



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de Araçatuba

LAURA CERETTI COACHMAN

**Efeitos da melatonina sobre a proliferação induzida pela
norepinefrina e epinefrina em células de câncer de boca**

**Araçatuba
2020**

LAURA CERETTI COACHMAN

Efeitos da melatonina sobre a proliferação induzida pela norepinefrina e epinefrina em células de câncer de boca

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título Cirurgião Dentista.

Orientador: Prof. Dr. Daniel Galera Bernabé

Araçatuba

2020

Ao **amor incondicional**, que permeia e sustenta todo o Universo.

À **coragem** para acessá-lo.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que me acolhe e lapida diariamente.

A vida, que me permite evoluir.

Aos meus pais, John William Coachman e Aparecida Ceretti pela vida e todo amor fornecido. Não tenho como expressar meu amor por vocês e minha gratidão por todo apoio e atenção incondicional que recebo.

Ao meu amor, melhor amigo e companheiro, Rudinei Cordeiro, que trilha comigo uma jornada com cumplicidade, amor e respeito.

À minha família e amigos, pelo apoio e ensinamentos de amor.

A todos os mestres e pensadores que contribuíram e contribuem para expansão da consciência.

A todos os seres que passaram pela minha jornada e me permitiram aprenderizado.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, na pessoa do diretor da Faculdade de Odontologia de Araçatuba Prof. Dr. Glauco Issamu Miyahara e do vice-diretor Prof. Dr. Alberto Carlos Botazzo Delbem.

A Profa. Dra. Aline Satie Takamiya, que muito contribuiu para minha evolução pessoal e profissional, sendo fundamental para conclusão deste trabalho. Não posso colocar em palavras tamanha admiração e gratidão pelos ensinamentos a mim

transmitidos. Meus mais profundos agradecimentos pela amizade e auxílio em momentos delicados e desafiadores.

A Profa. Dra. Sandra Helena Penha Oliveira, pela inspiração diária e confiança em minha capacidade. Agradeço pelas aulas de farmacologia, não somente devido ao conteúdo da disciplina, mas por nos inspirar força, determinação e paixão pela vida em todas as suas nuances. Honrarei os conhecimentos adquiridos para proporcionar o melhor a todo paciente que chegar a mim necessitando de ajuda

Ao Prof. Dr. Daniel Galera Bernabé, professor da disciplina de Estomatologia desta faculdade, pela oportunidade de crescimento e confiança, além de toda a atenção e tempo dispensado na orientação desta trajetória. Agradeço por me permitir adentrar neste estudo que tanto faz sentido para minha jornada. Levarei esta etapa, juntamente com a admiração que tenho pela sua pessoa, para sempre em meu coração.

A toda a equipe do Núcleo de pesquisa de Psiconeuroimunologia que me auxiliou para que este trabalho acontecesse. Agradeço por me inspirarem a construir um trabalho íntegro.

Ao Departamento de Ciências Básicas e todos os profissionais e alunos que lá trabalham. Agradeço por toda infraestrutura e equipamentos necessários que tive acesso para que este estudo fosse possível.

À Disciplina de Estomatologia desta faculdade e os seus docentes Dr. Éder Ricardo Biasoli, Dr. Glauco Issamu Miyahara, Dr. Daniel Galera Bernabé, por todo conhecimento que pude acessar durante a experiência da graduação.

A todos os professores, colaboradores, técnicos e funcionários desta faculdade que permitem acolhimento, conhecimento e evolução para seus alunos.

Às agências de fomento que financiaram este estudo. Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e Pro Reitoria de Pesquisa – UNESP, PROPE.

“Quero lembrá-lo de que todas as coisas materiais provêm do campo invisível do imaterial, além do espaço e do tempo. Dito de forma simples, ao plantar sementes neste mundo, você vê que no devido tempo elas frutificam. Se você consegue experimentar um sonho de modo tão completo na mente e nas emoções, dentro do mundo interior dos potenciais, ele já aconteceu. Assim, simplesmente entregue-se, ele tem de brotar em sua vida exterior. É a lei.”

JOE DISPENZA

COACHMAN, LC. **Efeitos da melatonina sobre a proliferação induzida pela norepinefrina em células de câncer de boca.** Trabalho de Conclusão de Curso – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista – “Júlio de Mesquita Filho”, Araçatuba, 2020.

RESUMO

O presente estudo teve por objetivo avaliar a regulação da melatonina (MT) sobre proliferação celular e expressão de interleucina-6 (IL-6) em células de câncer de boca induzida pela norepinefrina (NE) e epinefrina (EP). Primeiramente, células das linhagens SCC9 e SCC25 foram cultivadas em meio de cultura composto de Eagle modificado por Dulbecco's (DMEM) e meio de cultura F12 (DMEM/F12) e mantidas a 37°C em atmosfera úmida de 5% de gás carbônico (CO₂). Os estímulos hormonais foram realizados por 3, 6 e 24h com MT em concentrações de 1mM, 5mM e 10mM, EP 10 µM e NE 10 µ. Para os grupos em que se avaliou o efeito da MT com os hormônios do estresse, as células foram estimuladas com MT (1mM, 5mM e 10mM) 1 hora antes dos estímulos com EP (10 µM) e NE (10 µM). Células não estimuladas foram utilizadas como controle. O potencial proliferativo das células foi avaliado pela técnica de BrdU com kit específico e por ensaio de MTT. A expressão de IL-6 foi analisada por rt-PCR em tempo real. Os resultados mostraram que os hormônios epinefrina e norepinefrina induziram aumento da proliferação das células SCC9 e SCC25 em todos os períodos avaliados. A melatonina em concentrações de 5 e 10 mM promoveu redução da proliferação celular induzida pela epinefrina e norepinefrina. A expressão gênica de IL-6 mostrou-se aumentada após 6 horas de tratamento com norepinefrina e epinefrina (10 µM). O tratamento com melatonina (5 mM) foi capaz de reduzir significativamente a expressão de IL-6 induzida pelos hormônios do estresse. Estes resultados em conjunto denotam que a melatonina pode atenuar a proliferação de células de câncer de boca induzida por hormônios relacionados ao estresse, efeito este que pode ter sido associado à influência da melatonina sobre a expressão de IL-6.

Palavras-chave: melatonina, câncer de boca, estresse, norepinefrina, epinefrina, Interleucina-6.

COACHMAN, LC. **Effects of melatonin on induced proliferation of norepinephrine in oral cancer cells.** Trabalho de Conclusão de Curso – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista – “Júlio de Mesquita Filho”, Araçatuba, 2020.

ABSTRACT

The present study aimed to evaluate the regulation of melatonin on cell proliferation and IL-6 expression by norepinephrine and epinephrine-induced oral cancer cells. First, SCC9 and SCC25, cell strains were cultured in Dulbecco's modified Eagle's compound culture medium (DMEM) and F12 culture medium (DMEM / F12) and maintained at 37 ° C in a humidified 5% CO₂ atmosphere. Hormonal stimuli were performed with norepinephrine (10 µM) and epinephrine (10 µM) for 3, 6 and 24h in the presence or absence of melatonin (1 mM, 5 mM and 10 mM). Unstimulated cells were used as controls. Cell proliferative potential was evaluated by BrdU technique with specific kit and MTT assay. IL-6 expression was analyzed by rt-PCR in real time. The results showed that the epinephrine and norepinephrine hormones induced significant increase of SCC9 and SCC25 cell proliferation in all periods evaluated. Melatonin at concentrations of 5 and 10 mM demonstrated potential to reduce epinephrine and norepinephrine-induced cell proliferation. IL-6 gene expression was significantly increased after treatment with norepinephrine and epinephrine (10 µM) after 6 hours. Treatment with melatonin (5 mM) in the presence of epinephrine or norepinephrine was able to significantly reduce IL-6 expression. These findings showed that melatonin may affect the proliferation of oral cancer cells induced by stress-related hormones (norepinephrine and epinephrine) and this effect was mediated by IL-6 expression.

Key words: melatonin, oral cancer, stress, noradrenaline, epinephrine, interleukin-6.

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1 – Gráficos dos resultados do ensaio de viabilidade celular (MTT) realizado com a linhagem SCC9 em diferentes tempos.....25

Figura 2 – Gráficos dos resultados do ensaio de viabilidade celular (MTT) realizado com a linhagem SCC25 em diferentes tempos.....26

Figura 3 - Gráficos dos resultados do ensaio de proliferação celular (BrdU) realizado com a linhagem SCC9 em diferentes tempos.....27

Figura 4 - Gráficos dos resultados do ensaio de proliferação celular (BrdU) realizado com a linhagem SCC25 em diferentes tempos.....28

Figura 5 – Gráficos dos resultados da expressão de mRNA IL-6 (PCR) realizado com as linhagens SCC9 e SCC9.....29

LISTAS DE SIGLAS

IL-6 – Interleucina 6

DMEM – Eagle modificado por Dulbecco's

F12 – Nutrient Mixture

CO₂ – Gás Carbônico

mM – Milimolar

μM – Micromolar

μg – Micograma

μL – Microlitro

nm – Nanômetro

pmol – Picomol

nmol – Nanômol

MTT – 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina

BrdU – BrdU Cell Proliferation Kit

NE – Norepinefrina

EP – Epinefrina

MT – Melatonina

SNS – Sistema Nervoso Simpático

HPA – Hipotalâmico-hipofisário-adrenal

CEC – Carcinoma Espinocelular

MMPs – Metaloproteinases

VEGF – Fator de Crescimento Endotelial Vascular

LCR – Líquido Cefalorraquidiano

LSD1 – Histona Desmetilase Específica de Lisina 1

HIF-1α – Fator 1-alfa induzível por hipóxia

ROCK-1 – Proteína-quinase 1

p38 MAPK – Proteínas Cinases ativadas por Mitogênio P38

NFKB – Factor Nuclear Kappa B

BCL-2 – Linfoma de Célula B 2

RT-PCR – Transcrição Reversa Seguida de Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

RNA – Ácido Ribonucleico

cDNA – DNA curto

RNAm – RNA mensageiro

SUMÁRIO

1. Título: Efeitos da melatonina sobre a proliferação induzida pela norepinefrina e epinefrina em células de câncer de boca.....	1
2. Resumo.....	6
3. Abstract.....	7
4. Introdução.....	12
5. Metodologia.....	16
6. Resultados.....	20
7. Discussão.....	22
8. Conclusão.....	25
9. Referências.....	30

4 INTRODUÇÃO

O câncer de boca é o principal tipo de câncer de cabeça e pescoço e o sexto tipo mais comum de neoplasia maligna na população mundial ¹. O Carcinoma Espinocelular (CEC) é o câncer de boca mais prevalente e apresenta como principais fatores etiológicos o tabagismo e o alcoolismo crônico. Cerca de 300.000 novos casos CEC de boca são diagnosticados anualmente no mundo e este número vem crescendo particularmente na população mais jovem ². Mais da metade dos portadores de CEC de boca apresentam metástases regionais ou à distância no momento do diagnóstico, o que explica o alto índice de mortalidade para a doença em média após 5 anos. ¹ Justamente por ameaçar a sobrevivência e a qualidade de vida dos pacientes, o diagnóstico do câncer, seu tratamento e o processo de sobrevivência à doença podem ser extremamente estressantes fazendo com que os pacientes experimentem altos níveis de ansiedade, depressão, irritabilidade, estresse físico e psicológico.

O estresse tem sido considerado uma condição intrínseca dos seres humanos, sendo essencial para estimular os indivíduos a perceberem e reagirem aos desafios internos e externos da vida apresentando, portanto, efeitos adaptativos e protetores em curto prazo. Entretanto, esta condição parece ser nociva nos casos em que se torna crônica, como ocorre normalmente no câncer.

Em geral, o estresse crônico é acompanhado pelo aumento dos níveis de norepinefrina (NE) e epinefrina (E), catecolaminas liberadas pela medula supra-renal e pelos neurônios do sistema nervoso simpático (SNS). O estresse também pode acarretar elevação da produção do hormônio cortisol, devido uma desregulação do eixo hipotalâmico-hipofisário-adrenal (HPA) ^{3,4}.

Alguns estudos demonstraram pontualmente que o estresse crônico e seus neurohormônios podem influenciar o aparecimento e progressão do câncer ^{3,5,6}. Pesquisas

recentes revelaram que a norepinefrina pode, por exemplo, aumentar a neovascularização tumoral e o consequente crescimento de tumores malignos ^{3,4}. Estes efeitos são mediados por receptores β -adrenérgicos e podem também alterar a expressão de moléculas angiogênicas no microambiente tumoral ⁷. Os hormônios derivados do estresse crônico também são capazes de reduzir a citotoxicidade das células natural killers, inibindo a resposta celular para algumas citocinas e agindo diretamente em células tumorais, alterando a produção de quimiocinas, fatores de crescimento e citocinas ^{8,9}.

Diversos estudos têm mostrado que a norepinefrina, em condições que simulam o estresse, pode desregular a expressão de moléculas associadas à proliferação e invasão das células cancerígenas em células de câncer de mama, ovário, próstata e pele ³⁻⁶. Xie et al., ¹⁰ utilizando um modelo ortotópico em camundongos atímicos, mostraram que o estresse crônico por retenção aumentou o crescimento do CEC de boca. Este resultado foi acompanhado por aumento dos níveis plasmáticos de norepinefrina e aumento da expressão de metaloproteinases (MMPs) e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF). Também foi demonstrado que a norepinefrina, em concentrações que simulam o estresse crônico, estimulou a proliferação celular em células de CEC de boca. Este evento foi mediado por receptores beta-adrenérgicos e pela secreção de Interleucina-6 (IL-6), uma citocina pró-inflamatória associada à angiogênese e progressão tumoral ¹¹. Estudos clínicos também demonstram que níveis sistêmicos de IL-6 pré-tratamento são preditivos para a recidiva e menor sobrevida de pacientes com câncer de cabeça e pescoço ^{12,13}.

A melatonina é um hormônio sintetizado pela glândula pineal em resposta ao escuro e secretada no sangue e líquido cefalorraquidiano (LCR). Este hormônio apresenta papel fundamental no ciclo circadiano, na regulação da pressão arterial, reprodução sazonal e tempo de sono. Ensaios clínicos e experimentos laboratoriais têm demonstrado

que a melatonina possui a capacidade de regular a progressão tumoral e ocorrência de metástases do câncer de cabeça e pescoço ¹². Em doses farmacológicas, a melatonina é capaz de suprimir a proliferação de células do câncer de boca, reduzindo a expressão de histona desmetilase específica de lisina 1 (LSD1) ¹³. Associado a seu efeito em reduzir a viabilidade de linhagens celulares de CEC de boca, evidências apontam que a melatonina pode diminuir a produção das moléculas pró-angiogênicas fator 1-alfa induzível por hipóxia (HIF-1 α) e VEGF, e inibir a expressão de genes pró-metastáticos como a proteína-quinase 1 (ROCK-1) ¹⁴. Além disso, tem sido reportado que a melatonina pode reduzir a proliferação de células do câncer de cabeça e pescoço por reduzir os danos causados por espécies tóxicas derivadas do oxigênio ¹². A melatonina também regula a proliferação e a apoptose em vários tipos de câncer devido sua ação sobre a via de sinalização do p53, gene supressor de tumor que reconhece e repara danos ao DNA, bem como regula o ciclo celular, proliferação e apoptose ¹². Investigações em outros modelos biológicos mostram que a melatonina reduz a secreção de IL-6 em cultura de monócitos, e diminui os níveis desta citocina pró-inflamatória via ativação de proteínas cinases ativadas por mitogênio P38 (p38 MAPK) e factor nuclear kappa B (NFkB) ¹⁵. Além disso, a melatonina pode regular os níveis de citocinas pró-inflamatórias em alguns modelos de câncer. Porém, até o momento, não existem evidências da influência da melatonina sobre a produção de IL-6 por células do câncer de cabeça e pescoço. Como visto, enquanto os hormônios do estresse, como a norepinefrina, podem aumentar a proliferação celular e induzir dano ao DNA nas células cancerígenas, evidências demonstram que a melatonina possui efeitos anti-proliferativos. Até o momento não há estudos que tenham investigado as interações desses dois hormônios sobre o comportamento das células do câncer de boca.

Este estudo teve, portanto, o objetivo de avaliar a regulação da melatonina sobre proliferação celular e expressão de IL-6 por células de câncer de boca induzida pela norepinefrina e epinefrina.

5 METODOLOGIA

5.1 Cultura de células

As linhagens celulares derivadas de CEC de boca SCC9 (paciente masculino 25 anos) e SCC25 (paciente masculino 70 anos), ATCC, EUA, foram utilizadas para avaliar os efeitos da melatonina sobre a proliferação celular e sobre a expressão gênica de IL-6 induzida pela norepinefrina e epinefrina. As células foram cultivadas em meio de cultura Eagle modificado por Dulbecco's (DMEM) e F12 (DMEM/F12; Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) na proporção 1:1, suplementado com 10% de soro fetal bovino (GIBCO, Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA), 100 µg/ml de penicilina e 0,1% de gentamicina. As células foram mantidas em condições padrão de cultivo celular a 37°C e atmosfera úmida com 5% de CO₂.

5.2 Estímulos hormonais

Para realização dos estímulos hormonais as células SCC9 e SCC25 foram plaqueadas em placas de 96 poços para os ensaios de proliferação celular BrdU (BrdU Cell Proliferation Kit, Chemicon, Millipore, USA) e MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-il] - 2,5-difenil brometo de tetrazolium) (Sigma ChemicalCo., St. Louis, Mo, USA), com 7 x 10⁴ células por poço, e em placas de 24 poços para o ensaio de PCR tempo real, com 10⁵ células por poço. Para todos os ensaios as células de ambas as linhagens foram plaqueadas em meio de cultura DMEM/F12 com 10% de soro fetal bovino (GIBCO, Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA), 100 µg/ml de penicilina e 0,1% de gentamicina. Quarenta e oito horas após o plaqueamento e ao atingirem cerca de 50% de confluência, as células foram mantidas por mais 24 horas em meio de cultura DMEM/F12 em concentração reduzida de soro fetal bovino de 0,5%. Posteriormente, as células foram

estimuladas por 3, 6 e 24h com MT em concentrações de 1mM, 5mM e 10mM, EP 10µM e NE 10 µM. Para os grupos em que se avaliou o efeito da MT com os hormônios do estresse, as células foram estimuladas com MT (1 mM, 5mM e 10mM) 1 hora antes dos estímulos com EP (10µM) e NE (10µM) ⁶. Células não estimuladas foram utilizadas como controle.

5.3 Ensaio de Proliferação celular – BrdU

Células cultivadas e estimuladas de acordo com os itens 5.1 e 5.2 foram utilizadas para avaliação do potencial proliferativo utilizando-se a técnica de incorporação de BrdU com kit específico (BrdU Cell Proliferation Kit, Chemicon, Millipore, USA) de acordo com as recomendações do fabricante.

5.4 Ensaio de Proliferação celular – MTT

Para análise da proliferação celular pelo ensaio de MTT, células SCC9 e SCC25 foram cultivadas e estimuladas conforme descrito acima nos itens 5.1 e 5.2, respectivamente. Na sequência, as células viáveis foram então coradas com o corante formazam (3-[4,5-dimethylthiazol-2-il] -2,5-difenil brometo de tetrazolium) (MTT) (Sigma ChemicalCo., St. Louis, Mo, USA). A solução de MTT (5mg de 2,5-difenil brometo de tetrazolium) foi dissolvida em 1 mL de PBS, filtrada e esterilizada utilizando filtro Millipore 0,22 µm (Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Suíça). Então, foi adicionado a cada poço 100 µL da solução (10 µL de MTT por 90 µL de meio de cultura) contendo as células pós-estímulo onde permaneceram incubados por 2 horas a 37°C em 5% de CO₂ e 100% de umidade. Posteriormente, a solução de MTT foi retirada dos poços e descartada. Álcool isopropílico (100 µL) (Merck KGaA, Darmstadt, Hesse, Alemanha) foi adicionado às células e deixadas em mesa agitadora à temperatura ambiente por 30

minutos para dissolução dos cristais azuis formados a partir do MTT. A solução azul foi então transferida para uma placa de microtitulação de 96 poços e levada ao espectrofotômetro (Spectra Max 190; Molecular Devices, Sunnyvale, California, USA) para mensuração das absorbâncias em comprimento de onda ajustado para 570 nm.

5.5 Análise da expressão de RNAm para IL-6 nas linhagens tumorais por RT-PCR em tempo real

RT-PCR em tempo real foi utilizado para avaliar a expressão de IL-6 pelas linhagens celulares SCC9 e SCC25 estimuladas com os hormônios melatonina, norepinefrina e epinefrina conforme descrito no item 5.2. O RNA total foi extraído com Trizol. Para isto, após os estímulos de 6 horas removeu-se os sobrenadantes e acrescentou-se 1mL de Trizol por poço para a coleta. Amostras de RNA foram suspensas em 20 µL de água ultrapura livre de RNase e estocadas a -80°C para síntese de DNA complementar (cDNA). A quantidade e qualidade do RNA foram verificadas por espectrofotometria e o cDNA foi sintetizado com kit específico (High Capacity RNA to cDNA kit; Invitrogen Life Technologies) usando-se 2 µg de RNA total de acordo com as recomendações do fabricante. Níveis de RNAm para o gene estudado foi mensurado pelo sistema Taqman® no aparelho de PCR em tempo real Step-one (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) de acordo com recomendações do fabricante. O gene da β -actina foi usado como controle endógeno. Para cada gene testado foram utilizados primers inventoriados (Invitrogen Life Technologies; USA), sendo: β -actina (Hs01060665_g1) e IL-6 (Hs00174131_m1). As reações foram realizadas com volume final de 20 µl e cada amostra foi corrida em triplicata. As condições térmicas de ciclagem usadas foram universais de acordo com as recomendações do fabricante. Os níveis de expressão de IL-6 em cada amostra foram normalizados para os níveis de RNAm da β -actina. A

quantidade relativa (RQ) de RNAm IL-6 foi calculada utilizando o método de CT comparativo. Os resultados foram apresentados em porcentagem de aumento ou redução da expressão do gene alvo nas células tratadas com os hormônios em relação às células não estimuladas (grupos controles).

5.5 Análise estatística

Os dados obtidos foram analisados estatisticamente pelo teste ANOVA e na sequência pelo teste de Bonferroni. $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

6 RESULTADOS

6.1 A melatonina inibe a proliferação das células do CEC de boca induzida pelos hormônios do estresse

O ensaio de MTT foi utilizado para avaliar o efeito da MT sobre o potencial proliferativo induzido pelos hormônios NE e EP. O MTT mostrou que o tratamento das células SCC9 e SCC25 com EP e NE por 3, 6 e 24h aumentou significativamente a proliferação celular comparado às células não tratadas (Figura 1 e 2).

O efeito da MT sobre as células SCC9 e SCC25 variou de acordo com a concentração. Melatonina 1 mM estimulou a proliferação das células SCC9 após 3 e 24h (Figura 1 A, C, D e F), já para as células SCC25 o aumento na proliferação celular foi observado após 6 h de tratamento (Figura 2 B e E). As maiores concentrações de MT, por outro lado, reduziram a proliferação das células SCC9 em todos os períodos avaliados, e das células SCC25 somente após 24 h de tratamento (Figura 2).

A estimulação das células SCC9 com MT (1, 5 e 10 mM) 1 hora antes da exposição à NE e EP foi capaz de reverter o efeito proliferativo induzido por esses hormônios em todos os períodos analisados (Figura 1). Para a linhagem celular SCC25, a MT nas maiores concentrações (5 e 10 mM) inibiu significativamente o potencial proliferativo induzido pela EP em todos os períodos estudados (Figuras 2 A, B, C). O efeito da NE nas células SCC25 foi revertido pela MT nas maiores concentrações após 6 e 24h (Figura 2 E e F).

O ensaio de BrdU também confirmou o aumento da proliferação celular induzido pelos hormônios relacionados ao estresse nas células SCC9 (EP após 24 h; NE após 6 e 24 h) (Figura 3 C, D e E) e SCC25 (EP após 3 e 6 h; NE após 3, 6 e 24h) (Figura 4 A, B, D, E e F). De maneira geral, a exposição das células SCC9 e SCC25 às concentrações

mais altas de MT (5 e 10 mM) reduziu significativamente a proliferação celular comparado às células não estimuladas em todos os períodos avaliados (Figuras 3 e 4). Como observado nas figuras 3 e 4 a estimulação das células SCC9 e SCC25 com MT nas maiores concentrações previamente aos estímulos com os hormônios do estresse reduziu significativamente a proliferação celular induzida pelos hormônios.

6.2 A melatonina regula a expressão de RNAm para IL-6 em células do CEC de boca estimuladas com epinefrina e norepinefrina

O tratamento das células SCC9 e SCC25 com hormônios relacionados ao estresse, EP e NE (10 μ M), aumentaram em aproximadamente 300% a expressão de RNAm para IL-6 após 6 horas de tratamento (Figura 5 A, B). Por outro lado, a estimulação das células SCC9 com MT à 5 mM reduziu significativamente a expressão de IL-6 comparado às células SCC9 não estimuladas. Em relação as células SCC25 esta redução da expressão de IL-6 provocada pela MT não atingiu significância s (Figura 5 A, B). Uma forte inibição da expressão aumentada de IL-6 induzida pelos hormônios do estresse foi observada após o tratamento com MT (5 mM) nas células SCC9 (EP) e SCC25 (EP e NE) (Figura 5 A e B).

7 DISCUSSÃO

Este estudo forneceu as primeiras evidências de que a melatonina pode influenciar a resposta proliferativa de células de câncer de boca estimuladas por hormônios relacionados ao estresse crônico. Os resultados demonstraram que a MT foi capaz de inibir a proliferação celular e reduzir a expressão de IL-6 em células de CEC de boca estimuladas com EP e NE.

Sabe-se que a NE e a EP regulam várias funções vitais. Em condições normais, os níveis circulantes de NE e a EP variam de 10 pmol/L a 1 nmol/L; no entanto, sob condições de estresse psicológico, esses níveis podem aumentar até 100 nmol/L após a ativação do eixo simpático-adrenal-medular ¹⁶. O fato da resposta simpática ao estresse ter característica sistêmica reforça a ideia de que as células no microambiente tumoral podem estar sujeitas a alterações causadas por níveis hormonais que ocorrem à distância e localmente ¹⁷. Entre os pacientes diagnosticados com câncer, a hiperatividade acima do nível basal desse eixo simpático-adrenal-medular tem sido reportada e pode estar relacionada ao estresse e sintomas de depressão, ansiedade e irritação ¹⁸.

Os dados obtidos na presente pesquisa demonstraram que concentrações de EP e NE que simulam aquelas encontradas no microambiente tumoral sob condições de estresse crônico, induziram um aumento significativo na proliferação celular de ambas as linhagens de carcinoma de boca, SCC9 e SCC25, após os diferentes períodos de tratamento. Sood et al. ¹⁹ também encontraram que concentrações de NE e EP que mimetizam as encontradas em condições de estresse, aumentaram significativamente o potencial invasivo e a proliferação de células de câncer de ovário. Outro estudo também apontou que o tratamento com NE em concentrações semelhantes às secretadas em condições de estresse crônico aumentou o potencial metastático em camundongos com câncer de próstata, aumentando significativamente a atividade migratória das células

cancerígenas de maneira dependente da concentração do hormônio ²⁰. Anteriormente nossa equipe já havia reportado que a NE promove aumento da proliferação das células do SCC9 e SCC25 ¹¹, mas estes mesmos resultados com o hormônio EP ainda não haviam sido demonstrados.

A MT é um hormônio produzido principalmente pela glândula pineal, e tem atividade oncostática devido a sua capacidade de reduzir o estresse oxidativo inibindo a atividade de enzimas pró-oxidativas e estimulando enzimas antioxidantes, atividade anti-inflamatória e de vasoregulação. Além disso, a MT tem capacidade de modular o sistema imunológico aumentando a imunidade inata e adquirida e age como reguladora do ciclo circadiano ²¹⁻²⁴. Estudo recente de nosso grupo mostrou que ratos com supressão da secreção de melatonina por pinelectomia apresentaram maior ocorrência de carcinomas de boca induzidos quimicamente ²⁵. Os tumores dos ratos pinelectomizados também se apresentaram mais agressivos que os tumores dos animais sham (controle). Em nosso estudo, o tratamento das células com melatonina em concentrações de 5 e 10 mM foi capaz de inibir a proliferação das células SCC9 e SSC25 estimuladas com NE e EP. Lui et al ²⁶ também encontraram que a MT exerceu um efeito antiproliferativo e de antiangiogênese em células de câncer de boca. Resultados semelhantes também foram observados em um estudo conduzido por Colombo J. et al. ²⁷ em que a MT à 1 mM reduziu a proliferação, migração e invasão de células de hepatocarcinoma.

A literatura tem mostrado que a MT possui uma estrutura lipofílica que penetra as membranas celulares difundindo-se facilmente para o núcleo e mitocôndria, interagindo tanto com estruturas extracelulares como intracelulares. Desta forma, a MT é capaz de induzir atraso do ciclo celular na fase S, diminuição do consumo de oxigênio, regulação negativa da expressão de linfoma de células B 2 (Bcl-2) e aumento do estresse oxidativo, resultando em morte celular independente da caspase-3 ²⁸. Estes efeitos

poderiam, pelo menos em parte, explicar a redução da proliferação celular observada no presente estudo após o tratamento com melatonina.

Os resultados também mostraram que as células estimuladas com NE e EP mostraram aumento da expressão de IL-6 e o tratamento com MT foi capaz de reduzir a expressão desta citocina tanto nas células SCC9 como nas células SCC25. A inibição da expressão de IL-6 estimulada pela NE e EP nas células de CEC de boca também poderia ser um mecanismo envolvido na redução da proliferação celular observada após o tratamento de ambas as linhagens com melatonina. . Estudos demonstraram que níveis elevados de IL-6 estão associados à invasão, aumento do tamanho de tumores, metástases e diminuição da sobrevida de pacientes com câncer de boca ¹⁵, além de estar associada à metástase, angiogênese e invasão em outros diversos tipos de câncer ²⁹. Thomas et al. ³⁰ também apontaram que a IL-6 é capaz de contribuir para a imunossupressão, além de levar a uma maior proliferação, invasividade e progressão do tumor pancreático. Portanto, os resultados do presente estudo indicam um possível papel protetor da melatonina nos efeitos dos neurohormônios relacionados ao estresse sobre a progressão do câncer de boca.

8 CONCLUSÃO

O hormônio melatonina reduz a proliferação das células de câncer de boca induzida pelos hormônios do estresse epinefrina e norepinefrina. Este efeito pode estar relacionado a via de inibição promovida pela melatonina na expressão da citocina IL-6 nas células tumorais.

Figuras

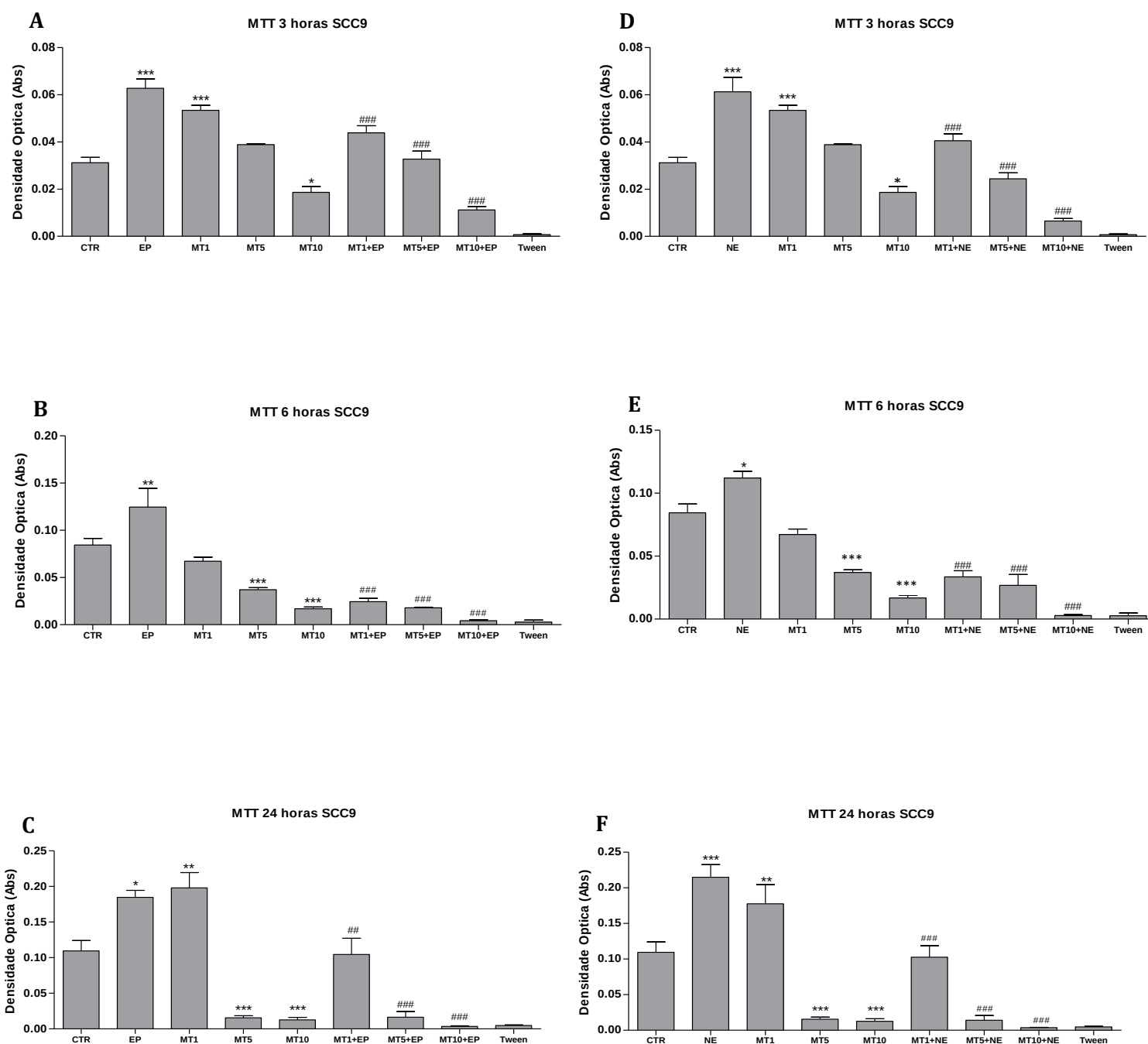


Figura 1. Células SCC9 foram estimuladas com EP (10 μ M), NE (10 μ M), MT (1, 5 e 10 mM), MT (1, 5 e 10 mM) + EP (10 μ M) e MT (1, 5 e 10 mM) + NE (10 μ M). Células não estimuladas foram utilizadas como controle. MTT foi realizado nos períodos de (A e D) 3, (B e E) 6 e (C e F) 24 horas. * p <0,05, ** p <0,01 e *** p <0,001 comparado ao grupo controle e ## p <0,01 e ### p <0,001 comparado aos grupos estimulados somente com EP ou NE, utilizando ANOVA com correção de Bonferroni. Barras representam o desvio padrão da média.

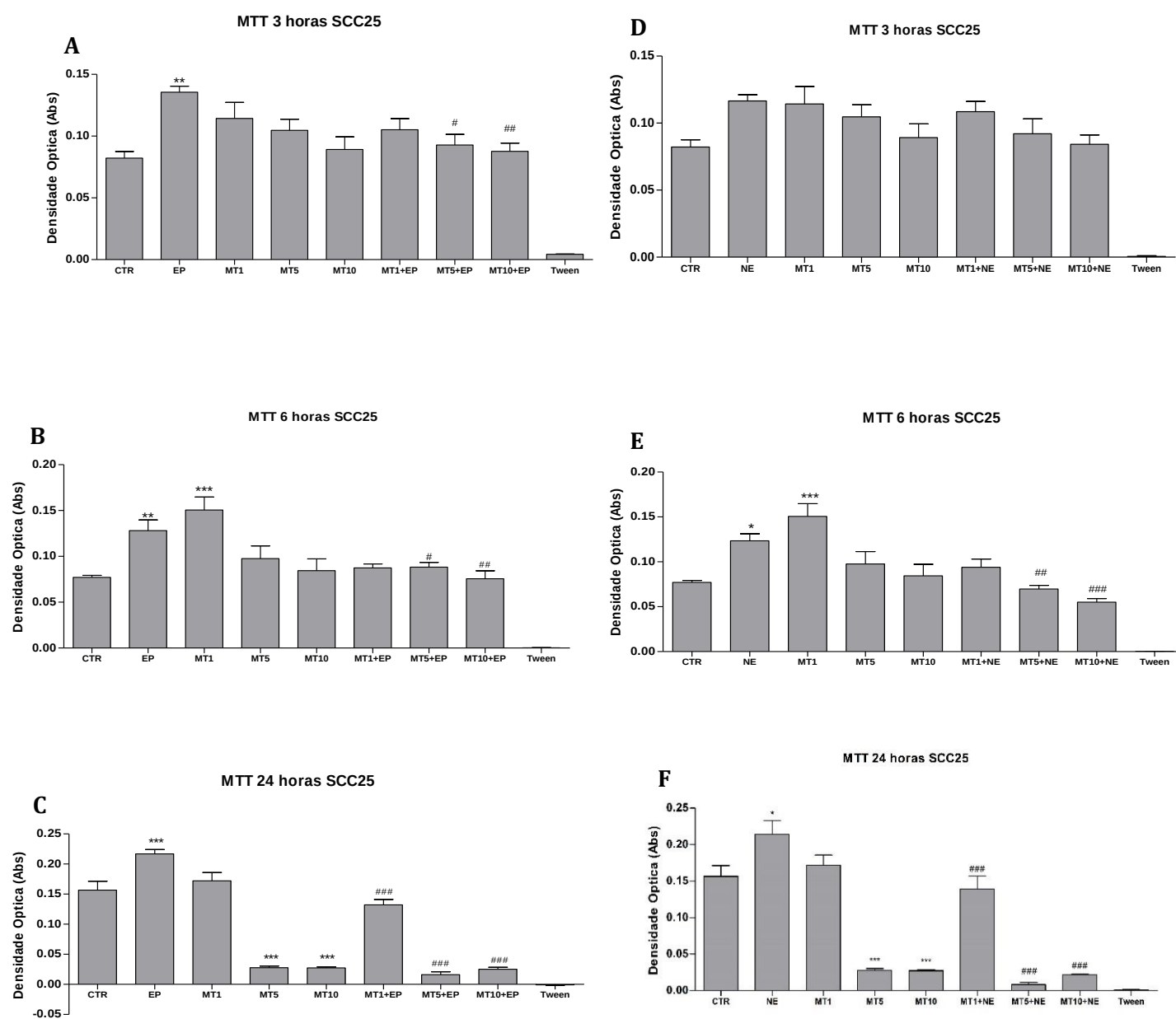


Figura 2. Células SCC25 foram estimuladas com EP (10 μ M), NE (10 μ M), MT (1, 5 e 10 mM), MT (1, 5 e 10 mM) + EP (10 μ M) e MT (1, 5 e 10 mM) + NE (10 μ M). Células não estimuladas foram utilizadas como controle. MTT foi realizado nos períodos de (A e D) 3, (B e E) 6 e (C e F) 24 horas. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ comparado ao grupo controle e ## $p < 0,01$ e ### $p < 0,001$ comparado aos grupos estimulados somente com EP ou NE, utilizando ANOVA com correção de Bonferroni. Barras representam o desvio padrão da média.

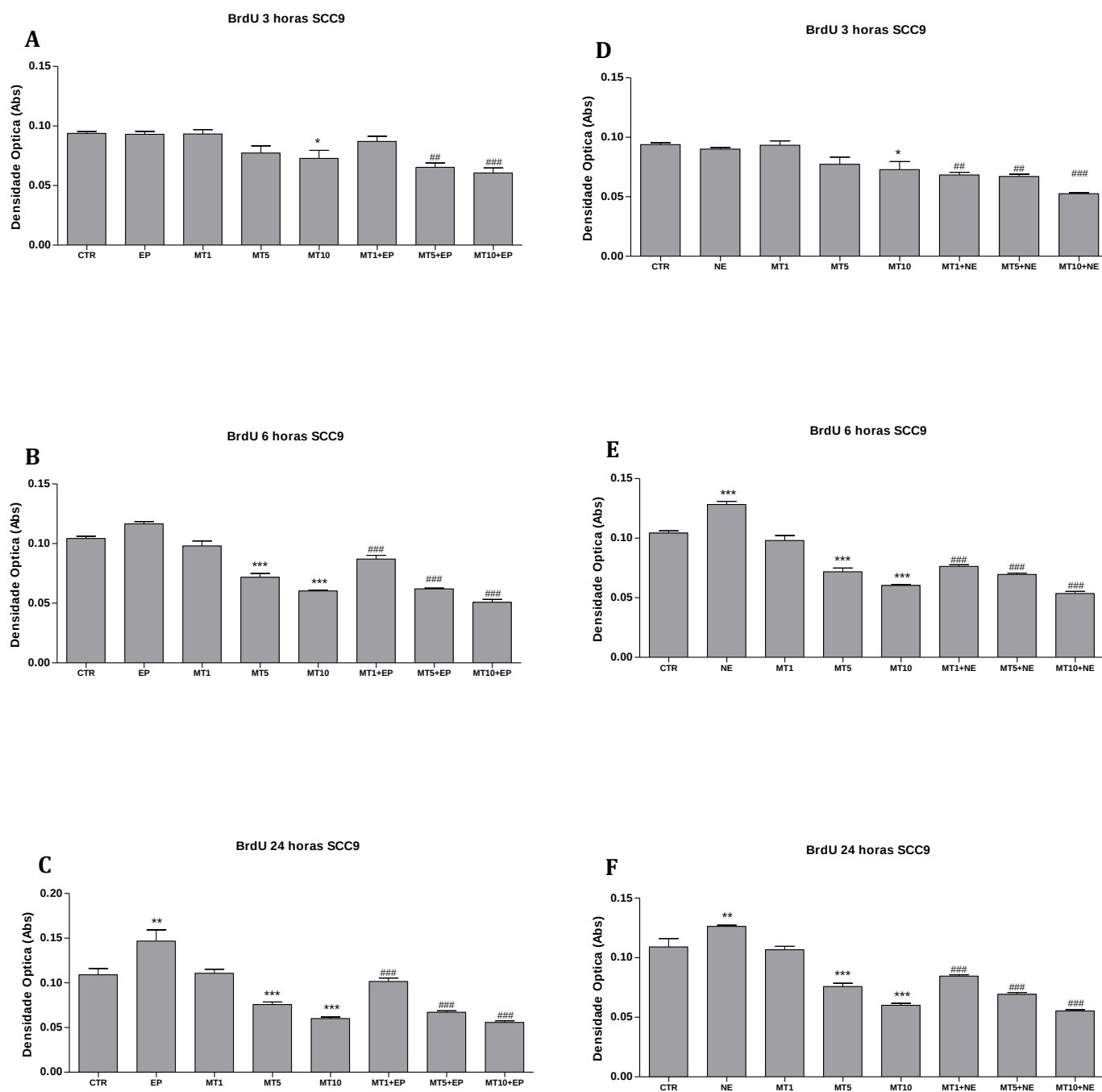


Figura 3. Células SCC9 foram estimuladas com EP (10 μ M), NE (10 μ M), MT (1, 5 e 10 mM), MT (1, 5 e 10 mM) + EP (10 μ M) e MT (1, 5 e 10 mM) + NE (10 μ M). Células não estimuladas foram utilizadas como controle. BrdU foi realizado nos períodos de (A e D) 3, (B e E) 6 e (C e F) 24 horas. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ comparado ao grupo controle e ## $p < 0,01$ e ### $p < 0,001$ comparado aos grupos estimulados somente com EP ou NE, utilizando ANOVA com correção de Bonferroni. Barras representam o desvio padrão da média.

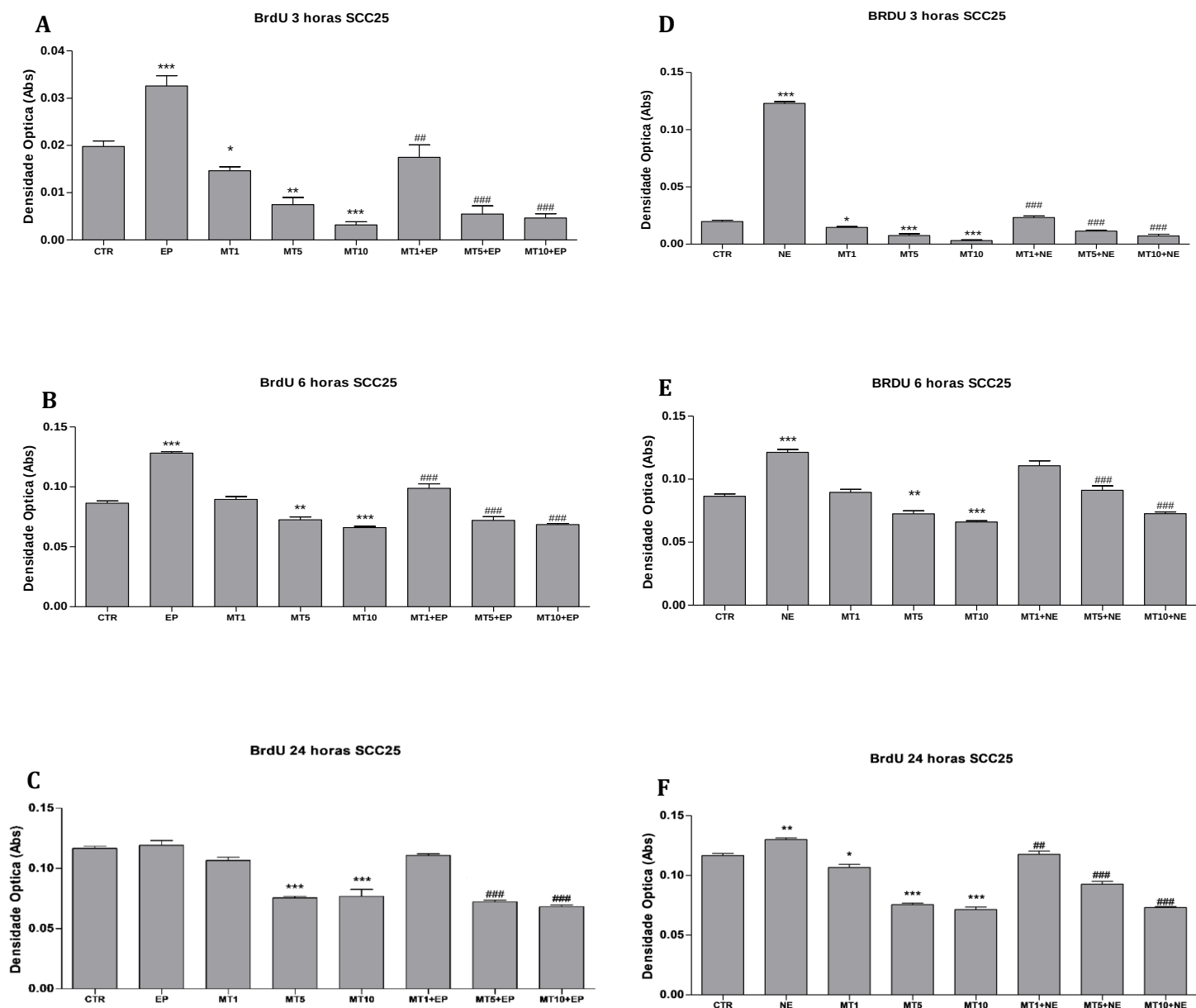


Figura 4. Células SCC25 foram estimuladas com EP (10 μ M), NE (10 μ M), MT (1, 5 e 10 mM), MT (1, 5 e 10 mM) + EP (10 μ M) e MT (1, 5 e 10 mM) + NE (10 μ M). Células não estimuladas foram utilizadas como controle. BrdU foi realizado nos períodos de (A e D) 3, (B e E) 6 e (C e F) 24 horas. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ comparado ao grupo controle e ## $p < 0,01$ e ### $p < 0,001$ comparado aos grupos estimulados somente com EP ou NE, utilizando ANOVA com correção de Bonferroni. Barras representam o desvio padrão da média.

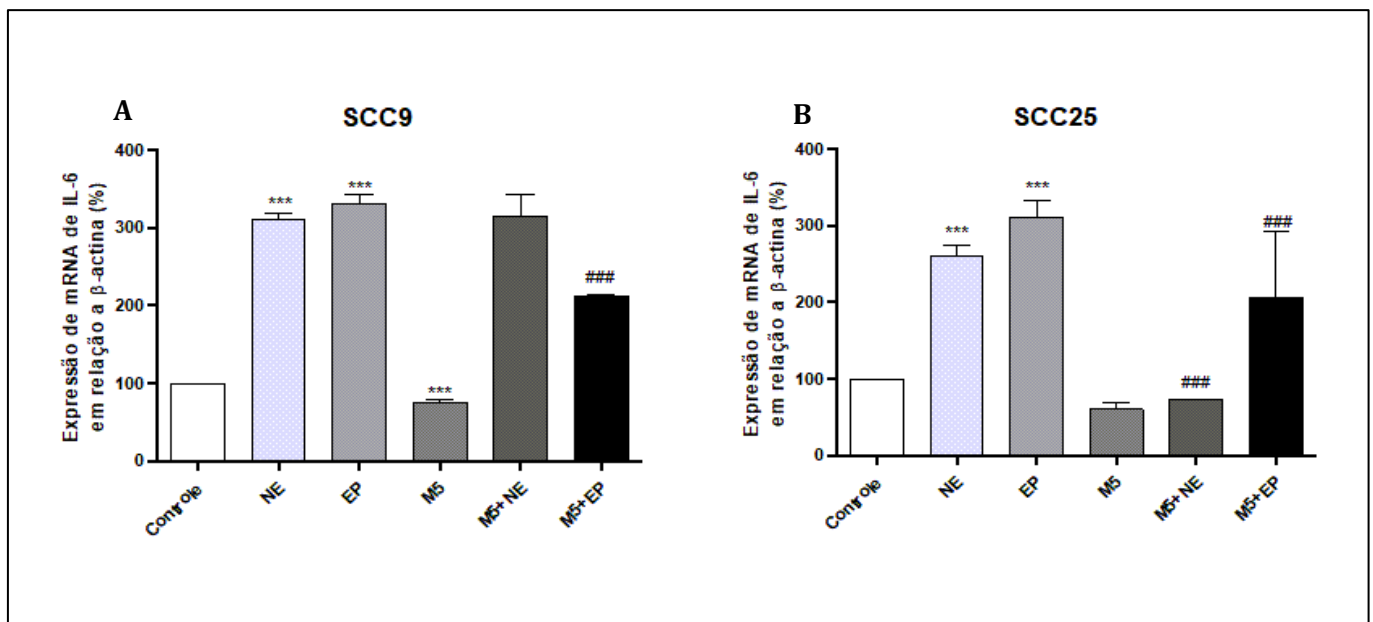


Figura 5. Células SCC9 e SCC25 foram estimuladas com EP (10 μ M), NE (10 μ M), MT (5mM), MT(5mM) + EP (10 μ M) e MT(5mM) + EP (10 μ M). As células foram coletadas após 6 horas de estímulo. O RNA total foi isolado e RT-PCR tempo real foi utilizado para quantificar a expressão de RNAm de IL-6. Os valores são apresentados como porcentagem de expressão de RNAm de IL-6 em relação ao controle (células não estimuladas). *** $p < 0,001$ comparado ao grupo controle e ### $p < 0,001$ comparado aos grupos estimulados somente com EP ou NE, utilizando ANOVA com correção de Bonferroni. Barras representam o desvio padrão da média.

9 REFERÊNCIAS

1. Ferlay J, Shin H-R, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer*. 2010;127(12):2893-2917. doi:10.1002/ijc.25516
2. Thomson PJ. Perspectives on oral squamous cell carcinoma prevention—proliferation, position, progression and prediction. *J Oral Pathol Med*. 2018;47(9):803-807. doi:10.1111/jop.12733
3. Thaker PH, Lutgendorf SK, Sood AK. The Neuroendocrine Impact of Chronic Stress on Cancer. *Cell Cycle*. 2007;6(4):430-433. doi:10.4161/cc.6.4.3829
4. Glaser R, Kiecolt-Glaser JK. Stress-induced immune dysfunction: implications for health. *Nat Rev Immunol*. 2005;5(3):243-251. doi:10.1038/nri1571
5. Reiche EMV, Nunes SOV, Morimoto HK. Stress, depression, the immune system, and cancer. *Lancet Oncol*. 2004;5(10):617-625. doi:10.1016/S1470-2045(04)01597-9
6. Antoni MH, Lutgendorf SK, Cole SW, et al. The influence of bio-behavioural factors on tumour biology: pathways and mechanisms. *Nat Rev Cancer*. 2006;6(3):240-248. doi:10.1038/nrc1820
7. Zahalka AH, Arnal-Estapé A, Maryanovich M, et al. Adrenergic nerves activate an angio-metabolic switch in prostate cancer. *Science*. 2017;358(6361):321-326. doi:10.1126/science.aah5072
8. Lutgendorf SK, Cole S, Costanzo E, et al. Stress-related mediators stimulate vascular endothelial growth factor secretion by two ovarian cancer cell lines. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2003;9(12):4514-4521.
9. Lim SS, Vos T, Flaxman AD, et al. A comparative risk assessment of burden of disease and injury attributable to 67 risk factors and risk factor clusters in 21 regions, 1990–2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *The Lancet*. 2012;380(9859):2224-2260. doi:10.1016/S0140-6736(12)61766-8

10. Xie H, Li C, He Y, Griffin R, Ye Q, Li L. Chronic stress promotes oral cancer growth and angiogenesis with increased circulating catecholamine and glucocorticoid levels in a mouse model. *Oral Oncol.* 2015;51(11):991-997. doi:10.1016/j.oraloncology.2015.08.007
11. Bernabé DG, Tamae AC, Biasoli ÉR, Oliveira SHP. Stress hormones increase cell proliferation and regulates interleukin-6 secretion in human oral squamous cell carcinoma cells. *Brain Behav Immun.* 2011;25(3):574-583. doi:10.1016/j.bbi.2010.12.012
12. Yeh C-M, Su S-C, Lin C-W, et al. Melatonin as a potential inhibitory agent in head and neck cancer. *Oncotarget.* 2017;8(52):90545-90556. doi:10.18632/oncotarget.20079
13. Yang C-Y, Lin C-K, Tsao C-H, et al. Melatonin exerts anti-oral cancer effect via suppressing LSD1 in patient-derived tumor xenograft models. *Oncotarget.* 2017;8(20):33756-33769. doi:10.18632/oncotarget.16808
14. Goncalves N, Rodrigues R, Jardim-Perassi B, et al. Molecular Markers of Angiogenesis and Metastasis in Lines of Oral Carcinoma after Treatment with Melatonin. *Anticancer Agents Med Chem.* 2014;14(9):1302-1311. doi:10.2174/1871520614666140812110246
15. Chen M-F, Wang W-H, Lin P-Y, Lee K-D, Chen W-C. Significance of the TGF- β 1/IL-6 axis in oral cancer. *Clin Sci.* 2012;122(10):459-472. doi:10.1042/CS20110434
16. Bierhaus A, Wolf J, Andrassy M, et al. A mechanism converting psychosocial stress into mononuclear cell activation. *Proc Natl Acad Sci.* 2003;100(4):1920-1925. doi:10.1073/pnas.0438019100
17. Eng JW-L, Kokolus KM, Reed CB, Hylander BL, Ma WW, Repasky EA. A nervous tumor microenvironment: the impact of adrenergic stress on cancer cells, immunosuppression, and immunotherapeutic response. *Cancer Immunol Immunother.* 2014;63(11):1115-1128. doi:10.1007/s00262-014-1617-9
18. McGregor BA, Antoni MH. Psychological intervention and health outcomes among women treated for breast cancer: A review of

- stress pathways and biological mediators. *Brain Behav Immun.* 2009;23(2):159-166. doi:10.1016/j.bbi.2008.08.002
19. Sood AK. Stress Hormone-Mediated Invasion of Ovarian Cancer Cells. *Clin Cancer Res.* 2006;12(2):369-375. doi:10.1158/1078-0432.CCR-05-1698
 20. Barbieri A, Bimonte S, Palma G, et al. The stress hormone norepinephrine increases migration of prostate cancer cells in vitro and in vivo. *Int J Oncol.* 2015;47(2):527-534. doi:10.3892/ijo.2015.3038
 21. Fernández-Mar MI, Mateos R, García-Parrilla MC, Puertas B, Cantos-Villar E. Bioactive compounds in wine: Resveratrol, hydroxytyrosol and melatonin: A review. *Food Chem.* 2012;130(4):797-813. doi:10.1016/j.foodchem.2011.08.023
 22. Reiter RJ, Tan D-X, Fuentes-Broto L. Melatonin: A Multitasking Molecule. In: *Progress in Brain Research.* Vol 181. Elsevier; 2010:127-151. doi:10.1016/S0079-6123(08)81008-4
 23. Miller SC, Pandi PSR, Esquifino AI, Cardinali DP, Maestroni GJM. The role of melatonin in immuno-enhancement: potential application in cancer: Role of melatonin in immuno-enhancement. *Int J Exp Pathol.* 2006;87(2):81-87. doi:10.1111/j.0959-9673.2006.00474.x
 24. Montilla P, Cruz A, Padillo FJ, et al. Melatonin versus vitamin E as protective treatment against oxidative stress after extra-hepatic bile duct ligation in rats: Oxidative stress in biliary obstruction in the rat: protection with melatonin and vitamin E. *J Pineal Res.* 2001;31(2):138-144. doi:10.1034/j.1600-079x.2001.310207.x
 25. Kayahara GM, Valente VB, Pereira RB, et al. Pineal gland protects against chemically induced oral carcinogenesis and inhibits tumor progression in rats. *Oncotarget.* 2020;11(20):1816-1831. doi:10.18632/oncotarget.27551
 26. Liu R, Wang H, Deng M, et al. Melatonin Inhibits Reactive Oxygen Species-Driven Proliferation, Epithelial-Mesenchymal Transition, and Vasculogenic Mimicry in Oral Cancer. *Oxid Med Cell Longev.* 2018;2018:1-13. doi:10.1155/2018/3510970

27. Colombo J, Maciel JMW, Ferreira LC, Da Silva RF, Zuccari DAP. Effects of melatonin on HIF-1 α and VEGF expression and on the invasive properties of hepatocarcinoma cells. *Oncol Lett.* 2016;12(1):231-237. doi:10.3892/ol.2016.4605
28. Asghari MH, Ghobadi E, Moloudizargari M, Fallah M, Abdollahi M. Does the use of melatonin overcome drug resistance in cancer chemotherapy? *Life Sci.* 2018;196:143-155. doi:10.1016/j.lfs.2018.01.024
29. Kumari N, Dwarkanath BS, Das A, Bhatt AN. Role of interleukin-6 in cancer progression and therapeutic resistance. *Tumor Biol.* 2016;37(9):11553-11572. doi:10.1007/s13277-016-5098-7
30. Mace TA, Shakya R, Pitarresi JR, et al. IL-6 and PD-L1 antibody blockade combination therapy reduces tumour progression in murine models of pancreatic cancer. *Gut.* 2018;67(2):320-332. doi:10.1136/gutjnl-2016-311585