



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

Barbara Maria Frigieri

Ação da melatonina na modulação do câncer de colo de útero

São José do Rio Preto
2021

Barbara Maria Frigieri

Ação da melatonina na modulação do câncer de colo de útero

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

Financiadora: FAPESP – 2017/02100-3
CAPES – 88882.434448/2019-01

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Flavia Cristina Rodrigues Lisoni

São José do Rio Preto
2021

F912a

Frigieri, Barbara Maria

Ação da melatonina na modulação do câncer de colo de útero /
Barbara Maria Frigieri. -- São José do Rio Preto, 2021

7500 p. : il., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio
Preto

Orientadora: Flavia Cristina Rodrigues Lisoni

1. Câncer. 2. Genética Humana. 3. Cultura Celular. 4. Melatonina.
5. Gene AKT. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp.
Biblioteca do Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José
do Rio Preto. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Barbara Maria Frigieri

Ação da melatonina na modulação do câncer de colo de útero

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

Financiadora: FAPESP – 2017/02100-3
CAPES – 88882.434448/2019-01

Comissão Examinadora

Prof^a. Dr^a. Flavia Cristina Rodrigues Lisoni
Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira (FEIS)/UNESP – Ilha Solteira

Prof^a. Dr^a. Ana Paula Girol
Centro Universitário Padre Albino (UNIFIPA) - Catanduva

Prof. Dr. Tiago Henrique
Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP) - São José do Rio Preto

São José do Rio Preto
10 de setembro de 2021

Ao grande amor da minha vida, meu avô, Alcides Frigieri, um grande homem, de honra, respeito, amor e amor ao próximo. Que sempre me ensinou que o amor é a razão para tudo na vida, quem me deu paixões para toda a vida. E que não vai ler esse trabalho, mas eu sei que onde estiver está explodindo de orgulho.

Afinal, “aqueles que nos amam nunca nos deixam de verdade, nós sempre podemos encontrá-los bem aqui (no coração)”.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida.

Aos meus avós, Maria, Gemma, José e Alcides (in memorian), por serem meus avós e pelo amor que dedicam a mim, eu os amo mais que tudo na vida. Escrevo isso depois de um ano de ouvir pela última vez um filinha do vô Cid, eu sei que a vida é o que tem que ser, mas isso é dolorido demais, sei que o senhor ficaria feliz demais com esse trabalho.

Aos meus pais, Lucimar e Jorge, pelos cuidados, amor, carinho, conversas, apoio, pela perseverança incondicional e por estarem nos momentos mais difíceis junto comigo.

A minha irmã, Maria Beatriz, preferida e única em minha vida, pelos todos nossos momentos bons ou ruins. Amo tanto você, meu bebe que cresceu.

A maravilhosa Pretta, um amor de quatro patas, que com sua carinha linda faz tudo ficar mais leve.

A minha tia Erica, a minha tia que é mãe, madrinha e irmã, que é puro amor, que fica extremamente orgulhosa com o que fazemos, que é apoio, colo e carinho.

A minha madrinha e meu padrinho que são meus segundos pais, que me amam como filha e sou grata a isso, por ser porto seguro, por serem incríveis para mim!

Ao meu tio preferido, tio Elezer, que mesmo de longe sei que está orgulhoso por esse trabalho e por ter nos dado um presente que hoje é uma linda estrela no céu, nossa estrela Gui.

Aos 4 primos, quase irmãos, que mesmo que a distância, nunca deixaram de estar no meu coração. Obrigada, Gui (in memorian), Vitinho, Nando e Lívia.

Ao José Augusto pela paciência, por ficar, por sempre estar aqui e ser abraço mesmo longe. Obrigada por tudo em todos os momentos, sem você tudo seria diferente e mais difícil.

Aos meus amigos por estarem por perto, por me ouvirem nos momentos difíceis, pelos bons momentos, pelas festas, pelas tardes de estudo e de café, pelas risadas, apoio, pelos bolos, pelas risadas nos momentos mais inapropriados, pelas memórias desses dias, por virarem a noite tentando me ensinar truço, pelas caronas do C2, aos chocolates e, os dias que sem nenhuma palavra se tornaram bons.

A minha orientadora, a Prof^a. Dr^a. Flávia Cristina Rodrigues Lisoni pelos 7 anos de dedicação, incentivos, apoio, amizade e confiança. Que me ensinou além disso tudo, a ser responsável, a amar algo na vida, por me apoiar em todos os momentos.

As meninas do meu grupo de pesquisa, todas vocês, por serem pessoas incríveis, pelo conhecimento dividido e rirem mesmo quando as células morriam. Vencemos distância e fizemos ciência com poucos recursos, fizemos o impossível ser possível.

A todos meus professores, do primário à pós-graduação, sem eles nada disso seria possível.

Ao programa e aos professores de Pós-graduação em Biociências do IBILCE, pela maravilhosa experiência e realização desse projeto de pesquisa, pelo ensino e oportunidade de aprendizado.

Agradeço a todos do DBZ/Feis, que por mais que eu perdi as chaves, sempre estiveram prontos para me ajudar a trocar o gás, arrumar o microscópio, levar material, imprimir documentos, ajudar com as informações valiosas.

Ao déficit de atenção e todas as dificuldades que por causa dele tive que vencer, com ele foi difícil, mas consegui vencê-lo em mais uma etapa.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 88882.434448/2019-01, à qual agradeço.

Agradeço à FAPESP pela concessão da bolsa de pesquisa, sob o processo nº 2017/02100-3, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

“Veni, vidi, vici”

Júlio César (47 a.C)

“A existência é um termo da evolução.”
Charles Darwin – A Origem das Espécies (1859)

“É a molécula que tem charme, não os cientistas.”

Francis Crick (1981)

RESUMO

O carcinoma de colo de útero, também chamado de câncer cervical, é o segundo tipo de neoplasia mundialmente mais frequente em mulheres. A cada ano surgem cerca de 530 mil novos casos, sendo a quarta causa de morte em países em desenvolvimento, com aproximadamente 275 mil mortes por ano. O tratamento para câncer de colo de útero inclui cirurgia, terapia por irradiação e quimioterapia, mas por serem métodos invasivos, pesquisadores têm buscado novos fármacos antitumorais para auxiliar a eficiência dos tratamentos. A melatonina seria um desses fármacos, pois tem atividade antitumoral por meio de vários mecanismos, incluindo seus efeitos antiproliferativos e pró-apoptóticos, bem como sua potente ação pró-oxidante em células tumorais. Melatonina é um hormônio natural produzido pela glândula pineal, regula o ritmo circadiano, possuindo propriedades imunomoduladoras, anti-inflamatórias e anti-oxidantes. Em função da importância da melatonina, foi proposto o presente trabalho que teve como objetivo geral avaliar seu potencial efeito nas células neoplásicas sobre a morfologia, proliferação e migração celular, citotoxicidade, genotoxicidade, apoptose, ciclo celular e expressão gênica, observando como ocorre essa ação e como essas alterações podem participar do processo tumorigênico. Foram utilizadas duas linhagens tumorigênicas, uma de carcinoma de colo de útero (SiHa) e outra de adenocarcinoma de colo de útero (HeLa), além de uma linhagem de células não tumorigênicas, derivada de células de queratinócitos da pele humana (HaCaT), tratadas com melatonina (concentração de 100nM e 1mM) por 4, 24, 48 e 72 horas. Nós observamos que a melatonina não alterou a morfologia celular, mas reduziu a proliferação e migração celular, não foi citotóxica, mas foi genotóxica, reduziu formação de colônias tumorais, induziu o processo de apoptose inicial, tardia e necrose e estimulou as células a estacionarem nas fases G1/G0 e G2/M do ciclo celular. Além disso, observamos que a melatonina também modulou a via gênica PI3K/AKT, pela ativação dos receptores *MTNR1A* e *MTNR1B* e diminuição de *AKT*. Dessa maneira, a melatonina parece apresentar uma ação antitumorigênica, por mecanismos relacionados às vias antiproliferativas, antimigratórias e apoptóticas, e abrem novas possibilidades de estudos futuros para terapias associadas ao câncer de colo de útero.

Palavras-chave: cultura celular, anti-proliferação, gene *AKT*

ABSTRACT

Cervical cancer, also called cervical cancer, is the second most common type of cancer in women worldwide. Each year there are about 530 thousand new cases, being the fourth leading cause of death in developing countries, with approximately 275,000 deaths per year. Approximately 35% of women diagnosed with cervical carcinoma have recurrent disease, with 90% of these findings within three years of initial treatment. Treatment for cervical cancer includes surgery, radiation therapy and chemotherapy, but because they are invasive methods, researchers have been looking for new anti-tumor drugs to help with the efficiency of treatments. Melatonin would be one of these drugs, as it has antitumor activity through several mechanisms, including its antiproliferative and pro-apoptotic effects, as well as its potent pro-oxidant action on tumor cells. Melatonin is a natural hormone produced by the pineal gland, regulates the circadian rhythm, having immunomodulatory, anti-inflammatory and anti-oxidant properties. It not only regulates biological functions, but is important in the actions of pathological processes, including cancer. Due to the importance of melatonin, the present work was proposed, which aimed to evaluate its potential effect on neoplastic cells on cell morphology, proliferation and migration, cytotoxicity, genotoxicity, apoptosis and cell cycle, gene and protein expression, observing how it occurs this action and how these changes can participate in the tumorigenic process. In the present work we observed that melatonin did not change cell morphology, but reduced cell proliferation and migration, was not cytotoxic, but genotoxic, reduced tumor colony formation, induced the process of early, late and necrosis apoptosis and stimulated cells to park in the G1/G0 and G2/M phases of the cell cycle. Thus, melatonin seems to have an anti-tumorigenic action, through mechanisms related to anti-proliferative, anti-migratory and apoptotic pathways, opening new possibilities for future studies for therapies associated with cervical cancer.

Keywords: cell culture, anti-proliferative, *AKT* gene

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Melatonina e suas propriedades biológicas.	21
Figura 2. Ação da melatonina no câncer	22
Figura 3. Via dos genes PI3K, AKT, mTOR e PTEN.	27
Figura 4. Fluxograma representativo com métodos do trabalho	33
Figura 5. Melatonina não altera a morfologia celular..	41
Figura 6. Melatonina reduz a proliferação celular..	43
Figura 7. Melatonina não é citotóxica..	45
Figura 8. Melatonina reduz a migração celular.	47
Figura 9. Melatonina induz danos no DNA.	49
Figura 10. Melatonina diminui a formação de esferoides tumorais.	50
Figura 11. Melatonina altera o ciclo celular.	51
Figura 12. Melatonina induz apoptose.	53
Figura 13. A melatonina modula a ativação da via de sinalização PI3K/AKT.	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Iniciadores para os genes de interesse.....	30
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

%: porcentagem
°C: graus Celsius
[]: concentração
≤: menor ou igual
5-FU: 5-fluorouracil
AI: apoptose inicial
AF: apoptose final ou necrose
ANXA 5: proteína Anexina 5
cDNA: DNA complementar
CV: célula viável
CIS: Cisplatina
COVID-19: Coronavírus
CO₂: gás carbônico
DNA: ácido desoxirribonucleico
EGFR: Receptor de fator de crescimento epidérmico
FAMERP: Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
FEIS: Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira
G₀: fase G₀ ou fase de repouso
G₁: fase G₁ ou Intérfase
G₂: fase G₂ ou Intérfase
GBM: Glioblastoma multiforme
GSCs: Células de glioblastoma
h: horas
HaCaT: queratinócitos da pele humana normais
HeLa: adenocarcinoma de colo de útero
H₂O: água
HPV: Papilomavírus humano
IBILCE: Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas
IC₅₀: metade da concentração inibitória máxima
ID: índice de dano
INCA: Instituto Nacional do Câncer
IL-1 β : interleucina 1 beta
iNOS: oxido nítrico sintase
kVa: quilovolt-ampere
M: molar
mM: mili molar

Meio MEM e DMEM: mistura de sais enriquecida com aminoácidos, vitaminas e compostos essenciais para crescimento celular

min: minutos

mL: mililitro

MTR1/MTR2/MTNR1A/ MTNR1B: receptor de melatonina

MTS:(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H

tetrazolium)

NaCl: cloreto de sódio

NaOH: hidróxido de sódio

NK: células natural killer

nM: nano molar

nNOS: oxido nítrico sintase

NMP: agarose de ponto de fusão normal

Nº: número

NF-κB: fator nuclear kappa B

OMS: Organização Mundial da Saúde

PBS: tampão fosfato salino

PCR: reação em cadeia da polimerase

PE: fitocoeritrina

PGE2: prostaglandina E receptor 2

pH: potencial hidrogeniônico

P53: proteína tumoral com peso de 53kDa

P21: proteína inibidora de ciclo celular com peso de 21kDa

P65: proteína envolvida na formação do heterodímero NF-κB com peso de 65 kDa

RAS: proto-oncogene

RNA: ácido ribonucleico

ROS: espécies reativas de oxigênio

RT: transcriptase reversa

seg: segundo

SiHa: carcinoma de células escamosas de colo de útero

UNESP: Universidade Estadual Paulista

USP: Universidade de São Paulo

V: volts

µg: microgramas

µL: microlitros

µM: micromolar

x: vezes

ZO-1: zona de oclusão

LISTA DE GENES

AKT: Serine/Threonine Kinase

CCNA1: Cyclin-A1

CHFR: Checkpoint With Forkhead and Ring Finger Domains

FHIT: Fragile Histidine Triad Diadenosine Triphosphatase

MMP- 2: Matrix Metalloproteinase 2

MMP- 9: Matrix Metalloproteinase 9

MTNR1A: Melatonin Receptor 1A

MTNR1B: Melatonin Receptor 1B

mTOR: mechanistic Target of Rapamycin kinase

PAX1: Paired Box 1

PTEN: Phosphatase and Tensin homolog

PI3K: Phosphatidylinositol 3-kinase

SFRP4: Secreted Frizzled Related Protein 4

Sumário

I – INTRODUÇÃO	18
II- OBJETIVOS	28
III- MATERIAL E MÉTODOS	30
Material	31
Métodos	31
A. Cultivo e análise da morfologia celular	31
B. Índice de proliferação celular	33
C. Ensaio de citotoxicidade e viabilidade celular	34
D. Ensaio de Migração Celular	34
E. Ensaio Cometa	35
F. Ensaio de formação de esferóides tumorais	35
G. Citometria de fluxo	36
H. Extração de RNA e confecção do cDNA	36
I. Seleção de genes de interesse	37
J. Análise de PCR quantitativo em tempo real	37
IV - RESULTADOS	39
Melatonina não altera a morfologia celular	40
Melatonina reduz a proliferação celular	42
Melatonina não é citotóxica	43
Melatonina reduz a migração celular	45
Melatonina induz danos no DNA	48
Melatonina diminui a formação de esferóides tumorais	50
Melatonina altera ciclo celular e apoptose	50
Melatonina modula a expressão de genes da via PI3K/AKT	54
V – DISCUSSÃO	56
VI - CONCLUSÃO	64
VII – REFERÊNCIAS	66

I – INTRODUÇÃO

O carcinoma de colo de útero, também denominado câncer cervical, é o segundo tipo de câncer mundialmente mais frequente em mulheres, sendo a quarta causa de morte em países em desenvolvimento. No Brasil é o terceiro tumor mais frequente na população feminina e a quarta causa de morte de mulheres por câncer. O número de mortes em 2019 foi 6.596 casos e no ano de 2020 contabiliza-se o número assustador de 16.590 ocorrências desse tipo de câncer na população feminina (INCA, 2021).

A carcinogênese de colo de útero está relacionada com alterações genéticas, infecção pelo Papilomavírus Humano (HPV), angiogênese e processos inflamatórios. A ideia de que a inflamação está envolvida na tumorigênese é apoiada pela observação de que surgem frequentemente em áreas de inflamação crônica (BURD, 2003).

Alguns genes relacionados com este tipo de câncer incluem *CCNA1*, *CHFR*, *FHIT*, *PAX1*, *PTEN*, *SFRP4*, *TSLC1*, entre outros (ONGENAERT et al., 2008), e possuem diferentes funções como regulação da transcrição e expressão, uma das quais tem baixa regulação com hipermetilação do promotor levando a lesões precursoras no desenvolvimento cervical e na transformação maligna.

Outro fator relacionado diretamente ao carcinoma de colo de útero é a infecção pelo Papilomavírus Humano (HPV), cerca de 90% dos casos estão associados com o HPV como agente causativo (JAAFAR et al., 2009). É sabido que os HPV tipo 16 e 18 são as principais causas do desenvolvimento de câncer cervical em todo mundo. (CHRYSOSTOMOU et al., 2018)

Apesar da infecção do HPV ser o principal fator de risco relacionado a esta doença, há outros fatores que contribuem com o desenvolvimento do carcinoma de colo de útero, entre eles a idade; número de parceiros sexuais, o qual tem sido relacionado com coinfeções, fumo, uso prolongado de contraceptivos hormonais, e um elevado número de gravidez, o qual pode estar associado ao fato de que um grande número de partos aumenta as lesões no canal cervical ou causa imunossupressão nesta área (SOTO-DE LEON et al., 2011).

Os principais tipos de câncer de colo de útero são o carcinoma de células escamosas e o adenocarcinoma (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2016). O primeiro

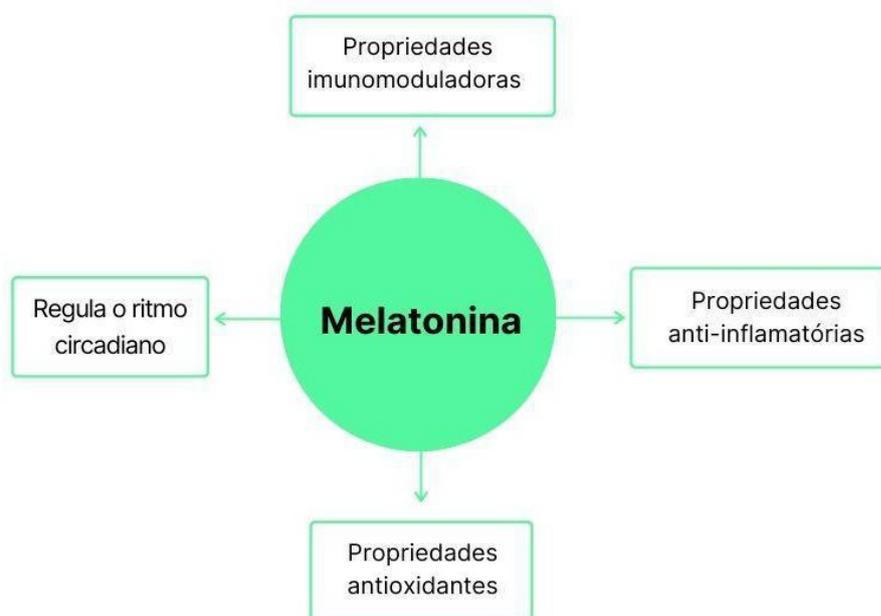
é derivado do epitélio estratificado não queratinizado, característico da mucosa normal do colo do útero, e é o tipo histológico mais comum. Esse tumor se origina de células da parte externa do útero em contato com a vagina (ectocérvix), enquanto o adenocarcinoma se desenvolve a partir das células glandulares produtoras de muco do endocérvix, parte interna do colo de útero (SANKARANARAYANAN et al., 2003).

Esses dois tipos celulares apresentam morfologia distintas, enquanto a SiHa (carcinoma de células escamosas de colo de útero) apresenta células isoladas e mais estreladas, a HeLa (adenocarcinoma de colo de útero) apresenta células mais alongadas, com prolongamentos citoplasmáticos e núcleo grande e centralizado, as células ficam bem aderidas umas às outras, formando um aspecto mucoso. Além disso, as duas linhagens celulares HeLa e SiHa estão infectadas pelo vírus (HPV 16 e 18) e genes também se expressando diferentemente. A linhagem celular HeLa é infectada pelo HPV18, enquanto a linhagem SiHa é infectada pelo HPV16 (SEEDORF et al., 1987).

O tratamento para câncer de colo de útero inclui cirurgia, terapia por irradiação e quimioterapia. Mas existem pacientes que apresentam resistência à quimioterapia, o que dificulta esse tipo de tratamento, então pesquisadores têm buscado novos fármacos antitumorais para melhorar a eficiência da quimioterapia. A melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) seria um desses fármacos, pois tem atividade antitumoral por meio de vários mecanismos, incluindo seus efeitos antiproliferativos e pró-apoptóticos, bem como sua potente ação pró-oxidante em células tumorais (CHEN et al., 2018).

Melatonina (Figura 1) é um hormônio natural produzido pela glândula pineal, e atua na regulação do ciclo circadiano, possuindo propriedades imunomoduladoras, anti-inflamatórias e antioxidantes (REITER; TAN; PAPPOLLA, 2004; DI BELLA et al., 2013; REITER et al., 2017). Sendo sua síntese realizada seguindo um mesmo padrão, no qual no período noturno há um pico significativo e durante o dia não há essa síntese (RAVINDRA; LAKSHMI; AHUJA, 2006; HILL et al., 2015).

Figura 1. Melatonina e suas propriedades biológicas.



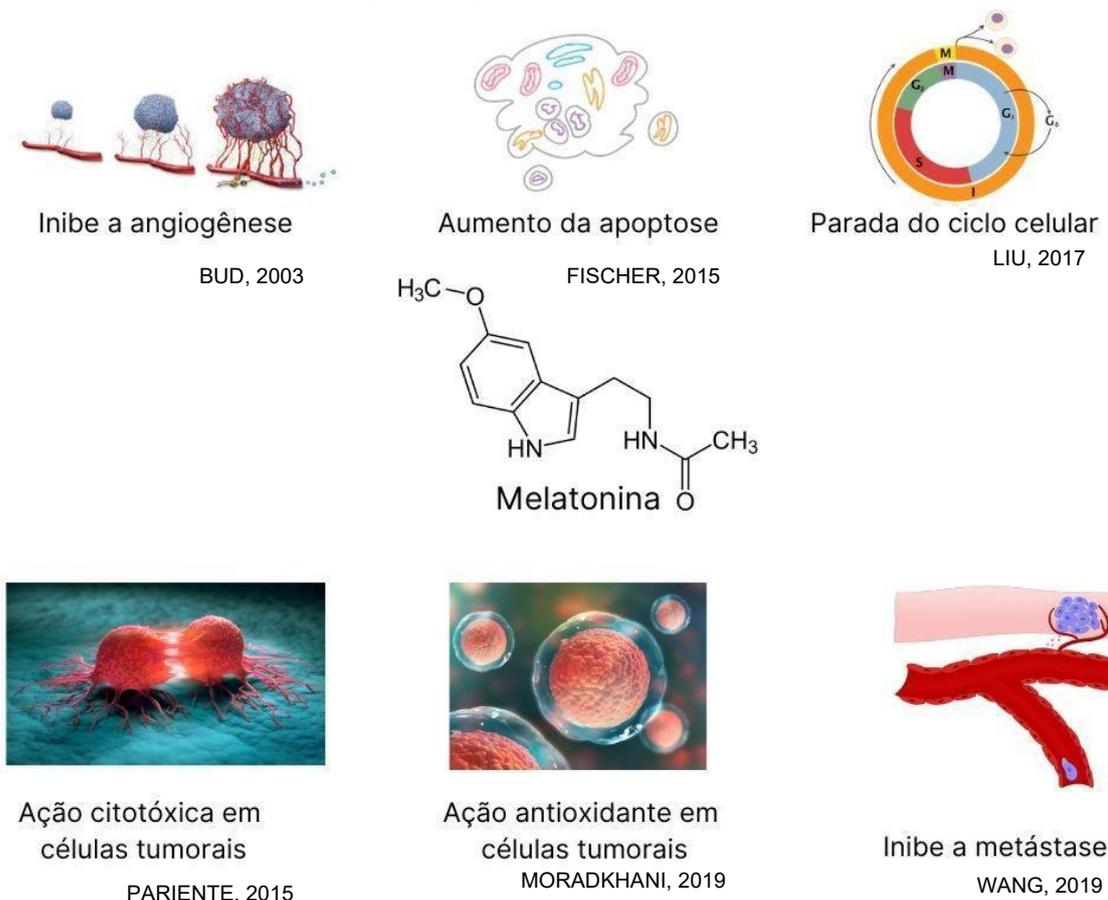
Fonte: Elaborado pela autora

Melatonina é uma indolamina com dois grupos funcionais e possui dois receptores (MTR1 e MTR2) associados à proteína G. Esta molécula está relacionada com efeito imunomodulador e neuroprotetor, pela ativação de células-T, B, NK e monócitos, proliferação de timócitos e liberação de citocinas; além de efeitos anti-apoptóticos, antioxidante e proteção de mitocôndrias contra radicais livres, modulando poros de transição de permeabilidade mitocondrial, efeitos no fluxo de elétrons mitocondriais e influência o metabolismo energético, sendo assim é considerada uma molécula multifuncional (MORADKHANI et al., 2019).

A melatonina não regula somente as funções biológicas, mas é importante em ações de processos patológicos, entre eles, o câncer (Figura 2). Essa molécula se mostrou um importante eliminador de radicais livres, exercendo o papel de antioxidante influenciando a cadeia de transferência de elétrons, prevenção dos níveis de peroxinitrito por meio da regulação do óxido nítrico sintases (iNOS, nNOS) e, assim,

reduzindo os níveis de óxido nítrico, em câncer de ovário (HARDELAND, 2017). Em fluido folicular pré-ovulatório, que contém altas quantidades de espécies reativas de oxigênio (ROS), a melatonina aliviou o efeito carcinogênico das altas concentrações de ROS, tendo uma ação antioxidante (HUANG et al., 2015). Mas a melatonina pode atuar também como um agente pró-oxidante em diferentes tipos de câncer (CHUFFA et al., 2017).

Figura 2. Ação da melatonina no câncer



Fonte: Elaborado pela autora

A melatonina também é um poderoso agente anti-inflamatório, pois induz a liberação de interleucina-2, interleucina-10 e interferon- γ , que leva ao aumento de células T auxiliares, que respondem a essas substâncias. As células T auxiliares têm

um significativo papel anticâncer, enquanto o fator nuclear-kappa B (NF-kB) aumenta a geração de ROS levando a danos no DNA (NICHOLS et al., 2001; ASK et.al, 2018). Na etiologia do câncer de ovário, o NF-kB é um fator significativo, muito utilizado como marcador de inflamação (YILMAZ et al., 2018).

A melatonina, além dos efeitos já conhecidos, pode também vir a ser um adjuvante no tratamento do COVID-19, pois essa molécula tem diversas funções benéficas em diferentes complicações virais. A regulação do estresse oxidativo, resposta imunológica e inflamatória pode vir a ser fundamental para o tratamento de infecções virais, como o SARS-CoV-2 (ZHANG et al., 2020).

A melatonina produzida nos pulmões funciona como uma barreira contra o COVID-19, impedindo que esse patógeno invada o epitélio e ativa o sistema imunológico para produção de anticorpos. Com a análise da expressão de 212 genes envolvidos na entrada do vírus nas células humanas, foi relacionada a expressão desses genes com a síntese de melatonina nos pulmões e foi visto que essa produção de melatonina pode ser relevante para inibir a infecção do coronavírus, visto isso, a administração desse hormônio em pacientes pode bloquear a entrada do patógeno em questão, sendo assim benéfico para o tratamento e para a população mundial, já que ainda não há vacinação para todos (A FERNANDES et al., 2021).

A melatonina pode modular vários genes associados a tumorigênese, entre eles, destacamos os genes *PI3K* (Phosphatidylinositol 3-kinase), *AKT* (Serine/Threonine Kinase), *mTOR* (mechanistic Target of Rapamycin kinase), *PTEN* (Phosphatase and Tensin homolog), que estão relacionados com vias metabólicas de progressão celular, enquanto os receptores diretos da melatonina, codificados pelos genes *MTNR1A* e *MTNR1B* (Melatonin Receptor 1A e 1B) e indiretos (receptor da proteína G) poderiam estar relacionados com essa via do *AKT* (Figura 3).

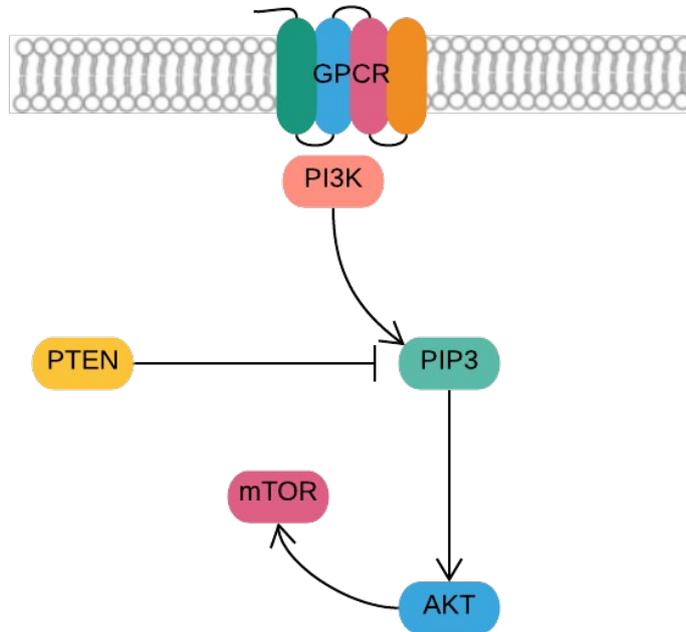
A via *PI3K/AKT/MTOR* apresenta um papel fundamental em várias funções celulares, como proliferação, adesão e migração celular, além da angiogênese e está ativada em diversos tumores. Quando esta via é ativada, a maquinaria tumoral não para, assim as células tumorais se proliferam e podem invadir outros tecidos. Essa via

pode ser ativada de três formas, pela mutação nos genes da família RAS (RAS proto-oncogene, GTPase), pela perda do gene *PTEN* ou pelo aumento da expressão de EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) (KARAR and MAITY, 2011).

O *PTEN* é um importante gene supressor de tumor, sua função é manter a homeostase celular e inibir a importante via oncogênica constituída por *PI3K* e *mTOR* (COUGHLIN et al., 2010). A perda de *PTEN* está associada a vários tipos de câncer, que pode levar à ativação de *PI3K* e conseqüentemente ao desenvolvimento do câncer (DI CRISTOFANO et al., 2000; BERNIS et al., 2007).

A *PI3K* é uma proteína que constitui uma das principais vias intracelulares em câncer; quando ativada, estimula processos celulares importantes como sobrevivência, mobilidade e crescimento celular (ENGELMAN et al., 2006). A *mTOR* é constituída por dois complexos multiproteicos; sua ativação desempenha papel importante na ativação da síntese proteica, contribuindo com a patogênese do câncer. A ativação de *mTOR* desencadeia a promoção de síntese proteica e a ativação de proteínas importantes para o controle do ciclo celular e de fatores de crescimento tumorais (AKCAKANAT et al., 2008).

Figura 3. Via dos genes *PI3K*, *AKT*, *mTOR* e *PTEN*.



Fonte: Elaborado pela autora

A melatonina também agiu como um quimioterápico natural, ajudando no tratamento de carcinoma ascítico de Ehrlich, pois quando essas células foram inoculadas intramuscularmente nos membros posteriores de camundongos, observou-se que o tratamento com a melatonina suprimiu o crescimento e a proliferação de tumor, induziu a apoptose e também inibiu a vascularização do tumor (AMIN et al., 2019).

Em células de glioblastoma (GSCs), que atuam na manutenção do crescimento tumoral cerebral, são necessárias novas estratégias terapêuticas para que haja uma forma de parar seu crescimento. Assim, isolando GSCs de pacientes com glioblastoma multiforme (GBM) para estudar os papéis e mecanismos subjacentes associados à melatonina, após o tratamento, notou-se que a melatonina alterou a biologia e inibiu a proliferação de GSC, além de alterar o perfil dos fatores de transcrição para inibir a iniciação e propagação celular. Notou-se também que houve a inibição da ativação de AKT1 assim comprometendo a fosforilação da vida do

anticorpo EZH2 (p21) e também leva a diminuição do desempenho das interações EZH2-STAT3, dessa forma leva a diminuição da auto renovação celular e da tumorigênese de GSCs e se mostrou como uma promissora terapêutica no GBM (CHEN et al., 2016).

Em câncer colorretal, a melatonina teve papel inibitório na progressão desse câncer, fazendo com que houvesse a parada do ciclo celular em G1, aumentando o nível das proteínas de zona de oclusão (ZO-1) e ocludina, mantendo junções apertadas entre as células e assim diminuindo a migração celular (LIU et al., 2017). Em câncer de pulmão, que é um tipo de câncer no qual a metástase é progressiva com prognóstico de baixa sobrevida, a melatonina agiu pela ativação da via de apoptose induzindo a morte celular, diminuiu a proliferação celular e inibiu a progressão tumoral. (POURHANIFEH et al., 2019).

Em câncer gástrico, proveniente de metástase pulmonar, a melatonina inibiu essa metástase induzida por IL-1 β por meio da regulação negativa de MMP-2, MMP-9, NF-kB e p65 (WANG et al., 2019).

Em relação à apoptose, a melatonina pode regulá-la em vários tipos de câncer, por múltiplos mecanismos. Por exemplo, pela via das caspases, que têm papéis essenciais na regulação da iniciação, transdução e promoção de sinais apoptóticos. Em câncer de ovário, a expressão da caspase-3 clivada está aumentada (HU et al., 2014), no entanto a melatonina é capaz de reduzir a expressão e ativação desta molécula (TSAI et al., 2018 e CHUFFA et al., 2015). Evidências sugerem que o tratamento com melatonina aumenta a apoptose, pela expressão elevada do gene p53, resultando em parada ciclo celular, na fase G2 (FISCHER et al., 2015). E ainda, outros dois membros importantes de genes relacionados à apoptose são BCL-2 e BAX (PAN et al., 2014), nos quais a melatonina aumenta a expressão de BAX e diminui a de BCL-2 (ALONSO-GONZALEZ et al., 2017 e XU et al., 2014); assim, a melatonina regula a razão BAX/BCL-2 (SANCHEZ et al., 2018).

Tamarkin e colaboradores (1981) mostraram que o tratamento com melatonina inibiu o desenvolvimento de tumores mamários e, a partir desse trabalho, evidências científicas mostram que a melatonina é capaz inibir o desenvolvimento e a progressão de vários tipos de câncer. Chen e colaboradores (2018) observaram que, a melatonina se mostrou tóxica e promoveu a morte de células tumorigênicas de colo de útero (linhagem HeLa), em comparação ao controle (células HeLa sem aplicação de melatonina), havendo redução de células tumorigênicas, pela inibição da via JNK/Parkin.

Outro estudo mostrou que a melatonina aumentou a citotoxicidade e a apoptose, induzidas pela cisplatina, em células HeLa e, assim a melatonina pode ser potencialmente aplicada para tratamento de câncer do colo do útero como um poderoso agente sinérgico (PARIENTE et al., 2015).

Além disso, a melatonina pode ter funções diferentes em células diferentes, por exemplo, podendo atuar protegendo células não tumorigênicas, mas ter uma ação citotóxica em células tumorigênicas, com efeitos envolvendo autofagia (degradando danos celulares), vias de fator de transcrição Nrf2 (nuclear factor, erythroid 2) e expressão de genes protetores. Assim, em células não tumorigênicas a melatonina age sendo citoprotetora e em células tumorais aumenta a apoptose (SAGRILLO-FAGUNDES et al., 2019).

Em sua revisão Shafabakhsh et al., (2019), observou que células HeLa (adenocarcinoma cervical), quando tratadas com melatonina e quimioterápicos, como a cisplatina (CIS) e 5-fluorouracil (5-FU), apresentam diminuição da viabilidade celular. Além disso, a melatonina induziu o efeito citotóxico desses agentes pela ativação da caspase-3. Foi observado também, que quando a CIS é utilizada em conjunto com a melatonina, houve um aumento da apoptose e da fragmentação do DNA, quando comparada com as células tratadas somente com CIS. Nessa linhagem celular, o co-tratamento de melatonina e CIS também atuaram na apoptose mitocondrial dependente da caspase-9 elevando as proteínas pró-apoptóticas, assim, a melatonina

aumentou a citotoxicidade e apoptose, e pode vir a ser um agente adjuvante muito valioso no tratamento do câncer de colo de útero.

Diante desta revisão bibliográfica, elaboramos o presente trabalho com o intuito de contribuir para o esclarecimento da ação da melatonina e avaliar seu potencial efeito em câncer do colo de útero, podendo então ser usada no tratamento desse câncer que acomete e leva à morte milhares de mulheres ao redor do mundo.

II- OBJETIVOS

Em função da importância da melatonina como um agente anti-inflamatório, foi proposto o presente trabalho que teve como objetivo geral avaliar seu potencial efeito nas células neoplásicas sobre a morfologia, proliferação e migração celular, citotoxicidade, genotoxicidade, apoptose, ciclo celular e expressão gênica, observando como ocorre essa ação e como essas alterações podem participar do processo tumorigênico. Além disso, pretendemos obter possíveis marcadores moleculares que possam direcionar, futuramente, terapias gênicas personalizadas ou mesmo indicar esse composto como um agente antitumorigênico, que complemente as terapias usuais.

Os seus objetivos específicos compreenderam investigar *in vitro* o efeito da melatonina nas células de linhagens tumorigênicas e de células não tumorigênicas na:

- 1) Morfologia, pela análise em microscopia óptica;
- 2) Índice de proliferação celular, pelo ensaio de curva de crescimento;
- 3) Migração celular, pelo ensaio de *transwell*;
- 4) Citotoxicidade, pelo ensaio de MTS;
- 5) Genotoxicidade, pelo ensaio Cometa;
- 6) Capacidade das células tumorais crescerem em suspensão, pela formação de colônias (esferóides);
- 7) Ciclo celular e apoptose/necrose celular, por citometria de fluxo;
- 8) Expressão dos genes *PI3K*, *AKT*, *mTOR*, *PTEN*, *MTR1* e *MTR2*, pela técnica de PCR quantitativa.

III- MATERIAL E MÉTODOS

Material

Foram utilizadas duas linhagens tumorigênicas e uma linhagem de células não tumorigênicas. As linhagens tumorigênicas são, de carcinoma de colo de útero (SiHa) e de adenocarcinoma de colo de útero (HeLa), gentilmente cedidas pela Profa. Dra. Eloiza Helena Tajara da Silva, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto/FAMERP, SP. A linhagem derivada de células de queratinócitos da pele humana imortalizadas (HaCaT), foi cedida gentilmente pela Profa. Dra. Katiuchia Uzzur Sales da USP/Ribeirão Preto, SP.

Melatonina

Foi utilizada melatonina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) nas concentrações de 100 nM e 1 mM, diluídas em 50% de solução PBS (Phosphate Buffered Saline) e 50% de etanol absoluto (Borin et al., 2016; Gonçalves et al., 2016). A melatonina foi diluída em capela, no escuro e 10 minutos antes dos experimentos, para que não houvesse degradação e/ou oxidação do produto. Somente foi diluído o necessário para os experimentos realizados naquele dia, mas quando houve sobra, esse foi descartado.

Na amostra controle negativo, sem a melatonina, foi adicionado sempre o etanol e o PBS, mas nota-se que o papel desses compostos foi avaliado durante os experimentos apenas para esclarecer sua contribuição como agente diluente e não para interferir nos dados.

Métodos

A. Cultivo e análise da morfologia celular

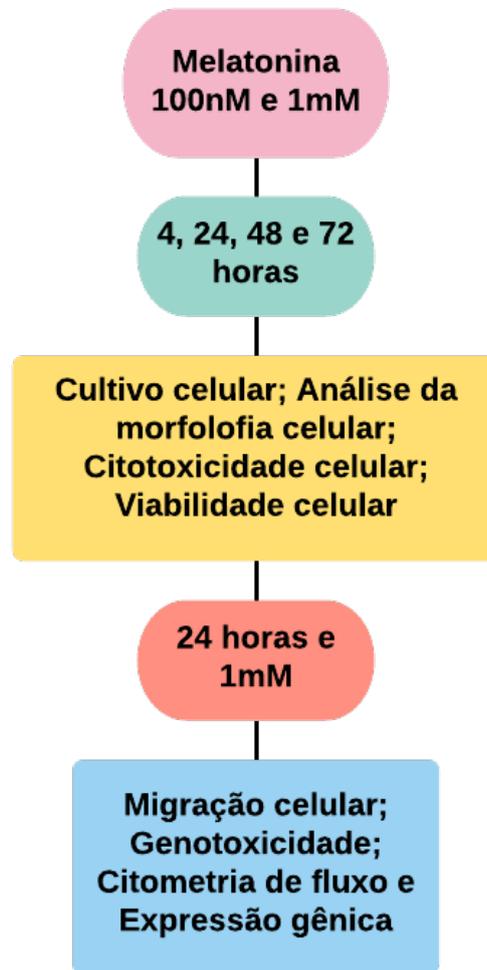
As linhagens celulares HeLa e SiHa foram semeadas em meio completo (MEM suplementado com 10% de soro fetal bovino, 10mM aminoácidos não essenciais, 100 mM piruvato de sódio, 1x antibiótico/antimicótico), enquanto a HaCaT foi cultivada em DMEM, suplementado igualmente as outras duas linhagens. Essas células foram mantidas a 37°C e atmosfera de 5% de CO₂ por 24 horas, até se fixarem no substrato. Após esse período, o meio foi trocado a cada dois ou três dias, ou até estarem com

70% de confluência. O crescimento e a morfologia celular foram avaliados diariamente em microscópio invertido e, quando a densidade celular se mostrou alta, o material foi submetido à tripsinização e subdividido em duas réplicas.

Para dois procedimentos abaixo descritos (Índice de proliferação celular e Ensaio de citotoxicidade e (viabilidade celular) foram realizados quatro experimentos, com cada uma das linhagens celulares: um experimento controle negativo (sem tratamento e sem agente diluidor), outro experimento controle negativo (sem tratamento, porém com o agente diluidor – 50% PBS e 50% etanol), um experimento com a melatonina (na concentração de 100 nM) e outro com a melatonina (na concentração de 1 mM) a serem tratados por 4, 24, 48 e 72h.

Então, foi escolhido o tempo e a concentração, com maior diferença significativa, de acordo com os testes estatísticos de cada experimento, para prosseguir os ensaios de migração celular, genotoxicidade, citometria de fluxo e de expressão gênica. Ou seja, após essa determinação, as células foram processadas em número de aproximadamente 5×10^4 , para os ensaios específicos. Todos os experimentos foram realizados em triplicata e executados no Laboratório de Genética Molecular da FEIS/UNESP. As diferentes condições experimentais são apresentadas no Fluxograma abaixo.

Figura 4. Fluxograma representativo com métodos do trabalho.



Fonte: Elaborado pela autora.

B. Índice de proliferação celular

Foram realizados quatro experimentos, com as três diferentes linhagens celulares: um experimento controle negativo (meio de cultura), outro controle negativo, porém com o veículo de diluição dos compostos (50%PBS + 50%etanol) e com a melatonina em duas diferentes concentrações (100 nM e 1 mM).

Para analisar o índice de proliferação foi realizada uma curva de crescimento para cada concentração a ser testada (100 nM e 1 mM) após 4, 24, 48 e 72 horas de tratamento. As células foram cultivadas em placas de cultura de 24 poços, semeadas na concentração de 5×10^4 em 300 μ L de meio MEM com 10% de soro fetal bovino e mantidas a 37°C em câmara úmida e atmosfera com 5% de CO₂, por 24 horas, até se fixarem no substrato. Após esse período, o meio de cultura foi substituído por meio de cultura sem soro fetal bovino (MEM 0%), a fim de deixar todas as células na mesma etapa celular. Após 24 horas foi trocado o meio de cultura, substituído de acordo com os experimentos referidos acima. Nesse dia zero do experimento, o meio sem soro fetal bovino foi substituído pelo meio completo e adicionado a melatonina nas concentrações desejadas.

Após 4 horas do experimento, as células dos primeiros poços da placa foram tripsinizadas e contadas na câmara de Neubauer (hemocitômetro). As células dos outros poços foram tripsinizadas e contadas após 24, 48 e 72 horas do início do experimento, o qual foi realizado em triplicatas.

Após esse ensaio de proliferação celular foi aplicado o teste estatístico Análise de variância a dois critérios ANOVA e teste de *Dunnett* (GraphPad 8.0), o qual o tempo e a concentração foram avaliados para sabermos se há diferença estatística significativa em relação à proliferação celular, sendo $p < 0,05$ considerado significativo.

C. Ensaio de viabilidade celular

O ensaio foi realizado utilizando o reagente MTS – CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (PROMEGA, USA), segundo normas do fabricante. As células foram plaqueadas (5×10^3) em placas de cultura de 96 poços com 100 μ L de meio de cultura completo.

A leitura foi realizada após 4 horas de incubação do reagente (na estufa a 37°C, CO₂ a 5%, umidificada) em leitor de ELISA no comprimento de onda de 492 nm (Thermo Plate, TpReader Basic), sendo esse ensaio realizado em triplicata.

Após esse ensaio foi aplicado o teste estatístico (ANOVA e teste de *Dunnett* - GraphPad 8.0) para a análise da viabilidade celular versus concentração, bem como o cálculo do IC50 (Concentração Inibitória para 50% das células), os valores de absorbância obtidos no tratamento com os compostos (A), foram normalizados para os valores obtidos com o solvente (B) para obtenção da porcentagem de viabilidade celular (C) através da equação: $C = A/B \times 100$ para todas as concentrações estudadas, no qual o tempo e o número de células viáveis foram avaliados para sabermos qual dará uma maior diferença estatística significativa em relação à viabilidade celular.

D. Ensaio de Migração Celular

Foi realizado o ensaio de migração em câmaras bipartes *Transwell* (poros de 8µM de diâmetro BD - Biosciences San Jose, CA, USA), segundo normas do fabricante.

As células foram cultivadas (5×10^4) em placas de 24 poços, com 500µL de meio de cultura completo, então foram contadas e transferidas para o inserto que estava dentro de outra placa de cultura de 24 poços. Na parte inferior desse poço havia meio de cultura com soro fetal bovino e na parte superior havia meio de cultura sem soro fetal bovino e melatonina [1 mM], sendo nessa parte que as células foram inseridas. Após 24h, os insertos foram lavados com PBS gelado e a fixação das células, na porção inferior, foi realizada com paraformaldeído a 4% em PBS, por 30 minutos. Após coradas com solução de cristal violeta, por 30 minutos, posteriormente lavados com PBS para remover o excesso do cristal violeta, e deixados para secar em posição invertida no fluxo laminar. Secos, os insertos foram colocados sobre lâminas, analisados e fotografados em cinco diferentes campos, em microscópio invertido de contraste de fase com câmera acoplada em aumento de 400x, a análise quantitativa de células que migraram foi feita a partir das fotos. Foi utilizada a Análise de Variância (ANOVA), seguido do *post-test* de comparações múltiplas *Bonferroni*.

E. Ensaio Cometa

As células (5×10^4) foram tripsinizadas, centrifugadas e misturadas com agarose de baixo ponto de fusão. Então, foram colocadas em lâminas com agarose de ponto de fusão normal para que fique uma fina película do composto sobre a lâmina. Foi realizada a eletroforese por 20 minutos a 100V e 300Kva. Em seguida, foi executado o processo de neutralização das lâminas e a fixação com álcool etílico 100%. As lâminas foram coradas com uma solução de *Gel Red* e analisadas em microscópio de fluorescência em aumento de 400x. Foram analisadas 100 células por grupo experimental. Os núcleos celulares foram classificados em uma classe de dano que é determinada de acordo com a intensidade e tamanho da cauda do cometa (KOBAYASHI, 1995).

A estatística dos dados foi baseada em análise de variância não paramétrica de postos de Kruskal-Wallis e as médias foram comparadas por meio do teste t de Student ao nível de 5% de probabilidade. O Índice total de danos (ID total) foi calculado pela fórmula abaixo, onde n refere-se ao número de células de cada classe de danos: $ID\ total = 0.(n\ Classe\ 0) + 1.(n\ Classe\ 1) + 2.(n\ Classe\ 2) + 3.(n\ Classe\ 3)$.

F. Ensaio de formação de esferoides tumorais

As células foram cultivadas em placas de 6 poços, contendo 1600 células por poço, com 1000 μ L de meio de cultura 10%. Após 12 h de cultura, o meio foi trocado e as células foram tratadas com melatonina [1 mM], a cada dois dias o meio e o tratamento foi substituído. Após 14 dias de cultura, o meio foi removido e as células foram lavadas com PBS, fixadas em metanol por 15 min e coradas com cristal violeta a 0,1% por 10 min. Por fim, as placas foram lavadas e as colônias foram fotografadas e contadas por inspeção visual.

G. Citometria de fluxo

Alíquotas das três linhagens celulares foram analisadas pela citometria de fluxo (Guava EasyCyte, MILLIPORE), para investigar a expressão das moléculas relacionadas com a apoptose e necrose após o tratamento com melatonina. Para essa

análise, as suspensões de células (1×10^5) foram incubadas com anticorpo monoclonal ANXA5 conjugado com fluorocromo (PE, BD Pharmingen, San Diego, USA), por 30 minutos. O FACscan Becton Dickinson (Oxford, UK) foi utilizado para medir a intensidade de fluorescência nos canais FL1 (548 nM) e, dessa forma, estimar a quantidade de moléculas relacionadas com apoptose e necrose por célula.

Para a análise de ciclo celular, as células foram tripsinizadas, lavadas com PBS gelado, fixadas com etanol 70% e incubadas por uma hora na geladeira. A suspensão de células foi centrifugada e o pellet ressuspendido em 200 μ l de solução do Kit Guava Cell Cycle Reagent (*MILLIPORE, Temecula, USA*) e então foi realizada a leitura no aparelho citômetro, adquiridos 5.000 eventos de cada amostra para investigação do ciclo celular após o tratamento com a melatonina. Foi utilizada a Análise de Variância (ANOVA), seguido do post-test de comparações múltiplas Dunnett's. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Imuno Morfologia do IBILCE/UNESP.

H. Extração de RNA e confecção do cDNA

O RNA das células controle e tratadas com melatonina foi extraído com o método do Trizol (Life Technologies, Grand Island, NY, USA) (Sambrook & Russel, 2001), quantificado em espectrofotômetro Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA), e avaliada quanto à integridade pela presença das duas bandas ribossomais 18S e 28S, em gel de agarose 1%. O cDNA (DNA complementar) foi obtido pela reação de transcrição reversa com o sistema High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Forster City, CA, USA).

I. Seleção de genes de interesse

Os genes estudados neste projeto (*PI3K, AKT, mTOR, PTEN MTNR1A e MTNR1B*) estão relacionados com vias metabólicas de progressão celular, e listados na Tabela 1, eles foram selecionados a partir de Chen et. al., 2020.

Tabela 1: Iniciadores para os genes de interesse

Oligonucleotídeo	Sequência (5' - 3')
PI3K	GTCAATCGGTGACTGTGTGG
PI3K sense	GAAGTGCAGTGCACCTTTCA
PTEN	CATAACGATGGCTGTGGTTG
PTEN sense	CCCCCACTTTAGTGACACAGT
AKT1	CACACCACCTGACCAAGATG
AKT1 sense	CTGGCCGAGTAGGAGAAGT
mTOR	TGTCCTGCTGGTCTGAACTG
mTOR sense	TTCAGCGATGTTCTTGTGAGG
MTNR1	CTGACCGCAAACCCAAACTG
MTNR1 sense	CGTCATCGGCTCTGTCTTCA
MTNR2	CGTCATCGGCTCTGTCTTCA
MTNR2 sense	CGGTAGATTCGGTGGTAGGC

Fonte: Elaborado pela autora

J. Análise de PCR quantitativo em tempo real

As reações serão realizadas em termociclador 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems), no Laboratório de Biomarcadores e Bioinformática Médica, na Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, FAMERP, SP. Todas as reações foram preparadas em triplicata, incluindo os controles endógenos GAPDH, ACTB e TUBB, que foram utilizados como normalizadores, e processadas em volume final de 20uL contendo 200 ng de cDNA, SYBR® Green PCR Master Mix e 100 nM de cada primer, segundo protocolo da Applied Biosystems. Finalmente, os valores de expressão gênica obtidos nas análises foram novamente normalizados pelo resultado da quantificação da amostra controle, escolhida como calibrador de todas as amostras. foi utilizado o método de Pfaffl, 2001 para os cálculos de análise comparativa.

IV - RESULTADOS

Melatonina não altera a morfologia celular

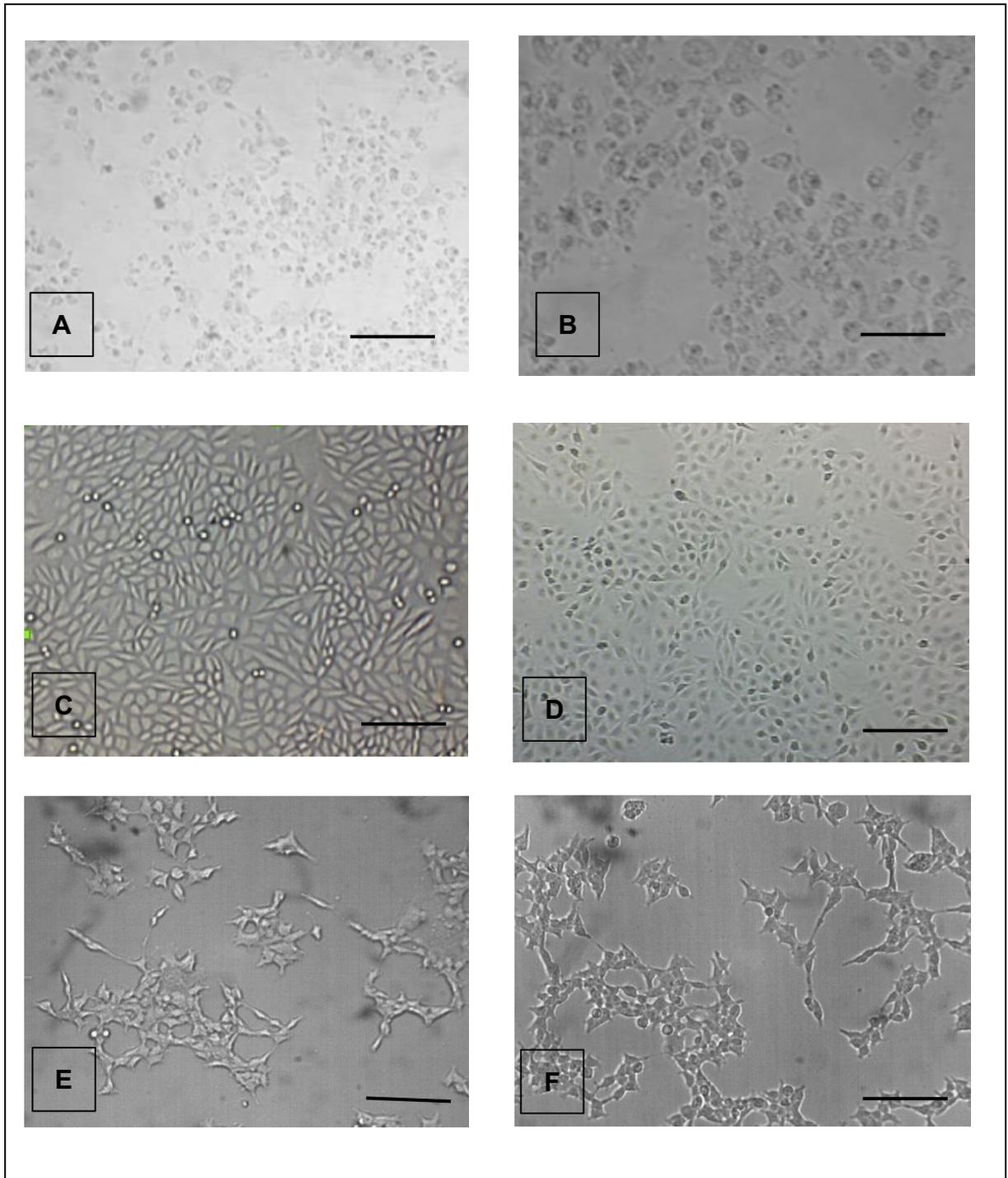
A morfologia das células HeLa (Figura 5 A e B) é caracterizada por uma monocamada de células poligonais, com uma boa adesão, que se assemelham a um muco e apresentam membranas celulares com extensões radiais dos filópodes preenchidos por citoplasma, e ainda sabe-se que tem a cromatina nuclear condensada. Mesmo após 24 horas do tratamento com melatonina na concentração de 1 mM, as células HeLa não apresentaram diferenças morfológicas em relação ao controle, ou seja, mantiveram suas características descritas acima.

Já a morfologia das células SiHa (Figura 5 C e D) é caracterizada por células nucleadas, fusiformes com núcleo grande, com citoplasma escasso e geralmente se encontram agrupadas pois precisam de adesão celular para seu crescimento. Após o tratamento com a melatonina, também não houve mudanças morfológicas nessas células, podendo-se notar que o citoplasma continuava escasso e o núcleo grande, como nas células controle.

Na linhagem HaCaT (Figura 5 E e F), a morfologia celular é caracterizada por multicamadas de células com núcleo central e a presença notória de citoplasma, em forma de estrela, quando atingem a confluência adequada formam um “tapete celular”. Observou-se que após o tratamento, a morfologia delas manteve-se muito parecida com a morfologia das células sem tratamento, com o mesmo aspecto estrelar e núcleo central.

Portanto, não foram observadas modificações na morfologia celular nas linhagens tumorigênicas e não tumorigênica após o tratamento com a melatonina nos tempos e concentrações escolhidas.

Figura 5. **Melatonina não altera a morfologia celular.** Morfologia das linhagens celulares HeLa (A), SiHa (C) e HaCaT (E) sem tratamento e HeLa (B), SiHa (D) e HaCaT (F) tratadas com a melatonina na concentração de 1 mM, após 24 horas de cultivo.



Fonte: Elaborado pela autora. A barra equivale a 100 μ m.

Melatonina reduz a proliferação celular

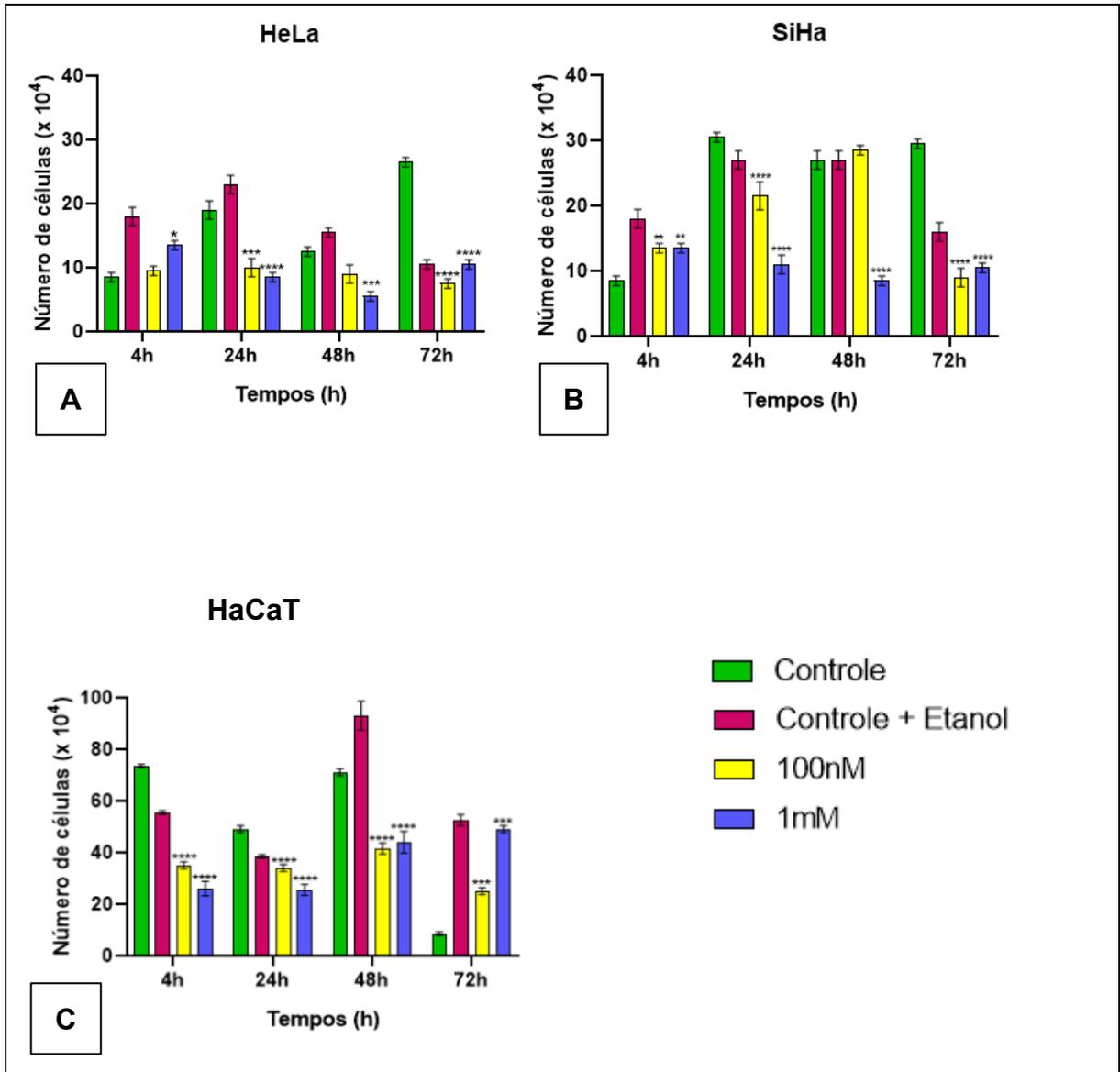
Na linhagem celular HeLa tratada com melatonina (Figura 6 A), foi possível observar que houve uma redução significativa da proliferação celular em relação ao controle, nos tempos de 24, 48, 72 horas, nas concentrações de 100 nM e de 1 mM.

Na linhagem celular SiHa tratada com melatonina (Figura 6 B) foi possível observar também que houve uma redução significativa da proliferação celular, em relação ao controle, nos tempos de 24, 48 e 72 horas, na concentração de 1 mM, enquanto na concentração de 100 nM, apenas nos tempos de 24 e 72 horas foi possível observar essa redução.

Na linhagem HaCaT tratada com melatonina (Figura 6 C), no tempo de 4, 24, 48 e 72 horas houve diminuição da proliferação celular, com a concentração de 100 nM, em relação ao controle e ao controle + etanol. Já a concentração de 1 mM, diminuiu a proliferação celular significativamente, quando comparada ao controle e controle + etanol, nos tempos de 4 e 24h.

Quando observamos os resultados apresentados nas três linhagens, nota-se que no tempo de 24 horas e concentração de 1 mM, apresentam diminuição da proliferação celular de forma significativa.

Figura 6. **Melatonina reduz a proliferação celular.** Gráfico de proliferação celular das linhagens HeLa (A), SiHa (B) e HaCaT (C). Células tratadas por 4, 24, 48 e 72 horas com Melatonina nas concentrações de 100 nM e 1 mM.



Fonte: Elaborado pela autora. (*)= $p < 0,05$; (**)= $p < 0,01$; (***)= $p < 0,001$ e (****)= $p < 0,0001$, diferença significativa em relação ao controle.

Melatonina reduz minimamente a viabilidade celular

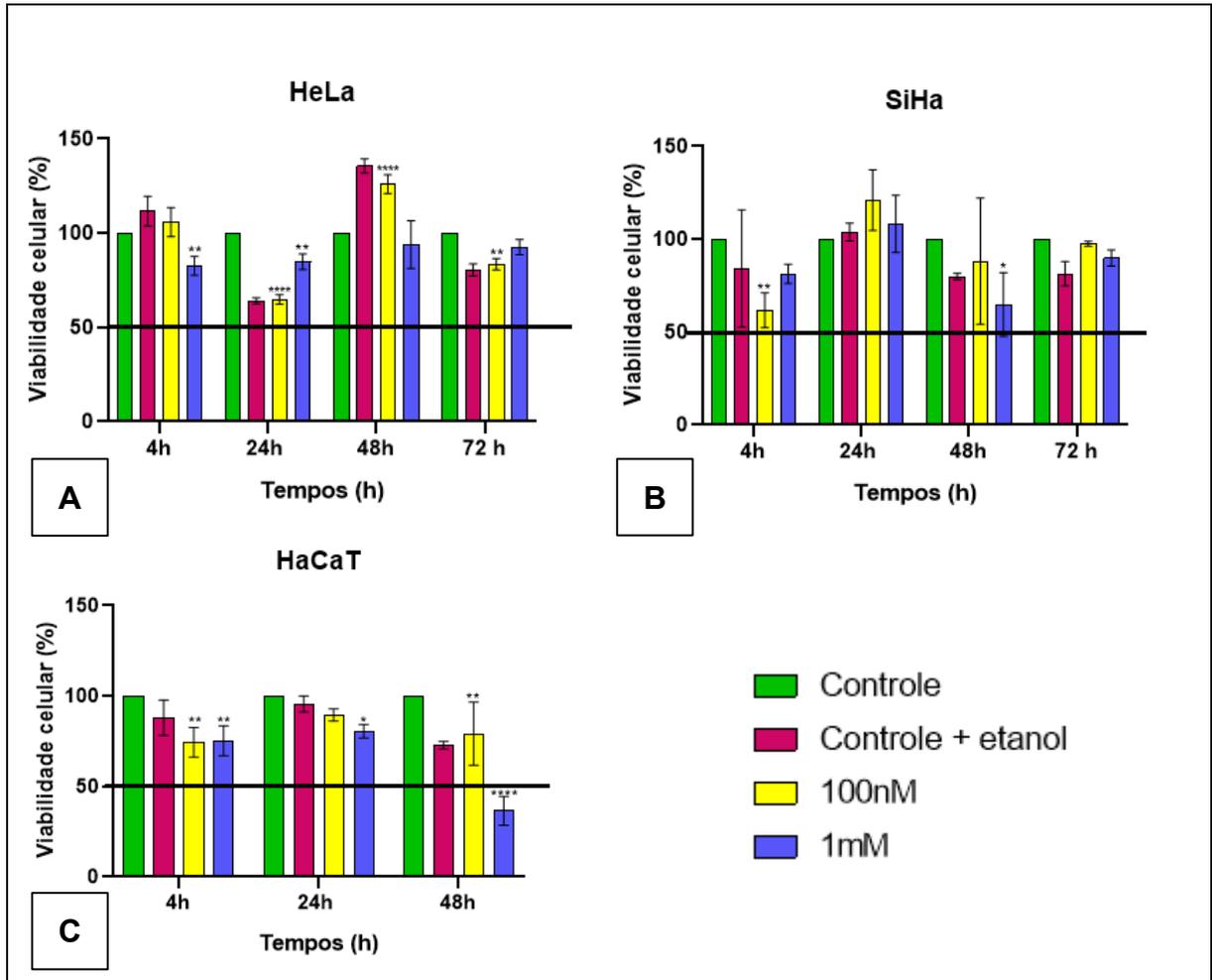
Na linhagem celular HeLa tratada com melatonina, nos tempos de 4, 24, 48 e 72 horas, foi possível notar que em todas as concentrações testadas, os índices ficaram acima de 50%, o que indica que não houve a diminuição da viabilidade celular, assim como no controle (Figura 7 A). É possível observar que no tempo de 24 horas as concentrações de 100 nM e 1 mM estiveram mais próximas de 50%, mas ainda assim não foram citotóxicas para as células.

Na linhagem celular SiHa, tratada com melatonina por 4, 24, 48 e 72 horas, também nota-se que em todas as concentrações testadas, os índices ficaram acima de 50%, o que indica que não foram citotóxicas para as células, assim como no controle (Figura 7 B).

Pode-se notar que no tempo de 4 horas a concentração de 100 nM alterou a viabilidade celular (próximo a 50%), mas ainda assim não foi citotóxica para as células. Os resultados obtidos mostraram-se favoráveis às células pois não foram citotóxicas mesmo tendo levado a diminuição da proliferação das mesmas.

Na linhagem celular HaCaT tratada com melatonina (Figura 7 C), observa-se que nos tempos de 4, 24 e 48 horas, na concentração de 100 nM, a viabilidade celular está acima de 50%, o que indica que o tratamento não foi citotóxico, assim como no controle. Já na concentração de 1 mM, no tempo de 48 horas, a viabilidade celular esteve abaixo do índice de 50, assim sendo citotóxica, mas nos outros tempos (4 e 24 horas) a viabilidade celular esteve acima de 50%, indicando o que foi visto nas linhagens tumorigênicas e assim não indicando citotoxicidade. No tempo de 72 horas, as células descolaram dos poços da placa de cultura, provavelmente devido à falta de espaço, assim não houve como fazer o experimento nesse tempo.

Figura 7. **Melatonina não é citotóxica.** Gráficos de citotoxicidade (MTS) das linhagens HeLa (A) e SiHa (B) tratadas por 4, 24, 48 e 72 horas e da linhagem HaCaT (C) tratadas por 4, 24, 48 horas com Melatonina nas concentrações de 100 nM e 1 mM.



Fonte: Elaborado pela autora. (*)= $p < 0,05$; (**)= $p < 0,01$; (***)= $p < 0,001$ e (****) = $p < 0,0001$; diferença significativa em relação ao controle.

Melatonina reduz a migração celular

O ensaio de migração celular foi realizado com a linhagem HeLa (Figura 8 A), no tempo de 24 horas, nas concentrações de 100 nM e 1 mM. Nota-se que em todos os tempos a concentração de 1 mM reduziu a migração celular, quando comparado ao controle e ao controle + etanol. Sendo possível, após a análise estatística, verificar

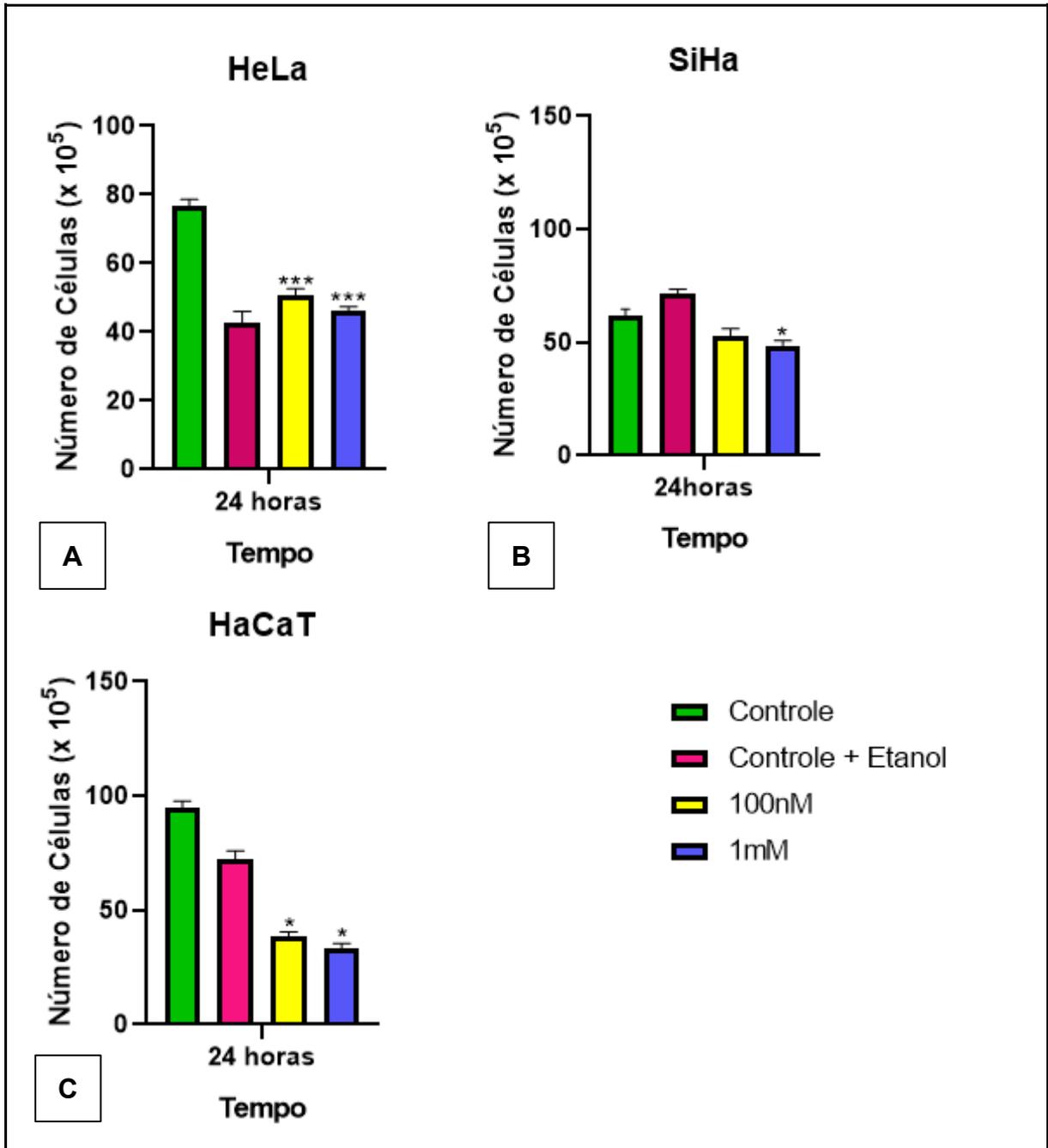
que no tempo de 24 horas a concentração de 1 mM. apresentou diferença significativa em relação ao grupo controle e controle + Etanol.

Para a linhagem celular SiHa (Figura 8 B), tratada por 24 horas, com as duas concentrações de melatonina (100 nM e 1 mM) houve diminuição na migração dessas células em relação ao controle e controle + etanol. No tempo de 24 horas, em ambas as concentrações de melatonina, nota-se a diminuição significativa da migração dessas células em relação ao controle e ao controle + etanol. Assim, pode-se observar que a melatonina promoveu um efeito anti migratório no tempo de 24 horas, sendo o mais significativo o tratamento de 1 mM.

Os resultados vistos por essa técnica, com as linhagens tumorigênicas (SiHa e HeLa), tratadas com melatonina, no tempo de 24 horas apresentaram diminuição significativa, por essa razão foram escolhidos para continuar os outros ensaios.

Nesse ensaio com a linhagem HaCaT (Figura 8 C), tratada com melatonina, no tempo de 24 horas, notou-se a diminuição no número de células migradas nas concentrações de 100 nM e 1 mM em relação ao controle e controle etanólico. Também quando compara-se as concentrações de 100 nM e 1 mM, nota-se que há diminuição significativa, no número de células migradas, da concentração de 1 mM em relação a 100 nM. Assim podemos inferir que a concentração de 1 mM de melatonina, no tempo de 24 horas, tem maior eficiência, como já havia sido visto nas linhagens tumorigênicas (SiHa e HeLa).

Figura 8. **Melatonina reduz a migração celular.** Gráficos de migração celular das linhagens HeLa (A), SiHa (B) e HaCaT (C) tratadas com Melatonina por 24 horas, nas concentrações de 100 nM e 1 mM.



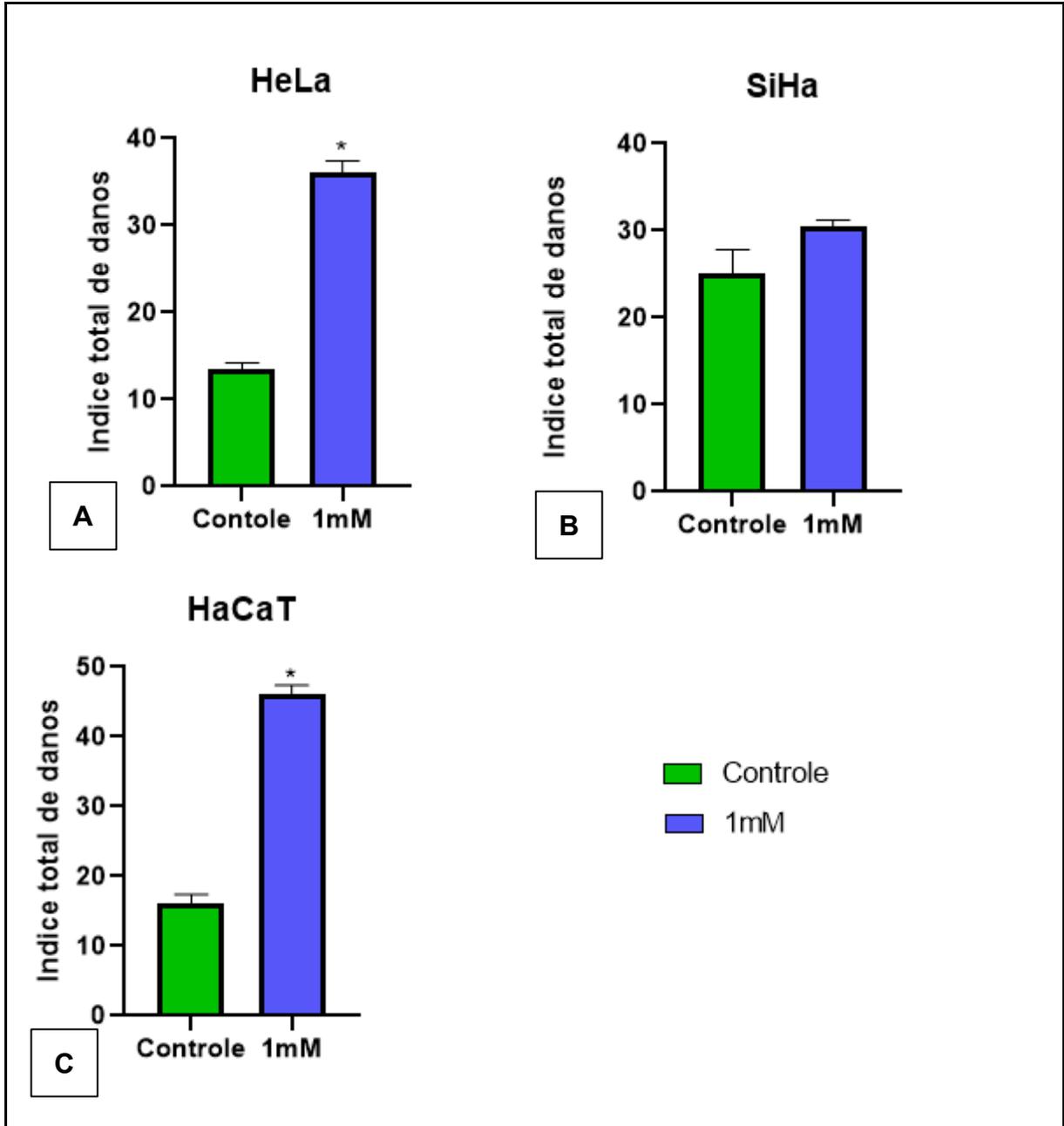
Melatonina induz danos no DNA

Por meio do ensaio cometa foi possível verificar que ocorreram danos ao material genético das células das duas linhagens tumorigênicas (HeLa e SiHa) e da linhagem normal (HaCaT), após 24 horas de tratamento com melatonina na concentração de 1 mM.

Para as linhagens HaCaT e HeLa foi possível observar que houve danos significativos após o tratamento com melatonina quando comparados ao controle. Enquanto na linhagem SiHa observou-se que, quando tratada com melatonina, não há diferença estatística na avaliação dos danos, em relação ao controle. Nas três linhagens é possível observar que o número de células é maior que no controle, pois quando a análise foi feita, essas células não mostraram danos nucleares (dano 0).

Apesar de termos realizado os demais ensaios com os dois controles negativos, com e sem etanol, como os resultados foram muito próximos, fizemos os próximos gráficos e estatística, apenas com a amostra sem etanol, como controle negativo.

Figura 9. **Melatonina induz danos no DNA.** Gráficos representativos do Índice total de danos, pelo ensaio cometa, das linhagens HeLa (A), SiHa (B) e HaCaT (C) tratadas com Melatonina por 24 horas, na concentração de 1 mM.



Fonte: Elaborado pela autora. (*)= $p < 0,05$; diferença significativa do tratamento em relação ao controle.

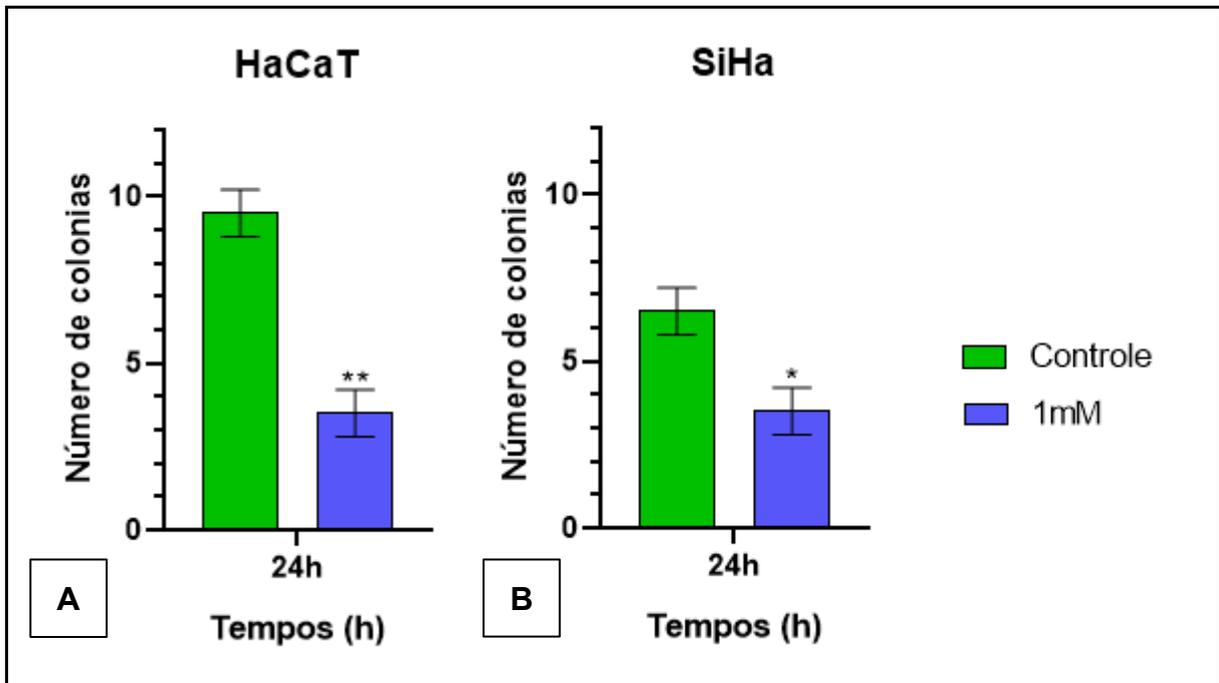
Melatonina diminui a formação de esferoides tumorais

Na linhagem celular HaCaT tratada com melatonina (Figura 10 A), foi possível observar que houve uma redução significativa na formação de colônia, em relação ao

controle, no tempo de 24 horas, na concentração de 1 mM. O mesmo resultado pode ser observado com as células SiHa (Figura 10 B), no qual a melatonina também impediu a formação de colônias. Os resultados obtidos corroboram com ensaio de proliferação celular, feito anteriormente, no qual a melatonina diminui a proliferação celular e conseqüentemente diminui a formação de colônias celulares.

Na linhagem celular HeLa não conseguimos finalizar o experimento, pois após o oitavo dia as células desgrudaram dos poços da placa de cultura.

Figura 10. **Melatonina diminui a formação de esferoides tumorais.** Gráficos indicando o número de colônias formadas nas linhagens HaCaT (A) e SiHa (B) tratadas com Melatonina por 24 horas, na concentração de 1 mM.



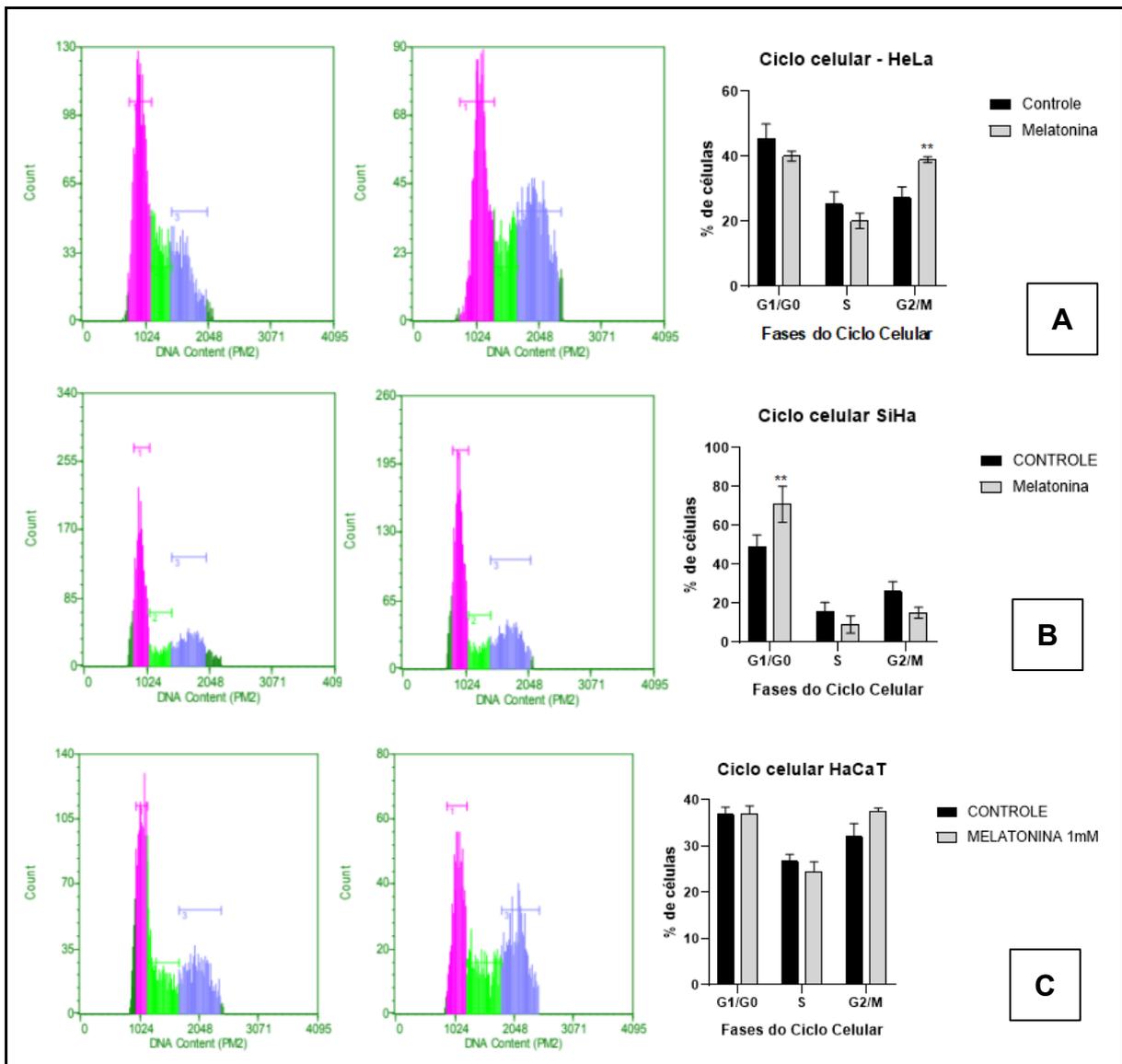
Fonte: Elaborado pela autora. (*)= $p < 0,05$ e (**)= $p < 0,01$; diferença significativa em relação ao controle.

Melatonina altera ciclo celular e apoptose

Os ensaios de ciclo celular e apoptose foram realizados com as três linhagens estudadas (HeLa, SiHa e HaCaT), no tempo de 24 horas e com a concentração de 1 mM. Os resultados mostraram que a melatonina, na linhagem celular HeLa (figura 11 A), levou a parada das células na fase G2/M do ciclo celular. Já na linhagem celular

SiHa, a melatonina acumulou as células na fase G1/G0 (figura 11 B). A linhagem HaCaT, não sofreu influência da melatonina no ciclo celular (figura 11 C). Sendo assim, é possível observar que a melatonina em linhagens tumorigênicas causa parada das células nos pontos de verificação do ciclo celular e o mesmo não ocorre nas células não tumorigênicas.

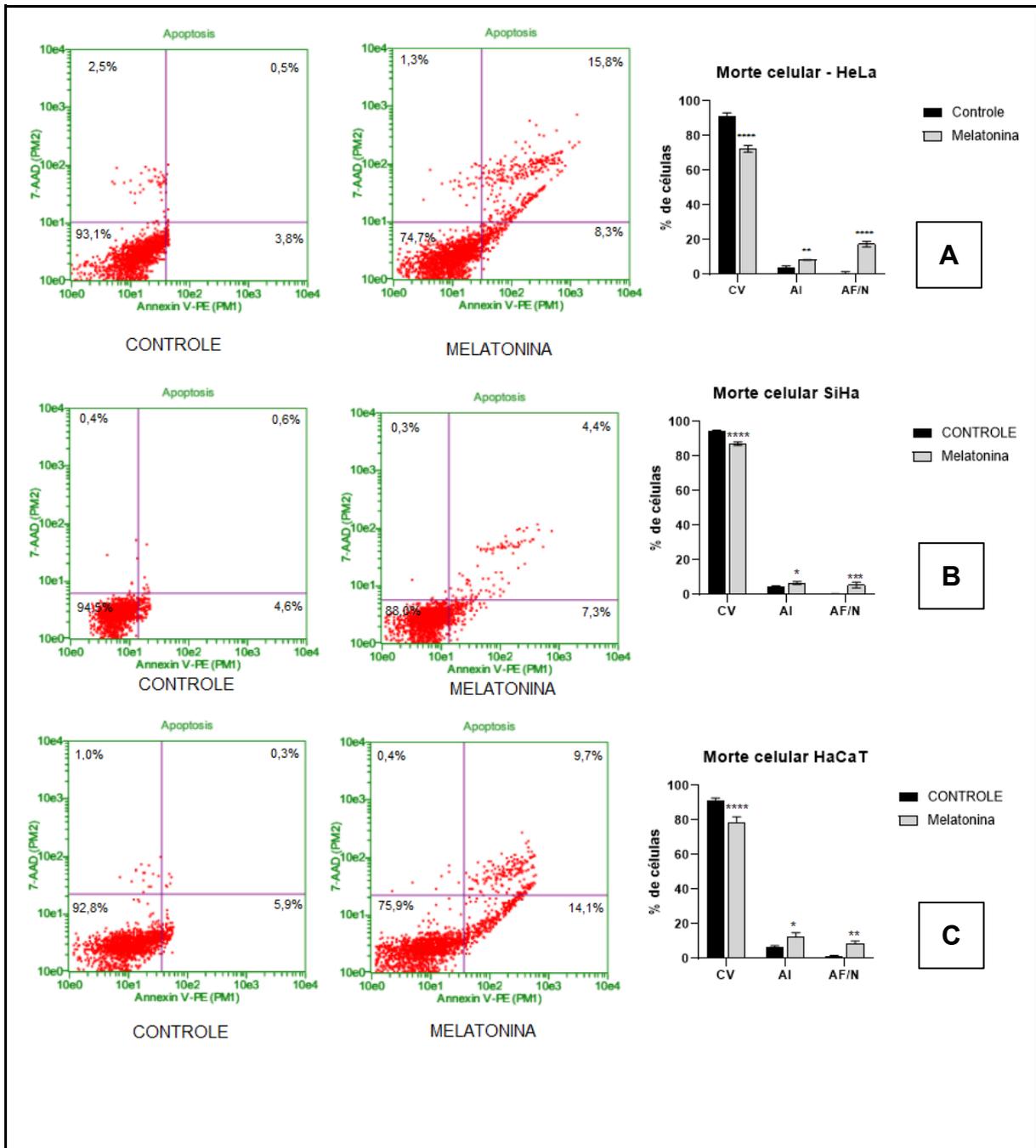
Figura 11. **Melatonina altera o ciclo celular.** Análise de ciclo celular das linhagens HeLa (A), SiHa (B) e HaCaT (C) tratadas com Melatonina por 24 horas, na concentração de 1 mM.



Fonte: Elaborado pela autora. (**)= $p < 0,015$; diferença significativa do tratamento em relação ao controle.

No ensaio de análise da apoptose, os resultados mostram que a melatonina estimulou morte celular programada apoptóticas nas células HeLa (figura 12 A), no qual 8,3% das células estavam em apoptose inicial (AI) e 15,8% em apoptose final ou necrose (AF), enquanto no controle, 93,1% das células estavam viáveis (CV). Na linhagem tumorigênica SiHa, a melatonina induziu a morte celular (figura 12 B), no qual 7,3% dessas células entraram em apoptose inicial (AI) e 4,4% em apoptose final ou necrose (AF), enquanto no controle, 94,5% das células estavam viáveis (CV). Já na linhagem HaCaT, observou-se anteriormente que a melatonina não causou parada das células nos pontos de verificação do ciclo celular, e nesse ensaio de apoptose que poucas células entram realmente em apoptose (figura 12 C). Enquanto 14,1% das células HaCaT encontram-se em apoptose inicial, apenas 9,7% em apoptose final ou necrose. Assim, é possível inferir que a melatonina tem ação na morte celular programada nas três linhagens estudadas no presente trabalho. Quando extrapolamos para o ambiente tumoral, a melatonina pode influenciar na morte celular tumoral causando efeitos inferiores nas células.

Figura 12. **Melatonina induz apoptose.** Análise de apoptose das linhagens HeLa (A), SiHa (B) e HaCaT (C) tratadas com Melatonina por 24 horas, na concentração de 1 mM.



Fonte: Elaborado pela autora. (*)= $p < 0,05$; (**)= $p < 0,01$; (***)= $p < 0,001$ e (****) = $p < 0,0001$; diferença significativa em relação ao controle.

Melatonina modula a expressão de genes da via PI3K/AKT

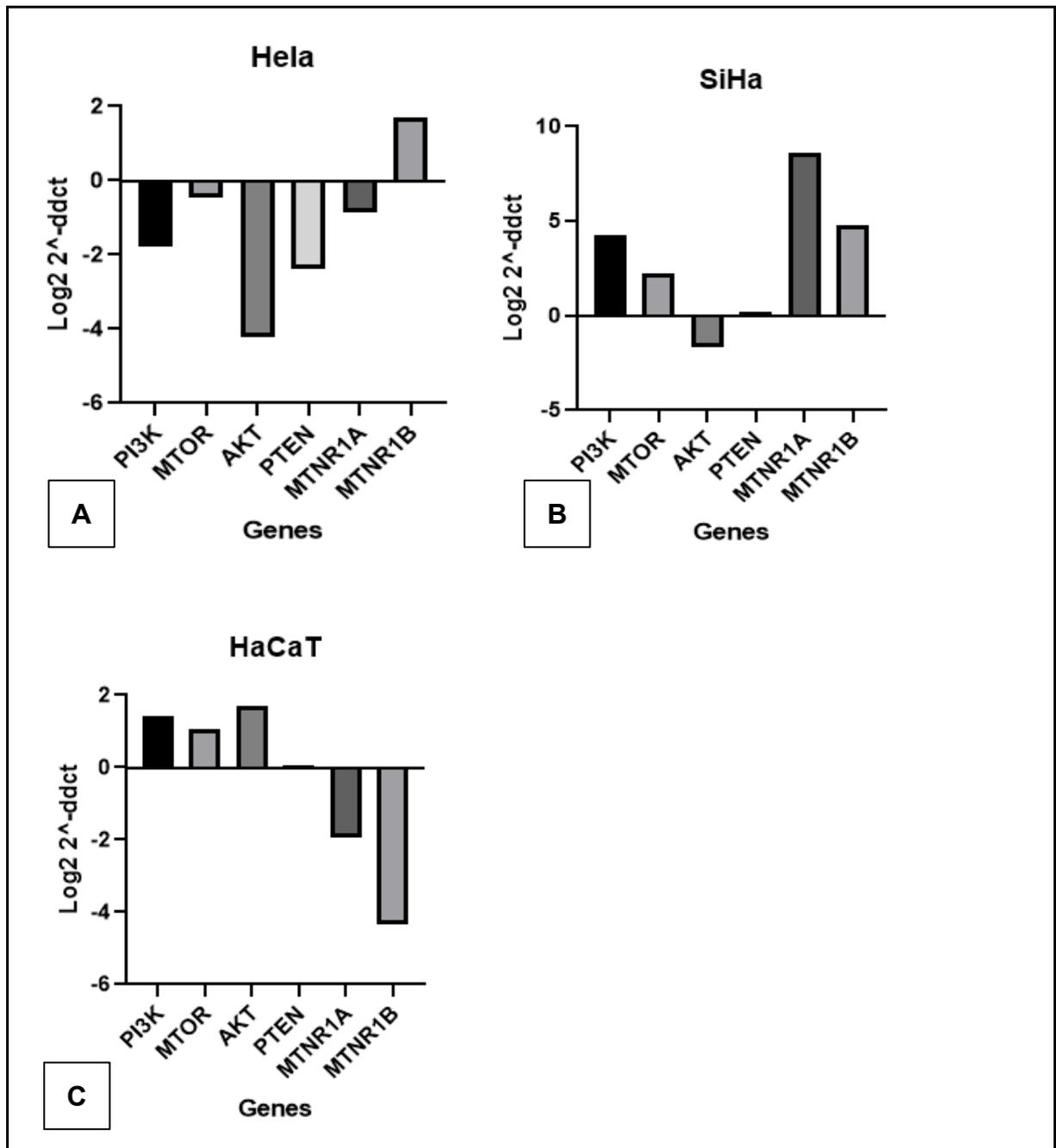
Após as extrações de RNA, no tempo e concentração escolhidos, como descrito anteriormente, foram avaliadas a qualidade e quantidade deste, pela presença das bandas ribossomais 18S e 28S, na corrida em gel de agarose, e pela análise em espectrofotômetro Nanodrop (Modelo Thermo Scientific™ NanoDrop™ 2000/2000c Spectrophotometers), que evidenciou uma razão de pureza (260/280 nm) próxima a 2,0 e uma boa concentração, variando de 143,5 a 316,6 ug/mL. A partir dessas concentrações de RNA, fizemos o cDNA para a utilização no PCR quantitativo.

Nessa análise da expressão gênica, foi observado na linhagem celular HeLa (figura 13 A), que a bioatividade da melatonina foi ativada agindo em seu receptor *MTNR1B*, que levou à sinalização de redução da expressão dos genes *PI3K*, *MTOR*, *AKT*, *PTEN* e do receptor *MTNR1A*. Portanto, determinamos que o tratamento de com melatonina (1 mM) por 24 horas inibiu a expressão de genes da via estudada em células HeLa.

Já em células SiHa (figura 13 B), a ativação da melatonina se deu pelos dois receptores *MTNR1A* e *MTNR1B*, reduzindo apenas a expressão de *AKT*, ou seja, a expressão dos genes *PI3K* e *MTOR* continuou elevada, após o tratamento com a melatonina.

Nas células HaCaT (figura 13 C), todos os genes estudados da cascata gênica em questão, foi observado o aumento da expressão após o tratamento com a melatonina. O mesmo não foi visto para os receptores de melatonina, *MTNR1A* e *MTNR1B*, em que a expressão foi diminuída após o tratamento.

Figura 13. **A melatonina modula a ativação da via de sinalização PI3K/AKT.** As células HeLa (A), SiHa (B) e HaCaT (C) foram tratadas com Melatonina (1 mM) por 24 horas e a expressão dos genes (PI3K, MTOR, AKT, PTEN, MTNR1A e MTNR1B) foi avaliada por PCR quantitativo. Os dados são representados como \log_2 , utilizando o método ddct, em comparação ao grupo controle (sem tratamento).



Fonte: Elaborado pela autora.

V – DISCUSSÃO

A melatonina, molécula pleiotrópica e multitarefa, é um hormônio natural produzido principalmente pela glândula pineal que regula o ritmo circadiano, também possui propriedades imunológicas, antioxidantes, hemostáticas e participa da regulação da glicose (CLAUSTRAT, et.al., 2015). Também possui efeitos apoptóticos, angiogênicos, oncostáticos e antiproliferativos em diferentes células tumorigênicas. Seu uso como adjuvante de quimioterápicos, para vir a ser um reforço dos efeitos terapêuticos, é de extrema importância, já que esta molécula é natural, produzida pelo organismo humano (BHATTACHARYA, et.al., 2019). Com isso, a investigação do potencial anticâncer da melatonina vem a ser de extrema importância para a comunidade científica.

Assim, o presente estudo evidenciou a melatonina e seus efeitos, quando administrada em linhagens de câncer de colo de útero (HeLa e SiHa), em diferentes tempos e concentrações, mas foi possível notar que o tempo de 24 horas e concentração de 1 mM apresentaram melhores resultados quando comparados com os outros tempos e concentrações estudados. Observamos nessas células tumorigênicas, a diminuição da proliferação e viabilidade celular, enquanto nas células não tumorigênicas (HaCaT) foi observado a diminuição na proliferação celular, mas a viabilidade se manteve íntegra.

A melatonina, no presente estudo, não alterou a morfologia das células tumorigênicas, nem nas não tumorigênicas, nos tempos e concentrações estudadas, assim como Panzer (1997), que também observou na linhagem celular HeLa, tratada com melatonina, nenhuma diferença morfológica, em relação às células sem tratamento.

Além disso, Amin e colaboradores (2019) observaram que em estudos *in vivo* com carcinoma de mama, a melatonina agiu como inibidor de crescimento, interrompendo a sinalização celular de estrogênio, assim causando diminuição de células reguladas por estrogênio, enquanto em estudos *in vitro* os pesquisadores também analisaram a diminuição da proliferação celular em células tumorigênicas de mama (MCF-7) e em carcinoma ascítico de Ehrlich, pela indução da apoptose e inibição da vascularização tumoral.

Em leiomioma uterino (linhagem ELT3) foi visto a diminuição da proliferação celular, após 24 horas de tratamento com melatonina, segundo Lin e colaboradores (2020) isso ocorreu devido à ativação dos receptores de melatonina, que por sua vez regulam negativamente a via de sinalização *AKT-ERK1/2-NFκB*. Então, podemos dizer que a melatonina diminui a proliferação em diferentes tipos de câncer, sendo um possível terapêutico no tratamento de diversos tumores.

Diminuição da proliferação também foi visto em linhagens celulares de câncer gástrico (BSG823 e SGC-7901), tratadas com melatonina (1 mM e 5mM), por 24 horas, e os autores atribuem esse fato ao aumento da expressão de miR-16-5p e inibição de *SMAD3*. Esse seria um mecanismo molecular para entender o efeito anticâncer da melatonina, com um potencial aplicação no tratamento do câncer gástrico (ZHU et al., 2018).

Apesar da melatonina não ter sido citotóxica nos nossos experimentos, Chen e colaboradores (2017) observaram, após o ensaio de viabilidade celular (MTT), que a melatonina, juntamente com co-tratamento com cisplatina, elevaram a porcentagem de células mortas, ou seja, reduziu a viabilidade das células HeLa. Esse efeito pode ser explicado pela indução da apoptose em células HeLa, acompanhado pela inativação da mitofagia associado ao bloqueio da via *JNK/Parkin*.

Estudos de associação da melatonina com outros quimioterápicos foi realizado por Pariente e colaboradores (2015), que observaram um aumento da citotoxicidade e apoptose na linhagem celular HeLa, tratada com melatonina por 24 horas, evidenciando que a melatonina pode vir a ser um agente sinérgico poderoso no tratamento do câncer de colo de útero.

Nossos resultados também indicaram uma redução da migração nas células tumorigênicas estudadas tratadas com a melatonina, assim como foi observado por Liu e colaboradores (2017), em linhagem tumorigênica colorretal (RKO), tratadas por 24 e 48 horas, no qual tiveram a migração inibida pela melatonina, provavelmente regulando negativamente a expressão do gene *ROCK* (Proteína quinase associada a Rho) e aumentando a expressão de *ZO-1* e ocludina na membrana celular, que pode estar associado, pela via de sinalização *p38/MAPK*.

Outra via que a melatonina também pode ativar, para justificar esse efeito antimigratório é a *GSK3 β* (Glicogênio sintase quinase 3 β), inibindo a fosforilação de *AKT* da serina-treonina quinase, induzindo a degradação de *β -catenina* e inibindo a transição epitélio-mesenquimal, um processo fundamental subjacente à metástase do câncer de mama (MAO et al., 2012).

Em câncer epitelial de ovário foi observado que a melatonina reduziu a carga tumoral abdominal *in vivo* e inibiu efeitos pró-metastáticos induzidos pela norepinefrina, pela regulação negativa do eixo *AKT/ β -catenina*, apoiando assim a aplicação clínica potencial da melatonina em câncer de ovário (BU et al., 2020).

Em células tronco de câncer de ovário (CSCs) foi observado que houve um efeito antimigratório nessas células tratadas com melatonina, independente das vias de sinalização *MAPK/PI3K*, apesar do seu papel fundamental na migração celular. A melatonina também diminui a transição epitélio-mesenquimal em CSCs por regulação negativa dos genes que estão envolvidos neste fenômeno. Assim, os pesquisadores sugerem o uso da melatonina como uma importante estratégia para superar a invasão tumoral e metástase (AKBARZADEH et al., 2017).

No teste de genotoxicidade foi observado que a melatonina age danificando os núcleos celulares nas três linhagens estudadas nesta investigação. Na linhagem celular HaCaT tratada, o dano nuclear foi visto e quando extrapolamos para apoptose celular notamos o mesmo efeito, pois a ação da melatonina aumentou os danos nucleares e essas células entraram no processo apoptótico, fragmentando o DNA. Mas no ensaio de análise do ciclo celular não ocorreu parada celular em nenhuma das fases, então vimos que a melatonina não influencia o ciclo celular nessa linhagem.

Na linhagem HeLa, a melatonina exerceu o mesmo efeito genotóxico, enquanto interessantemente não foi observado esse efeito na linhagem celular SiHa, pois a melatonina teve apenas um pequeno efeito genotóxico, porém não significativo, o que poderia ser explicado pela origem histológica diferente dessas linhagens, pois HeLa tem origem glandular, enquanto SiHa epitelial, ou uma outra explicação poderia ser devido às células SiHa precisarem de uma maior concentração de melatonina para sofrerem o efeito genotóxico.

Kontek e colaboradores (2013), em seus estudos com linhagens celulares de câncer de pulmão (A549), adenocarcinoma colorretal (HT29) e linfócitos humanos, tratadas com melatonina e irinotecano também verificaram ações diferentes de genotoxicidade. Em linfócitos houve dano ao DNA, mas não foi genotóxico, na linhagem A549, foi visto fragmentação no DNA celular e na linhagem HT29, a melatonina aumentou a genotoxicidade do irinotecano. Além disso, os autores mostram que o irinotecano quando testado juntamente com melatonina causou maiores danos no DNA celular, nas três linhagens estudadas, do que quando comparado ao tratamento somente com o irinotecano.

Diferente dos nossos resultados, Kocyigit e colaboradores (2018), em seus estudos com células de carcinoma epidermóide humano (A431) e fibroblastos normais humanos (1079Sk), tratados com melatonina, observaram que os efeitos genotóxicos foram significativamente maiores em células cancerosas do que aqueles observados em células normais. Os pesquisadores atribuem que esses efeitos sejam dose dependentes, pois foram vistos apenas em doses mais elevadas de melatonina, e podem ser devido à sua capacidade de produção de ROS. A melatonina então, nas células tumorigênicas atuaria como pró-oxidante, ativando danos ao DNA dependente de ROS, levando essas células à apoptose.

Em nossos estudos com as linhagens HaCaT e SiHa, foi visto que houve redução de formações de colônias celulares após o tratamento com melatonina em relação ao controle. Em linhagens de câncer colorretal tratadas com melatonina, Ji e colaboradores (2021), obtiveram resultados que corroboram com os nossos achados, pois observaram redução do número de colônias celulares em relação ao grupo sem tratamento, fato que atribuem a regulação positiva da expressão de miR 34a/4449a pela melatonina. Wang e colaboradores (2020) em seus estudos com carcinoma de células escamosas oral (SCC-9) também observaram que, houve diminuição significativa do número de colônias celulares, após o tratamento com melatonina, atribuindo essa diminuição a superexpressão de miR-25-p5.

Sobre o ciclo celular, nas células HeLa verificamos a parada em G2/M e em SiHa em G1/G0 e em ambas foi visto apoptose em fase inicial, final ou necrose.

Segundo Lin et al. 2020, esses resultados podem ser explicados pela modulação da expressão de proteínas pró e anti-apoptóticas, pela melatonina. Eles observaram em células de leiomioma uterino (ELT3) e de músculo uterino liso (UtSMC), tratadas com melatonina, um aumento de células em G0/G1, apesar de não resultar em apoptose, mas viram aumento de expressão nos genes supressores de tumor, *PTEN*, *p21* e *p27*, evidenciando que a melatonina agiu como protetora para as células em questão.

Em câncer gástrico, foi observado uma parada do ciclo celular em G0/G1 nas células SGC-7901 tratadas com melatonina e esse efeito foi associado a um aumento da expressão do gene *p21* na fase G1 (HUANG et al., 2020).

Em células de câncer de mama (MDA-MB-361), tratadas com melatonina, foi observado indução da apoptose celular pela supressão de *COX-2/PGE2/NF-kB*, sinalização de *PI3K/AKT* e ativação da via apoptótica dependente de *APAF-1/caspase*. A expressão de *COX-2* desempenhou um papel fundamental no processo de inflamação e câncer, com a inibição dessa, resultando em supressão do crescimento celular e indução da apoptose (WANG et al., 2012).

As vias de sinalização que a melatonina ativa, podem contribuir para suas atividades protetoras, entre elas, a via *PI3K/AKT* surge como uma das principais candidatas, devido ao seu papel no metabolismo e sobrevivência celular. Pois já foi relatado que a sinalização mediada por *PI3K/AKT* é uma das vias mais críticas na regulação da sobrevivência celular, proliferação e metabolismo em mamíferos (BELLACOSA et al., 1998; KILIC et al., 2005). *AKT* é regulado principalmente pela via do fosfatidilinositol (3, 4, 5) - trisfosfato (*PIP3*) e a fosforilação de *AKT* pode ser regulada pela melatonina, via ativação de *PI3K* (KILIC, et al., 2006). Portanto, alinhamos que a ativação dos receptores 1A e 1B pela administração de melatonina, reduzem a expressão dos genes da via *PI3K/AKT* e essa redução seria um dos principais contribuintes para o efeito benéfico da melatonina na diminuição da tumorigênese.

Em nossos resultados, observamos que na linhagem celular HeLa, o tratamento com melatonina levou à ativação da via *PI3K/AKT*, pelo receptor *MTNR1B*, que reduziu notavelmente a expressão dos genes *PI3K*, *MTOR*, *AKT*, *PTEN*, o que

pode estar relacionado também com a parada das células na fase G2/M do ciclo celular, o que conseqüentemente levou essas células à apoptose. Nossos resultados estão de acordo com Lin e colaboradores (2020), que também observaram uma ativação do receptor *MTNR1B* pela melatonina, que por sua vez regula negativamente a via de sinalização *AKT* e fez com que a maquinaria tumoral parasse.

Em adenocarcinoma de mama, Proietti e colaboradores (2010), observaram que o *AKT* fosforilado está reduzido significativamente após o tratamento com melatonina, o que também não aumentou a expressão de *PTEN*, o que pode ocorrer inicialmente, como um evento precursor, antes da regulação negativa de *AKT* fosforilado.

Já em células SiHa, a ativação da melatonina se deu pelos dois receptores *MTNR1A* e *MTNR1B*, reduzindo apenas a expressão de *AKT*, ou seja, a expressão dos genes *PI3K* e *MTOR* continuou elevada, mesmo após o tratamento com a melatonina. Wang e colaboradores (2012), observaram que a ativação da via de sinalização dependente de *AKT* também pode ser mediada por melatonina e que *PI3K* fosforilada e *AKT* são os mediadores de proliferação e sobrevivência celular, via receptor *MTNR1A*, em câncer de mama.

Em HaCaT, linhagem de queratinócitos normais humanos, não houve a ativação da via *PI3K/AKT* pelos receptores *MTNR1A* e *MTNR1B*, conseqüentemente a expressão de todos os genes estudados se manteve aumentada, como nas células normais de diferentes tecidos, vistos em outros estudos.

Assim, podemos concluir que o gene *AKT* tem potencial para ser o marcador genético que procuramos, pois em ambas as linhagens tumorigênicas (HeLa e SiHa) foi observada a expressão diminuída, após o tratamento e na linhagem normal (HaCaT) a expressão foi aumentada.

Song e colaboradores (2018) também observaram que o tratamento com a melatonina, em células de tumor gástrico, reduziu a expressão de *AKT* e aumentou de *p53*, sugerindo que a melatonina inibe o crescimento celular tumorigênico pela atenuação da atividade de *AKT*.

Diante do exposto, consideramos a melatonina um agente antiproliferativo, antimigratório, genotóxico, indutor de apoptose e modulador do ciclo celular e da expressão da via gênica *PI3K/AKT*, em câncer de colo de útero, sendo então promissor no tratamento desse tipo de câncer, mas futuros estudos são necessários, principalmente em relação a sua aplicação sozinho ou associado a outros tratamentos já existentes.

VI - CONCLUSÃO

Nossos achados, até o presente momento, permitem concluir que a melatonina, nas linhagens celulares tumorigênicas estudadas:

- Não altera a morfologia celular, mas reduz a proliferação e migração celular;
- Não é citotóxico, porém é genotóxico;
- Reduz formação de colônias tumorais;
- Induz as células estacionarem nas fases G1/G0 e G2/M do ciclo celular;
- Induz o processo de apoptose inicial, tardia e necrose;
- Modula a expressão de genes da via *PI3K/AKT*.

Dessa maneira, a melatonina parece apresentar uma ação antitumorigênica, por mecanismos relacionados às vias antiproliferativas, antimigratórias e apoptóticas e abrem novas possibilidades de estudos futuros para terapias associadas no câncer de colo de útero.

VII – REFERÊNCIAS

A CHUFFA, Luiz Gustavo; ALVES, Michelly s; MARTINEZ, Marcelo; CAMARGO, Isabel Cristina C; PINHEIRO, Patricia F F; DOMENICONI, Raquel F; L JÚNIOR, Luiz Antonio; MARTINEZ, Francisco Eduardo. Apoptosis is triggered by melatonin in an in vivo model of ovarian carcinoma. **Endocrine-Related Cancer**, [S.L.], v. 23, n. 2, p. 65-76, 10 nov. 2015. Bioscientifica.

A FERNANDES, Pedro; KINKER, Gabriela s; NAVARRO, Bruno V; JARDIM, Vinicius C; RIBEIRO-PAZ, Edson D; CÓRDOBA-MORENO, Marlina O; SANTOS-SILVA, Débora; MUXEL, Sandra M; FUJITA, André; MORAES, Carolina Borsoi. Melatonin-Index as a biomarker for predicting the distribution of presymptomatic and asymptomatic SARS-CoV-2 carriers. **Melatonin Research**, [S.L.], v. 4, n. 1, p. 189-205, 3 jan. 2021. ST Bio-life.

ALONSO-GONZALEZ C, MENENDEZ-MENENDEZ J, GONZALEZ-GONZALEZ A, GONZALEZ A, COS S, MARTINEZ-CAMPA C. Melatonin enhances the apoptotic effects and modulates the changes in gene expression induced by docetaxel in MCF7 human breast cancer cells. **Int J Oncol**. 2018;52:560–70.

ASK TF, LUGO RG, SUTTERLIN S. The neuro-immuno-senescence integrative model (NISIM) on the negative association between parasympathetic activity and cellular senescence. *Front Neurosci*. 2018;12:726.

BELLACOSA, Alfonso; CHAN, Tung O; AHMED, Naheed N; DATTA, Ketaki; MALSTROM, Scott; STOKOE, David; MCCORMICK, Frank; FENG, Jinan; TSICHLIS, Philip. Akt activation by growth factors is a multiple-step process: the role of the ph domain. **Oncogene**, [S.L.], v. 17, n. 3, p. 313-325, jul. 1998. Springer Science and Business Media LLC.

BHATTACHARYA, Sankha; PATEL, Krishna Kumar; DEHARI, Deepa; AGRAWAL, Ashish Kumar; SINGH, Sanjay. Melatonin and its ubiquitous anticancer effects. **Molecular And Cellular Biochemistry**, [S.L.], v. 462, n. 1-2, p. 133-155, 26 ago. 2019. Springer Science and Business Media LLC.

BHOWMICK, N. A.; MOSES, H. L. Tumor-stroma interactions. **Current Opinion in Genetics & Development, London**, v. 15, p. 97-101, 2005.

BU, Shixia; WANG, Qian; SUN, Junyan; LI, Xiao; GU, Tingting; LAI, Dongmei. Melatonin suppresses chronic restraint stress-mediated metastasis of epithelial ovarian cancer via NE/AKT/ β -catenin/SLUG axis. **Cell Death & Disease**, [S.L.], v. 11, n. 8, p. 1-10, ago. 2020. Springer Science and Business Media LLC.

BURD, Eileen M.. Human Papillomavirus and Cervical Cancer. **Clinical Microbiology Reviews**, [S.L.], v. 16, n. 1, p. 1-17, jan. 2003. American Society for Microbiology.

CHEN, Xueran et al.,. Melatonin inhibits tumorigenicity of glioblastoma stem-like cells via the AKT-EZH2/STAT3 signaling axis. **Journal Of Pineal Research**, [s.l.], v. 61, n. 2, p.208-217, 4 jun. 2016.

CHEN, Li et al.,. Melatonin increases human cervical cancer HeLa cells apoptosis induced by cisplatin via inhibition of JNK/Parkin/mitophagy axis. **In Vitro Cell Dev Biol Anim**, v. 54, n. 1, p.1-10, 2018.

CLAUSTRAT, B.; LESTON, J.. Melatonin: physiological effects in humans. **Neurochirurgie**, [S.L.], v. 61, n. 2-3, p. 77-84, abr. 2015. Elsevier BV..

CHUFFA, Luiz Gustavo de Almeida; REITER, Russel J; LUPI, Luiz Antonio. Melatonin as a promising agent to treat ovarian cancer: molecular mechanisms. **Carcinogenesis**, [S.L.], v. 38, n. 10, p. 945-952, 2 jun. 2017. Oxford University Press (OUP).

CHRYSOSTOMOU, Andreas; STYLIANOU, Dora; CONSTANTINIDOU, Anastasia; KOSTRIKIS, Leondios. Cervical Cancer Screening Programs in Europe: the transition towards hpv vaccination and population-based hpv testing. **Viruses**, [S.L.], v. 10, n. 12, p. 729, 19 dez. 2018. MDPI AG.

FISCHER, Martin; QUAAS, Marianne; STEINER, Lydia; ENGELAND, Kurt. The p53-p21-DREAM-CDE/CHR pathway regulates G2/M cell cycle genes. **Nucleic Acids Research**, [S.L.], v. 44, n. 1, p. 164-174, 17 set. 2015. Oxford University Press (OUP).

HARDELAND, Rüdiger. Melatonin and the electron transport chain. **Cellular And Molecular Life Sciences**, [S.L.], v. 74, n. 21, p. 3883-3896, 7 ago. 2017. Springer Science and Business Media LLC.

HILL, S. M. et al.,. **Melatonin: an inhibitor of breast cancer**. **Endocrine Related Cancer**, v.22, n. 3, p. R183R204, 3 jun .2015.

Hu Q, Peng J, Liu W, He X, Cui L, Chen X, et al.,. **Elevated cleaved caspase-3 is associated with shortened overall survival in several cancer types**. *Int J Clin Exp Pathol*. 2014;7:5057–70.

HUANG, Hsuan-Shun; CHU, Sung-Chao; HSU, Che-Fang; CHEN, Pao-Chu; DING, Dah-Ching; CHANG, Meng-Ya; CHU, Tang-Yuan. Mutagenic, surviving and tumorigenic effects of follicular fluid in the context of p53 loss: initiation of fimbria carcinogenesis. **Carcinogenesis**, [S.L.], v. 36, n. 11, p. 1419-1428, 10 set. 2015. Oxford University Press (OUP).

HUANG, Yongye; YUAN, Kexun; TANG, Meifang; YUE, Jiaming; BAO, Lijun; WU, Shuang; ZHANG, Yanxin; LI, Yin; WANG, Yihang; OU, Xu. Melatonin inhibiting the survival of human gastric cancer cells under ER stress involving autophagy and Ras-Raf-MAPK signalling. **Journal of Cellular And Molecular Medicine**, [S.L.], v. 25, n. 3, p. 1480-1492, 25 dez. 2020. Wiley.

JI, Guangyu; ZHOU, Wenjuan; LI, Xian; DU, Jingyi; LI, Xinyue; HAO, Hongbo. Melatonin inhibits proliferation and viability and promotes apoptosis in colorectal cancer cells via upregulation of the microRNA-34a/449a cluster. **Molecular Medicine Reports**, [S.L.], v. 23, n. 3, p. 1-2, 5 jan. 2021. Spandidos Publications.

JAAFAR, F.; RIGHI, E.; LINDSTROM, V.; NOHADANI, M.; VAN NOORDEN, S.; LLOYD, T.; POZNANSKY, J.; STAMP, G.; DINA, R.; COLEMAN, D. V.; POZNANSKY, M. C. Correlation of CXCL12 expression and FoxP3+ cell infiltration with human papillomavirus infection and clinicopathological progression of cervical cancer. **The American Journal of Pathology**, Bethesda, v. 175, n. 4, p. 1525-1535, Oct., 2009.

KILIC, Ertugrul; KILIC, Ülkan; REITER, Russel J.; BASSETTI, Claudio L.; HERMANN, Dirk M.. Tissue-plasminogen activator-induced ischemic brain injury is reversed by melatonin: role of inos and akt. *Journal Of Pineal Research*, [S.L.], v. 39, n. 2, p. 151-155, 21 mar. 2005. Wiley.

KILIC, Ertugrul; KILIC, Ülkan; WANG, Yaoming; BASSETTI, Claudio L.; MARTI, Hugo H.; HERMANN, Dirk M.; KILIC, Ertugrul; KILIC, Ülkan; WANG, Yaoming; BASSETTI, Claudio L.. The phosphatidylinositol-3 kinase/Akt pathway mediates VEGF's neuroprotective activity and induces blood brain barrier permeability after focal cerebral ischemia. **The FASEB Journal**, [S.L.], v. 20, n. 8, p. 1185-1187, 26 abr. 2006. Wiley.

KOCYIGIT, Abdurrahim; GULER, Eray Metin; KARATAS, Ersin; CAGLAR, Hifa; BULUT, Huri. Dose-dependent proliferative and cytotoxic effects of melatonin on human epidermoid carcinoma and normal skin fibroblast cells. **Mutation Research/Genetic Toxicology And Environmental Mutagenesis**, [S.L.], v. 829-830, p. 50-60, maio 2018. Elsevier BV.

LIN, Po-Han; TUNG, Yen-Ting; CHEN, Hsin-Yuan; CHIANG, Yi-Fen; HONG, Hui-Chih; HUANG, Ko-Chieh; HSU, Sung-Po; HUANG, Tsui-Chin; HSIA, Shih-Min. Melatonin activates cell death programs for the suppression of uterine leiomyoma cell proliferation. **Journal Of Pineal Research**, [S.L.], v. 68, n. 1, 28 nov. 2020. Wiley.

LIU, Zhen; ZOU, Duobing; YANG, Xiaoping; XUE, Xiaolong; ZUO, Li; ZHOU, Qing; HU, Ruolei; WANG, Yuan. Melatonin inhibits colon cancer RKO cell migration by

downregulating Rho-associated protein kinase expression via the p38/MAPK signaling pathway. **Molecular Medicine Reports**, [S.L.], v. 16, n. 6, p. 9383-9392, 19 out. 2017. Spandidos Publications

MAO, Lulu; DAUCHY, Robert T.; BLASK, David E.; SLAKEY, Lauren M.; XIANG, Shulin; YUAN, Lin; DAUCHY, Erin M.; SHAN, Bin; BRAINARD, George C.; HANIFIN, John P.. Circadian Gating of Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Breast Cancer Cells Via Melatonin-Regulation of GSK3 β . **Molecular Endocrinology**, [S.L.], v. 26, n. 11, p. 1808-1820, 1 nov. 2012. The Endocrine Society.

MORADKHANI, Fatemeh; MOLOUDIZARGARI, Milad; FALLAH, Marjan; ASGHARI, Narjes; KHOEI, Heidar Heidari; ASGHARI, Mohammad Hossein. Immunoregulatory role of melatonin in cancer. **Journal of Cellular Physiology**, [S.L.], v. 235, n. 2, p. 745-757, 4 jul. 2019. Wiley.

NICHOLS TC, FISCHER TH, DELIARGYRIS EN, BALDWIN AS Jr. Role of nuclear factorkappa B (NF-kappa B) in inflammation, periodontitis, and atherogenesis. **Ann Periodontol**. 2001;6:20–9.

ONGENAERT, M.; WISMAN, G. B.; VOLDERS, H. H.; KONING, A. J.; ZEE, A. G.; VAN CRIEKINGE, W.; SCHUURING, E. Discovery of DNA methylation markers in cervical cancer using relaxation ranking. **BMC Medical Genomics, London**, v. 24, p. 1-57, Nov., 2008.

PAN, Li-Li; WANG, Ai-Yan; HUANG, Yong-Qi; LUO, Yu; LING, Min. Mangiferin Induces Apoptosis by Regulating Bcl-2 and Bax Expression in the CNE2 Nasopharyngeal Carcinoma Cell Line. **Asian Pacific Journal Of Cancer Prevention**, [S.L.], v. 15, n. 17, p. 7065-7068, 15 set. 2014. Asian Pacific Organization for Cancer Prevention.

PARIENTE, Roberto et al.,. Melatonin sensitizes human cervical cancer HeLa cells to cisplatin-induced cytotoxicity and apoptosis: effects on oxidative stress and DNA fragmentation. **Journal Of Pineal Research**, [s.l.], v. 60, n. 1, p.55-64, 18 nov. 2016. Wiley.

PROIETTI, Sara; CUCINA, Alessandra; D'ANSELMI, Fabrizio; DINICOLA, Simona; PASQUALATO, Alessia; LISI, Elisabetta; BIZZARRI, Mariano. Melatonin and vitamin D3 synergistically down-regulate Akt and MDM2 leading to TGF β -1-dependent growth inhibition of breast cancer cells. **Journal Of Pineal Research**, [S.L.], nov. 2010. Wiley.

POURHANIFEH, Mohammad Hossein; SHARIFI, Mehran; REITER, Russel J.; DAVOODABADI, Abdoulhossein; ASEMI, Zatollah. Melatonin and non-small cell lung

cancer: new insights into signaling pathways. **Cancer Cell International**, [S.L.], v. 19, n. 1, 16 maio de 2019. Springer Science and Business Media LLC.

RAVINDRA, T.; LAKHMI, N. K.; AHUJA, Y. R. Melatonin in pathogenesis and therapy of cancer. **Indian journal of medical sciences**, v. 60, n.12, p. 523-535, dez. 2006.

REITER, R. et al.,. Melatonin, a Full Service Anti-Cancer Agent: Inhibition of **Initiation, Progression and Metastasis**. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 4, p. 843, 17 abr. 2017.

REITER, R. J.; TAN, D-X.; PAPPOLLA, M. A. Melatonin Relieves the Neural Oxidative Burden that Contributes to Dementias. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1035, n. 1, p. 179-196, 1 dez. 2004.

SANKARANARAYANAN, J.W. Sellors & R. et al.,. **Colposcopia e tratamento da neoplasia intra-epitelial cervical: Manual para principiantes**. 2003. International Agency for Research on Cancer.

SEEDORF, K et al. Identification of early proteins of the human papilloma viruses type 16 (HPV 16) and type 18 (HPV 18) in cervical carcinoma cells. **The Embo Journal**, [s. /], v. 1, n. 6, p. 139-144, jan. 1987.

SANCHEZ DI, GONZALEZ-FERNANDEZ B, CRESPO I, SAN-MIGUEL B, ALVAREZ M, GONZALEZ-GALLEGO J, et al.,. Melatonin modulates dysregulated circadian clocks in mice with diethylnitrosamine-induced hepatocellular carcinoma. **J Pineal Res**. 2018;65:e12506.

SHAFABAKHSH, Rana; REITER, Russel J.; MIRZAEI, Hamed; TEYMOORDASH, Somayyeh Noei; ASEMI, Zatollah. Melatonin: a new inhibitor agent for cervical cancer treatment. **Journal Of Cellular Physiology**, [S.L.], v. 234, n. 12, p. 21670-21682, 27 maio 2019. Wiley.

SOTO-DE LEON, S.; CAMARGO, M.; SANCHEZ, R.; MUNOZ, M.; PEREZ-PRADOS, A.; PURROY, A.; PATARROYO, M. E.; PATARROYO, M. A. Distribution patterns of infection with multiple types of human papillomaviruses and their association with risk factors. **PLoS One**, San Francisco, v. 6, n. 2, e14705, Feb., 2011.

TAMARKIN, L. et al., Melatonin inhibition and pinealectomy enhancement of 7, 12dimethylbenz(a)anthracene-induced mammary tumors in the rat. **Cancer research**, v. 41, n. 11 Pt 1, p. 4432-6, nov. 1981.

TERRA-FILHO, M.; KITAMURA, S. Occupational lung cancer. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, São Paulo, v. 32, p. 60-68, 2006.

TORRE, Lindsey A.; SIEGEL, Rebecca L.; WARD, Elizabeth M.; JEMAL, Ahmedin. Global Cancer Incidence and Mortality Rates and Trends—An Update. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, [S.L.], v. 25, n. 1, p. 16-27, 14 dez. 2015. American Association for Cancer Research (AACR).

TSAI, Ching-Chou; LIN, Yu-Ju; YU, Hong-Ren; SHEEN, Jiunn-Ming; TAIN, You-Lin; HUANG, Li-Tung; TIAO, Mao-Meng. Melatonin alleviates liver steatosis induced by prenatal dexamethasone exposure and postnatal high-fat diet. **Experimental And Therapeutic Medicine**, [S.L.], v. 2, n. 1, p. 3-4, 6 jun. 2018. Spandidos Publications.

XU L, JIN QD, GONG X, LIU H, ZHOU RX. Anti-gastric cancer effect of melatonin and Bcl-2, Bax, p21 and p53 expression changes. **Sheng Li Xue Bao**. 2014;66:723–9.

ZARE, Hadis; SHAFABAKHSH, Rana; REITER, Russel J.; ASEMI, Zatollah. Melatonin is a potential inhibitor of ovarian cancer: molecular aspects. **Journal Of Ovarian Research**, [S.L.], v. 12, n. 1, 26 mar. 2019. Springer Science and Business Media LLC.

YILMAZ E, GUL M, MELEKOGLU R, KOLELI I. Immunohistochemical analysis of nuclear factor kappa Beta expression in etiopathogenesis of ovarian tumors. *Acta Cir Bras*. 2018;33:641–50.

ZHANG, Rui; WANG, Xuebin; NI, Leng; DI, Xiao; MA, Baitao; NIU, Shuai; LIU, Changwei; REITER, Russel J.. COVID-19: melatonin as a potential adjuvant treatment. **Life Sciences**, [S.L.], v. 250, p. 117583, jun. 2020. Elsevier BV.

WALBOOMERS, J. M.; JACOBS, M. V.; MANOS, M. M.; BOSCH, F. X.; KUMMER, J. A.; SHAH, K. V.; SNIJDERS, P. J.; PETO, J.; MEIJER, C. J.; MUÑOZ, N. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. **The Journal of Pathology, London**, v. 189, n. 1, p. 12-19, Sep., 1999.

WANG, Jingshu; XIAO, Xiangsheng; ZHANG, Yun; SHI, Dingbo; CHEN, Wangbing; FU, Lingyi; LIU, Liqun; XIE, Fangyun; KANG, Tiebang; HUANG, Wenlin. Simultaneous modulation of COX-2, p300, Akt, and Apaf-1 signaling by melatonin to inhibit proliferation and induce apoptosis in breast cancer cells. **Journal Of Pineal Research**, [S.L.], v. 53, n. 1, p. 77-90, 16 fev. 2012. Wiley.

WANG, Yanling; TAO, Bo; LI, Jiaying; MAO, Xiaoqun; HE, Wei; CHEN, Qinbiao. Melatonin Inhibits the Progression of Oral Squamous Cell Carcinoma via Inducing miR-25-5p Expression by Directly Targeting NEDD9. **Frontiers In Oncology**, [S.L.], v. 10, 2 dez. 2020. Frontiers Media SA.