

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
CENTRO DE CIÊNCIAS QUÍMICAS, FARMACÊUTICAS E DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E BIOPROSPECÇÃO



Dissertação

**AVALIAÇÃO DE MARCADORES BIOQUÍMICOS E DE VIABILIDADE
CELULAR EM DIFERENTES TEMPOS E DOSES DE MELATONINA NA
LINHAGEM DU 145**

Alessandra Cortes Teotonio

Pelotas, 2018

Alessandra Cortes Teotonio

Avaliação de marcadores bioquímicos e de viabilidade celular em diferentes tempos e doses de melatonina na linhagem DU 145

Dissertação apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção como requisito parcial à obtenção do título de mestre.

Orientador(a): Izabel Cristina Custódio de Souza

Coorientador (a): Giovana Gamaro

Dados de catalogação na fonte:
Ubirajara Buddin Cruz – CRB 10/901
Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

T314a Teotonio, Alessandra Cortes
 Avaliação de marcadores bioquímicos e de viabilidade celular em diferentes tempos e doses de melatonina na linhagem DU 145 / Alessandra Cortes Teotonio. – 62f. : il. – Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção. Universidade Federal de Pelotas. Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e da Alimentação, 2018. – Orientadora Izabel Cristina Custódio de Souza ; co-orientadora Giovana Gamaro.

1.Câncer de próstata. 2.Melatonina. 3.DU 145. I.Souza, Izabel Cristina Custódio de. II.Gamaro, Giovana. III.Título.

CDD: 616.99463

A banca examinadora, abaixo assinada, aprova a dissertação intitulado "Avaliação de marcadores bioquímicos e de viabilidade celular em diferentes tempos e doses de melatonina na linhagem DU 145", de autoria de Alessandra Cortes Teotonio.

Data da defesa: 14 de Maio de 2018

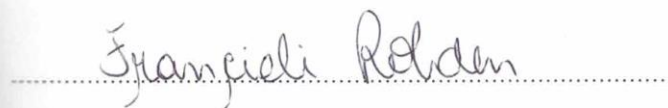
Banca examinadora:



Prof^a. Dr^a. Izabel Cristina Custódio de Souza (Orientadora). Doutora em Ciências Biológicas - Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul



Prof^a. Dr^a. Giana de Paula Cognato. Doutora em Ciências Biológicas - Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul



Prof^a. Dr^a. Francieli Rohden. Doutora em Ciências Biológicas - Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção da Universidade Federal de Pelotas, pela possibilidade da formação acadêmica.

A minha querida orientadora Prof^a. Dr^a. **Izabel Cristina Custódio de Souza**, por todas as oportunidades, dedicação, incentivo e orientação que me proporcionaram crescimento pessoal e profissional.

A minha estimada coorientadora Prof^a. Dr^a **Giovana Gamaro** por toda a disposição, incentivo e paciência que me ajudaram na confecção deste trabalho, além de todo o ensinamento profissional e pessoal.

A Prof^a. Dr^a. **Giana de Paula Cognato**, pelas contribuições para este trabalho, e pela participação como banca examinadora. A Dr^a. **Francieli Rohden**, pela participação como banca examinadora, e pelas sugestões para este trabalho.

A todos os integrantes do Grupo de Pesquisa em Neuromodulação celular (NeuroCell), mas principalmente aos colegas **Caroline Crespo da Costa, Priscila Centeno Crespo, Adriéle da Silva, Gabriel Veiga, Jéssica Thamony Carlos Gonçalves e Clara Camacho dos Reis** pelo apoio, amizade e colaboração dedicada durante o desenvolvimento deste trabalho. Agradeço ainda à minha família, principalmente a minha mãe **Marlene Cortes Ferreira**, namorado **Guilherme Dani Hermann** e amigos por toda a compreensão, apoio, incentivo e carinho.

RESUMO

Título: Avaliação de marcadores bioquímicos e de viabilidade celular em diferentes tempos e doses de melatonina na linhagem DU 145.

Autor: Alessandra Cortes Teotonio

Orientadora: Dr^a. Izabel Cristina Custódio de Souza

Coorientadora: Giovana Duzzo Gamaro

O câncer de próstata (Pca) é a segunda neoplasia com maior mortalidade no mundo. O desenvolvimento do Pca não é perfeitamente conhecido. Os tratamentos são extremamente caros e ao mesmo tempo com efeitos adversos debilitantes, principalmente para pacientes Pca resistente a ablação androgênica. A melatonina (MLT) é uma molécula endógena que apresenta propriedade antitumoral promissora em diversas neoplasias. Desta forma, o objetivo deste estudo foi realizar uma curva de tratamento com MLT em diferentes concentrações (1nM, 10nM, 100nM, 1µM, 10µM e 100µM) por diferentes tempos de tratamento (24h, 48h, 72, 120h e 240h) na linhagem celular DU 145 independente de andrógeno. Avaliou-se a viabilidade celular por meio de ensaios com brometo de dimetiltiazoldifeniltetrazólio (MTT) e pela técnica de exclusão com azul de tripan. Além dos ensaios citados anteriormente, foram realizados a quantificação do conteúdo proteico pelo método Bradford, avaliação da atividade e massa mitocondrial das células DU 145, tratadas com MLT utilizando citometria de fluxo com marcação fluorescente (MitoTracker™ Green (MTG) e Red (MTR)). Nossos estudos demonstraram um efeito antiproliferativo na concentração mais elevada de MLT (100 µM) e o tempo a partir de 120h. A partir dos resultados obtidos, conclui-se que a molécula MLT é promissora na inibição da linhagem DU 145 de Pca na concentração de 100 µM em tempos superiores a 120h. No entanto, mais estudos são necessários para elucidar os mecanismos envolvidos nesses efeitos.

Palavras-chaves: Câncer de próstata, melatonina, DU 145

ABSTRACT

Title: Evaluation of biochemical markers and cell viability at different times and doses of melatonin in the DU 145 strain

Author: Alessandra Cortes Teotonio

Orientadora: Dr^a. Izabel Cristina Custódio de Souza

Coorientadora: Giovana Gamaro

Prostate cancer (Pca) is a disease of unpredictable evolution, being the second neoplasm with the highest mortality in the world. The development of Pca is not well known, several proteins are related to the process, and may be the reason for the treatments being extremely expensive and at the same time with debilitating adverse effects, especially for Pca patients resistant to androgen ablation. The melatonin (MLT) is an endogenous molecule that has promising antitumor properties in several neoplasms. Due to its potential, this work aimed to perform a treatment curve with MLT in different concentrations (1nM, 10nM, 100nM, 1μM, 10μM and 100 μM) for different treatment times (24h, 48h, 72, 120h and 240h) in the androgen independent cell line DU 145. Cell viability was assessed by means of dimethylthiazoldiphenyltetrazolium bromide (MTT) assays and trypan blue exclusion technique. In addition to quantification of the protein content by the Bradford method and evaluation of the activity and mitochondrial mass of DU 145 cells treated with MLT by means of fluorescence using MitoTracker [™] Green (MTG) and Red (MTR) reagents. The results demonstrated that the higher MLT concentration and the time from 120h provided the best antiproliferative results. Regarding the time of 120h and 240h, there was no conclusive result about the best effect. The data show that the molecule is promising in the treatment of Pca. However, more studies are needed to elucidate the mechanisms involved in these effects.

Key Words: prostate cancer, melatonin, DU 145

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRAFICA

Figura 1. Ferramentas utilizadas para busca de referências bibliográficas desta revisão.....	16
Figura 2. Localização e dimensão da glândula prostática; (b) Ampliação com a localização de um câncer na próstata (adaptado de(American Cancer Society, 2018)	17
Figura 3. Representação esquemática do processo de oncogênese da próstata (adaptado de Feldman <i>et al</i> , 2014).....	20
Figura 4. Representação esquemática da síntese da melatonina (adaptado de Iuvone <i>et al.</i> , 2005).....	23
Figura 5. Processo de apoptose (Adaptado de Kubli e Gustafsson, 2012).	27
Figura 6. Interação e atividade da melatonina intracelular (adaptado de Leon <i>et al.</i> , 2005).	29

MANUSCRITO

Figure 1. Quantification of cellular protein content.....	46
Figure 2.. Cell viability analysis by MTT assay	47
Figure 3. Cell proliferation assay by tripan blue exclusion.....	48
Figure 4. Analysis of mass and mitochondrial activity by fluorometry.....	49

LISTA DE ABREVIATURAS

AA-NAT - arilalquilamina N-acetiltransferase

AKT – proteína quinase B, do inglês *Protein kinase B*

AMPC - monofosfato cíclico de adenosina, do inglês *cyclic adenosine monophosphate*

AR(s) – receptor(es) de andrógeno(s), do inglês *androgen receptor(s)*

Bad - promotor associada morte Bcl-2, do inglês *Bcl-2-associated death promoter*

Bcl-2 - linfoma de células B-2, do inglês *B-cell lymphoma 2*

Bcl-xl - linfoma de células B extra-grandes, do inglês *B-cell lymphoma-extra large*

BDNF - fator neurotrófico derivado do cérebro, do inglês *Brain-derived neurotrophic factor*

COX-2 - Ciclo-oxigenase-2

CRPC – câncer de próstata resistente a castração, do inglês *castration-resistant prostate cancer*

DHT - di-hidrotestosterona

DNA - ácido desoxirribonucleico, do inglês *deoxyribonucleic acid*

ERK – quinases reguladas por sinal extracelular do inglês *extracellular signal-regulated kinases*

GLUT1 - transportador de glicose 1 do inglês *glucose transporter 1*

HIF-1 α - fator 1- alfa indutível por hipóxia, do inglês *hypoxia-inducible factor 1-alpha*

IGF-1 - fator de crescimento semelhante à insulina 1, do inglês *Insulin-like growth factor 1*

IGFBP3 – proteína 3 de ligação ao fator de crescimento semelhante à insulina do inglês *insulin-like growth factor-binding protein 3*

JNK - c-JUN N-terminal quinase, do inglês *c-Jun N-terminal kinases*

LHRH - hormônio liberador de hormônio luteinizante, do inglês *Luteinizing hormone-releasing hormone*

MAPK - proteína quinase ativada por mitógeno, do inglês *mitogen-activated protein kinase*

MLT - melatonina

mTOR - alvo da rapamicina em mamífero, do inglês *mammalian target of rapamycin*

P75NTR – receptor de neurotrofina p75, do inglês *p75 neurotrophin receptor*

Pca – câncer de próstata, do inglês *prostate cancer*

PCNA - antígeno nuclear de células em proliferação do inglês *proliferating cell nuclear antigen*

PKA - proteína quinase A, do inglês *Protein kinase A*

PKC - proteína quinase C, do inglês *Protein kinase C*

PSA - antígenos específicos da próstata, do inglês *prostate-specific antigens*

ROs – espécies reativas do oxigênio, do inglês *reactive oxygen species*

Sirt1 – sirtuína 1

TrkB - receptor tirosina quinase B, do inglês *tyrosine receptor kinase B*.

.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. OBJETIVOS	14
Geral.....	14
Específicos	14
3. REVISÃO DA LITERATURA	15
Câncer de Próstata.....	16
Linhagens Celulares do Câncer de Próstata.....	21
Melatonina e o Câncer de Próstata	22
Relação mitocondrial em neoplasias.	26
6. MANUSCRITO	30
7. CONCLUSÃO.....	50
8. PERSPECTIVAS.....	51
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52

1. INTRODUÇÃO

O câncer de próstata (Pca) é a segunda neoplasia mais frequente no Brasil e o segundo tipo de câncer com maior mortalidade mundial. O Instituto Nacional do Câncer (INCA) estima o surgimento de mais de 68 mil novos casos até o final de 2018 (Inca, 2018). A etiologia desta doença está relacionada à predisposição genética, idade, etnia e associada a fatores de risco como tabagismo, má alimentação e sedentarismo (Stewart e Wild, 2014).

O Pca também pode ser modulado pela expressão e alteração de diversas proteínas como o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), essa neurofina apresenta alta afinidade por receptores de tirosina quinase B (TrkB) e menor afinidade por receptores de neurofina p75 (p75NRT). Estudos sugerem que o aumento da malignidade está diretamente associado ao aumento da sinalização de TrkB (Festuccia *et al.*, 2007; Bronzetti *et al.*, 2008). Ademais, o BDNF e seu receptor TrkB estão envolvidos em uma variedade de neoplasias, cujo o receptor está intimamente ligado ao início do carcinoma (Han *et al.*, 2007).

A correlação entre ciclo celular e apoptose está comprovada devido às funções do linfoma de células B-2 (Bcl-2), promotor associada morte Bcl-2 (Bad) e linfoma de células B extragrandes (Bcl-xl) entre outras proteínas. A fosforilação e desfosforilação destas proteínas controladas por proteínas quinases e proteínas fosfatases constitui um dos principais mecanismos que regulam uma variedade de processos na célula incluindo a morte celular (Paker; *et al.*, 2001).

Cabe ressaltar que alterações de sinalização no alvo da rapamicina em mamífero (mTOR), conhecida por estabelecer a cascata de reações envolvendo a sobrevivência celular, também está relacionada com o desenvolvimento de carcinomas, visto que a ativação da via promove aumento do conteúdo proteico e o crescimento celular necessário para o processo de divisão (Kim *et al.*, 2002; Jacinto *et al.*, 2004).

Atualmente os tratamentos existentes para o Pca incluem realização de cirurgias, radioterapia, quimioterapias, hormonioterapia, entre outros. Esses

tratamentos podem ser aplicados separadamente ou associados dependendo do estágio da doença (Heidenreich *et al.*, 2007). Porém, geralmente os pacientes apresentam diversos efeitos adversos que costumam ser agressivos e debilitantes ao organismo. Em casos de prostatectomia, por exemplo, é comumente relatado complicações como incontinência, disfunção erétil e a formação de hérnia inguinal (Ward *et al.*, 2005). Por outro lado, o uso de quimioterápicos, gera efeitos adversos como, dor, náuseas, vômitos, diarreia, distúrbio no sono dentre outros sintomas que debilitam o paciente dificultando o tratamento, que retornará a ser realizado apenas após a melhora do quadro (Fromme *et al.*, 2004).

Dentro deste contexto, surge a necessidade de métodos terapêuticos alternativos que visam, diminuir concomitantemente o carcinoma e os efeitos adversos atrelados ao tratamento. A melatonina (MLT), um neuro-hormônio derivado do triptofano é naturalmente produzido e secretado pela glândula pineal, a qual regula o ciclo circadiano, ritmo sazonal (Ackermann e Stehle, 2006; Lerchl, A. e Reiter, R. J., 2012) e modula funções imunológicas (Reiter, 2003; Toma *et al.*, 2007). A MLT apresenta uma redução significativa na sua secreção noturna em neoplasias de próstata (Bartsch *et al.*, 1992; Sigurdardottir *et al.*, 2015). Ademais este hormônio está sendo aplicado em diversos estudos, que evidenciam efeitos antidepressivo (Cardinali *et al.*, 2012), antienvhecimento (Pandi-Perumal *et al.*, 2013), antioxidantes (Galano *et al.*, 2011), anti-inflamatórios (Kireev *et al.*, 2008; Russel J. Reiter, 2008) e também antitumoral (Tamarkin *et al.*, 1981; Paroni *et al.*, 2014).

Em diversos estudos foi demonstrado que a MLT reduz significativamente o crescimento de tumores humanos *in vitro*, através de utilização das linhagens LNCap, PC3 e DU 145 (Roberta M. Moretti, 2000; Siu *et al.*, 2002; Sainz *et al.*, 2005; Jung-Hynes *et al.*, 2011; Paroni *et al.*, 2014). Embora a maioria dos carcinomas sejam dependentes de andrógenos, ocorre a progressão do tumor para uma condição de independência de andrógenos, sendo as opções terapêuticas para essas neoplasias mais resistentes ainda muito limitadas (Gittes 1991).

Neste sentido, estudos *in vitro* com linhagens de Pca independentes de androgênios, com destaque a linhagem DU 145, quando tratadas com MLT demonstrou que mesmo em células resistentes ocorre o potencial antineoplásico do neuro-hormônio ((Marelli *et al.*, 2000; Jung-Hynes *et al.*, 2011).

No presente estudo foi analisado parâmetros bioquímicos que envolvem os efeitos da MLT com relação à proliferação celular em uma curva de dose e tempo em células DU 145, linhagem celular independente de andrógenos.

2. OBJETIVOS

Geral

Este estudo teve por objetivo avaliar o efeito da MLT sobre os mecanismos bioquímicos de cultura de células neoplásicas de próstata DU 145.

Específicos

- Avaliar o efeito de diferentes concentrações (1nM, 10nM, 100nM, 1µM, 10µM e 100µM) de melatonina nas células DU 145 sobre viabilidade celular por meio de MTT e exclusão por Tripan;
- Avaliar o efeito de diferentes tempos (24h, 48h, 72h, 120h e 240h) de exposição à melatonina nas células DU 145 sobre viabilidade celular por meio de MTT e exclusão por Tripan;
- Quantificar o conteúdo proteico nas diferentes concentrações e tempos de tratamento com melatonina pelo método de Bradford;
- Avaliar a massa e a função mitocondrial por meio de ensaio com fluorescência dos marcadores MitoTraker Green e Red.

3. REVISÃO DA LITERATURA

Esta revisão aborda alguns aspectos fisiológicos e bioquímicos do desenvolvimento do câncer de próstata, bem como, os efeitos e os mecanismos associados ao tratamento com melatonina em células, animais e humanos. Desta forma, tornou-se necessário a busca de referências bibliográficas em no mínimo três bases de dados, Pubmed, Lilacs e Scielo. Sendo assim, foram pesquisadas as palavras chaves “prostate cancer” = câncer de próstata, “melatonin” = melatonina, “mitochondria” = mitocôndria, e a combinação dos mesmos.

A partir do levantamento bibliográfico, foi possível observar que a utilização da melatonina tem mostrado resultados satisfatórios, tanto em estudos *in vitro*, como *in vivo*. Além disso, essa substância vem sendo indicada para tratar pacientes com distúrbios do sono, destacando-se também como antidepressivo, anti-inflamatório, imunomodulador, bem como, antitumoral em diferentes tipos de carcinomas. Esse hormônio abre uma grande possibilidade no tratamento de pacientes portadores de carcinoma prostático.

Apesar de efeitos satisfatórios em neoplasias de próstata, mostrado em diversos estudos, os diferentes mecanismos de ação da melatonina ainda necessitam ser melhores elucidados, principalmente os relacionados à carcinomas prostáticos resistentes à castração. Abaixo na figura 1, estão mostradas as diferentes combinações de palavras-chave para a revisão na literatura.

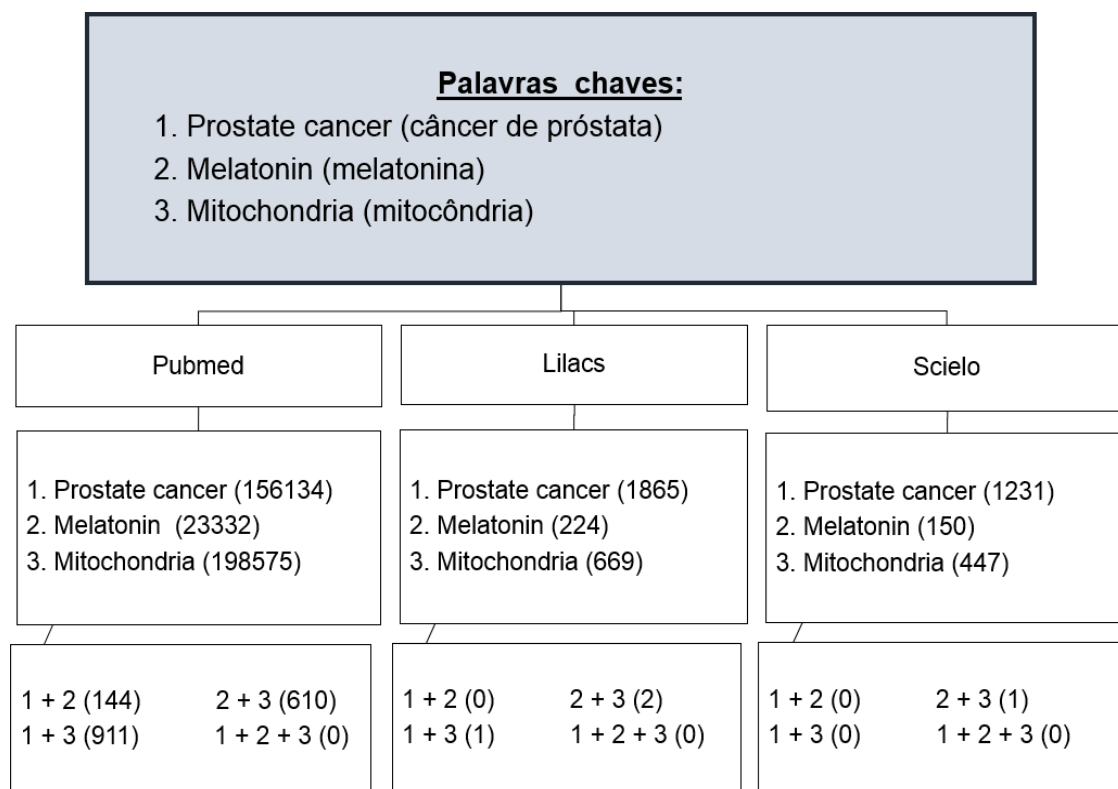


Figura 1. Ferramentas utilizadas para busca de referências bibliográficas desta revisão.

Câncer de Próstata

A próstata é uma glândula anexa ao aparelho reprodutor masculino (Figura 2a), localizado entre bexiga e o reto, que necessita de androgênios para o desenvolvimento e maturação normal (Chatterjee, 2003). Apresenta como função o armazenamento e secreção de um fluído alcalino, que compõe o sêmen, sendo importante para prolongar a vida do espermatozoide no canal vaginal. Essa glândula está sujeita a uma série de patologias, dentre elas, neoplasia maligna (Figura 2b) (American Cancer Society, 2018).

O Pca costuma ser assintomático até em fases avançadas. A evolução da doença é relativamente imprevisível, com casos de rápida disseminação, antes mesmo de surgirem os sintomas locais. Em alguns casos nota-se apenas dores pélvica, lombar e ao urinar, além de sangue na urina, sintomas muito similares a hiperplasia benigna (American Cancer Society, 2018).

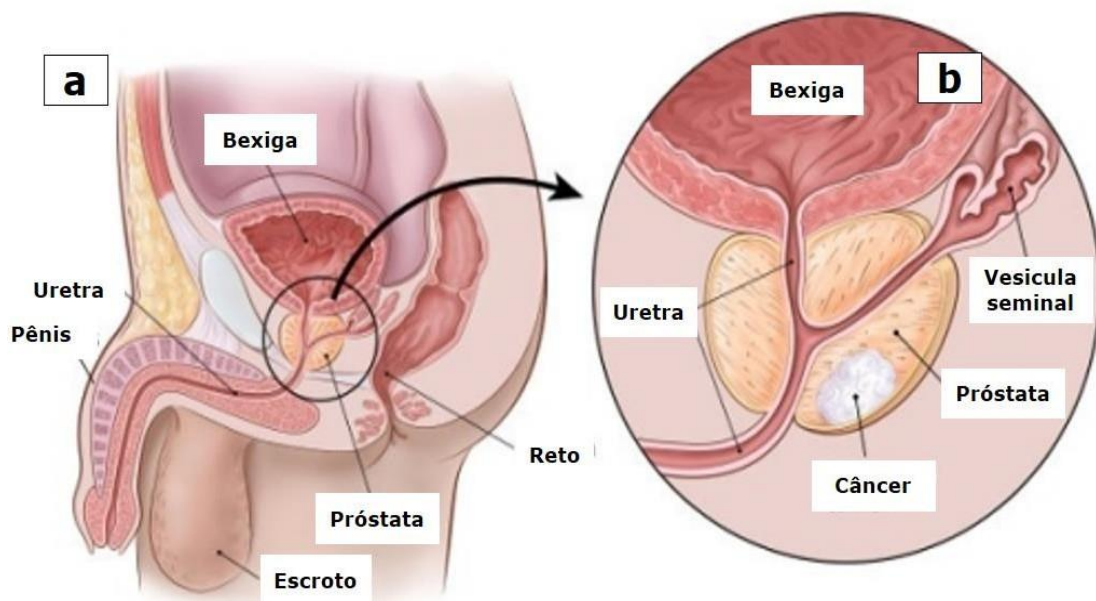


Figura 2. Localização e dimensão da glândula prostática; (b) Ampliação com a localização de um câncer na próstata (adaptado de American Cancer Society, 2018)

Neste contexto, a realização de exames regulares auxilia no diagnóstico precoce levando a menor morbidade para o indivíduo. No Brasil, a identificação da patologia é realizada por meio de exame físico e sanguíneo para o antígeno prostático específico (PSA), mas a confirmação ocorre somente com a biópsia da próstata (Brasil, 2002).

Os fatores que determinam a etiologia do desenvolvimento do Pca não são bem conhecidos, mas sabe-se que a idade, por exemplo é um fator de risco importante, devido a incidência e mortalidade elevada após 50 anos (Brasil, 2002). Outro importante fator de risco é a história familiar de parentes de primeiro grau, tais como pai ou irmão com Pca antes dos 60 anos, além da origem étnica, visto que ocorrem maior incidência em afrodescendentes (Crawford, 2009).

Os mecanismos genéticos e moleculares envolvidos na oncogênese, bem como, na progressão do câncer de próstata, envolvem problemas no reparo do DNA de células acometidas por lesões genéticas (Cotran *et al.*, 2000). Além disso, outros fatores relacionados aos principais mecanismos que regulam uma variedade de processos celulares incluindo a morte celular é diretamente relacionado a desregulação de proteínas quinases e fosfatases (Okada e Mak, 2004).

A apoptose é um mecanismo inato de defesa antineoplásica, pois vários agentes quimioterápicos agem por meio da indução dessa morte celular. Desta forma, uma intensa investigação dos mecanismos moleculares do processo de apoptose e a aplicação de quimioterápicos no tratamento do câncer tem sido estudada (Nicholson, 2000).

Algumas famílias de proteínas indutoras e/ou repressoras de morte por apoptose, como a Bcl-2, estão envolvidas no desenvolvimento tumoral. A desregulação dessa família de proteínas está intimamente relacionada ao aumento de espécies reativas de oxigênio, descontrole do pH intracelular e desestabilização do potencial de membrana mitocondrial. (Chong *et al.*, 2014).

Outro fato importante, é que, os carcinomas apresentam níveis elevados de hormônio do crescimento, como o similar a insulina-1 (IGF-1) e de hormônios androgênicos, por exemplo, a testosterona e diidrotestosterona (DHT). Estes hormônios masculinos atuam em receptores androgênicos (AR), promovendo a proliferação celular. O processo de oncogênese, causa instabilidade celular, molecular e genética, levando ao desequilíbrio entre proliferação celular e apoptose, iniciando o Pca (Chatterjee, 2003; American Cancer Society, 2018).

Contudo, os tumores de próstata, principalmente os mais agressivos também podem se desenvolver de forma independente de androgênicos ou até mesmo de seus receptores. Estes tipos de Pcas tornam-se resistentes a tratamentos como, hormonioterapia (Taplin *et al.*, 1999).

Diante disso, cinco mecanismos foram apresentados por Feldman e Feldman para demonstrar a resistência ao tratamento de ablação androgênica (figura 3): (a) A via hipersensível em que o aumento na densidade e

sensibilidade de AR acarreta no estímulo da proliferação celular mesmo com pequenas quantidades de androgênios; (b) A via promíscua em que mutação em AR permite a estimulação por pseudo-androgênios endógenos e exógenos, como corticoides e antagonistas de androgênios (flutamida); (c) Na via ilegítima ocorre a progressão do tumor independente de androgênio, por ação de fatores de crescimentos em ARs que desencadeiam na ativação da via da proteína quinase B (AKT) ou da via proteína quinase mitógeno-ativada (MAPK) resultado na proliferação celular; (d) A via escape em que observa-se a independência de androgênio e de AR, e a progressão do tumor ocorre por ativação de proteínas anti-apoptóticas da família Bcl-2 através da mitocôndria (Lin *et al.*, 2013; Ferreira *et al.*, 2014). A ausência do AR pode ser explicada pela perda dos genes p53 e RB (genes supressores de tumor), que geram a instabilidade cromossômica e resultando na perda deste receptor (Logothetis *et al.*, 2013); (e) A via células-tronco ocorre quando uma subpopulação de células-tronco do epitélio da próstata ausentes de AR e independente de androgênio originam o tumor, e o mesmo acaba sendo selecionado no processo de tratamento antineoplásico (Feldman e Feldman, 2001).

As principais terapias disponíveis para o Pca incluem: prostatectomia total, a radioterapia, o bloqueio androgênico e a quimioterapia (American Cancer Society, 2018). A prostatectomia consiste na retirada da próstata, representa uma das intervenções mais comuns no tratamento de neoplasias prostáticas. Estudos mostraram que, homens submetidos à prostatectomia apresentaram sintomas, ainda que temporariamente, como alterações psicológicas, da função intestinal e urinária e relacionadas à sexualidade (Palmer, 2001; Burt *et al.*, 2005).

Outras terapias incluem, a radioterapia, hormonioterapia e a vigilância ativa. Entre essas alternativas, a radioterapia, pode apresentar complicações mais agressivas como, lesões actínicas de órgãos pélvicos que podem aparecer até tardiamente (Dornas *et al.*, 2008). A terapia hormonal, comumente utilizada, tem por objetivo reduzir o nível de androgênios, mas por outro lado, pode ocorrer a progressão para o Pca resistente a castração (CRPC) (Chandrasekar *et al.*, 2015).

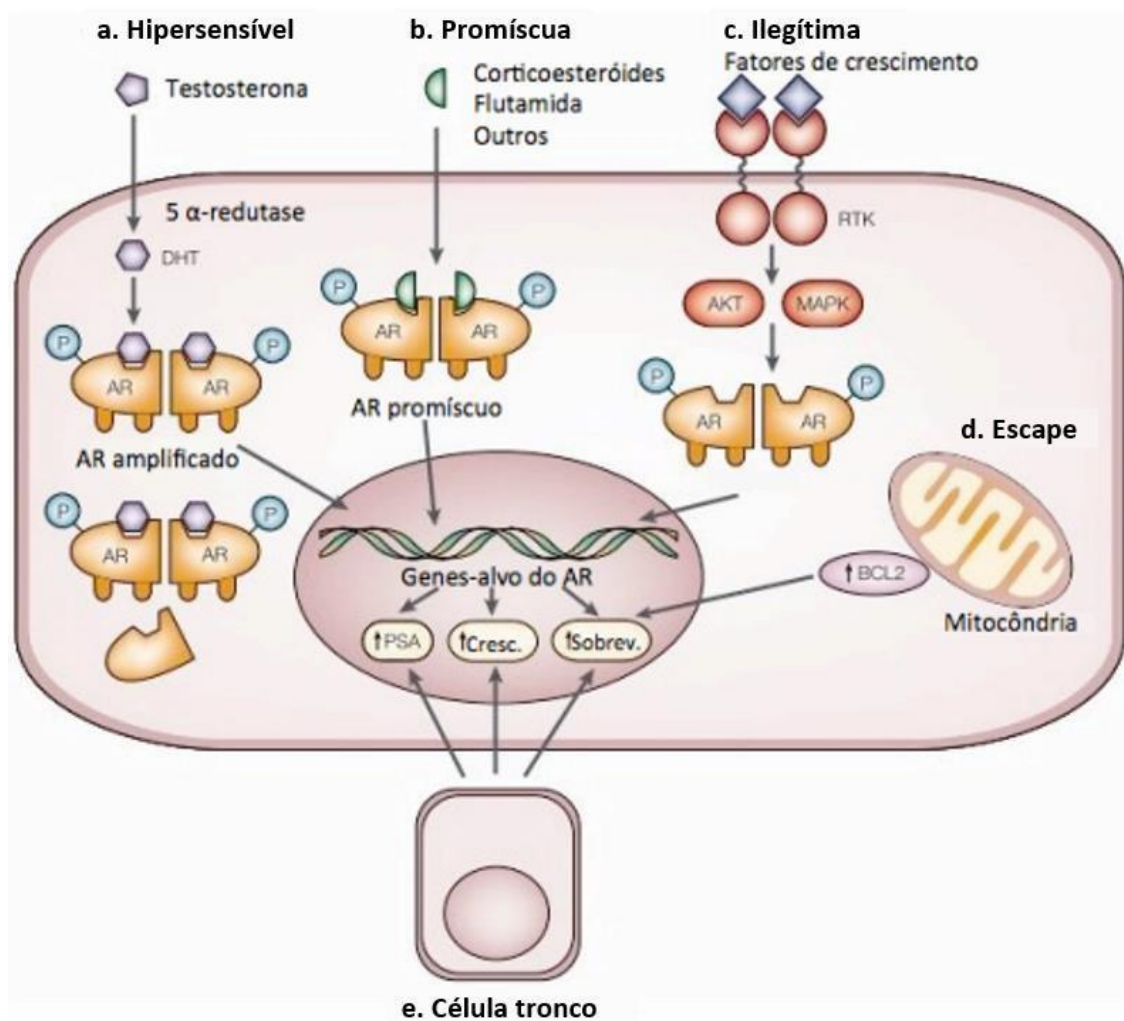


Figura 3. Representação esquemática do processo de oncogênese da próstata (adaptado de Feldman *et al*, 2014).

Vários estudos mostraram que os mecanismos de ação e os efeitos toxicológicos de novos tratamentos e a oncogênese em linhagens celulares, tornaram-se fundamentais para as pesquisas *in vitro*, estabelecendo um modelo simples para explicar processos biologicamente complexos.

Linhagens Celulares do Câncer de Próstata

As linhagens celulares de células neoplásicas humanas são originadas a partir dos diversos órgãos. No entanto, as linhagens referentes ao Pca, não são muito diversificadas, sendo as mais estudadas são: LNCap, PC3 e DU 145. Essas linhagens apresentam como características, são originadas de adenocarcinoma prostático em metástase. A LNCap, por exemplo, é originada de metástase de linfonodos supra clavicular, a PC3 de metástase óssea e a DU 145 de metástase cerebral (Atcc, 2018).

As linhagens referidas anteriormente podem estar relacionadas à presença ou ausência dos hormônios androgênicos como por exemplo, a linhagem LNCap que apresenta sensibilidade à androgênio, enquanto que, as Linhagens PC3 e DU 145, apresentam, baixa sensibilidade e insensibilidade a androgênios, respectivamente (Atcc, 2018). Dentre elas, a linhagem celular DU 145 não apresenta AR (Atcc, 2018).

Em 1983 surgiu um dos primeiros estudos utilizando a linhagem LNCap, que prediz uma resposta clínica para avaliar atividade antitumoral, no qual as células foram submetidas ao tratamento com nove substâncias citotóxicas diferentes, além de radiação e terapia hormonal (Metcalf *et al.*, 1983).

Ainda outros estudos publicados utilizando essas linhagens visando, a combinação entre duas terapias conhecidas (Tamoxifeno e radiação gama) (Mimeault *et al.*, 2007; Konsoula *et al.*, 2011), a descoberta de mecanismos de ação antitumorais (Lin *et al.*, 2013; Tamaki *et al.*, 2014), a utilização de novas substâncias (Wong *et al.*, 2014; Hirsch *et al.*, 2015; Naiki-Ito *et al.*, 2015), e de novas técnicas antitumorais (Maddalena *et al.*, 2009).

Em estudo realizado por Wang e colaboradores foi possível demonstrar, que a linhagem celular DU 145, apresentava a proteína Bad fosforilada (estado anti-apoptótico), quando submetida ao tratamento com L-glutamato, induzindo a liberação de Ca^{2+} . Por outro lado, a desfosforilação da Bad desencadeava o processo de apoptose das células (Wang *et al.*, 1999). Complementando, uma pesquisa utilizando a técnica de *imunoblotting*, demonstrou uma alta expressão da proteína Bad em linhagens de Pca DU 145 (Kitada *et al.*, 1998).

Outros estudos buscando novas alternativas de tratamento antineoplásico, mostraram que a utilização da MLT produzida endogenamente é conhecida por regular o sono. Esta substância tem demonstrado a capacidade de inibir o crescimento de linhagens celulares DU 145, LNCap e PC3 (Siu *et al.*, 2002; Sainz *et al.*, 2005; Jung-Hynes *et al.*, 2011).

Melatonina e o Câncer de Próstata

O neuro-hormônio N-acetil-5-metoxitriptamina, também conhecido como melatonina, produzido principalmente pela glândula pineal, mas pode ser produzido por outras células de diferentes tecidos, que inclui, retina, pele, trato gastrointestinal, além de macrófagos e monócitos (Wang *et al.*, 2012; Acuña-Castroviejo *et al.*, 2014).

A produção da MLT ocorre unicamente durante o ciclo noturno (Figura 4), um processo que antecede a sua síntese ocorre no período diurno, no qual acontece a conversão do triptofano em serotonina (Danielczyk e Dzięgiel, 2009). A fase noturna da MLT se dá pela indução da enzima arilalquilamina N-acetiltransferase (AA-NAT), que em presença de luz, captada pela retina, torna-se inativada, convertendo a serotonina em N-acetilserotonina. No entanto, a N-acetilserotonina é convertida em MLT por ação da enzima 5-hidroindol-O-metiltransferase (Iuvone *et al.*, 2005).

A MLT por apresentar um caráter anfifílico, não é estocada, alcançando a corrente sanguínea e consequentemente as células-alvos (Korf *et al.*, 1998; Paradies *et al.*, 2010; Reiter *et al.*, 2010). Quando os níveis de MLT estão elevados na corrente sanguínea, é possível que esse neuro-hormônio possa ser transportado para tecidos, como, líquido, fluidos dos olhos e folículos ovarianos (Reiter *et al.*, 2010). No entanto, a presença da MLT nesses tecidos, ainda pode indicar a sua síntese fora da glândula pineal, e não por excesso no sangue (Acuña-Castroviejo *et al.*, 2014).

A MLT interage com os receptores MT1 e MT2, que correspondem estruturalmente em torno de 60%. Esses receptores estão acoplados a proteína G, encontrados em tecido cerebral, retina entre outros (Slominski *et al.*, 2012; Reiter *et al.*, 2014). Ainda um outro receptor, o MT3, localizado no

citosol de várias células (oócitos, blastocistos, células de câncer cervical e colorretal), exerce a função da enzima quinona redutase 2 no processo de detoxificação (Dubocovich *et al.*, 2010; Reiter *et al.*, 2010; Reiter *et al.*, 2014).

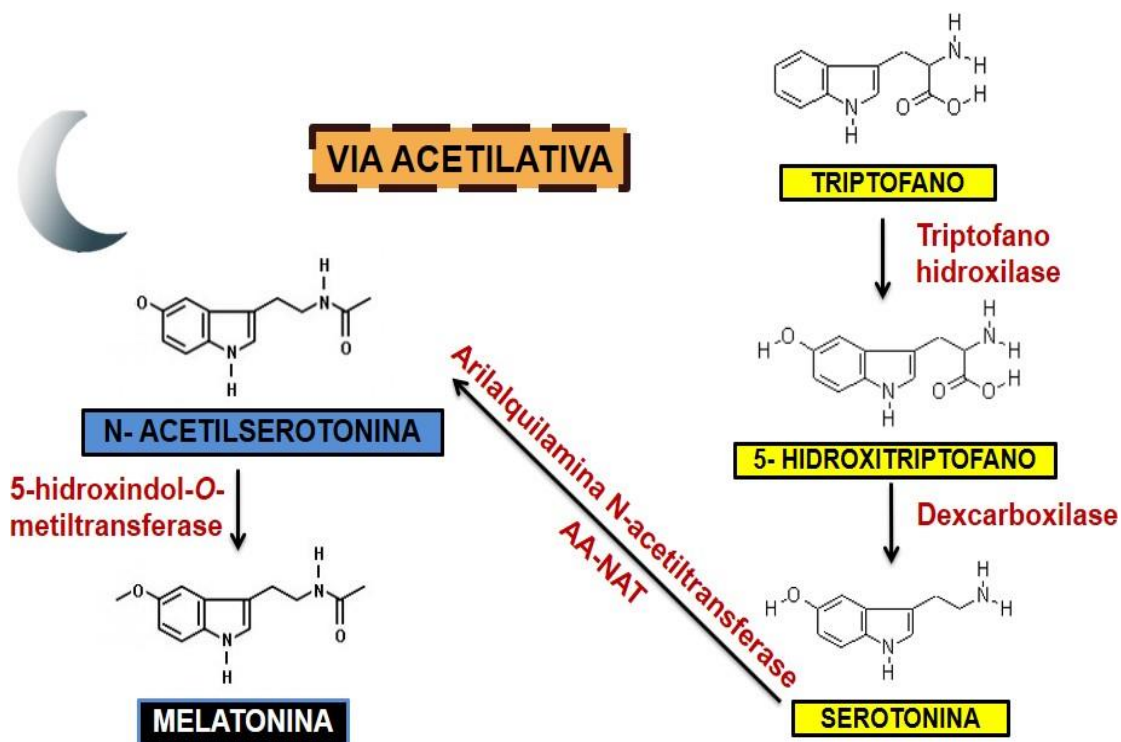


Figura 4. Representação esquemática da síntese da melatonina (adaptado de Iuvone *et al.*, 2005).

A MLT regula os processos intracelulares estabelecidos pela inibição da adenilciclase, e subsequentemente a redução do monofosfato cíclico de adenosina (AMPC) e aumento da atividade da proteína quinase A (PKA) (Reppert *et al.*, 1995; Reiter *et al.*, 2010).

Os efeitos da MLT e os seus metabólitos estão associados às diversas funções fisiológicas que incluem: a regulação do ciclo circadiano do ritmo sazonal (Ackermann e Stehle, 2006; Lerchl, Alexander e Reiter, Russel J, 2012); efeito antidepressivo (Weil *et al.*, 2006; Cardinali *et al.*, 2012); regulação cardiovascular (Régrigny *et al.*, 1998); efeito antioxidante (Galano *et al.*, 2011);

efeito anti-inflamatório (Kireev *et al.*, 2008; Reiter *et al.*, 2008); modulação de funções imunológicas (Reiter, 2003; Toma *et al.*, 2007).

Em 1997, surgiu um estudo preliminar que utilizava a MLT no tratamento do Pca em humanos. Neste estudo, foram selecionados quatorze pacientes com Pca metastático, refratários ou resistentes a terapia com o triptorelina (análogo do hormônio liberador de hormônio luteinizante - LHRH), submetidos ao tratamento de 20mg de MLT. No final do estudo 8 pacientes apresentaram redução nos níveis de PSA (Lissoni *et al.*, 1997).

Em linhagens de Pca humano 22Rv1, refratárias aos hormônios andrógenos, foi demonstrado que o efeito antiproliferativo da MLT ocorreu através do receptor MT1 com a ativação de proteína quinase C (PKC) e PKA em paralelo (Tam *et al.*, 2007). Foi demonstrado em um estudo *in vitro*, que a MLT (0,5 mM a 2 mM) reduziu o número de células de Pca e interrompeu a progressão do ciclo celular, tanto em células LNCaP como em PC3, não mediado pela PKA (Sainz *et al.*, 2005).

Estudos realizados por Ortíz-López (2009) e Gilad (2010), mostraram que a MLT possui propriedades oncostáticas, capazes de diminuir a invasividade de células cancerosas (Ortíz-López *et al.*, 2009) e o crescimento tumoral *in vitro* e *in vivo* (Gilad *et al.*, 1999; Luchetti *et al.*, 2010). A partir dessa constatação, muitos mecanismos de ação foram propostos para explicar os efeitos oncostáticos e oncoprotetores da MLT (Vijayalaxmi *et al.*, 2002; Jung e Ahmad, 2006). Os mecanismos estudados mostraram a influência de hormônios sexuais, bem como, enzimas relacionadas a indução do tumor.

A ação da MLT, proposta por estudos com câncer de mama, linhagem humana MCF-7, sugere a redução do estradiol, como responsável pela diminuição da mitose (Collins *et al.*, 2003; Proietti *et al.*, 2013; Lopes *et al.*, 2016). Pesquisas corroboraram com a hipótese da redução do estradiol pela MLT, pois foi observado um efeito inibitório, sobre a atividade da aromatase (enzima responsável pela conversão de andrógenos em estradiol), em tecido neoplásico (Sánchez-Barceló *et al.*, 2005; Alvarez-Garcia *et al.*, 2013).

Seguindo a mesma linha de estudo, foi observado que a MLT (50 μ M-1 mM) em linhagem LNCap, bloqueou a translocação nuclear do AR,

confirmando a ação antiandrogênica da MLT (Mayo *et al.*, 2017). Em linhagens PC3, a MLT apresenta uma ação de supressão de fator 1- alfa indutível por hipóxia (HIF-1 α), acarretando na ação anti-angiogênica e protetora de radicais livres (Cho *et al.*, 2011).

Cabe ressaltar que a MLT atua estimulando várias enzimas antioxidantes, suprimindo uma variedade de radicais livres e espécies reativas de oxigênio (Ravindra *et al.*, 2006; Cho *et al.*, 2011), protegendo as células de danos, melhorando a capacidade de reparo do ácido desoxirribonucleico (DNA) e reduzindo a angiogênese por meio da regulação de fatores de crescimento endotelial (Alvarez-Garcia *et al.*, 2013; Jardim-Perassi *et al.*, 2014). Além disso, a MLT pode exercer papel modulatório na inflamação por inibição da proliferação celular, atuando sobre a ciclo-oxigenase-2 (COX-2) (Wang *et al.*, 2012).

Hevia e colaboradores (2015), sugeriram que a MLT (0,5 mM a 1 mM) interage com transportadores de glicose 1 (GLUT1), por esta razão, diminui a glicose nas células tumorais. Com a modificação da expressão do transportador GLUT1, a progressão das células tumorais dependentes e independentes de androgênio é atenuada (Hevia *et al.*, 2015; Hevia *et al.*, 2017). Além disso, Joo e colaboradores (2009) observaram que o processo de apoptose induzida pela MLT (1 mM) em células LNCap, era ativada pelas vias das proteínas quinases, c-JUN N-terminal quinase (JNK) e proteína quinase 38. Por outro lado, as quinases reguladas por sinal extracelular (ERK), não responderam ao tratamento com a MLT (Joo e Yoo, 2009).

A administração por via oral da MLT (10 e 20 mg /L), em modelo de experimentação animal, apresentou um efeito inibitório do Pca e concomitantemente reduziu os níveis séricos de IGF-1 e da proteína 3 de ligação ao fator de crescimento semelhante à insulina (IGFBP3), bem como, o nível do antígeno nuclear de células em proliferação (PCNA) e da proteína sirtuina 1 (Sirt1) (Jung-Hynes *et al.*, 2011)

Devido ao potencial terapêutico, a MLT pode ser um excelente coadjuvante aos medicamentos comumente usados para a tratamento do câncer de próstata. Admite-se que a MLT exerce um efeito antineoplásico,

sendo que vários mecanismos têm sido sugeridos para explicar seus efeitos biológicos, contudo o mecanismo de ação em carcinomas prostático ainda não está totalmente estabelecido.

Relação mitocondrial em neoplasias.

A mitocôndria é uma organela que apresenta uma estrutura com uma membrana interna e outra externa, contendo um espaço entre membranas e a matriz com a cadeia de DNA próprio (Andersson *et al.*, 2003). Esta organela modula diversas funções celulares vitais. Dentre as funções destaca-se, níveis de cálcio intracelular, processos de apoptose, bem como, regulação energética por oxirredução, na qual, envolve a formação de espécies reativas de oxigênio (ROs) (Wallace, 2012). Alterações nos componentes estruturais e funcionais dessa organela, pode desencadear uma proliferação celular desordenada.

Warburg, sugeriu que em células com tumores malignos, a produção energética das células neoplásicas ocorre somente pela via glicolítica e sem utilização de oxigênio (Warburg, 1956). Por outro lado, sabe-se que essa alteração metabólica não corresponde a verdade, pois a produção energética em neoplasias também pode ocorrer pela via oxidativa. Embora as ROs liberadas pelo processo bioenergético oxidativo, em altas concentrações, possam induzir morte celular por toxicidade, também podem promover mitoses, bem como, sinalização celular (Zu e Guppy, 2004; Gupta *et al.*, 2012).

As proteínas da família Bcl-2 presentes no espaço intermembranoso da mitocôndria, são responsáveis por promover o controle da permeabilidade da membrana dessa organela e do processo apoptótico. Embora, a família Bcl-2 é constituída de proteínas pró e anti-apoptóticas. Em geral, as proteínas pró-apoptóticas promovem o transporte de citocromo C e de ROs presentes na mitocôndria para o citoplasma. Na cascata do processo de apoptose, as proteínas anti-apoptóticas bloqueiam a saída do citocromo C e ROs (Hardwick e Soane, 2013).

Um exemplo de proteína anti-apoptótica transmembrana é a Bcl-xl, apresentando a capacidade de inibir a liberação do citocromo c (proteína que

sinaliza a apoptose por ativação de caspases), por impedir a ligação com as proteínas pró-apoptóticas Bax e Bak (Figura 5). (Finucane *et al.*, 1999).

Cabe ressaltar, que as proteínas anti-apoptóticas estão relacionadas a resistência quimioterápica (Yang *et al.*, 2016). Desta maneira, as proteínas mitocondriais são importantes alvos para estudo de novas substância antitumorais.

Chen e colaboradores (2001) observaram em um estudo *in vitro*, que a alta expressão da proteína Bcl-xl em células Pca (DU 145 e PC3), promoveu o processo apoptótico (Chen *et al.*, 2001). Além disso, a alta expressão de Bcl-xl no carcinoma de próstata está associada a progressão para tumores independentes de andrógenos (Castilla *et al.*, 2006).

Outros estudos mostraram que em um tumor viral sexualmente transmissível entre caninos, descoberto há mais de 10.000 anos, ocorria a renovação mitocondrial das células provenientes do hospedeiro para suprir as células tumorais com altas taxas de mutação do DNA mitocondrial (Rebbeck *et al.*, 2011).

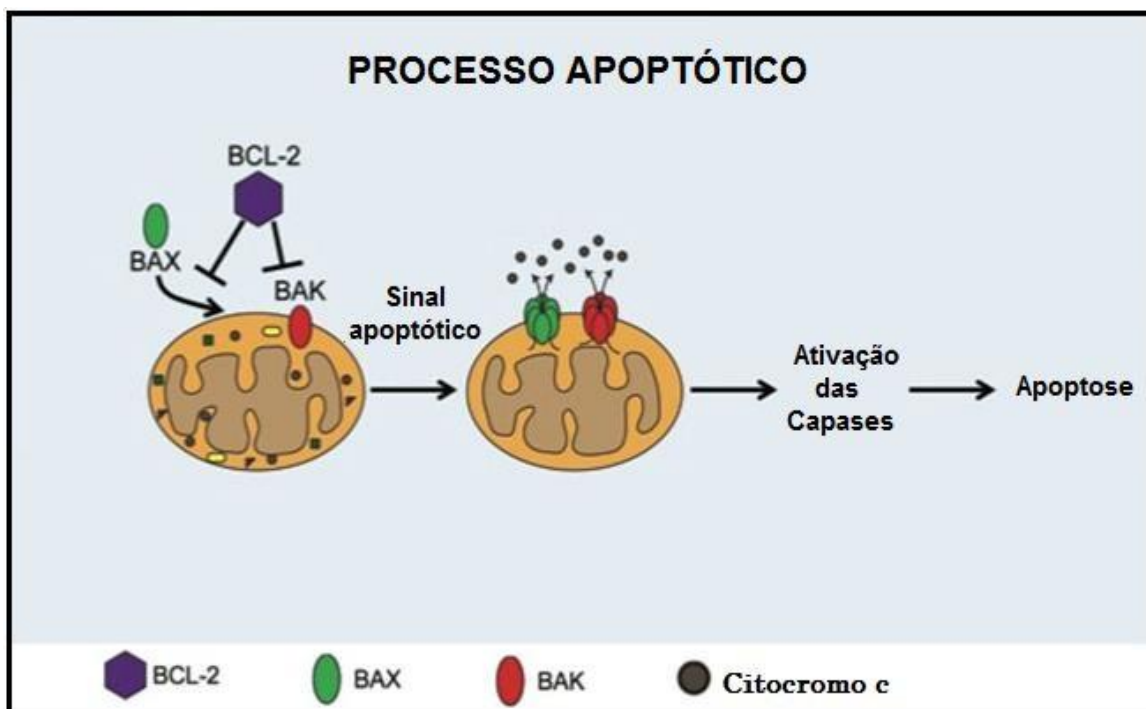


Figura 5. Processo de apoptose (Adaptado de Kubli e Gustafsson, 2012).

Geyer e colaboradores, observaram mutações na expressão dos genes de deleção (11q13, 1-q13.2 e 19p13) que era recorrente em células tumorais da mama, quando as mesmas apresentavam elevadas densidades mitocondriais (Geyer *et al.*, 2012). Da mesma forma, foi observado por Grupp e colaboradores, que em células de Pca ocorreu uma alta expressão de mitocôndrias com deleção de PTEN (Grupp *et al.*, 2013).

Devido a importância das mitocôndrias em células neoplásicas torna-se importante alvo de estudo de novas substâncias sobre a estrutura e função dessa organela, dentre elas, a MLT.

Evidências científicas, relatam que a MLT possui um importante papel antiproliferativo em carcinomas, por meio da inibição de ROs ou por ativação de proteínas pró apoptóticas (Figura 6) (Raza *et al.*, 2008; Proietti *et al.*, 2017).

Curiosamente, um estudo realizado por Reiter e colaboradores, mostrou que as taxas de MLT são encontradas em diversas estruturas celulares. Os autores observaram em células do córtex cerebral de rato, que as mitocôndrias apresentavam níveis mais elevados de MLT comparados ao citosol e ao plasma sanguíneo, atingindo valores de 300 pg / mg (Reiter, 1986).

Em uma pesquisa realizada por Yun e colaboradores (2014), foi observado que a MLT (1 mM) apresentou um efeito antitumoral em pulmão, diminuindo a expressão das proteínas mitocondriais Bcl-xl e Bad fosforilada (Yun *et al.*, 2014).

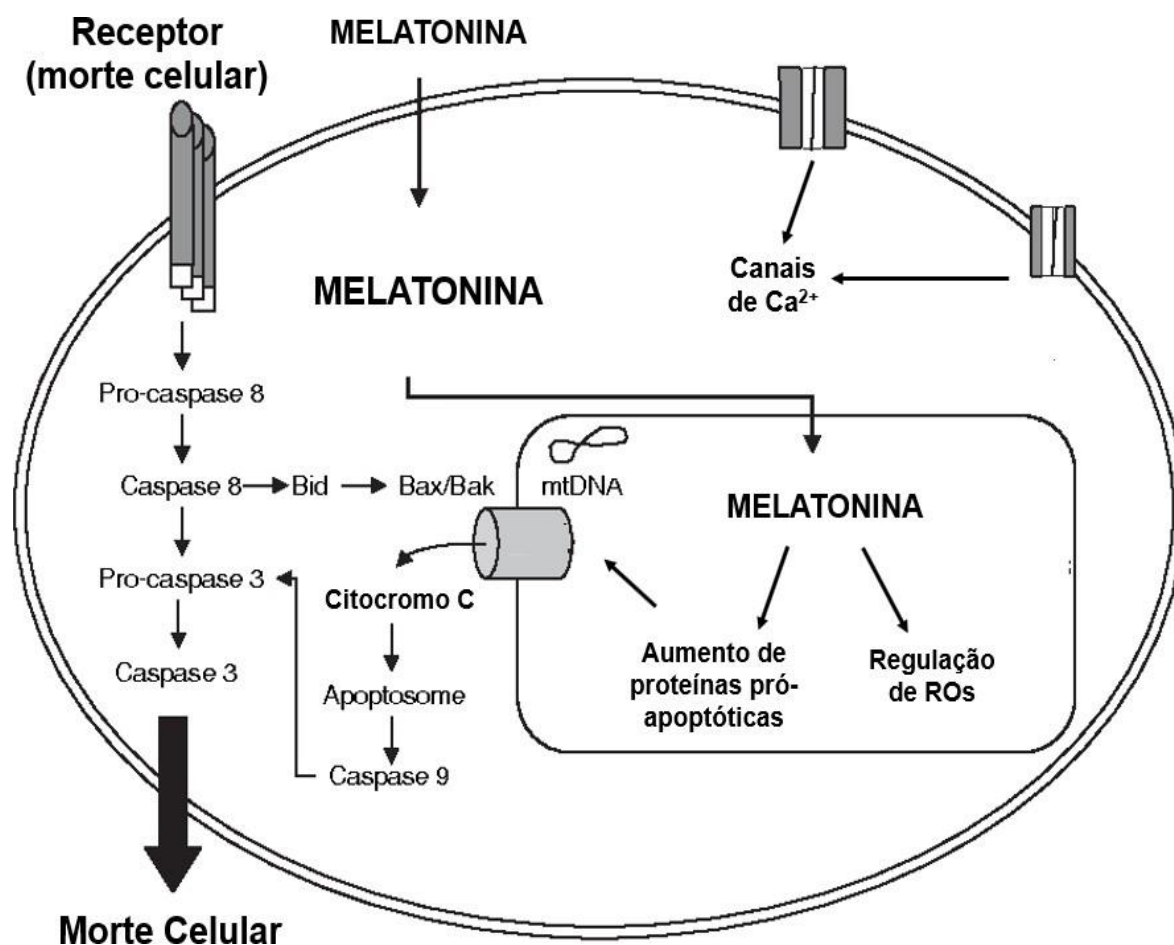


Figura 6. Interação e atividade da melatonina intracelular (adaptado de Leon *et al.*, 2005).

Perdomo e colaboradores, observaram que a melatonina (0,01 – 1 mM) induziu o processo de apoptose em células de leucemia humana, por meio da ativação de proteases (capases) na regulação positiva do fator pró-apoptótico Bax. Além disso, os autores observaram que a utilização de um inibidor de proteases diminuía o processo apoptótico, mas permanecia um rápido aumento (<30 min) das ROs desencadeando a morte celular (Perdomo *et al.*, 2013).

Embora alguns estudos relacionam a MLT com a atividade mitocondrial em células de Pca, ainda se faz necessário novas abordagens acerca desse processo para um melhor entendimento dessa organela como alvo terapêutico (REFERENCIAR).

MANUSCRITO

Todos os resultados desta dissertação serão apresentados na forma de manuscrito que foi submetido ao periódico Cell Biochemistry & Function.

 Cell Biochemistry & Function

 Home

 Author

 Review

Submission Confirmation

[Print](#)

Thank you for your submission

Submitted to
Cell Biochemistry & Function

Manuscript ID
CBF-18-0103

Title
Melatonin Exerts Dose- and Time-Dependent effects in the Cell Viability and Mitochondrial Function of DU 145 cells

Authors
Teotonio, Alessandra Cortes
Meira Martins, Leo
Uberti, Augusto
Gamaro, Giovana
Crespo, Priscila
Guma, Fatima
Oliveira, Cleverson
Tarquinio, Sandra
Parello, Camila
Silva, Adriele
Caumo, Wolnei
Souza, Izabel

Date Submitted
08-May-2018

© Clarivate Analytics | © ScholarOne, Inc., 2018. All Rights Reserved.

ScholarOne Manuscripts and ScholarOne are registered trademarks of ScholarOne, Inc.

ScholarOne Manuscripts Patents #7,257,767 and #7,263,655.

[@ScholarOneNews](#) | [System Requirements](#) | [Privacy Statement](#) | [Terms of Use](#)

CELL BIOCHEMISTRY & FUNCTION

Melatonin Exerts Dose- and Time-Dependent effects in the Cell Viability and Mitochondrial Function of DU 145 cells

Journal:	<i>Cell Biochemistry & Function</i>
Manuscript ID:	Draft
Wiley - Manuscript type:	Research Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Teotonio, Alessandra Cortes; Federal University of Pelotas (UFPel) Meira Martins, Leo; Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Biochemistry Uberti, Augusto ; Federal University of Rio Grande do Sul Gamaro, Giovana; Federal University of Pelotas (UFPel) Crespo, Priscila; Federal University of Pelotas (UFPel) Guma, Fatima; UFRGS, Bioquímica Oliveira, Cleverson; Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Farmacologia Tarquinio, Sandra; Federal University of Pelotas (UFPel) Parello, Camila; Catholic University of Pelotas (UCP) Silva, Adriele ; Federal University of Pelotas Caumo, Wolnei; Federal University of Rio Grande do Sul Souza, Izabel; Basic Researches, Biology Institute , Department of Morfology
Keywords:	Cytotoxicity, DU145, Melatonin, Mitochondrial Function, Prostate Cancer
Abstract:	Prostate cancer (Pca) affects many men and the available treatments cause several adverse effects. This study aimed to investigate the effects of Melatonin (MLT), a circadian cycle hormone, in cell viability and mitochondrial function of the Pca DU 145 cell line. DU145 cells were treated with Melatonin (1nM, 10nM, 100nM, 1µM, 10µM and 100µM) for 24h, 48h, 72h, 120h, and 240h. Quantification of the protein content was performed by the Bradford method. Cell viability analysis was performed by MTT assay and trypan blue exclusion. The analysis of mitochondrial activity and mass was performed by flow cytometry after staining cells with the fluorescent dyes Mitotracker Red (MTR) and Mitotracker Green (MTG). The MLT effects in DU145 cells was found to be dose-dependent, and the best antitumor effect was obtained with the highest concentration of treatment (100 µM). Also, the long exposure time increases the antitumor effect. Further investigation are undoubtedly necessary to elucidate the mechanism by which MLT exerts its antitumoral effects.

Melatonin Exerts Dose- and Time-Dependent effects in the Cell Viability and Mitochondrial Function of DU 145 cells

Alessandra Cortes Teotonio^{1,2,3}, Leo Anderson Meira Martins⁴, Augusto Frantz Uberti⁵, Giovana Duzzo Gamarro^{2,3}, Priscila Centeno Crespo^{1,2,3}, Fatima Therezinha Costa Rodrigues Guma⁴, Cleverson Moraes de Oliveira⁴, Sandra Beatriz Chaves Tarquinio⁶, Camila Perelló Ferrúa⁷, Adriele Silva², Wolnei Caumo⁸, Izabel Cristina Custódio de Souza^{2,3}

¹ Postgraduate Program in Bioprospecting and Biochemistry, Federal University of Pelotas (UFPel), Pelotas, Brazil.

² Laboratory of Cell Neuromodulation: Basic Researches, Biology Institute – Department of Morphology, Federal University of Pelotas (UFPel), Pelotas, RS, 96030-000, Brazil.

³ Program in Bioprospecting and Biochemistry, Federal University of Pelotas (UFPel), Pelotas, RS, 96030-000, Brazil.

⁴ Institute of Basic Health Sciences - Department of Biochemistry, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, 90035-003, Brazil.

⁵ Center for Biotechnology, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, 91501-970, Brazil

⁶ Dentistry College - Department of Semiology and Clinic, Federal University of Pelotas (UFPel), Pelotas, RS, 96015-560, Brazil.

⁷ Postgraduate Program in Health and Behavior, Catholic University of Pelotas, RS, 96015560, Brazil

⁸ Medicine college - Department of Pharmacology, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, 90035-903, Brazil.

* Corresponding author: Izabel Cristina Custódio de Souza

Izabel Cristina Custódio de Souza, PHD

Professor – Federal University of Pelotas

Biology Institute/ Department of Morphology

250 Duque de Caxias Av. Pelotas, RS 96030000

Phone: 55 53 3221-1044

<http://mc.manuscriptcentral.com/cbf>

Abstract

Prostate cancer (Pca) is the most frequent malignancy worldwide and the available treatments cause several adverse effects. This study aims to investigate the effects of Melatonin (MLT), a circadian cycle hormone, in cell viability and mitochondrial function of the Pca DU 145 cell line. DU 145 cells were treated with Melatonin (1nM, 10nM, 100nM, 1µM, 10µM and 100µM) for 24h, 48h, 72h, 120h, and 240h. Quantification of the protein content was performed by the Bradford method. Cell viability analysis was performed by MTT assay and trypan blue exclusion the analysis of mitochondrial activity and mass was performed by flow cytometry after staining cells with the fluorescent dyes Mitotracker Red (MTR) and Mitotracker Green (MTG). The MLT effects in DU 145 cells was found to be dose-dependent, and the best antitumor effect was obtained with the highest concentration of treatment (100 µM). Also, the long exposure time the higher was the antitumor effect. Further investigation is undoubtedly necessary to elucidate the mechanism by which MLT exerts its antitumoral effects.

Key Words: Cytotoxicity, DU 145, Melatonin, Prostate Cancer.

1. INTRODUCTION

Prostate cancer (Pca) is the most frequent male malignancy worldwide and the second cause of cancer death among men ^{1,2}. In Brazil, Pca is estimated to be the most incident malignancy among man during the year of 2018, excluding non-melanoma skin cancers ³. Additionally, available Pca treatment are expensive and are often associated with genitourinary dysfunctions, such as erectile dysfunction and urinary incontinence, impairing quality of life ⁴.

Another important aspect regarding the therapeutical approach for this type of cancer is its ability to develop resistance to the frequently provided hormonal treatments, either as palliative or maintenance therapy, narrowing even further the available treatment alternatives for castration-resistant Pca (CRPC) ^{5,6}. In this context, studies using androgen-negative Pca cell lines, such as DU 145, have been conducted to better understand the Pca cellular and molecular biology and to develop alternatives treatment for its malignancy ^{1,7-9}.

Among those efforts, melatonin (MLT) has been identified as a possible antitumor agent for several types of cancer ^{9,10}, including Pca ^{10,11}. MLT is a tryptophan-derived hormone produced and secreted by the pineal gland to regulate the circadian cycle, with actions dependent and independent of MT1 and MT2 receptors ^{12,13}. Regarding the Pca tumor growth and development, MLT is known to have *in vivo* and *in vitro* antitumoral properties over both androgen-sensitive and androgen-resistant types of Pca ¹⁴. These properties seem to be related to the MLT1 receptors for androgen-sensitive tumors; however, the absence of MLT1 membrane receptors in androgen-negative Pca may suggest other unknown pathways that lead to MLT antiproliferative properties over androgen-resistant Pca ^{13,15}. Moreover, the MLT effects over tumoral cells seem to be related to the reduction of tumor-induced angiogenesis, to the regulation of Reactive Oxygen Species (ROS) and to the pro-apoptotic functions ¹⁶⁻¹⁸.

Due to the absence of treatment side effects and its low cost, MLT can be an excellent alternative treatment for CRPC Pca. Thus, in this study we

investigated the effects of MLT in cell viability and mitochondrial function of Pca DU 145 cell line, through effect evaluation of DU 145 lineage exposure to crescent MLT concentrations and lengths of time.

2. MATERIALS AND METHODS

Reagents

Melatonin (MLT), RPMI-1640 cell culture medium, glutamine, penicillin G sodium, and streptomycin sulfate, and Coomassie Blue G-250 were purchased from Sigma-Aldrich® (St. Louis, USA). Fetal bovine serum (FBS), amphotericin B, and trypsin were purchased from Gibco® (Carlsbad, USA).

Cell Culture and treatment

The DU 145 Pca cell line is derived from brain metastasis of a human androgen-unresponsive prostate carcinoma that not expresses the androgen receptor (Stone, 1978). DU 145 cells were seeded at a density of 5,000 cells/well in 96 well plates, 30,000 cells/well in 24 well plates and 100,000 cells/well in 12 well plates. Cells were grown in RPMI-1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), glutamine (1mmol/l), 1% antibiotic (10000UI penicillin G sodium and 10mg/mL streptomycin sulfate), and 0,1% of antifungal (amphotericin B 250µg / mL) in a humidified atmosphere of 5% CO₂ until it reaches 90% confluence. Melatonin (MLT) was diluted in absolute ethanol to obtain a stock solution at 2.9 mM of concentration. Then, a serial dilution was performed to reach the final treatment concentrations: 1nM, 10nM, 100nM, 1µM, 10µM, and 100µM. Cells were treated for 24h, 48h, 72h, 120h, and 240h.

Quantification of cellular protein content

Quantification of cellular proteins was performed by the method of Bradford ¹⁹. Cultured-cells at 12-well plates were mechanically scrapped for protein obtainment. For this analysis, a standard curve was prepared with 1mg/mL albumin (Inlab) diluted in 2.5 mL of Coomassie Blue G-250 solution.

Samples absorbance was measured using a spectrophotometer (TP-Reader, Thermo Plate) at wavelength 595 nm.

Cell viability by MTT assay

The viability assay was performed by incubating the 24-well cultured-cells with MTT reagent (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)²⁰. After treatment with MLT, cells were exposed to MTT for 4h at 37°C, then purple formazan crystals were solubilized in 100 µL of DMSO. Samples absorbance was measured in a spectrophotometer (TP-Reader, Thermo Plate) at the wavelength 540 nm.

Cell proliferation test by trypan blue exclusion

Briefly, after treatment with MLT, cells were harvested from each well of a 96-well plate by trypsin and then diluted in 50µL of trypan blue 0,2% (Dinâmica®). The dead trypan blue positive and alive negative cells were counted in a hemocytometer using an inverted light microscope²¹.

Analysis of mitochondrial mass and activity by fluorometry

MitoTracker™ Red (MTR) and MitoTracker™ Green (MTG) probes were used to stain the mitochondria of live cells depending, respectively, on the oxidative activity (MTR) and organelle lipid content (MTG). Thus, it is possible to establish a relationship between MTR and MTG fluorescence intensities to estimate the rate of mitochondrial function: if MTG fluorescence is higher than MTR fluorescence, this may represent the mitochondrial swelling that characterizes organelle failure^{22,23}. Briefly, after MLT treatment, DU 145 cells cultured in 24 well plates were washed with phosphate buffered saline (PBS) and harvested with trypsin. Then, cells were re-suspended and incubated for 20 minutes with 100nM of MTG and MTR diluted into PBS. A total of 10,000 events were acquired at the BD FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences, USA). The units of fluorescence values for MTR and MTG were obtained using the FCS Express 4 software (DeNovo, Canada).

Statistical analysis

Data are represented by the mean $\pm$ standard error of the mean. All data were analyzed by the IBM® SPSS® statistics 20 program. One-way ANOVA or repeated measures ANOVA were performed using Tukey as *post-hoc* test. Results were considered statistically significant when $p < 0.05$.

3 RESULTS

Quantification of cellular protein content

Through Bradford Method, it was observed that treatment with 100 μ M of MLT decreased protein content in all the treatment times, except for 24h (Figure 1A). Also, when compared with controls, it was found reduction in protein content in the 48h (Figure 1B, 51.7 ± 1.12 mg / mL, One-way ANOVA, $F_{(7, 8)} = 10.38$, $p < 0.05$), 72h (Figure 1C, 48.8 ± 9.10 mg/mL, One-way ANOVA $F_{(7, 8)} = 2.47$, $p < 0.05$), 120h and 240h of treatment (Figure 1E, 49.4 ± 1.12 mg / mL, One-way ANOVA, $F_{(7,8)} = 8.57$, $p < 0.05$).

Cell viability assay

There was no statistical difference in MTT assay among controls and ethanol concentrations. For MLT, we found reduction on cell viability for 10 μ M and 100 μ M, respectively, administered at 24h (Figure 2A, $58,20 \pm 2,6\%$ and $39.2 \pm 1.1\%$, One-Way ANOVA, $F_{(7, 88)} = 135.28$, $p < 0.05$), 48h (Figure 2B, $60,90 \pm 1,1\%$ and $33.3 \pm 1.9\%$, One-Way ANOVA, $F_{(7, 88)} = 139.67$, $p < 0.05$), 72h (Figure 2C, $54,4 \pm 0,8\%$ and $33.6 \pm 0.8\%$, One-Way ANOVA, $F_{(7, 88)} = 99.65$, $p < 0.05$), 120h (Figure 2D, $47.5 \pm 1.7\%$ and $35.5 \pm 2.9\%$, One-Way ANOVA, $F_{(7, 88)} = 83.83$, $p < 0.05$), and 240h (Figure 2E, $77,01 \pm 4,4\%$ and $62.7 \pm 2.8\%$, One- Way ANOVA, $F_{(7, 88)} = 17.01$, $p < 0.05$). In addition, the times of treatment and concentrations of MLT tested that induced the largest reduction on cell viability were concentrations of 10 and 100 μ M applied for 120h (Figure 2D).

3.2 Cell proliferation test by trypan blue exclusion

Cells treated with all concentrations of MLT showed no significant difference in the trypan blue assay at 24 h (Figure 3A) and 48h (Figure 3B) of treatment. However, there was cell count decrease to colonies treated with 100 μ M of MLT during 72h (Figure 3C, $2.93 \times 10^5 \pm 0.36$, One-Way ANOVA, $F_{(7, 88)} = 10.42$, $p < 0.05$), 120h (Figure 3D, $1.57 \times 10^5 \pm 0.35$, One-Way ANOVA / Tukey, $F_{(7, 88)} = 7.05$, $p < 0.05$) and 240h (Figure 3E, $1.92 \times 10^5 \pm 0.50$, One-Way ANOVA, $F_{(7, 88)} = 4.28$, $p < 0.05$). Likewise, there was cell reduction for the ones treated with MLT at 10 μ M for 120h (Figure 3D, $2.61 \times 10^5 \pm 0.36$, One-Way ANOVA, $F_{(7, 88)} = 7.05$, $p < 0.05$) and 240h (Figure 3E, $2.22 \times 10^5 \pm 0.23$, One-Way ANOVA, $F_{(7, 88)} = 4.28$, $p < 0.05$).

3.4 Analysis of mass and activity mitochondrial by fluorometry

Only cells treated with 100 μ M of MLT during 240 hours presented a decreased MTR fluorescence (Figure 4A). On the other hand, during 24h-treatment, the MTG fluorescence was increased in DU 145 cells from the lowest MLT concentration tested. For all the others treatments time (48h, 72h, 120h, and 240h), only the highest concentration induced an increased MTG fluorescence in DU 145 cells (Figure 4B). An increase of mitochondrial mass (MTG) that is not accompanied for the increase of organelle function (MTR) may indicate mitochondrial swelling and disfunction^{16,17}.

Excepted for the 24h and 120h treatment, the rate of mitochondrial function (i.e.MTR/MTG) revealed that cells that were exposed to 100 μ M of melatonin had their organelle impaired (Figure 4C). Altogether, these results corroborate the cell toxicity of melatonin from 48h of treatment at 100 μ M of concentration.

4. DISCUSSION

Although MLT has been tested in CRPC lines over the years regarding dosage and time of exposure, these assessments never exceeded doses higher than 100nM and lengths higher than 96h, and no plateau has been identified for MLT effects over Pca²⁴⁻²⁶. In our study, we analyzed concentrations up to 100µM and exposures to 240h, identifying a dose-dependent and time-dependent response over cell viability. Even though we didn't find statistical difference in MTT analysis, Trypan Blue Exclusion and protein content between the highest dosages and times of treatment, we observed a tendency of reduction in outcome that suggests that we didn't reach MLT dosage or time of exposure plateau.

Additionally, our data suggests that concentrations higher than 10 µM and exposures longer than 24h reduce cell viability, with optimal decrease at 10 µM and 100 µM applied for 120h. These findings align with the ones by Jung-Hynes and colleagues, who observed a decreased number of DU 145 colonies under MLT treatment (10nM to 2mM) during 24 to 48h²⁷. However, when Siu and colleagues inoculated DU 145 cells in mice treated with 4µg/g of body weight of MLT, they found no antiproliferative outcomes in tumor development. This effect could've happened because of an insufficient dose of MLT provided, as identified by Hevia and colleagues in a study about speed and rate of MLT internalization in DU 145 line, in which they found that this specific cell line has a slower rate of MLT internalization, associated with a diminished capacity of MLT absorption, justifying the need for longer and higher exposures to obtain antiproliferation^{26,28}.

In the search for the pathways by which cell proliferation occurs in DU 145 cells, since they don't have membrane MLT1 receptors¹, we performed MTR/MTG ratio that revealed increased MTG over MTR fluorescence for cells treated with 100 µM of MLT from 48h, which indicates mitochondrial swelling, potentially resulting in organelle failure. These findings are consistent with the decreased cell viability readings found in MTT and Trypan Blue assays.

5 CONCLUSION

Based on this study, it is possible to affirm that MLT exerts an antitumoral effect in Pca DU 145 strains in a dose and time-dependent manner. Also this effect seems to involve mitochondrial dysfunction and showcase MLT as a promising therapeutical alternative for Pca. However, the unknown pathways involved in the occurrence of such effects constitute a necessity for further investigation underlying routes.

REFERENCES

1. ATCC ATCC. PROSTATE CANCER. 2018.
2. Bray F, Ren JS, Masuyer E, Ferlay J. Global estimates of cancer prevalence for 27 sites in the adult population in 2008. *International Journal of Cancer*. 2012;132(5):1133-1145.
3. INCA . Câncer de próstata. 2018; <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/prostata+/definicao>. Accessed 02/03/2018.
4. Ward JF, Eggener SE. Active surveillance monitoring: the role of novel biomarkers and imaging. *Asian J Androl*. 2015;17(6):882-884; discussion 883.
5. Chandrasekar T, Yang JC, Gao AC, Evans CP. Mechanisms of resistance in castration-resistant prostate cancer (CRPC). *Translational Andrology and Urology*. 2015;4(3):365-380.
6. Taplin M-E, Bubley GJ, Ko Y-J, et al. Selection for Androgen Receptor Mutations in Prostate Cancers Treated with Androgen Antagonist. *Cancer research*. 1999;59(11):2511-2515.
7. Stone KR, Mickey DD, Wunderli H, Mickey GH, Paulson DF. Isolation of a human prostate carcinoma cell line (DU 145). *International Journal of Cancer*. 1978;21(3):274-281.
8. Metcalfe SA, Whelan RDH, Masters JRW, Hill BT. In vitro responses of human prostate tumour cell lines to a range of antitumour agents. *International Journal of Cancer*. 1983;32(3):351-358.

9. Hirsch GE, Parisi MM, Martins LA, Andrade CM, Barbe-Tuana FM, Guma FT. gamma-Oryzanol reduces caveolin-1 and PCGEM1 expression, markers of aggressiveness in prostate cancer cell lines. *The Prostate*. 2015;75(8):783-797.
10. Ortiz-López L, Morales-Mulia S, Ramírez-Rodríguez G, Benítez-King G. ROCK-regulated cytoskeletal dynamics participate in the inhibitory effect of melatonin on cancer cell migration. *Journal of Pineal Research*. 2009;46(1):15-21.
11. Lerchl A, Reiter RJ. Treatment of sleep disorders with melatonin. *BMJ*. 2012;345:e6968.
12. Reiter RJ, Tan DX, Galano A. Melatonin: Exceeding Expectations. *Physiology*. 2014;29(5):325-333.
13. Slominski RM, Reiter RJ, Schlabritz-Loutsevitch N, Ostrom RS, Slominski AT. Melatonin membrane receptors in peripheral tissues: Distribution and functions. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2012;351(2):152-166.
14. Paroni R, Terraneo L, Bonomini F, et al. Antitumour activity of melatonin in a mouse model of human prostate cancer: relationship with hypoxia signalling. *Journal of Pineal Research*. 2014;57(1):43-52.
15. Mayo JC, Hevia D, Quiros-Gonzalez I, et al. IGFBP3 and MAPK/ERK signaling mediates melatonin-induced antitumor activity in prostate cancer. *Journal of Pineal Research*. 2017;62(1):e12373.
16. Perdomo J, Cabrera J, Estévez F, Loro J, Reiter RJ, Quintana J. Melatonin induces apoptosis through a caspase-dependent but reactive oxygen species-independent mechanism in human leukemia Molt-3 cells. *Journal of Pineal Research*. 2013;55(2):195-206.
17. Proietti S, Cucina A, Minini M, Bizzarri M. Melatonin, mitochondria, and the cancer cell. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2017;74(21):4015-4025.
18. Castilla C, Congregado Bn, Chinchón D, Torrubia FJ, Japón MA, Siez C. Bcl-xL Is Overexpressed in Hormone-Resistant Prostate Cancer and

- Promotes Survival of LNCaP Cells via Interaction with Proapoptotic Bak. *Endocrinology*. 2006;147(10):4960-4967.
19. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*. 1976;72(1):248-254.
 20. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*. 1983;65(1):55-63.
 21. BARILE FA. *In vitro cytotoxicology: mechanisms and methods*. Boca Raton, FL,1994.
 22. Lima KG, Krause GC, da Silva EFG, et al. Octyl gallate reduces ATP levels and Ki67 expression leading HepG2 cells to cell cycle arrest and mitochondria-mediated apoptosis. *Toxicology in Vitro*. 2018;48:11-25.
 23. Agnello M, Morici G, Rinaldi AM. A method for measuring mitochondrial mass and activity. *Cytotechnology*. 2008;56(3):145-149.
 24. Bizzarri M, Proietti S, Cucina A, Reiter RJ. Molecular mechanisms of the pro-apoptotic actions of melatonin in cancer: a review. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*. 2013;17(12):1483-1496.
 25. Jung-Hynes B, Schmit TL, Reagan-Shaw SR, Siddiqui IA, Mukhtar H, Ahmad N. Melatonin, a novel Sirt1 inhibitor, imparts anti-proliferative effects against prostate cancer in vitro in culture and in vivo in TRAMP model. *Journal of pineal research*. 2011;50(2):140-149.
 26. Hevia D, González-Menéndez P, Quiros-González I, et al. Melatonin uptake through glucose transporters: a new target for melatonin inhibition of cancer. *Journal of Pineal Research*. 2015;58(2):234-250.
 27. Jung-Hynes B, Schmit TL, Reagan-Shaw SR, Siddiqui IA, Mukhtar H, Ahmad N. Melatonin, a novel Sirt1 inhibitor, imparts antiproliferative effects against prostate cancer in vitro in culture and in vivo in TRAMP model. *Journal of Pineal Research*. 2011;50(2):140-149.
 28. Hevia D, Mayo JC, Quiros I, Gomez-Cordoves C, Sainz RM. Monitoring intracellular melatonin levels in human prostate normal and cancer cells

by HPLC. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2010;397(3):1235-1244.

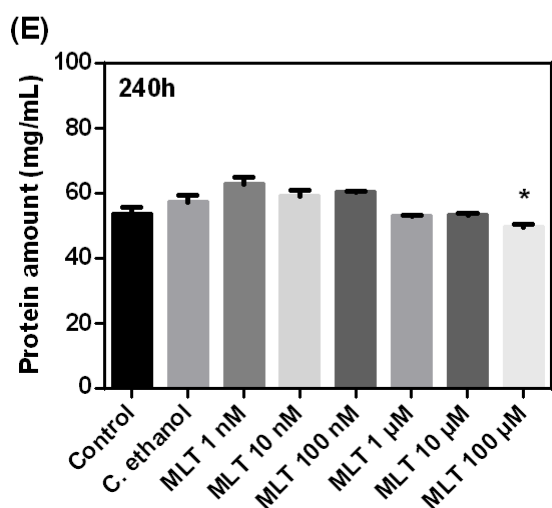
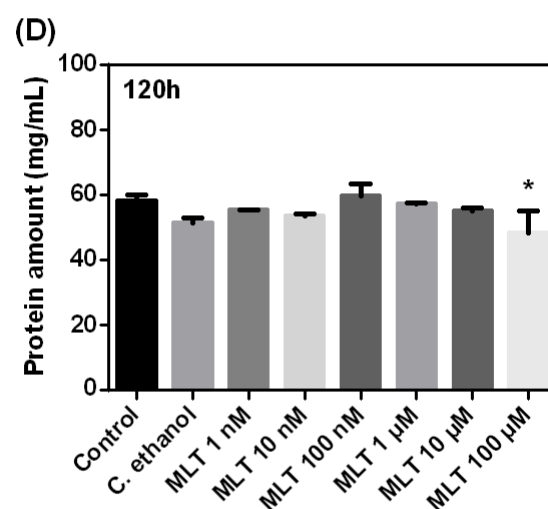
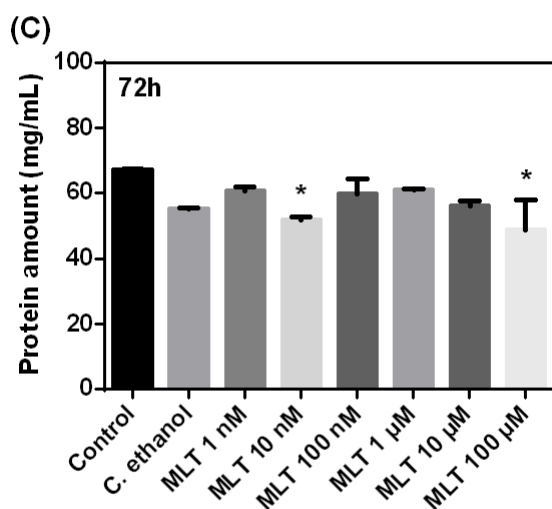
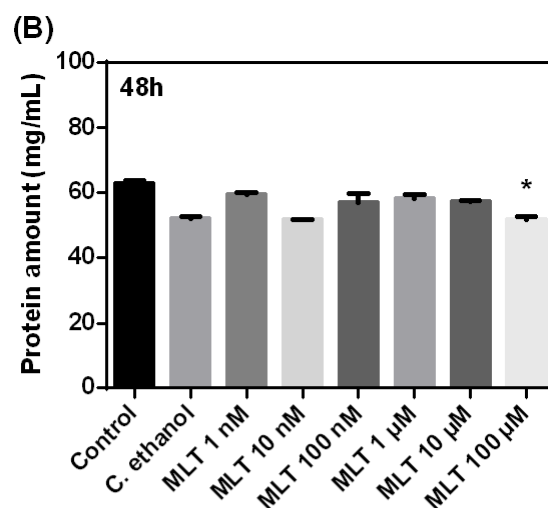
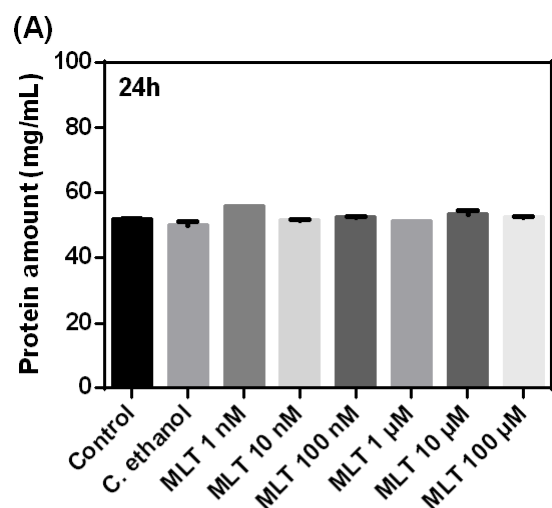
CAPTIONS

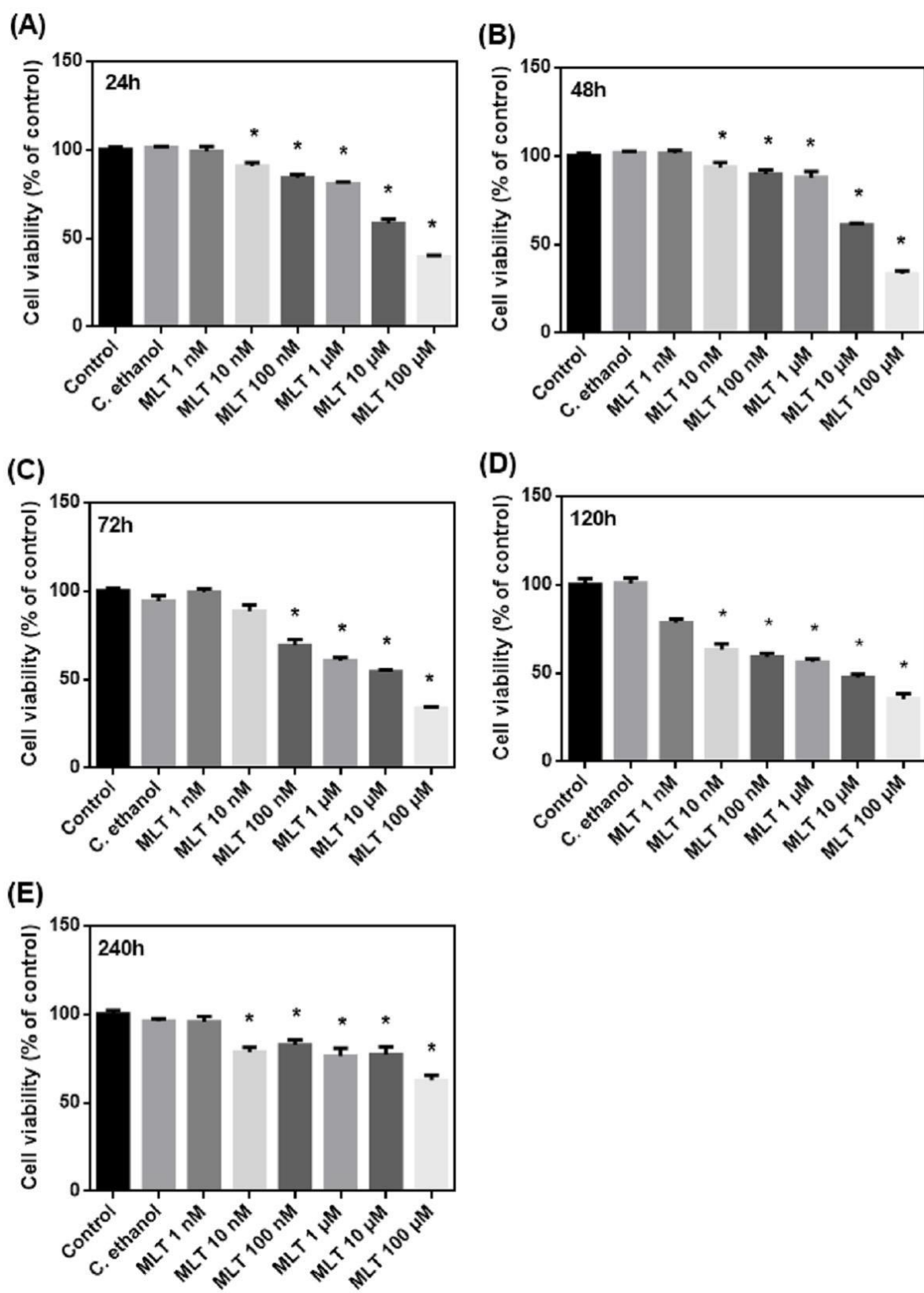
Figure 1. Quantification of cellular protein content. Data are presented by mean $\pm$ S.E.M (n = 2) analyzed by one-way ANOVA and Tukey, being considered significant data with $p < 0.05$ in relation to the control (*). Relationship of the effect of MLT (1nM, 10nM, 100nM, 1 μ M, 10 μ M and 100 μ M), control and ethanol in DU 145 cells line compared to treatment time 24h (A), 48 (B), 72h (C), 120h (D) and 240h (E).

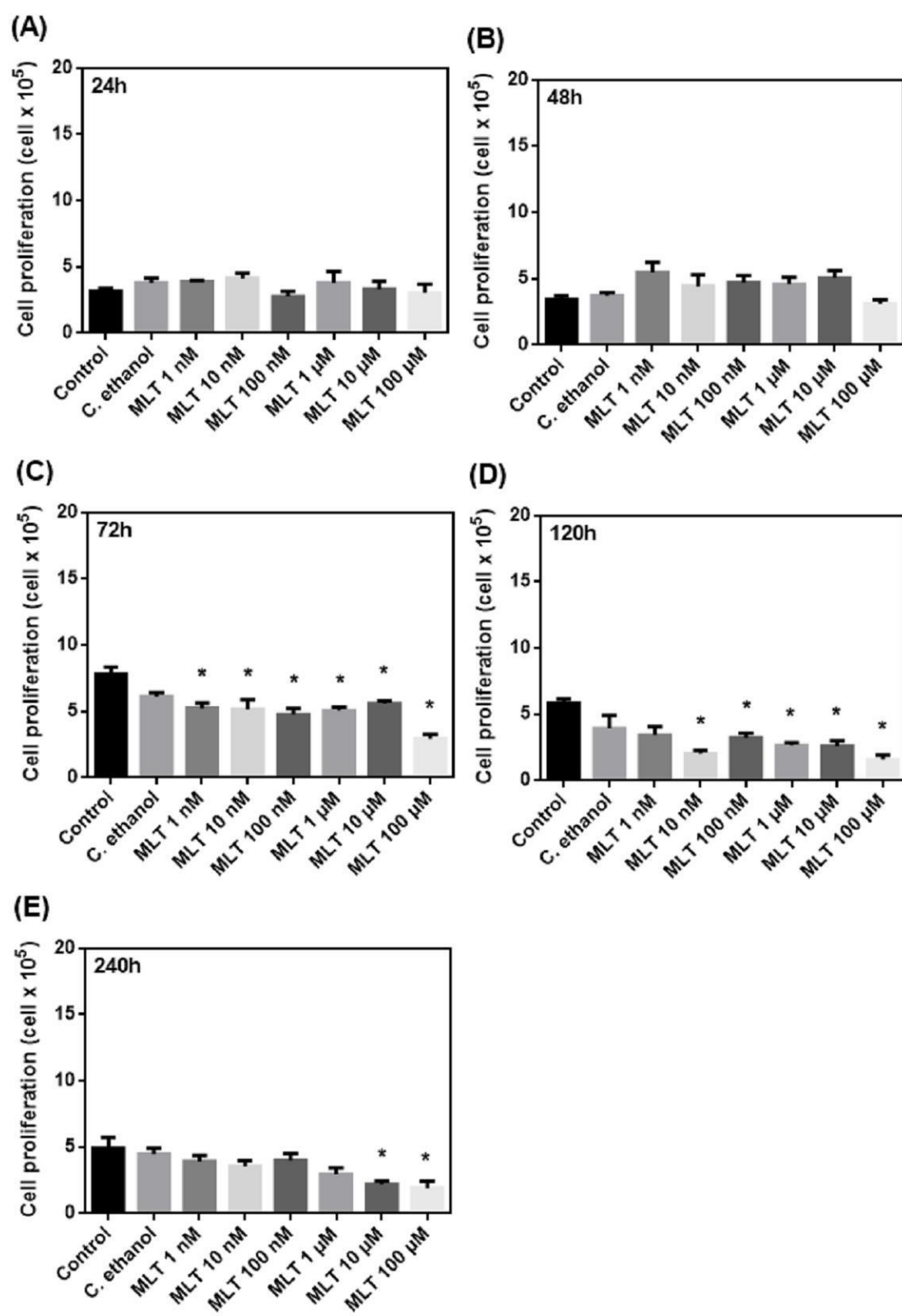
Figure 2. Cell viability analysis by MTT assay. Data are presented by mean $\pm$ S.E.M (n = 12) analyzed by one-way ANOVA and Tukey, being considered significant data with $p < 0.05$ in relation to the control (*). Relationship of the effect of MLT (1nM, 10nM, 100nM, 1 μ M, 10 μ M and 100 μ M), control and ethanol in DU 145 cells line compared to treatment time 24h (A), 48 (B), 72h (C), 120h (D) and 240h (E).

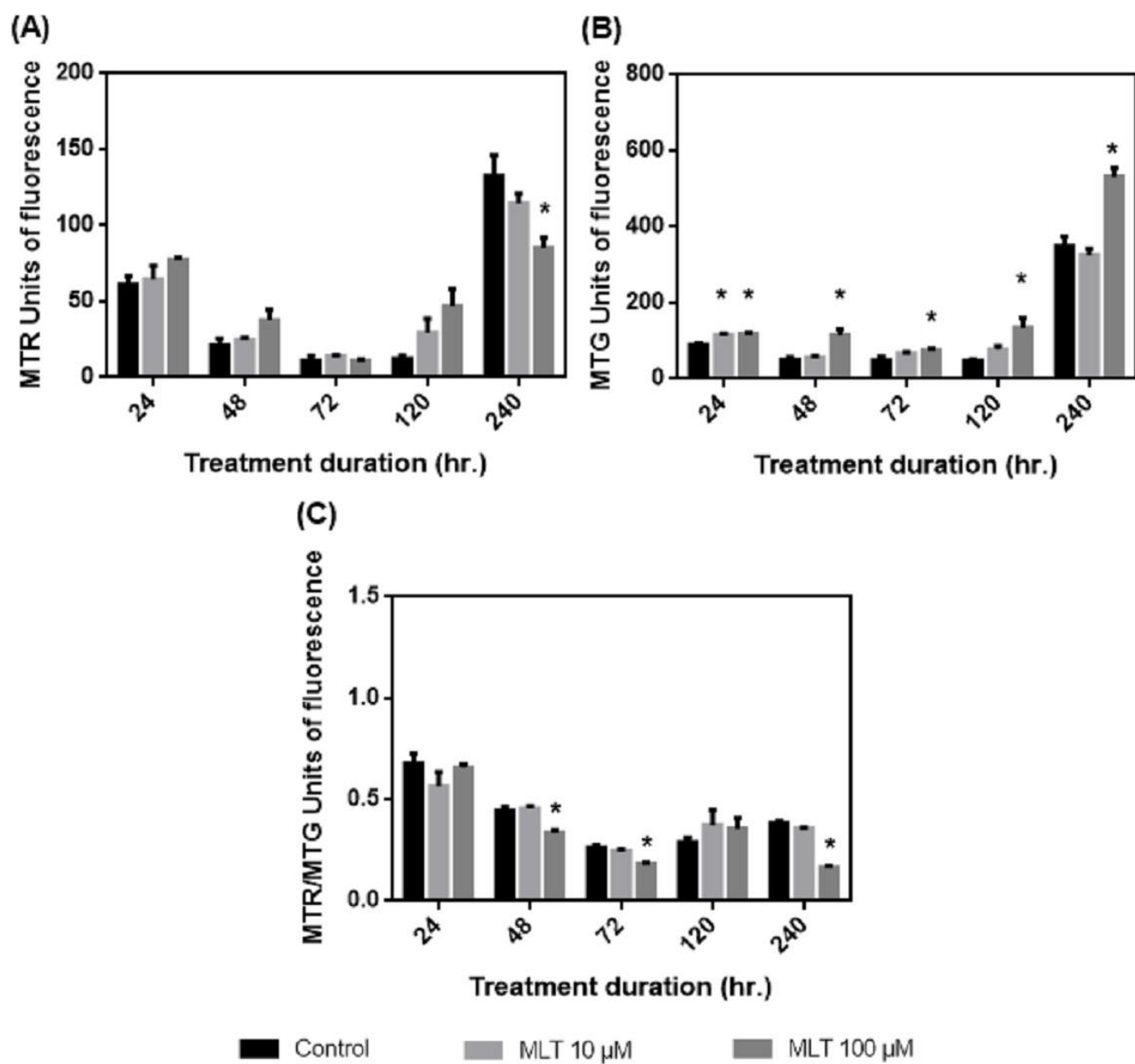
Figure 3. Cell proliferation assay by tripan blue exclusion. Data are presented by mean $\pm$ S.E.M (n = 12) analyzed by one-way ANOVA and Tukey, being considered significant data with $p < 0.05$ in relation to the control (*). Relationship of the effect of MLT (1nM, 10nM, 100nM, 1 μ M, 10 μ M and 100 μ M), control and ethanol in DU 145 cells line compared to treatment time 24h (A), 48 (B), 72h (C), 120h (D) and 240h (E).

Figure 4. Analysis of mass and mitochondrial activity by fluorometry. Data are presented by mean $\pm$ S.E.M (n = 4) analyzed by one-way ANOVA and Tukey, being considered significant data with $p < 0.05$ in relation to the control (*). Evaluation of mitochondrial activity (A), mitochondrial mass (B) and activity / mass ratio (C) performed through a technique with MTR and MTG fluorescence markers, concentrations of MLT (10 μ M and 100 μ M) and control were compared in relation to treatment time (24h, 48h, 72h, 120h and 240h).









7. CONCLUSÃO

Tendo em vista os nossos resultados, verificou-se que os efeitos da MLT em células DU 145 foram dependentes da dose. Desta forma, observou-se um efeito antiproliferativo mais pronunciado no tratamento de maior concentração de MLT (100 μ M). Além disso, destacamos, que o efeito observado ocorreu ao longo do tempo de exposição a MLT, envolvendo uma disfunção mitocondrial. Assim, a MLT torna-se uma promissora alternativa terapêutica, entretanto, mais pesquisas serão necessárias para elucidar o mecanismo pelo qual a MLT exerce seus efeitos antitumorais em Pca.

8. PERSPECTIVAS

Além dos dados apresentados nessa dissertação, haverá ainda, outras análises a serem executadas. Nessa dissertação foram expostos apenas resultados bioquímicos da viabilidade celular, conteúdo proteico e análise da atividade e massa mitocondrial da linhagem DU 145 tratada com MLT nas concentrações de 1nM, 10nM, 100nM, 1µM, 10µM, e 100µM e nos tempos de 24h, 48h, 72h, 120h e 240h.

Para análises futuras, executaremos as seguintes avaliações:

- ✓ Avaliação do ciclo celular das células DU 145 tratadas com MLT em diferentes tempos e concentrações, por meio de kit comercial;
- ✓ Avaliação da expressão das proteínas BDNF, mTOR, BAD, Bcl-xl e p53, por meio da técnica de Western blotting;
- ✓ Avaliação do tipo de morte celular induzida pela MLT nas células DU 145, por meio do ensaio com anexina V.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACKERMANN, K.; STEHLE, J. H. Melatonin synthesis in the human pineal gland: advantages, implications, and difficulties. **Chronobiol Int**, v. 23, n. 1-2, p. 369-79, 2006.

ACUÑA-CASTROVIEJO, D. et al. Extrapineal melatonin: sources, regulation, and potential functions. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 71, n. 16, p. 2997-3025, 2014.

ALVAREZ-GARCIA, V. et al. Melatonin modulates aromatase activity and expression in endothelial cells. **Oncol Rep**, v. 29, n. 5, p. 2058-64, 2013.

AMERICAN CANCER SOCIETY, A. Prostate Cancer. 2018. Disponível em: < <https://www.cancer.org/cancer/prostate-cancer> >. Acesso em: 27.02.2018.

ANDERSSON, S. G. E. et al. On the origin of mitochondria: a genomics perspective. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 358, n. 1429, p. 165-179, 2003.

ATCC, A. T. C. C. PROSTATE CANCER. 2018. Disponível em: < https://www.atcc.org/Search_Results.aspx?dsNav=Ntk:PrimarySearch%7cProstate+Cancer%7c3%7c,Ny:True,Ro:30,N:1000552&searchTerms=Prostate+Cancer&redir=1 >. Acesso em: 23.02.2018.

BARTSCH, C. et al. Melatonin and 6-sulfatoxymelatonin circadian rhythms in serum and urine of primary prostate cancer patients: Evidence for reduced pineal activity and relevance of urinary determinations. **Clinica Chimica Acta**, v. 209, n. 3, p. 153-167, 1992.

BRASIL, M. D. S. Programa Nacional de Controle do Câncer da Próstata : Documento de Consenso. **Secretaria de Assistência à Saúde. Instituto Nacional de Câncer**, 2002. ISSN ISBN 85-7318-086-2. Disponível em: < http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/cancer_da_prostata.pdf >. Acesso em: 25.02.2018.

BRONZETTI, E. et al. A possible role of BDNF in prostate cancer detection. **Oncol Rep**, v. 19, n. 4, p. 969-74, 2008.

BURT, J. et al. Radical prostatectomy: men's experiences and postoperative needs. **Journal of Clinical Nursing**, v. 14, n. 7, p. 883-890, 2005.

CARDINALI, D. P. et al. Melatonin and its analogs in insomnia and depression. **Journal of Pineal Research**, v. 52, n. 4, p. 365-375, 2012.

CASTILLA, C. et al. Bcl-xL Is Overexpressed in Hormone-Resistant Prostate Cancer and Promotes Survival of LNCaP Cells via Interaction with Proapoptotic Bak. **Endocrinology**, v. 147, n. 10, p. 4960-4967, 2006.

CHANDRASEKAR, T. et al. Mechanisms of resistance in castration-resistant prostate cancer (CRPC). **Translational Andrology and Urology**, v. 4, n. 3, p. 365-380, 2015.

CHATTERJEE, B. The role of the androgen receptor in the development of prostatic hyperplasia and prostate cancer. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 253, n. 1, p. 89-101, 2003.

CHEN, X. et al. Constitutively active Akt is an important regulator of TRAIL sensitivity in prostate cancer. **Oncogene**, v. 20, p. 6073, 2001.

CHO, S. Y. et al. Sphingosine kinase 1 pathway is involved in melatonin-induced HIF-1 α inactivation in hypoxic PC-3 prostate cancer cells. **Journal of Pineal Research**, v. 51, n. 1, p. 87-93, 2011.

CHONG, S. J. F.; LOW, I. C. C.; PERVAIZ, S. Mitochondrial ROS and involvement of Bcl-2 as a mitochondrial ROS regulator. **Mitochondrion**, v. 19, p. 39-48, 2014.

COLLINS, A. et al. Overexpression of the MT1 melatonin receptor in MCF-7 human breast cancer cells inhibits mammary tumor formation in nude mice. **Cancer Letters**, v. 189, n. 1, p. 49-57, 2003.

COTRAN, R. S.; COLLINS, T.; KUMAR, V. Patologia estrutural e funcional. **Guanabara Koogan**, n. 6, 2000.

CRAWFORD, E. D. Understanding the Epidemiology, Natural History, and Key Pathways Involved in Prostate Cancer. **Urology**, v. 73, n. 5, p. S4-S10, 2009.

DANIELCZYK, K.; DZIĘGIEL, P. MT1 melatonin receptors and their role in the oncostatic action of melatonin. **Postepy Hig Med Dosw**, v. 63, p. 425-434, 2009.

DORNAS, M. C. et al. CÂNCER DE PRÓSTATA. **Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto**, v. 7, n. 1, p. 100-107, 2008.

DUBOCOVICH, M. L. et al. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXV. Nomenclature, Classification, and Pharmacology of G Protein-Coupled Melatonin Receptors. **Pharmacological Reviews**, Bethesda, MD, v. 62, n. 3, p. 343-380, 2010.

FELDMAN, B. J.; FELDMAN, D. The development of androgen-independent prostate cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 1, p. 34, 2001.

FERREIRA, G. M. et al. Melatonin Attenuates Her-2, p38 MAPK, p-AKT, and mTOR Levels in Ovarian Carcinoma of Ethanol-Preferring Rats. **J Cancer**, v. 5, n. 9, p. 728-35, 2014.

FESTUCCIA, C. et al. Tyrosine kinase inhibitor CEP-701 blocks the NTRK1/NGF receptor and limits the invasive capability of prostate cancer cells in vitro. **Int J Oncol**, v. 30, n. 1, p. 193-200, 2007.

FINUCANE, D. M. et al. Bax-induced Caspase Activation and Apoptosis via Cytochrome c Release from Mitochondria Is Inhibitable by Bcl-xL. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 4, p. 2225-2233, 1999.

FROMME, E. K. et al. How Accurate Is Clinician Reporting of Chemotherapy Adverse Effects? A Comparison With Patient-Reported Symptoms From the Quality-of-Life Questionnaire C30. **Journal of Clinical Oncology**, v. 22, n. 17, p. 3485-3490, 2004.

GALANO, A.; TAN, D. X.; REITER, R. J. Melatonin as a natural ally against oxidative stress: a physicochemical examination. **Journal of Pineal Research**, v. 51, n. 1, p. 1-16, 2011.

GEYER, F. C. et al. Genomic profiling of mitochondrion-rich breast carcinoma: chromosomal changes may be relevant for mitochondria accumulation and tumour biology. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 132, n. 1, p. 15-28, 2012.

GILAD, E. et al. Melatonin receptors in PC3 human prostate tumor cells. **Journal of Pineal Research**, v. 26, n. 4, p. 211-220, 1999.

GITTES , R. F. Carcinoma of the Prostate. **New England Journal of Medicine**, v. 324, n. 4, p. 236-245, 1991.

GRUPP, K. et al. High mitochondria content is associated with prostate cancer disease progression. **Molecular Cancer**, v. 12, p. 145-145, 2013.

GUPTA, S. C. et al. Upsides and Downsides of Reactive Oxygen Species for Cancer: The Roles of Reactive Oxygen Species in Tumorigenesis, Prevention, and Therapy. **Antioxidants & Redox Signaling**, 140 Huguenot Street, 3rd Floor New Rochelle, NY 10801 USA, v. 16, n. 11, p. 1295-1322, 2012.

HAN, L. et al. Neurotrophic receptor TrkB: Is it a predictor of poor prognosis for carcinoma patients? **Medical Hypotheses**, v. 68, n. 2, p. 407-409, 2007.

HARDWICK, J. M.; SOANE, L. Multiple Functions of BCL-2 Family Proteins. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 5, n. 2, p. 10.1101/cshperspect.a008722 a008722, 2013.

HEIDENREICH, A. et al. EAU Guidelines on Prostate Cancer. **European Urology**, v. 53, n. 1, p. 68-80, 2007.

HEVIA, D. et al. Melatonin Decreases Glucose Metabolism in Prostate Cancer Cells: A (13)C Stable Isotope-Resolved Metabolomic Study. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 8, p. 1620, 2017.

HEVIA, D. et al. Melatonin uptake through glucose transporters: a new target for melatonin inhibition of cancer. **Journal of Pineal Research**, v. 58, n. 2, p. 234-250, 2015.

HIRSCH, G. E. et al. gamma-Oryzanol reduces caveolin-1 and PCGEM1 expression, markers of aggressiveness in prostate cancer cell lines. **Prostate**, v. 75, n. 8, p. 783-97, 2015.

INCA, I. N. D. C. J. D. A. G. D. S. Câncer de próstata. 2018. Disponível em: < <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/prostata+/definicao> >. Acesso em: 02/03/2018.

IUVONE, P. M. et al. Circadian clocks, clock networks, arylalkylamine N-acetyltransferase, and melatonin in the retina. **Prog Retin Eye Res**, v. 24, n. 4, p. 433-56, 2005.

JACINTO, E. et al. Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. **Nature Cell Biology**, v. 6, p. 1122, 2004.

JARDIM-PERASSI, B. V. et al. Effect of Melatonin on Tumor Growth and Angiogenesis in Xenograft Model of Breast Cancer. **PLOS ONE**, v. 9, n. 1, p. e85311, 2014.

JOO, S. S.; YOO, Y. M. Melatonin induces apoptotic death in LNCaP cells via p38 and JNK pathways: therapeutic implications for prostate cancer. **Journal of Pineal Research**, v. 47, n. 1, p. 8-14, 2009.

JUNG-HYNES, B. et al. Melatonin, a novel Sirt1 inhibitor, imparts antiproliferative effects against prostate cancer in vitro in culture and in vivo in TRAMP model. **Journal of Pineal Research**, v. 50, n. 2, p. 140-149, 2011.

JUNG, B.; AHMAD, N. Melatonin in Cancer Management: Progress and Promise. **Cancer Research**, v. 66, n. 20, p. 9789-9793, 2006.

KIM, D.-H. et al. mTOR Interacts with Raptor to Form a Nutrient-Sensitive Complex that Signals to the Cell Growth Machinery. **Cell**, v. 110, n. 2, p. 163-175, 2002.

KIREEV, R. A. et al. Melatonin is able to prevent the liver of old castrated female rats from oxidative and pro-inflammatory damage. **Journal of Pineal Research**, v. 45, n. 4, p. 394-402, 2008.

KITADA, S. et al. Expression and location of pro-apoptotic Bcl-2 family protein BAD in normal human tissues and tumor cell lines. **The American Journal of Pathology**, v. 152, n. 1, p. 51-61, 1998.

KONSOULA, Z. et al. Adamantanyl-Histone Deacetylase Inhibitor H6CAHA Exhibits Favorable Pharmacokinetics and Augments Prostate Cancer Radiation Sensitivity. **International Journal of Radiation Oncology • Biology • Physics**, v. 79, n. 5, p. 1541-1548, 2011.

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

KUBLI, D. A.; GUSTAFSSON, Å. B. Mitochondria and Mitophagy: The Yin and Yang of Cell Death Control. **Circulation research**, v. 111, n. 9, p. 1208-1221, 2012.

LEON, J; ACUÑA-CASTROVIEJO, D; ESCAMES, G; TAN, DX; REITER, RJ. Melatonin mitigates mitochondrial malfunction. **J Pineal Res**, v.38, p1-9, 2005.

LERCHL, A.; REITER, R. J. Treatment of sleep disorders with melatonin. **BMJ**, v. 345, p. e6968, 2012.

LERCHL, A.; REITER, R. J. Treatment of sleep disorders with melatonin. **BMJ : British Medical Journal**, v. 345, 2012.

LIN, H. P. et al. Difference in protein expression profile and chemotherapy drugs response of different progression stages of LNCaP sublines and other human prostate cancer cells. **PLoS One**, v. 8, n. 12, p. e82625, 2013.

LISSONI, P. et al. Reversal of clinical resistance to LHRH analogue in metastatic prostate cancer by the pineal hormone melatonin: Efficacy of LHRH analogue plus melatonin in patients progressing on LHRH analogue alone. **Eur Urol.**, v. 31, n. 2, p. 178-181, 1997.

LOGOTHETIS, C. J. et al. Molecular Classification of Prostate Cancer Progression: Foundation for Marker driven-Treatment of Prostate Cancer. **Cancer discovery**, v. 3, n. 8, p. 849-861, 2013.

LOPES, J. et al. Melatonin decreases estrogen receptor binding to estrogen response elements sites on the OCT4 gene in human breast cancer stem cells. **Genes & Cancer**, v. 7, n. 5-6, p. 209-217, 2016.

LUCHETTI, F. et al. Melatonin signaling and cell protection function. **The FASEB Journal**, v. 24, n. 10, p. 3603-3624, 2010.

MADDALENA, M. E. et al. ¹⁷⁷Lu-AMBA biodistribution, radiotherapeutic efficacy, imaging, and autoradiography in prostate cancer models with low GRP-R expression. **J Nucl Med**, v. 50, n. 12, p. 2017-24, 2009.

MARELLI, M. M. et al. Growth-inhibitory activity of melatonin on human androgen-independent DU 145 prostate cancer cells. **The Prostate**, v. 45, n. 3, p. 238-244, 2000.

MAYO, J. C. et al. IGFBP3 and MAPK/ERK signaling mediates melatonin-induced antitumor activity in prostate cancer. **Journal of Pineal Research**, v. 62, n. 1, p. e12373, 2017.

METCALFE, S. A. et al. In vitro responses of human prostate tumour cell lines to a range of antitumour agents. **International Journal of Cancer**, v. 32, n. 3, p. 351-358, 1983.

MIMEAULT, M. et al. Novel combination therapy against metastatic and androgen-independent prostate cancer by using gefitinib, tamoxifen and etoposide. **International Journal of Cancer**, v. 120, n. 1, p. 160-169, 2007.

NAIKI-ITO, A. et al. Ellagic acid, a component of pomegranate fruit juice, suppresses androgen-dependent prostate carcinogenesis via induction of apoptosis. **Prostate**, v. 75, n. 2, p. 151-60, 2015.

NICHOLSON, D. W. From bench to clinic with apoptosis-based therapeutic agents. **Nature**, v. 407, p. 810, 2000.

OKADA, H.; MAK, T. W. Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells. **Nature Reviews Cancer**, v. 4, p. 592, 2004.

ORTÍZ-LÓPEZ, L. et al. ROCK-regulated cytoskeletal dynamics participate in the inhibitory effect of melatonin on cancer cell migration. **Journal of Pineal Research**, v. 46, n. 1, p. 15-21, 2009.

PAKER, S. K. et al. Relationship between apoptosis regulator proteins (bcl-2 and p53) and Gleason score in prostate cancer. **Pathol Oncol Res**, v. 7, n. 3, p. 209-212, 2001.

PALMER, M. H. Using Epidemiology in Patient Education for Post-Prostatectomy Urinary Incontinence. **Ostomy Wound Manage**, v. 47, n. 12, p. 20-25, 2001.

PANDI-PERUMAL, S. R. et al. Melatonin Antioxidative Defense: Therapeutical Implications for Aging and Neurodegenerative Processes. **Neurotoxicity Research**, v. 23, n. 3, p. 267-300, 2013.

PARADIES, G. et al. Melatonin, cardiolipin and mitochondrial bioenergetics in health and disease. **Journal of Pineal Research**, v. 48, n. 4, p. 297-310, 2010.

PARONI, R. et al. Antitumour activity of melatonin in a mouse model of human prostate cancer: relationship with hypoxia signalling. **Journal of Pineal Research**, v. 57, n. 1, p. 43-52, 2014.

PERDOMO, J. et al. Melatonin induces apoptosis through a caspase-dependent but reactive oxygen species-independent mechanism in human leukemia Molt-3 cells. **Journal of Pineal Research**, v. 55, n. 2, p. 195-206, 2013.

PROIETTI, S. et al. Melatonin, mitochondria, and the cancer cell. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 74, n. 21, p. 4015-4025, 2017.

PROIETTI, S. et al. Molecular mechanisms of melatonin's inhibitory actions on breast cancers. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 70, n. 12, p. 2139-2157, 2013.

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

RAZA, H. et al. Alterations in mitochondrial respiratory functions, redox metabolism and apoptosis by oxidant 4-hydroxynonenal and antioxidants curcumin and melatonin in PC12 cells. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 226, n. 2, p. 161-168, 2008.

REBBECK, C. A.; LEROI, A. M.; BURT, A. Mitochondrial Capture by a Transmissible Cancer. **Science**, v. 331, n. 6015, p. 303-303, 2011.

RÉGRIGNY, O. et al. Melatonin improves cerebral circulation security margin in rats. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 275, n. 1, p. H139-H144, 1998.

REITER, R. J. Normal patterns of melatonin levels in the pineal gland and body fluids of humans and experimental animals. **Journal of neural transmission. Supplementum**, v. 21, p. 35-54, 1986.

REITER, R. J. Melatonin: clinical relevance. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 17, n. 2, p. 273-285, 2003.

REITER, R. J.; TAN, D.-X.; FUENTES-BROTO, L. Chapter 8 - Melatonin: A Multitasking Molecule. In: MARTINI, L. (Ed.). **Progress in Brain Research**: Elsevier, v.181, 2010. p.127-151.

REITER, R. J.; TAN, D. X.; GALANO, A. Melatonin: Exceeding Expectations. **Physiology**, v. 29, n. 5, p. 325-333, 2014.

REITER, R. J. et al. Biogenic amines in the reduction of oxidative stress: melatonin and its metabolites. **Neuro Endocrinol Lett**, v. 29, n. 4, p. 391-8, 2008.

REPPERT, S. M. et al. Molecular characterization of a second melatonin receptor expressed in human retina and brain: the Mel1b melatonin receptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 92, n. 19, p. 8734-8738, 1995.

ROBERTA M. MORETTI, M. M. M., ROBERTO MAGGI, DONATELLA DONDI, MARCELLA MOTTA, PATRIZIA LIMONTA Antiproliferative action of melatonin on human prostate cancer LNCaP cells **ONCOLOGY REPORTS**, v. 7, n. 2, p. 347-351, 2000.

RUSSEL J. REITER, D.-X. T., MEI-JIE JOU, AHMET KORKMAZ , LUCIEN C. MANCHESTER, SERGIO D. PAREDES. Biogenic amines in the reduction of oxidative stress: Melatonin and its metabolites. **Neuroendocrinology Letters**, v. 29, n. 4, p. 391-398, 2008.

SAINZ, R. M. et al. Melatonin reduces prostate cancer cell growth leading to neuroendocrine differentiation via a receptor and PKA independent mechanism. **The Prostate**, v. 63, n. 1, p. 29-43, 2005.

SÁNCHEZ-BARCELÓ, E. J. et al. Melatonin–estrogen interactions in breast cancer. **Journal of Pineal Research**, v. 38, n. 4, p. 217-222, 2005.

SIGURDARDOTTIR, L. G. et al. Urinary Melatonin Levels, Sleep Disruption, and Risk of Prostate Cancer in Elderly Men. **European Urology**, v. 67, n. 2, p. 191-194, 2015. ISSN 0302-2838.

SIU, S. W. F. et al. Melatonin and prostate cancer cell proliferation: Interplay with castration, epidermal growth factor, and androgen sensitivity. **The Prostate**, v. 52, n. 2, p. 106-122, 2002.

SLOMINSKI, R. M. et al. Melatonin membrane receptors in peripheral tissues: Distribution and functions. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 351, n. 2, p. 152-166, 2012.

STEWART, B. W.; WILD, C. P. World Cancer Report 2014. **International Agency for Research on Cancer and World Health Organization**, p. 453-463, 2014.

TAM, C. W. et al. Signaling mechanisms of melatonin in antiproliferation of hormone-refractory 22Rv1 human prostate cancer cells: implications for prostate cancer chemoprevention. **Journal of Pineal Research**, v. 42, n. 2, p. 191-202, 2007.

TAMAKI, H. et al. Bcl-2 family inhibition sensitizes human prostate cancer cells to docetaxel and promotes unexpected apoptosis under caspase-9 inhibition. **Oncotarget**, v. 5, n. 22, p. 11399-11412, 2014.

TAMARKIN, L. et al. Melatonin Inhibition and Pinealectomy Enhancement of 7,12-Dimethylbenz(a)anthracene-induced Mammary Tumors in the Rat. **Cancer Research**, v. 41, n. 11 Part 1, p. 4432-4436, 1981.

TAPLIN, M.-E. et al. Selection for Androgen Receptor Mutations in Prostate Cancers Treated with Androgen Antagonist. **Cancer Research**, v. 59, n. 11, p. 2511-2515, 1999.

TOMA, C. D. et al. Expression of the melatonin receptor (MT) 1 in benign and malignant human bone tumors. **Journal of Pineal Research**, v. 43, n. 2, p. 206-213, 2007.

VIJAYALAXMI et al. Melatonin: From Basic Research to Cancer Treatment Clinics. **Journal of Clinical Oncology**, v. 20, n. 10, p. 2575-2601, 2002.

WALLACE, D. C. Mitochondria and cancer. **Nature reviews. Cancer**, v. 12, n. 10, p. 685-698, 2012.

WANG, H.-G. et al. Ca²⁺ Induced Apoptosis Through Calcineurin Dephosphorylation of BAD. **Science**, v. 284, n. 5412, p. 339-343, 1999.

WANG, J. et al. 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**, v. 53, n. 1, p. 77-90, 2012.

WARBURG, O. On the Origin of Cancer Cells. **Science**, v. 123, n. 3191, p. 309-314, 1956.

WARD, J. F. et al. Radical prostatectomy for clinically advanced (cT3) prostate cancer since the advent of prostate-specific antigen testing: 15-year outcome. **BJU Int**, v. 95, n. 6, p. 751-6, 2005.

WEIL, Z. M. et al. Melatonin receptor (MT1) knockout mice display depression-like behaviors and deficits in sensorimotor gating. **Brain Research Bulletin**, v. 68, n. 6, p. 425-429, 2006.

WONG, H. C. et al. SRJ23, a new semisynthetic andrographolide derivative: in vitro growth inhibition and mechanisms of cell cycle arrest and apoptosis in prostate cancer cells. **Cell Biology and Toxicology**, v. 30, n. 5, p. 269-288, 01 2014.

YANG, M.-C. et al. Bim directly antagonizes Bcl-xl in doxorubicin-induced prostate cancer cell apoptosis independently of p53. **Cell Cycle**, v. 15, n. 3, p. 394-402, 2016.

YUN, M. et al. Melatonin Sensitizes H1975 Non-Small-Cell Lung Cancer Cells Harboring a T790M-Targeted Epidermal Growth Factor Receptor Mutation to the Tyrosine Kinase Inhibitor Gefitinib. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 34, n. 3, p. 865-872, 2014.

ZU, X. L.; GUPPY, M. Cancer metabolism: facts, fantasy, and fiction. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 313, n. 3, p. 459-465, 2004/01/16/ 2004.