

EFEITO DA MELATONINA (MLT) NA ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA DE CÉLULAS EM CULTIVO DA LINHAGEM DU 145 DE CANCER DE PROSTATA

ALESSANDRA CORTES TEOTONIO¹; ADRIÉLE SILVA²; LEO ANDERSON MEIRA MARTINS³; GIOVANA DUZZO GAMARRO⁴; PRISCILA CENTENO CRESPO⁵; IZABEL CRISTINA CUSTÓDIO DE SOUZA⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – alessandra.cortes@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – adriegssilva31@gmail.com

³Universidade Federal do Rio Grande do Sul - leo.meira@ufrgs.br

⁴Universidade Federal de Pelotas – giovanagamaro@hotmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – priscrespo@gmail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas – belcustodio20@yahoo.com.br

1. INTRODUÇÃO

O câncer de próstata (Pca), ocupa o segundo lugar no ranking de neoplasias com maior mortalidade mundial (American Cancer Society, 2018). Os tratamentos disponíveis para o Pca são de alto custo, além de resultarem em diversos efeitos adversos, comumente debilitante, especialmente para pacientes com Pca resistente à terapia de ablação androgênica (Chandrasekar *et al.*, 2015). Neste contexto, estudos utilizando linhagens de células Pca independentes de androgênios e de seus receptores (AR), como a linhagem de Pca DU145, estão sendo utilizados na busca de alternativas aos tratamentos atuais (Hirsch *et al.*, 2015; Atcc, 2018).

Em meio à necessidade de novos tratamentos que promovam a redução de tumores e tenham menos efeitos adversos, emerge a melatonina (MLT), um hormônio derivado do triptofano, produzido e secretado pela glândula pineal, conhecido por regular o ciclo circadiano, sendo também relacionado atividade antitumoral (Agnello *et al.*, 2008; Lima *et al.*, 2018). Embora muitos estudos tenham relatado propriedades antineoplásicas da MLT, pouco se sabe sobre os mecanismos que envolvem a relação do hormônio com Pca, especialmente relacionados a tumores independentes de andrógeno (Jung-Hynes *et al.*, 2011; Bizzarri *et al.*, 2013).

Tendo em vista o efeito antiproliferativo promissor da melatonina, este estudo teve como objetivo, a realização de uma curva de tempo (24h, 48h, 72h, 120h e 240h) e dose (10µM e 100µM de MLT) em cultura de células da linhagem Pca-DU145.

2. METODOLOGIA

As células DU145 foram cultivadas em meio RPMI-1640 (Sigma-Aldrich®) suplementado com 10% de soro bovino fetal (FBS) (Gibco®), 1% de penicilina/estreptomicina (Sigma-Aldrich®) e 0,1% de anfotericina B (Gibco®) em atmosfera úmida, com temperatura de 37°C e com 5% de CO₂, até atingir 90% de confluência. Após confluência, as células foram transferidas para placas de 12,24 e 96 poços. O tratamento com a melatonina (Sigma-Aldrich®) ocorreu nas concentrações de 10µM e 100µM em diferentes tempos de 24h, 48h, 72h, 120h e 240h.

A quantificação do conteúdo proteico foi realizada pelo método de Bradford (Bradford, 1976).

O ensaio de viabilidade foi realizado pelo método de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio) (Sigma-Aldrich) (Mosmann, 1983).

A análise de proliferação celular foi realizada por meio do método de exclusão de Trypan blue, (Barile, 1994).

A análise de massa e atividade mitocondrial foi realizada por meio do método fluorocência utilizando sondas MitoTracker™ Red (MTR) e MitoTracker™ Green (MTG) (Agnello *et al.*, 2008; Lima *et al.*, 2018).

Os dados obtidos foram apresentados pela média \pm erro padrão da média. Para análise estatística foi utilizado teste ANOVA de uma via e post hoc de Tukey ($p < 0,05$). Todos os dados foram analisados pelo programa IBM® SPSS® statistics 20.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos para as análises de conteúdo proteico, MTT, exclusão por trypan, massa e atividade mitocondrial por fluorocência encontram-se resumidamente na tabela 1.

Tabela 1. Resultados do efeito da MLT na linhagem celular DU145 em cultivo, tratadas com 10 μ M e 100 μ M de MLT nos tempos de 24h, 48h, 72h, 120h e 240h. (n=4)

		24h	48h	72h	120h	240h
Conteúdo Proteico (mg/mL)	Controle	51,8 \pm 0,2	62,8 \pm 0,8	63,3 \pm 0,2	53,3 \pm 1,8	53,7 \pm 2,0
	10 μ M	53,4 \pm 1,1	54,1 \pm 0,1	56,0 \pm 1,5	55,1 \pm 0,8	53,3 \pm 0,6
	100 μ M	52,3 \pm 0,3	51,7 \pm 1,1	48,8 \pm 9,1	48,2 \pm 7,0	49,4 \pm 1,1
Viabilidade celular por MTT (%)	Controle	100 \pm 1,5	100 \pm 1,5	100 \pm 1,6	100 \pm 3,3	100 \pm 2,0
	10 μ M	58,2 \pm 2,6	60,9 \pm 1,1	54,4 \pm 0,8	47,5 \pm 1,7	77,1 \pm 4,4
	100 μ M	39,2 \pm 1,1	33,3 \pm 1,9	33,6 \pm 0,8	35,5 \pm 2,9	62,7 \pm 2,8
Exclusão por trypan (cél. x 10⁵)	Controle	3,2 \pm 0,2	3,4 \pm 0,3	7,8 \pm 0,5	5,8 \pm 0,3	4,9 \pm 0,8
	10 μ M	3,3 \pm 0,6	5,1 \pm 0,6	5,6 \pm 0,2	2,6 \pm 0,4	2,2 \pm 0,2
	100 μ M	3,0 \pm 0,7	3,1 \pm 0,3	2,9 \pm 0,4	1,6 \pm 0,3	1,9 \pm 0,5
MTR (vf)	Controle	61,0 \pm 5,5	21,2 \pm 4,5	10,9 \pm 3,2	12,1 \pm 2,2	132 \pm 13,6
	10 μ M	64,7 \pm 8,7	24,4 \pm 1,7	13,8 \pm 0,7	29,4 \pm 9,0	115 \pm 6,3
	100 μ M	77,0 \pm 1,8	37,5 \pm 7,1	11,0 \pm 0,8	47,0 \pm 11,3	85,1 \pm 7,0
MTG (vf)	Controle	90,3 \pm 2,4	49,7 \pm 7,8	48,4 \pm 9,5	48,4 \pm 4,1	348 \pm 26,2
	10 μ M	115 \pm 4,4	56,6 \pm 3,9	66,1 \pm 3,6	77,8 \pm 9,0	326 \pm 16,3
	100 μ M	118 \pm 3,3	115 \pm 15,5	74,8 \pm 4,0	134 \pm 24,9	531 \pm 24,2
Relação de MTR/ MTG (vf)	Controle	0,7 \pm 0,0	0,4 \pm 0,0	0,3 \pm 0,0	0,3 \pm 0,0	0,4 \pm 0,0
	10 μ M	0,6 \pm 0,0	0,4 \pm 0,0	0,2 \pm 0,0	0,4 \pm 0,0	0,4 \pm 0,0
	100 μ M	0,7 \pm 0,0	0,3 \pm 0,0	0,2 \pm 0,0	0,3 \pm 0,0	0,2 \pm 0,0

A MLT tem sido avaliada ao longo dos anos quanto à sua capacidade antitumoral em várias neoplasias malignas, incluindo Pca, (Bizzarri *et al.*, 2013). Embora muitos estudos tenham avaliado os desfechos, tanto para duração do tratamento, quanto para a concentração administrada, nenhum deles avaliou concentrações maiores que 100nM de MLT e exposições ao tratamento maiores que 96h.

Em nossos estudos observamos que maior dose analisada, 100µM de MLT, foi a que promoveu uma maior atividade antiproliferativa em todos os ensaios aplicados. Jung-Hynes e col., observaram que o número colônias de células DU 145 decresciam, conforme aumentavam a concentração de MLT (10nM a 2mM) (Jung-Hynes *et al.*, 2011).

Referente ao tempo de exposição da MLT, observou-se a diminuição significativa de células viáveis a partir de 48h de tratamento (ensaios de quantificação proteica, MTT e fluorescência), permanecendo até 240h em todas as análises. Hevia e colaboradores corroboram com os dados, pois seus estudos demonstram que a linhagem DU 145 internaliza e absorve MLT mais lentamente, por essa razão, leva um tempo superior para apresentar grandes efeitos antiproliferativos (Hevia *et al.*, 2010; Hevia *et al.*, 2015).

Estudos utilizando marcadores de fluorescência (MitoTracker), mostraram que o aumento da massa mitocondrial (MTG), mas não da sua função (MTR) pode indicar um edema e disfunção mitocondrial (Agnello *et al.*, 2008; Lima *et al.*, 2018). Os nossos resultados mostraram que a relação MTR / MTG, indica um efeito antiproliferativo das células DU 145 tratadas com MLT. Este efeito foi observado a partir de 48h na concentração de 100 µM, em que ocorreu o aumento de MTG quando comparado ao MTR, resultando na falha da organela (Agnello *et al.*, 2008; Lima *et al.*, 2018).

4. CONCLUSÕES

Com base neste estudo, é possível afirmar que a MLT exerce um efeito antiproliferativo tempo-dependente na linhagem Pca DU 145. Estes efeitos indicam a MLT como uma alternativa terapêutica promissora para o Pca. No entanto, as vias de sinalização envolvidas no processo ainda não estão bem elucidadas, necessitando de mais estudos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGNELLO, M.; MORICI, G.; RINALDI, A. M. A method for measuring mitochondrial mass and activity. **Cytotechnology**, Dordrecht, v. 56, n. 3, p. 145-149, 2008.

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

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&edir=1 >. Acesso em: 23.02.2018.

BARILE, F. A. **In vitro cytotoxicology: mechanisms and methods**. Boca Raton, FL,: 1994. 222.

BIZZARRI, M. et al. Molecular mechanisms of the pro-apoptotic actions of melatonin in cancer: a review. **Expert Opinion on Therapeutic Targets**, v. 17, n. 12, p. 1483-1496, 2013.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1, p. 248-254, 1976.

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.

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.

HEVIA, D. et al. Monitoring intracellular melatonin levels in human prostate normal and cancer cells by HPLC. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 397, n. 3, p. 1235-1244, 2010.

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.

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.

LIMA, K. G. et al. Octyl gallate reduces ATP levels and Ki67 expression leading HepG2 cells to cell cycle arrest and mitochondria-mediated apoptosis. **Toxicology in Vitro**, v. 48, p. 11-25, 2018.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1, p. 55-63, 1983.