



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS - UFAL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR

ANA KELLY DA SILVA FERNANDES DUARTE

**ANÁLISE TRANSCRIPTÔMICA DE MARCADORES CRONOBiolÓGICOS E DE
CÉLULAS DE SCHWANN ASSOCIADOS A PROGRESSÃO DO MELANOMA**

**MACEIÓ
2022**

Ana Kelly Da Silva Fernandes Duarte

Análise transcriptômica de marcadores cronobiológicos e de células de Schwann associados a progressão do melanoma

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Alagoas para obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Biologia Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Carvalho Fraga

Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Carolinne de Sales Marques

Maceió

2022

Catálogo na Fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecário: Marcelino de Carvalho Freitas Neto – CRB-4 – 1767

D812a Duarte, Ana Kelly da Silva Fernandes.

Análise transcriptômica de marcadores cronobiológicos e de células de Schwann associados a progressão do melanoma / Ana Kelly da Silva Fernandes Duarte. – 2022.

86 f. : il.

Orientador: Carlos Alberto de Carvalho Fraga.

Co-Orientadora: Carolinne de Sales Marques.

Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Biologia Molecular) – Universidade Federal de Alagoas. Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Bioquímica e Biologia Molecular. Maceió, 2022.

Bibliografia: f. 54-57.

1. Neoplasias. 2. Metástase neoplásica. 3. Melatonina. I. Título.

CDU: 616-006.6

Ao meu pai e a minha mãe

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todos que me ajudaram nessa trajetória. Irei citar apenas 1/3 dessas pessoas para que o meu “eu do futuro” consiga sempre incluir alguém nessa lista.

Aos meus pais, pelo amor;

Ao meu orientador Carlos Alberto Fraga, por toda ajuda;

As minhas irmãs, por toda alegria que causaram;

Aos meus amigos, Osman, Heloisa, Lucas, Larisse e Jéssica;

À equipe do Laboratório de Histopatologia, em especial Genilda e Rodger;

Ao meu querido orientando José Wilson.

*"If you're lost you can look and you will find me
Time after time
If you fall, I will catch you, I'll be waiting
Time after time"- Cindy Lauper*

RESUMO

O melanoma é considerado um dos tipos neoplásicos mais agressivos por apresentar rápida evolução para metástase. Embora vários fatores ambientais e genéticos já tenham sido descritos podendo influenciar no desenvolvimento e agravo desse tipo tumoral a desregulação no sistema de temporização circadiana permanece recebendo pouca atenção. Por sua vez, a melatonina é o principal hormônio controlador dos genes do relógio biológico, sabe-se que uma eventual mudança na regulação desses genes pode contribuir para o desenvolvimento de várias doenças, inclusive o câncer. Nesse contexto, tornou-se o objetivo deste estudo realizar análises de bioinformática com dados de tecido de melanoma e câncer de pele do tipo não melanoma a fim de avaliar quais genes relacionados ao relógio biológico podem contribuir para a progressão deste tipo tumoral. Além disso, ensaios de cultura celular foram realizados utilizando a melatonina como tratamento em linhagens celulares de carcinoma cutâneo não melanoma (A431) e no tipo melanoma (B16) visando observar alterações nessas células neoplásicas. Modificações nas expressões gênicas associadas aos genes do relógio, proliferação, migração, invasão e apoptose celular nas células A432 e B16 após o tratamento com a melatonina foram avaliadas. Dessa maneira, os genes relacionados ao relógio biológico apresentaram expressões alteradas no câncer de pele do tipo melanoma e esses genes foram associados com uma baixa sobrevida de acordo com a análise de bioinformática. Em cultura celular, a administração de melatonina aumentou a expressão dos genes PER2, CRY1 e CRY2 e diminuiu os níveis de expressão do gene CLOCK. Os genes PER2, CRY1 e CRY2 são considerados genes supressores tumorais que podem controlar eventos de importância no contexto tumoral como a proliferação celular, apoptose e controle do sistema de reparo e dano ao DNA. A administração de melatonina mostrou ser capaz de induzir alterações comportamentais nas células do melanoma e influenciar as expressões dos genes MKI67, HIF-1A, VEGFA, COL1A1, CDH1, CASP3, BAX, BCL2, MMP9, PER2, CRY1, CRY2 e CLOCK. A principal causa de mortalidade pelo melanoma é a disseminação metastática e as complicações subsequentes, apesar dos avanços na cirurgia e em outros métodos de tratamento, a taxa de sobrevida de um paciente com melanoma metastático permanece inalterada, apenas 4 anos, tendo em vista os dados aqui relatados, espera-se contribuir com a pesquisa terapêutica visando o tratamento de indivíduos que apresentem essa condição.

Palavras-chave: Câncer. Metástase. Melatonina.

ABSTRACT

Melanoma is considered one of the most aggressive neoplastic types because it presents a rapid progression to metastasis, although several environmental and genetic factors have already been described that may influence the development and aggravate this tumor type, the deregulation in the circadian timing system remaining unattractive. Melatonin is the main hormone controlling the genes of the biological clock, it is known that an eventual change in the regulation of these genes can contribute to the development of several diseases including cancer. In this study, bioinformatics analyzes were performed with tissue data from melanoma and non-melanoma skin cancer in order to assess which genes related to the biological clock may contribute to the progression of this tumor type. In addition, cell culture assays were carried out using melatonin as a treatment in non-melanoma cutaneous carcinoma cell lines (A431) and melanoma-type (B16) observing changes in these neoplastic cells. Changes in gene expression associated with clock, anticipation, migration, invasion and cell apoptosis genes in A432 and B16 cells after melatonin treatment were evaluated. In summary, genes related to the biological clock showed altered expression in melanoma skin cancer and these genes were associated with poor survival, according to the bioinformatics analysis. In cell culture, melatonin administration increased the expression of the PER2, CRY1 and CRY2 genes and experienced CLOCK gene expression levels. The PER2, CRY1 and CRY2 genes are considered tumor suppressor genes that can control events of importance in the tumor context, such as cell anticipation, apoptosis and control of the DNA repair and damage system. Melatonin administration has been shown to be able to induce behavioral changes in melanoma cells and influence the expression of genes MKI67, HIF-1A, VEGFA, COL1A1, CDH1, CASP3, BAX, BCL2, MMP9, PER2, CRY1, CRY2 AND CLOCK. The main cause of mortality from melanoma is metastatic dissemination and subsequent complications, despite advances in surgery and other methods of treatment, the survival rate of a patient with metastatic melanoma remains unchanged, only 4 years, in view of the data reported here, it is expected to contribute to therapeutic research by guiding the treatment of individuals who have this condition.

.

Keywords: Cancer. Metastasis. Melatonin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mecanismo de regulação molecular do ritmo circadiano	24
Figura 2- Expressão imunohistoquímica dos genes ARNTL, CRY1, CRY2, PER2 e CLOCK em amostras de tecido normal e com melanoma.....	37
Figura 3- Ensaio de migração celular com linhagem de carcinoma de células escamosas de pele antes e após o tratamento com melatonina.....	38
Figura 4- Ensaio de migração celular com linhagem celular de melanoma antes e após o tratamento com melatonina	38
Figura 5- Índice de proliferação celular após o tratamento com melatonina para as linhagens celulares A431 e B16	39
Figura 6- Ensaio de apoptose celular após o tratamento com melatonina nas linhagens celulares A431 e B16.	39
Figura 7- Índice de apoptose celular após o tratamento com melatonina nas linhagens celulares A431 e B16	40
Figura 8- Índice de expressão do gene MKI67 após o tratamento com melatonina nas linhagens celulares A431 e B16.	41
Figura 9- Índice de expressão do gene HIF-1A após o tratamento com melatonina nas linhagens celulares A431 e B16.	41
Figura 10- Índice de expressão do gene VEGFA após o tratamento com melatonina nas linhagens celulares A431 e B16.	42
Figura 11- Índice de expressão do gene COL1A1 após o tratamento com melatonina nas linhagens celulares A431 e B16.	42
Figura 12- Índice de expressão do gene MMP9 após o tratamento com melatonina nas linhagens celulares A431 e B16.	43
Figura 13- Índice de expressão do gene CLOCK após o tratamento com melatonina nas linhagens celulares A431 e B16.	43
Figura 14- Índice de expressão do gene BCL2 após o tratamento com melatonina nas linhagens celulares A431 e B16.	44
Figura 15- Índice de expressão do gene CDH1 após o tratamento com melatonina nas linhagens celulares A431 e B16.	44
Figura 16- Índice de expressão do gene CASP3 após o tratamento com melatonina nas linhagens celulares A431 e B16.	45

Figura 17- Índice de expressão do gene BAX após o tratamento com melatonina nas linhagens celulares A431 e B16.	45
Figura 18- Índice de expressão do gene PER2 após o tratamento com melatonina nas linhagens celulares A431 e B16.	46
Figura 19-Índice de expressão do gene PER1 após o tratamento com melatonina nas linhagens celulares A431 e B16.	46
Figura 20-Índice de expressão do gene CRY1 após o tratamento com melatonina nas linhagens celulares A431 e B16.	47
Figura 21- Índice de expressão do gene CRY2 após o tratamento com melatonina nas linhagens celulares A431 e B16.	47

LISTA DE QUADROS

Tabela 1 - Fototipos de pele.....	19
-----------------------------------	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ABCD:** Assimetria, Bordas irregulares, Cores múltiplas e o Diâmetro
- AJCC:** *American Joint Committee on Cancer*
- CAMs:** Moléculas de adesão celular
- CBC:** Carcinoma de células basais
- CEC:** Carcinoma espinocelular
- CSCC:** Carcinoma espinocelular cutâneo
- DAVID:** *Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery*
- DEGs:** Genes diferencialmente expressos
- EUA:** Estados Unidos da América
- FBS:** Soro fetal bovino
- GEO:** *Gene expression omnibus*
- GO:** Ontologia Genética
- GTEX:** *Genotype-Tissue Expression*
- INCA:** Instituto Nacional do Câncer
- IPN:** Invasão Perineural
- KEGG:** *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*
- MEC:** Matriz extracelular
- MMPs:** Metaloproteinases da matriz
- NREM:** *Non-rapid eye movement*
- NSQ:** Núcleo supraquiasmático
- REM:** *Rapid eye movement*
- SKCM:** *Skin Cells Melanoma*
- SNP:** Sistema nervoso periférico
- STC:** Sistema de temporização circadiana
- TGF- β :** Fator de crescimento transformante beta
- TNM:** Tumor, Linfonodo e Metástase
- VEGF:** Fator de crescimento endotelial vascular

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2.REFERENCIAL TEÓRICO	17
2.1 Melanoma: Características gerais.....	17
2.1.1 Melanoma: Fatores de risco.....	19
2.1.2 Melanoma: Epidemiologia.....	20
2.1.3 Melanoma: Metástase	21
2.2 Ritmo circadiano: Características gerais.....	22
2.2.1 Desregulação do ritmo circadiano no câncer	24
2.3 Melatonina: Caractreristicas gerais e sua relação com o câncer	26
3. JUSTIFICATIVA	28
4. OBJETIVOS	30
4.1 Objetivo geral:.....	30
4.2 Objetivos específicos:	30
5. MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
5.1 Análise de expressão diferencial.....	31
5.2 Coleta da lista de genes.....	31
5.3 Experimentação <i>in vitro</i> : cultura de células.....	32
5.4 Ensaio de viabilidade celular.....	32
5.5 Ensaio de proliferação celular	32
5.6 Ensaio de migração celular	33
5.7 Ensaio de morte celular	33
5.8 Isolamento de RNA e PCR em tempo real.....	34
5.9 Análises estatísticas.....	34
6.1 RESULTADOS	35
6.2 Genes diferencialmente expressos (DEGS), ontologia gênica e enriquecimento funcional.....	35

6.3 Principais genes relacionados ao relógio biológico na análise transcriptômica do melanoma	35
6.4 Efeitos da melatonina no comportamento celular	37
6.5 Análises de expressão gênica após administração de melatonina	40
9. REFERENCIAS	54
10. PRODUTOS	58
10.1 Patente.....	58
10.2 Artigo.....	60

1. INTRODUÇÃO

O melanoma corresponde a um tipo tumoral que se origina a partir do acúmulo de mutações nos melanócitos, células pigmentadas encontradas principalmente na pele. Apresentando comportamento muitas vezes agressivo, o melanoma desenvolve uma rápida progressão para metástase, pacientes com esse tipo de neoplasia apresentam uma sobrevida estimada de no máximo 4/5 anos se diagnosticados tardiamente (EGGERMONT *et al.*, 2011; GARBE *et al.*, 2011).

Com uma forte tendência mundial para o aumento na incidência do melanoma, esse tipo tumoral já é considerado um grave problema de saúde pública em vários países. Acompanhando essa tendência, estima-se que anualmente no Brasil 8.450 novos casos sejam contabilizados, sendo 4.200 casos diagnosticados em homens e 4.250 em mulheres (XU *et al.*, 2020; GARBE *et al.*, 2011; INCA, 2022).

A metástase é responsável 90% das mortes envolvendo câncer, esse evento celular e molecular caracteriza-se principalmente pela capacidade das células neoplásicas de colonizar outros tecidos ou órgãos além do seu sítio de origem. O desenvolvimento e sucesso de eventos metastáticos depende de vários fatores moleculares que dão suporte para invasão e colonização das células mutadas a longa distância, como o desenvolvimento de um microambiente favorável e específico que garante a sobrevivência das células neoplásicas em um sítio estranho (LIU *et al.* 2016). Dentre os mecanismos que atuam nesses eventos de suporte para a progressão tumoral, encontram-se as alterações no ritmo circadiano e a invasão perineural (SOTÁK *et al.*, 2013; CHEN *et al.*, 2019).

A melatonina está envolvida em inúmeros processos biológicos, sendo sintetizada exclusivamente durante o período noturno e tendo sua síntese inibida por influências luminosas, a melatonina é conhecida como o “hormônio do sono” por apresentar funções ligadas a indução do sono. Para além da sua atuação no ritmo circadiano, evidências substanciais indicam que a melatonina regula a proliferação e apoptose celular em alguns modelos tumorais, bem como, consegue atuar em processos que visam facilitar o processo metastático. (MEDIAVILLA *et al.*, 1999; TALIB, 2018; YEH, 2017).

Os genes do relógio biológico estão envolvidos em diversas funções no organismo dos seres vivos, como por exemplo, a secreção de hormônios, o envelhecimento, o ciclo celular, a resposta ao dano no DNA, dentre outros (BOZEK *et al.*, 2009; MAZZOCCOLI; PAZIENZA; VINCIGUERRA, 2012; RUTTER; REICK; MCKNIGHT, 2002). Entre as discussões sobre a atuação do ritmo circadiano no processo de carcinogênese, a que mais chama atenção é a explicação que os genes do ritmo circadiano regulam o ciclo celular e quando existe a perda de função dos genes do relógio biológico ocorre a progressão de neoplasias malignas, uma vez que o ritmo circadiano está associado ao metabolismo energético das células e conseqüentemente o crescimento e a morte celular (GERY; KOEFFLER, 2010; NIRVANI *et al.*, 2018).

Já foi observado que alguns dos genes regulatórios do ciclo celular como MYC, P53, CYCLIN D1 e WEE1, apresentaram alteração de expressão ligada a desregulação do ritmo circadiano em pacientes com leucemia. Além disso, estudos em modelos animais com câncer oral, mostraram que os padrões de expressão para os genes do relógio PER1, PER2, REV-ERBA, BMAL1 e CRY1, bem como os genes WEE1, DBP e P21, apresentaram sua expressão rítmica alterada no tecido tumoral (LANDGRAF; SHOSTAK; OSTER, 2012; MAZZOCCOLI; PAZIENZA; VINCIGUERRA, 2012; SOTÁK *et al.*, 2013; ZEE; ATTARIAN; VIDENOVIC, 2013; NIRVANI *et al.*, 2018).

Além dos mecanismos que auxiliam na proliferação das células, o ritmo circadiano está sendo associado com a evolução das neoplasias a nível metastático. A invasão perineural (IPN) corresponde a um tipo de disseminação metastática no qual as células neoplásicas invadem os nervos do sistema nervoso periférico para realizar o seu trajeto até o sítio secundário, uma vez que, os nervos protegem essas células neoplásicas contra as defesas imunológicas (CHEN *et al.*, 2019).

Ambos os eventos, invasão perineural e desregulação do ritmo circadiano, foram descritos separadamente, como atuantes na agressividade tumoral. Entretanto, é importante identificar eventos relacionados à alteração do ritmo circadiano que estão associados ao câncer, principalmente no tipo melanoma, um dos mais agressivos tipos tumorais, que possam impactar diretamente na invasão do sistema nervoso periférico (SNP) pelas células neoplásicas, uma vez que as células mutadas ao

invadirem os nervos do SNP conseguem realizar a disseminação metastática mais efetivamente e de maneira mais rápida (YANG *et al.*, 2020).

Nesse contexto, o objetivo do presente estudo foi avaliar a progressão do melanoma, associando esse evento aos genes do ritmo circadiano e observar uma possível interação entre esse evento e a desdiferenciação das células de Schwann, agentes importantes para a promoção da invasão perineural. O melanoma é um tipo tumoral complexo e agressivo que necessita de mais estudos para melhorar o entendimento sobre os processos que estão relacionados a sua progressão. A fim de contribuir para a descoberta de novos alvos para a pesquisa terapêutica, esse estudo também procurou observar o comportamento das células neoplásicas de melanoma quando tratadas com o hormônio melatonina.

2.REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Melanoma: Características gerais

O câncer de pele, segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA, 2022), é um dos tipos tumorais mais frequentes no Brasil e sua classificação pode ser atribuída levando em consideração o tipo celular que deu origem as mutações neoplásicas, dessa maneira, podemos classificar o câncer de pele em: câncer de pele do tipo melanoma e não melanoma (TURNER *et al.*, 2018).

O câncer de pele do tipo melanoma, recebe esse nome pois sua gênese está ligada a rápida e descontrolada proliferação das células melanocíticas, responsáveis pela produção da proteína melanina, esse tipo proteico tem como característica mais conhecida a produção do pigmento marrom que dá cor os olhos, cabelos, pele e pelos dos organismos, além disso, a síntese dessa pigmentação visa a proteção do DNA contra a radiação solar (PRALEA *et al.*,2019). Já o câncer de pele do tipo não melanoma pode ser classificado em carcinoma de células basais (CBC) também conhecido como Carcinoma Basocelular que apresenta sua etiologia ligada principalmente com a alta exposição aos raios solares, carcinoma de células escamosas primário, carcinoma espinocelular ou epidermóide (CEC) e neoplasia maligna das células queratinizantes são alguns dos subtipos de câncer de pele do tipo não melanoma (BALCH, *et al.*,2009; DE ARAGÃO *et al.*, 2019).

O melanoma é o mais agressivo dos tumores que atingem o sistema tegumentar, o modelo mais conhecido para explicar a progressão tumoral do melanoma descreve que primeiramente os melanócitos passam pela hiperplasia, depois displasia até evoluir para neoplasia. Com rápida evolução para metástase, o melanoma pode ser classificado em: A) Melanoma extensivo superficial, ocorrendo em regiões de pele exposta, B) Melanoma nodular, que apresenta ulcerações e manchas elevadas e rígidas semelhantes a um caroço de cor preta, azulada ou vermelha-azulada. C) Melanoma lentiginoso acral, que ocorre nas plantas dos pés e das mãos, sendo o subtipo mais incomum dos melanomas cutâneos. D) Lentigo maligno ou melanoma in situ, de crescimento radial e lento que atinge principalmente a região da cabeça e pescoço. Essa classificação depende de características histológicas e padrão de disseminação metastática (DE ARAGÃO *et al.*, 2019; TURNER *et al.*, 2018; MAGRO *et al.*, 2014).

O diagnóstico precoce é fundamental para alcançar resultados positivos no tratamento contra o melanoma, através de biopsia, dermatoscopia e avaliação clínica visual, é possível identificar a presença ou não de modificações malignas na pele. Uma das maneiras mais utilizadas para distinguir uma lesão potencialmente maligna de uma lesão pigmentada benigna é regra do ABCD (Assimetria, Bordas irregulares, Cores múltiplas e o Diâmetro) (EGGERMONT *et al.*, 2011; DE ARAGÃO *et al.*, 2019), já para definir o estadiamento do melanoma é recomendável seguir o sistema TNM (Tumor, Linfonodo e Metástase) estabelecido pela AJCC (*American Joint Committee on Cancer*), onde são regulamentados quatro grupos (T1, T2, T3 e T4), cada grupo representa o tamanho da espessura do melanoma em milímetros: T1, espessura ≤ 1 mm, T2, espessura 1.01-2.00 mm, T3, espessura 2.01 – 4.00 mm, T4, espessura ≥ 4.00 , cada grupo apresentado anteriormente, ainda contém duas subclassificações: a= sem ulcerações e b= com ulcerações (ALADOWICZ *et al.*, 2013; DE ARAGÃO *et al.*, 2019; BALCH *et al.*, 2009)

O tratamento, na maioria dos casos, é realizado através de cirurgia, que leva em consideração, como mencionado, principalmente a espessura da lesão, mas dependendo do estadiamento do tumor também são administradas imunoterapia, radioterapia e cirurgia de forma combinada (ALADOWICZ *et al.*, 2013).

2.1.1 Melanoma: Fatores de risco

O melanoma é considerado uma neoplasia multifatorial, uma vez que tanto fatores ambientais como genéticos podem influenciar no desenvolvimento de uma lesão potencialmente maligna (ALADOWICZ *et al.*, 2013). É do conhecimento científico que indivíduos que apresentem fototipos I e II, segundo a classificação proposta por Fitzpatrick e Moshier (1983), (tabela 1) são mais vulneráveis a queimaduras por radiação UV, essa é uma das características mais estudadas e estabelecidas quanto aos fatores de risco para o desenvolvimento do melanoma (ELWOOD *et al.*, 1997).

Tabela 1 - Fototipos de pele.

Fototipo	Característica	Eritema	Bronzeado	Sensibilidade
I	Pele muito clara e sensível, presença de sardas e cabelos ruivos ou loiros	Sempre	Nunca	Muito sensível
II	Pele clara, cabelos loiros ou castanho claros	Sempre	Às vezes	Sensível
III	Pele clara, cabelo castanho claro	Moderado	Moderado	Normal
IV	Pele morena, cabelo castanho escuro	Pouco	Sempre	Normal
V	Pele escura, cabelo escuro ou preto	Raro	Sempre	Pouco sensível
VI	Pele muito escura, cabelo preto.	Nunca	Pele muito pigmentada	Insensível

Fonte: Adaptado, MOTTA. 2002.

A presença de nevos melanocíticos, popularmente conhecidos como “pintas” ou “sinais”, também representa um fator com potencial para o desenvolvimento do melanoma (BEVONA *et al.*, 2003). Podendo ser congênitos ou adquiridos os nevos melanocíticos apresentam características como coloração marrom ou marrom escuro,

morfologicamente redondos ou ovais com bordas bem definidas podendo ser ásperos, planos ou elevados. Os nevos melanocíticos congênitos estão presentes desde o nascimento do indivíduo e podem ser classificados de acordo com o seu tamanho (pequeno, médio e gigante), a presença de um nevo gigante é associada com o risco de 5% a 20% maior para transformação maligna e a chance desse evento tumoral acontecer ainda na infância é de 60% (PASCHOAL *et al.*, 2002; GUIMARÃES, 2020; GOMES *et al.*, 2011; CUST *et al.*, 2019).

Com relação a taxa de transformação maligna para nevos melanocíticos adquiridos, foi observado que indivíduos que apresentam uma taxa superior de 100 novos nevos anualmente demonstram ter de 5 a 17 vezes mais chances de desenvolver uma lesão potencialmente maligna em comparação com uma pessoa que apresente < 100 novos nevos (BEVONA, *et al.*, 2003; GOMES *et al.*, 2011).

Histórico familiar de melanoma, idade (indivíduos acima de 50 anos), também são apresentados como potenciais fatores de risco para um evento de câncer de pele do tipo melanoma. Geneticamente, o melanoma pode ser considerado uma doença autossômica dominante onde o histórico familiar apresenta um papel fundamental para o desenvolvimento dessa neoplasia, as mutações encontradas no inibidor de quinase ciclina dependente 2A (CDKN2A ou p16) é um dos eventos mutacionais mais encontrados entre membros familiares que desenvolveram esse tipo tumoral, além disso, também podem ser encontradas mutações no oncogene CDK4 e no gene MC1R (TSAO *et al.*, 2004).

2.1.2 Melanoma: Epidemiologia

Com incidência aumentando em todo o mundo o melanoma se apresenta como um problema de saúde pública, apenas nos Estados Unidos da América (EUA), foi registrado um aumento nos casos de 270% entre os anos 1973 a 2002 (LI, Zhen *et al.*, 2022; CUST *et al.*, 2020; PAULSON *et al.*, 2020), entretanto, a maior incidência mundial dessa lesão maligna é encontrada no Estado australiano de Queensland, com incidência de 55.8/105 entre os habitantes homens e 41.1/105 para as mulheres. A incidência desse tipo tumoral também é alta na Nova Zelândia, Suíça, Noruega, Suécia e Dinamarca. Além disso, a taxa de mortalidade também apresenta aumento principalmente nos EUA, homens são os mais acometidos (+2,3% de 1975 a 1989 e

+0,2% de 1989 a 2007) em comparação com as mulheres (+0,8% entre 1975-1989, -0,6% entre 1989-2007) (LI, Zhen *et al.*, 2022).

No Brasil, segundo os dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA), embora a incidência desse tipo tumoral seja considerada baixa a letalidade do melanoma é considerada alta e continua aumentando com os anos. Estima-se que 8.450 novos casos por ano sejam contabilizados em território brasileiro.

2.1.3 Melanoma: Metástase

De forma simplista, metástase, refere-se ao evento no qual as células mutadas provenientes de um tumor sólido desenvolvem a capacidade de sair do seu sítio de origem através dos vasos sanguíneos e linfáticos e colonizar tecidos secundários, durante esse processo, é notável que ocorram diversos mecanismos moleculares e bioquímicos que propiciem a sobrevivência, defesa e adaptação das células neoplásicas fora de sua região de origem, a metástase é a principal causa de morte envolvendo tumores, cerca de 90%. A importância da metástase para as células neoplásicas vai além da disseminação das suas células para regiões secundárias, esse fenômeno também permite que aumentem os eventos de recidivas tumorais (LIU RUI *et al.*, 2018; SEYFRIED *et al.*, 2013).

De acordo com Tuner e seus colaboradores (2018), o processo de progressão metastática apresenta algumas fases, tais como: (1) invasão local, através do rompimento da matriz extracelular e da membrana basal, onde se localiza o tumor sólido, (2) invasão de vasos linfáticos e/ ou vasos sanguíneos, pelas células neoplásicas, (3) parada em um tecido secundário, (4) invasão de tecidos distantes, e (5) sobrevivência e proliferação em um microambiente distante para formar novas colônias tumorais.

Em estágios avançados, o melanoma apresenta um prognóstico desanimador, com um tempo médio de sobrevida estimado em 4/5 anos (BALCH *et al.*, 2009). Além disso, outras características do melanoma metastático referem-se à presença de metástase precoce e a predileção por órgãos específicos (ALADOWICZ *et al.*, 2013).

Como citado anteriormente, o melanoma pode ser classificado em subtipos de acordo com características histológicas e com o padrão de disseminação metastática,

podendo ser: nodular, lentigo maligno, desmoplásico, mucoso ou acral e melanoma extensivo superficial, sendo este último o mais comum (DE ARAGÃO *et al.*, 2019).

Como o próprio nome sugere, o tipo extensivo superficial, apresenta inicialmente uma progressão radial, com boas chances de cura se diagnosticado precocemente por não atingir os tecidos vascularizados, entretanto, a médio e longo prazo, esse tipo tumoral pode evoluir para uma progressão vertical atingindo os tecidos vascularizados potencializando as chances de um evento metastático. Paralelamente, o melanoma do tipo nodular apresenta uma rápida evolução para disseminação vertical, sendo considerado muito agressivo (ALADOWICZ *et al.*, 2013; DE ARAGÃO *et al.*, 2019).

Embora existam diferenças substanciais entre os tipos de melanoma e seus processos de progressão metastática é possível pontuar eventos moleculares que ocorrem em comum na maioria dos subtipos de melanoma durante o evento metastático, surpreendentemente poucos eventos metastáticos são únicos ou exclusivos para cada um dos tipos de melanoma (LIU RUI *et al.*, 2018; SEYFRIED *et al.*, 2013).

2.2 Ritmo circadiano: Características gerais

O sono é um estado fisiológico antagonista a vigília no qual o indivíduo apresenta perda gradativa dos níveis de consciência, diferentemente do coma no estado de sono profundo o indivíduo consegue ser desperto através de estímulos sensoriais. O tempo considerado ótimo para cada noite de sono é estimado entre 7 e 8 horas, entretanto, essa estimativa pode ser alterada de acordo com a idade e as características pessoais dos indivíduos (CARDOSO *et al.*, 2014).

Sendo um estado comportamental cíclico de alta complexidade, o sono pode ser classificado em duas grandes fases que se alternam em cada episódio de adormecimento, denominadas: sono sincronizado NREM (*non-rapid eye movement*) e sono dessincronizado REM (*rapid eye movement*). Para cada uma dessas fases é observado um comportamento fisiológico distinto, na fase NREM considerada a mais longa ocupando quase 80% de todo episódio de sono e com quatro estágios distintos (N1, N2, N3 e N4) são observadas mudanças na pressão arterial, temperatura corporal e frequência cardíaca. Já na fase REM são observadas diminuições do tônus

vascular, irregularidades na frequência cardíaca e frequência respiratória, além de serem observados movimentos rápidos dos olhos e a notável ativação do encéfalo, identificada pelo eletroencefalograma, demonstrando ondas cerebrais semelhante ao observado no estado de vigília, é nessa fase que são observadas as maiores ocorrências de sonhos vividos (DRAGER, *et al.*, 2009; CARDOSO, *et al.*, 2014).

O relógio biológico dos organismos vivos é influenciado diretamente por fatores ambientais, nesse contexto, se destaca principalmente a forte influência dos ciclos claro-escuro com duração de 24h. A partir dessas alternâncias entre dia e noite os organismos se adaptam e criam comportamentos específicos para cada um dos momentos do ciclo claro-escuro, conseqüentemente uma vasta gama de processos bioquímicos e moleculares acompanham essas adaptações. É de conhecimento científico que mesmo sem a influência direta dessas variações luminosas, os organismos mantêm os comportamentos ligados às oscilações claro-escuro, sendo atribuído ao sistema de temporização circadiana (STC) a função de modular os ritmos circadianos. (DIBNER, *et al.*, 2010; GOLOMBEK *et al.*, 2010).

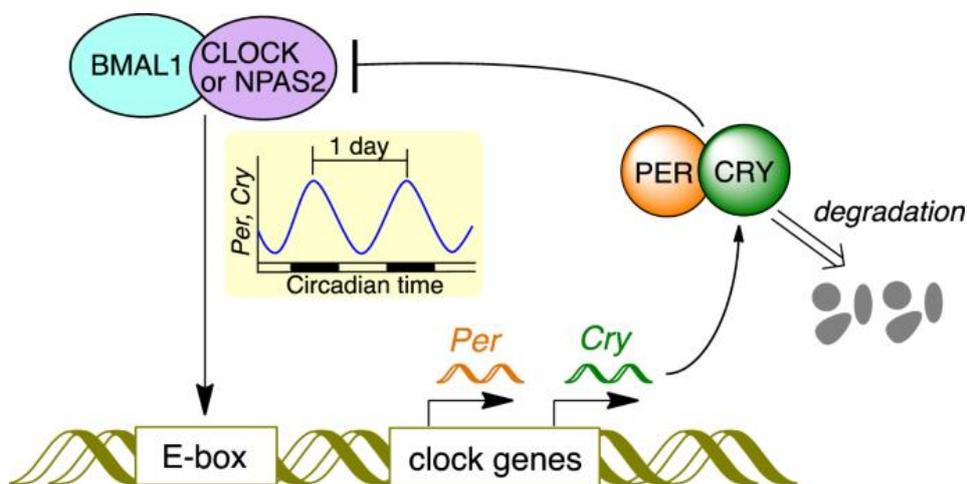
Constituído por estruturas neurais, como o marcapasso central, vias de entrada e vias de saída, o STC é o principal centro de comando para a modulação comportamental dos indivíduos frente às modificações temporais. Dentre todas as estruturas anteriormente citadas, se destaca a função do marcapasso central, ou núcleo supraquiasmático (NSQ), constituído por aglomerados de neurônios localizados no hipotálamo anterior, de cada lado do terceiro ventrículo logo acima do quiasma óptico. Essa estrutura, é o principal marcador temporal do organismo e sua função inclui alocação temporal para execução dos comportamentos nos mamíferos. Além desse “relógio central”, também existem os “relógios periféricos”, constituídos por pequenos aglomerados celulares com funções semelhantes ao NSQ, distribuídos por todo organismo, entretanto, todos esses núcleos menores são controlados pelo “relógio mestre” ou NSQ, através da expressão direta de genes específicos do ritmo circadiano. (HUANG, *et al.*, 2011. DIBNER, *et al.*, 2010; GOLOMBEK *et al.*, 2010).

A fisiologia do ritmo circadiano é geralmente o resultado da expressão de genes específicos que controlam principalmente o NSQ. Através de circuitos de feedback de transcrição/tradução interligados a fim de produzirem oscilações que têm a duração de aproximadamente 24 horas. Dessa maneira, podemos aferir que os grandes reguladores dos relógios biológicos são genes e produtos protéicos que atuam tanto

na geração quanto na regulação dos ritmos circadianos, seja nos osciladores periféricos ou no NSQ, o controle partirá dos circuitos de feedback negativo de transcrição e tradução dos genes. Assim, as proteínas codificadas por esses genes podem regular negativamente a sua própria síntese (FISHBEIN *et al.*, 2021).

A nível molecular a rede de comunicação para a ativação/bloqueio circadiano ocorre da seguinte maneira, inicialmente, o heterodímero composto entre as proteínas CLOCK e BMAL1 atuam como fatores de transcrição induzindo a expressão dos genes PER e CRY através de uma ligação aos elementos E-BOX localizados na região promotora desses genes. Em seguida, quando os genes PER e CRY são transcritos e seus produtos proteicos acumulam-se no citoplasma ocorre a união entre essas proteínas formando novamente complexos heterodímeros que retornam para a região do núcleo, já dentro dessa organela, o complexo PER/CRY inibe a atividade de BMAL1/CLOCK. (Figura 1) (ALBUQUERQUE, 2014; MINEGISHI *et al.*, 2018.)

Figura 1 - Mecanismo de regulação molecular do ritmo circadiano



Fonte: MINEGISHI *et al.* (2018)

2.2.1 Desregulação do ritmo circadiano no câncer

Os genes do relógio biológico estão envolvidos em diversas funções no organismo, como por exemplo, a secreção de hormônios, envelhecimento, ciclo celular, a resposta ao dano no DNA, dentre outros. Assim, é de se esperar que a sua desregulação esteja relacionada com o surgimento de diferentes doenças, como transtornos de humor, desordens metabólicas e também o câncer (BOZEK *et al.*,

2009; MAZZOCCOLI; PAZIENZA; VINCIGUERRA, 2012; RUTTER; REICK; MCKNIGHT, 2002; MILLER *et al.*, 2007).

O relógio circadiano e o ciclo celular possuem semelhanças conceituais e moleculares, sendo ambos os eventos interligados, é de se esperar que ocorram interações entre esses dois ciclos. Quando ocorre uma desregulação no ritmo circadiano, são observadas alterações no ciclo celular (LANDGRAF; SHOSTAK; OSTER, 2012; MAZZOCCOLI; PAZIENZA; VINCIGUERRA, 2012; SOTÁK *et al.*, 2013), dessa maneira, o ritmo circadiano coordena a progressão do ciclo celular tanto em tecidos saudáveis como em tecidos neoplásicos, assim, comumente mutações em genes do ritmo circadiano são associadas a progressão do câncer (MAZZOCCOLI; PAZIENZA; VINCIGUERRA, 2012; SOTÁK *et al.*, 2013).

Os genes de relógio biológico já foram detectados em mucosas bucais saudáveis e suas oscilações diurnas foram mapeadas, demonstrando que a oscilação rítmica dos genes e seus diferentes picos ocorrem simultaneamente com diferentes fases do ciclo celular. O gene *PER1* atingiu o pico simultaneamente com o gene TP53, um marcador da fase G1 do ciclo celular e um importante gene supressor tumoral. Além do PER1, outro importante gene do ritmo circadiano, BMAL1 também atinge seu pico simultaneamente com outro gene marcador de fase M (ciclina β 1) (MAIESE, 2017; TOTH *et al.*, 2017; LI *et al.*, 2018).

Alterações na expressão dos genes do relógio podem aumentar a susceptibilidade ao câncer através dos efeitos nos mecanismos biológicos que regulam o dano e reparo ao DNA, o metabolismo energético, crescimento e morte celular em tecidos neoplásicos (GERY; KOEFFLER, 2010; NIRVANI *et al.*, 2018). Genes que fazem parte do mecanismo de regulação do ciclo celular, como MYC, P53, CYCLIN D1 e WEE1, já foram descritos por apresentarem alteração em sua expressão em pacientes com leucemias associadas à desregulação de genes do relógio (LANDGRAF; SHOSTAK; OSTER, 2012; MAZZOCCOLI; PAZIENZA; VINCIGUERRA, 2012; SOTÁK *et al.*, 2013; ZEE; ATTARIAN; VIDENOVIC, 2013). Estudos em modelos animais com câncer oral, mostraram que os padrões de expressão para os genes do relógio PER1, PER2, REV-ERBA, BMAL1 e CRY1, bem como os genes WEE1, DBP e P21, apresentaram sua expressão rítmica alterada no tecido tumoral (NIRVANI *et al.*, 2018). Estudos confirmaram que a ciclina β 1 e o TP53

são alvos de genes do relógio biológico, uma vez que quando ocorre a perda de expressão do gene BMAL1 também ocorre a redução da expressão do gene TP53.

Maiese (2017), sugere que o gene do relógio biológico PER1 pode ser usado como um marcador para determinar o estadiamento clínico e o risco metastático em modelos com que apresentem câncer oral, sendo assim um potencial alvo para a prevenção e tratamento nesse tipo de neoplasia. Análises teciduais de pacientes com diagnóstico de câncer de cabeça e pescoço mostram que a expressão de nove genes do relógio biológico, PER1, PER2, PER3, CRY1, CRI2, CK1 ϵ , TIM, CLOCK e BMAL1 apresentam modificações nas suas expressões.

2.3 Melatonina: Características gerais e sua relação com o câncer

A melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina), é um neuro-hormônio endógeno sintetizado na glândula pineal exclusivamente durante à noite, influências luminosas correspondem ao principal fator de regulação desse hormônio (NETO et al., 2008). A síntese da melatonina ocorre através de várias reações, inicialmente, o triptofano sofre uma reação de hidroxilação, através da enzima triptofano hidroxilase, formando um 5-hidroxitriptofano, que por sua vez passa por uma reação de descarboxilação, se transformando em serotonina, a partir deste momento, a serotonina sofre uma conversão em N-acetilserotonina, reação catalisada pela enzima aril-alcil-amina-Nacetiltransferase, e logo após, sofre outra conversão de N-acetilserotonina em melatonina, reação mediada pela hidroxil-indol-O-metiltransferase (AMARAL *et al.*, 2018). Uma vez sintetizada, a melatonina é liberada para as outras regiões do organismo. Sendo metabolizada no fígado, o seu principal metabólito é a 6-sulfatoximelatonina. Todavia, os humanos não apresentam a característica de estocar melatonina, esse hormônio é prontamente excretado através da urina (NETO *et al.*, 2008).

Embora a síntese de melatonina ocorra principalmente na glândula pineal, já foi observado que as mesmas enzimas que atuam nessa região, podem sintetizar melatonina em outras partes do corpo como na retina, timo, medula óssea, epitélio respiratório, pele, cristalino, intestino e linfócitos, nesses casos, a melatonina

apresenta padrões de sinalização parácrinas e/ou autócrinas (CARPENTIERI *et al.*, 2012; CARRILLO-VICO *et al.*, 2004).

A melatonina é uma molécula com funções pleiotrópicas; que está envolvida em inúmeros processos biológicos, principalmente na regulação do ritmo circadiano (YEH, 2017). Evidências substanciais indicaram que a melatonina regula a proliferação e apoptose em vários tipos de câncer através de um aumento na expressão da proteína p21WAF1 em modelos de câncer de mama (MEDIAVILLA *et al.*, 1999). Ademais, em tumores de cabeça e pescoço metastáticos foi relatado que a melatonina conseguia inibir a expressão gênica de enzimas metaloproteinases de matriz (MMPs), responsáveis por degradar a matriz extracelular (MEC) facilitando o processo metastático nesse tipo de neoplasia. (TALIB, 2018).

Segundo Nishida e seus colaboradores (2006), além da remodelação da MEC, a progressão do tumor requer a ativação da angiogênese, um processo definido como a formação de novos vasos sanguíneos a partir de estruturas pré-existentes. Os vasos sanguíneos ao redor do tumor não apenas fornecem oxigênio e nutrientes, mas também permitem a invasão de células neoplásicas no sistema circulatório e sua migração para locais secundários. O processo de angiogênese tumoral é orquestrado por múltiplas vias de sinalização provocadas por interações entre as células neoplásicas e o estroma circundante. Demonstrou-se que várias proteínas são pró-angiogênicas, incluindo, entre outras, angiogenina, fator básico de crescimento de fibroblastos, fator de crescimento epidérmico, fator estimulador de colônias de granulócitos, fator de crescimento de hepatócitos, interleucina-8, fator de crescimento placentário, crescimento endotelial derivado de plaquetas, fator de crescimento transformador (TGF) $-\alpha$, TGF- β , fator de necrose tumoral- α e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF). Entre eles, a família VEGF e seus receptores têm chamado atenção considerável ao campo da angiogênese tumoral (TALIB, 2018; NISHIDA *et al.*, 2006; CARMELIET, *et al.*, 2000.)

Recentemente, vários estudos mostraram que a melatonina pode diminuir a expressão do VEGF em vários modelos tumorais. Nas linhagens celulares de câncer de boca, a melatonina inibiu a expressão dos fatores pró-angiogênicos, HIF1- α e VEGF. Esses resultados sugerem que a melatonina tem o potencial de inibir angiogênese do tumor, evitando, portanto, uma progressão neoplásica. (TALIB, 2018).

3. JUSTIFICATIVA

A metástase e as suas complicações subsequentes se apresentam como a principal causa de mortes em eventos tumorais, cerca de 90%, esse evento no qual as células mutadas provenientes de um tumor sólido desenvolvem a capacidade de sair do seu sítio de origem através dos vasos sanguíneos e linfáticos e colonizar tecidos secundários é observado em uma ampla gama de tipos tumorais. O câncer de pele do tipo melanoma é conhecido por sua alta agressividade devido a rápida evolução para metástases à longa distância implicando em uma baixa sobrevida e piora na qualidade de vida do paciente.

Acompanhando uma tendência mundial, no Brasil existe uma forte propensão a aumentos nos casos de melanoma, essa doença multifatorial é associada principalmente a exposição exacerbada aos raios solares. Estima-se que anualmente 8.450 novos casos sejam detectados em território brasileiro. Embora muitos tipos tumorais venham sendo associados com os mecanismos da regulação circadiana, o melanoma ainda recebe pouca atenção. O ritmo circadiano é capaz de controlar eventos de importância para o desenvolvimento neoplásico, através dos seus genes reguladores (PER1, PER2, BMALL e CLOCK). O relógio biológico consegue influenciar diretamente a expressão de genes ligados ao ciclo celular, apoptose e angiogênese e uma vez desregulada a expressão dos genes do ritmo circadiano é notável o surgimento e estimulação de eventos mutacionais.

O tratamento clássico para o melanoma consiste em cirurgia, radioterapia e quimioterapia. No entanto, é observado que mesmo com os avanços nas pesquisas e tratamentos para essa doença a taxa de sobrevida de pacientes que apresentem essa condição permanece inalterada, incentivando a busca por novas terapias que visem não só o aumento da sobrevida desses indivíduos mas que também apresentem menos efeitos colaterais, como produtos endógenos (TALIB et al., 2018).

Dessa forma, a melatonina se apresenta como uma excelente candidata a estudos que visem a identificação de novas ferramentas terapêuticas. Sendo o principal hormônio produzido pela glândula pineal, a melatonina foi isolada pela primeira vez em 1981, sua síntese e secreção ocorre principalmente pelos pinealócitos seguindo um padrão rítmico, com pico secretório no período noturno e quase nenhuma síntese no período diurno. (NETO et al., 2004).

Além da glândula pineal, a melatonina já foi isolada na retina, em células do trato gastrointestinal, hemácias humanas, dentre outros. Atualmente, sabe-se que a melatonina é o principal hormônio que regula a atividade metabólica da glândula pineal, estrutura com origem nos fotorreceptores da retina e projeção ao núcleo supraquiasmático do hipotálamo. O núcleo supraquiasmático é considerado o relógio biológico do homem, e as projeções retino-hipotalâmicas que chegam a ele fazem a interação entre o ambiente cíclico externo e o relógio interno (NETO, *et al.*, 2004).

Como citado anteriormente, alguns genes do relógio biológico possuem papéis-chave associados ao ritmo circadiano na progressão de neoplasias malignas. A perda de função desses genes leva a proliferação e ao crescimento neoplásico, resultando em ativação oncogênica, proliferação celular descontrolada, inibição da apoptose e rápida progressão tumoral. Nesse sentido, foi observado que o principal hormônio regulador desses genes do relógio biológico, denominada melatonina é capaz de reduzir a proliferação celular, migração e apoptose em modelos tumorais de mama e carcinoma de células escamoso da cavidade oral (HUANG *et al.*, 2012; KANG *et al.*, 2013).

Uma vez que os efeitos da melatonina no câncer de pele do tipo melanoma permanecem desconhecidos, o presente estudo justifica-se e está fundamentado na necessidade de investigação de novos alvos terapêuticos e identificação de eventos/marcadores moleculares que atuam na progressão desse tipo tumoral. Essa investigação pode apontar novos alvos endógenos para possíveis intervenções terapêuticas que visem o tratamento de indivíduos que apresentem essa condição.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral:

- Associar fatores ligados a desdiferenciação das células de Schwann e dos genes do ritmo circadiano a progressão do melanoma e observar o efeito do hormônio melatonina em células de melanoma.

4.2 Objetivos específicos:

- Identificar os genes diferencialmente expressos no melanoma;
- Analisar as vias moleculares associadas aos genes diferencialmente expressos do melanoma;
- Associar os genes diferencialmente expressos do melanoma aos genes do ritmo circadiano;
- Associar os genes diferencialmente do melanoma à lista de genes associados às células de Schwann;
- Analisar o processo de invasão celular das células neoplásicas de melanoma após tratamento com melatonina;
- Analisar o processo de apoptose celular das células neoplásicas de melanoma após o tratamento com melatonina;
- Analisar o processo de proliferação celular das células neoplásicas de melanoma após o tratamento com a melatonina;
- Investigar o perfil de expressão gênica dos genes: MKI67, HIF-1A, VEGFA, COL1A1, CDH1, CASP3, BAX, BCL2, MMP9, PER1, PER2, CRY1, CRY2 E CLOCK após o tratamento com melatonina.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Análise de expressão diferencial

Os dados referentes a expressão gênica e informações clínicas do melanoma foram extraídas das bases *Geodatasets* e *The Cancer Genome Atlas* (TCGA). O pacote *TCGAbiolinks* e o pacote *TCGAbiolinksGUI/R* foram utilizados para manipular os dados, comparando os genes diferencialmente expressos (DEGs) encontrados em amostras de tecidos normais e tecidos que apresentavam melanoma (SKCM). As amostras de tecidos normais foram obtidas através do projeto *Genotype-Tissue Expression* (GTEx). O valor de $P < 0,05$ e o $\log_{2}FC \geq 1$ foram definidos como critérios de significância.

A análise de ontologia gênica foi realizada através da *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG), um recurso de banco de dados para interpretação biológica de sequências de genomas e outros dados. As análises KEGG estavam disponíveis no banco de dados *Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery* (DAVID) v6.8 (<https://david.ncifcrf.gov/>), um recurso de dados composto por uma base de conhecimento integrada de biologia e ferramentas de análise para extrair informações biológicas significativas de grandes quantidades de genes e coleções de proteínas. O valor de $p < 0,05$ foi definido como critério de corte.

Ainda, uma análise de sobrevivência foi realizada através da ferramenta *Kaplan-Meier*, que fornece gráficos demonstrando a associação entre o desfecho clínico de um paciente e expressão de determinados genes. Para confirmar a função proteica dos DEGs nos tecidos neoplásicos, análises de imuno-histoquímica foram realizadas através de dados obtidos na base *Human Protein Atlas* (<https://www.proteinatlas.org/>) □ Realizamos também análises utilizando o Geo2R, para verificar a expressão diferencial de genes no câncer do tipo não melanoma (GSE66359).

5.2 Coleta da lista de genes

A coleta da lista de genes foi realizada utilizando o *Entrez Gene* do NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/) e *GeneCards* (<https://www.genecards.org/>), usando os

identificadores para os genes associados ao ritmo circadiano. A lista de genes e DEGs com os perfis de expressão gênica (regulados positivamente e regulados negativamente) foram combinados e identificados com um diagrama de Venn 2.1.0 (<http://www.interactivenn.net/>).

5.3 Experimentação *in vitro*: cultura de células

As linhagens celulares A431 (carcinoma de células escamosas da pele humana) e B16 (célula de camundongo com melanoma) foram armazenadas a -80°C e criopreservadas em solução específica. Para sincronizar o crescimento das células A431 e B16 (1×10^5), elas foram inseridas em uma placa de 12 poços e passaram por 24 horas com privação de soro fetal bovino (FBS), em seguida elas eram liberadas no meio contendo 2% de FBS. Ambas as linhagens foram cultivadas em meio com a adição de 0,25 ng/mL de melatonina. Na ocasião, todos os tratamentos foram realizados na ausência de FBS. As amostras resultantes dessa ação foram mantidas a 4°C e usadas dentro 24 horas para os ensaios subsequentes. Todos os experimentos de cultura celular foram realizados três vezes.

5.4 Ensaio de viabilidade celular

As células A431 e B16 foram cultivadas em placa de 96 poços a uma densidade de 1×10^4 células/poço por 12 h a 37°C em 5% de CO_2 , depois tratadas com melatonina por 24h. As análises de viabilidade celular foram realizadas através do teste 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina (MTT) $50\mu\text{g}/10\mu\text{L}$. Dimetilsulfóxido (DMSO; $200\mu\text{l}$) foi adicionado após a remoção do sobrenadante. Após agitar a placa por 10 min, a viabilidade celular foi avaliada medindo a absorbância a 490 nm usando um instrumento de marcação de enzimas (EX- tipo 800); todas as medições foram realizadas três vezes. A curva de crescimento celular foi concluída usando o tempo como abscissa e o valor A (média \pm DP) como ordenada.

5.5 Ensaio de proliferação celular

Como citado anteriormente, as linhagens A431 e B16 (1×10^5), foram cultivadas em uma placa contendo 12 poços e sincronizados por privação de FBS, após isso, a melatonina (Sigma, St. Louis, MO, EUA) foi adicionada ao meio de cultura. Depois de 24 horas as células foram tripsinizadas e a viabilidade celular foi avaliada por coloração em azul de tripano (Sigma, St. Louis, MO, EUA). As células foram contadas em câmara de Neubauer (prolab, São Paulo, SP, Brasil).

5.6 Ensaio de migração celular

A avaliação do efeito da melatonina na migração das células A431 e B16 foi realizada através de um o ensaio “*wound scratch*” após as células crescerem em placas de cultura de 6 poços e atingirem confluência. Posteriormente, o meio da cultura foi removido e uma escarificação (arranhão) foi produzida na monocamada de células com o auxílio de uma ponteira de 200 μ l. As células foram lavadas com PBS e incubadas a 37°C com os meios de cultura completos, na presença ou ausência da melatonina. Os poços eram fotografados no início do experimento e após 24 horas. As fotos foram obtidas com uma câmera SC30 (Olympus, Center Valley, PA, EUA) acoplada em um microscópio (Olympus, Center Valley, PA, EUA). O software ImageJ foi usado para realizar as análises estatísticas calculando a taxa da área inicial (em pixels) pela área final livre após as 24h do experimento com as células.

5.7 Ensaio de morte celular

A detecção de células apoptóticas foi realizada através da coloração laranja de acridina (AO, Sigma, St. Louis, MO, EUA) e brometo de etídio (EB, Sigma, St. Louis, MO, EUA). As células foram incubadas em 10 μ g/ml de AO e 20 μ g/ml em brometo de etídio em sala escura por 5 min. As células foram então observadas sob um microscópio de fluorescência FSX100 (Olympus, Center Valley, PA, EUA). A coloração intensa do brometo etídio (Ex360-370, Em420-460, filtro DM400) indica morte celular, enquanto a coloração laranja de acridina (Ex460-495, Em510-550, filtro DM505) indica células vivas. A contagem das células foi realizada através de imagem pelo software ImageJ.

5.8 Isolamento de RNA e PCR em tempo real

O RNA das amostras tumorais foi isolado usando o reagente TRIzol (GIBCO Invitrogen), de acordo com as especificações do fabricante. O RNA total foi transcrito reversamente e o cDNA subsequente foi aquecido a 95°C para terminar a reação. Para PCR em tempo real, 2 µl do cDNA foram adicionados ao TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) referentes aos genes MKI67, HIF-1A, VEGFA, COL1A1, CDH1, CASP3, BAX, BCL2, MMP9, PER1, PER2, CRY1, CRY2, BMAL1, CLOCK (*Applied Biosystems*). A amplificação foi realizada em um ABI Sistema de Detecção de Sequência 7000. Todas as reações foram feitas em triplicata e o RNAr 18S (kit de controle *TaqMan RNAr*, *Applied Biosystems*) foi utilizado como controle. Os resultados foram quantificados como valores Ct, onde Ct foi definido como o ciclo limite de PCR no qual o produto amplificado é primeiro detectado e definido como expressão gênica relativa (a proporção de alvo/controle).

5.9 Análises estatísticas

As análises foram realizadas usando o software *GraphPad Prism* (Versão 6.0, *GraphPad Software Inc.*, San Diego, CA, EUA). Os testes de Shapiro-Wilk e Kolmogorov-Smirnov foram utilizados para avaliar a distribuição dos dados. Amostras apresentadas como uma distribuição normal, um teste T foi aplicado. Todos os dados são médias ± S.D. A significância estatística foi aceita em $p < 0,05$.

6.1 RESULTADOS

6.2 Genes diferencialmente expressos (DEGS), ontologia gênica e enriquecimento funcional

Visando identificar os principais eventos de sinalização molecular associados à expressão dos genes do relógio biológico com o melanoma, foram realizadas análises de conjuntos de dados dos perfis de expressão de mRNA através dos dados obtidos na base TCGA. Dessa maneira, foram resgatados dados de melanoma com lesão primária e metastática, os dados contendo as amostras de tecido saudável foram obtidos do banco Gtex. Para identificar os genes diferencialmente expressos (DEGs), o pacote TCGAbiolinks foi introduzido no software R e os dados contendo os genes *upregulated* e *downregulated* foram baixados. Não foram encontrados dados acerca do carcinoma espinocelular cutâneo (cSCC) na base do TCGA, para suprir essa carência, foram realizadas análises utilizando o Geo2R de RNAs totais entre grupos de queratinócitos epidérmicos normais e linhagens celulares de cSCC (dados encontrados sob código de identificação GSE66359).

Após obter os resultados de expressão gênica pertencente a amostra de SKCM a partir do TCGA esses dados foram processados usando métodos padrão, e os grupos “normal” e “amostras de câncer” foram comparados. Posteriormente, foi realizada uma análise de enriquecimento de termos GO e classificação funcional por análise KEGG, através da plataforma DAVID, para investigar os papéis biológicos e funcionais desses DEGs. Foi observado a presença dos genes do ritmo circadiano regulados negativamente nas amostras de SKCM e moléculas de adesão celular (CAMs), além disso, as vias ligadas a diabetes *mellitus* tipo I, receptor de interação citocina-citocina e doença autoimune da tireoide foram as mais ativas nesse tipo de câncer. Não foram identificados dados que associassem o ritmo circadiano e a desdiferenciação das células de Schwann/invasão perineural nas análises.

6.3 Principais genes relacionados ao relógio biológico na análise transcriptômica do melanoma

Através do Entrez Gene e os dados do *GeneCards*, foram identificados 177 genes relacionados ao relógio biológico. O diagrama de Venn foi utilizado para mostrar

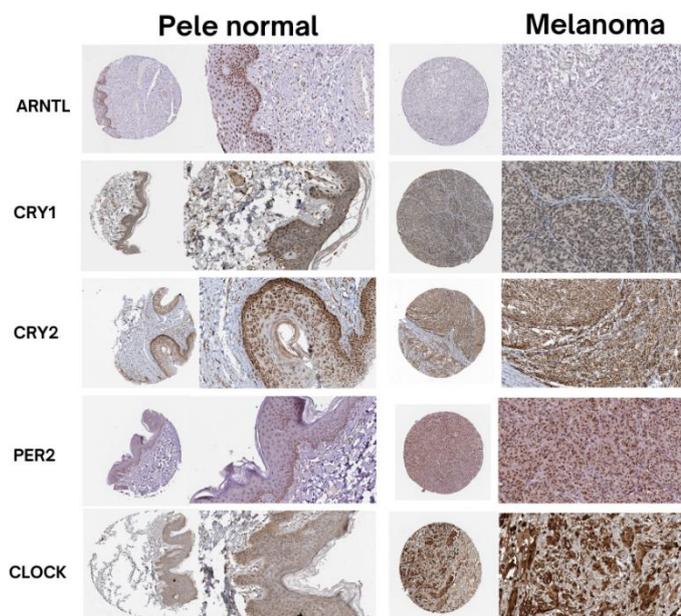
a sobreposição entre os DEGs identificados a partir do banco TCGA e os genes identificados no Entrez Gene e Gene Cards.

De acordo com os resultados das interseções entre os dados do TCGA e dos bancos Entrez Gene e Gene Cards foi possível identificar os genes PRKN, MYC, FOXO1, GADD45A, RXRA, CAVIN1, THPO, ID2, SMAD3, POMC, GNB3, TET2, HES7, THBD, RORB, CRY2, PER2, SERPINE1, VEGFA, CEBPA, OLFML3, CHI3L1, RASD1, TUFT1, ARNTL, NR1D1, NFIL3, MMP2, AQP3, SIK1, DEFB1, CYP2E1, THBS1, RORC, DLK1, NEAT1, PER1, STAR, ASS1, ADH4, RORA e FABP4 apresentando expressões inibidas no tecido com melanoma, enquanto HMG20A, NR1I3, TNF, RB1, NEFH, NOX4, FOXP3, DELEC1, CTNNB1, OIP5, TIMELESS, CDK5, NUF2, SOX2, BHLHE41, S100A8, IL1B, CDKN2A, MMP9 e CCL4 foram identificados apresentando regulação aumentada.

Em sSCC, os genes ARNTL, ERN1, RORA, DEFB1, GADD45A, PPP1CB e RCOR1 apresentaram alta expressão, enquanto os genes TIMELESS E CDK5 foram expressos negativamente. Observamos que vários genes comuns estão desregulados em ambos os tipos tumorais. AQP3, RORA, CYP2E1, PER2, DEFB1, CRY2, RASD1, PRKN, RORC e DLK1 foram os genes em comum que apresentaram expressão negativa, enquanto TIMELESS, IL1B, NOX4, OIP5, FOXP3, NUF2, NEFH, MMP9 e CDKN2A foram expressos positivamente.

A análise de sobrevida mostrou que a alta expressão dos genes AQP3, S100A8, PER2, DEFB1, CRY2, KAT2B, RORC, ADH4, TIMELESS, IL1B, NOX4, OIP5, FOXP3, NUF2, NEFH, MMP9 e CDKN2A está associada com baixa sobrevida em amostras de melanoma. Para observar a expressão proteica dos genes PER2, CRY1, CRY2, BMAL1 e CLOCK nas amostras de melanoma realizamos uma análise imuno-histoquímica através do *The Human Protein Atlas*. As proteínas CRY1 e BMAL1 apresentaram maior expressão nos tecidos normais enquanto que a expressão de PER2, CRY2 e proteínas CLOCK apresentaram maior expressão em amostras de câncer (Figura 2).

Figura 2- Expressão imunohistoquímica dos genes ARNTL, CRY1, CRY2, PER2 e CLOCK em amostras de tecido normal e com melanoma



Fonte: *The Human Protein Atlas*

6.4 Efeitos da melatonina no comportamento celular

Para relacionar o ritmo circadiano no melanoma, ensaios de proliferação, invasão, AO/EB e qRT-PCR foram realizados através da administração de melatonina em culturas celulares de melanoma (B16) e câncer de pele do tipo não melanoma (A431). O ensaio de proliferação sugeriu que a melatonina provoca um efeito antiproliferativo na linhagem celular B16, a melatonina também inibiu significativamente a migração das células dessa linhagem. A capacidade de invasão é uma característica importante das células neoplásicas metastáticas e um alvo para o desenvolvimento de agentes terapêuticos. O ensaio de morte celular realizado por brometo de etídio revelou que a melatonina aumentou significativamente o número de células apoptóticas quando comparado ao grupo controle. Entretanto, a linhagem celular A431 não apresentou diferenças significativas para os ensaios de proliferação, apoptose ou migração (Figura 3-7).

Figura 3- Ensaio de migração celular com linhagem de carcinoma de células escamosas de pele antes e após o tratamento com melatonina

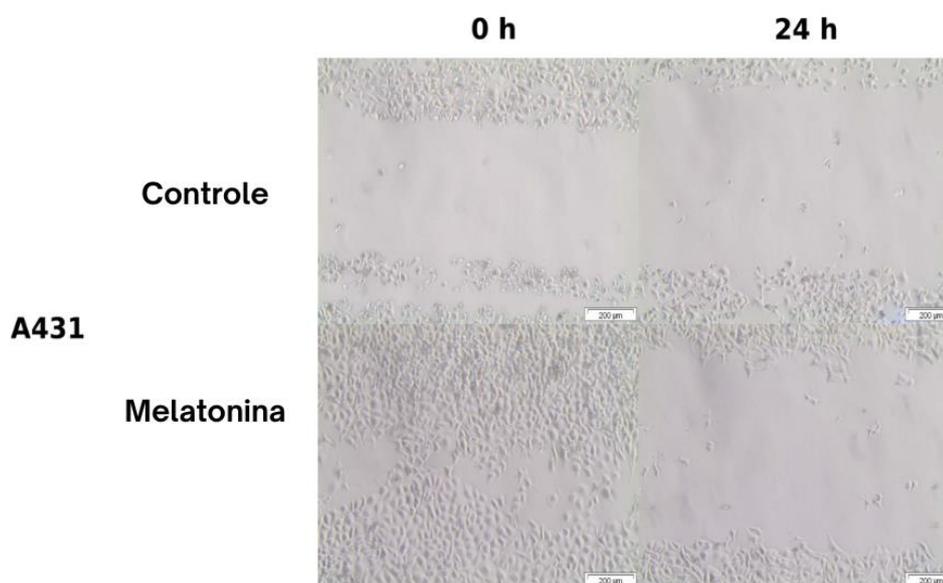


Figura 4- Ensaio de migração celular com linhagem celular de melanoma antes e após o tratamento com melatonina

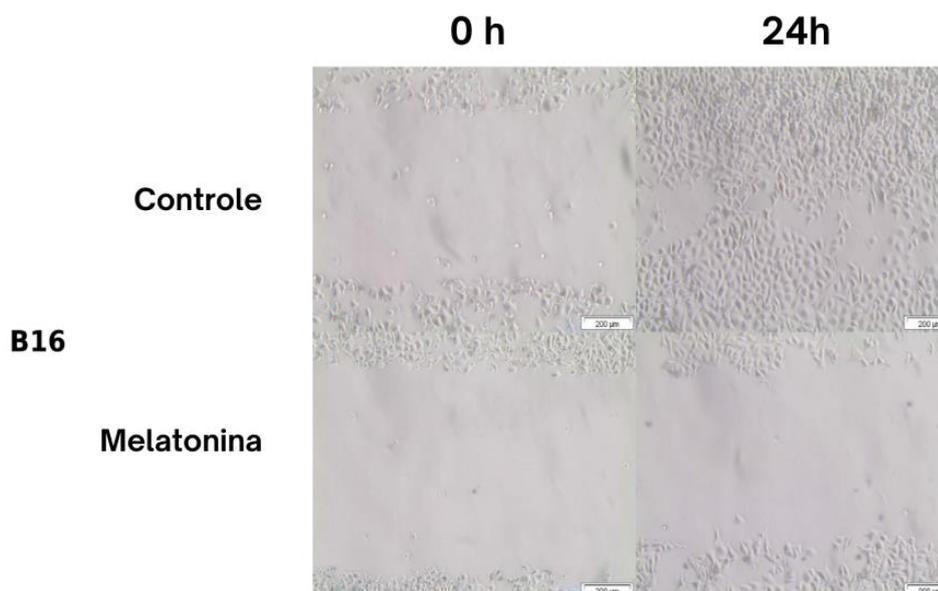


Figura 5- Índice de proliferação celular após o tratamento com melatonina para as linhagens celulares A431 e B16

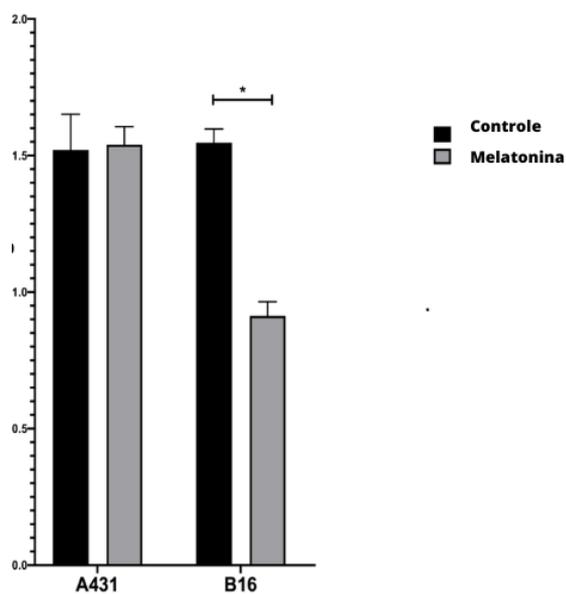


Figura 6- Ensaio de apoptose celular após o tratamento com melatonina nas linhagens celulares A431 e B16.

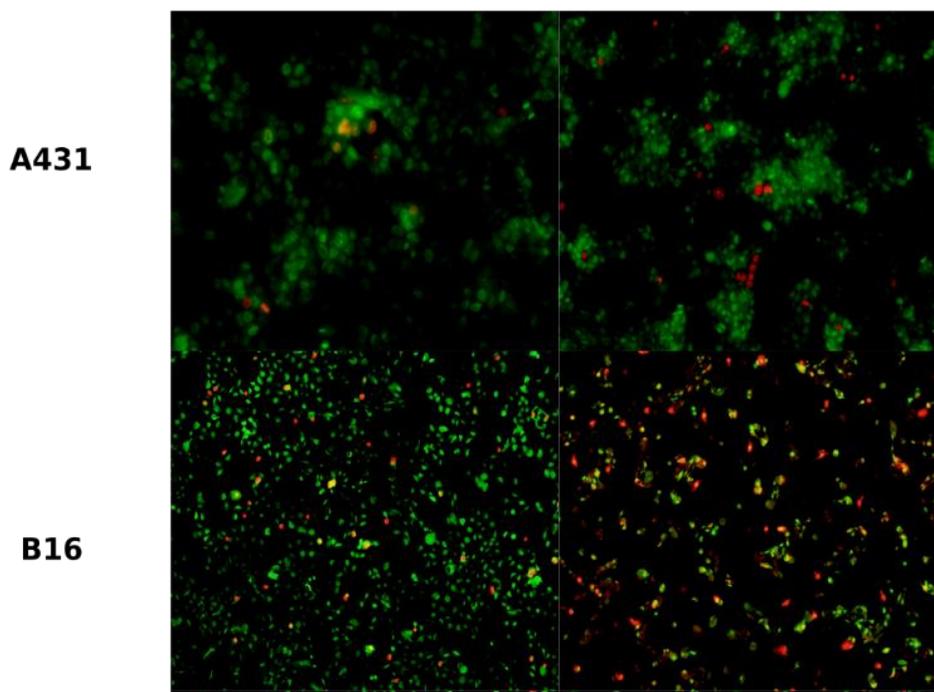
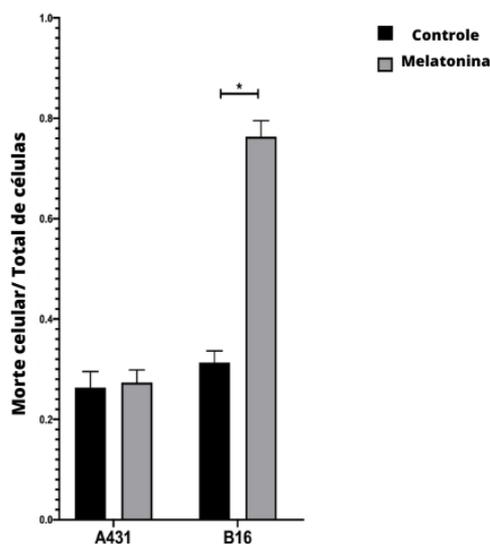


Figura 7- Índice de apoptose celular após o tratamento com melatonina nas linhagens celulares A431 e B16



6.5 Análises de expressão gênica após administração de melatonina

PCR quantitativo em tempo real foi utilizado para avaliar os níveis de expressão dos RNAm correspondentes aos genes ligados a proliferação (MKI67), migração e invasão (COL1A1, MMP9 e CDH1), apoptose (CASP3, BAX e BCL2) e genes relacionados ao relógio biológico (PER2, CRY1, CRY2 e CLOCK). Assim, observamos que a melatonina diminui os níveis de MKI67, HIF-1^a, VEGFA, COL1A1, MMP9, BCL2 e CLOCK (Figura 8-14).

Figura 8- Índice de expressão do gene MKI67 após o tratamento com melatonina nas linhagens celulares A431 e B16.

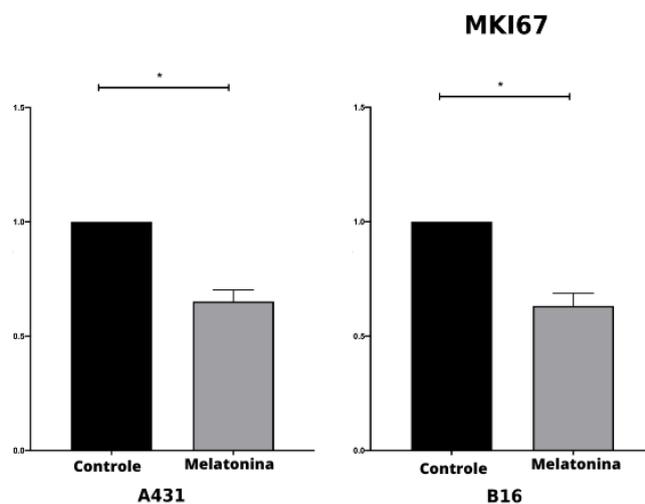


Figura 9- Índice de expressão do gene HIF-1A após o tratamento com melatonina nas linhagens celulares A431 e B16.

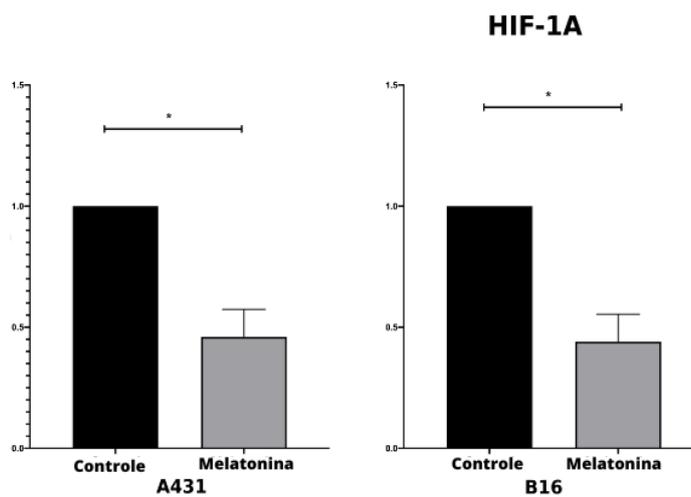


Figura 10- Índice de expressão do gene VEGFA após o tratamento com melatonina nas linhagens celulares A431 e B16.

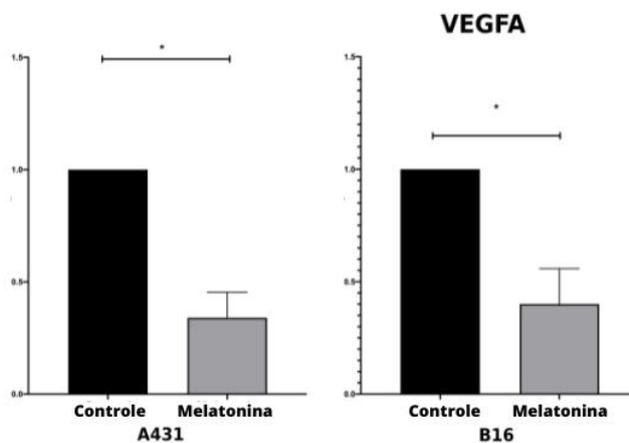


Figura 11- Índice de expressão do gene COL1A1 após o tratamento com melatonina nas linhagens celulares A431 e B16.

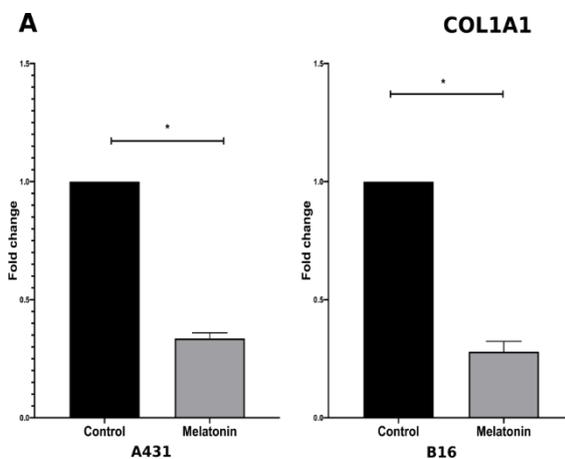


Figura 12- Índice de expressão do gene MMP9 após o tratamento com melatonina nas linhagens celulares A431 e B16.

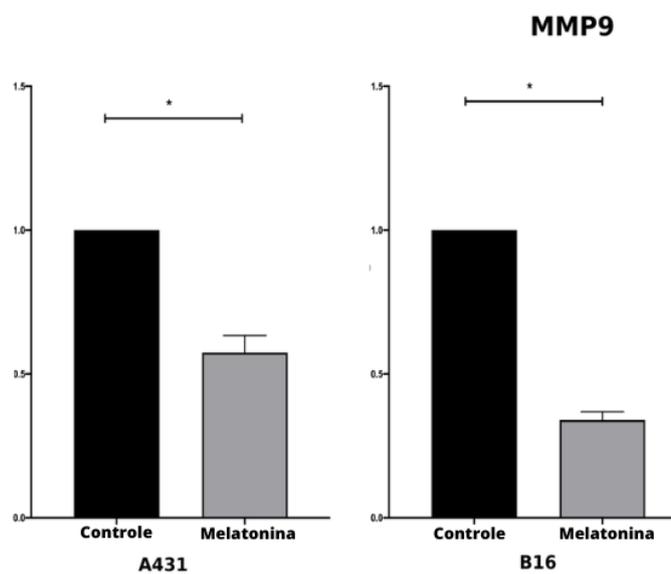


Figura 13- Índice de expressão do gene CLOCK após o tratamento com melatonina nas linhagens celulares A431 e B16.

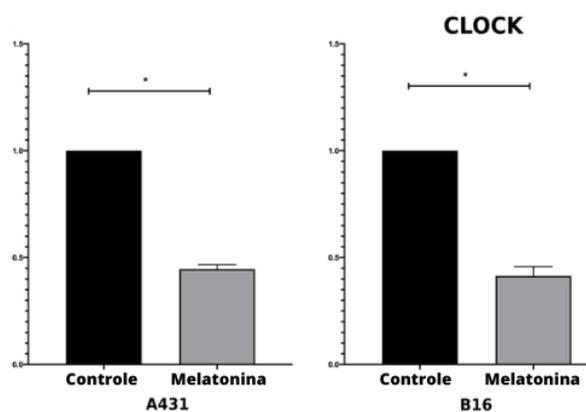
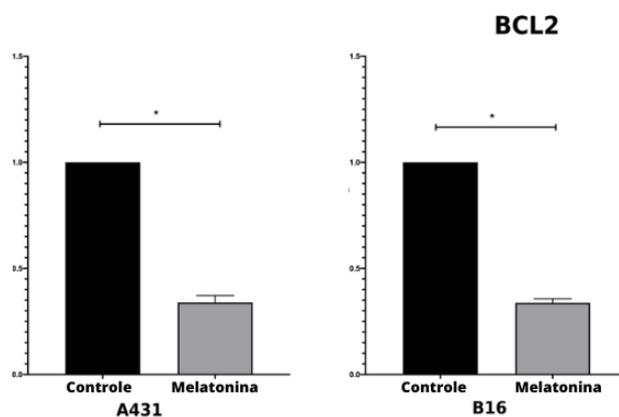


Figura 14- Índice de expressão do gene BCL2 após o tratamento com melatonina nas linhagens celulares A431 e B16.



Em contrapartida, o tratamento com melatonina aumentou os níveis de CDH1, CASP3, BAX, PER1, PER2, CRY1 e CRY2 na linhagem celular B16. As expressões gênicas nas linhagens de células A431 não mostraram diferença (Figura 15-21).

Figura 15- Índice de expressão do gene CDH1 após o tratamento com melatonina nas linhagens celulares A431 e B16.

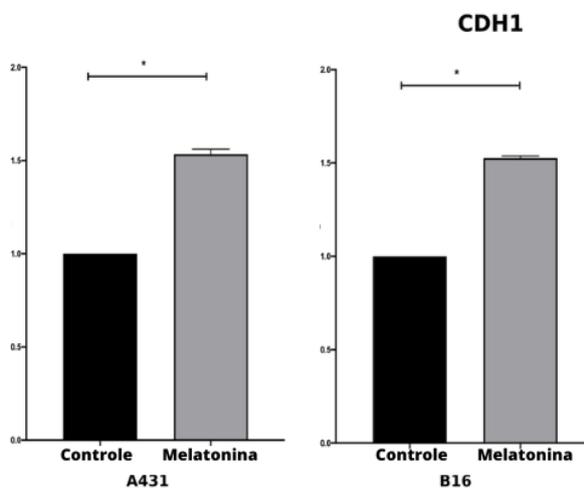


Figura 16- Índice de expressão do gene CASP3 após o tratamento com melatonina nas linhagens celulares A431 e B16.

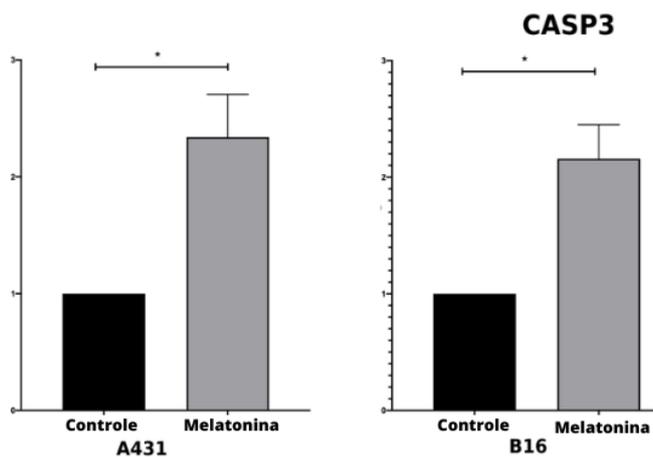


Figura 17- Índice de expressão do gene BAX após o tratamento com melatonina nas linhagens celulares A431 e B16.

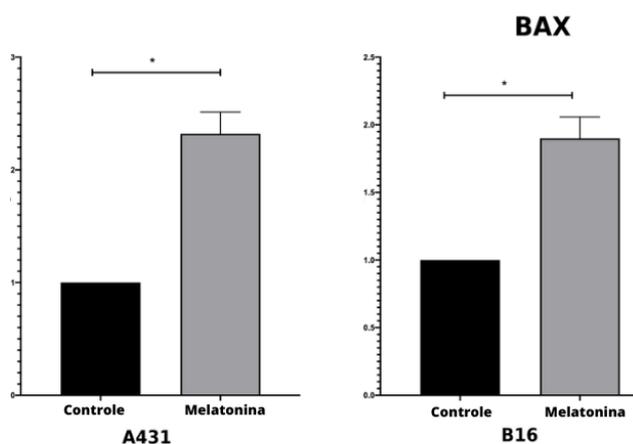


Figura 18- Índice de expressão do gene PER2 após o tratamento com melatonina nas linhagens celulares A431 e B16.

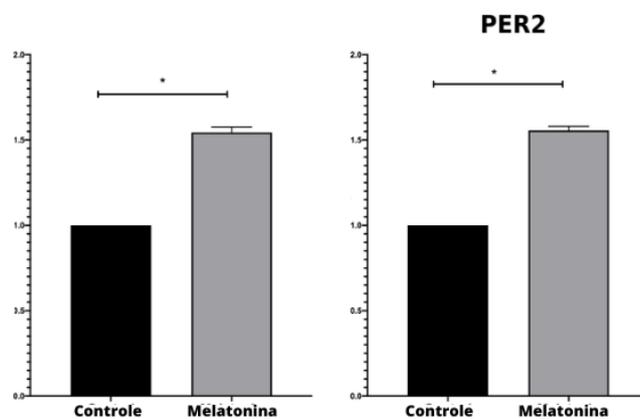


Figura 19-Índice de expressão do gene PER1 após o tratamento com melatonina nas linhagens celulares A431 e B16.

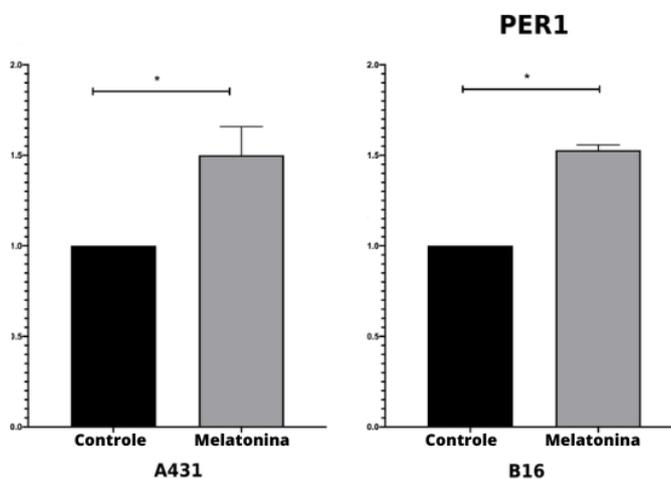


Figura 20-Índice de expressão do gene CRY1 após o tratamento com melatonina nas linhagens celulares A431 e B16.

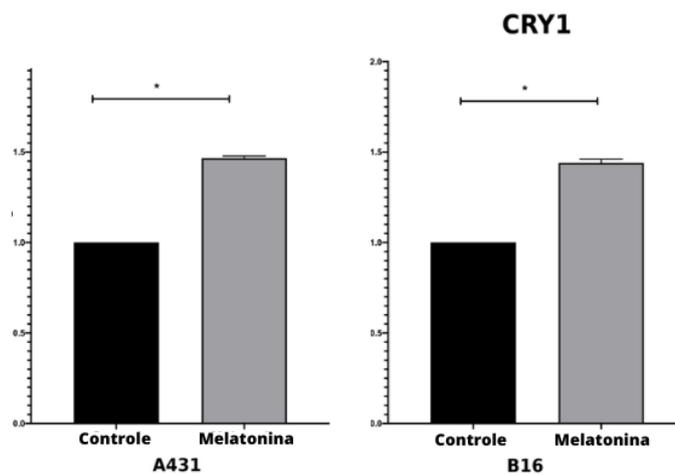
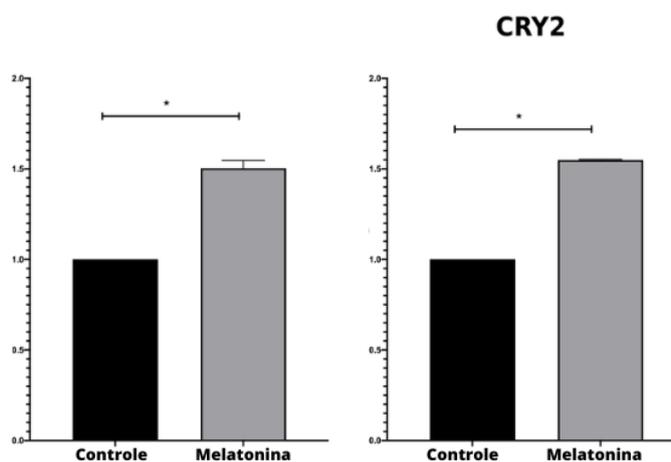


Figura 21- Índice de expressão do gene CRY2 após o tratamento com melatonina nas linhagens celulares A431 e B16.



7. DISCUSSÃO

As alterações na expressão dos genes do ritmo circadiano estão associadas a diversas doenças, entre elas o processo neoplásico, uma vez que os mecanismos de atuação dos relógios biológicos promovem e regulam eventos de importância molecular e celular. Alguns dos principais genes relacionados com a regulação do ciclo celular, como MYC, TP53, CICLINA D1 e WEE1 já foram descritos associados à desregulação do relógio biológico (TAN *et al.*, 2015; FU *et al.*, 2002).

Esse evento de modificação rítmica da expressão dos genes do relógio biológico em processos neoplásicos foi observado em pesquisas que utilizaram modelos animais, a expressão dos genes PER1, PER2, REV-ERBA, além dos genes BMAL1 e CRY1 foram encontrados alterados. Segundo Lee e seus colaboradores (2010), esses eventos de alterações rítmicas nas expressões dos genes do relógio biológico podem acelerar o desenvolvimento de tumores, por atuarem principalmente em processos chave do comportamento celular, como o aumento no crescimento das células e diminuição nas vias de sinalização apoptóticas, esses dados foram encontrados em animais expostos a ciclos com fotoperíodos alternados (claro/escuro – 14:10h ou 10:14h) em relação aos animais que permaneceram sob ciclos constantes de 12:12 horas (LEE *et al.*, 2010) □

Pereira *et al.*, (2019), demonstraram através de análises de bioinformática uma forte associação entre o ritmo circadiano, cânceres e diabetes tipo 2, mostrando a ampla atuação do relógio biológico no controle dessas doenças e suas correlações, sugerindo principalmente que o distúrbio do sono poderia promover o desenvolvimento de diabetes tipo 2 e conseqüentemente o câncer □ Além disso, atualmente existem evidências sugerindo que as desregulações dos genes do ritmo circadiano promovem instabilidade gênica, resultando no aumento de variantes genéticas em um tumor, o que contribui para um fenótipo maligno e comportamento agressivo, como maior propensão para metástase, angiogênese e escape da apoptose (FORRESTER *et al.*, 1990; KARAGANIS *et al.*, 2008; DUFFIELD *et al.*, 2003 DE CARVALHO FRAGA *et al.*, 2014).

O objetivo do presente estudo foi identificar uma possível relação entre a desregulação do ritmo circadiano o melanoma e marcadores relacionados às células de Schwann, uma vez que, em estudos anteriores, Rocha e seus colaboradores

(2022), localizaram associações importantes entre esses dois eventos na progressão metastática no carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço, principalmente através da reprogramação das células de Schwann que promovem a invasão perineural. Entretanto, não foi possível identificar fatores que associam a reprogramação das células de Schwann e invasão perineural relacionados ao ritmo circadiano no melanoma.

Assim, foram realizadas várias outras análises com dados de bioinformática e *in vitro* para determinar os mecanismos moleculares que auxiliam a progressão do melanoma através de uma desregulação no ritmo circadiano. Primeiramente, foram coletados dados dos DEGs regulados negativamente e positivamente na base de dados TCGA e GEO datasets, em seguida, esses dados passaram por análises de enriquecimento e de vias de sinalização. O segundo passo do estudo foi confirmar os dados obtidos nas análises de bioinformática com análises de bancada.

A partir dos resultados observados neste estudo, foi observado que os genes do relógio biológico se encontram desregulados tanto nas linhagens celulares de cSCC como nas linhagens SKCM, esse fato está relacionado com baixa sobrevida e quimiorresistência. Como citado anteriormente, com o intuito de confirmar a análise de bioinformática, foram realizados ensaios de cultura celular, no qual células de linhagem de melanoma foram tratadas com melatonina.

A administração da melatonina aumentou a expressão dos genes PER2, CRY1, CRY2, paralelamente, os níveis de BMAL1 e do gene CLOCK foram reduzidos. Muitos genes ligados diretamente ao relógio biológico são considerados supressores tumorais, uma vez que podem controlar a proliferação das células e morte celular. As desregulações de genes ligados diretamente ao relógio biológico constituem um dos primeiros eventos a serem alterados no processo neoplásico e a desregulação do gene CLOCK nesse processo é uma das mais estudadas, uma vez que esse gene pode controlar a progressão do câncer e pode influenciar na progressão e no desfecho dessa doença (RANA *et al.*, 2014; NIRVANI *et al.*, 2018; RANA *et al.*, 2010).

A melatonina é um hormônio do sistema de temporização circadiana, sintetizada pela glândula pineal (AULINAS *et al.*, 2019). Com alta capacidade de inibir o crescimento tumoral, esse hormônio atua diretamente bloqueando a formação de novos vasos sanguíneos, fenômeno conhecido como angiogênese (ZHU *et al.*, 2012; GURUNATHAN *et al.*, 2019).

Estudos recentes demonstraram que a melatonina pode suprimir o crescimento de alguns tipos de células neoplásicas, especialmente quando combinada com o uso de outras drogas utilizadas no tratamento do câncer (LU *et al.*, 2016; REITER *et al.*, 2004; LI *et al.*, 2017; LEON-BLANCO *et al.*, 2003). No presente estudo, foi observado que a melatonina inibiu a proliferação, migração, invasão das células do melanoma, além de induzir a apoptose. Esses resultados, corroboram com dados publicados anteriormente, que mostram a atuação da melatonina como crucial na inibição de processos celulares de importância para as células neoplásicas. (REITER *et al.*, 2004; LEON-BLANCO *et al.*, 2003; TAROCCO *et al.*, 2019).

A capacidade de migração celular é uma importante característica das células neoplásicas, seu papel crítico na progressão do tumor é associado diretamente com o processo metastático. Visando observar o comportamento das células do melanoma tratadas com a melatonina, um ensaio de migração celular foi realizado e após 24 horas de tratamento com esse hormônio, foi observado uma diminuição no processo migratório das células do melanoma. Esses dados foram confirmados por qPCR, mostrando que a expressão dos genes COL1A1 e MMP9 diminuem e ocorre um aumento da expressão do gene CDH1. No entanto, a análise de migração celular para carcinoma de pele do tipo não melanoma não mostrou diferença significativa, pressupondo que esse tipo de carcinoma não sofre influência da melatonina. A melatonina também está associada à promoção da apoptose por estimular o aumento das principais moléculas intracelulares envolvidas no processo apoptótico como a CASP3 (GUIMARAES *et al.*, 2016) □ No presente estudo, a melatonina induziu os níveis de expressão de CASP3 em amostras de melanoma.

Os níveis de expressão de fatores angiogênicos refletem a agressividade das células tumorais. Este processo é regulado por genes como HIF-1A e VEGFA. O presente estudo mostrou que a melatonina diminuiu a expressão de HIF-1A e VEGFA, confirmando dados anteriores que demonstram que melatonina pode participar dos processos de bloqueio de fatores angiogênicos. Dessa maneira, nossos resultados estão de acordo com a literatura, que atribui a melatonina funções na diminuição dos processos angiogênicos, migratórios, invasivos e apoptóticos (CHEN *et al.*, 2021; LI *et al.*, 2017; BASTANI *et al.*, 2021) □

A angiogênese é um requisito essencial para a progressão do tumor e metástase, é através desse processo que as células neoplásicas conseguem os

nutrientes necessários para dar suporte às colônias tumorais (AGUILAR-CAZARES *et al.*,2019). A redução dos principais fatores associados ao processo angiogênico pode ser explicada pela associação entre a melatonina e a diminuição das MAP quinases ERK1 e ERK2 ativadas por fosforilação (OGATA *et al.*,2004) □A melatonina reduz a fosforilação e conseqüentemente a ativação da MAP, além disso, a melatonina reduz significativamente as atividades no promotor de VEGF, assim ocorre uma diminuição da expressão de VEGF a nível proteico e transcricional (LU *et al.*, 2016; CHEN *et al.*, 2021; BASTINI *et al.*, 2021).

A partir dos dados levantados neste trabalho, observa-se que as mudanças na expressão dos genes do relógio biológico podem ser responsáveis por alterações moleculares, o que leva a uma agressividade do câncer. A administração de melatonina mostrou alterações importantes no comportamento nas células do câncer do tipo melanoma, através de modulações importantes nos genes ligados a apoptose, angiogênese e migração celular.

8. CONCLUSÃO

Recebendo influência direta dos genes do ritmo circadiano, o câncer é uma doença que viola as principais regras do comportamento celular, suas características de agressividade são um reflexo de diversas mutações que as células acumulam com o tempo, o objetivo central das células neoplásicas é crescer e se multiplicar desordenadamente visando invadir e colonizar locais distantes do seu sítio primário, esse evento é conhecido por metástase. A agressividade do melanoma é relacionada fundamentalmente com o rápido desenvolvimento para os eventos metastáticos.

A partir dos dados aqui apresentados, podemos concluir que a melatonina foi capaz de ativar vias de morte celular, reduzir a proliferação, migração e processos angiogênicos no melanoma. Entretanto, não foram identificados dados que conseguissem associar o ritmo circadiano e a desdiferenciação das células de Schwann/invasão perineural nos processos de progressão do melanoma. Ainda assim, conseguimos identificar a presença da inibição dos genes do ritmo circadiano no melanoma. Observamos também que as vias moleculares mais ativas nesse tipo tumoral são vias ligadas a diabetes *mellitus* tipo I, vias de interação citocina-citocina e doença autoimune da tireoide.

As análises de expressão diferencial indicaram que em tecidos com melanoma, os genes PRKN, MYC, FOXO1, GADD45A, RXRA, CAVIN1, THPO, ID2, SMAD3, POMC, GNB3, TET2, HES7, THBD, RORB, CRY2, PER2, SERPINE1, CEBPA, OLFML3, CHI3L1, RASD1, TUFT1, ARNTL, NR1D1, NFIL3, AQP3, SIK1, DEFB1, CYP2E1, THBS1, RORC, DLK1, NEAT1, PER1, STAR, ASS1, ADH4, RORA e FABP4 apresentariam expressão diminuída, enquanto que os genes HMG20A, NR1I3, TNF, RB1, NEFH, NOX4, FOXP3, DELEC1, CTNNB1, OIP5, TIMELESS, CDK5, NUF2, SOX2, BHLHE41, S100A8, IL1B, CDKN2A, MMP9 e CCL4 estariam com expressão aumentada.

Ao realizar a análise de sobrevida foi observado que a alta expressão dos genes AQP3, S100A8, PER2, DEFB1, CRY2, KAT2B, RORC, ADH4, TIMELESS, IL1B, NOX4, OIP5, FOXP3, NUF2, NEFH, MMP9 e CDKN2A estariam ligados com baixa sobrevida em amostras de melanoma e provavelmente um pior prognóstico.

Embora com o avanço das pesquisas no campo oncológico, a sobrevida de pacientes com melanoma metastático permanece inalterada, acentuando a urgência em mais estudos que identifiquem marcadores moleculares a serem utilizados pela pesquisa terapêutica. A administração de melatonina mostrou ser capaz de induzir alterações comportamentais nas células do melanoma, conseguindo diminuir a invasividade, diminuir processos ligados a angiogênese, aumentar a apoptose, e influenciar as expressões dos genes MKI67, HIF-1A, VEGFA, COL1A1, CDH1, CASP3, BAX, BCL2, MMP9, PER2, CRY1, CRY2 e CLOCK. Nossos dados estimulam as pesquisas área experimental e clínica visando a validação da melatonina no tratamento de indivíduos com essa condição.

9. REFERENCIAS

AGUILAR-CAZARES, Dolores et al. Contribution of angiogenesis to inflammation and cancer. **Frontiers in oncology**, v. 9, p. 1399, 2019.

ALBUQUERQUE, Tânia Cristina de Oliveira. **Regulação dos genes circadianos Per1 e Per2 pelo estradiol em células epiteliais do Plexo Coróide**. 2014. Tese de Doutorado.

AMARAL, Fernanda Gaspar do; CIPOLLA-NETO, José. A brief review about melatonin, a pineal hormone. **Archives of endocrinology and metabolism**, v. 62, p. 472-479, 2018.

AULINAS, Anna. Physiology of the pineal gland and melatonin. **Endotext [Internet]**, 2019.

BALCH, Charles M. et al. Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. **Journal of clinical oncology**, v. 27, n. 36, p. 6199, 2009.

BASTANI, Sepideh et al. Melatonin as a therapeutic agent for the inhibition of hypoxia-induced tumor progression: a description of possible mechanisms involved. **International journal of molecular sciences**, v. 22, n. 19, p. 10874, 2021.

CARPENTIERI, A.; DÍAZ DE BARBOZA, G.; ARECO, V.; PERALTA LÓPEZ, M.; TOLOSA DE TALAMONI, N. New perspectives in melatonin uses. *Pharmacol Res.* 65(4): 437-44, 2012.

CARRILLO-VICO, A.; CALVO, J.R.; ABREU, P.; LARDONE, P.J.; GARCÍAMAURIÑO, S.; REITER, R.J.; GUERRERO, J.M. Evidence of melatonin synthesis by human lymphocytes and its physiological significance: possible role as intracrine, autocrine, and/or paracrine substance. *FASEB J.* 18(3):537-9, 2004.

CHEN, Kunlun et al. Melatonin inhibits proliferation, migration, and invasion by inducing ROS-mediated apoptosis via suppression of the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in gallbladder cancer cells. **Aging (Albany NY)**, v. 13, n. 18, p. 22502, 2021.

CUST, A. E. et al. A risk prediction model for the development of subsequent primary melanoma in a population-based cohort. **British Journal of Dermatology**, v. 182, n. 5, p. 1148-1157, 2020.

CUST, Anne E. et al. Associations of pigmentary and naevus phenotype with melanoma risk in two populations with comparable ancestry but contrasting levels of ambient sun exposure. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 33, n. 10, p. 1874-1885, 2019.

DE ARAGÃO BEZZERA, Diego et al. **Oncologia. Atualização para graduação**. Booknando Livros LTDA, 2019.

DE CARVALHO FRAGA, Carlos Alberto et al. Increased VEGFR2 and MMP9 protein levels are associated with epithelial dysplasia grading. **Pathology-Research and Practice**, v. 210, n. 12, p. 959-964, 2014.

DIBNER, Charna; SCHIBLER, Ueli; ALBRECHT, Urs. The mammalian circadian timing system: organization and coordination of central and peripheral clocks. **Annual review of physiology**, v. 72, p. 517-549, 2010.

DRAGER, Luciano F.; KRIEGER, Eduardo M. Mecanismos de controle da pressão arterial no sono. **Rev. bras. hipertens**, v. 16, p. 169-173, 2009.

DUFFIELD, G. E. DNA microarray analyses of circadian timing: the genomic basis of biological time. **Journal of neuroendocrinology**, v. 15, n. 10, p. 991-1002, 2003.

EGGERMONT, Alexander MM; ROBERT, Caroline. New drugs in melanoma: it's a whole new world. *European Journal of Cancer*, v. 47, n. 14, p. 2150-2157, 2011.

ELWOOD, J. Mark; JOPSON, Janet. Melanoma and sun exposure: an overview of published studies. *International journal of cancer*, v. 73, n. 2, p. 198-203, 1997

FISHBEIN, Anna B. et al. Circadian disruption and human health. **The Journal of clinical investigation**, v. 131, n. 19, 2021.

FORRESTER, William C. et al. A deletion of the human beta-globin locus activation region causes a major alteration in chromatin structure and replication across the entire beta-globin locus. **Genes & development**, v. 4, n. 10, p. 1637-1649, 1990.

FU, Loning et al. The circadian gene *Period2* plays an important role in tumor suppression and DNA damage response in vivo. **cell**, v. 111, n. 1, p. 41-50, 2002.

GARBE, Claus et al. Systematic review of medical treatment in melanoma: current status and future prospects. **The oncologist**, v. 16, n. 1, p. 5-24, 2011.

GOLOMBEK, Diego A.; ROSENSTEIN, Ruth E. Physiology of circadian entrainment. **Physiological reviews**, v. 90, n. 3, p. 1063-1102, 2010.

GOMES, Joana et al. Melanoma maligno associado a nevo melanocítico. **Journal of the Portuguese Society of Dermatology and Venereology**, v. 69, n. 3, p. 413-413, 2011.

GUIMARAES, Talita A. et al. Evaluation of the antineoplastic activity of gallic acid in oral squamous cell carcinoma under hypoxic conditions. **Anti-cancer drugs**, v. 27, n. 5, p. 407-416, 2016.

GUIMARÃES, Tatiana Grolla. NEVUS MELANOCÍTICO CONGÊNITO GIGANTE: A IMPORTÂNCIA DO DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO. **Repositório de Trabalhos de Conclusão de Curso**, 2020.

GURUNATHAN, Sangiliyandi et al. Role and therapeutic potential of melatonin in various type of cancers. **OncoTargets and therapy**, v. 14, p. 2019, 2021.

- HUANG, Congfa et al. Association of increased ligand cyclophilin A and receptor CD147 with hypoxia, angiogenesis, metastasis and prognosis of tongue squamous cell carcinoma. **Histopathology**, v. 60, n. 5, p. 793-803, 2012.
- HUANG, Wenyu et al. Circadian rhythms, sleep, and metabolism. **The Journal of clinical investigation**, v. 121, n. 6, p. 2133-2141, 2011.
- KANG, Fei-Wu et al. Hypoxia-inducible factor-1 α overexpression indicates poor clinical outcomes in tongue squamous cell carcinoma. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 5, n. 1, p. 112-118, 2013.
- KARAGANIS, Stephen P. et al. Circadian genomics of the chick pineal gland in vitro. **BMC genomics**, v. 9, n. 1, p. 1-17, 2008.
- LEON-BLANCO, Mercedes M. et al. Melatonin inhibits telomerase activity in the MCF-7 tumor cell line both in vivo and in vitro. **Journal of pineal research**, v. 35, n. 3, p. 204-211, 2003.
- LI, Ya et al. Melatonin for the prevention and treatment of cancer. **Oncotarget**, v. 8, n. 24, p. 39896, 2017.
- LU, Jian-Jun et al. Melatonin inhibits AP-2 β /hTERT, NF- κ B/COX-2 and Akt/ERK and activates caspase/Cyto C signaling to enhance the antitumor activity of berberine in lung cancer cells. **Oncotarget**, v. 7, n. 3, p. 2985, 2016.
- MEDIAVILLA, M. D.; COS, S.; SANCHEZ-BARCELO, E. J. Melatonin increases p53 and p21WAF1 expression in MCF-7 human breast cancer cells in vitro. **Life sciences**, v. 65, n. 4, p. 415-420, 1999.
- MINEGISHI, Saika et al. Circadian clock disruption by selective removal of endogenous carbon monoxide. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 1-12, 2018.
- NETO, Júlio Anselmo Sousa; CASTRO, Bruno Freire de. Melatonina, ritmos biológicos e sono: uma revisão da literatura. **Rev Bras Neurol**, v. 44, n. 1, p. 5-11, 2008.
- NIRVANI, Minou et al. Circadian clock and oral cancer. **Molecular and clinical oncology**, v. 8, n. 2, p. 219-226, 2018.
- NISHIDA, Naoyo et al. Angiogenesis in cancer. **Vascular health and risk management**, v. 2, n. 3, p. 213, 2006.
- OGATA, Toru et al. Opposing extracellular signal-regulated kinase and Akt pathways control Schwann cell myelination. **Journal of Neuroscience**, v. 24, n. 30, p. 6724-6732, 2004.
- PRALEA, Ioana-Ecaterina et al. From extraction to advanced analytical methods: The challenges of melanin analysis. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 16, p. 3943, 2019.

RANA, Sobia et al. Deregulated expression of circadian clock and clock-controlled cell cycle genes in chronic lymphocytic leukemia. **Molecular biology reports**, v. 41, n. 1, p. 95-103, 2014.

RANA, Sobia; MAHMOOD, Saqib. Circadian rhythm and its role in malignancy. **Journal of circadian rhythms**, v. 8, n. 1, p. 1-13, 2010.

REITER, Russel J. Mechanisms of cancer inhibition by melatonin. **Journal of pineal research**, v. 37, n. 3, p. 213-214, 2004.

ROCHA, Rodger Marcel Lima et al. Invasão perineural no carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço: Impacto de genes relacionados ao ritmo circadiano. 2022.

TALIB, Wamidh H. Melatonin and cancer hallmarks. **Molecules**, v. 23, n. 3, p. 518, 2018.

TAN, Xue-Mei et al. Circadian variations of clock gene Per2 and cell cycle genes in different stages of carcinogenesis in golden hamster buccal mucosa. **Scientific reports**, v. 5, n. 1, p. 1-7, 2015.

TAROCCO, Anna et al. Melatonin as a master regulator of cell death and inflammation: molecular mechanisms and clinical implications for newborn care. **Cell death & disease**, v. 10, n. 4, p. 1-12, 2019.

YANG, Min-Wei et al. Perineural Invasion Reprograms the Immune Microenvironment through Cholinergic Signaling in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Perineural Invasion Promotes Immune Suppression in PDAC. **Cancer research**, v. 80, n. 10, p. 1991-2003, 2020.

ZHU, Lirong; ZEE, Phyllis C. Circadian rhythm sleep disorders. **Neurologic clinics**, v. 30, n. 4, p. 1167-1191, 2012.

10. PRODUTOS

10.1 Patente



05/11/2021 870210102201
15:24

29409161942437322

Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2021 022257 3

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 24464109000148

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Av. Lourival Melo Mota, s/n, Tabuleiro do Martins

Cidade: Maceió

Estado: AL

CEP: 57072-970

País: Brasil

Telefone: 82-3214-1064

Fax: 82-3214-1035

Email: nit@propep.ufal.br

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): Painel genético para diagnóstico e prognóstico do melanoma

Resumo: Painel genético caracterizado pela detecção em pacientes com melanoma no que diz respeito a predição da melanoma utilizando os biomarcadores selecionados a partir do grupo que consiste ITGAL, TYROBP, ANAPC4, JAK2, BTK, TNFRSF1B, FGR, SCT, BLNK, CASP8, TBX21, DAPP1, FOXP3, CYLD, PSME1, NFKB2, CDC6, CS, RNF19A, SP100, OAS1, PSMD8, UBE2D1, BCAR1 e ADRB1. Os genes FAM171A1, RARRES2 e PAM através do método da reivindicação 1. Painel genético para diagnóstico e prognóstico da melanoma baseado na expressão dos genes ITGAL, TYROBP, ANAPC4, JAK2, BTK, TNFRSF1B, FGR, SCT, BLNK, CASP8, TBX21, DAPP1, FOXP3, CYLD, PSME1, NFKB2, CDC6, CS, RNF19A, SP100, OAS1, PSMD8, UBE2D1, BCAR1 e ADRB1. Os genes FAM171A1, RARRES2 e PAM 1. A presente invenção descreve um painel de marcadores genéticos que possuem potencial de diagnóstico e prognóstico, estratificando os resultados da agressividade e sobrevida dos pacientes afetados com melanoma.

Figura a publicar: 6

10.2 Artigo

Clock-related genes disruption and melatonin administration are associated with melanoma and oral cancer, but not with skin carcinoma

Abstract

Melatonin plays an important role in the regulation of circadian clock genes, whose deregulation contribute to cancer development. In this study, we first performed a bioinformatic analysis for melanoma, non-melanoma skin cancer and oral squamous cell carcinoma in order to evaluate what clock-related genes are deregulated when compared to normal tissue. Further, we administrated melatonin in cell cultures for cutaneous squamous cell carcinoma, skin melanoma and oral squamous cell carcinoma to observe changes in cancer cell phenotypes. Later, we evaluated gene expressions associated to clock genes, cancer cell proliferation, migration, invasion and apoptosis. In summary, clock-related genes are deregulated in both cancers. Skin melanoma and oral cancer presented common deregulated clock related-genes and associated with poor survival and chemioresistence, according to bioinformatic analysis. In cell culture, melatonin administration increased *Per2*, *Cry1*, *Cry2* and *Bmal1* mRNA expression levels and decreases *Clock* gene mRNA levels. *Per2*, *Cry1*, *Cry2* and *Bmal1* genes belong to tumor suppressor genes that can control cell proliferation, cell death, DNA damage and repair system. Te hypothesized that changes in the expression of clock related-genes in cancer could be responsible for metabolic changes that could lead to the cancer aggressiveness. Melatonin administration showed changes in melanoma and oral cancer phenotypes. Melatonin also seems to influence melanoma and oral tumor progression through *Mki67*, *Hif-1a*, *Vegfa*, *Colla1*, *Cdh1*, *Casp3*, *Bax*, *Bcl2*, *Mmp9*, *Per2*, *Cry1*, *Cry2*, *Bmal1* and *Clock* modulation.

Keywords: cancer, metastasis, angiogenesis, apoptosis, melatonin-mediated

Introduction

Cancer has been considered a chronopathology since the 1970's [1], mainly linked to a series of changes in the activity of cell cycle regulators. Circadian rhythm disruption plays a key role in tumorigenesis by different mechanisms. The circadian clock genes drives the rhythms of many cellular processes, including cell cycle [2–7], metabolism [8], DNA damage repair [5,9], autophagy [10,11], and others physiological mechanisms whose function contribute to cancer development. The circadian timing system involves central and peripheral oscillators that cycle independently, as the auto regulatory loop of circadian clock genes transcription and translation [12], which are all synchronized by signals such as melatonin presence [13–15].

Melatonin is a neurohormone secreted by the pineal gland during the dark phase of the day, justifying the title “dark hormone”. The wide spectrum of melatonin's actions have been reported in some reviews [16–19] that list a series of melatonin anti-cancer effects in different cancer types. These effects rely on its antioxidant [19–21], immunostimulating [17], and apoptotic [22–24] properties preventing tumor initiation, promotion, and progression, mainly in hormonal-dependent cancers. However, even in oral cancer, melatonin has been shown promising results in a dose- and time-dependent manner. At pharmacological concentrations, melatonin exerts anti-angiogenic and anti-survival effects [25,26], proliferation suppression [27], cell viability [28], aside from reduce the drug resistance [29]. On the other hand, invasion and metastasis cases derived from oral cancer patients are more frequent in individuals who presented lower levels of serum melatonin, reinforcing our hypothesis. It is also observed in pinealectomized rats, that displayed higher volume and thickness tumors than controls [30].

Based on the related reports related to melatonin effects on cancer, we first performed a bioinformatic analysis for melanoma, non-melanoma skin cancer and oral squamous cell carcinoma in order to evaluate what clock-related genes are deregulated when compared to normal tissue. Further, we administrated melatonin in cell cultures for cutaneous squamous cell carcinoma (cSCC), skin melanoma and oral squamous cell carcinoma to observe changes in cancer cell phenotypes. Later, we evaluated gene expressions associated to clock genes, cancer cell proliferation, migration, invasion and apoptosis.

Methods

Differentially expressed gene analysis

RNA-seq and clinical information data from Geodataset and The Cancer Genome Atlas (TCGA) were performed as previously described [31–33]. Basically, we used TCGAblinks and the TCGAblinksGUI R package to compare differentially expressed genes (DEGs) in normal and melanoma (SKCM) and oral squamous cell carcinoma (OSCC). Normal samples were obtained from The Genotype-Tissue Expression (GTEx) project. An adj. $P < 0.05$ and a $\log_{2}FC \geq 1$ were set as the cut-off criteria. The Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) analyses were available at the DAVID database (<https://david.ncifcrf.gov/>) [34]. A p -value < 0.05 was set as the cut-off criterion. Kaplan–Meier plots were drawn to explore the association between clinical outcome and gene expression, and to visualize survival differences (<http://bioinformatica.mty.itesm.mx:8080/Biomatec/SurvivaX.jsp>). Immunohistochemistry protein data for normal and cancer samples were performed with the Human Protein Atlas (<https://www.proteinatlas.org/>) [35–37]. We performed Geo2R analysis using total RNAs from normal human epidermal keratinocytes and cSCC cell lines were extracted (GSE66359) [38].

Gene list collection

We used Entrez Gene from NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/) and GeneCards (<https://www.genecards.org/>), which were used as the identifiers for the renin-angiotensin system-related genes. The gene list and co-expressed upregulated and downregulated DEGs of the gene expression profiles were combined and identified with a Venn Diagram 2.1.0 (<http://bioinfo.gp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>).

In vitro experimentation: cell culture

Immortalized cell lines of A431 (human skin squamous cell carcinoma), B16 (murine melanoma cell) and SCC-9 (squamous cell carcinoma of the tongue), commercially acquired (ATCC, USA) were used. These were stored in an ultra freezer at -80°C and cryopreserved in a specific solution. To obtain synchronized cultures of A431, B16 and SCC9 cells (1×10^5), cells were seeded in a 12-well plate and synchronized for 24 hours by serum starvation and released with media containing 2% FBS. A431, B16 and SCC9 cells were cultured in media with the addition to 0.25 ng/mL melatonin. All treatments were performed in the absence of FBS. The resultant solutions were kept at 4°C and used within 24 hours for the assay. All culture experiments were performed in triplicate.

Cell viability assay

A431, B16 and SCC9 cells were seeded in a 96-well plate at a density of 1×10^4 cells/well, cultured for 12 h under 37°C in 5% CO_2 , then treated with different concentration of Melatonin for 24 h. At the end of the treatment, MTT, $50\mu\text{g}/10\mu\text{L}$, was added and the cells were incubated for another 4 hours. Dimethylsulfoxide (DMSO; $200\mu\text{l}$) was added to each well after removal of the supernatant. After shaking the plate for 10 min, cell viability was assessed by measuring the absorbance at 490 nm using an Enzyme-labeling instrument (EX-800 type); all measurements were performed three times. Cell growth curve was completed using time as the abscissa and A value (mean \pm SD) as the ordinate.

Cell proliferation assay

A431, B16 and SCC9 (1×10^5) were seeded in a 12-well plate and synchronized for 24 hours by serum starvation, then Melatonin (Sigma) was added to the culture medium. After 24 hours cells were trypsinized and cell viability was assessed by trypan blue staining (Sigma, St. Louis, MO, USA). Cells were counted in a Newbauer chamber (prolab, São Paulo, SP, Brazil).

Wound scratch assay

The evaluation of the effect of melatonin on the migration of A431, B16 and SCC9 cells was performed using the wound-healing assay (migration). A431, B16 and SCC9 cells were grown in 6-well culture plates until they reached confluence. Subsequently, the culture medium will be removed and a scarification (scratch) will be produced on the cell monolayer using a $200\mu\text{l}$ tip. Cells were washed with PBS and incubated at 37°C in the incubator with complete culture media, in the presence or absence of the melatonin. Wells were photographed at the beginning of the experiment and after 24 hours (SCC9 /HaCat cells). Pictures were obtained with a camera SC30 (Olympus, Center Valley, PA, USA) in an IX81 inverted microscope (Olympus, Center Valley, PA, USA). ImageJ software was used for analysis. To calculate the wound healing ratio, the initial area (in pixels) was divided by the final cell-free area (in pixels).

Invasion assay

For the transwell invasion assay was used, the polycarbonate membrane with pores of 8 microns in diameter from the upper chamber was covered with $50\mu\text{L}$ of Matrigel. SCC9 cells were

trypsinized and resuspended in number from 3×10^5 cells / ml serum-free DMEM to each well. These cells were plated in the upper chamber of migration. Treatment was placed in the lower chamber diluted in DMEM without serum. To control this experiment, the lower chamber was filled with DMEM without serum. The multiwell plate was covered and incubated for 24 hours at 37°C in CO_2 incubator. After the incubation period, the upper chamber invasion was inverted to remove cells that have not invaded and culture medium from the upper chamber. There remained only the cells that have migrated, being located on the underside of the membrane. These cells were fixed in 4% paraformaldehyde in PBS, stained with Crystal Violet solution of 2% methanol in images of fields of each membrane were acquired in a final magnification of 500x to determine the number of cells that invaded through counting.

Acridine orange/ethidium bromide cell death assay

The detection of apoptotic cells was performed by simultaneous staining with both acridine orange (AO, Sigma, St. Louis, MO, USA) and ethidium bromide (EB, Sigma, St. Louis, MO, USA). Cells were incubated in $10 \mu\text{g/ml}$ of AO and $20 \mu\text{g/ml}$ of ethidium bromide on the dark room for 5 min. Cells were then mounted and observed under a fluorescence microscope FSX100 (Olympus, Center Valley, PA, USA). Intense ethidium bromide (Ex360-370, Em420-460, filter DM400) staining indicates cell death, while extreme acridine orange (Ex460-495, Em510-550, filter DM505) indicates live cells. The automatic count and threshold were performed in merge image by ImageJ software. Evidence suggests that AO/EB allows for the discrimination of live, apoptotic and necrotic cells.

RNA isolation and real-time PCR

RNA was isolated from tumor tissue using the TRIzol reagent (GIBCO Invitrogen), according to the manufacturer. Total RNA was reverse transcribed and the subsequent cDNA was heated at 95°C to terminate the reaction. For real-time PCR, $2 \mu\text{l}$ of the cDNA was added to TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) with the *Mki67*, *Hif-1a*, *Vegfa*, *Colla1*, *Cdh1*, *Casp3*, *Bax*, *Bcl2*, *Mmp9*, *Per1*, *Per2*, *Cry1*, *Cry2*, *Bmall*, *Clock*- specific primer/probe set (Applied Biosystems); amplification was performed on an ABI 7000 Sequence Detection System. All reactions were done in triplicate and 18S rRNA (TaqMan rRNA control kit, Applied Biosystems) served as an internal control. The results were quantified as Ct values, where Ct was defined as the threshold cycle of PCR at which the amplified product is first detected and defined as relative gene expression (the ratio of target/control).

Statistical analysis

Analyses were performed using GraphPad Prism software (Version 6.0, GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Kolmogorov-Smirnov and the Shapiro-Wilk Tests were performed to evaluate data distribution. As samples presented as a normal distribution, one-way T test. All data are given as means \pm S.D. Statistical significance was accepted at $p < 0.05$.

Results

Identification of differentially expressed genes, gene ontology enrichment and functional classification

In an attempt to characterize the molecular signaling events in clock gene expression in melanoma and oral cancer, we adopted datasets of mRNA expression profiling from TCGA database. Oral cancer dataset contains the total mRNA of normal and cancer samples. Since melanoma dataset from TCGA contains only metastatic and primary lesions, we performed DEGs analysis by using normal skin samples from Gtex database. To identify the differentially expressed genes (DEGs), we applied TCGAbiolinks R package and found out upregulated and downregulated genes. Since, cutaneous squamous cell carcinoma (cSCC) has no TCGA data, we performed Geo2R analysis using total RNAs from normal human epidermal keratinocytes and cSCC cell lines were extracted (GSE66359).

We obtained gene expression data belonging to specimens of SKCM and OSCC from TCGA; these data were preprocessed using standard methods, and we compared normal and cancer samples. Later, we performed a GO term enrichment and functional classification by KEGG analysis, using DAVID platform, to investigate the biological and functional roles of these DEGs. We observed circadian entertainment downregulated in both SKCM and OSCC. Cell adhesion molecules (CAMs), Type I diabetes mellitus, Cytokine-cytokine receptor interaction and Autoimmune thyroid disease were the most active pathways in both cancers (Supplementary Tables 1-6).

Overview of the clock-related genes and cancer transcriptomic analysis

By using Entrez Gene and gene cards analysis, we identified 177 clock-related genes. Venn diagram was performed to show the overlap between DEG genes identified from the meta-analysis and those from the clock-related genes. In OSCC, we observed downregulation of *Aqp3*, *S100a8*, *Rora*, *Nr0b2*, *Cyp2e1*, *Chrm3*, *Per2*, *Defb1*, *Cry2*, *Kat2b*, *Drd2*, *Rasd1*, *Prkn*, *Ppargc1a*, *Rorc*, *Dlk1*, *Adh4* genes. On the other hand, *Mmp2*, *Star*, *Gnb3*, *Fabp4*, *Aanat*, *Timeless*, *Il1b*, *Hcrtr2*, *Nox4*, *Slc6a3*, *Oip5*, *Foxp3*, *Nuf2*, *Fgf8*, *Rorb*, *Piwil1*, *Atoh7*, *Nefh*, *Hes7*, *Serpine1*, *Mmp9*, *Mtnr1b*, *Tert*, *Cdkn2a*, *Zbp2*, *Npsr1* clock-related genes were upregulated. According to SKCM analysis, *Prkn*, *Myc*, *Foxo1*, *Gadd45a*, *Rxra*, *Cavin1*, *Thpo*, *Id2*, *Smad3*, *Pomc*, *Gnb3*, *Tet2*, *Hes7*, *Thbd*, *Rorb*, *Cry2*, *Per2*, *Serpine1*, *Vegfa*, *Cebpa*, *Olfml3*, *Chi3l1*, *Rasd1*, *Tuft1*, *Arntl*, *Nr1d1*, *Nfil3*, *Mmp2*, *Aqp3*, *Sik1*, *Defb1*, *Cyp2e1*, *Thbs1*, *Rorc*,

Dlk1, Neat1, Per1, Star, Ass1, Adh4, Rora, Fabp4 were downregulated, while *Hmg20a, Nr1i3, Tnf, Rb1, Nefh, Nox4, Foxp3, Delec1, Ctnnb1, Oip5, Timeless, Cdk5, Nuf2, Sox2, Bhlhe41, S100a8, Il1b, Cdkn2a, Mmp9, Ccl4* were upregulated. In sSCC, *Arntl, Ern1, Rora, Defb1, Gadd45a, Ppp1cb* and *Rcor1* upregulated, while *Timeless* and *Cdk5* were downregulated.

We observed that several common genes are deregulated in both diseases. *Aqp3, Rora, Cyp2e1, Per2, Defb1, Cry2, Rasd1, Prkn, Rorc,* and *Dlk1* were downregulated in melanoma and oral cancer samples, while *Timeless, Il1b, Nox4, Oip5, Foxp3, Nuf2, Nefh, Mmp9* and *Cdkn2a* were upregulated. Most of upregulated common clock-related genes were associated with drug sensitivity (Supplementary Figure 1-4). Survival analysis showed that *Aqp3, S100a8, Per2, Defb1, Cry2, Kat2b, Rorc* and *Adh4* high expression was associated with poor survival only in melanoma samples, while higher expression of *Timeless, Il1b, Nox4, Oip5, Foxp3, Nuf2, Nefh, Mmp9* and *Cdkn2a* were associated with poor survival in both tumors (Supplementary Figure 5-8).

We performed immunohistochemistry analysis by using The Human Protein Atlas for *Per2, Cry1, Cry2, Bmal1* and *Clock* genes. The DEG analyses for CRY1 and BMAL1 proteins are supported by immunohistochemistry showing protein expression higher in normal than in cancer samples. However, we observed over expression of PER2, CRY2 and CLOCK proteins in cancer samples as compared to normal samples (Figure 1-2).

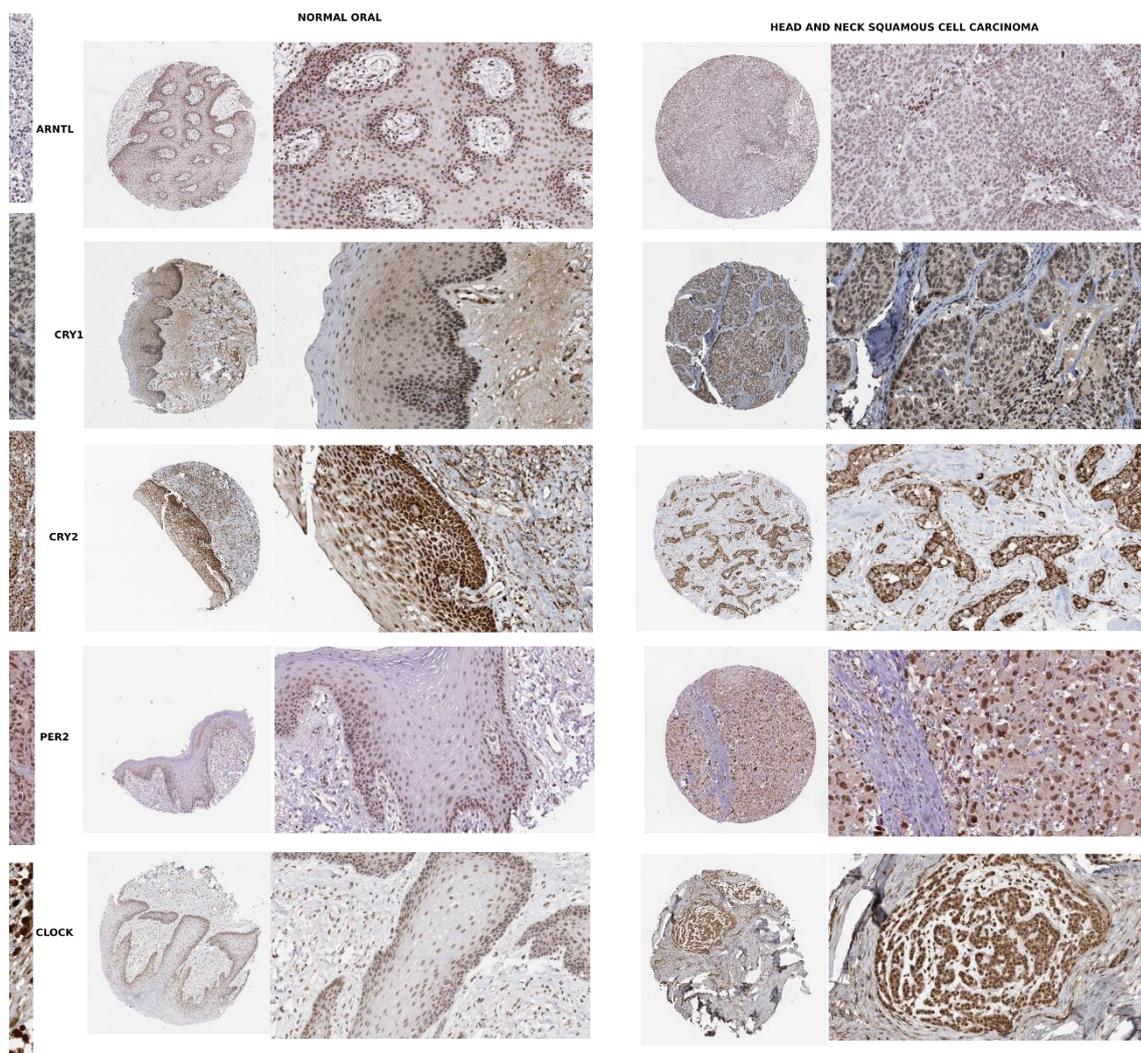


Figure 1 – Immunohistochemistry expression of the ARNTL, CRY1, CRY2, PER2 e CLOCK in a sample of normal tissue and with squamous cell carcinoma of the oral cavity.

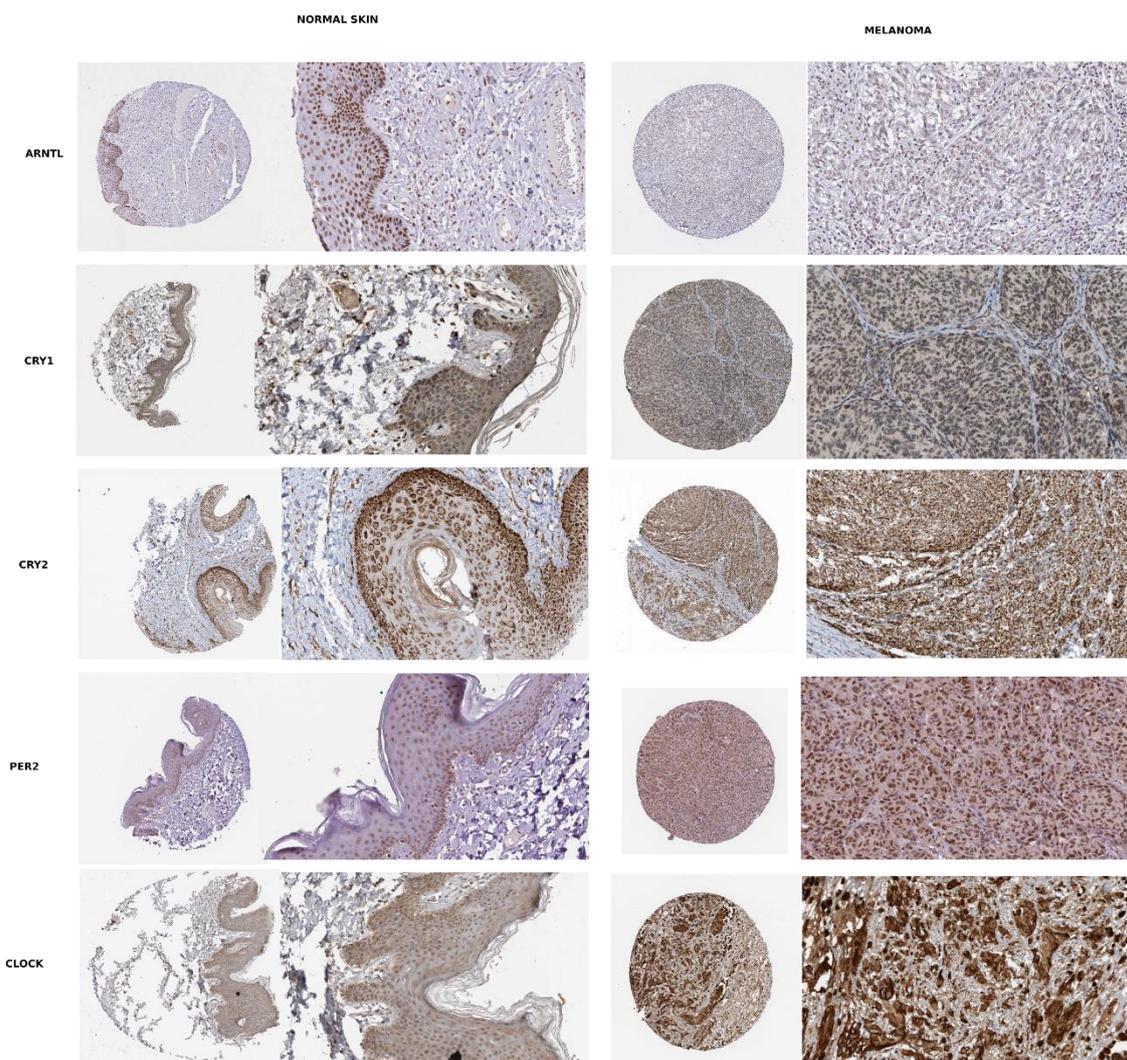


Figure 2 – Immunohistochemistry expression of the ARNTL, CRY1, CRY2, PER2 e CLOCK in a sample of normal tissue and melanoma.

Effects of Melatonin on cell phenotype

Since circadian entertainment is associated with both melanoma and oral cancer, as demonstrated before, proliferation assay, wound-scratch, invasion, AO/EB and qRT-PCR assays were performed to clarify the effect of Melatonin on the human skin squamous cell carcinoma, melanoma and oral cancer cell phenotype. Proliferation assay suggests that Melatonin elicits an antiproliferative effect in B16 and SCC9 cell lines. Melatonin also inhibited migration significantly in B16 and SCC9 cells according to wound-scratch assay. Invasiveness is an important characteristic of cancer cells and a target for the development of anticancer agents. Melatonin significantly reduced the invasiveness in SCC9 cells. Acridine Orange/Ethidium Bromide Cell death assay reveals that Melatonin significantly increased the

number of apoptotic cells when compared to control. A431 cell line did not show difference neither in proliferation and apoptosis nor in migration assays (Figure 3).

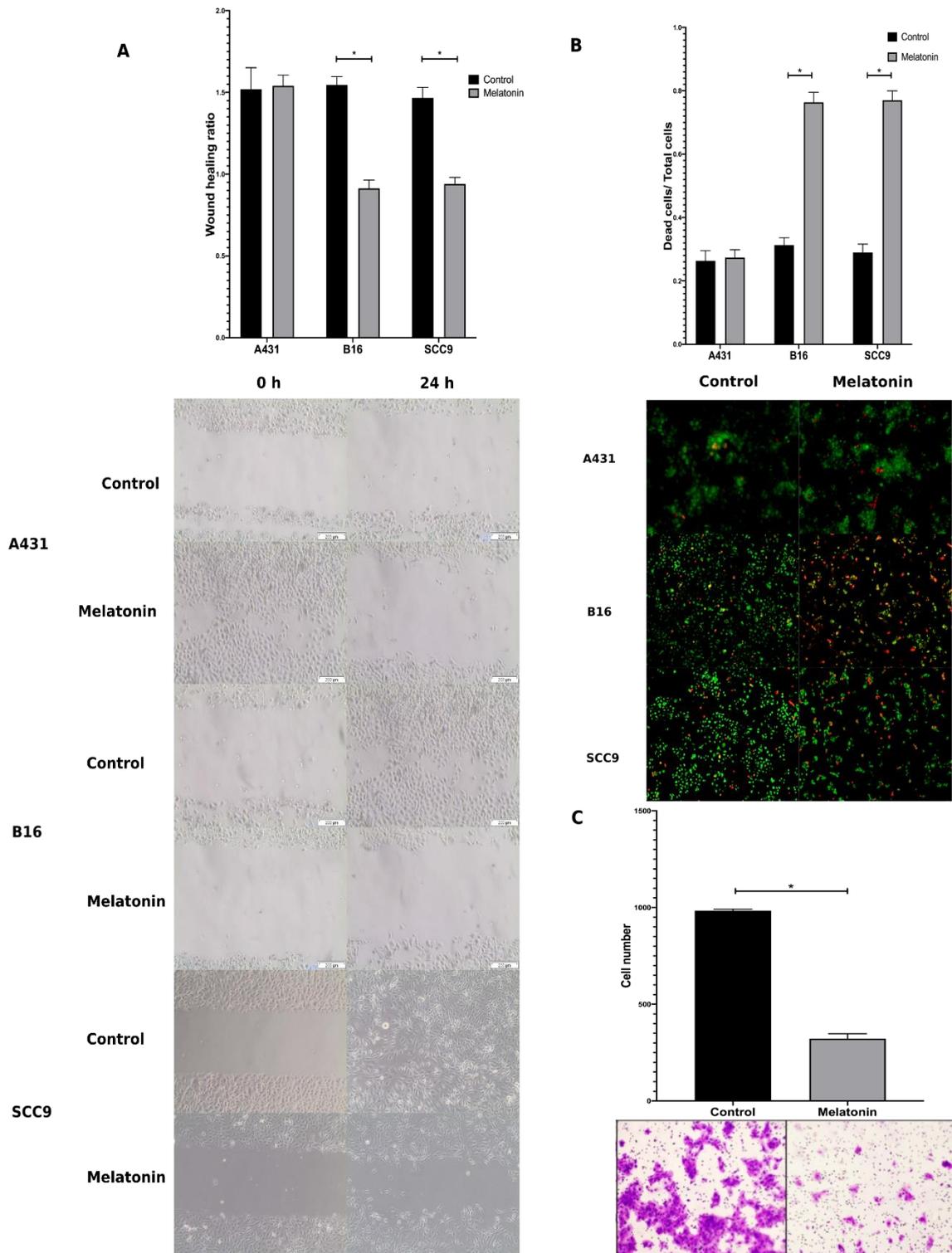


Figure 3 - Effects of Melatonin in SCC9, B16 and A431 cells.

Gene expression analyses after melatonin administration

To confirm these data, we used quantitative real-time PCR to evaluate the mRNA expression levels of proliferation (*Mki67*), migration and invasion (*Colla1*, *Mmp9* and *Cdh1*), apoptosis (*Casp3*, *Bax* and *Bcl2*) and clock-related genes (*Per2*, *Cry1*, *Cry2*, *Bmal1* and *Clock*). We showed that Melatonin decreases *Mki67* (Supplementary Figure 9), *Colla1*, *Mmp9*, *Bcl2* and *Clock*, and increases *Cdh1*, *Casp3*, *Per1*, *Per2*, *Cry1*, *Cry2*, *Bmal1* in both B16 and SCC9 cell lines. Gene expressions in A431 cell lines showed no statistical difference (Figure 4-5). We also observed that melatonin inhibits *Hif-1a* and *Vegfa* mRNA expression levels (Supplementary Figure 9).

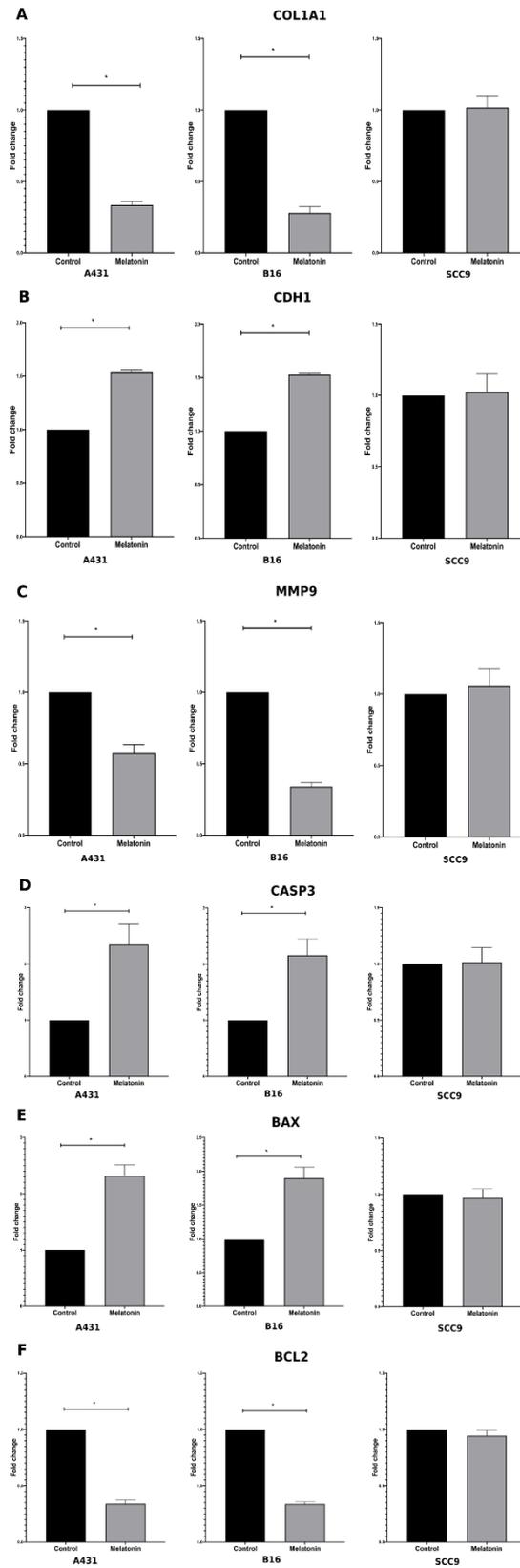


Figure 4 - Gene expression analyses after melatonin administration

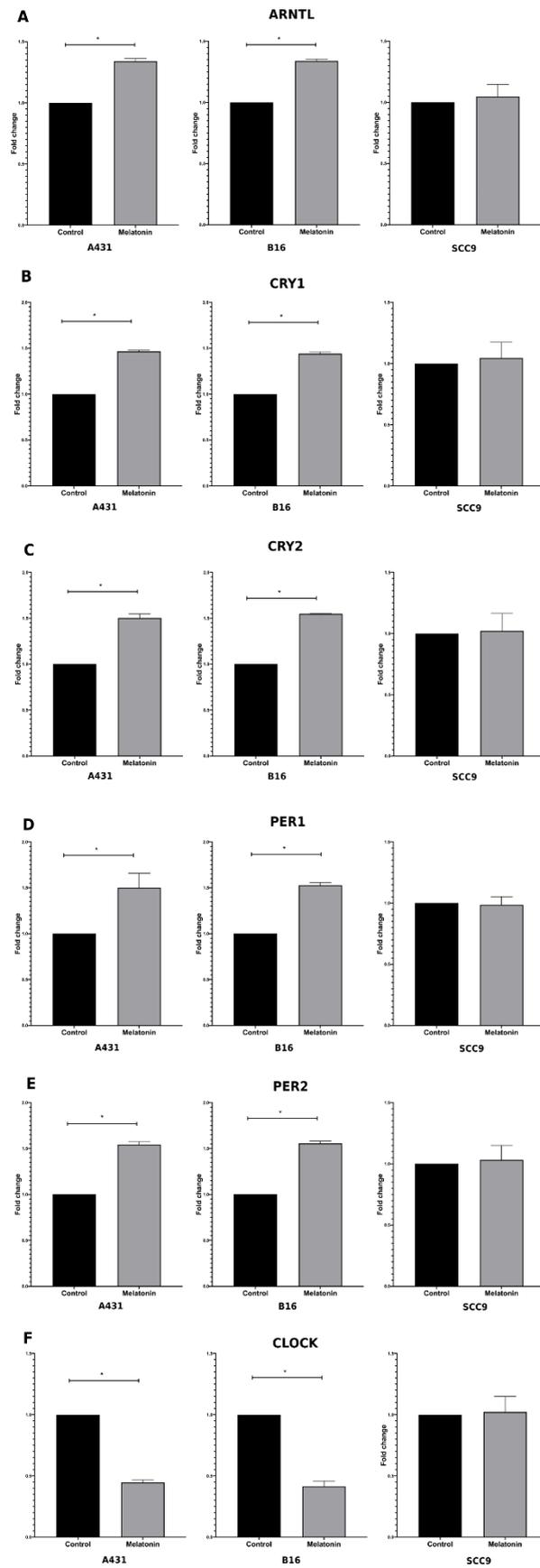


Figure 5 - Gene expression analyses after melatonin administration

Discussion

Alterations in clock genes expression may increase susceptibility to cancer through effects on biological mechanisms that regulate DNA damage, repair, energy metabolism, cell growth and death in neoplastic tissues. Genes related to cell cycle regulation, such as *Myc*, *Tp53*, *Cyclin D1* and *Wee1* have already been described associated with dysregulation of clock-related genes [39,40]. Animal models has been shown that *Per1*, *Per2*, *Rev-Erba*, *Bmal1* and *Cry1* genes expression patterns presented their rhythmic expression altered in tumor tissues. These altered rhythmic expression can accelerate the development of tumors, increasing growth and decreasing apoptotic pathways in animal models exposed to cycles with alternating photoperiods (light/dark – 14:10h or 10:14h) compared to animals that remained under constant cycles of 12:12 hours [41].

We previously showed a bioinformatic association between circadian rhythm and type 2 diabetic-related cancers. We suggested that sleeping disturbance could promote type 2 diabetes and related-cancer development, by clock genes expression deregulation [33]. A consistent amount of evidence suggests that clock genes deregulation promotes genomic instability, which may in turn increase the number of genetic variants in a tumor [7,14,42]. These processes contribute to the malignant phenotype and to aggressive tumor behavior, including a greater propensity for metastasis, angiogenesis, and escape from apoptosis [43–45].

The aim of our study is to identify the link between circadian rhythm deregulation and cutaneous skin cancer, melanoma and oral cancer tissues. We performed several analytical methods to determine the underlying molecular mechanisms. First, we detected downregulated and upregulated DEGs based on the RNA data. In summary, clock-related genes are deregulated in cSCC, SKCM and OSCC. SKCM and OSCC presented common deregulated clock related-genes. Deregulated clock related-genes were associated with poor survival and chemioresistance.

To confirm the data derived from the bioinformatic analysis, we performed cell culture assays in a presence of melatonin in skin carcinoma, murine melanoma and oral squamous cell carcinoma cell lines. Melatonin administration increased *Per2*, *Cry1*, *Cry2* and *Bmal1* mRNA expression leves and descread *Clock* gene mRNA levels. *Per2*, *Cry1*, *Cry2* and *Bmal1* genes belong to tumor suppressor genes that can control cell proliferation, cell death, DNA damage and repair system. Deregulation of clock-controlled genes is an early event that leads to cancer initiation. Therefore, *Clock* gene has been reported to control cancer progression and might influence disease progression and outcome [23,46,47].

Melatonin is a hormone of the circadian temporization system, synthesized by the pineal gland [48]. Melatonin has a high capacity to inhibit tumor growth, acting directly to block the formation of new blood vessels [13,49]. When administered in therapeutical doses, above the levels naturally found in the body, melatonin present antioxidant properties [20]. Recent studies have demonstrated that melatonin can suppress the growth of some cancer cells types, especially when combined with drugs used in cancer treatment [24,26,50,51]. We observed that melatonin inhibited melanoma and oral cancer cells proliferation, migration and invasion and also induces apoptosis. Interestingly, these results corroborate with previous published data, which show that melatonin may have a crucial role in inhibiting cancer cell processes, which may influence tumor growth and metastasis in some types of cancer [24,51,52].

Since cell migration process plays a critical role in tumor progression and metastasis, and considering that melatonin can attenuate this process, we performed wound-healing to evaluate the effects of melatonin in cell migration. After 24 hours of melatonin treatment, the melanoma and oral squamous cells migration, and oral squamous cell invasion were decreased. These data were confirmed by qPCR, showing that *Coll1a1* and *Mmp9* decreases and increases of *Cdh1* after melatonin treatment. However, cell migration analysis for skin carcinoma showed no difference. We hypothesize that skin carcinoma has no melatonin interferences. Melatonin is also associated with apoptosis promotion by increasing the key intracellular molecules involved in apoptosis execution, *Casp3* [53]. In the current study, melatonin induces the *Casp 3* mRNA expression levels and showed higher number of apoptotic melanoma and oral squamous cell lines.

Levels of expression of angiogenic factors reflect the aggressiveness of tumor cells. This process is regulated by genes such as *Hif-1 α* and *Vegfa*. We showed that melatonin decreases *Hif-1 α* and *Vegfa* mRNA expression, confirming previous studies showing that melatonin could block angiogenic factors. Our data are in agreement with a previous data that observed melatonin decreasing angiogenesis, migration and invasion and inducing apoptosis [25,50,54]. Accordingly, there are studies to suggest that melatonin reduces proliferation and angiogenesis with a decrease in the downstream HIF signaling protein VEGF in tumoral cells. Angiogenesis is an essential requirement for tumor progression and metastasis [55]. Tumoral cells melatonin-mediated reduction is associated with a decrease of the MAP kinases ERK1 and ERK2 phosphorylation and activation [56]. Melatonin reduces phosphorylation and activation of the MAP, significantly reducing hypoxia-induced VEGF promoter activities and VEGF expression at both mRNA and protein levels [24,25,54].

Taking all data together, we hypothesized that changes in the expression of clock related-genes in cancer could be responsible for metabolic changes that could lead to the cancer

aggressiveness. Melatonin administration showed changes in melanoma and oral cancer phenotypes. Melatonin also seems to influence melanoma and oral tumor progression through *Mki67*, *Hif-1a*, *Vegfa*, *Colla1*, *Cdh1*, *Casp3*, *Bax*, *Bcl2*, *Mmp9*, *Per2*, *Cry1*, *Cry2*, *Bmal1* and *Clock* modulation. These biological molecules not only represent the association of clock gene biomarkers with melanoma and oral cancer but also have significant potential to be considered as systems-level biomarkers that may be used for screening or therapeutic purposes. Our data stimulate efforts in news studies to achieve the experimental and clinical validation about these biomolecules.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Ethics approval and consent to participate

Not applicable.

- 1] Garcia-Sainz M, Halberg F. Mitotic rhythms in human cancer, reevaluated by electronic computer programs—evidence for chronopathology. *J Natl Cancer Inst* 1966;37:279–92. <https://doi.org/10.1093/jnci/37.3.279>.
- [2] Reddy AB, Wong GKY, O’Neill J, Maywood ES, Hastings MH. Circadian clocks: Neural and peripheral pacemakers that impact upon the cell division cycle. *Mutat Res - Fundam Mol Mech Mutagen* 2005;574:76–91. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2005.01.024>.
- [3] Miller BH, McDearmon EL, Panda S, Hayes KR, Zhang J, Andrews JL, et al. Circadian and CLOCK-controlled regulation of the mouse transcriptome and cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci* 2007. <https://doi.org/10.1073/pnas.0611724104>.
- [4] Soták M, Polidarová L, Ergang P, Sumová A, Pácha J. An association between clock genes and clock-controlled cell cycle genes in murine colorectal tumors. *Int J Cancer* 2013. <https://doi.org/10.1002/ijc.27760>.
- [5] Borgs L, Beukelaers P, Vandenbosch R, Belachew S, Nguyen L, Malgrange B. Cell circadian cycle: New role for mammalian core clock genes. *Cell Cycle* 2009;8:832–7. <https://doi.org/10.4161/cc.8.6.7869>.
- [6] Larne O, Östling P, Haflidadóttir BS, Hagman Z, Aakula A, Kohonen P, et al. MIR-183 in prostate cancer cells positively regulates synthesis and serum levels of prostate-specific antigen. *Eur Urol* 2015;68:581–8. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2014.12.025>.
- [7] Matsumoto A, Ukai-Tadenuma M, Yamada RG, Houl J, Uno KD, Kasukawa T, et al. A functional genomics strategy reveals clockwork orange as a transcriptional regulator in the *Drosophila* circadian clock. *Genes Dev* 2007;21:1687–700. <https://doi.org/10.1101/gad.1552207>.
- [8] Mazzocchi G, Pazienza V, Vinciguerra M. Clock genes and clock-controlled genes in the regulation of metabolic rhythms. *Chronobiol Int* 2012. <https://doi.org/10.3109/07420528.2012.658127>.
- [9] Ben-Shlomo R. Chronodisruption, cell cycle checkpoints and DNA repair. *Indian J Exp Biol* 2014;52:399–403. <https://doi.org/24851401>.

- [10] Asghari MH, Ghobadi E, Moloudizargari M, Fallah M, Abdollahi M. Does the use of melatonin overcome drug resistance in cancer chemotherapy? *Life Sci* 2018;196:143–55. <https://doi.org/10.1016/J.LFS.2018.01.024>.
- [11] Reiter RJ, Rosales-Corral SA, Tan DX, Acuna-Castroviejo D, Qin L, Yang SF, et al. Melatonin, a full service anti-cancer agent: Inhibition of initiation, progression and metastasis. *Int J Mol Sci* 2017;18. <https://doi.org/10.3390/ijms18040843>.
- [12] Buhr ED, Takahashi JS. Molecular components of the Mammalian circadian clock. *Handb Exp Pharmacol* 2013;217:3–27. https://doi.org/10.1007/978-3-642-25950-0_1.
- [13] Zhu L, Zee PC. Circadian Rhythm Sleep Disorders. *Neurol Clin* 2012. <https://doi.org/10.1016/j.ncl.2012.08.011>.
- [14] Karaganis SP, Kumar V, Beremand PD, Bailey MJ, Thomas TL, Cassone VM. Circadian genomics of the chick pineal gland in vitro. *BMC Genomics* 2008;9. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-206>.
- [15] Amaral FG Do, Cipolla-Neto J. A brief review about melatonin, a pineal hormone. *Arch Endocrinol Metab* 2018;62:472–9. <https://doi.org/10.20945/2359-3997000000066>.
- [16] Samanta S. Melatonin: an endogenous miraculous indolamine, fights against cancer progression. *J Cancer Res Clin Oncol* 2020;146:1893–922. <https://doi.org/10.1007/S00432-020-03292-W>.
- [17] Bhattacharya S, Patel KK, Dehari D, Agrawal AK, Singh S. Melatonin and its ubiquitous anticancer effects. *Mol Cell Biochem* 2019;462:133–55. <https://doi.org/10.1007/S11010-019-03617-5>.
- [18] D. Mediavilla M, J. Sanchez-Barcelo E, X. Tan D, Manchester L, J. Reiter R. Basic mechanisms involved in the anti-cancer effects of melatonin. *Curr Med Chem* 2010;17:4462–81. <https://doi.org/10.2174/092986710794183015>.
- [19] Srinivasan V, Spence DW, Pandi-Perumal SR, Trakht I, Cardinali DP. Therapeutic actions of melatonin in cancer: possible mechanisms. *Integr Cancer Ther* 2008;7:189–203. <https://doi.org/10.1177/1534735408322846>.
- [20] Tan DX, Manchester LC, Esteban-Zubero E, Zhou Z, Reiter RJ. Melatonin as a potent and inducible endogenous antioxidant: synthesis and metabolism. *Molecules* 2015;20:18886–906. <https://doi.org/10.3390/molecules201018886>.

- [21] Bozek K, Relógio A, Kielbasa SM, Heine M, Dame C, Kramer A, et al. Regulation of clock-controlled genes in mammals. *PLoS One* 2009. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004882>.
- [22] Reiter RJ, Rosales-Corral SA, Tan DX, Acuna-Castroviejo D, Qin L, Yang SF, et al. Melatonin, a Full Service Anti-Cancer Agent: Inhibition of Initiation, Progression and Metastasis. *Int J Mol Sci* 2017;18:843. <https://doi.org/10.3390/IJMS18040843>.
- [23] Rana S, Munawar M, Shahid A, Malik M, Ullah H, Fatima W, et al. Deregulated expression of circadian clock and clock-controlled cell cycle genes in chronic lymphocytic leukemia. *Mol Biol Rep* 2014;41:95–103. <https://doi.org/10.1007/s11033-013-2841-7>.
- [24] Lu JJ, Fu L, Tang Z, Zhang C, Qin L, Wang J, et al. Melatonin inhibits AP-2 β /hTERT, NF- κ B/COX-2 and Akt/ERK and activates caspase/Cyto C signaling to enhance the antitumor activity of berberine in lung cancer cells. *Oncotarget* 2016;7:2985–3001. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.6407>.
- [25] Chen K, Zhu P, Chen W, Luo K, Shi XJ, Zhai W. Melatonin inhibits proliferation, migration, and invasion by inducing ROS-mediated apoptosis via suppression of the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in gallbladder cancer cells. *Aging (Albany NY)* 2021;13:22502. <https://doi.org/10.18632/AGING.203561>.
- [26] Reiter RJ. Mechanisms of cancer inhibition by melatonin. *J Pineal Res* 2004;37:213–4. <https://doi.org/10.1111/J.1600-079X.2004.00165.X>.
- [27] Yang CY, Lin CK, Tsao CH, Hsieh CC, Lin GJ, Ma KH, et al. Melatonin exerts anti-oral cancer effect via suppressing LSD1 in patient-derived tumor xenograft models. *Oncotarget* 2017;8:33756–69. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.16808>.
- [28] Goncalves N, Rodrigues R, Jardim-Perassi B, Moschetta M, Lopes J, Colombo J, et al. Molecular markers of angiogenesis and metastasis in lines of oral carcinoma after treatment with melatonin. *Anticancer Agents Med Chem* 2014;14:1302–11. <https://doi.org/10.2174/1871520614666140812110246>.
- [29] Stanton SE, Disis ML. Clinical significance of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer. *J Immunother Cancer* 2016. <https://doi.org/10.1186/s40425-016-0165-6>.
- [30] Kayahara GM, Valente VB, Pereira RB, Lopes FYK, Crivelini MM, Miyahara GI, et al. Pineal gland protects against chemically induced oral carcinogenesis and inhibits tumor progression in rats. *Oncotarget* 2020;11:1816. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.27551>.

- [31] Colaprico A, Silva TC, Olsen C, Garofano L, Cava C, Garolini D, et al. TCGAAbiolinks: An R/Bioconductor package for integrative analysis of TCGA data. *Nucleic Acids Res* 2016;44:e71. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1507>.
- [32] Pereira LX, Alves da Silva LC, de Oliveira Feitosa A, Santos Ferreira RJ, Fernandes Duarte AK, da Conceição V, et al. Correlation between renin-angiotensin system (RAS) related genes, type 2 diabetes, and cancer: Insights from metanalysis of transcriptomics data. *Mol Cell Endocrinol* 2019;110455. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2019.110455>.
- [33] Barbosa Vieira TK, Jurema da Rocha Leão M, Pereira LX, Alves da Silva LC, Pereira da Paz BB, Santos Ferreira RJ, et al. Correlation between circadian rhythm related genes, type 2 diabetes, and cancer: Insights from metanalysis of transcriptomics data. *Mol Cell Endocrinol* 2021;526:111214. <https://doi.org/10.1016/J.MCE.2021.111214>.
- [34] Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc* 2009;4:44–57. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.211>.
- [35] Uhlen M, Zhang C, Lee S, Sjöstedt E, Fagerberg L, Bidkhori G, et al. A pathology atlas of the human cancer transcriptome. *Science* (80-) 2017;357. https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAN2507/SUPPL_FILE/SUPPLEMENTARY-TABLES.ZIP.
- [36] Thul PJ, Akesson L, Wiking M, Mahdessian D, Geladaki A, Ait Blal H, et al. A subcellular map of the human proteome. *Science* (80-) 2017;356. https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAL3321/SUPPL_FILE/PAP.PDF.
- [37] Uhlén M, Fagerberg L, Hallström BM, Lindskog C, Oksvold P, Mardinoglu A, et al. Tissue-based map of the human proteome. *Science* (80-) 2015;347. https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1260419/SUPPL_FILE/1260419_UHLEN.SM.PDF.
- [38] Edgar R, Lash A. The Gene Expression Omnibus (GEO): A Gene Expression and Hybridization Repository. *NCBI Handb* 2002:0.
- [39] Tan XM, Ye H, Yang K, Chen D, Wang QQ, Tang H, et al. Circadian variations of clock gene *Per2* and cell cycle genes in different stages of carcinogenesis in golden hamster buccal mucosa. *Sci Rep* 2015;5. <https://doi.org/10.1038/SREP09997>.
- [40] Fu L, Pelicano H, Liu J, Huang P, Lee CC. The circadian gene *Period2* plays an important role in tumor suppression and DNA damage response in vivo. *Cell* 2002;111:41–50. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00961-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00961-3).

- [41] Lee S, Donehower LA, Herron AJ, Moore DD, Fu L. Disrupting Circadian Homeostasis of Sympathetic Signaling Promotes Tumor Development in Mice. *PLoS One* 2010;5. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0010995>.
- [42] Duffield GE. DNA microarray analyses of circadian timing: the genomic basis of biological time. *J Neuroendocrinol* 2003;15:991–1002. <https://doi.org/10.1046/J.1365-2826.2003.01082.X>.
- [43] de Carvalho Fraga CA, Farias LC, de Oliveira MVM, Domingos PLB, Pereira CS, Silva TF, et al. Increased VEGFR2 and MMP9 protein levels are associated with epithelial dysplasia grading. *Pathol Res Pract* 2014;210:959–64. <https://doi.org/10.1016/J.PRP.2014.06.020>.
- [44] Marques-Silva L, Farias LC, de Carvalho Fraga CA, de Oliveira MVM, Cardos CM, Fonseca-Silva T, et al. HPV-16/18 detection does not affect the prognosis of head and neck squamous cell carcinoma in younger and older patients. *Oncol Lett* 2012;3:945–9. <https://doi.org/10.3892/OL.2012.588>.
- [45] Fraga CAC, de Oliveira MVM, Alves LR, Viana AG, de Sousa AA, Carvalho SFG, et al. Immunohistochemical profile of HIF-1 α , VEGF-A, VEGFR2 and MMP9 proteins in tegumentary leishmaniasis. *An Bras Dermatol* 2012;87. <https://doi.org/10.1590/S0365-05962012000500006>.
- [46] Nirvani M, Khuu C, Utheim TP, Sand LP, Sehic A. Circadian clock and oral cancer. *Mol Clin Oncol* 2018. <https://doi.org/10.3892/mco.2017.1518>.
- [47] Rana S, Mahmood S. Circadian rhythm and its role in malignancy. *J Circadian Rhythms* 2010. <https://doi.org/10.1186/1740-3391-8-3>.
- [48] Aulinas A. *Physiology of the Pineal Gland and Melatonin*. Endotext 2019.
- [49] Gurunathan S, Qasim M, Kang MH, Kim JH. <p>Role and Therapeutic Potential of Melatonin in Various Type of Cancers</p>. *Onco Targets Ther* 2021;14:2019–52. <https://doi.org/10.2147/OTT.S298512>.
- [50] Li Y, Li S, Zhou Y, Meng X, Zhang JJ, Xu DP, et al. Melatonin for the prevention and treatment of cancer. vol. 8. Impact Journals, LLC; 2017. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.16379>.
- [51] Leon-Blanco MM, Guerrero JM, Reiter RJ, Calvo JR, Pozo D. Melatonin inhibits telomerase activity in the MCF-7 tumor cell line both in vivo and in vitro. *J Pineal Res* 2003;35:204–11. <https://doi.org/10.1034/J.1600-079X.2003.00077.X>.

- [52] Tarocco A, Caroccia N, Morciano G, Wieckowski MR, Ancora G, Garani G, et al. Melatonin as a master regulator of cell death and inflammation: molecular mechanisms and clinical implications for newborn care. *Cell Death Dis* 2019 104 2019;10:1–12. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1556-7>.
- [53] Guimaraes TA, Farias LC, Fraga CA, Feltenberger JD, Melo GA, Coletta RD, et al. Evaluation of the antineoplastic activity of gallic acid in oral squamous cell carcinoma under hypoxic conditions. *Anticancer Drugs* 2016;27. <https://doi.org/10.1097/CAD.0000000000000342>.
- [54] Bastani S, Akbarzadeh M, Rezaei YR, Farzane A, Nouri M, Sisakht MM, et al. Melatonin as a Therapeutic Agent for the Inhibition of Hypoxia-Induced Tumor Progression: A Description of Possible Mechanisms Involved. *Int J Mol Sci* 2021;22. <https://doi.org/10.3390/IJMS221910874>.
- [55] Aguilar-Cazares D, Chavez-Dominguez R, Carlos-Reyes A, Lopez-Camarillo C, Hernandez de la Cruz ON, Lopez-Gonzalez JS. Contribution of Angiogenesis to Inflammation and Cancer. *Front Oncol* 2019;9. <https://doi.org/10.3389/FONC.2019.01399>.
- [56] Ogata T. Opposing Extracellular Signal-Regulated Kinase and Akt Pathways Control Schwann Cell Myelination. *J Neurosci* 2004. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5520-03.2004>

Legends

Figure 1 - Representative immunohistochemical staining characteristics of ARNTL, CRY1, CRY2, PER2 and CLOCK expressions in normal skin and melanoma patients. PER1 staining was not available. Data are extracted from The Human Protein Atlas (<https://www.proteinatlas.org/>).

Figure 2 - Representative immunohistochemical staining characteristics of ARNTL, CRY1, CRY2, PER2 and CLOCK expressions in normal oral and cancer patients. PER1 staining was not available. Data are extracted from The Human Protein Atlas (<https://www.proteinatlas.org/>).

Figure 3 – A - Melatonin decreases oral cancer cell migration in A431, B16 and SCC-9 cells. Scratch wound-healing assay was conducted in melatonin treated and control cells. Migration distance was measured at 24hours after cells were scratched. B - Representative fluoromicrographs of apoptosis detected by acridine orange/ethidium bromide assay in A431, B16 and SCC-9 cells. Melatonin increases apoptosis in cancer cells. C - Melatonin decreases oral cancer cell invasion in SCC-9 cells. Invasion assay was conducted in melatonin treated cells and control cells. Values represent mean \pm SD. *P<0.05.

Figure 4 - Real-Time PCR showing the effect of melatonin in A431, B16 and SCC-9 cells. Melatonin decreases *Coll1a1*, *Mmp9* and *Bcl-2* and increases *Cdh1*, *Casp3* and *Bax* in both B16 and SCC9 cell lines . Values represent mean \pm SD. *P<0.05.

Figure 5 - Real-Time PCR showing the effect of melatonin in A431, B16 and SCC-9 cells. Melatonin increases *Bmall*, *Cry1*, *Cry2*, *Per1* and *Per2* and decreases *Clock* mRNA expression leves in both B16 and SCC9 cell lines .. Values represent mean \pm SD. *P<0.05.

Supplementary Figure 1 -Correlation between GDSC drug sensitivity and *Aqp3*, *Rora*, *Cyp2e1*, *Per2*, *Defb1*, *Cry2*, *Rasd1*, *Prkn*, *Rorc*, and *Dlk1* mRNA expression. Analysis was performed by Gene Set Cancer Analysis (GSCA), an integrated database for genomic and immunogenomic gene set cancer analysis.

Supplementary Figure 2 -Correlation between CTRP drug sensitivity and *Aqp3*, *Rora*, *Cyp2e1*, *Per2*, *Defb1*, *Cry2*, *Rasd1*, *Prkn*, *Rorc*, and *Dlk1* mRNA expression. Analysis was performed by Gene Set Cancer Analysis (GSCA), an integrated database for genomic and immunogenomic gene set cancer analysis.

Supplementary Figure 3 -Correlation between GDSC drug sensitivity and *Timeless*, *Il1b*, *Nox4*, *Oip5*, *Foxp3*, *Nuf2*, *Nefh*, *Mmp9* and *Cdkn2a* mRNA expression. Analysis was performed by Gene Set Cancer Analysis (GSCA), an integrated database for genomic and immunogenomic gene set cancer analysis.

Supplementary Figure 4 -Correlation between CTRP drug sensitivity and *Timeless*, *Il1b*, *Nox4*, *Oip5*, *Foxp3*, *Nuf2*, *Nefh*, *Mmp9* and *Cdkn2a* mRNA expression. Analysis was performed by Gene Set Cancer Analysis (GSCA), an integrated database for genomic and immunogenomic gene set cancer analysis.

Supplementary Figure 5 - Kaplan-Meier analysis of *Aqp3*, *Rora*, *Cyp2e1*, *Per2*, *Defb1*, *Cry2*, *Rasd1*, *Prkn*, *Rorc*, and *Dlk1* in melanoma. $P < 0,05$ was considered statistically significant.

Supplementary Figure 6 - Kaplan-Meier analysis of *Aqp3*, *Rora*, *Cyp2e1*, *Per2*, *Defb1*, *Cry2*, *Rasd1*, *Prkn*, *Rorc*, and *Dlk1* in head and neck squamous cell carcinoma. $P < 0,05$ was considered statistically significant.

Supplementary Figure 7 - Kaplan-Meier analysis of *Timeless*, *Il1b*, *Nox4*, *Oip5*, *Foxp3*, *Nuf2*, *Nefh*, *Mmp9* and *Cdkn2a* in melanoma. $P < 0,05$ was considered statistically significant.

Supplementary Figure 8 - Kaplan-Meier analysis of *Timeless*, *Il1b*, *Nox4*, *Oip5*, *Foxp3*, *Nuf2*, *Nefh*, *Mmp9* and *Cdkn2a* in head and neck squamous cell carcinoma. $P < 0,05$ was considered statistically significant.

Supplementary Figure 9 - Real-Time PCR showing the effect of melatonin in A431, B16 and SCC-9 cells. Melatonin decreases *Mki67*, *Hif-1a* and *Vegfa* expression levels in both B16 and SCC9 cell lines. Values represent mean \pm SD. * $P < 0.05$.

Supplementary Table 1 - Functional annotation analysis of downregulated differentially expressed genes in skin carcinoma using the DAVID tool. $P < 0,05$ was considered statistically significant.

Supplementary Table 2 - Functional annotation analysis of upregulated differentially expressed genes in skin carcinoma using the DAVID tool. $P < 0,05$ was considered statistically significant.

Supplementary Table 3 - Functional annotation analysis of downregulated differentially expressed genes in skin melanoma using the DAVID tool. $P < 0,05$ was considered statistically significant.

Supplementary Table 4 - Functional annotation analysis of upregulated differentially expressed genes in skin melanoma using the DAVID tool. $P < 0,05$ was considered statistically significant.

Supplementary Table 5 - Functional annotation analysis of downregulated differentially expressed genes in oral squamous cell carcinoma using the DAVID tool. $P < 0,05$ was considered statistically significant.

Supplementary Table 6 - Functional annotation analysis of upregulated differentially expressed genes in oral squamous cell carcinoma using the DAVID tool. $P < 0,05$ was considered statistically significant.