

**Titolo:** La melatonina inibisce la proliferazione indotta da specie reattive dell'ossigeno, transizione epiteliale-mesenchimale e mimetismo vascolare nel cancro orale - Melatonin Inhibits Reactive Oxygen Species-Driven Proliferation, Epithelial-Mesenchymal Transition, and Vasculogenic mimicry in Oral Cancer.

**Codice:** MLT009

**Autore:** Liu et al.

**Data:** 2018

**Rivista:** Oxidative Medicine and Cellular Longevity 2018:3510970

**Argomento:** melatonina

**Accesso libero:** si

**DOI:** <https://doi.org/10.1155/2018/3510970>

**URL:** <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5884151/>

**BLOG:** <https://www.metododibellaevidenzescientifiche.com/2021/05/30/mlt009-liu-et-al-2018/>

**Parole chiave:** melatonina, EMT, ROS, angiogenesi, metastasi, vie di segnalazione, AKT, ERK

**Tumore:** tumore del cavo orale

**Traduzione:** Tradotte le sezioni "Riassunto", "Introduzione", "Discussione" e "Conclusioni". Alcune semplificazioni sono state fatte soprattutto nella sezione "Discussione".

### **Punti di interesse**

Liu et al. hanno studiato l'effetto della melatonina sulle linee cellulari di tumore del cavo orale (studio in vitro) e su xenotrapianti su topi (studio in vivo). Inoltre hanno studiato l'angiogenesi su cellule endoteliali della vena ombelicale umana (HUVEC) fatte crescere in mezzo di coltura in cui erano state fatte crescere linee cellulari tumorali con e senza melatonina.

Hanno evidenziato gli effetti oncostatici della MLT e studiato anche il meccanismo di azione molecolare, ovvero le vie biochimiche di segnalazione che la melatonina attiverebbe per esplicare le sue azioni. Si parla principalmente di due vie biochimiche di segnalazione: la via ERK e la via AKT. Le sigle si riferiscono a proteine diverse, le proteine del gruppo ERK e le proteine del gruppo AKT. Entrambe sono proteine CHINASI ovvero proteine enzimatiche che catalizzano una reazione chimica che comporta la cessione di un gruppo fosfato ad un altro substrato (fosforilazione). Questa fosforilazione, a seconda dei casi, attiva o disattiva il substrato che viene fosforilato. Entrambe queste vie sono attivate dalle specie reattive dell'ossigeno ROS. La via AKT è coinvolta nella proliferazione cellulare, inibizione dell'apoptosi, EMT e angiogenesi. La via che utilizza le chinasi ERK è coinvolta nell'angiogenesi

Le cellule tumorali del cavo orale producono specie reattive dell'ossigeno (radicali liberi - ROS) in grandi quantità.

I ROS

- 1) attivano vie di segnalazione indicate con la sigla AKT che portano a proliferazione e a inibizione dell'apoptosi;
- 2) attivano la trasformazione epitelio-mesenchimale con la sovraespressione delle proteine Vimentina e SNAIL (markers di cellule mesenchimali), e bloccano la trascrizione della proteina Caderina E (marker di cellule epiteliali), avviando così la EMT. Questo avviene tramite l'attivazione della via di segnalazione AKT;
- 3) attivano l'angiogenesi, inducendo la produzione del fattore inducibile da ipossia 1alfa che stimola la produzione di VEGF (fattore di crescita endotelio vascolare) attraverso le vie di segnalazioni sia AKT che ERK

Questo studio ha dimostrato che la melatonina ha ridotto significativamente la produzione di ROS. La melatonina ha ridotto anche la proliferazione e la resistenza all'apoptosi nelle cellule del cancro orale. A livello molecolare, questo è stato causato inattivando la via segnalazione Akt, invece attivata dai ROS (ROS-dipendente). Gli effetti antimigratori e anti-invasivi della melatonina sulle cellule del cancro orale dipendono dalla soppressione della transizione epitelio-mesenchimale (EMT). A livello molecolare questo avviene tramite l'inattivazione della segnalazione Akt, ROS-dipendente. La melatonina ha avuto anche un effetto antiangiogenico sulle cellule tumorali orali ottenuto attraverso il blocco delle vie biochimiche di segnalazione che coinvolgono sia le proteine chinasi ERK che Akt, entrambe attivate da ROS.

Coerentemente, in vivo è stato dimostrato che la melatonina ha ritardato la cancerogenesi del cancro orale.

In merito alla tossicità, la melatonina sembra essere notevolmente non tossica e negli esperimenti sui ratti è stato impossibile trovare una LD50 orale, anche con dosi fino a 3200 mg / kg. Negli esseri umani, 250 mg di melatonina assunti per via orale ogni 6 ore per 25-30 giorni non hanno mostrato effetti tossici su pressione sanguigna, frequenza cardiaca, ECG, emocromo, elettroliti o enzimi epatici e l'unico effetto collaterale riscontrato era la sonnolenza.

La melatonina, una molecola a tossicità nulla, agendo direttamente su i ROS neutralizzandoli e stimolando indirettamente altri enzimi antiossidanti, disattiva le vie di segnalazione biochimiche che invece, una volta attivate portano a proliferazione, evasione dall'apoptosi, EMT, metastasi e angiogenesi.

## Traduzione articolo

### Riassunto

**A livello globale, il cancro orale è il tipo più comune di cancro della testa e del collo. La melatonina provoca effetti inibitori sul cancro orale; tuttavia, la funzione biologica della melatonina e i meccanismi sottostanti rimangono in gran parte sconosciuti. In questo studio, abbiamo scoperto che la melatonina ha compromesso la proliferazione e la resistenza all'apoptosi delle cellule tumorali orali inattivando la segnalazione di Akt dipendente da ROS, coinvolgendo la sottoregolazione della ciclina D1, PCNA e Bcl-2 e la sovraregolazione di Bax. La melatonina ha inibito la migrazione e l'invasione delle cellule tumorali orali reprimendo la segnalazione di Akt attivata da ROS, implicando la riduzione della proteina SNAIL e vimentina e il potenziamento della caderina E. Inoltre, la melatonina ha ostacolato il mimetismo vascolare delle cellule tumorali orali attraverso il blocco delle proteine chinasi regolate da ROS (ERK) e delle vie di Akt che coinvolgono il fattore 1 $\alpha$  inducibile dall'ipossia. Coerentemente, la melatonina ha ritardato la carcinogenesi del cancro orale in vivo. Nel complesso, questi risultati hanno indicato che la melatonina esercita effetti antisopravvivenza, antimotilità e antiangiogenesi sul cancro orale in parte sopprimendo la segnalazione di Akt o ERK dipendente dai ROS.**

### Introduzione

Il cancro orale è uno dei tumori maligni più comuni in tutto il mondo [1]. Il carcinoma orale a cellule squamose è il tipo più diffuso e rappresenta il 90% dei tumori orali [2]. Nonostante i grandi progressi nel trattamento chirurgico, radioterapia e chemioterapia, l'elevata recidiva e la prognosi infausta del cancro orale appaiono frequentemente a causa della rapida crescita, dell'invasività locale e delle metastasi a distanza [3-5]. Pertanto, è imperativo esplorare i meccanismi alla base

della crescita e delle metastasi del cancro orale e identificare un potenziale agente terapeutico per il cancro orale.

Le specie reattive dell'ossigeno (ROS) sono altamente associate a diverse condizioni patologiche, inclusi i tumori [6]. È accertato che le cellule cancerose di solito generano una grande quantità di ROS [7]. I ROS possono attivare la segnalazione Akt che portano della proliferazione e dell'evasione dell'apoptosi in diversi tumori, incluso il cancro orale [8, 9]. I ROS sono altamente coinvolti nelle metastasi del cancro, possono essere mediatori o modulatori della transizione epitelio-mesenchimale (EMT) [10-12]. L'EMT svolge un ruolo importante nelle metastasi del cancro e conferisce principalmente alle cellule tumorali fenotipi invasivi [13]. Durante l'EMT, le cellule epiteliali perdono i loro marcatori epiteliali, come E-caderina, e acquisiscono i marcatori mesenchimali, tra cui Vimentina e proteina SNAIL [14]. Secondo quanto riferito, la proteina SNAIL è un repressore trascrizionale della caderina E nelle cellule tumorali [15]. Nel cancro al colon, è stato dimostrato che i ROS, attraverso la via di segnalazione AKT, potenziano l'espressione della proteina SNAIL e Vimentina e contemporaneamente riduce l'espressione di E-caderina [16], avviando di fatto alla EMT. Le specie reattive dell'ossigeno sono anche un regolatore critico dell'angiogenesi che è essenziale per le metastasi del cancro [17, 18]. ROS induce l'espressione del fattore inducibile dall'ipossia  $1\alpha$  (HIF- $1\alpha$ ) portando così alla sovraregolazione del fattore di crescita dell'endotelio vascolare (VEGF) e alla successiva angiogenesi [19, 20, 21]. Durante la trasformazione maligna delle cellule epiteliali bronchiali umane è stato visto che i ROS stimolano i fattori di crescita HIF- $1\alpha$  e al VEGF attraverso vie biochimiche di segnalazione che coinvolgono sia le proteine chinasi denominate ERK sia le proteine chinasi AKT [21]. Pertanto, il targeting dei ROS è una potenziale strategia terapeutica per ridurre i fenotipi maligni del cancro orale.

La melatonina (N-acetil-5-metossitriptamina), che è principalmente prodotta e secreta dalla ghiandola pineale, è stata inizialmente trovata coinvolta nella regolazione del ritmo cronobiologico [22]. Come potente antiossidante, la melatonina elimina direttamente una varietà di radicali liberi e stimola indirettamente le attività degli enzimi antiossidanti [23, 24]. La melatonina esercita effetti soppressivi su più tipi di tumori in parte a seconda delle attività di spazzino dei radicali liberi e antiossidante [25-27]. In precedenza, la melatonina veniva utilizzata come agente preventivo e curativo per i tumori orali abolendo lo stress ossidativo [28, 29]. Tuttavia, rimane sconosciuto se la melatonina ostacoli il cancro orale riducendo la proliferazione aumentata dei ROS, l'EMT e l'angiogenesi.

In questo studio, abbiamo scoperto per la prima volta che le cellule tumorali orali producevano ROS in grandi quantità e che questi erano significativamente diminuiti dal trattamento con melatonina. La melatonina ha ridotto la proliferazione e la resistenza all'apoptosi nelle cellule del cancro orale inattivando la segnalazione Akt, ROS-dipendente. Gli effetti antimigratori e anti-invasivi della melatonina sulle cellule del cancro orale dipendevano dalla soppressione dell'EMT tramite l'inattivazione della segnalazione Akt dipendente dai ROS. L'effetto antiangiogenico della melatonina sulle cellule tumorali orali era attraverso il blocco delle vie ERK e Akt attivate da ROS. Coerentemente, la melatonina ha ritardato la cancerogenesi del cancro orale in vivo. Nel complesso, la melatonina ha represso parzialmente la proliferazione, la motilità e l'angiogenesi delle cellule del cancro orale reprimendo le vie biochimiche di segnalazione attivate da i ROS che coinvolgono sia le proteine chinasi ERK che Akt.

## Discussione

In questo studio, la melatonina reprime il cancro orale in vitro e in vivo. I risultati chiave sono stati i seguenti: in primo luogo, la melatonina ha soppresso la produzione di ROS nelle cellule di cancro orale. In secondo luogo, la melatonina ha ridotto la proliferazione e l'evasione dell'apoptosi delle cellule tumorali orali inattivando la segnalazione Akt ROS-dipendente. In terzo luogo, l'effetto

inibitorio della melatonina sulla migrazione e sull'invasione delle cellule del cancro orale è mediato dall'inattivazione della segnalazione Akt dipendente dai ROS. In quarto luogo, la melatonina ha abolito la formazione del vaso capillare da parte di cellule endoteliali della vena ombelicale umana (HUVEC) indotta invece dalle cellule tumorali studiate, bloccando le vie di segnalazione Akt e ERK, entrambe attivate da ROS. Infine, la melatonina ha ostacolato la tumorigenesi del cancro orale in vivo, il che era coerente con i risultati in vitro. Nel complesso, la melatonina riduce la proliferazione causata dai ROS, l'EMT e il mimetismo vasculogenico nel cancro orale, suggerendo che la melatonina potrebbe essere un potenziale agente per la terapia del cancro orale.

I ROS sono altamente coinvolti nella progressione del cancro, che è un processo complicato che include la proliferazione incontrollata e la resistenza all'apoptosi, la migrazione e l'invasione delle cellule tumorali e l'angiogenesi intorno alla lesione tumorale [31, 35]. Precedenti studi hanno dimostrato che i ROS erano prodotti in modo eccessivo nel cancro orale [36, 37]. Anche in questo studio abbiamo scoperto che nelle cellule tumorali orali e negli xenotrapianti tumorali sono state generate elevate quantità di ROS. Studi sperimentali e clinici hanno illustrato gli effetti benefici della melatonina in molti tumori umani, come il cancro al seno, il cancro del colon-retto, il cancro ai polmoni, il melanoma e la leucemia [38]. L'effetto anticancerogeno della melatonina è positivamente associato alla sua azione antiossidante [39]. Nel presente studio, la melatonina ha notevolmente ridotto la produzione di ROS nelle cellule tumorali orali in vitro e in vivo, suggerendo che la melatonina provoca effetti antitumorali inibendo la generazione di ROS.

Una maggiore proliferazione e resistenza all'apoptosi sono caratteristiche vitali del cancro umano [31]. Prove crescenti hanno confermato che l'attivazione aberrante di Akt promuove la proliferazione e inibisce l'apoptosi delle cellule tumorali orali e regola le vie metaboliche cellulari necessarie per la crescita del tumore [42, 43]. Inoltre, il blocco della segnalazione Akt provoca l'apoptosi di un maggior numero di cellule tumorali orali [44]. In letteratura, la melatonina riduce la proliferazione e induce l'apoptosi delle cellule tumorali orali [45]. Coerentemente con questi rapporti, abbiamo scoperto che la melatonina ha ridotto significativamente la proliferazione e la resistenza all'apoptosi delle cellule tumorali orali tramite l'inattivazione di Akt in vitro e in vivo. L'aumento dei ROS induce la fosforilazione di Akt, portando così alla proliferazione delle cellule tumorali e all'evasione dell'apoptosi [8, 9]. Complessivamente, questi risultati hanno suggerito che la melatonina ostacola la proliferazione e innesca l'apoptosi delle cellule del cancro orale inattivando la segnalazione Akt ROS-dipendente.

Le metastasi locali e a distanza sono le principali cause di prognosi negativa del cancro orale [5]. EMT, un processo per cui le cellule epiteliali si spostano da fenotipo epiteliale a fenotipo mesenchimale e diventano altamente mobili, si propone di influenzare la migrazione delle cellule tumorali, l'invasione e la disseminazione metastatica [46]. La perdita di marcatori epiteliali, come E-caderina, e il guadagno dei marcatori mesenchimali, come Vimentina e SNAIL, sono i segni distintivi dell'EMT [47]. Nelle cellule di carcinoma squamoso orale umano l'attivazione della via biochimica di segnalazione AKT riduce il livello di E-caderina e sovraregola l'espressione di Vimentina [33]. Coerentemente ad altri studi, in questo lavoro, l'attivazione della via di segnalazione AKT è stata parallela all'aumento di delle proteine tipiche della EMT, come la proteina SNAIL e Vimentina e alla diminuzione di E-caderina (tipica invece di una cellula epiteliale) nelle cellule tumorali orali. In questo rapporto, la melatonina, similmente ad altri studi [32,48], ha ridotto la migrazione e l'invasione delle cellule tumorali orali, riducendo l'espressione di vimentina e SNAIL e la via di segnalazione AKT e ha invece determinato la sovraregolazione di E-caderina in vitro e in vivo. Tutti i dati suggeriscono che la melatonina può sopprimere le metastasi del cancro orale riducendo l'attivazione della via di segnalazione Akt attivata a sua volta da i ROS.

L'angiogenesi è un requisito fondamentale per le metastasi del cancro. Il VEGF è il fattore di crescita chiave che stimola l'angiogenesi [49]. HIF-1 $\alpha$  è un attivatore trascrizionale cruciale dell'espressione di VEGF legandosi al suo promotore [50]. HIF-1 $\alpha$  aumenta l'angiogenesi tumorale inducendo VEGF e altri fattori proangiogenici che contribuiscono a un fenotipo tumorale altamente aggressivo [51]. Le vie biochimiche di segnalazione che coinvolgono le proteine chinasi ERK e Akt sono essenziali per l'angiogenesi del cancro [52,21,53]. In questo studio, abbiamo dimostrato che nelle cellule tumorali del cancro orale, sia in vitro che in vivo, i fattori di crescita HIF-1 $\alpha$  e VEGF erano altamente sovraregolati. La melatonina ha inibito le vie di segnalazione biochimiche e diminuito notevolmente l'espressione di HIF-1 $\alpha$  e VEGF, e notevolmente ostacolato la formazione del vaso capillare da parte delle cellule endoteliali della vena ombelicale umana.

La validità della melatonina come agente oncostatico prominente e presente in natura è stata esaminata in termini di meccanismo d'azione oncostatico putativo, ma è stato indagato anche la correlazione tra i livelli di melatonina e l'attività neoplastica e l'esito della melatonina somministrata terapeutamente negli studi clinici. In letteratura, Lerner e Nordlund [55] hanno esaminato la farmacologia clinica della melatonina e hanno affermato che "La persona che riceve 200 mg di melatonina per via endovenosa al giorno per 5 giorni non ha evidenza di tossicità ritardata 18 anni dopo". Questa dose è l'equivalente, secondo una stima prudente, del contenuto di melatonina di circa un milione di pineali umane al giorno [56]. La melatonina sembra essere notevolmente non tossica e negli esperimenti sui ratti è stato impossibile trovare una LD50 orale, anche con dosi fino a 3200 mg / kg [57]. Negli esseri umani, 250 mg di melatonina assunti per via orale ogni 6 ore per 25-30 giorni non hanno mostrato effetti tossici su pressione sanguigna, frequenza cardiaca, ECG, emocromo, elettroliti o enzimi epatici e l'unico effetto collaterale riscontrato era la sonnolenza [58]. Di Bella et al. [59] hanno riportato successo con la terapia con melatonina in pazienti con linfoma, leucemia, cancro al seno, allo stomaco e ai polmoni e osteosarcoma. Lissoni e colleghi hanno condotto uno studio in cui sono state somministrate iniezioni di melatonina intramuscolare da 20 mg ogni 15 ore al giorno a pazienti con tumori solidi metastatici e le neoplasie sono state significativamente migliorate [60]. Secondo i rapporti precedenti, abbiamo ipotizzato che la concentrazione sperimentale di melatonina (40 mg / kg) in questo studio possibilmente non ha effetti tossici sui parametri fisiologici e potrebbe diventare clinicamente realizzabile. Tuttavia, sono necessari ulteriori studi clinici per verificare la speculazione.

## Conclusioni

In sintesi, la melatonina abolisce la proliferazione cellulare, la metastasi e l'angiogenesi promosse dai ROS nel cancro orale. Abbiamo scoperto che la melatonina sopprime la produzione di ROS nelle cellule del cancro orale. La melatonina inibisce la proliferazione e induce l'apoptosi delle cellule tumorali orali. La melatonina riduce la migrazione e l'invasione delle cellule tumorali orali mediante la repressione dell'EMT. Inoltre, la melatonina riduce l'angiogenesi del cancro orale. A livello molecolare, la melatonina esercita effetti antisopravvivenza e antimobilità inattivando la segnalazione Akt attivata a sua volta da i ROS ed esibisce la sua funzione antiangiogenesi bloccando le vie ERK e Akt attivate da ROS nel cancro orale. Insieme, questi risultati indicano che la riduzione dei ROS da parte della melatonina probabilmente fornisce una protezione terapeutica promettente contro il cancro orale.