

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Instituto de Biologia
Curso de Ciências Biológicas



Trabalho de Conclusão de Curso

Avaliação da importância do Bicarbonato de Sódio sobre a viabilidade das células DU145 tratadas com melatonina

Adriéle Silva

Pelotas, 2018

Adriéle da Silva

Avaliação da importância do Bicarbonato de Sódio sobre a viabilidade das células DU145 tratadas com melatonina

Trabalho de Conclusão de Curso apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Licenciatura em Ciências Biológicas.

Orientador: Izabel Cristina Custodio de Souza

Coorientador: Alessandra Cortês Teotonio

Pelotas, 2018

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

S586a Silva, Adriéle

Avaliação da importância do bicarbonato de sódio sobre a viabilidade das células DU145 tratadas com melatonina / Adriéle Silva ; Izabel Cristina Custodio de Souza, orientadora ; Alessandra Cortes Teotonio, coorientadora. — Pelotas, 2018.

37 f.

Trabalho de Conclusão de Curso (Licenciatura em Ciências Biológicas) — Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, 2018.

1. Câncer de próstata. 2. Linhagem celular DU145. 3. Melatonina. 4. Bicarbonato de sódio. I. Souza, Izabel Cristina Custodio de, orient. II. Teotonio, Alessandra Cortes, coorient. III. Título.

CDD : 616.99463

Adriéle da Silva

Avaliação da importância do Bicarbonato de Sódio sobre a viabilidade das células DU145 tratadas com melatonina

Trabalho de conclusão aprovado, como requisito parcial, para obtenção do grau de Licenciatura em Ciências Biológicas, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas.

Data da defesa: 30 de novembro de 2018

Banca Examinadora:

.....
Prof. Dra. Izabel Cristina Custodio de Souza (Orientadora), doutora em Ciências Biológicas: Bioquímica, pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

.....
Prof. Dr. André Peres Koth, doutor em Fisiologia pela Universidade Federal de Rio Grande.

.....
Prof. Me. Caroline Crespo da Costa, mestre em Saúde e comportamento pela Universidade Católica de Pelotas.

.....
Farm. Me. Priscila Centeno Crespo (Suplente), mestre em Bioquímica e Bioprospecção pela Universidade Federal de Pelotas.

Agradecimentos

Inicio esses agradecimentos salientando que aqui serão feitas algumas gratulações a pessoas que fizeram parte de toda a minha jornada acadêmica. Pessoas fundamentais para que eu chegasse ao final dessa longa caminhada.

Em primeiro lugar, agradeço a Universidade Federal de Pelotas por ter me dado a oportunidade de fazer um curso superior, de qualidade, totalmente gratuito. Assim como, ao Instituto de Biologia e a todos os professores que de alguma forma acrescentaram no meu trajeto.

Aos meus colegas que compartilharam comigo as mesmas angústias, tristezas e alegrias. Nossas “terapias em grupo” era o que me acalmava, saber que todos estávamos no mesmo “barco” era por vezes confortante. Saibam que vocês, até mesmo os mais distantes, foram essências para o comprimento desse trajeto.

A Daniela Rodriguero e a Priscila Voitg, vocês não imaginam o tamanho de importância que vocês tiveram nesse “meio fim” da universidade. Nunca mediram esforços para me ajudar no que fosse preciso, resolvendo, muitas vezes, os meus problemas como se fossem de vocês. Obrigada por terem compartilhado comigo essa jornada, quero levar vocês para toda a vida.

A Andreza Lautenschleger, por todos os cafés, incentivos, conversas, ajudas, companheirismo, trabalhos, provas em grupo e etc. Tu fosses o meu maior presente da graduação, de colega se tornou uma das melhores amigas que alguém pode ter. Com certeza te levarei para a vida toda. A Laura Barreto, sabemos que durante essa jornada tivemos “pendengas” e que por muitas vezes discordamos muito uma da outra, mas sempre superamos tudo, por que acima de tudo somos amigas. Tu está comigo desde os primeiros dias de aula e sempre foi aquela pessoa que eu tive certeza que poderia contar, que sempre esteve ao meu lado para tudo que eu precisei. Gurias, muito obrigada por sempre estarem comigo, desde o primeiro semestre, foram importantíssimas para o comprimento dessa etapa. Terei vocês ao meu lado como amigas para toda a vida.

A minha querida orientadora Izabel, por sempre ter solução para todos os meus problemas, por sempre me entender e estar ao meu lado, tenho certeza que fiz uma ótima escolha quando escolhi trabalhar contigo, obrigada por tudo. A Alessandra Cortes, por estar diretamente comigo, por me ensinar tudo que sei de cultivo celular e por ter essa paciência enorme comigo. A Ana Paula Ferreira, por todo tempo e ajuda dedicada ao meu trabalho. A Jéssica Obelar, por sempre estar disposta a me ouvir, me ajudar e me dar conselhos a tudo que se relacionava a este trabalho. A todo o grupo de Neuromodulação Celular (Neurocell) pelas contribuições e incentivos ao meu trabalho.

Aos meus amigos de fora da universidade por entenderem todas as minhas ausências, por sempre estarem me apoiando, incentivado e torcendo por mim. É maravilhoso saber que tenho vocês, que poderei sempre contar com vocês e que quando essa etapa acabar vocês ainda vão estar comigo para comemorar o final dessa e me incentivar a ir para a próxima etapa.

Ao Jonas Mathias Schmitd, por estar ao meu lado, por aguentar todos os meus “pitis” e crises, por ter paciência e por sempre me incentivar visando a minha melhora. Tuas cobranças por muitas vezes me deixavam irritada, mas hoje entendo que a tua intenção era o meu crescimento pessoal e profissional. Tu tens grande importância na conclusão da minha graduação e nas escolhas dos meus planos futuros, obrigada.

Às minhas irmãs, por acreditarem em mim e por dividirem a vida delas comigo. A Natali por estar presente desde o meu primeiro dia de vida, por nunca medir esforços para me defender e por encarar os meus problemas como fosse dela. Agradeço ela, também, por ter me dado o melhor presente que poderia me dar, o Pedro e a ele agradeço por existir, por me distrair e por me fazer sorrir nas horas difíceis da graduação. Helen, agradeço por todas as vezes que escutasse minhas explicações enquanto eu estudava, pelos desenhos que fez para mim, por se orgulhar e estar do meu lado em cada passo dessa jornada, saibas que quando for a tua vez estarei do teu lado em cada passo da tua caminhada assim como tu estive na minha. Gurias e Pedro amo vocês infinitamente.

Por fim, as duas pessoas mais importantes, aos meus pais por ter me dado a vida e por serem incansáveis na busca pela minha felicidade. Pai, obrigada por cada vez que levantou cedo para me levar a aula, pelo carinho e amor que sempre me

tratou, por se esforçar por mim, por se orgulhar e por me dar todo o suporte para que eu conseguisse chegar ao fim desse objetivo. Mãe, não tenho palavras para descrever o tamanho do orgulho que sinto da mulher que tu és. Obrigada por tudo que tu fizeste e fazes por mim e pelas gurias, por trabalhar tanto para poder nos proporcionar as melhores oportunidades na vida, pelas madrugadas que tu acordaste para me consular e ajudar, pelos doces que me trouxe quando eu estava triste e por tantas outras vezes. Palavras não são o suficiente para agradecer tudo que tu fazes por mim e pela minha felicidade. Pai e mãe, se não fosse vocês com certeza nada disso teria acontecido. Tudo isso é para vocês e por vocês, porque iniciamos juntos e chegamos ao fim dessa jornada juntos, assim conquistamos ela juntos. Isso é uma pequena tentativa de retribuir um terço do que vocês fizeram por mim. Amo vocês!!!

Resumo

SILVA, Adriéle. **Avaliação da importância do Bicarbonato de Sódio sobre a viabilidade das células DU145 tratadas com melatonina.** 2018. 36f. Trabalho de Conclusão de Curso, Instituto de Biologia - Graduação em Ciências Biológicas – Licenciatura, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2018.

Dentre os diferentes tipos de câncer existentes, o de próstata se destaca pelos altos números de morte e metástase celular. Existem diversos tipos de tratamento para câncer de próstata, entre eles, estão a quimioterapia a radioterapia, que além de apresentarem efeitos colaterais, na maioria dos casos, nem sempre se mostra eficiente, diante disso surge vários estudos de componentes que realmente reduza e impeça o crescimento destas células. Surgindo assim as pesquisas usando o hormônio melatonina. Desta forma, o estudo visa entender se o hormônio modifica a viabilidade celular de células de câncer de próstata da linhagem DU145, além de avaliar a importância do composto bicarbonato de sódio (NaHCO_3) (BS) no meio de cultura dessas células. Para isso, as células foram cultivadas com meio celular contendo e não contendo bicarbonato de sódio, após atingirem confluência, foram tratadas com melatonina nas concentrações de 1nM, 10nM, 100nM 1 μ M e 10 μ M em diferentes tempos, 24h, 48h, 72h, 120h e 240h, a viabilidade celular foi avaliada por meio do teste MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina). Os resultados demonstraram que na concentração a 10 μ M e no tempo de 120h foi onde ocorreram maiores reduções da viabilidade celular das células cultivadas nos dois meios de cultivo, além disso ocorreu uma maior redução de viabilidade celular em todos os tempos e concentrações nas células cultivadas em meio de cultura sem BS. Nossos estudos foram realizados na Faculdade de Odontologia, laboratório Núcleo de Biologia celular e tecidual (NCTBIO) e no laboratório de Neuromodulação celular (NEUROCELL), ambos da Universidade Federal de Pelotas.

Palavras-chave: câncer de próstata; linhagem celular DU 145; melatonina; bicarbonato de sódio.

ABSTRACT

SILVA, Adriéle. **Evaluation of the importance of sodium bicarbonate on the viability of DU145 cells treated with melatonin.** 2018, 36f Completion of course work, Institute of Biology - Undergraduate Degree in Biological Sciences, Federal University of Pelotas, Pelotas, 2018.

Among the different types of cancer, prostate cancer is characterized by a high number of cell death and metastasis. There are several types of treatment for prostate cancer, among them chemotherapy and radiotherapy, which in addition to presenting side effects, in most cases, is not always efficient, as a result, several studies of components have been performed that effectively reduce and prevent the growth of these cells. This way emerge the researches using the hormone melatonin. Thus, the study aims to understand if the hormone modifies the cell viability of prostate cancer of the DU145 line, in addition to evaluating the importance of sodium bicarbonate (NaHCO₃) (BS) in the culture medium of these cells. For this, the cells were cultured with cellular medium containing and not containing sodium bicarbonate, after reaching confluence, were treated with melatonin at the concentrations of 1nM, 10nM, 100nM 1µM e 10µM in different times, 24h, 48h, 72h, 120h e 240h, cell viability was assessed by means of the MTT test (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina). The results demonstrated that the concentration at 10µM and in the time of 120 h it was where greater reductions of the cell viability of the cultured cells occurred in the two culture media, in addition a greater reduction of cell viability occurred at all times and concentrations in the cultured cells in culture medium without BS. Our studies were carried out at the Faculty of Dentistry, Cellular and Tissue Biology Laboratory (NCTBIO) and Cellular Neuromodulation Laboratory (NEUROCELL), both of the Federal University of Pelotas.

Keywords: prostate cancer; DU 145 cell line; melatonin; sodium bicarbonate.

Lista de figuras

Figura 1	Localização da próstata (adaptada de Google imagens)	12
Figura 2	Representação esquemática da síntese de melatonina (adaptada de Google imagens)	15
Figura 3	Ferramentas utilizadas para busca de referencial teórico	16
Figura 4	Gráficos com os resultados do teste de viabilidade celular das células cultivadas sem a adição de NaHCO_3 no meio de cultura celular	23
Figura 5	Gráficos com os resultados do teste de viabilidade celular das células cultivadas com a adição de NaHCO_3 no meio de cultura celular	24
Figura 6	Gráficos comparativos dos resultados obtidos através do teste de viabilidade celular das células cultivadas nos dois tipos de meio celular	26

Lista de Abreviaturas e Siglas

ADT	Terapia de privação androgênica
AMP	Adenosina monofosfato
AR	Receptor de andrógeno
ATP	Trifosfato de adenosina
BS	Bicarbonato de sódio
CO ₃	Dióxido de carbono
CRPC	Câncer de próstata resistente à castração
CW22RV1	Linhagem celular de carcinoma epitelial de próstata
DHT	di-hidrotestotosterona
DU 145	Linhagem celular humana de tumor de próstata derivada de metástase cerebral
HG	Condições de hiperglicemia
HIF-1	Fator induzido por hipóxia 1
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
IB	Instituto de Biologia
INCA	Instituto nacional do câncer
LNCaP	Linhagem celular humana de tumor de próstata derivada de metástase do linfonodo
MCF-7	Linhagem celular de câncer de mama
MCPRC	Câncer de próstata metastático resistente à castração
MLT	Melatonina
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina
NaHCO ₃	Bicarbonato de sódio
NC	Condições normais de glicemia
NCTBIO1	Núcleo de biologia celular e tecidual 1
NEUROCELL	Neuromodulação celular
PC-3	Linhagem celular humana de tumor de próstata derivada de metástase óssea
Pca	Câncer de próstata
PI	Iodeto de propídio

PNTA1	Célula epitelial de próstata humana
PSA	Antígeno prostático específico
SHBG	Globulina de ligação hormonal sexual
TGF- β	Fator de transformação do crescimento beta
UCM1037	Análogo da melatonina
UFPEL	Universidade Federal de Pelotas
UV	Ultravioleta

Sumário

1. Introdução	12
1.1 Objetivos	16
1.1.1 Objetivo geral	16
1.1.2 Objetivo específico	16
1.2 Referencial teórico	16
2. Matérias e métodos	20
2.1 Local de execução do projeto.....	20
2.2 Cultivo Celular	20
2.3 Tratamento com MLT	20
2.4 Ensaio de viabilidade celular	21
2.5 Análise morfológica	21
2.6 Análise estatística	21
3. Resultados	22
3.1 Ensaio de viabilidade celular em meio de cultura sem a adição de bicarbonato de sódio	22
3.2 Ensaio de viabilidade celular em meio de cultura com a adição de bicarbonato de sódio	24
3.3 Comparação das células cultivadas em meio RPMI 1640 com e sem a adição do bicarbonato de sódio	25
4. Discussão	28
5. Conclusão	30
Referências	31

1. INTRODUÇÃO

A próstata é um órgão do sistema reprodutor masculino, que, em conjunto com outros órgãos do mesmo sistema, tem como função a produção do sêmen. Localiza-se a baixo da bexiga, anterior ao reto e posterior ao pênis como observa-se na figura1 (INCA, 2017).



Figura 1. Localização da próstata (Google imagens)

As células do tecido prostático aumentam, normalmente, a proliferação em resposta a hormônios androgênicos. A testosterona é o principal androgênio circulante na corrente sanguínea. Este hormônio ao ligar-se a albumina ou globulina dos hormônios sexuais (SHBG), nas células estromais, é convertido pela enzima 5-alfa-redutase em dihidrotestosterona (DHT). A DHT é um metabólito dez vezes mais potente que a testosterona, sendo um importante mediador do crescimento prostático. O DHT se liga aos receptores nucleares androgênicos e ativa a transcrição de fatores de crescimento mitogênicos em células estromais e epiteliais prostáticas, ativando a mitose (KAPLAN et al, 2006).

Quando ocorre um desequilíbrio na proliferação e diferenciação celular desse órgão, é o que chamamos de câncer. Essa doença surge em pessoas que tem predisposição genética e que se expõem a fatores de riscos, tais como tabagismo, alcoolismo, raios ultravioletas (UV) irregulares, entre outros (FRIESTINO, 2013).

O câncer de próstata (Pca) se destaca pela frequência em que ocorre, sendo a segunda maior causa de morte entre os homens. Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA) estima-se que no ano de 2018 tiveram 68.220 novos casos. Essa patologia, na maioria das vezes, apresenta crescimento lento, sendo quase sempre assintomático, mas mesmo apresentando sintomas, é de difícil diagnóstico (BARCELAR et al, 2015).

Porém, pode se desenvolver rapidamente, espalhando-se por outros órgãos e podendo levar o indivíduo à morte. A medida que o tumor aumenta, sintomas como, sangue na urina, dor ou sensação de queimação ao urinar, fluxo urinário fraco ou incapacidade de urinar, ou ainda, micção frequente (especialmente à noite) acompanhado de dores ósseas, em muitos casos, pode ocorrer uma infecção generalizada, até mesmo, insuficiência renal (Thompson et al, 2007).

O diagnóstico dessa neoplasia é realizado por meio de exame clínico, como por exemplo, toque retal e dosagem do andrógeno prostático específico (PSA), em níveis elevados em homens acometidos pela doença. Surgindo, muitas vezes, a necessidade de exames mais acurados como os histopatológicos (GLEASON, 1992; HEIDENREICH et al, 2014).

Os tumores em estágios avançados, respondem bem à terapia de privação de androgênios (ADT) no início do tratamento. No entanto, na maioria dos casos, a ADT torna-se não eficaz, pois o câncer volta a se desenvolver com maior invasibilidade. A ADT torna a próstata resistente à castração (CRPC), muitas vezes levando o paciente a óbito. Novos agentes terapêuticos, como, a abiraterona e enzalutamida, vem demonstrando uma maior eficácia em relação à CRPC. Entretanto, ainda não é suficiente, sendo necessário novas terapias. Além disso, estudos mostram que a quimioterapia antes ou associada às terapias hormonais, aumenta a taxa de sobrevivência e de cura (BELTRAN et al, 2018).

A maioria das causas de morte por câncer de próstata ocorrem devido à progressão para o distúrbio metastático. Aproximadamente 90% dos homens com tumor da próstata metastática resistente à castração (MCRPC) levam a metástase óssea, sendo o único local ativo em 86% dos pacientes, fatores ainda não bem esclarecidos. Acredita-se que possa estar relacionado aos processos bioquímicos e

fisiológicos favoráveis, como o fator de crescimento transformador beta (TGF- β) no tecido ósseo. Provavelmente, quimiocinas e citocinas, podem atuar como quimioatrativos para as células tumorais de próstata colonizando o tecido ósseo. As metástases em tecidos moles são menos comuns, atingindo cerca da metade dos pacientes (HESS et al. 2006; LOGOTHETIS et al. 2011; BRIGANTI et al. 2014; DENG et al. 2014).

Considerando a gravidade dessa doença, há muitos estudos *in vitro* utilizando linhagens celulares de tumores de próstata, tais como, PC-3, LNCaP e DU145. A linhagem celular LNCaP, é derivada de metástases dos linfonodos sendo dependente de androgênios. As outras duas linhagens são andrógeno independentes, apresentando características diferentes quando cultivadas.

Embora a linhagem PC-3 seja independente de androgênio, possui os receptores androgênicos, enquanto que, a e DU 145 não possui os receptores. Essas duas linhagens foram isoladas de metástases óssea e cerebral, respectivamente. As células da linhagem DU145, quando comparadas com as PC3, possuem moderado potencial metastático (GONDI et al, 2005; ALIMIRAH et al, 2006).

Diante da diversidade dos tratamentos existentes, como a quimioterapia e a radioterapia, os quais tem um forte efeito colateral e não são totalmente eficazes, surge com a pesquisa a possibilidade da utilização de um tratamento com um hormônio conhecido como Melatonina. Atuando como regulador do sistema neuroendócrino, bem como, o ritmo circadiano, sendo necessário para diversos processos fisiológicos em vertebrados (SOARES et al, 2011).

A melatonina é um hormônio não esteroide, uma indolamina produzida, principalmente, pela glândula pineal. É encontrada em muitos outros tecidos e órgãos, incluindo, retina, glândula de Harder, mucosa intestinal, cerebelo, epitélio das vias aéreas, fígado, rim, suprarrenais, timo, tireoide, pâncreas, ovário, corpo carotídeo, placenta, endométrio, mastócitos, célula natural killer, leucócitos, eosinófilos, plaquetas e células endoteliais (SINGH e JADHAH, 2014).

A produção da MLT ocorre somente a noite, por ser um hormônio fotossensível, ocorrendo somente um pré-processo de síntese durante o dia, caracterizado pela transformação do triptofano até a serotonina. A produção noturna da MLT ocorre pelo

sinal da enzima arilalquilamina N-acetiltransferase (AA-NAT), que é inativa na presença da luz, essa enzima transforma a serotonina em N-acetilserotonina que por ação da enzima 5-hidroxiindol-O-metiltransferase irá formar o hormônio (Figura 2) (SINGH e JADHAH, 2014).

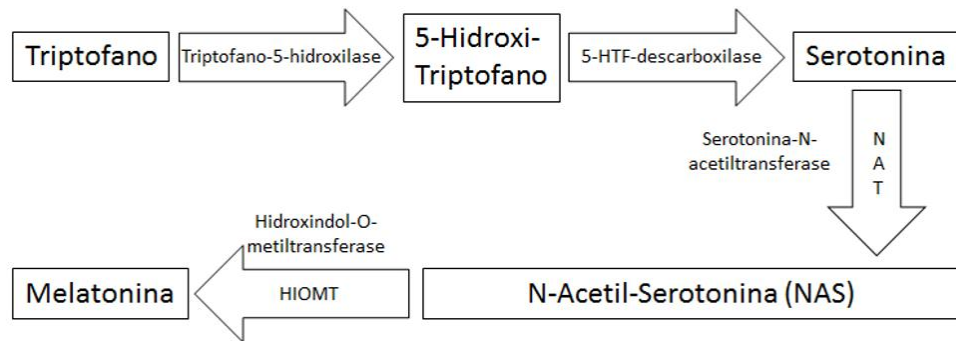


Figura 2. Representação esquemática da síntese de melatonina (adaptado do Google imagens).

Desta forma, muitas pesquisas associam que a ruptura no ritmo circadiano (alterações no sono), leva ao risco de desenvolver um câncer de próstata pela baixa produção de melatonina. Esta indolamina tem sido muito estudada devido ao seu potencial efeito antiproliferativo em células tumorais como MCF-7 (células de câncer da mama) e em células de câncer da próstata (LNCaP, Pc-3 e Du145). Portanto, o uso de melatonina pode ser um modulador para o câncer de próstata agindo indiretamente, por meio do ciclo do sono, ou diretamente nas células afetadas (SOARES et al, 2011).

Em busca de melhores condições para cultivar as células de câncer de próstata, algumas vezes, surge a necessidade de alterações protocolares. Dentre as quais, a inclusão de bicarbonato de sódio (BS) no meio de cultivo para a manutenção do pH das células. O bicarbonato de sódio (NaHCO_3) é um composto químico, se apresenta como um pó branco, solúvel em água e com sabor levemente alcalino. É classificado como um sal (PASQUALI, 2007).

O NaHCO_3 tem a ação de tampão e é utilizado para estabilizar o pH do meio de cultura contendo células em crescimento. As células em cultura produzem dióxido de carbono (CO_2) e requerem pequenas quantidades do composto NaHCO_3 para crescimento e sobrevivência. O CO_2 altera o pH do meio de cultura, em níveis

elevados, diminui o pH do meio, mas quando reduzido, eleva o pH do meio (PASQUALI, 2007).

1.1 Objetivo

1.1.1 Objetivo geral

Avaliar a importância do bicarbonato de sódio no meio de cultura de células de câncer de próstata da linhagem DU145 tratadas com melatonina.

1.1.2 Objetivo específico

Comparar o tratamento com MLT em células DU145, na presença e na ausência de NaHCO_3 nos seguintes parâmetros:

-Avaliação do efeito de diferentes tempos (24h, 48h, 72h, 120h e 240h) e concentrações (1nM, 10nM, 100nM, 1 μ M e 10 μ M) de melatonina nas células DU145 sobre viabilidade celular por meio de MTT;

2.1 Referencial teórico

O referencial teórico do presente trabalho se baseou em duas combinações de palavras chaves (*Melatonin and DU145* e *Prostate Câncer and Melatonin*), utilizando cinco sites de busca diferentes (PubMed, Lilacs, Cochrane, MedLine, Scielo). Conforme ilustrado na figura 3.

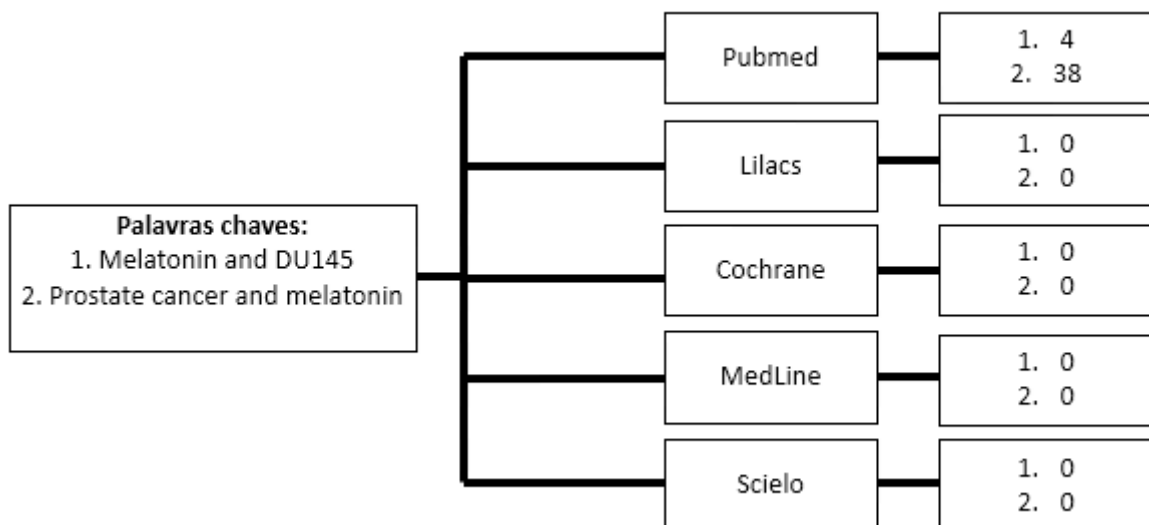


Figura 3. Ferramentas utilizadas para busca de referencial teórico

Hevia e colaboradores (2017) analisaram o papel da MLT na captação da glicose em concentrações altas (1mM de glucose-6-fosfato) e sem a adição de glicose em linhagens de células sensíveis (LNCaP) e não sensíveis (PC3) a androgênio, utilizaram a concentração de 1mM de MLT. Os autores demonstraram que essa concentração de melatonina durante 24 e 48 horas de tratamento levou a uma redução na captação da glicose em ambas as linhagens. Além disso, em condições onde o açúcar não foi adicionado, o hormônio reduziu a relação ATP/AMP. Este trabalho mostrou que, metabolicamente, a melatonina limita a glicólise aeróbica, o ciclo do ácido tricarboxílico e a via das pentoses fosfato em células de câncer de próstata sensíveis a androgênio. Sendo assim, o estudo sugere que a redução da captação da glicose é um dos principais alvos da MLT em células de Pca.

Em estudos realizados por, Gobbo e colaboradores (2015), foi demonstrado a influência da MLT sob condições hiperglicêmicas (HG), com 450mg/Dl de glicose, e em condições normais (NC) no processo de proliferação e apoptose de células de linhagens de Pca dependentes (22Rv1) e independentes (PC3) de androgênio, bem como, em linhagens de células epiteliais da próstata humana (PNTA1). Foi utilizado as concentrações de 500µM, 5mM e 10mM de MLT, durante 24h e 48h. Os resultados mostraram que as células PNTA1 não foram alteradas pela MLT sob NC, porém a incubação de 24h sob HC e com tratamento na concentração de 10mM de MLT, diminuiu o número de mitoses. A linhagem 22Rv1 mostrou uma diminuição na proliferação celular, após 24h de exposição a 5mM de MLT sob as duas condições. Em células PC3 a concentração de 500µM de MLT sob NC por 24 h favoreceu a proliferação de celular, após 48 h, o MLT na molaridade mais alta diminuiu as células viáveis. Quando incubadas em HG por um dia teve apresentou uma ação sinérgica associada à MLT de maneira dose-dependente, este efeito foi aumentado 48h após a adição de MLT, principalmente na concentração de 10mM. Com isso nesse trabalho foi demonstrado que a MLT apresenta efeitos proliferativos e antiapoptóticos em Pca em HG e que o inverso ocorre em NC.

Estudos mostraram os efeitos da serotonina e da MLT na regulação do crescimento maligno e na atividade de dois receptores de serotonina (5HTR1 e 5HTR1b) em linhagens de Pca (DU145, PC-3, LNCaP e 22RV1). Nos experimentos, os autores utilizaram duas concentrações de melatonina a de 10^{-11} M e 10^{-3} M. Os resultados mostraram que a expressão de mRNA de 5HTR1b foi maior que a de

5HTR1a e serotonina mostrou um efeito estimulante de crescimento significativo em todas as linhagens, além disso, a MLT inibiu a viabilidade apenas em células PC3. De forma semelhante, o antagonista de 5HTR1a induziu alterações apoptóticas nas células PC3 apenas a 10^{-3} , enquanto o antagonista de 5HTR1b induziu necrose nessa concentração em todas as linhas celulares. Noto-se, também, Alterações do ciclo celular células PC3 e DU145 sob a influência do antagonista de 5HTR1a. Desta forma, a pesquisa mostrou que a MLT possui um papel importante na regulação do desenvolvimento dessa patologia (Pirozhoki et al., 2010).

Hevia e colaboradores (2010) desenvolveram um método analítico simples para detecção e quantificação de MLT dentro de células normais e cancerígenas. Para isso foi realizado análises cromatográficas líquidas de alta performance (HPLC) após a extração do hormônio de amostras biológicas. Utilizando quatro linhas celulares humanas, normais e de câncer de próstata. O método foi útil para quantificar a MLT em todos os tipos de células estudadas, avaliando a estabilidade do hormônio nas condições experimentais. Além disso, o uso do método permitiu a confirmação de que as concentrações intracelulares de MLT são diferentes dependendo do tipo de célula. O trabalho mostrou que células androgênio dependentes incubadas por 6 h com MLT, apresentavam concentrações citoplasmáticas maiores em relação as independentes de androgênio. Este fato explica, porque a MLT apresenta maiores propriedades antitumorais em células LNCaP, dependentes de androgênio, comparadas a células PC-3 ou DU145, independentes de androgênio. Além disso, quando a concentração intracelular de MLT está aumentada, suas propriedades antitumorais são melhores.

Recentemente Calastretta e colaboradores (2018), testaram um análogo da melatonina (UCM 1037) em quatro (4) linhagens celulares de Pca, LNCaP e 22Rv1 (sensíveis ao androgênio) e DU145 e PC-3 (não sensíveis ao androgênio). Os pesquisadores analisaram o efeito da molécula na proliferação celular, no ciclo celular e citotoxicidade. Nas células tratadas com a melatonina a expressão da proteína MT1 foi maior nas células LNCAP, intermediária nas células DU145 e menor nas PC-3 e 22Rv1, a proteína MT2 foi expressa somente nas células PC-3 e DU145. A expressão do receptor de androgênio (AR) foi observada em células LNCaP e 22Rv1 (sensíveis a androgênio). O ensaio de viabilidade celular mostrou que o UCM 1037 tem um efeito antiproliferativo tempo e dose dependente, na concentração de 10^{-4} M o efeito foi maior nas células sensíveis ao androgênio, reduzindo significativamente o número de

células dessas linhagens quando comparadas ao grupo controle no tempo de 48 horas a 72 horas. Nas células independentes de androgênio, a proliferação celular foi menor na mesma dose e tempo de tratamento, mas os resultados não foram significativos. Análises utilizando o iodeto de propídio (PI) revelou um acúmulo significativo e tempo dependente de células LNCaP e 22Rv1 na região sub-G1 do ciclo celular, após tratamento com o análogo da melatonina UCM 1037, sendo indicativo de apoptose e/ou necrose. Em contraste, o UCM 1037 apresentou um aumento apenas rápido da população de células PC3 e DU 145 em sub-G1. Nas células sensíveis ao androgênio, foi evidente um efeito citotóxico, já nas células não sensíveis ao androgênio, os efeitos citotóxicos não foram tão evidentes.

Tendo em vista que o câncer de próstata é a doença que mais acomete os homens no mundo, é de extrema importância, o estudo para entender as vias de sinalização envolvidas no processo de metástase. Assim como, avaliar a importância dos compostos envolvidos no crescimento celular através da adição ao meio de cultivo, nesse trabalho o bicarbonato de sódio. Espera-se, ao concluir este estudo, obter um melhor entendimento de aspectos morfológicos e bioquímicos no desenvolvimento do tumor de próstata. Desta forma, contribuindo para buscar terapias que inibam a proliferação de células tumorais de próstata.

2. MATÉRIAS E METODOS

2.1 Local de execução do projeto

O trabalho foi realizado no laboratório de cultivo celular núcleo de biologia celular e tecidual (NCTBIO I) da Faculdade de Odontologia e no Laboratório de Neuromodulação celular (NeuroCell) do departamento de morfologia/IB da Universidade Federal de Pelotas/RS (UFPel).

2.2 Cultivo celular

A linhagem celular DU 145 foi cultivada em garrafas de 75 cm³, mantidas em meio RPMI 1640 (Sigma Aldrich – R6504), suplementado com 10% Soro Fetal Bovino(SFB) (GIBCO), 1% de penicilina e estreptomicina, 1µl/ml de fungizone, Hapes e com(1g/l)/sem bicarbonato de sódio e incubadas a 37°C e 5% CO₂. Após atingir 90 - 100% de confluência as células foram lavadas com salina (PBS 1% pH 7,2- Ref. 700/3-032) e tripsinizadas (tripsina/EDTA - Ref. 25200-072) para congelamento e/ou tratamento.

2.3 Tratamento com MLT

As células foram plaqueadas em placas de 24 poços e incubadas por 72 horas para atingirem confluência celular. Após esse período, foram tratadas com o hormônio Melatonina (Sigma Ref. CAS 7331-4) em diferentes concentrações 1nM, 10nM, 100nM, 1µM e 10M por 24h, 48h, 72h 120h e 240h.

2.4 Ensaio de Viabilidade Celular

O ensaio de viabilidade celular foi realizado por meio do método do brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium]- MTT (Sigma Ref.M2128). As culturas de células foram incubadas a 37°C e 5% CO₂ com seus tratamentos. Após o tempo de tratamento, foi retirado 10 µL de meio celular e adicionado 10 µL da solução de MTT em cada poço das placas tratadas. Após 4 horas em incubação a 37°C com 5% CO₂, o MTT foi retirado junto com meio, descartado e adicionado 200 µL de DMSO para solubilização das células. A leitura das placas foi realizada por meio do método de ELISA em espectrofotômetro (Termo plate® TP-READER) em 595 nm.

2.5 Análises Morfológicas

O aspecto morfológico das células foi monitorado durante todo experimento em microscópio de luz invertido.

2.6 Análise estatística

Os dados foram apresentados como média, erro padrão da média e submetidos à análise de variância (ANOVA) de uma via seguido do teste Post Hoc de Tukey. Foram considerados significativos os valores de $p < 0,05$. Todas as análises foram realizadas com o programa estatístico SPSS (Statistical for Social Science-Version 18.0 Inc., Chicago, IL, EUA).

3. RESULTADOS

3.1 Ensaio de viabilidade celular em meio de cultura sem a adição de bicarbonato de sódio

O ensaio de viabilidade celular foi realizado utilizando a solução de MTT, em células DU145 cultivadas com meio RPMI 1640 sem a adição de bicarbonato de sódio. Tratadas com melatonina nas concentrações de 1nM, 10nM, 100nM, 10µM e 10µM nos tempos de 24h, 48h, 72h, 120h e 240h, os resultados estão apresentados na figura 4 (A, B, C, D, E).

Em relação ao tempo de 24 horas o tratamento com o hormônio não foi observado um resultado significativo em nenhuma das concentrações estudadas. No entanto, no tempo de 48 horas, nas concentrações de 100nM, 1uM e 10uM de MLT, observou-se uma redução na viabilidade celular. No tempo de 72h, houve uma diminuição na viabilidade celular nas duas maiores concentrações de MLT e no tempo de 120h esse mesmo resultado foi observado em todas as concentrações testadas. Contudo, no tempo de 240h os resultados não foram estatisticamente significativos, mas ocorreu um pequeno aumento na viabilidade celular quando comparado ao tempo de 120h.

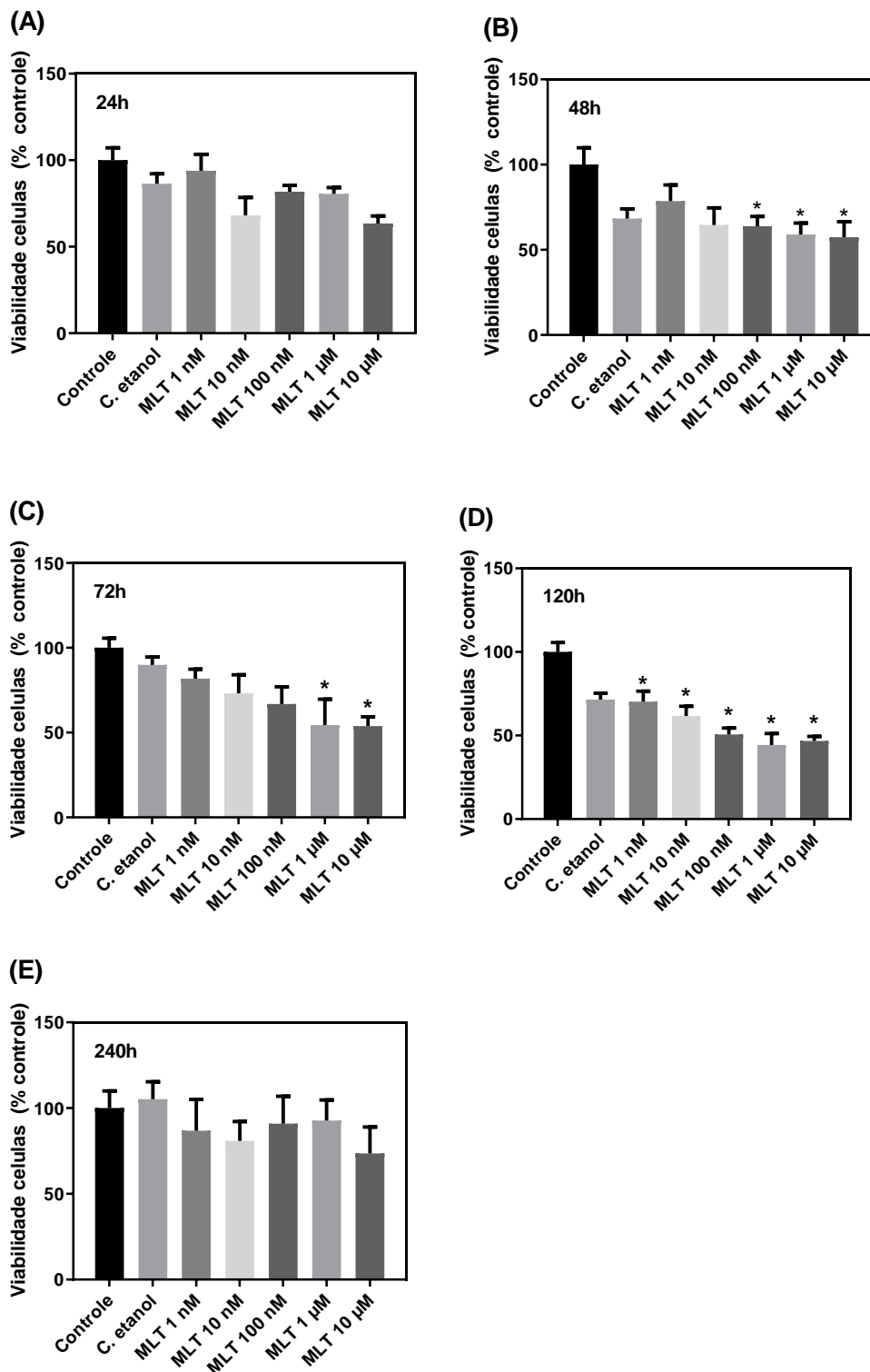


Figura 4: Análise da viabilidade celular por MTT. Dados apresentados pela média \pm erro da média, analisado pelo one-way ANOVA TUKEY, foram considerados significativos os valores de $p < 0,05$ em relação ao grupo controle (*). Relação do efeito da MLT (1nM, 10nM, 100nM, 1 μ M e 10 μ M, controle total e controle etanol em células de câncer de próstata DU145

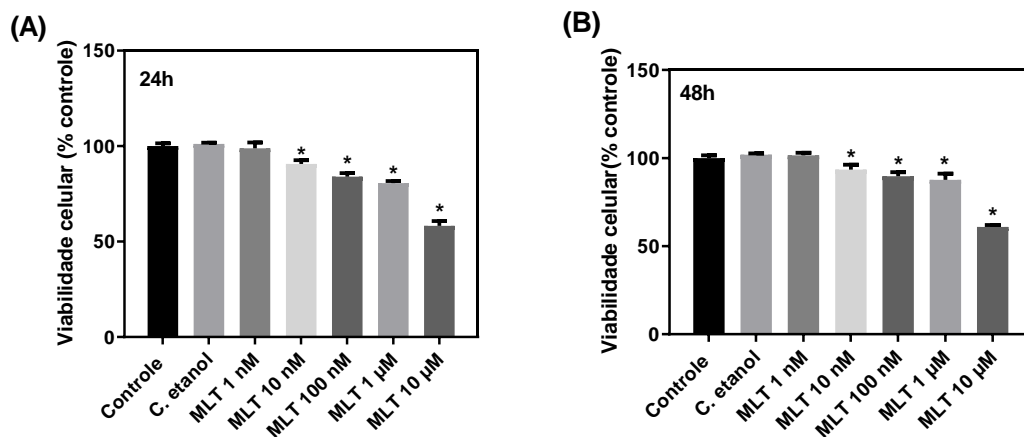
cultivadas em meio celular sem a adição de bicarbonato de sódio, nos tempos de 24h (A), 48h (B), 72 (C), 120h (D) e 240h (E).

3.2 Ensaio de viabilidade celular em meio de cultura com a adição de bicarbonato de sódio

O ensaio de viabilidade celular foi realizado utilizando a solução de MTT, em células DU145 cultivadas com meio RPMI 1640 com a adição de bicarbonato de sódio. Tratadas com melatonina nas concentrações de 1nM, 10nM, 100nM, 10 μ M e 10 μ M nos tempos de 24h, 48h, 72h, 120h e 240h, os resultados estão apresentados na figura 5 (A, B, C, D, E).

Nossos resultados mostraram que no tempo de 24h, 48h, 120h e 240h ocorreu uma redução significativa na viabilidade celular nas concentrações de melatonina a partir de 10nM, entretanto, no tempo de 72h essa redução da viabilidade celular iniciou a partir na concentração de 100nM.

O estudo mostrou que o tempo de 120h foi o que apresentou a melhor e maior relação tempo-dependente na redução da viabilidade celular. Embora o tempo de 240h tenha mostrado resultados significativos no aumento da viabilidade celular em comparação ao tempo de 120h foi menor (Figura 5 - A, B, C, D, E).



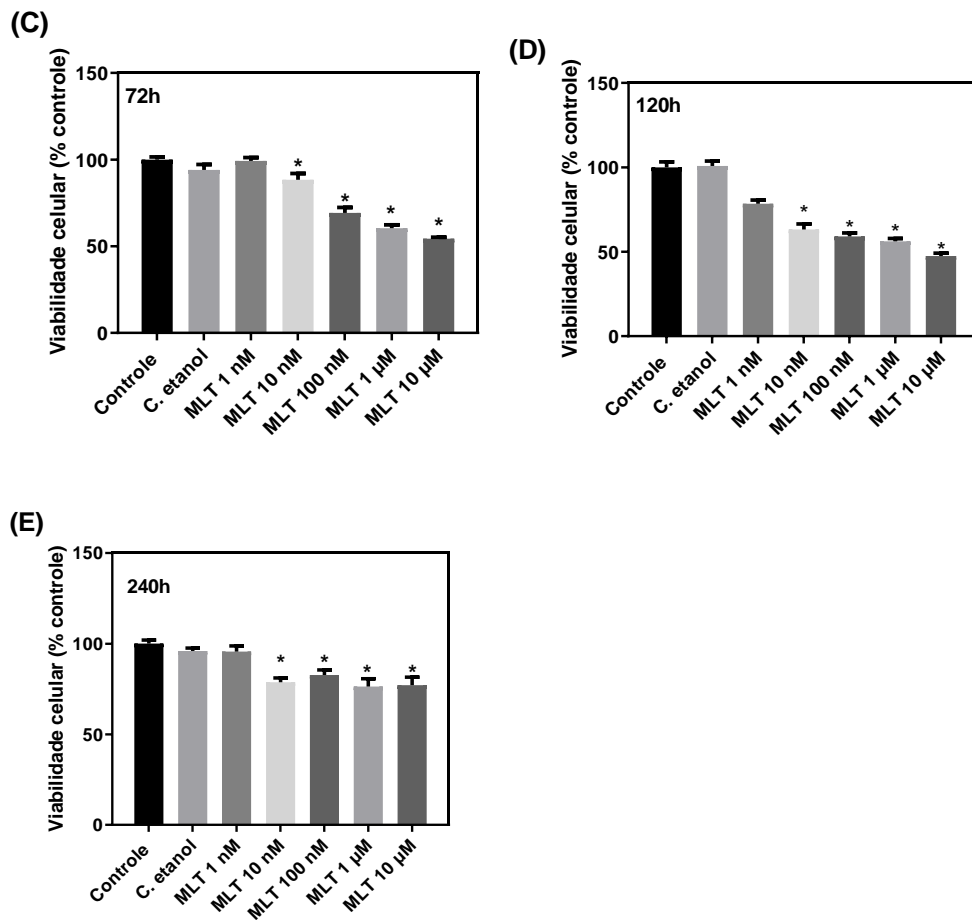


Figura 5: Análise da viabilidade celular por MTT. Dados apresentados pela média \pm erro da média, analisado pelo one-way ANOVA TUKEY, foram considerados significativos os valores de $p < 0,05$ em relação ao grupo controle (*). Relação do efeito da MLT (1nM, 10nM, 100nM, 1 μ M e 10 μ M), controle total e controle etanol em células de câncer de próstata DU145 cultivadas em meio celular com a adição de bicarbonato de sódio, nos tempos de 24h (A), 48h (B), 72 (C), 120h (D) e 240h (E) (adaptação de Cortes e colaboradores, 2018).

3.3 Comparação das células cultivadas em meio RPIM 1640 com e sem adição de bicarbonato de sódio

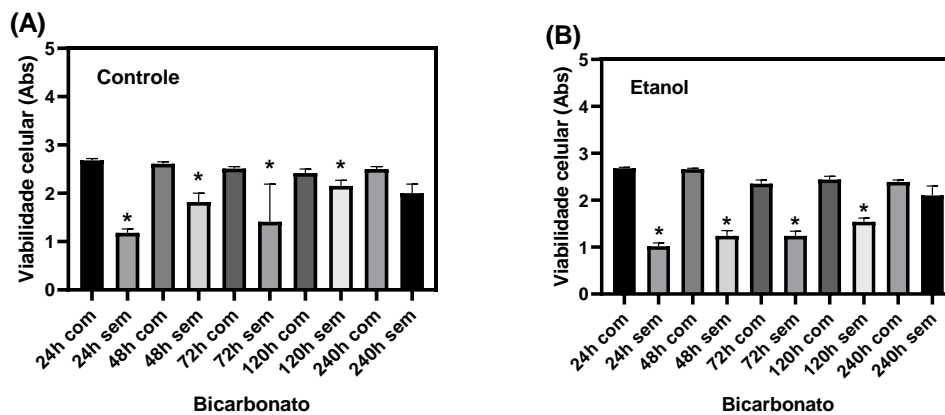
Resultados obtidos nos testes de comparação de células cultivadas em meio celular com e sem bicarbonato de sódio tratadas em diferentes tempos (24h, 48h, 72h 120h e 240h) e doses de melatonina (1nM, 10nM, 100nM, 1 μ M e 10 μ M).

Nossos resultados mostraram que o grupo controle das células cultivadas em meio na presença e ausência de bicarbonato de sódio, no tempo de 24 horas de tratamento houve uma diferença significativa na viabilidade celular do meio sem em relação ao com bicarbonato de sódio. O mesmo resultado foi observado durante 48h,

72h, e 120h de tratamento. Porém, o tempo de 240 horas não foram observados resultados significativos (Figura 6 A). Não houve diferença significativa entre controle e controle-etanol sem e com bicarbonato de sódio no meio de cultura (Figura 6 B).

Em relação a concentração de 1nM de MLT observou-se uma diminuição significativa na viabilidade celular das células sem bicarbonato de sódio quando comparadas as com o sal. Esse resultado foi significativo em todos os tempos de tratamentos, exceto, em 120 horas (Figura 6 C).

Os resultados utilizando a concentração de 10nM mostrou uma diminuição na viabilidade celular das células cultivadas sem bicarbonato de sódio nos três primeiros tempos de tratamento (24h, 48h e 75h) quando comparadas as cultivadas com bicarbonato de sódio (Figura 6 D). O mesmo resultado foi encontrado nas concentrações de 100nM, 1 μ M e 10 μ M (Figura 6 E, F e G).



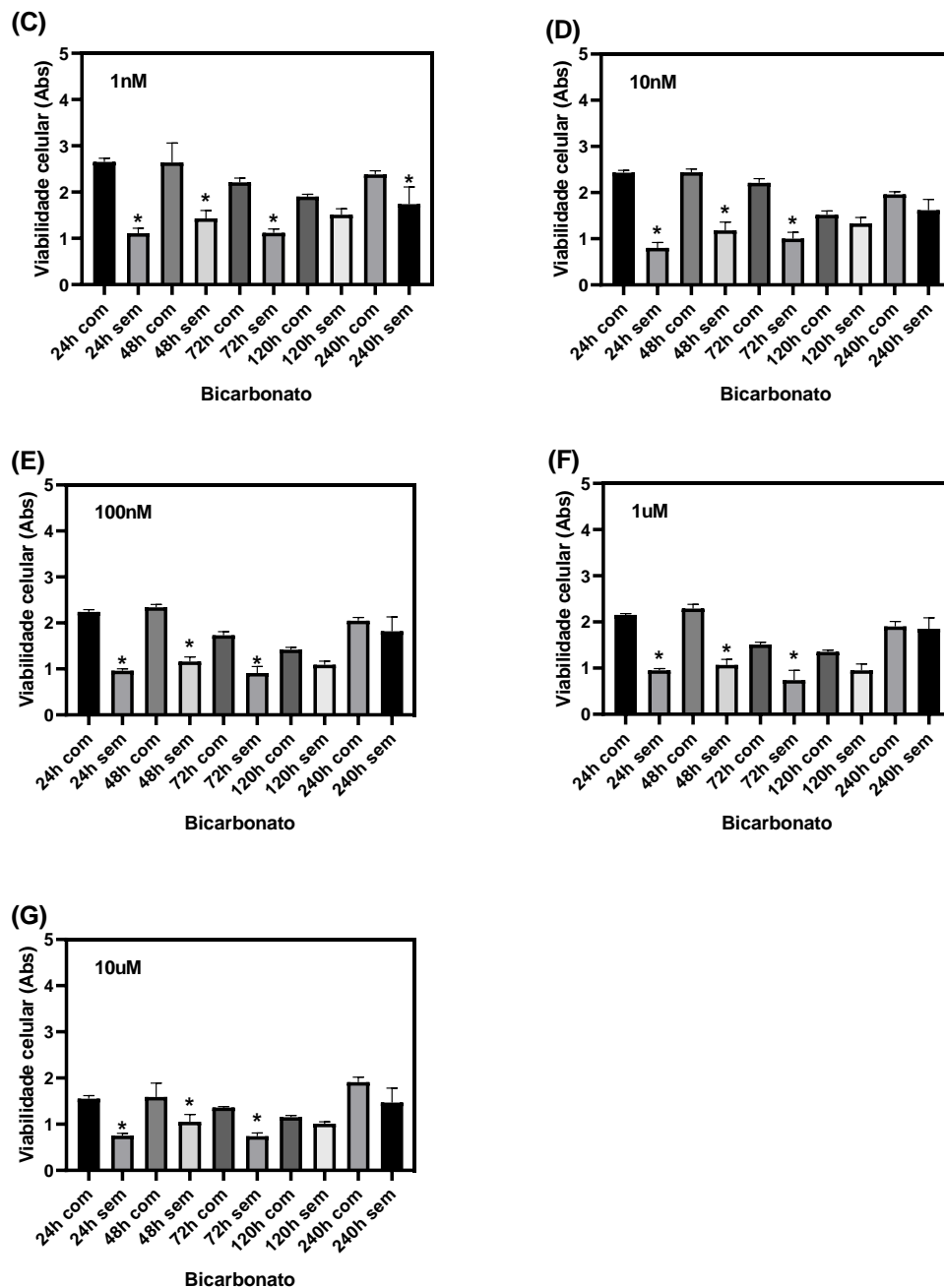


Figura 6: Análise comparativa da viabilidade celular por MTT. Dados apresentados pela média \pm erro da média, analisado pelo one-way ANOVA e TUKEY, foram considerados significativos os valores de $p < 0,05$ em relação ao grupo cultivado com a presença de bicarbonato de sódio (*). Comparação dos diferentes tempos (24h, 48h, 72h, 120h e 240h) entre o grupo controle total (A), controle-etanol (B) e diferentes concentrações de MLT, 1nM (C), 10nM (D), 100nM (E), 1µM (F) e 10µM (G), em ausência e presença de bicarbonato de sódio.

4. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos nas análises bioquímicas forneceram subsídios para a comparação entre o meio de cultura para as células DU145 na ausência e presença do Bicarbonato de sódio. A comparação determinou a importância da manutenção do pH alcalino do meio na proliferação celular e na redução da apoptose. Os dados experimentais demonstraram que a ausência do bicarbonato de sódio resultou na acidez do meio, o que, provavelmente, favorece a degradação da matriz extracelular, o que é corroborado pelo estudo de McIntyre et al. (2016).

A melatonina vem exercendo um efeito antitumoral em células DU145, nas duas condições de cultivo, com/sem bicarbonato de sódio, o que corrobora com o que diz no trabalho de Bizzari e colaboradores, no qual confirma o efeito antitumoral do hormônio em células cancerígenas. Porém ocorre diferenças na taxa de viabilidade celular em células cultivadas em meio de cultura com ausência e presença de bicarbonato de sódio.

Hevia (2010) diz em seu trabalho que as células DU 145 levam um tempo maior para internalizar o hormônio. Além disso, Jung-Hynes (2017) diz que o efeito antitumoral da MLT aumenta progressivamente de acordo com a concentração do hormônio.

A ausência de BS está relacionada com a manutenção da alcalinidade do meio, já que a atividade metabólica das células está em sua fase inicial e, portanto, não apresenta acidez do meio. O que foi observado no tempo de 24h nos nossos estudos (GORBATENKO et al. 2014).

Conforme aumenta o tempo de exposição o metabolismo celular já produz um início de acidificação do meio. Este fator associado a ausência do bicarbonato de sódio fornece indícios de favorecimento da atividade antitumoral da melatonina, o que se mostra presente no tempo de 48h e 72h. (MCINTYRE et al., 2016; GORBATENKO et al., 2014).

Ocorreu uma diminuição da viabilidade celular nos dois tipos de meio de cultivo, porém essa diminuição se mostrou mais acentuada na ausência de bicarbonato de sódio. Podemos relacionar que ausência de Bicarbonato de sódio no meio de cultivo associado acidez produzida pelo metabolismo celular favoreceram positivamente a ação antiproliferativo da melatonina (SWIETACH et al. 2007).

A figura 4 E evidencia uma diminuição de atividade da MLT em todos as concentrações, este resultado pode estar relacionado a troca do meio de cultura realizada, o que favoreceu o crescimento da cultura celular. Visto que, os metabólitos ácidos do meio foram removidos resultando em uma similaridade nas condições ideais de cultivo o entre os tempos de 24h e 240h. Assim, foram devolvidas as condições ótimas de crescimento celular ao meio de cultura (MCINTYRE et al., 2016).

Os controles com e sem etanol apresentaram redução na viabilidade celular nos grupos sem bicarbonato, mesmo na ausência de melatonina, quando comparados com os grupos com bicarbonato de sódio. Indicando que o bicarbonato favorece o crescimento das células tumorais por estabilizar a alcalinidade do meio, o que representa uma condição ideal de cultivo como reportado pelos autores McIntyre et al. (2016), Swietach et al. (2007), Faes et al. (2016).

Gorbatenko et al. (2014) destaca que o bicarbonato de sódio reduz seu efeito tampão conforme aumentar o tempo de exposição. O que justifica a não significância da comparação dos tratamentos em todas as concentrações de melatonina no tempo de 120horas por este ter apresentado a maior redução na viabilidade celular dos tratamentos em células cultivadas com bicarbonato de sódio.

Zhang (2018) demonstra que o bicarbonato de sódio atua na reversão da acidez do meio extracelular provocado pelo metabolismo celular funcionando como um tampão alcalino, corroborando os resultados obtidos neste estudo. Diante disso percebe-se que o composto é necessário para o crescimento celular, mas que a sua ausência durante o tratamento a, provavelmente, aumenta a atividade da MLT.

5. CONCLUSÃO

Com esse estudo podemos concluir que o bicarbonato de sódio é essencial para o cultivo celular, pois ele, juntamente com outros compostos, torna o meio celular em condições ideais para o crescimento e desenvolvimento celular. Além disso, percebemos que as células tratadas com MLT que foram cultivadas em meio sem a adição de bicarbonato de sódio obtiveram uma maior diminuição da viabilidade celular, sendo assim, provavelmente, o meio sem bicarbonato de sódio exerce melhores condições a MLT para que ela aumente seus efeitos na redução da viabilidade celular. Sendo assim, o NaHCO_3 pode reduzir o efeito antitumoral da melatonina. Entretanto, serão necessários estudos para que essa hipótese realmente seja comprovada e para entender todos os mecanismos envolvidos nesse processo.

REFÊRENCIAS

ALIMIRAH, F.; CHEN, J.; BASRAWALA, Z.; XIN, H.; CHOUBEY, D. DU145 and PC3 human prostate cancer cell lines express androgen receptor: Implications for the androgen receptor functions and regulation. **Federation of European Biochemical Societies**. V. 580, ed. 9, p. 2294-2300, 2006.

BARCELAR, A. J. J.; MENEZES, C. S.; BARBOSA, C. A.; FREITAS, G. B. S.; SILVA, G. G.; VAZ, J. P. S.; OLIVEIRA, T. M. Câncer de próstata: métodos de diagnóstico, prevenção e tratamento. **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research**, v. 10, n. 3, p. 40-46, 2015.

BELTRAN, H.; BEER, T. M.; CARDUCCI, M. A.; DE BONO, J.; GLEAVE, M.; HUSSAIN, M.; KELLY, W. K.; SAAD, F.; STERNBERG, C.; TAGAWA, S. T.; TANNOCK, I. F. New therapies for castration-resistant prostate cancer: efficacy and safety. **European Urology**, v. 60, ed. 2, p. 279-290, 2011.

BELTRAN, H.; LI, Q.; DENG, Q.; CHAO, H. P.; LUI, X.; YUE, L.; LIN, K.; LIU, K.; CALHOON-DANIS, T.; HUANG, J.; RUBIN, M. A.; SHEN, J.; CHATTA, G.; PUZANOVI, S.; MOHLER, J. L.; WANG, J.; ZHAO, R.; KIRK, J.; CHAI, X.; TANG, D. G. Linking prostate cancer cell AR heterogeneity to distinct castration and enzalutamide responses. **Nature communications**. V. 9, ed. 1, n. 3600, p. 110-127, 2018.

BIZZARI, M.; PROIETTI, S.; CUCINA, A.; REITER, R. J. Molecular mechanisms of the pro-apoptotic actions of melatonin in cancer: a review. **Expert opinion on therapeutic targets**, v. 17, ed. 12, p. 1438-1496.

BRIGANTI, A.; SUARDI, N.; GALLINA, A.; ABDOLLAH, F.; NOVARA, G.; FICARRA, V.; MONTORSI, F. Predicting the risk of bone metastasis in prostate cancer. **Cancer Treatment reviews**, v.40, n.1, p.3-11, 2014.

CALASTRETTI, A.; GATTI, G.; LUCINI, U.; DUGNANI, S.; CANTI, G.; SCAGLIONE, F.; BEVILACQUA, A. Melatonin analogue antiproliferative and cytotoxic effects on human prostate cancer cells. **International Journal of molecular Science**. V. 19, ed. 5, p. 1-15, 2018.

CORTES, A. T. Avaliação de marcadores bioquímicos e de viabilidade celular em diferentes tempos e doses de melatonina na linhagem DU145. 2018, 71f. (Dissertação: mestrado em Bioquímica e Bioprospecção) Centro de ciências químicas, farmacêuticas e de alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas 2018.

DE BONO, J.S.; LOGOTHETIS, C. J.; MOLINA, A.; FIZAZI, K.; NORTH, S.; CHU, L.; CHI, K.N.; JONES, R.J.; GOODMAN, O.B. M. Abiraterone and increased survival in metastatic prostate cancer. **The new England journal of medicine**, v. 364, n.21, p. 1995–2005, 2011.

DENG, X.; HE, G.; LIU, J.; LUO, F.; PENG, X.; TANG, S.; GAO, Z.; LIN, Q.; KELLER, J.M.; YANG, T.; KELLER; E. T. Recent advances in bone-targeted therapies of metastatic prostate cancer. **Cancer Tratament reviews**, v. 40, n.6, p.730–738, 2014.

FAES, S.; DUVAL, A. P.; PLANCHE, A.; ULDRY, E.; SANTORO, T.; PYTHOUD, C.; STEHLE, J.; HORLBECK, J.; LETOVANEC, IGOR.; RIGGI, N.; DEMARTINES, N.; DORMOND, O. Acidic tumor microenvironment abrogates the efficacy of mTORC1 inhibitors. **Molecular cancer**, v. 10, ed. 2, p. 101-112.

FRIESTINO, J. K. O.; REZENDE, R.; LORENTZ, L. H.; SILVA, O. M. P. Mortalidade por câncer de próstata no Brasil: Contexto histórico. **Revista Baiana de Saúde Pública**, Bahia, v. 37, n.3, p. 688-701, 2013.

GLEASON, D.F. Histologic grading of prostate cancer: A perspective. **Hum Pathol**, v. 23, n. 2, p. 273-279, 1992.

GOBBO, M. G.; DIZEVI, N.; ABRAHAMSSON, P. A.; BERTILSSON, P.; MASITELI, V. S.; PYTLOWANCIV, E. Z.; TABOCA, S. R.; GOES, R. M. Influence of Melatonin on the Proliferative and Apoptotic Responses of the Prostate under Normal and Hyperglycemic Conditions. **Journal of diabetes research**. V. 2015, p. 18. 2015.

GORBATENKO, A.; OLESEN, C. W.; BOEDTKJER, E.; PEDERSEN, S. F. Regulation and roles of bicarbonate transporters in cancer. **Frontiers in physiology**, v. 5, ed. 13, p. 130-145, 2014.

HEIDENREICH, A., P. J.; BASTIAN, F. EAU guidelines on prostate cancer. Part II: Treatment of advanced, relapsing, and castration-resistant prostate cancer. **European Urology**. V. 65, n.2, p. 467-479, 2014.

HESS, K.R.; VARADHACHARY, G. R.; TAYLOR, S. H.; WEI, W.; RABER, M. N.; LENZI, R.; ABBRUZZESE, J. L.; Metastatic patterns in adenocarcinoma. **Cancer**, v. 106, ed. 7, p. 1624-1633, 2006.

HEVIA, D.; GONZALEZ-MENDEZ, P.; FERNANDEZ-FERNANDEZ, M.; CUETO, S.; RODRIGUEZ, P. G.; GARCIA, J. L. A.; MAYO, J. C.; SAINZ, R. M. Melatonin decreases glucose metabolism, in prostate cancer cells: A¹³C stable isotope resolved metabolomic study. **International journal of molecular Sciences**. V. 18, ed. 8, n.1626, p. 100-119, 2017.

HEVIA, D.; GONZALEZ-MENDEZ, P.; QUIROS-GONZÁLES I.; Melatonin uptake through glucose transporters: a new target for melatonin inhibition of cancer. **Journal of pineal research**, v. 50, ed. 2, p. 234-250

HEVIA, D.; MAYO, J. C.; QUIROS, C.; GOMEZ, C.; SAINZ, R. M. Monitoring intracellular melatonin levels in human prostate normal and cancer cells by HPLC. **Analytical and bioanalytical chemistry**. V. 397, ed. 3, p. 1235-1244, 2010.

INCA, Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Próstata. Disponível em:
<<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/prostata>>. Acesso em: 28 set. 2018.

JUNG-HYNES, B.; SCHMIT, T. L.; REAGAN-SHAW, S. R.; SIDDIQUI, I. A.; MUKHTAR, H.; AHMAD, N. Melatonin, a novel Sirt1 inhibitor, imparts antiproliferative effects against prostate cancer in vitro in culture and in vivo in TRAMP model. **Journal of pineal research**, v. 50, ed. 2, p. 140-149.

KAPLAN, S. A. J. D.; MCCONNELL, A. Combination therapy with doxazosin and finasteride for benign prostatic hyperplasia in patients with lower urinary tract symptoms and a baseline total prostate volume of 25 ml or greater. **Journal urology**, v.175, n.1, p. 217-220, 2006.

MCINTYRE, A.; HULIKOVA, A.; LEDAKI, I.; SNELL, C. Disrupting hypoxia-induced bicarbonate transport acidifies tumor cells and suppresses tumor growth. **University of Oxford**, 2016.

MURALIKRISHNA, P. S.; GONDI, C. S.; LAKK, S.S; JULTA, A.; ESTES, N.; GUJRATI, C. M.; RAO, J. S. RNA interference- directed knockdown of urokinase plasminogen activator and urokinase plasminogen activator inhibits prostate cancer cell invasion, survival and tumorigenicity in vivo. **Journal of Biological chemistry**. V.230, ed. 43, p. 36529-36540, 2005.

PARK, J. W.; HULANO, M. S.; BAEK, W. K. Melatonin down-regulates HIF-1 alpha expression through inhibition of protein translation in prostate cancer. **Journal of pineal research**. V. 46, ed. 4, p. 415-421, 2009.

PASQUALI, I.; BETTINI, R.; GIORDANO, F. Thermal behaviour of diclofenac, diclofenac sodium and sodium bicarbonate compositions. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 90, ed. 3, p. 903-907, 2007.

PIROZHOK, I.; MEYE, A.; HAKENBERG, O. W.; FUESSEL, S.; WIRTH, M. P. Serotonin and melatonin do not play a prominent role in the growth of prostate cancer cell lines. **Urologia internationalis**. V. 84, ed. 4, p.452-460, 2010.

SINGH, M.; JADHAH, H. R.; Melatonin: functions and ligands. **Drug Discovery today**. V. 19, e. 9, p.1410-1418, 2014.

SOARES, J. M.; FERREIRA, C. S.; MAGANHIN, C. C.; SIMÕES, R. S.; CASTELLO, M. J B.; BARACAT, E. C. Melatonina: modulador de morte celular. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v.56, n.6, p.715-718, 2010.

SWIETACH, P.; RICHARD D.; VAUGHAN, J.; HARRIS, A. L. Regulation of tumor pH and the role of carbonic anhydrase 9. **Cancer Metastasis**, v. 29, ed. 1, p. 299-310.

THRASHER, J. B.; BURNETT A. L.; AUS, G.; CANBY-HAGINO, E. D.; COOKSON, M. S.; D'AMICO, A. V.; DMOCHOWSKI, R. R.; ETON, D. T.; FORMAN, J. D.; GOLDENBERG, S. L.; HERNANDEZ, J.; HIGANO, C. S.; KRAUS, S.; LIEBERT, M.; MOUL, J. W.; TANGEN, C.; THOMPSON, I. Erectile function outcome reporting after

clinically localized prostate cancer treatment. **The journal of urology**, v.178, ed. 2, p. 597-601, 2007.

THRASHER, J. B.; BURNETT A. L.; AUS, G.; CANBY-HAGINO, E. D.; COOKSON, M. S.; D'AMICO, A. V.; DMOCHOWSKI, R. R.; ETON, D. T.; FORMAN, J. D.; GOLDENBERG, S. L.; HERNANDEZ, J.; HIGANO, C. S.; KRAUS, S.; LIEBERT, M.; MOUL, J. W.; TANGEN, C.; THOMPSON, I. Guideline for the management of clinically localized prostate cancer: 2007 update. **The journal of urology**, v. 177, ed. 6, p. 2106-2131, 2007.

ZHANG, H. Will cancer cells be defeated by sodium bicarbonate? **HHS Public Access**, v. 60, ed. 3, p. 326-328, 2018.