



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**  
Campus de São José do Rio Preto

Tialfi Bergamin de Castro

A melatonina e seus metabólitos como marcadores prognósticos em  
neoplasias mamárias humanas

São José do Rio Preto  
2017

Tialfi Bergamin de Castro

A melatonina e seus metabólitos como marcadores prognósticos em  
neoplasias mamárias humanas

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biociências, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Financiadora: FAPESP - Proc.2015/02935-2

Orientadora: Profa. Dra. Debora Ap Pires de

Campos Zuccari

Coorientador: Eduardo Alves Almeida

São José do Rio Preto  
2017

Castro, Tialfi Bergamin de.

A melatonina e seus metabólitos como marcadores prognósticos em neoplasias mamárias humanas/ Tialfi Bergamin de Castro. -- São José do Rio Preto, 2017

95f. : il.

Orientador: Debora Ap Pires de Campos Zuccari

Coorientador: Eduardo Alves Almeida

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Câncer. 2. Mamas – Câncer. 3. Melatonina. I. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. II. Título.

CDU – 616-006

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE  
UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto

Tialfi Bergamin de Castro

A melatonina e seus metabólitos como marcadores prognósticos em  
neoplasias mamárias humanas

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biociências, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Financiadora: FAPESP - Proc.2015/02935-2

Comissão Examinadora

Profa. Dra. Debora Ap Pires de Campos Zuccari  
UNESP – São José do Rio Preto  
Orientadora

Prof. Dr. Angelo Gustavo Zucca Matthes  
Hospital do Câncer de Barretos – Barretos

Profa. Dra. Eny Maria Goloni Bertollo  
FAMERP – São José do Rio Preto

Prof. Dr. Luis Octávio Regasini  
UNESP – São José do Rio Preto

Prof. Dr. Sebastião Roberto Taboga  
UNESP – São José do Rio Preto

São José do Rio Preto  
31 de outubro de 2017

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Investigação Molecular do Câncer (LIMC) na Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP), SP, Brasil, sob orientação da Profa. Dra. Debora Ap. Pires de Campos Zuccari. Os recursos para o desenvolvimento do projeto foram obtidos na forma de Reserva Técnica de bolsa de estudos da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) concedida ao aluno.

## Sumário

<b>RESUMO.....</b>	<b>X</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>XII</b>
<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>13</b>
<b>ARTIGOS .....</b>	<b>15</b>
<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>57</b>
<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>65</b>
<b>BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>67</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>73</b>
<b>ANEXO I METODOLOGIA.....</b>	<b>74</b>
<b>ANEXO II TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO .....</b>	<b>79</b>
<b>ANEXO III QUESTIONÁRIO APLICADO.....</b>	<b>81</b>

## **Dedicatória**

Dedico este trabalho a minha esposa Bruna que sempre me apoiou em tudo e sempre foi o meu combustível para exercer o melhor de mim na minha vida e no trabalho.

## **Agradecimentos**

Primeiramente agradeço a minha família por sempre me apoiar em minha carreira como pesquisador.

Agradeço também a minha esposa amada que sempre está ao meu lado me apoiando e me ajudando, sempre.

Agradeço a Professora Debora Zuccari que sempre me orientou.

Sou grato também aos meus amigos de laboratório que sempre me ajudaram.

Agradeço ao professor Luis Alberto Beraldo de Moraes, responsável pelo Laboratório de Espectrometria de Massas da USP-Ribeirão Preto e ao técnico Eduardo Crevelin pela abertura das portas do laboratório e ajuda com as análises.

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelos meses de bolsa concedidos.

Agradeço a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de doutorado (Processo FAPESP nº 2015/02935-2), que foi essencial para o desenvolvimento deste projeto e sua conclusão.



## **Epígrafe**

“Agradeço todas as dificuldades que enfrentei; não fosse por elas, eu não teria saído do lugar. As facilidades nos impedem de caminhar. Mesmo as críticas nos auxiliam muito. ”

**Chico Xavier**

## Prefácio

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Investigação Molecular no Câncer (LIMC) da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP) e no Laboratório de Espectrometria de Massas da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (FFCLRP – USP).

O aluno realizou o projeto com bolsa CAPES (novembro de 2013 a junho de 2015) e bolsa FAPESP (Proc nº 2015/02935-2 - julho de 2015 a outubro de 2017).

O projeto de doutorado intitulado **“A melatonina e seus metabólitos como marcadores prognósticos em neoplasias mamárias humanas”** teve como objetivos avaliar os níveis séricos de melatonina e seus metabólitos AFMK e AMK em mulheres com carcinoma mamário, mulheres em quimioterapia e mulheres que trabalham a noite e comparar com mulheres sem histórico de câncer. Também foram avaliadas as expressões do receptor de melatonina MT1 e do transportador de glicose GLUT1 em tumores mamários através de imunohistoquímica.

Para a defesa de tese apresentamos os manuscritos **“Lower levels of melatonin in women with breast cancer”** e **“Immunohistochemical expression of melatonin receptor MT1 and glucose transporter GLUT1 in human breast cancer”**.

## RESUMO

O câncer de mama é a principal causa de mortes relacionadas ao câncer em mulheres e pesquisas têm sido focadas em identificar e validar biomarcadores que podem ser utilizados para confirmar o diagnóstico e determinar o prognóstico. Mudanças no ritmo circadiano podem contribuir para o desenvolvimento do câncer e sendo assim, a melatonina, um hormônio sintetizado pela glândula pineal à noite, na ausência de luz e seus metabolitos AFMK e AMK são sugeridos como potenciais biomarcadores. A melatonina pode atuar através do receptor MT1 regulando cinases e a expressão de genes específicos relacionados a proliferação, angiogênese, diferenciação celular e transporte de glicose. A expressão elevada de GLUT1 (Glucose Transporter-1) está associada ao prognóstico ruim no câncer. Os objetivos deste estudo foram comparar os níveis de melatonina, AFMK e AMK em mulheres recentemente diagnosticadas com câncer de mama, mulheres em quimioterapia adjuvante, enfermeiras que trabalham à noite em comparação com mulheres saudáveis e hábitos normais e avaliou-se a expressão do receptor MT1 e GLUT1 em tumores de mama e correlacionou com os subtipos moleculares, características patológicas e prognóstico. Foi coletado sangue de 53 mulheres com câncer de mama sendo 47 sem tratamento e 6 em quimioterapia adjuvante, 19 mulheres saudáveis sendo 10 enfermeiras de turno noturno e 9 mulheres de hábitos normais. Os compostos foram quantificados por espectrometria de massas. Para a expressão de MT1 e GLUT1 foi realizada imunohistoquímica em 42 tumores de mama. Os resultados mostraram que mulheres com câncer de mama tiveram níveis menores de melatonina em comparação com mulheres de hábitos normais ( $p < 0.01$ ), níveis ainda mais baixos em enfermeiras que trabalham no período noturno e em pacientes em quimioterapia adjuvante ( $p < 0.01$ ). Não houve diferença significativa nos níveis de AFMK e AMK entre os grupos ( $p > 0.05$ ). Além disso, pacientes com metástase apresentaram níveis elevados de melatonina e AFMK ( $p = 0.02$  e  $p = 0.01$ , respectivamente) e altos níveis de AFMK estavam presentes quando linfonodos estavam acometidos ( $p = 0.04$ ), pacientes com

tumores maiores que 20mm e que dormem com luz à noite ( $p=0.02$  e  $p=0.007$ , respectivamente). Na análise imunohistoquímica, alta expressão do MT1 foi associada ao subtipo Luminal A, melhor prognóstico ( $p<0.05$ ) e em tumores RE+ ( $p=0.002$ ), enquanto que a expressão elevada de GLUT1 foi associada ao triplo-negativo, pior prognóstico ( $p<0.05$ ), tumores maiores que 20mm ( $p=0.004$ ) e baixa em tumores RE+ ( $p=0.003$ ). Em conclusão, nossos resultados mostram menores níveis de melatonina em pacientes com câncer de mama e apontam para o benefício da suplementação de melatonina como proteção para mulheres que trabalham à noite o que poderia reduzir o risco de desenvolvimento de câncer de mama. Os resultados da imunohistoquímica indicam que o MT1 e o GLUT1 podem ser utilizados como marcadores prognósticos e são potenciais alvos para o tratamento do câncer de mama. De acordo com os resultados pode-se concluir que a quebra do ciclo circadiano e, portanto, alterações nos níveis de melatonina e a expressão de MT1 e GLUT1 podem estar relacionadas com o risco de desenvolvimento e prognóstico do câncer de mama.

**Palavras-chave:** Câncer. Câncer de mama. Melatonina. AFMK. AMK. MT1. GLUT1.

## **ABSTRACT**

*Breast cancer is the leading cause of cancer-related deaths in women and researches has been focused on identify and validate biomarkers that can be used to confirm the diagnosis and determine the prognosis. Changes in circadian rhythm may contribute to the development of cancer and thus melatonin, a hormone synthesized by the pineal gland at night, in the absence of light and its metabolites AFMK and AMK are suggested as potential biomarkers. Melatonin can act through the MT1 receptor by regulating kinases and the expression of specific genes related to proliferation, angiogenesis, cell differentiation and glucose transport. High GLUT1 (Glucose Transporter-1) expression is associated with poor prognosis in cancer. The objectives of this study were to compare the levels of melatonin, AFMK and AMK in women newly diagnosed with breast cancer, women on adjuvant chemotherapy, health nurses which work at night compared to healthy women and normal habits and the expression of MT1 receptor and GLUT1 in breast tumors and correlated with molecular subtypes, pathological features and prognosis. Blood from 53 women with breast cancer was collected, 47 of them without treatment and 6 in adjuvant chemotherapy, 19 healthy women, 10 of them night shift nurses and 9 women of normal habits. Compounds were quantified by mass spectrometry. For the expression of MT1 and GLUT1, immunohistochemistry was performed in 42 breast tumors. The results showed that women with breast cancer had lower levels of melatonin compared to normal women ( $p < 0.01$ ), even lower levels in nurses working at night and in adjuvant chemotherapy ( $p < 0.01$ ). There was no significant difference in AFMK and AMK levels between groups ( $p > 0.05$ ). In addition, patients with metastasis had high levels of melatonin and AFMK ( $p = 0.02$  and  $p = 0.01$ , respectively) and high levels of AFMK were present when lymph nodes were affected ( $p = 0.04$ ), patients with tumors larger than 20mm and who sleep with light at night ( $p = 0.02$  and  $p = 0.007$ , respectively). In the immunohistochemical analysis, high MT1 expression was associated with the Luminal A subtype, with a better prognosis ( $p < 0.05$ ) and in ER + tumors ( $p = 0.002$ ), whereas high GLUT1*

*expression was associated with triple negative, worse prognosis ( $p < 0.05$ ), tumors greater than 20mm ( $p = 0.004$ ) and low in ER + tumors ( $p = 0.003$ ). In conclusion, our results show lower levels of melatonin in breast cancer patients and point to the benefit of melatonin supplementation as protection for women who work at night which could reduce the risk of developing breast cancer. The results of immunohistochemistry indicate that MT1 and GLUT1 can be used as prognostic markers and are potential targets for the treatment of breast cancer. According to the results it can be concluded that the breakdown of the circadian cycle and, therefore, changes in melatonin levels and the expression of MT1 and GLUT1 may be related to the risk of development and prognosis of breast cancer*

**Keywords:** Cancer. Breast cancer. Melatonin. AFMK. AMK. MT1. GLUT1.

## **INTRODUÇÃO**

# INTRODUÇÃO

## I. CÂNCER DE MAMA

Câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado (maligno) de células que invadem os tecidos e órgãos, podendo espalhar-se (metástase) para outras regiões do corpo. Estas células tendem a ser muito agressivas e incontroláveis, determinando a formação de tumores (acúmulo de células cancerosas) ou neoplasias malignas. O carcinoma mamário é o câncer mais frequentemente diagnosticado e a principal causa de morte por câncer em mulheres no Brasil e no mundo, e, segundo o Instituto Nacional do Câncer, desde 1979 os dados mostram que isso tem agravado. Para 2016, estimou-se a ocorrência de 57960 casos novos de câncer da mama, com um risco estimado de 56,2 casos a cada 100 mil mulheres (INSTITUTO NACIONAL DO CANCER, 2016).

Esta doença é considerada heterogênea com múltiplas variações fenotípicas e moleculares, necessitando de uma grande variedade de tratamentos que podem conduzir a diferentes respostas (WEI et al., 2013). Os métodos diagnósticos atuais se limitam principalmente a procedimentos invasivos, como biópsias de tecido, e mesmo após o diagnóstico, o prognóstico pode não ser conclusivo, uma vez que as células tumorais podem adquirir resistência a determinado tratamento, o que favorece o crescimento tumoral, invasão e metástase (PARK et al., 2010). Dessa forma, marcadores específicos podem ser utilizados para determinar características específicas do tumor,



identificando pacientes que se beneficiarão com tratamentos específicos (PEREZ, 2011).

Nesse sentido, com o avanço de técnicas que viabilizam o mapeamento das expressões gênicas e proteicas de tecidos foram possíveis a detecção e a distinção de diferentes perfis de neoplasias mamárias. Essas alterações estão diretamente associadas com prognóstico, resistência à quimioterapia, terapia hormonal e proliferação celular (ROSS et al., 2009).

A positividade para o receptor de estrógeno (RE), por exemplo, é um fator preditivo de resposta ao quimioterápico Tamoxifeno, porém, os tumores chamados triplo-negativos, (RE-, RP- e HER2-) são caracterizados por um pior prognóstico, uma vez que não respondem a tratamentos específicos, relacionando-se à ocorrência de metástases e menor sobrevida das pacientes. Já o uso de Trastuzumabe (Herceptin) em pacientes com câncer de mama que apresentam superexpressão da proteína HER2 é um exemplo de sucesso da terapia-alvo com anticorpos monoclonais. Esses dados mostram a importância da expressão de um ou mais imunomarcadores como uma informação útil, e muitas vezes conclusiva, na prática clínica (THOMAS; BERNER, 2000), permitindo que estratégias de tratamento sejam definidas de maneira mais eficaz e com menor toxicidade (DUFFY; O'DONOVAN; CROWN, 2011; GONZALEZ-ANGULO; MORALES-VASQUEZ; HORTOBAGYI, 2007; HICKS; KULKARNI, 2008).

A classificação prognóstica atual considera, além dos subtipos histológicos, os subtipos moleculares (PEROU; BORRESEN-DALE, 2011),

caracterizados nos seguintes fenótipos: Luminal A (receptor de estrogênio (RE) positivo e/ou receptor de progesterona (RP) positivo, receptor do fator de crescimento epidermal 2 negativo (HER2) negativo e Ki67<14%); Luminal B (RE<sup>+</sup> e/ou RP<sup>+</sup>, HER2<sup>+</sup> e Ki67>14%); Triplo-negativo (RE<sup>-</sup>, RP<sup>-</sup>, HER2<sup>-</sup>, citoqueratina 5/6<sup>+</sup> e/ou HER1<sup>+</sup>) e HER2-superexpresso (RE<sup>-</sup>, RP<sup>-</sup>, HER2<sup>+</sup>).

O subtipo luminal A tem baixa taxa de proliferação e é acompanhado de um bom prognóstico. O luminal B tem alta taxa de proliferação e um prognóstico mais pobre que o luminal A. A expressão do RE e RP, por exemplo, está associada ao melhor prognóstico da doença (BARDOU et al., 2003; DUFFY; O'DONOVAN; CROWN, 2011). O HER2 tem expressão alterada em aproximadamente 10-15% dos casos. Nesse contexto, o status do HER2 e dos receptores hormonais, RE e RP, são fatores prognósticos e preditivos que foram incorporados à rotina clínica e permitem que se estabeleça um tratamento individualizado (HSIAO et al., 2010).

Muitos esforços foram direcionados à identificação de genes e proteínas como marcadores prognósticos do câncer, no entanto, informações sobre o perfil metabólico de células tumorais ou tecidos são limitadas. Embora alterações genéticas tenham sido amplamente caracterizadas em câncer de mama, alterações metabólicas ainda são pouco conhecidas (CLAUDINO et al., 2007; GRIFFIN; KAUPPINEN, 2007; YANG et al., 2017).

Assim, como uma abordagem alternativa para a descoberta de biomarcadores, a metabolômica permite a identificação de metabólitos em fluidos biológicos e tecidos (LINDON et al., 2004; NICHOLSON; WILSON, 2003).

Alguns estudos têm demonstrado que existem alterações metabólicas específicas de células tumorais, que podem auxiliar no diagnóstico e prognóstico da doença (BATHEN et al., 2007; SITTER et al., 2006; YANG et al., 2007). As alterações metabólicas ocorrem em decorrência de alterações genômicas e proteômicas em diferentes tipos de tumores mamários. Portanto, o metaboloma reflete alterações no estado fisiopatológico dos sistemas biológicos (FIEHN, 2002). Este campo de estudo é uma grande promessa pois fornece uma visão abrangente sobre o metabolismo da célula do câncer, levando a possibilidade de potenciais terapias personalizadas (PIRMAN et al., 2013).

Até agora, abordagens metabolômicas têm sido utilizadas para uma grande variedade de aplicações como detecção precoce de doenças, resposta a fármacos e toxicidade, estudos de nutrição e sistemas biológicos, além de serem utilizadas em linhagens de células de câncer de mama e tecidos, com foco na identificação de alterações em vias metabólicas (CLAYTON et al., 2006; GOWDA et al., 2008; GRIFFIN; KAUPPINEN, 2007; SERKOVA; NIEMANN, 2006; SREEKUMAR et al., 2009; ZHANG et al., 2008). Em comparação com outros estudos de potenciais biomarcadores para o câncer, a metabolômica proporciona uma forte ligação entre genótipo e fenótipo, e pode fornecer algumas informações sobre a oncogênese. Outro ponto positivo é que uma vez estabelecidos, testes com base nos perfis metabólicos são relativamente de baixo custo, rápidos e podem ser automatizados (SPRATLIN; SERKOVA; ECKHARDT, 2009).

Desta forma, foram desenvolvidas tecnologias para quantificar diversos metabólitos, permitindo a análise completa do metabolismo, como a cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-MS), cromatografia líquida em espectrometria de massas (LC-MS) e ressonância magnética nuclear (RMN). Tais técnicas em conjunto com análises estatísticas multivariadas fornecem informações sobre um grande número de metabólitos, incluindo aqueles que tiveram seus níveis alterados entre indivíduos saudáveis e doentes, inclusive pacientes com câncer (LANZA et al., 2010; PAN; RAFTERY, 2007; ZHANG et al., 2012).

## **II. MELATONINA**

Atualmente, um dos metabólitos que pode ser candidato a biomarcador e fator de diferenciação dos subtipos do câncer de mama é a melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina), o principal hormônio sintetizado pela glândula pineal. A melatonina possui um papel regulador sobre eventos fisiológicos, metabólicos e comportamentais, importante na regulação de fenômenos endócrinos independentes do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal, termorregulação, regulação do sistema cardiovascular, ciclos de atividade-reposo e vigília-sono, sistema imunológico, crescimento e envelhecimento (MAGANHIN et al., 2008). A melatonina pode atuar por meio de receptores de membrana acoplados a proteína G, denominados MT1 e MT2. Esses receptores são encontrados em diversos tecidos, incluindo mama, sistema nervoso central, trato gastrointestinal,

pulmão, pele, glândula adrenal, coração, vasos sanguíneos, células do sistema imune, entre outros (DUBOCOVICH; MARKOWSKA, 2005).

A melatonina também pode atuar por mecanismos independentes de seus receptores de membrana, exibindo propriedades anti-inflamatórias (TAHAN et al., 2011), e antioxidantes, diretamente pela neutralização de efeitos deletérios promovidos por radicais livres (MEDIAVILLA et al., 2010) e pelo aumento da expressão gênica e/ou atividade de enzimas antioxidantes (RODRIGUEZ et al., 2004). Ainda, por ser lipossolúvel, a melatonina pode atravessar diretamente qualquer membrana celular e interagir com proteínas intracelulares, como a calmodulina, e com receptores nucleares (SÁNCHEZ-BARCELÓ et al., 2005)

Além disso, a melatonina pode exercer efeito inibitório na atividade da enzima aromatase no tecido mamário neoplásico (SÁNCHEZ-BARCELÓ et al., 2005), inibir a atividade da enzima telomerase (SOUSA-NETO, J.A.; SCALDAFERRI, 2005), aumentar a imunidade local (LUCHETTI et al., 2010) e a expressão de genes supressores tumorais (ALLEGRA et al., 2003; DAI et al., 2008) além de alterar o comportamento de melanócitos em melanoma (KIM et al., 2015).

Sua produção segue um padrão rítmico, com pico secretório no período noturno, atingindo níveis plasmáticos máximos entre 03:00 e 04:00 horas em humanos, e quase nenhuma produção no período diurno (ESPINO; PARIENTE; RODRÍGUEZ, 2012a; RAVINDRA; LAKSHMI; AHUJA, 2006). É sintetizada a partir da conversão do aminoácido triptofano em serotonina, que é acetilada em N-acetilserotonina, na reação catalisada pela enzima n-acetil-transferase (AA-

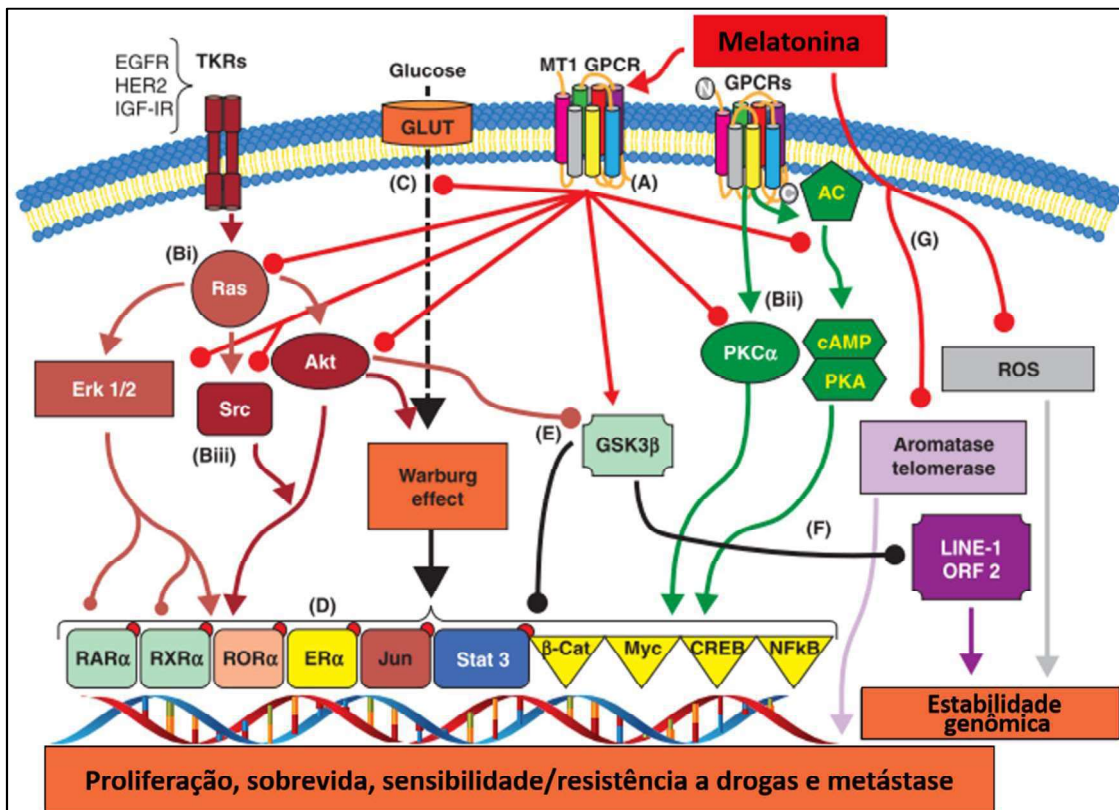
NAT) e então convertida em melatonina pela enzima hidróxi-indol-O-metiltransferase (HIOMT) (AL-OMARY, 2013; ESPINO; PARIENTE; RODRÍGUEZ, 2012b). A enzima AA-NAT apresenta um ritmo diário, atingindo concentrações 100 vezes superiores na fase de escuro, quando comparado à fase de claro. Esta variação cíclica da AA-NAT faz com que a redução dos níveis de serotonina na fase de escuro seja acompanhada pelo aumento das concentrações de N-acetilserotonina e melatonina. A melatonina é secretada durante a noite em todas as espécies de mamíferos, independente de possuírem hábito diurno ou noturno (BILU; KRONFELD-SCHOR, 2013; KORF; VON GALL, 2006; TUREK; GILLETTE, 2004).

Estudos indicam que alterações no ciclo circadiano, e portanto nos níveis de melatonina, podem contribuir para o desenvolvimento do câncer, e sendo assim, correlacionam o risco elevado da ocorrência desta doença em trabalhadores noturnos, e, de idêntica razão, baixo risco em mulheres cegas (STEVENS et al., 2014). Uma possível explicação para este fato seria a variação nos níveis plasmáticos da melatonina, que, por estar envolvida em inúmeras funções fisiológicas, teria sua inibição comprometendo a homeostase (LI et al., 2013).

Além disso, alguns estudos demonstraram que a melatonina possui efeitos oncostáticos e oncoprotetores no câncer de mama, os quais podem estar relacionados às suas propriedades bioquímicas e/ou metabólicas. Um dos mecanismos propostos é a capacidade da melatonina em inibir os hormônios precursores da produção ovariana de estradiol, reduzindo assim, a resposta

mitogênica das células em tumores de mama RE positivos. Posteriormente, outros estudos utilizando células neoplásicas de mama da linhagem MCF-7-RE positiva, confirmaram a propriedade antiestrogênica da melatonina (RAVINDRA; LAKSHMI; AHUJA, 2006; SOUSA-NETO, J.A.; SCALDAFERRI, 2005).

Através do controle de diversas cinases, a melatonina também pode influenciar a opção celular pelo efeito Warburg e assim alterar a captação de glicose realizado pelas GLUTs (Glucose Transporter) **(C – Figura 1)** e assim controlar também a expressão de genes como ER $\alpha$  (Receptor de Estrógeno alfa) e ROR $\alpha$  (Clock gene), que está relacionado com o ritmo circadiano **(D – Figura 1)**. **(E – Figura 1)** A melatonina também pode reprimir a inibição de AKT da GSK3b, o que permite que a GSK3b (glycogen synthase kinase 3 beta) e até c-MYC e promovam sua ubiquitinação. Além disso, através da ativação da melatonina GSK3b **(F – Figura 1)** pode ser capaz de reprimir a atividade LINE-1 e danos do DNA. Devido à sua natureza altamente lipofílica, a melatonina pode difundir através de membranas celulares, nucleares e mitocondriais e mecanismos independentes de receptores **(G – Figura 1)** para inibir a expressão da aromatase e pode reprimir a instabilidade genômica através da supressão da atividade da telomerase e sua atividade antioxidante no ROS.



**Figura 1.** Imagem modificada de Hill et al.; 2015. Ação da melatonina através do receptor MT1 acoplado a proteínas G (A); ativação das proteínas G $\alpha$  pode reprimir várias vias de sinalização, incluindo as rotas TRK e GPCR, que ativam cascatas de sinalização como MAPK/ERK1/2 (Mitogen Activated Protein Kinases/Extracellular Signal-Regulated Kinases) (Bi), PI3K/AKT (Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase/Protein Kinase B), PKC (Protein Kinase C) (Bii) e cAMP/PKA (AMP cíclico/Protein kinase A), bem como vias de cinases não receptoras, incluindo c-SRC (Proto-oncogene tyrosine-protein kinase) (Biii) e FAK (Focal adhesion kinase).

### III. METABÓLITOS DA MELATONINA

A principal via de transformação da melatonina ocorre no fígado, envolvendo sua hidroxilação em 6-hidroximelatonina [6(OH)M]. Em seguida, ocorrem os processos de sulfatação ou glicuronidação, e posteriormente excreção na urina (FACCIOLÁ et al., 2001; REITER, 1991; SEMAK et al., 2008). No mesmo percurso, a melatonina é metabolizada em 5-metoxitriptamina (5-MT) pela melatonina deacetilase, em sequência é transformada em 5-



metoxindolacetaldeído, 5-metoxi-indol ácido acético, ou 5-metoxitriptofol (GRACE; CAHILL; BESHARSE, 1991; KIM et al., 2013; ROGAWSKI; ROTH; AGHAJANIAN, 1979). Também por atividade enzimática ela pode ser desmetilada em seu precursor NAS (FACCIOLÁ et al., 2001; SEMAK et al., 2008).

Além das vias enzimáticas, a melatonina interage com espécies reativas de oxigênio e gera 3-hidroxi-melatonina cíclica, N(1)-acetil-N(2)-formil-5-metoxiquinuramina (AFMK) e N(1)-acetil-5-metoxi-quinuramina (AMK) (LI et al., 2013; TAN et al., 2000; ZANG et al., 1998).

O AFMK (N<sup>1</sup>-acetil-N<sup>2</sup>-formil-5-metoxiquinuramina), também é resultante da via quinúrica, metabolismo da melatonina pelo sistema nervoso central e posteriormente, pela ação da enzima formamidase, o AFMK é convertido em AMK (N<sup>1</sup>-acetil-N<sup>2</sup>-5-metoxiquinuramina) (CAGNOLI et al., 1995).

A melatonina e seus metabólitos possuem capacidade antioxidante, removendo diretamente espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, e aumentando a expressão de enzimas também com função antioxidante. Determinações da reatividade química entre a melatonina e espécies reativas de oxigênio, combinado com técnicas de ressonância magnética nuclear (RMN), mostraram que a melatonina pode reduzir o radical superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), oxigênio singleto (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>) e radical hidroxila (OH<sup>-</sup>) (ALMEIDA et al., 2004; HEVIA et al., 2015; MATUSZAK; RESZKA; CHIGNELL, 1997).

O estudo de Ferri e colaboradores (2005) indica que a conversão por via quinúrica pode atingir um terço do catabolismo da melatonina (DUBOCOVICH et

al., 2010b; FERRY et al., 2005; HILL et al., 2015) Na via da quinureninas, estudos mostraram que a melatonina atua como um antioxidante ao interagir com radicais livres. O AFMK também é um potente antioxidante, tão eficaz quanto a melatonina, e sua síntese pode ocorrer por ação enzimática da indolamina-2,3-dioxigenase (IDO1). Pode também ser produzido por mielo ou hemoperoxidases, espécies reativas de oxigênio (ROS) ou radiação ultravioleta (CIORBA, 2013; JAWOREK et al., 2016). Após a cascata antioxidativa, o AFMK pode ser adicionalmente convertido em AMK (N-acetil-5-metoxicinuramina) por N-deformilação (SILVA et al., 2004).

Sendo assim, a avaliação dos níveis de melatonina, AFMK e AMK pode ser importante para melhor entender a influência de alterações do ciclo circadiano no risco de desenvolvimento de câncer de mama e ainda a influência da expressão proteica do receptor de melatonina MT1 e do transportador de glicose GLUT1 nas células tumorais.

## **OBJETIVOS**

## **OBJETIVOS GERAIS**

1. Mensurar os níveis plasmáticos da melatonina, AFMK e AMK em mulheres com câncer de mama e sua relação com mulheres controle (sem histórico de neoplasia) por espectrometria de massas;
2. Analisar a expressão proteica do receptor de melatonina (MT1) e do transportador de glicose GLUT-1 em tumores de mama por imunohistoquímica;

### **Objetivos específicos**

1. Comparar os níveis plasmáticos de melatonina, AFMK e AMK com fatores clínico-patológicos (idade, tamanho do tumor, acometimento de linfonodos e metástase);
2. Mensurar os níveis plasmáticos de melatonina, AFMK e AMK em enfermeiras do Hospital de Base de São José do Rio Preto que trabalham a noite e comparar com o grupo de mulheres sem histórico de câncer e com hábito diurno;
3. Mensurar os níveis plasmáticos de melatonina, AFMK e AMK em mulheres diagnosticadas com câncer de mama durante o tratamento quimioterápico no Hospital de Base de São José do Rio Preto e comparar com o grupo de mulheres controles;
4. Correlacionar os níveis plasmáticos de melatonina, AFMK e AMK com qualidade do sono das mulheres no geral, na noite anterior a coleta de sangue e com a presença de fonte de luz no ambiente durante a noite;
5. Analisar a expressão proteica do receptor de melatonina MT1 e do transportador de glicose 1 (GLUT1) em tumores de mama por imunohistoquímica e comparar com os subtipos tumorais e características clínico-patológicas (idade, tamanho do tumor, acometimento de linfonodos e metástase);

## **ARTIGOS**

## **ARTIGO 1**

## Endocrine

### Lower levels of melatonin in women with breast cancer

--Manuscript Draft--

<b>Manuscript Number:</b>	
<b>Full Title:</b>	Lower levels of melatonin in women with breast cancer
<b>Article Type:</b>	Original Article
<b>Corresponding Author:</b>	Debora Aparecida Pires de Campos Zuccari Faculdade de Medicina de Sao Jose do Rio Preto BRAZIL
<b>Corresponding Author Secondary Information:</b>	
<b>Corresponding Author's Institution:</b>	Faculdade de Medicina de Sao Jose do Rio Preto
<b>Corresponding Author's Secondary Institution:</b>	
<b>First Author:</b>	Tialfi Bergamin de Castro, PhD
<b>First Author Secondary Information:</b>	
<b>Order of Authors:</b>	Tialfi Bergamin de Castro, PhD Eduardo Alves de Almeida, Professor Debora Aparecida Pires de Campos Zuccari
<b>Order of Authors Secondary Information:</b>	
<b>Funding Information:</b>	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (2015/02935-2)      Sr Tialfi Bergamin de Castro
<b>Abstract:</b>	Changes in the circadian rhythm may contribute to development of cancer and is correlated with the high risk of breast cancer in night workers. Melatonin is a hormone synthesized by the pineal gland at night in absence of light. In this context, levels of melatonin and the metabolite of oxidative metabolism, N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine (AFMK), are suggested as potential biomarkers. The aims of this study were to evaluate levels of melatonin and AFMK in women recently diagnosed with breast cancer, women under adjuvant chemotherapy, night-shift nurses and compare with healthy women to evaluate the relation of these compounds with breast cancer risk. Blood samples were collected from 47 women with breast cancer, 9 healthy women, 10 healthy night shift nurses and 6 patients under adjuvant chemotherapy. Compounds levels were measured by mass spectrometry. Women with breast cancer have lower levels of melatonin compared to control women, and even lower in night-shift nurses and in patients under adjuvant chemotherapy. There was no significant difference of AFMK levels between the groups. Besides that, high levels of melatonin and AFMK were related to patients with metastasis, and high levels of AFMK were related with presence of lymph node-positive, tumor >20mm and patients who sleep with light at night. Concluding, our results show reduction of melatonin levels in breast cancer patients, suggesting a relation with the disease. In addition, our results point to the importance of melatonin supplementation in women that work at night to reduce the risk of breast cancer.
<b>Suggested Reviewers:</b>	

[Click here to view linked References](#)

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

### Lower levels of melatonin in women with breast cancer

Tialfi Bergamin de Castro<sup>1</sup>; Eduardo Alves Almeida<sup>2</sup>; Debora Aparecida Pires de Campos Zuccari<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> São Paulo State University (UNESP) - Cristóvão Colombo Street, 2265 - São José do Rio Preto, São Paulo - Brazil

<sup>2</sup> Regional University of Blumenau Foundation – FURB - R. Antônio da Veiga, 140 – Blumenau, Santa Catarina, Brazil

<sup>3</sup> São José do Rio Preto Medical School - FAMERP, Av. Brigadeiro Faria Lima, 5416 - São José do Rio Preto, São Paulo – Brazil

**Keywords:** breast cancer; circadian rhythmic; melatonin; AFMK; blood level

**Corresponding author:** Debora Ap Pires de Campos Zuccari

ORCID number: 0000-0002-0146-9041

Av. Brigadeiro Faria Lima, 5416

Postal code: 15090-000 – Vila São José

São José do Rio Preto, São Paulo – Brazil

Tel: +55 17 32015928



## Abstract

1  
2 Changes in the circadian rhythm may contribute to development of cancer and is correlated with the high  
3 risk of breast cancer in night workers. Melatonin is a hormone synthesized by the pineal gland at night in  
4 absence of light. In this context, levels of melatonin and the metabolite of oxidative metabolism, *N*<sup>1</sup>-acetyl-  
5 *N*<sup>2</sup>-formyl-5-methoxykynuramine (AFMK), are suggested as potential biomarkers. The aims of this study  
6 were to evaluate levels of melatonin and AFMK in women recently diagnosed with breast cancer, women  
7 under adjuvant chemotherapy, night-shift nurses and compare with healthy women to evaluate the relation  
8 of these compounds with breast cancer risk. Blood samples were collected from 47 women with breast  
9 cancer, 9 healthy women, 10 healthy night shift nurses and 6 patients under adjuvant chemotherapy.  
10 Compounds levels were measured by mass spectrometry. Women with breast cancer have lower levels of  
11 melatonin compared to control women, and even lower in night-shift nurses and in patients under adjuvant  
12 chemotherapy. There was no significant difference of AFMK levels between the groups. Besides that, high  
13 levels of melatonin and AFMK were related to patients with metastasis, and high levels of AFMK were  
14 related with presence of lymph node-positive, tumor >20mm and patients who sleep with light at night.  
15 Concluding, our results show reduction of melatonin levels in breast cancer patients, suggesting a relation  
16 with the disease. In addition, our results point to the importance of melatonin supplementation in women  
17 that work at night to reduce the risk of breast cancer.  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35

## Introduction

36  
37  
38 Breast cancer is the most frequent type of cancer in women worldwide. High risk of breast cancer  
39 development has been related with breakdown of circadian cycle by shift work and the presence of artificial  
40 light at night, a common factor in modern life. [1] Circadian rhythmic disruption can block the night  
41 production of melatonin (*N*-acetyl-5-methoxytryptamine), an endogenous hormone synthesized from  
42 serotonin by the pineal gland during the night. [2,3] Serotonin is acetylated to *N*-acetylserotonin by the  
43 enzyme arylalkylamine *N*-acetyltransferase (AANAT) and then it is converted into melatonin by the enzyme  
44 hydroxyindole-*O*-methyl-transferase (HIOMT). Melatonin production follows a rhythmic pattern with  
45 secretory peak between 3 am to 4 am, in the absence of light and once secreted, it is distributed to various  
46 body tissues and organs and is not stored. [4,5] The light stimulus in the retina inhibits the action of AANAT,  
47 inhibiting the conversion of serotonin into *N*-acetylserotonin and consequently blocking melatonin  
48 production. [6,7]  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

Three main pathways are described to melatonin degradation: i) indolic pathway, which results in 6-hydroxy-melatonin in liver; ii) alternative indolic pathways, which produce 5-methoxyindole acetic acid, or 5-methoxy-tryptophol; and iii) kynuric pathway that produce *N*<sup>1</sup>-acetyl-*N*<sup>2</sup>-formyl-5-methoxykynuramine (AFMK) that involves melatonin oxidative pyrrole-ring cleavage. A study of Ferri and colleagues (2005) indicates that the conversion by kynuric pathway can reach one third of melatonin catabolism. [2,8,9]

In the kynuric pathway, studies have been shown that melatonin act as an antioxidant by interacting with free radicals. AFMK is also a potent antioxidant, as effective as melatonin, and its synthesis can occur by enzymatic action of indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO1). It can be also produced by myelo- or hemoperoxidases, reactive oxidative species (ROS) or ultraviolet radiation. [10,11] Following the antioxidative cascade, AFMK can be further converted to AMK (*N*-acetyl-5-methoxykynuramine) by *N*-deformylation. [12]

Several actions related with physiological, metabolic and behavioral events are described to melatonin, such as regulation of endocrine phenomena independent of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis, thermoregulation, regulation of cardiovascular system, activity-rest and wake-sleep cycles, immune system, growth and aging. [2,10,13,14] Melatonin also has important functions in cancer, showing oncogenic and oncoprotective effects on breast tumors, which include cell cycle regulation, inhibition of proliferation and promotion of apoptosis, role in DNA repair and tumor suppression by angiogenesis and metastasis inhibition. [2,15–17]

Melatonin low levels can be related with risk of cancer development, principally in night workers. [2,18] In 2001, Schernhammer and colleagues showed that night shift workers have increased risk of breast cancer development. [19] Following that, World Health Organization has designated night-shift work as a risk factor for the development of breast cancer. [20]

According to the literature, it would be important to evaluate the level of melatonin and AFMK in women, especially women who work at night. Thus, in this study, we evaluated the serum levels of melatonin and its metabolites and AFMK, in breast cancer patients and under adjuvant chemotherapy compared with health women, as well as in night shift work nurses. In addition, its levels were compared with clinical pathological characteristics of breast cancer patients to verify its potential correlation with prognosis.

## Material and Methods

### 1. Blood samples

The project approved by ethics committee of São José do Rio Preto Medical School (number 682.062). Approximately 10 mL of blood were collected from a total of 47 breast cancer patients (mean age 57), without treatment or surgery, diagnosed at the Gynecology and Obstetrics Service of the Cancer Institute of Base Hospital of São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil; besides that, 10 blood samples from nurses that work just at night and 6 samples from woman diagnosed with breast cancer during adjuvant chemotherapy. The control group consisted of blood samples from 9 women with no history of cancer and paired with breast cancer patients by age. All women signed informed consent term and were asked about quality of sleep and amount of light in the room at night. The samples were collected between 7am and 9am, because of the stop synthesis of the compounds at the beginning of the photoperiod of the day, consequently, its level decreases during the day. Plasma was separated and immediately stored at -80 °C for further extraction.

The tumor type and subtype, including TNM information (tumor size, lymph node involvement and metastases) were collected in the Pathology Service of the Base Hospital of São José do Rio Preto.

### 2. Melatonin and AFMK extraction

Plasma samples were thawed and transferred to a 15mL falcon tube in ice and protected from light. Dichloromethane 1:1 was added and the samples were vigorously vortexed. Subsequently, samples were centrifuged at 6500 rpm for 10 min at 4 °C and thereafter the organic phase (bottom) was separated into a 2mL tube. The dichloromethane was dried in nitrogen gas and samples were stored in at -80 °C for further analysis.

### 3. Dosage of melatonin and AFMK by mass spectrometry

A mass spectrometry system coupled to an HPLC (High Performance Liquid Chromatography) were used (model Xevo® TQ-S –Waters, Milford, Massachusetts, EUA) with a Phenomenex® C18 (100 mm x 4.6 mm, 2.7 µm) column.

HPLC conditions were set in gradient with A (H<sub>2</sub>O + formic acid 0.1%) and B (acetonitrile + formic acid 0.1%) and 50% of B for 5 minutes, 90% of B for 2 minutes and 50% of B until 15 minutes. The dried

1  
2 samples were re-suspended in 150 µl of acetonitrile. The injection volume was 10 µL for the standards and  
3 for the samples.

4 Mass spectrometer conditions were set in capillary voltage 320kV, font temperature 150 °C,  
5 desolvation gas temperature (N2) 350 °C, desolvation gas flow 600 L/h, collision gas 0.15 mL/min. The  
6 settings for reading the molecules were established by MRM (Multiple Reaction Monitoring) for melatonin  
7 (233.1>174.1 – cone voltage 35V, collision energy 13eV – dwell time= 0.412s) and for AFMK  
8 (287.1>228.1 – cone voltage 40V, collision energy 15eV – dwell time= 0.412s).  
9

10 For quantification, a standard curve was performed with 11 points of melatonin and AFMK  
11 standards concentrations between 1 pg/ml and 200 pg/ml and the curve equation was used to determine the  
12 concentration of these molecules in samples by the peak area of each compound. Both curve presented R<sup>2</sup>  
13 > 0,99.  
14

#### 15 **4. Chemicals**

16 Melatonin, acetonitrile and dichloromethane were purchased from Sigma Aldrich (St. Louis,  
17 Missouri, EUA) and AFMK from Cayman Chemical Company (Ann Arbor, Michigan, EUA).  
18

#### 19 **5. Statistical analysis**

20 The results were subjected to statistical analysis using GraphPad Prism 6.0 software (GraphPad,  
21 La Jolla, CA, USA). Levels of melatonin and AFMK between groups (control, breast cancer patients, nurses  
22 shift work and woman under adjuvant chemotherapy) and between different clinicopathological data were  
23 compared by Mann–Whitney or paired- Student t test. Multiple comparison analysis was performed using  
24 One-way Anova followed by Bonferroni. Spearman correlation was performed to evaluate the correlation  
25 of metabolites levels and age of the patients, tumor status of ER, TNM, quality of sleep and room light at  
26 night. The results were considered statistically significant when P was < 0.05. Data are pretended with  
27 mean ± standard error of the mean (S.E.M.).  
28  
29  
30  
31

### 32 **Results**

#### 33 **Plasmatic level of Melatonin and AFMK in woman with breast cancer**

34 Levels of melatonin and its metabolites were evaluated in breast cancer patients, night shift nurses  
35 and women in adjuvant chemotherapy and compared with healthy women, considered the control group. In  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

group analysis melatonin level was higher and statistically different in control group compared with woman from the other groups ( $p \leq 0.05$ ), while AFMK levels did not present significant differences between experimental groups ( $p > 0.05$ ) (Fig. 1 A and Fig. B, respectively). In paired test, women with cancer were paired with control group according with age and sleep quality. Paired *t test* showed that there was statistically significant difference (higher in control group than cancer group) between melatonin levels ( $p < 0.001$ ; Fig. 2).

Melatonin level was also significantly lower in woman with cancer and metastasis when compared with woman with cancer but without metastasis ( $p < 0.05$ ) and there is no difference between melatonin levels and T1 vs  $T \geq 2$  primary tumor size, presence of lymph node involvement or not, and although a tendency to have a higher concentration in the group of women with cancer who sleep without light at night was not statistically significant in relation to women who sleep with some light source ( $p > 0.05$ ). (Fig. 3).

When compared AFMK levels between groups with no metastasis and presence of metastasis (M0 and M1, respectively), tumor size ( $T < 1$  and  $T \geq 2$ ), and lymph node involvement (N0 for no involvement and N1 for involvement), AFMK were significantly higher ( $p < 0.05$ ) in M1,  $T \geq 2$  and N1 and in patients with sleep with no light in room at night (Fig. 4, A, B, C and D, respectively).

Regarding the clinical pathological characteristics of breast cancer patients, results showed that melatonin levels were significantly higher in patients with distant metastasis ( $p = 0.02$ ; Table 1), and there was no correlation with the other characteristics ( $p > 0.05$ ; Table 1). High levels of AFMK were related to tumor size higher than 2 mm ( $T \geq 2$ ), regional lymph node-positive and metastasis ( $p < 0.05$ , Table 1). Moreover, it was also observed a significant correlation between low level of AFMK and the presence of a considerable light source in the room at night ( $p < 0.05$ ).

#### **Spearman correlation test**

Table 2 shows the statistically significant correlations observed between melatonin and AFMK levels and the clinical pathological characteristics, sleep quality and presence of light in room at night using the Spearman correlation test. A negative correlation was found between age and sleep quality at night before blood collection. In addition, positive correlations were found between levels of melatonin and AFMK with the presence of metastasis and there was a positive correlation between light in the room at night with sleep quality the night before blood collection (table 2).

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

## Discussion

The master biological clock located in the suprachiasmatic nucleus receives information about the photoperiod and controls the circadian cycle and melatonin synthesis. [2,21,22] Thus, the increase of melatonin levels at night informs the body that it is nighttime and restore the metabolic and homeostatic state at normal rates. [23]

Melatonin is an important tumor suppressor and its production in the nocturnal period is directly related to the expression of clock genes (e.g. Per1, Per2, Bmal, Clock, Cry1) and its deregulation by circadian cycle breakdown, therefore, low melatonin production causes increased replication errors and mutations in DNA. Thus, circadian cycle deregulation inhibits tumor suppression functions of melatonin in diverse tissues, including breast. [1,24–26] According to these studies, lower levels of melatonin are related to the increased risk of developing cancer, including breast cancer, and these data corroborate with our findings showing lower level of melatonin in women with breast cancer compared to women without a history of cancer (control group) independent of sleep quality and presence of light in the room at night.

Several studies indicate that bright light, up to 2500 lux, and devices with light source at night also alters melatonin levels. [27–36] In fact, recently the increased risk of breast cancer has been associated with night workers, which is related with the interruption of melatonin production. [7] Therefore, women who work during the night may have increased risk of developing breast cancer due to constant lowered melatonin levels. Our results corroborate with these data, which showed low levels of melatonin in night shift nurses in comparison with women without history of cancer and no nocturnal activities. In addition, elevated levels of AFMK were related to women who slept without a light source in their bedroom at night. The absence of light may contribute to the increase in melatonin level and consequently higher metabolism in AFMK, which may explain this high level of this metabolite.

Regarding the clinical pathological factors, a study of Bartsch and colleagues (1889) showed that the level of nocturnal melatonin was inversely proportional to the size of breast tumors in women [37], however there was no correlation between tumor size and melatonin levels in our study. Nevertheless, patients with tumors  $>2\text{mm}$  ( $T \geq 2$ ) had higher AFMK levels than patients with T1. Perhaps due to the higher oxidation rate of melatonin due to the stress caused by the increased number of tumor cells.

Oncostatic and antiproliferative actions of melatonin in breast tumors are established in the literature in both *in vitro* and *in vivo* studies. [2,38,39] The mainly therapeutic effect described to melatonin

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

is related to its action through the activation of the MT1 melatonin receptor in ER-positive breast cancer cells for example. [7]

Melatonin is also related to downregulation of metastasis-related genes and key genes in angiogenesis. [2] In our study, melatonin levels were not correlated with ER status, however higher levels of melatonin and AFMK were correlated with presence of distant metastasis and AFMK level with lymph node involvement (N>0). T lymphocytes produce all the enzymes necessary to synthesize considerable levels of melatonin, thus, it is suggested that the invasion of lymph node and other tissues by tumor cells can increase the local immune response and, as a consequence, increases the melatonin levels. [40–46] In addition, tumor cells in the lymph nodes increase the expression of IDO1 enzyme, that suppress the action of T lymphocytes, through the activation of regulatory T cells, as escape from the host immune system. [47–51] This enzyme is involved in one of the main pathways that catabolize the conversion of indoleamines (tryptophan, serotonin and melatonin) into kynurenines (formylkynurenine, formyl-5-hydroxykynurenamine and AFMK, respectively). This data can explain the high levels of AFMK observed in patients with lymph node-positive and metastasis could be a consequence of the melatonin production by the local immune cells. It is know that several actions of melatonin occur through its membrane receptors coupled to G proteins (MT1 and MT2), but because it is lipophilic, melatonin can also cross the cell membrane acting directly in modulation of intracellular proteins and performing antioxidant activity. [9] The antioxidant action of melatonin is related to tissue protection by eliminating ROS and nitrogen species, and in the activation of antioxidant enzymes such as superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), and glutathione reductase (GR). When this antioxidant action occurs the conversion of melatonin into AFMK also occurs, independent of enzymatic action. [10] In this context, we found that patients under adjuvant chemotherapy showed lower levels of melatonin compared to control women, which can be related with its antioxidant potential against the oxidative stress and cell death caused by chemotherapy.

AFMK is a potent antioxidant and it can be deformed by arylamine formamidase or hemoperoxidase to AMK. [9] In addition to the antioxidant action, AFMK also has anti-inflammatory functions in acute pancreatitis and it can also controls melanocytes *in vitro* [10]. Treatment with high doses of AFMK in pancreatic cancer cell line (PANC-1) increased heat shock proteins (HSP), which are related to control of proliferation and protection against cell damage. [52] There are few studies in the literature relating the AFMK with cancer.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

In conclusion, our results show that melatonin serum levels are lower in breast cancer patients and in nurses that work at night, indicating a possible factor that may be related to the risk of cancer. In addition, higher levels of melatonin and AFMK are related with clinical pathological characteristics of the breast cancer patients, such as metastasis and lymph node-positive, suggesting a relationship with inflammatory response. Taken together, our results suggest that the maintenance of the circadian cycle and the absence of light sources at night, therefore normal levels of melatonin and AFMK, are important factors that may inform the risk of breast cancer development. The analysis of serum levels of melatonin can be an important tool for the normalization of concentration through supplementation, available today, both in women with low levels as in women working at night.

#### **Acknowledgement**

We thank the grant #2015/02935-2, São Paulo Research Foundation (FAPESP) and the Professor Luis Albeto Beraldo de Moraes by ceding Spectrometry Laboratory of Pharmaceutical Sciences Faculty of Mass Ribeirão Preto - University of São Paulo to perform the analysis and thank for Dr. Eduardo José Crevelin for the support.

**Funding:** This study was funded by São Paulo Research Foundation (FAPESP) (grant number 2015/02935-2).

**Conflict of Interest:** The authors declare that they have no conflict of interest.

#### **ETHICAL APPROVAL**

“All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional and/or national research committee and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards.”

#### **INFORMED CONSENT**

“Informed consent was obtained from all individual participants included in the study.”

#### **References**

1. R. G. Stevens, G. C. Brainard, D. E. Blask, S. W. Lockley, and M. E. Motta, *CA Cancer J Clin* **64**, 207 (2014).
2. S. M. Hill, V. P. Belancio, R. T. Dauchy, S. Xiang, S. Brimer, L. Mao, A. Hauch, P. W. Lundberg, W. Summers, L. Yuan, T. Frasch, and D. E. Blask, *Endocr. Relat. Cancer* **22**, R183 (2015).
3. Z. Xie, F. Chen, W. A. Li, X. Geng, C. Li, X. Meng, Y. Feng, W. Liu, and F. Yu, *Neurol. Res.* **6412**, 1 (2017).
4. J. a S. Neto and B. F. De Castro, *Rev. Bras. Neurol.* **44**, 5 (2008).
5. R. J. Reiter, *Endocr. Rev.* **12**, 151 (1991).



6. J. Espino, J. A. Pariente, and A. B. Rodríguez, *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2012**, 1 (2012).
7. V. Srinivasan, G. Maestroni, D. Cardinali, A. Esquifino, S. P. Perumal, and S. Miller, *Immun. Ageing* **5**, 109 (2011).
8. G. FERRY, C. UBEAUD, P.-H. LAMBERT, S. BERTIN, F. COGÉ, P. CHOMARAT, P. DELAGRANGE, B. SERKIZ, J.-P. BOUCHIET, R. J. W. TRUSCOTT, and J. A. BOUTIN, *Biochem. J.* **388**, 205 (2005).
9. M. L. Dubocovich, P. Delagrange, D. N. Krause, D. Sugden, D. P. Cardinali, and J. Olcese, *Pharmacological Rev.* **62**, 343 (2010).
10. J. Jaworek, J. Szklarczyk, J. Bonior, M. Kot, M. Goralska, P. Pierzchalski, R. J. Reiter, U. Czech, and R. Tomaszewska, *J. Physiol. Pharmacol.* **67**, 411 (2016).
11. M. A. Ciorba, *Curr. Opin. Gastroenterol.* **29**, 146 (2013).
12. S. O. Silva, M. R. Rodrigues, S. R. Q. Carvalho, L. H. Catalani, A. Campa, and V. F. Ximenes, *J. Pineal Res.* **37**, 171 (2004).
13. C. C. Maganhin, A. A. F. Carbonel, J. H. Hatty, L. F. P. Fuchs, I. S. de Oliveira-Júnior, M. de J. Simões, R. S. Simões, E. C. Baracat, and J. M. Soares-Jr, *Rev. Assoc. Med. Bras.* **54**, 267 (2008).
14. R. J. Reiter, J. C. Mayo, D. X. Tan, R. M. Sainz, M. Alatorre-Jimenez, and L. Qin, *J. Pineal Res.* **253** (2016).
15. G. B. Gelaleti, T. F. Borin, L. B. Maschio-Signorini, M. G. Moschetta, B. V. Jardim-Perassi, G. B. Calvino, M. C. Facchini, A. M. Vilorio-Petit, and D. A. P. de Campos Zuccari, *Life Sci.* **183**, 98 (2017).
16. B. V. Jardim-Perassi, M. R. Lourenço, G. M. Doho, I. H. Grigolo, G. B. Gelaleti, L. C. Ferreira, T. F. Borin, M. G. Moschetta, and D. A. Pires de Campos Zuccari, *Anticancer. Agents Med. Chem.* **16**, 347 (2016).
17. T. F. Borin, A. S. Arbab, G. B. Gelaleti, L. C. Ferreira, M. G. Moschetta, B. V. Jardim-Perassi, A. Iskander, N. R. S. Varma, A. Shankar, V. B. Coimbra, V. A. Fabri, J. G. de Oliveira, and D. A. P. de C. Zuccari, *J. Pineal Res.* **60**, 3 (2016).
18. R. G. Stevens, G. C. Brainard, D. E. Blask, S. W. Lockley, and M. E. Motta, *CA Cancer J Clin* **64**, 207 (2014).
19. E. S. Schernhammer, F. Laden, F. E. Speizer, W. C. Willett, D. J. Hunter, I. Kawachi, and G. A. Colditz, *J. Natl. Cancer Inst.* **93**, 1563 (2001).
20. K. Straif, R. Baan, Y. Grosse, B. Secretan, F. El Ghissassi, V. Bouvard, A. Altieri, L. Benbrahim-Tallaa, V. Coglian, and WHO International Agency For Research on Cancer Monograph Working Group, *Lancet. Oncol.* **8**, 1065 (2007).
21. D. M. Berson, F. A. Dunn, and M. Takao, *Science* **295**, 1070 (2002).
22. M. H. Hastings, A. B. Reddy, and E. S. Maywood, *Nat. Rev. Neurosci.* **4**, 649 (2003).
23. R. M. Slominski, R. J. Reiter, N. Schlubritz-Loutsevitch, R. S. Ostrom, and A. T. Slominski, *Mol. Cell. Endocrinol.* **351**, 152 (2012).
24. M. P. Antoch, V. Y. Gorbacheva, O. Vykhovanets, I. A. Toshkov, R. V Kondratov, A. A. Kondratova, C. Lee, and A. Y. Nikitin, *Cell Cycle* **7**, 1197 (2008).
25. M. A. Gauger and A. Sancar, *Cancer Res.* **65**, 6828 (2005).
26. S. You, P. A. Wood, Y. Xiong, M. Kobayashi, J. Du-Quiton, and W. J. M. Hrushesky, *Breast Cancer Res. Treat.* **91**, 47 (2005).

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

27. G. C. Brainard, J. P. Hanifin, J. M. Greeson, B. Byrne, G. Glickman, E. Gerner, and M. D. Rollag, *J. Neurosci.* **21**, 6405 (2001).

28. G. Glickman, R. Levin, and G. C. Brainard, *Neuro Endocrinol. Lett.* **23 Suppl 2**, 17 (2002).

29. J. R. Gaddy, M. D. Rollag, and G. C. Brainard, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **77**, 1398 (1993).

30. G. C. Brainard, M. D. Rollag, and J. P. Hanifin, *J. Biol. Rhythms* **12**, 537 (1997).

31. J. J. Gooley, K. Chamberlain, K. A. Smith, S. B. S. Khalsa, S. M. W. Rajaratnam, E. Van Reen, J. M. Zeitzer, C. A. Czeisler, and S. W. Lockley, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **96**, E463 (2011).

32. J. M. Zeitzer, D. J. Dijk, R. Kronauer, E. Brown, and C. Czeisler, *J. Physiol.* **526 Pt 3**, 695 (2000).

33. C. Cajochen, J. M. Zeitzer, C. A. Czeisler, and D. J. Dijk, *Behav. Brain Res.* **115**, 75 (2000).

34. S. W. Lockley, G. C. Brainard, and C. A. Czeisler, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **88**, 4502 (2003).

35. S. W. Lockley, E. E. Evans, F. A. J. L. Scheer, G. C. Brainard, C. A. Czeisler, and D. Aeschbach, *Sleep* **29**, 161 (2006).

36. C. Cajochen, S. Frey, D. Anders, J. Spati, M. Bues, A. Pross, R. Mager, A. Wirz-Justice, and O. Stefani, *J. Appl. Physiol.* **110**, 1432 (2011).

37. C. Bartsch, H. Bartsch, U. Fuchs, T. H. Lippert, O. Bellmann, and D. Gupta, *Cancer* **64**, 426 (1989).

38. D. E. Blask, D. B. Pelletier, S. M. Hill, A. Lemus-Wilson, D. S. Grosso, S. T. Wilson, and M. E. Wise, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **117**, 526 (1991).

39. S. R. Teplitzky, T. L. Kiefer, Q. Cheng, P. D. Dwivedi, K. Moroz, L. Myers, M. B. Anderson, A. Collins, J. Dai, L. Yuan, L. L. Spriggs, D. E. Blask, and S. M. Hill, *Cancer Lett.* **168**, 155 (2001).

40. D. Pozo, M. Delgado, J. M. Fernandez-Santos, J. R. Calvo, R. P. Gomariz, I. Martin-Lacave, G. G. Ortiz, and J. M. Guerrero, *FASEB J.* **11**, 466 (1997).

41. D. Pozo, S. García-Mauriño, J. M. Guerrero, and J. R. Calvo, *J. Pineal Res.* **37**, 48 (2004).

42. J. M. Guerrero, D. Pozo, S. García-Mauriño, C. Osuna, P. Molinero, and J. R. Calvo, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **917**, 397 (2000).

43. P. J. Lardone, A. Carrillo-Vico, M. C. Naranjo, B. De Felipe, A. Vallejo, M. Karasek, and J. M. Guerrero, *J. Cell. Physiol.* **206**, 273 (2006).

44. H. Zhang and Y. Zhang, *J. Pineal Res.* **57**, 131 (2014).

45. Y. Chen, M. Leon-Ponte, S. C. Pingle, P. J. O'Connell, and G. P. Ahern, *Acta Physiol. (Oxf)* **213**, 860 (2015).

46. W. Ren, G. Liu, S. Chen, J. Yin, J. Wang, B. Tan, G. Wu, F. W. Bazer, Y. Peng, T. Li, R. J. Reiter, and Y. Yin, *J. Pineal Res.* **62**, 1 (2017).

47. F. Fallarino, U. Grohmann, C. Vacca, R. Bianchi, C. Orabona, A. Spreca, M. C. Fioretti, and P. Puccetti, *Cell Death Differ.* **9**, 1069 (2002).

48. F. Fallarino, U. Grohmann, K. W. Hwang, C. Orabona, C. Vacca, R. Bianchi, M. L. Belladonna, M. C. Fioretti, M.-L. Alegre, and P. Puccetti, *Nat. Immunol.* **4**, 1206 (2003).

49. G. Frumento, R. Rotondo, M. Tonetti, G. Damonte, U. Benatti, and G. B. Ferrara, *J. Exp. Med.* **196**, 459 (2002).

50. P. Terness, T. M. Baucr, L. Rösc, C. Dufter, A. Watzlik, H. Simon, and G. Opelz, *J. Exp. Med.* **196**, 447 (2002).

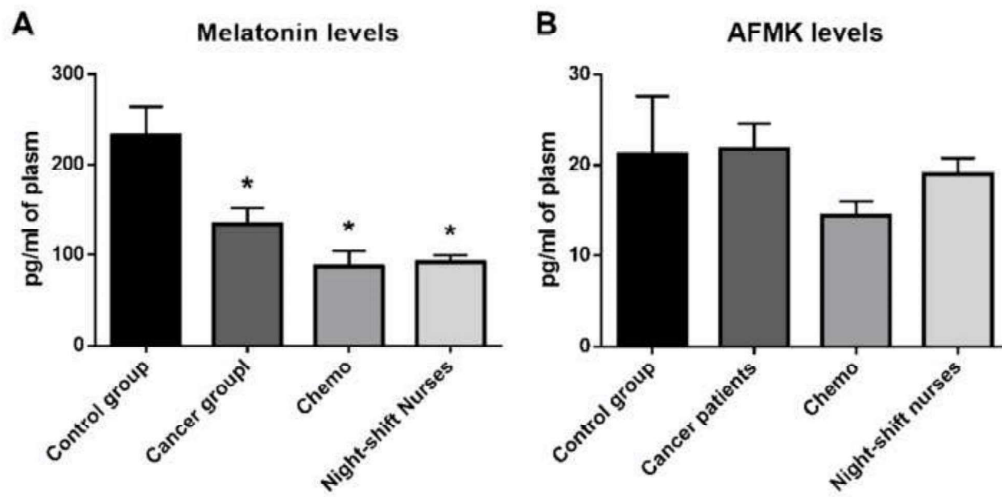
51. G. C. Prendergast, C. Smith, S. Thomas, L. Mandik-Nayak, L. Laury-Kleintop, R. Metz, and A. J.

Muller, *Cancer Immunol. Immunother.* **63**, 721 (2014).

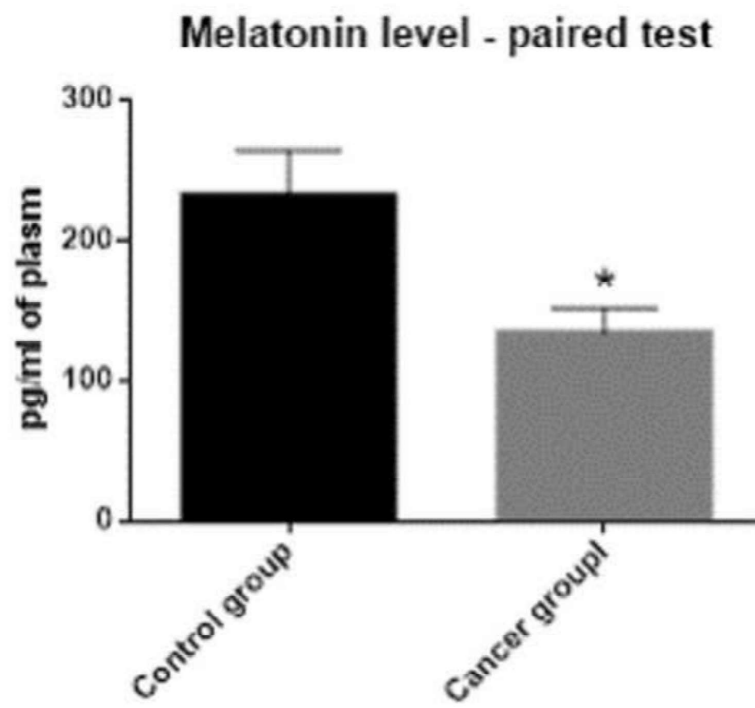
52. A. Leja-Szpak, P. Pierzchalski, M. Goralska, K. Nawrot-Porabka, J. Bonior, P. Link-Lenczowski, M.

Jastrzebska, and J. Jaworek, *J. Physiol. Pharmacol.* **66**, 711 (2015).

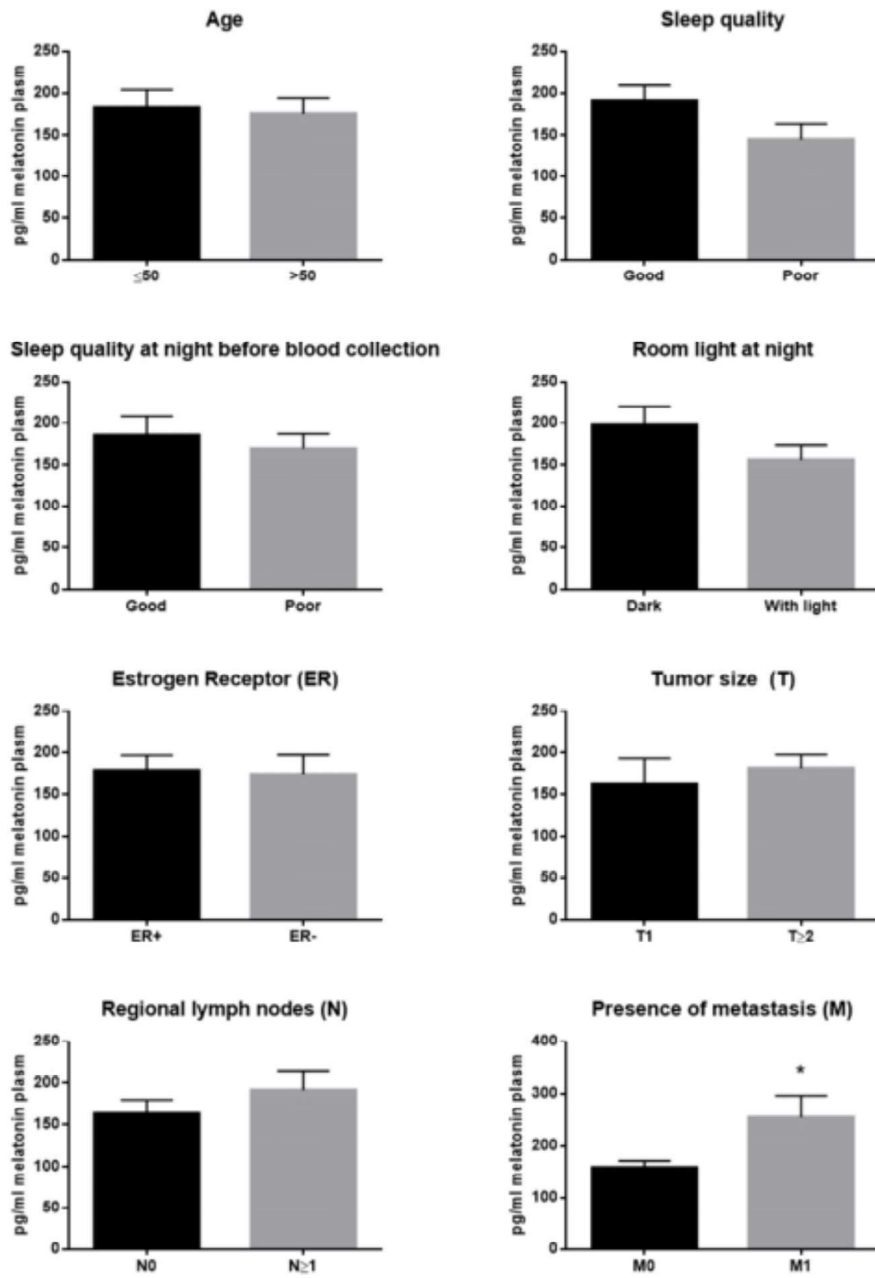
1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

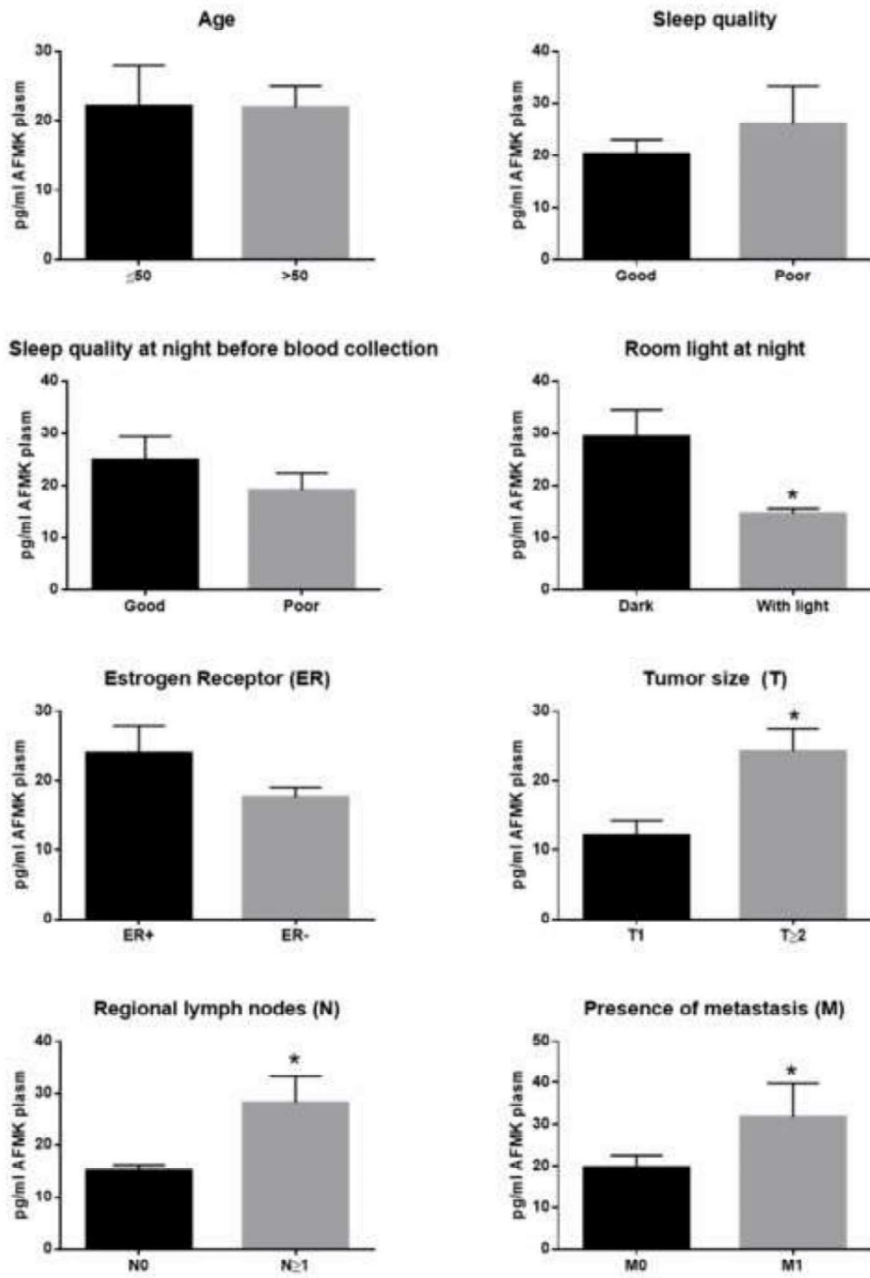


[Click here to download Figure Fig2.tiff](#)



[Click here to download Figure Fig3.tif](#)





**Table 1:** Mean levels of melatonin and AFMK and its correlation with clinical, pathological and sleep characteristics of patients with breast cancer.

	Number of patients	Mean (pg/ml of plasm)	
		melatonin	AFMK
<b>Patient age</b>			
≤50	14 (31%)	183.3	22.1
>50	31 (69%)	175.3	19.8
<i>p value</i>		0.22	0.99
<b>ER (Estrogen receptor)</b>			
Positive	32 (71%)	179.1	21.7
Negative	13 (29%)	174.5	17.62
<i>p value</i>		0.62	0.48
<b>Tumor size</b>			
T1	9 (20%)	162.1	10.43
T≥2	36 (80%)	181.7	23.04
<i>p value</i>		0.60	<b>0.02*</b>
<b>Regional lymph nodes</b>			
N0	22 (49%)	163.1	13.8
N≥1	23 (51%)	191.8	27.0
<i>p value</i>		0.53	<b>0.03*</b>
<b>Metastasis</b>			
M0	36 (80%)	158.7	18.6
M1	9 (20%)	254.1	28.3
<i>p value</i>		<b>0.02*</b>	<b>0.01*</b>
<b><sup>a</sup>General sleep quality</b>			
Good	32 (71%)	190.8	19.1
Poor	13 (29%)	145.6	24.0
<i>p value</i>		0.30	0.85
<b><sup>a</sup>Light at night</b>			
Dark	23 (51%)	198.2	26.8
With light	22 (49%)	156.5	13.9
<i>p value</i>		0.27	<b>0.03*</b>
<b><sup>a</sup>Night sleepness before blood collection</b>			
Good	23 (51%)	186.0	22.7
Poor	22 (49%)	169.2	18.2
<i>p value</i>		0.88	0.57

\* Significant value to *t test*

\*\* Not detected, level lower than 1 pg/ml of plasm

<sup>a</sup> According to a questionnaire applied to the patient



**Table 2:** Spearman correlation test between variables: melatonin, AFMK and AMK levels; age; TNM; general sleep quality; light in the room at night and sleep quality last night.

	<i>r value</i>	<i>p value</i>
Age vs sleep quality last night	-0.303	<b>0.04</b>
Melatonin level vs Metastasis	0.306	<b>0.04</b>
AFMK level vs Metastasis	0.487	<b>0.01</b>
Melatonin level vs AFMK level	0.487	<b>&lt;0.01</b>
Sleep quality last night* vs light at night	0.377	<b>0.01</b>

\*Sleep quality last night = sleep quality on night before blood collection

## **ARTIGO 2**

**Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**  
**Immunohistochemical expression of melatonin receptor MT1 and glucose transporter GLUT1 in human breast cancer**  
 --Manuscript Draft--

<b>Manuscript Number:</b>	JOCR-D-17-02568	
<b>Full Title:</b>	Immunohistochemical expression of melatonin receptor MT1 and glucose transporter GLUT1 in human breast cancer	
<b>Article Type:</b>	Original Article – Cancer Research	
<b>Keywords:</b>	breast cancer; diagnosis; prognosis; melatonin; MT1; GLUT1	
<b>Corresponding Author:</b>	Debora Ap Pires de Campos Zuccari Faculdade de Medicina de Sao Jose do Rio Preto São José do Rio Preto, BRAZIL	
<b>Corresponding Author Secondary Information:</b>		
<b>Corresponding Author's Institution:</b>	Faculdade de Medicina de Sao Jose do Rio Preto	
<b>Corresponding Author's Secondary Institution:</b>		
<b>First Author:</b>	Tialfi Bergamin de Castro, PhD	
<b>First Author Secondary Information:</b>		
<b>Order of Authors:</b>	Tialfi Bergamin de Castro, PhD André de Lima Mota, Master Newton Antonio Bordin Junior Dalisio de Santi Neto Debora Ap Pires de Campos Zuccari	
<b>Order of Authors Secondary Information:</b>		
<b>Funding Information:</b>	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (2015/02935-2)	Dr Tialfi Bergamin de Castro
<b>Abstract:</b>	<p>Breast cancer is a heterogeneous disease, and is the leading causes of cancer-related deaths among women. Even after diagnosis, the prognosis can not be concluded since patients can develop resistance to therapy, which favors tumor growth, invasion and metastasis. In the recent years, research has been focused to identify significant markers that can be used to determine the prognosis. Melatonin can act through G protein-coupled MT1 receptor, which control selected protein kinases, influence the levels of transcription factor phosphorylation, expression of specific genes, proliferation, angiogenesis, cell differentiation, migration, and indirectly control glucose transporter in cancer cells. It is know that glucose enters into the cells by glucose transporters, as GLUT1 that show wide tissue distribution and appears to be altered in human breast carcinoma. High GLUT1 expression is associated with increased malignant potential, invasiveness and poor prognosis in some cancers including breast cancer. The aim of this study was to evaluate the expression of MT1 receptor and GLUT1 in breast tumors and correlate with molecular subtypes and prognostic characteristics. We found that MT1 high expression was associated with good prognosis subtype (Luminal A), while GLUT1 high expression was related with poor prognosis subtype (triple-negative). Besides that, we found high expression of MT1 in ER+ and the inverse in GLUT1 expression. GLUT1 also is high expressed in tumor <math>\geq 20</math>mm. These results indicate MT1 and GLUT1 as potential target for breast cancer subtypes and prognosis.</p>	
<b>Suggested Reviewers:</b>		
<b>Opposed Reviewers:</b>		

[Click here to view linked References](#)

**Immunohistochemical expression of melatonin receptor MT1 and glucose transporter GLUT1 in human breast cancer**

Tialfi Bergamin de Castro<sup>a</sup>; André de Lima Mota<sup>b</sup>; Newton Antônio Bordin Junior<sup>c</sup>; Dalisio de Santi Neto<sup>c</sup>; Debora Aparecida Pires de Campos Zuccari<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> UNESP - Univ Estadual Paulista – Cristóvão Colombo Street, 2265 - 15054-000 - São José do Rio Preto, São Paulo - Brazil

<sup>b</sup>FAMERP – São José do Rio Preto Medical School - Av. Brigadeiro Faria Lima, 5416 – 15091-200 - São José do Rio Preto, São Paulo – Brazil

<sup>c</sup>Hospital de Base de São José do Rio Preto - Av. Brigadeiro Faria Lima, 5416 – 15091-200 - São José do Rio Preto, São Paulo – Brazil

Corresponding author: Debora Ap Pires de Campos Zuccari

ORCID number: 0000-0002-0146-9041

Av. Brigadeiro Faria Lima, 5416

Postal code: 15090-000 – Vila São José

São José do Rio Preto, São Paulo – Brazil

Tel: +55 17 32015928

## ABSTRACT

Breast cancer is a heterogeneous disease, and is the leading causes of cancer-related deaths among women. Even after diagnosis, the prognosis can not be concluded since patients can develop resistance to therapy, which favors tumor growth, invasion and metastasis. In the recent years, research has been focused to identify significant markers that can be used to determine the prognosis. Melatonin can act through G protein-coupled MT1 receptor, which control selected protein kinases, influence the levels of transcription factor phosphorylation, expression of specific genes, proliferation, angiogenesis, cell differentiation, migration, and indirectly control glucose transporter in cancer cells. It is know that glucose enters into the cells by glucose transporters, as GLUT1 that show wide tissue distribution and appears to be altered in human breast carcinoma. High GLUT1 expression is associated with increased malignant potential, invasiveness and poor prognosis in some cancers including breast cancer. The aim of this study was to evaluate the expression of MT1 receptor and GLUT1 in breast tumors and correlate with molecular subtypes and prognostic characteristics. We found that MT1 high expression was associated with good prognosis subtype (Luminal A), while GLUT1 high expression was related with poor prognosis subtype (triple-negative). Besides that, we found high expression of MT1 in ER+ and the inverse in GLUT1 expression. GLUT1 also is high expressed in tumor  $\geq 20$ mm. These results indicate MT1 and GLUT1 as potential target for breast cancer subtypes and prognosis.

**Keywords:** breast cancer; diagnosis; prognosis; melatonin; MT1; GLUT1

## INTRODUCTION

Despite the advances in research and treatment, breast cancer is still one of the leading causes of cancer-related deaths among women, and a major health problem in the world. Current diagnostic methods are primarily invasive procedures, such as tissue biopsies. However, even after diagnosis, the prognosis cannot be concluded, since patients can become resistant to specific treatments, which favors tumor growth, invasion and metastasis (Park et al. 2010). In addition, breast cancer is a heterogeneous disease, which requires a variety of treatments that may lead to different responses (Wei et al 2013) Thus, the complexity of the disease makes it difficult to generalize the choice of treatment and expect similar results in a large number of patients.

Currently, both diagnosis and prognosis of breast cancer are based on the expression of markers that define the following molecular subtypes; Luminal A (estrogen receptor (ER) positive and/or progesterone receptor (PR) positive, human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) negative and Ki-67 < 14 %), Luminal B (ER-positive and / or PR-positive, HER2-positive, Ki-67 > 14 %), HER2-positive (ER and PR negative and HER2 positive), triple-negative (negative for ER, PR, HER2 and for cytokeratin 5/6 (CK5/6) and differentiated triple-negative basal-like (negative for ER, PR, HER2 and CK5/6 positive), which shows the worst prognosis. These intrinsic molecular signatures are robust and applied to both carcinoma in situ and invasive breast cancers (Maganhin et al. 2008; Perez 2011). Thus, in recent years, research has been focused on identifying new tumor markers to support the establishment of characteristics that can help diagnostic and prognosis (Jablonska et al. 2013; Sonnenblick et al. 2014).

Melatonin (N-acetyl-5-metoxitriptamina) is the main hormone synthesized by the pineal gland at night and it shows a cyclic production, with peak of production between 3 am and 4 am in humans. The presence of light in retina blocks the Aralkylamine N-Acetyltransferase (AANAT), enzyme responsible for melatonin production. Thus, low levels of melatonin have been associated with high risk of breast cancer in night shift workers, who are exposed to light at night (Stevens et al. 2014), suggesting melatonin levels as a potential biomarker. In addition, some studies have shown that melatonin has different oncostatic and oncoprotective effects on breast cancer (Hill et al. 2015), mainly related to antiestrogenic properties in ER-positive breast tumors (Nooshinfar et al. 2017). Furthermore, several other antitumor properties are ascribed to melatonin, including regulation of the expression of core clock and clock-related genes, cell-signaling pathways critical to cell proliferation, cell survival, metastasis and drug resistance (Hill et al. 2015). Recently, it was demonstrated that melatonin can also suppresses tumor aerobic metabolism (Warburg effect) (Liu et al. 2016).

The first action of melatonin is through specific membrane receptors coupled to protein G, MT1 and MT2, inhibiting the activity of adenylyl cyclase, and thereby decreasing the production of adenosine 3',5'-cyclic monophosphate (cAMP). This cascade can control selected protein kinases (PKC, PKA, MAPK) and influence the levels of transcription factor phosphorylation, that is, cAMP response element-binding, as well as expression of specific genes and protein involved in proliferation, angiogenesis, cell differentiation and migration processes. MT1 also influences levels of protein kinase B (AKT) which control innumerable proteins in glycolysis pathway, such as glucose transporter GLUT1, hexokinase and phosphofruktokinase (PFK) (Vander Heiden et al. 2009; Cairns et al. 2011; Slominski et al. 2012;

Belancio et al. 2015). MT1 receptor shows wide tissue distribution, expressed in several tissues including breast, however, it is a lipophilic molecule, which confers the ability to cross the cell, nuclear, and mitochondrial membranes independently of receptors and bind to proteins, triggering a variety of non-receptor mediated effects in breast cancer.

Glucose enters in the cells by a family of seven different GLUTs. GLUT1 is a high-affinity glucose transporter and it is widely distributed in tissues, while its expression appears to be altered in human breast carcinoma (Kang et al. 2002). GLUT1 expression is associated with increased malignant potential, invasiveness and poor prognosis in lung, colorectal, gastric and ovarian cancers and it is associated with higher grade and proliferative activity in breast cancer. Its expression is regulated by several different mechanisms, for example, transcription factors such as Sp1, Sp3, and p53, and is stimulated by hypoxia via hypoxia induction factor 1-alpha (HIF-1-alpha) (Noguchi et al. 2016). During their increased metabolic activity and proliferation rate, tumor cells increase the expression of GLUTs and only use them as a source of glucose uptake. Considering the role of GLUT1 in tumor metabolism and progression, it is a potential prognostic marker and target to therapy (Chen et al. 2015).

Therefore, the aim of this study is to evaluate the expression of melatonin receptor MT1, and glucose receptor GLUT1 in breast cancer patients with different phenotypic tumor subtypes in order to evaluate their relation with prognosis and its potential value target therapy and new researches.

## **MATERIAL AND METHODS**

The project approved by ethics committee of São José do Rio Preto Medical School (number 682.062).

### **Patients and tumor samples**

The study was performed on 42 tumors samples obtained from patients 24-88 years old (mean age: 56.6 years) diagnosed with breast cancer between 2014 and 2017. Samples was obtained from surgery or by biopsy only after confirmation of presence of cancer cells and all patients had not chemotherapy or radiotherapy treatment. After the signing of a consent form, the material was requested from the Pathology Service of the Hospital de Base of Sao José do Rio Preto, Sao Paulo, Brazil. The tumors were embedded in paraffin, and MT1 and GLUT1 protein expression have been achieved. In pathology service, the tumors were classified in invasive ductal carcinoma (85.72%), *in situ* ductal carcinoma (7.14%), *in situ* lobular carcinoma (2.38%), invasive lobular carcinoma and (2,38%) and

invasive papillary carcinoma (2,38%). In addition, 12 tumors were classified as grade I, 25 grade II and 5 grade III. For phenotypic classification were obtained 27 Luminal A, 7 Luminal B, 3 Her2-overexpressed and 5 Triple-negative.

### **Immunohistochemistry**

Histological sections of 4µm were obtained from the paraffin embedded material and adhered to silanized slides. Subsequently, deparaffinization of the slides was performed, initially in an oven at 60 °C, followed by xylol and, finally, hydration with decreasing ethanol.

Antigen retrieval was done in a cooker pan (ARNO, São Paulo, SP, Brazil) at 95 °C with citrate buffer (pH 6,0) for 30 min. After cooling, the slides were incubated with 3 % hydrogen peroxide for 30 min to block endogenous peroxidase activity. After this, the slides were covered with bovine serum albumin (BSA) solution for 30 min and incubated at 4 °C overnight with the antibody anti-MT1 (Sigma, USA, Clone 4543) and anti-GLUT1 (ABCAM, Clone AB652) at a concentration of 1:100 and 1:1200, respectively. Subsequently they were washed with phosphate-buffered saline (PBS) for 15 min and incubated with the REVEAL-Biotin-Free Polyvalent DAB-HRP Kit (Spring Bioscience, USA) which consisted of the secondary antibody biotinylated anti-mouse, rabbit, and goat immunoglobulins for 20 min and streptavidin-peroxidase complex for 10 min, followed by washing with PBS for 15 min. We applied 0.5 % 3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB, Signet® Covance Laboratories, Dedham, MA, USA) to the slides for 2–5 min at 20–22 °C. The slides were counterstained with hematoxylin for 40s. The reactions were accompanied by a positive control for the primary antibody tested (human breast tissue) and a negative control (no primary antibody).

### **Evaluation of immunohistochemical staining by optical density**

Multiple fields were examined on each slide, especially demarcated areas with distinct brown staining. The slides were photographed and the proteins quantified using ImageJ Software (NIH, Bethesda, MD, USA) and through a 40× objective lens of a Nikon Eclipse E200 microscope. For each sample, three regions of tumor tissue were selected, and 20 areas of the tumor cells cytoplasm were marked in each region, thereby analyzing 60 different areas of every sample to average the relative intensity of immunoreactivity. The values were obtained as arbitrary units (a.u.) and the mean optical density (M.O.D.) showed the staining intensity specifically in the immunoreactive areas.



### **Statistical analysis**

The results were subjected to statistical analysis using Prism 6.0 software (GraphPad, La Jolla, CA, USA). Clinicopathological data of cases were compared with the expression level of MT1 and GLUT1 utilizing Kruskal–Wallis and Mann–Whitney tests. Multiple comparisons analysis was performed using One-way Anova with Bonferroni. The results were considered statistically significant with  $P < 0.05$  in all the analyses.

## **RESULTS**

### **MT1 receptor expression**

MT1 receptor expression was detected in tumor tissue, staining the cytoplasm and cell membrane (Figure 1). Multiple comparison test showed that there was a significant difference between the tumor subtypes. MT1 expression was decreasing as the tumor aggressiveness increases. Luminal A tumors showed higher MT1 expression than Luminal B ( $p < 0.001$ ) and Triple-negative ( $p < 0.001$ ). Its expression was higher in Luminal B than triple-negative ( $p < 0.001$ ), while Her-2 overexpressed tumors showed higher MT1 expression than triple-negative ( $p < 0.001$ ) (Figure 2).

**Fig1.** Photomicrograph of immunohistochemistry for melatonin receptor (MT1) with anti-MT1 antibody and Glucose Transporter 1 (GLUT1) with anti-GLUT1 antibody revealing cytoplasmic expression in tumors Luminal A, Luminal B, Her-2 overexpression and Triple-negative and no expression in negative control.

**Fig2.** Different MT1 (A) and GLUT1 (B) expression between breast cancer subtypes. Statistically different between Luminal A and Luminal B. For Triple-negative subtype MT1 expression is lower than all other subtypes and in GLUT1 expression in Triple-negative is statistically higher than Luminal subtypes. \* $p < 0.05$ .

### **GLUT1 protein expression**

GLUT1 protein expression was also detected in the membrane and cytoplasm of tumor cells (Figure 3). Multiple comparison test was performed to evaluate the difference between the subtype groups and there was a significant difference when comparing Luminal A with Triple-negative ( $p < 0.001$ ) and Luminal B with Triple-negative ( $p < 0.01$ ). Contrary to that observed in the MT1 expression, GLUT-1 expression increased as malignancy increases (Figure 4).

### Differences in MT1 and GLUT1 protein expressions in breast cancer subtypes

Comparing the expression of MT1 and GLUT-1 receptors, the difference was statistically significant in Luminal A ( $p < 0.0001$ ) and triple-negative ( $p = 0.01$ ). Luminal A tumors showed high expression of MT1 and low expression of GLUT1. However, triple-negative tumors, which are known for the worst prognosis, showed an inverse relation to Luminal A, with low expression of MT1 and high expression of GLUT1. Regarding the other phenotypes (Luminal B and Her-2 overexpressed) there was no statistical difference in MT1 and GLUT1 expression ( $p = 0.1$  and  $0.4$  respectively). The relation between MT1 and GLUT1 expression was presented in Figure 5.

**Fig3.** Relation between MT1 and GLUT1 expression in each breast cancer subtype - Luminal A (A); Luminal B (B); Her2-overexpressed (C) and Triple-negative (D). The expression of MT1 and GLUT1 is statistically different in Luminal A and Triple-negative subtypes. \* $p < 0.05$ .

### Clinicopathological characteristics

The immunostaining of the markers was compared with the clinic-pathological characteristics of breast cancer patients. Results showed that there was a significant decrease in MT1 expression in tumors according to the grade. Tumors with grade III showed lower expression of MT1 than tumors with grade I and II ( $p = 0.04$ ) (Figure 6), while there was no statistically significant difference in GLUT1 and tumors grade ( $p = 0.17$ ).

MT1 expression was also higher in ER-positive tumors than ER-negative, while GLUT1 expression was lower in ER-positive than ER-negative ( $p = 0.002$  and  $p = 0.003$ , respectively, Figure 7).

GLUT1 expression also showed higher expression in tumors  $>20\text{mm}$  ( $T \geq 2$ ) than tumors  $<20\text{mm}$  ( $T = 1$ ) (Figure 8). Have no relation between MT1 expression and tumor size ( $p > 0.05$ ).

**Table 1.** Expression of MT1 and GLUT1 receptors in age and clinicopathological characteristics.

**Fig4.** Lower expression of MT1 in tumor with grade III in relation with grades I and II. \* $p < 0.05$ .

**Fig5.** MT1 (A) and GLUT1 (B) expression in ER+ and ER- breast tumors. Lower expression of MT1 in tumors ER- and the inverse, high expression of GLUT1 in ER-. \* $p < 0.05$ .

**Fig6.** High GLUT1 expression in breast tumor T<sub>≥2</sub>.

## DISCUSSION

While many patients are treated successfully, one third of breast cancer patients develop cancer metastasis or recurrence in their lifetime. In this context, biomarkers can be used to detect tumors, distinguish different tumor profiles, predict the evolution of breast cancer, (Haupt et al. 2010) and, above all, determine tumor-specific characteristics, directing patients to specific treatments (Anderson et al. 2014). Breast cancer is not a single disease but rather a heterogeneous group of diseases with distinct pathological, morphological and molecular features with clinical outcomes depending on tumor characteristics. The further molecular characterization of each breast cancer subtype would allow the development of subtype specific treatments, resulting in increased breast cancer survival rates (Miah et al. 2017).

Many of the anti-cancer effects of melatonin are mediated primarily through binding to the two membrane-associated GPCRs, MT1 and MT2 (Hill et al. 2015). One of the proposed mechanisms is the ability of melatonin to inhibit the precursor hormones of ovarian estrogen production, thereby reducing the mitogenic response of cells in ER-positive breast tumors (Sousa-Neto, J.A.; Scaldaferrri 2005). In our study, MT1 expression was higher in ER positive tumors. The same results were observed in a study that evaluated 50 invasive ductal breast tumor biopsy specimens (Jablonska et al. 2013). Also, MT1 negativity in triple-negative breast cancer was significantly associated with higher risk of disease progression. This study corroborates our results that show a lower expression of MT1 in triple-negative tumors when compared with the other tumor subtypes. Confirming a relation of low MT1 expression with worst prognosis observed in a study of Jablonska *et al.* (2013), our study showed that tumors diagnosed with grade III show lower expression of MT1 than tumors of grade I and II.

The expression of the ER $\alpha$  can be directly modulated by the action of melatonin when bound to the MT1 receptor which, when activated, indirectly controls the glucose transporter GLUT1 [12]. MT1 receptor promotes the inhibition of forskolin-stimulated cAMP formation, the suppression of protein kinase A (PKA) activity, the phosphorylation of the CREB and suppresses tumor aerobic metabolism (the Warburg effect), subsequently reducing cell-signaling pathways critical to cell proliferation, cell survival, metastasis, and drug resistance. This type of glucose metabolism is termed aerobic glycolysis and it

represents the bioenergetic process that is preferred by cancer cells over oxidative phosphorylation to accommodate rapidly expanding tumor biomass (PANDIPERUMAL et al. 2008).

Cancer cells depend on glycolysis instead of oxidative phosphorylation for energy production and this phenomenon is known as Warburg effect. Thus, cancer cells take up glucose at an elevated rate to meet their increased energy demands. Crucially, cancer cells require massive amounts of glucose as an energy source for their dysregulated growth and thus overexpress GLUTs. High expression of GLUT1 was correlated with poor prognosis in several cancer types, including breast cancer (Oh et al. 2017). This data corroborates with our results which show higher expression of GLUT1 in triple-negative tumors when compared with luminal subtypes. Grover-McKay *et al.* (1998) demonstrated a strong association between GLUT1 expression and the invasive capacity of breast cancer cells and showed that this protein was expressed in highly invasive MDA-MB-231 cells. In addition, many reports indicated that GLUT1 contributes to tumor aggressiveness (Grover-McKay et al. 1998; Oh et al. 2017). These data agree with the relationship between tumor size and GLUT-1 expression found in our study. High expression of GLUT1 in tumors with size  $\geq 20$  mm, is possibly explained by the increased energetic need of tumor cells.

DAUCHY *et al.* (2015) showed that key tumor-promoting kinases (ERK1/2, AKT, SRC, and FAK) and transcription factors (ER $\alpha$ , CREB, and STAT3) were highly expressed and/or phospho-activated in MCF-7 breast tumor xenografts rats exposed to disruption of circadian melatonin signal (Dauchy et al. 2014; Hill et al. 2015). It could explain our results which show a significant difference in expression of MT1 receptor and GLUT1 in Luminal A (ER+, high expression of MT1 and low expression of GLUT1) and Triple-negative (ER-PR-HER2-, low expression of MT1 and high expression of GLUT1) phenotypes. The low expression of MT1 receptor and consequently high expression of kinases like AKT increase GLUT1 expression.

## CONCLUSION

According to our results, and based on the literature, it was possible to relate the high expression of the MT1 receptor and low expression of GLUT1 in breast cancer subtype of good prognosis (Luminal A) and the inverse correlation in triple-negative tumors, which shows a worse prognosis. Thus, our results suggest that the expression of these proteins could be used as potential target and help to define better therapeutic protocols in breast cancer patients.

## **COMPLIANCE WITH ETHICAL STANDARDS**

### **CONFLICT OF INTEREST**

The authors declare that they have no conflict of interest.

### **ETHICAL APPROVAL**

“All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional and/or national research committee and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards.”

### **INFORMED CONSENT**

“Informed consent was obtained from all individual participants included in the study.”

### **FUNDING**

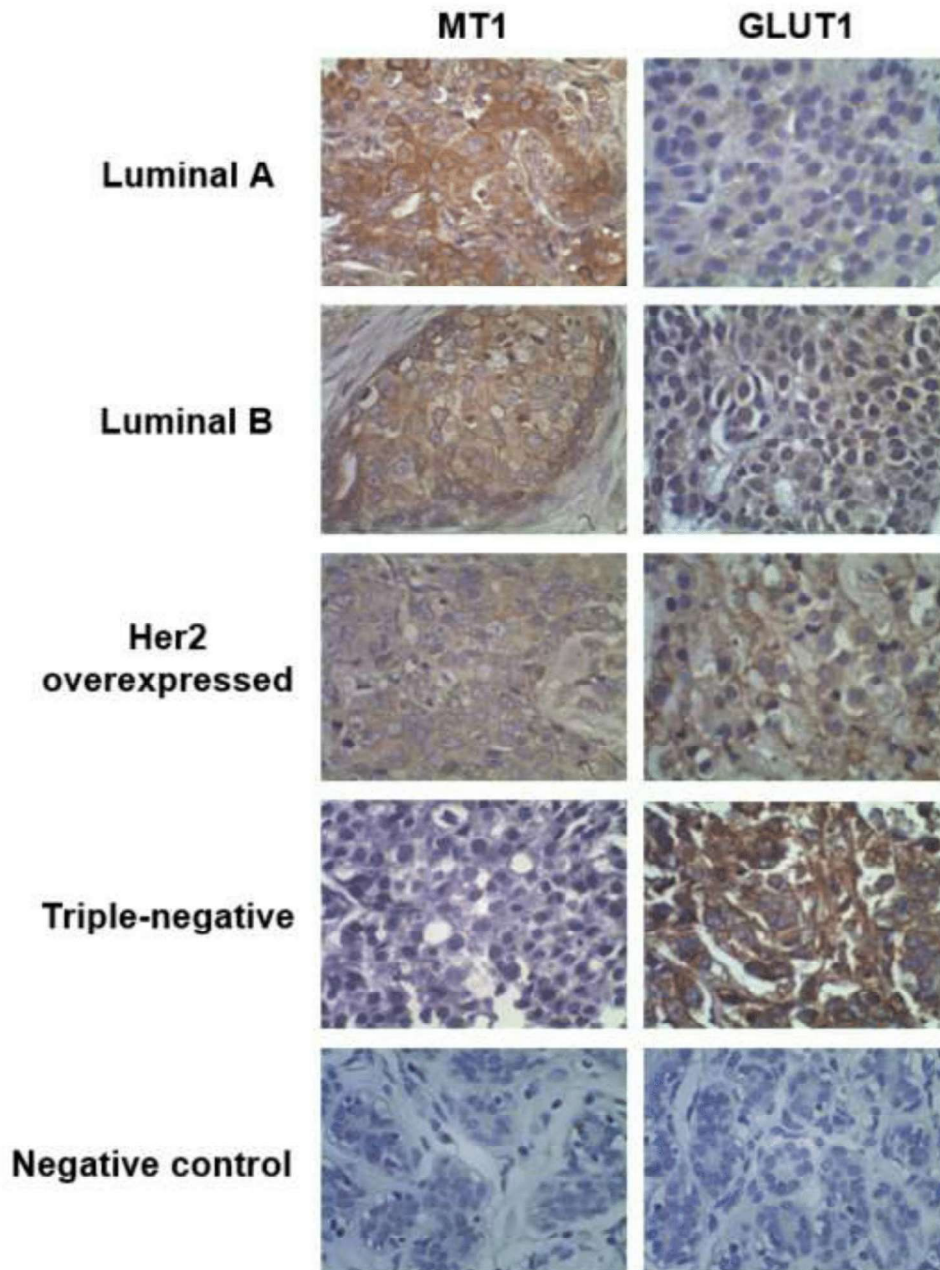
This work was supported by the São Paulo Research Foundation (FAPESP) (grant #2015/02935-2).

## **REFERENCES**

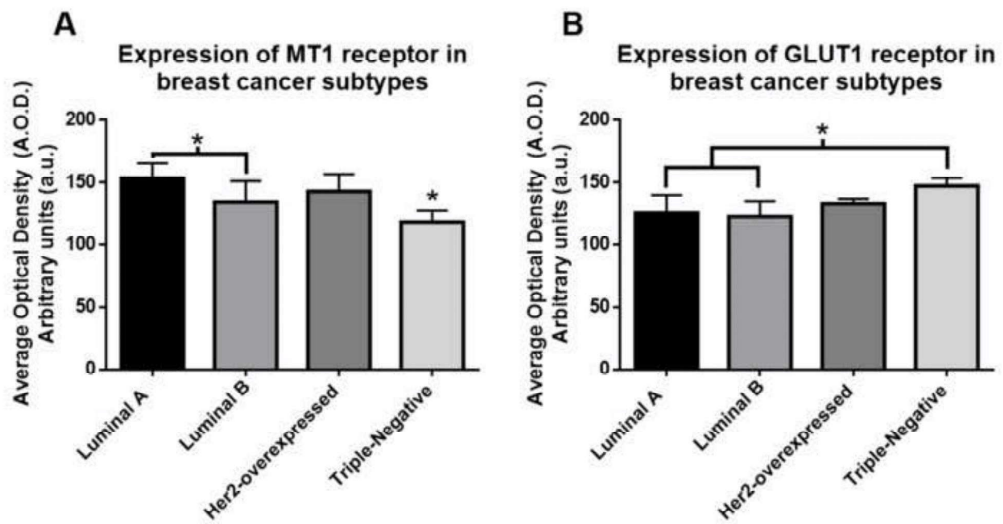
- Anderson WF, Rosenberg PS, Prat A, et al (2014) How Many Etiological Subtypes of Breast Cancer: Two, Three, Four, Or More? *JNCI J Natl Cancer Inst* 106:dju165-dju165 . doi: 10.1093/jnci/dju165
- Belancio VP, Blask DE, Deininger P, et al (2015) The aging clock and circadian control of metabolism and genome stability. *Front Genet* 5:455 . doi: 10.3389/fgene.2014.00455
- Cairns RA, Harris IS, Mak TW (2011) Regulation of cancer cell metabolism. *Nat Rev Cancer* 11:85–95 . doi: 10.1038/nrc2981
- Chen B, Tang H, Liu X, et al (2015) miR-22 as a prognostic factor targets glucose transporter protein type 1 in breast cancer. *Cancer Lett* 356:410–7 . doi: 10.1016/j.canlet.2014.09.028
- Dauchy RT, Xiang S, Mao L, et al (2014) Circadian and melatonin disruption by exposure to light at night drives intrinsic resistance to tamoxifen therapy in breast cancer. *Cancer Res* 74:4099–110 . doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-3156
- Grover-McKay M, Walsh SA, Seftor EA, et al (1998) Role for glucose transporter 1 protein in human breast cancer. *Pathol. Oncol. Res.* 4(2):115–120
- Haupt B, Ro JY, Schwartz MR (2010) Basal-like breast carcinoma: a phenotypically distinct entity. *Arch*

- Pathol Lab Med 134:130–3 . doi: 10.1043/1543-2165-134.1.130
- Hill SM, Belancio VP, Dauchy RT, et al (2015) Melatonin: An inhibitor of breast cancer. *Endocr. Relat. Cancer* 22:R183–R204
- Jablonska K, Pula B, Zemla A, et al (2013) Expression of melatonin receptor MT1 in cells of human invasive ductal breast carcinoma. *J Pineal Res* 54:334–345 . doi: 10.1111/jpi.12032
- Kang SS, Chun YK, Hur MH, et al (2002) Clinical significance of glucose transporter 1 (GLUT1) expression in human breast carcinoma. *Jpn J Cancer Res* 93:1123–8
- Liu J, Clough SJ, Hutchinson AJ, et al (2016) MT<sub>1</sub> and MT<sub>2</sub> Melatonin Receptors: A Therapeutic Perspective. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 56:361–383 . doi: 10.1146/annurev-pharmtox-010814-124742
- Maganhin CC, Carbonel AA, Hatty JH, et al (2008) [Melatonin effects on the female genital system: a brief review]. *Rev Assoc Med Bras* 54:267–271 . doi: S0104-42302008000300022 [pii]
- Miah S, Banks CAS, Adams MK, et al (2017) Advancement of mass spectrometry-based proteomics technologies to explore triple negative breast cancer. *Mol BioSyst* 13:42–55 . doi: 10.1039/C6MB00639F
- Noguchi C, Kamitori K, Hossain A, et al (2016) D-Allose Inhibits Cancer Cell Growth by Reducing GLUT1 Expression. *Tohoku J Exp Med* 238:131–41 . doi: 10.1620/tjem.238.131
- Nooshinfar E, Safaroghli-Azar A, Bashash D, Akbari ME (2017) Melatonin, an inhibitory agent in breast cancer. *Breast Cancer* 24:42–51 . doi: 10.1007/s12282-016-0690-7
- Oh S, Kim H, Nam K, Shin I (2017) Glut1 promotes cell proliferation, migration and invasion by regulating epidermal growth factor receptor and integrin signaling in triple-negative breast cancer cells. *BMB Rep* 50:132–137 . doi: 10.5483/BMBRep.2017.50.3.189
- PANDIPERUMAL S, TRAKHT I, SRINIVASAN V, et al (2008) Physiological effects of melatonin: Role of melatonin receptors and signal transduction pathways. *Prog Neurobiol* 85:335–353 . doi: 10.1016/j.pneurobio.2008.04.001
- Park SY, Jang WJ, Yi EY, et al (2010) Melatonin suppresses tumor angiogenesis by inhibiting HIF-1 $\alpha$  stabilization under hypoxia. *J Pineal Res* 48:178–184 . doi: 10.1111/j.1600-079X.2009.00742.x
- Perez EA (2011) Breast cancer management: opportunities and barriers to an individualized approach. *Oncologist* 16 Suppl 1:20–2 . doi: 10.1634/theoncologist.2011-S1-20
- Slominski RM, Reiter RJ, Schlabritz-Loutsevitch N, et al (2012) Melatonin membrane receptors in

- peripheral tissues: Distribution and functions. *Mol Cell Endocrinol* 351:152–166 . doi: 10.1016/j.mce.2012.01.004
- Sonnenblick A, Fumagalli D, Azim HA, et al (2014) New strategies in breast cancer: the significance of molecular subtypes in systemic adjuvant treatment for small T1a,bN0M0 tumors. *Clin Cancer Res* 20:6242–6 . doi: 10.1158/1078-0432.CCR-14-1086
- Sousa-Neto, J.A.; Scaldaferrri PM (2005) Melatonina e câncer -revisão da literatura. *Rev Bras Cancerol* 51:49–58
- Stevens RG, Brainard GC, Blask DE, et al (2014) Breast Cancer and Circadian Disruption From Electric Lighting in the Modern World. *CA Cancer J Clin* 64:207–218 . doi: 10.3322/caac.21218
- Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB (2009) Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Science* (80- ) 324:1029–1033 . doi: 10.1126/science.1160809
- Wei S, Liu L, Zhang J, et al (2013) Metabolomics approach for predicting response to neoadjuvant chemotherapy for breast cancer. *Mol Oncol* 7:297–307 . doi: 10.1016/j.molonc.2012.10.003

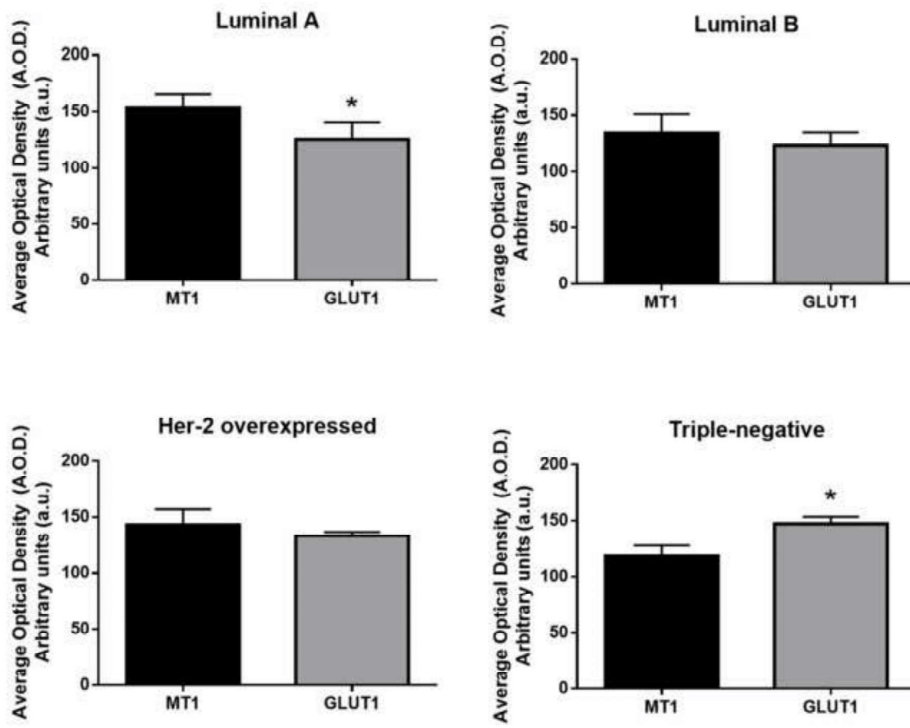


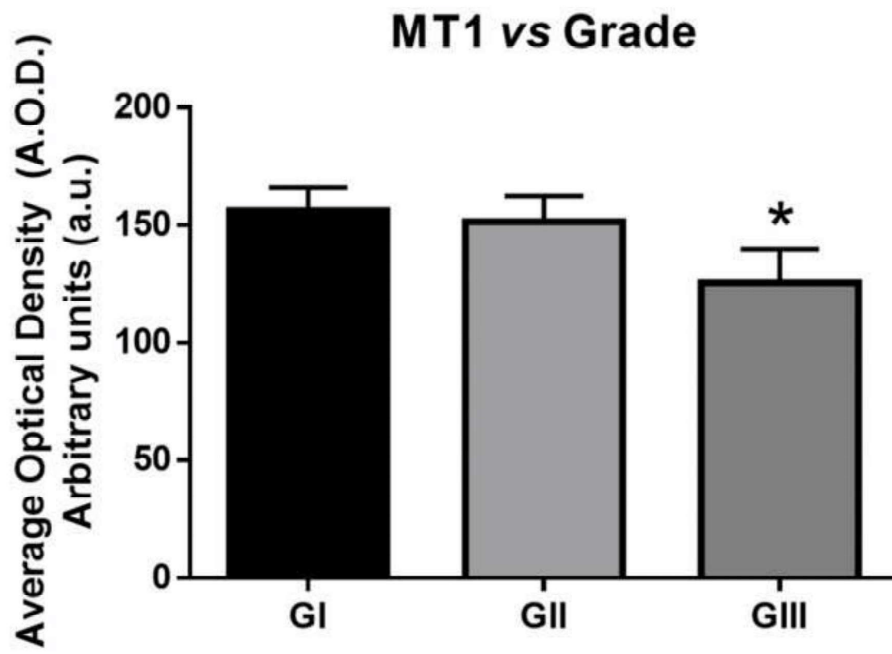




colour figure

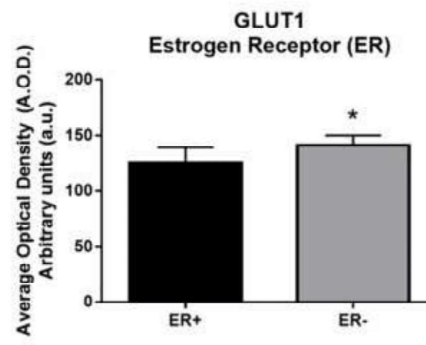
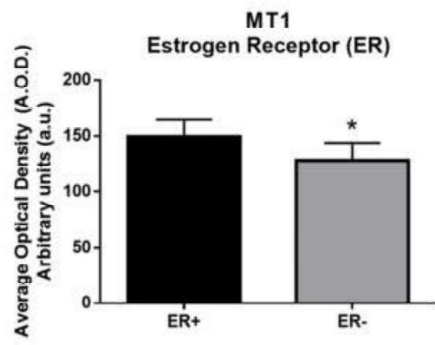
[Click here to download colour figure Fig3.tif](#)

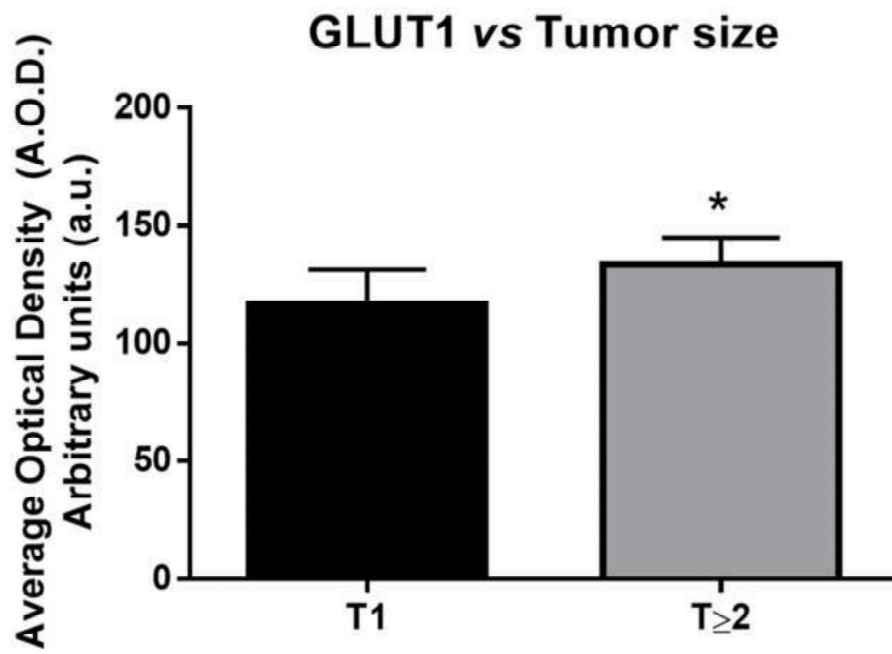




colour figure

[Click here to download colour figure Fig5.tif](#)





**Table 1.** Expression of MT1 and GLUT1 receptors in age and clinicopathological characteristics.

	Number of patients (%)	Average Optical Density (A.O.D.) Arbitrary units (a.u.)	
		MT1	GLUT1
<b>Patient age</b>			
≤50	12 (28.5)	148.1	129.8
>50	30 (71.5)	148.5	131.0
<i>p value</i>		0.99	0.65
<b>ER (Estrogen receptor)</b>			
Positive	34 (80.9)	151.2	128.1
Negative	8 (19.1)	125.8	139.7
<i>p value</i>		<b>0.002*</b>	<b>0.003*</b>
<b>Tumor size</b>			
T1	14 (33.3)	145.1	117.9
T≥2	28 (66.7)	148.1	132.5
<i>p value</i>		0.38	<b>0.004*</b>
<b>Regional lymph nodes</b>			
N0	28 (66.7)	147.9	130.1
N≥1	14 (33.3)	148.6	129.3
<i>p value</i>		0.79	0.83
<b>Metastasis</b>			
M0	29 (69)	148.1	129.8
M1	13 (31)	147.9	130.3
<i>p value</i>		0.85	0.54

\*  $p \leq 0.05$

## **DISCUSSÃO**

## DISCUSSÃO

Nesse estudo, os níveis séricos de melatonina e seus metabólitos AFMK e AMK foram avaliados em pacientes com câncer de mama, pacientes submetidas a quimioterapia e enfermeiras que trabalham em turno noturno em comparação com mulheres controle. Ainda, a expressão do receptor de melatonina MT1 e do transportador de glicose GLUT-1 foram avaliados no tecido tumoral de mama de mulheres. Os resultados mostraram que mulheres com câncer e com quebra do ciclo circadiano tem níveis menores de melatonina em relação as mulheres sem histórico de câncer (controle). Ainda a expressão do MT1 e GLUT1 foram relacionadas com os subtipos e prognóstico do câncer de mama.

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) a ruptura do ciclo circadiano contribui com o aumento do risco de desenvolvimento de câncer de mama (ADAMS, 2013). Tal ruptura pode levar a alterações nos níveis sanguíneos de melatonina e conseqüentemente alterar a expressão de inúmeros genes relacionados ao relógio biológico, incluindo genes supressores tumorais (ANTOCH et al., 2008; GAUGER; SANCAR, 2005; STEVENS et al., 2014; YOU et al., 2005). Dessa forma, baixos níveis de melatonina estão relacionados ao aumento do risco de desenvolvimento de câncer de mama. Esses estudos corroboram nossos resultados que mostraram um menor nível de melatonina em mulheres com câncer de mama em comparação com mulheres sem histórico de câncer. Tamarkin e colaboradores (1982) também encontraram menor nível de melatonina em mulheres com câncer de mama (RE+) em relação as mulheres do grupo sem câncer. (TAMARKIN et al., 1982)



A melatonina é sintetizada no período noturno a partir da conversão do aminoácido triptofano em serotonina, que é acetilada em N-acetilserotonina, na reação catalisada pela enzima n-acetil-transferase (AA-NAT) e então convertida em melatonina pela enzima hidroxindol-O-metiltransferase (HIOMT) (ALOMARY, 2013; ESPINO; PARIENTE; RODRÍGUEZ, 2012). A enzima AA-NAT apresenta um ritmo diário, atingindo concentrações 100 vezes superiores na fase de escuro, quando comparado à fase de claro. Esta variação cíclica da AA-NAT faz com que a redução dos níveis de serotonina na fase de escuro seja acompanhada pelo aumento das concentrações de N-acetilserotonina e melatonina (HILL et al., 2015). A síntese de melatonina ocorre principalmente na glândula pineal, no entanto, sua produção extra-pineal já foi demonstrada (REITER; TAN; LORENA, 2010). A melatonina é um potente antioxidante e sua reação com espécies reativas de oxigênio e nitrogênio converte melatonina em AFMK, outro potente antioxidante que é convertido da mesma forma em AMK. Além dessa via a melatonina também é convertida em AFMK através da via enzimática pela ação da indolamina 2,3-dioxinase (IDO1) e posteriormente o AFMK é convertido em AMK pela enzima formamidase (ACUÑA-CASTROVIEJO et al., 2014; JAWOREK et al., 2016).

Vários estudos indicam que a exposição à luz ou dispositivos com fonte de luz durante a noite podem influenciar a síntese de melatonina (BARTSCH et al., 1989; BRAINARD et al., 2001; BRAINARD; ROLLAG; HANIFIN, 1997; CAJOCHEN et al., 2000, 2011; GADDY; ROLLAG; BRAINARD, 1993; GLICKMAN; LEVIN; BRAINARD, 2002; GOOLEY et al., 2011; LOCKLEY et al.,

2006; LOCKLEY; BRAINARD; CZEISLER, 2003; ZEITZER et al., 2000). Assim, foi descrito que mulheres que trabalham a noite, e, portanto, estão expostas à luz no período noturno, apresentam um risco elevado de desenvolver câncer de mama devido em consequência a baixa produção de melatonina (REITER et al., 2017). Esses dados corroboram nossos resultados, os quais demonstraram que enfermeiras de turnos noturnos apresentam baixos níveis de melatonina em comparação com mulheres sem história de câncer e sem atividades noturnas. Além disso, nosso estudo demonstrou que mulheres que dormem sem fonte de luz no quarto à noite apresentam níveis elevados de AFMK, o que pode estar relacionado ao aumento da melatonina devido à ausência de luz e consequentemente maior metabolização em AFMK.

Com relação as características clínico-patológicas, mulheres com tumores maiores que 20 mm ( $T \geq 2$ ) apresentaram níveis elevados de AFMK em relação a pacientes com T1. Esse aumento pode ser explicado pela maior taxa de oxidação da melatonina devido ao estresse causado pelo aumento do número de células tumorais. Similarmente, um estudo de Bartsch e colaboradores (1989) mostrou que o nível de melatonina noturna foi inversamente proporcional ao tamanho dos tumores mamários (BARTSCH et al., 1989). Ainda, níveis mais elevados de melatonina e AFMK também foram correlacionados com presença de metástase à distância e níveis de AFMK com comprometimento dos linfonodos ( $N > 0$ ). Sabe-se que linfócitos T produzem todas as enzimas necessárias para sintetizar melatonina, assim, sugere-se que a invasão de linfonodos e outros tecidos pelas células tumorais pode aumentar a resposta

imune local e, como consequência, aumentar os níveis de melatonina (CHEN et al., 2015; GUERRERO et al., 2000; LARDONE et al., 2006; POZO et al., 1997, 2004; REN et al., 2017; ZHANG; ZHANG, 2014). Os altos níveis de AFMK também podem ser explicados como uma consequência da produção de melatonina pelas células imunes locais. Células tumorais nos linfonodos aumentam a expressão de IDO1, que suprime a ação dos linfócitos T através da ativação de células T-reguladoras, como escape do sistema imune do hospedeiro (FALLARINO et al., 2002, 2003; FRUMENTO et al., 2002; PRENDERGAST et al., 2014; TERNESS et al., 2002). Essa enzima está envolvida em uma das principais vias que cataboliza a conversão de indoleaminas (triptofano, serotonina e melatonina) em quinurenines (formylkynurenine, formyl-5-hydroxykynurenamine e AFMK, respectivamente).

AFMK é um potente antioxidante e pode ser deformilado por arilamina formamidase ou hemoperoxidase para AMK, outro potente antioxidante (DUBOCOVICH et al., 2010). AFMK também possui funções anti-inflamatórias, descritas na pancreatite aguda, e pode controlar o aumento de melanócitos *in vitro* (JAWOREK et al., 2016). O tratamento com altas doses de AFMK em linhagem de câncer de pâncreas (PANC-1) levou ao aumento de proteínas relacionados ao controle da proliferação e proteção contra danos celulares (LEJA-SZPAK et al., 2015). Estudos referentes ao AFMK e AMK no câncer são escassos na literatura e nosso estudo não demonstrou relações estatisticamente significantes entre os níveis de AMK nos grupos avaliados. No entanto, com relação ao AFMK, pacientes sob quimioterapia adjuvante apresentam níveis

mais baixos de melatonina em comparação com as mulheres controle, o que pode estar relacionado com seu potencial antioxidante contra o estresse oxidativo e a morte celular causada pela quimioterapia. Sabe-se que além de seus receptores de membrana acoplados às proteínas G (MT1 e MT2), a melatonina, por ser lipofílica, também pode atravessar a membrana celular atuando diretamente na modulação de proteínas intracelulares, o que está intimamente relacionado a sua atividade antioxidante (DUBOCOVICH et al., 2010). A melatonina atua na eliminação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e na ativação de enzimas antioxidantes como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutatona peroxidase (GPx) e glutatona redutase (GR). A conversão da melatonina em AFMK ocorre independente da ação enzimática durante suas ações antioxidantes (JAWOREK et al., 2016).

Diversas ações oncostáticas e antiproliferativas são descritas para a melatonina (BLASK et al., 1991; HILL et al., 2015; TEPLITZKY et al., 2001) especialmente em tumores de mama RE-positivo. Nesses tumores a melatonina atua principalmente de forma antiestrogênica por meio de seu receptor de membrana MT1, possuindo ação moduladora sobre as enzimas responsáveis pela síntese do estrogênio, como a aromatase, e sobre o RE, inibindo a expressão do RE- $\alpha$  e a ligação do complexo estradiol-RE ao sítio de ligação do receptor de estrogênio (ERE) no DNA (HILL et al., 2011; MEDIAVILLA et al., 2010; SÁNCHEZ-BARCELÓ et al., 2005; TEPLITZKY et al., 2001).

Nesse contexto, nossos resultados mostraram que a expressão do receptor MT1 foi maior em tumores mamários ER positivos, e uma menor expressão foi

observada em tumores triplo-negativos quando comparados com os outros subtipos fenotípicos. Resultados similares foram observados em um estudo de (JABLONSKA et al., 2013) que demonstraram uma menor expressão do MT1 em câncer de mama triplo-negativo, a qual foi associada ao maior risco de progressão da doença (JABLONSKA et al., 2013). Ainda, confirmando a relação entre a baixa expressão de MT1 com pior prognóstico observado no estudo de Jablonska et al. (2013), nosso estudo mostrou que tumores diagnosticados com grau III apresentam menor expressão de MT1 do que tumores de grau I e II.

A expressão do ER $\alpha$  pode ser modulada diretamente pela ação da melatonina quando ligada ao receptor MT1 que, quando ativado, controla indiretamente o transportador de glicose GLUT1 (VANDER HEIDEN; CANTLEY; THOMPSON, 2009). O receptor MT1 promove a inibição da formação de AMPc, a supressão da atividade da Proteína Cinase A (PKA) e suprime o metabolismo aeróbico do tumor (efeito Warburg), reduzindo posteriormente as vias de sinalização celular críticas para a proliferação celular, sobrevivência celular, metástase e resistência aos medicamentos. O efeito Warburg representa o processo bioenergético que é preferido pelas células tumorais sobre a fosforilação oxidativa para adaptar a rápida expansão da biomassa tumoral (HILL et al., 2015; PANDIPERUMAL et al., 2008). Assim, as células tumorais absorvem glicose a uma taxa elevada para atender a sua crescente demanda de energia e, portanto, podem superexpressar GLUTs. Alta expressão de GLUT1 foi correlacionada com um prognóstico ruim em vários tipos de câncer, incluindo câncer de mama (OH et al., 2017). Grover-McKay et al. (1998) demonstraram

uma forte associação entre a expressão de GLUT1 e a capacidade invasiva de células de câncer de mama e mostraram que essa proteína foi muito expressa em células MDA-MB-231, as quais são altamente invasivas. De fato, os trabalhos indicam que GLUT1 contribui para a agressividade tumoral (GROVER-MCKAY et al., 1998; OH et al., 2017). Esses dados corroboram nossos resultados que mostraram maior expressão de GLUT1 em tumores triplo-negativos quando comparados com os subtipos Luminal A e B. Ainda, a expressão elevada de GLUT1 foi observada em tumores com tamanho maior ou igual a 20 mm, o que é possivelmente explicada pelo aumento da necessidade energética de células tumorais.

## **CONCLUSÃO**

## CONCLUSÃO

O presente trabalho permitiu estabelecer as seguintes conclusões:

- As mensurações mostram menor nível de melatonina em mulheres com câncer em comparação com mulheres livres de neoplasia, sugerindo um papel protetor da melatonina no desenvolvimento do câncer de mama;
- As expressões proteicas elevadas de MT1 e GLUT1 estão associadas ao prognóstico tumoral (melhor prognóstico e pior prognóstico, respectivamente).
- Níveis elevados de melatonina e AFMK em mulheres com metástase e de AFMK em mulheres com linfonodos acometidos e tumores maiores que 20mm sugerem alta atividade de células do sistema imune produzindo e convertendo melatonina em AFMK e assim elevando seus níveis.
- Diminuição dos níveis de melatonina em mulheres saudáveis que trabalham no turno noturno em comparação com mulheres saudáveis de hábito diurno confirmam o bloqueio do ciclo circadiano e a síntese de melatonina durante a noite.
- Níveis de melatonina plasmática menores em mulheres com câncer de mama durante tratamento quimioterápico em relação ao grupo controle denotando maior estresse celular causado pelo tratamento quimioterápico e conseqüentemente maior consumo de melatonina como fator antioxidante.
- Foram encontrados menores níveis de AFMK em mulheres que dormem com luz no quarto e pelo bloqueio da síntese de melatonina e conseqüentemente assim menor nível de AFMK.
- O MT1 teve menor expressão em tumores de grau III que pode relacionado com pior prognóstico e o GLUT1 foi altamente expresso em tumores de tamanho avançado o que pode estar relacionado com a grande necessidade energética direcionadas ao crescimento tumoral acelerado.



## **BIBLIOGRAFIA**

## BIBLIOGRAFIA

- ACUÑA-CASTROVIEJO, D. et al. Extrapineal melatonin: sources, regulation, and potential functions. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 71, n. 16, p. 2997–3025, 20 ago. 2014.
- ADAMS, P. **The breast cancer conundrum. Bulletin of the World Health Organization**, 2013.
- AL-OMARY, F. A. M. Melatonin. In: **Profiles of drug substances, excipients, and related methodology**. [s.l: s.n.]. v. 38p. 159–226.
- ANTOCH, M. P. et al. Disruption of the circadian clock due to the Clock mutation has discrete effects on aging and carcinogenesis. **Cell Cycle**, v. 7, n. 9, p. 1197–1204, 1 maio 2008.
- BARTSCH, C. et al. Stage-dependent depression of melatonin in patients with primary breast cancer. Correlation with prolactin, thyroid stimulating hormone, and steroid receptors. **Cancer**, v. 64, n. 2, p. 426–433, 1989.
- BLASK, D. E. et al. Pineal melatonin inhibition of tumor promotion in the N-nitroso-N-methylurea model of mammary carcinogenesis: potential involvement of antiestrogenic mechanisms in vivo. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 117, n. 6, p. 526–532, nov. 1991.
- BRAINARD, G. C. et al. Action spectrum for melatonin regulation in humans: evidence for a novel circadian photoreceptor. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 21, n. 16, p. 6405–12, 15 ago. 2001.
- BRAINARD, G. C.; ROLLAG, M. D.; HANIFIN, J. P. Photic regulation of melatonin in humans: ocular and neural signal transduction. **Journal of biological rhythms**, v. 12, n. 6, p. 537–46, 29 dez. 1997.
- CAJOCHEN, C. et al. Dose-response relationship for light intensity and ocular and electroencephalographic correlates of human alertness. **Behavioural brain research**, v. 115, n. 1, p. 75–83, out. 2000.
- CAJOCHEN, C. et al. Evening exposure to a light-emitting diodes (LED)-backlit computer screen affects circadian physiology and cognitive performance.

**Journal of Applied Physiology**, v. 110, n. 5, p. 1432–1438, 1 maio 2011.

CHEN, Y. et al. T lymphocytes possess the machinery for 5-HT synthesis, storage, degradation and release. **Acta physiologica (Oxford, England)**, v. 213, n. 4, p. 860–7, abr. 2015.

DUBOCOVICH, M. L. et al. Nomenclature , Classification , and Pharmacology of G Protein-Coupled Melatonin Receptors. **Pharmacological Reviews**, v. 62, n. 3, p. 343–380, set. 2010.

ESPINO, J.; PARIENTE, J. A.; RODRÍGUEZ, A. B. **Oxidative stress and immunosenescence: Therapeutic effects of melatonin***Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2012.

FALLARINO, F. et al. T cell apoptosis by tryptophan catabolism. **Cell Death and Differentiation**, v. 9, n. 10, p. 1069–1077, 16 set. 2002.

FALLARINO, F. et al. Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. **Nature Immunology**, v. 4, n. 12, p. 1206–1212, 26 dez. 2003.

FRUMENTO, G. et al. Tryptophan-derived catabolites are responsible for inhibition of T and natural killer cell proliferation induced by indoleamine 2,3-dioxygenase. **The Journal of experimental medicine**, v. 196, n. 4, p. 459–68, 19 ago. 2002.

GADDY, J. R.; ROLLAG, M. D.; BRAINARD, G. C. Pupil size regulation of threshold of light-induced melatonin suppression. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 77, n. 5, p. 1398–401, nov. 1993.

GAUGER, M. A.; SANCAR, A. Cryptochrome, circadian cycle, cell cycle checkpoints, and cancer. **Cancer Research**, v. 65, n. 15, p. 6828–6834, 1 ago. 2005.

GLICKMAN, G.; LEVIN, R.; BRAINARD, G. C. Ocular input for human melatonin regulation: relevance to breast cancer. **Neuro endocrinology letters**, v. 23 Suppl 2, p. 17–22, jul. 2002.

GOOLEY, J. J. et al. Exposure to room light before bedtime suppresses melatonin onset and shortens melatonin duration in humans. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 96, n. 3, p. E463-72, mar. 2011.

GROVER-MCKAY, M. et al. **Role for glucose transporter 1 protein in human**

**breast cancer Pathology Oncology Research**, 1998.

GUERRERO, J. M. et al. Involvement of nuclear receptors in the enhanced IL-2 production by melatonin in Jurkat cells. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 917, p. 397–403, 2000.

HILL, S. M. et al. Declining melatonin levels and MT1 receptor expression in aging rats is associated with enhanced mammary tumor growth and decreased sensitivity to melatonin. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 127, n. 1, p. 91–98, 12 maio 2011.

HILL, S. M. et al. Melatonin: an inhibitor of breast cancer. **Endocrine Related Cancer**, v. 22, n. 3, p. R183–R204, 3 jun. 2015.

JABLONSKA, K. et al. Expression of melatonin receptor MT1 in cells of human invasive ductal breast carcinoma. **Journal of Pineal Research**, v. 54, n. 3, p. 334–345, abr. 2013.

JAWOREK, J. et al. Melatonin metabolite, N1-acetyl-N1-formyl-5-methoxykynuramine (AFMK), attenuates acute pancreatitis in the rat: In vivo and in vitro studies. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 67, n. 3, p. 411–421, 2016.

LARDONE, P. J. et al. Melatonin synthesized by Jurkat human leukemic T cell line is implicated in IL-2 production. **Journal of cellular physiology**, v. 206, n. 1, p. 273–9, jan. 2006.

LEJA-SZPAK, A. et al. Kynuramines induce overexpression of heat shock proteins in pancreatic cancer cells Via 5-hydroxytryptamine and MT1/MT2 receptors. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 66, n. 5, p. 711–718, out. 2015.

LOCKLEY, S. W. et al. Short-wavelength sensitivity for the direct effects of light on alertness, vigilance, and the waking electroencephalogram in humans. **Sleep**, v. 29, n. 2, p. 161–8, fev. 2006.

LOCKLEY, S. W.; BRAINARD, G. C.; CZEISLER, C. A. High sensitivity of the human circadian melatonin rhythm to resetting by short wavelength light. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 88, n. 9, p. 4502–5, set. 2003.

MEDIAVILLA, M. D. et al. Basic mechanisms involved in the anti-cancer effects of melatonin. **Current medicinal chemistry**, v. 17, n. 36, p. 4462–81, 2010.

OH, S. et al. Glut1 promotes cell proliferation, migration and invasion by regulating epidermal growth factor receptor and integrin signaling in triple-negative breast cancer cells. **BMB reports**, v. 50, n. 3, p. 132–137, mar. 2017.

PANDIPERUMAL, S. et al. Physiological effects of melatonin: Role of melatonin receptors and signal transduction pathways. **Progress in Neurobiology**, v. 85, n. 3, p. 335–353, jul. 2008.

POZO, D. et al. Expression of the Mel1a-melatonin receptor mRNA in T and B subsets of lymphocytes from rat thymus and spleen. **FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 11, n. 6, p. 466–73, maio 1997.

POZO, D. et al. mRNA expression of nuclear receptor RZR/RORalpha, melatonin membrane receptor MT, and hydroxindole-O-methyltransferase in different populations of human immune cells. **Journal of pineal research**, v. 37, n. 1, p. 48–54, ago. 2004.

PRENDERGAST, G. C. et al. **Indoleamine 2,3-dioxygenase pathways of pathogenic inflammation and immune escape in cancer***Cancer Immunology, Immunotherapy* NIH Public Access, , jul. 2014.

REITER, R. J. et al. **Melatonin, a full service anti-cancer agent: Inhibition of initiation, progression and metastasis***International Journal of Molecular Sciences* Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), , 2017.

REITER, R. J.; TAN, D. X.; LORENA, F. B. Melatonin: A multitasking molecule. **Progress in Brain Research**, v. 181, n. C, p. 127–151, 2010.

REN, W. et al. Melatonin signaling in T cells: Functions and applications. **Journal of Pineal Research**, v. 62, n. 3, p. 1–15, 2017.

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

STEVENS, R. G. et al. Breast Cancer and Circadian Disruption From Electric Lighting in the Modern World. **CA Cancer J Clin**, v. 64, n. 3, p. 207–218, 2014.

TAMARKIN, L. et al. Decreased nocturnal plasma melatonin peak in patients with

estrogen receptor positive breast cancer. **Science (New York, N.Y.)**, v. 216, n. 4549, p. 1003–5, 28 maio 1982.

TEPLITZKY, S. R. et al. Chemoprevention of NMU-induced rat mammary carcinoma with the combination of melatonin and 9-cis-retinoic acid. **Cancer letters**, v. 168, n. 2, p. 155–63, 26 jul. 2001.

TERNESS, P. et al. Inhibition of allogeneic T cell proliferation by indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing dendritic cells: mediation of suppression by tryptophan metabolites. **The Journal of experimental medicine**, v. 196, n. 4, p. 447–57, 19 ago. 2002.

VANDER HEIDEN, M. G.; CANTLEY, L. C.; THOMPSON, C. B. Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. **Science**, v. 324, n. 5930, p. 1029–1033, 22 maio 2009.

YOU, S. et al. Daily coordination of cancer growth and circadian clock gene expression. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 91, n. 1, p. 47–60, maio 2005.

ZEITZER, J. M. et al. Sensitivity of the human circadian pacemaker to nocturnal light: melatonin phase resetting and suppression. **The Journal of physiology**, v. 526 Pt 3, n. Pt 3, p. 695–702, 1 ago. 2000.

ZHANG, H. M.; ZHANG, Y. **Melatonin: A well-documented antioxidant with conditional pro-oxidant actions** **Journal of Pineal Research**, set. 2014.

**ANEXOS**

## **ANEXO I**



## **METODOLOGIA**

### **1. Coleta de amostras**

Este trabalho foi enviado ao Comitê de Ética da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto e foi aprovado sob o número 682.062.

#### **1.1. Amostras de sangue**

Foram coletados aproximadamente 10 mL de sangue de um total de 52 pacientes com câncer de mama atendidas no Serviço de Ginecologia e Obstetrícia (GO) do Instituto do Câncer (ICA) do Hospital de Base de São José do Rio Preto. O atendimento ambulatorial é realizado de segunda, quarta e sexta-feira no período da manhã. O aluno permanece no ambulatório entre 7:00 e 9:00 horas aguardando a triagem e confirmação do diagnóstico de câncer de mama. Após esta etapa, a paciente é informada sobre o projeto e questionada se deseja ou não participar. Caso a paciente esteja de acordo com o projeto, sem nenhuma dúvida e desejar positivamente doar uma amostra de sangue, esta é levada à sala de enfermagem do ICA onde é assinado o termo de consentimento (ANEXO II), respondido o questionário (ANEXO III) e posteriormente é realizada a coleta de sangue pela enfermeira do serviço.

As amostras de pacientes controle foram coletadas pelo aluno (que possui formação e experiência neste procedimento, adquirido quando foi técnico contratado de laboratório clínico particular) sempre com o critério de pareamento pela idade, horário do despertar, horário da coleta da amostra, qualidade do sono no geral e na noite anterior, e quantidade de luz no quarto durante a noite, que foi estipulada em baixa (nenhuma fonte de luz e todas as janelas e portas fechadas) e alta (TV, relógio digital e/ou abajur ligados, porta e/ou janela aberta).

#### **1.2. Processamento das amostras de sangue**

Após a coleta de sangue, a amostra foi centrifugada a 1200 rpm por 15 min, o plasma foi separado e acondicionado em tubos de 2ml e congelados em freezer -80 °C para posterior extração dos compostos.

#### **1.3. Extração de melatonina, AFMK e AMK**

As amostras de plasma foram descongeladas e transferidas para um tubo falcon de 15 mL e acondicionadas em gelo. Foi adicionado diclorometano na proporção de 1:1 e as amostras foram agitadas em vortex vigorosamente até a verificação de um aspecto leitoso. Após esta etapa as amostras foram centrifugadas a 6500 rpm por 10 min a 4 °C e posteriormente a fase orgânica (inferior) foi separada em um tubo de 2 mL.

O diclorometano foi seco em gás nitrogênio com a utilização de um *dry-block* e após total evaporação do reagente, as amostras foram acondicionadas em freezer -80 °C para posterior análise.

#### **1.4. Dosagem de melatonina, AFMK e AMK através de espectrometria de massas Xevo® TQ-S (Waters)**

O volume de injeção foi de 10 uL tanto dos padrões quanto das amostras. As amostras secas foram ressuspensas em 200 uL de acetonitrila. Foi utilizada uma C18 (100 mm x 4.6 mm, 2.7 µm) com H<sub>2</sub>O + ácido fórmico 0,1% (A) e acetonitrila + ácido fórmico 0,1% (B) como fase móvel e gradiente descrito na tabela 1.

<i>Time (min)</i>	<i>%A</i>	<i>%B</i>
0	50	50
5	10	90
7	10	90
7,1	50	50
12	50	50

**Tabela 1.** Condições cromatográficas do HPLC.

As condições do espectrômetro de massas foram: voltagem do capilar = 3.20 kV, temperatura da fonte = 150 °C, temperatura do gás de dessolvatação (N<sub>2</sub>) = 350 °C, fluxo do gás de dessolvatação = 600 L/h, fluxo do gás de colisão = 0.15 mL/min. E as configurações para leitura das moléculas foram estabelecidas por MRM (Multiple Reaction Monitoring) da seguinte forma: melatonina - 233.1 > 174.1 - voltagem do cone = 35 V; energia de colisão = 13 eV (dwell time = 0.412s); AMK - 237.1 > 114.1 - voltagem do cone = 35 V; energia de colisão =

15 eV (dwell time = 0.412s); AFMK - 287.1 > 228.1 - voltagem do cone = 40 V; energia de colisão = 15 eV (dwell time = 0.412s).

## **2. Fragmentos tumorais emblocados em parafina**

Os blocos parafinados contendo os fragmentos dos tumores de mama das pacientes incluídas no projeto foram disponibilizados pelo Serviço de Patologia do Hospital de Base de São José do Rio Preto. Após a verificação pelo aluno no sistema de laudos com o diagnóstico histopatológico e a classificação fenotípica realizada a partir da expressão imunohistoquímica dos anticorpos anti-receptor de estrógeno, anti-receptor de progesterona e expressão do gene HER-2-neu, solicitou-se o bloco contendo o fragmento tumoral. Após a separação pelo funcionário responsável e assinatura do aluno de termo de responsabilidade, os blocos foram levados ao Laboratório de Investigação Molecular no Câncer (LIMC) para realização da técnica de imunohistoquímica para avaliar a expressão do receptor de melatonina MT1 e transportador de glicose GLUT1.

## **3. Imunohistoquímica**

O procedimento imuno-histoquímico foi realizado no tecido tumoral a fim de avaliar a expressão do anticorpo anti-MT1 (receptor de melatonina). Foi realizada a padronização de acordo com as informações fornecidas pelo fabricante para o anticorpo, estabelecendo-se a diluição de 1:100 para o MT1 e 1:1200 para o GLUT1.

Cortes histológicos de 3µm foram obtidos do material incluído em parafina e aderidos em lâminas silanizadas. Posteriormente foi realizada a etapa de desparafinização dos cortes, inicialmente em estufa a 60 °C, seguida em xilol e, por fim, a hidratação com etanol em grau decrescente. O processo de recuperação antigênica ocorreu em panela a vapor durante 35 minutos com tampão de ácido cítrico (pH 6,0). O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado com água oxigenada (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) durante 30 minutos.

As lavagens dos cortes histológicos entre as etapas foram realizadas em tampão PBS (1x). O material foi incubado com o anticorpo primário do marcador

específico em câmara úmida escura por 18 horas a temperatura de 4 °C. Após o período de incubação, todas as lâminas foram lavadas com solução salina (PBS) e incubadas com anticorpo secundário. O método utiliza a enzima HRP (horseradish peroxidase) na presença de anticorpo primário, anticorpo secundário-biotina e peroxidase-estreptavidina revelados com cromógeno DAB (Sigma), conforme as instruções do kit Star Trek Universal HRP Detection (Medical Biocare). A contracoloração foi realizada com Hematoxilina por 40 segundos e a montagem das lâminas em resina Erv-mount (Erviagas). Todas as imunorreações foram acompanhadas de um controle positivo para o anticorpo testado (mama normal humana) e um controle negativo (sem anticorpo primário).

Após o procedimento imuno-histoquímico, as lâminas foram observadas na objetiva de 40 X em microscópio Nikon Eclipse E200 e analisadas por densitometria óptica. Para cada amostra foram fotografados 3 diferentes campos apenas nas áreas imunorreativas, nas quais foram quantificados 20 pontos com o software ImageJ, totalizando 60 pontos quantificados para cada lâmina. Os valores foram obtidos em unidades arbitrárias (u.a.) e demonstraram a densidade óptica média (D.O.M.) para cada amostra.

## **ANEXO II**

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**  
(Conselho Nacional de Saúde, resolução 196/96)

**Título da Pesquisa: “A Melatonina e seus metabólitos como marcadores prognósticos em neoplasias mamárias humanas”**

**Pesquisadores Responsáveis:** Profa. Dra. Debora Aparecida Pires de Campos Zuccari – Docente do Departamento de Biologia Molecular e coordenadora do LIMC / Prof. Newton Antônio Bordin Junior – Oncologista - Responsável pela Unidade de Mastologia e Oncologia Ginecológica do Hospital de Base

- Para obter maior conhecimento dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento do câncer de mama, os pesquisadores da FAMERP de São José do Rio Preto (SP) estão desenvolvendo uma pesquisa científica que poderá melhorar o nosso conhecimento sobre esse tumor e, portanto, oferecer novas possibilidades de tratamento e de melhora na qualidade de vida;
- O estudo tem como objetivo verificar a mensuração da melatonina e de seu metabólito principal (AFMK) e relacionar as quantificações com o prognóstico e subtipo da doença.
- Para isso, uma amostra de sangue e o bloco do fragmento tumoral parafinado serão coletados e enviados ao laboratório para as análises. Não haverá mudança na técnica cirúrgica ou tratamento para esta coleta.
- Se eu concordar que uma pequena quantidade de sangue retirado seja utilizada para a pesquisa não terei quaisquer benefícios ou direitos financeiros sobre os eventuais resultados decorrentes dela.
- Se eu não concordar ou decidir retirar meu consentimento em qualquer momento, minha decisão não influenciará, de nenhum modo, o meu tratamento nem a evolução da minha doença.

Declaro que, após ter sido convenientemente esclarecido pelo pesquisador sobre a utilização para estudo de uma amostra de sangue (10 mL) a ser retirado pela enfermeira responsável do setor de ambulatório e a coleta do bloco do tecido tumoral parafinado, consinto em participar livre e espontaneamente deste estudo sem que tenha sido submetido (a) a qualquer tipo de pressão:

Assim, consinto em participar do projeto de pesquisa em questão.

Nome do (a) participante:

Representante legal:

RG do prontuário médico:

Data:...../...../...../ Assinatura:.....

Declaração de responsabilidade: Expliquei a natureza, objetivos, riscos e benefícios deste estudo. Coloquei-me a disposição para perguntas e respondi a todas. Obtive o consentimento de maneira livre e me coloquei à disposição para esclarecimento de qualquer dúvida sobre o estudo pelos endereços abaixo indicados.

Nome do (a) pesquisador:

Data:...../...../...../ Assinatura:.....

Inscrição no Conselho Regional: .....

Profa. Dra. Debora Aparecida Pires de Campos Zuccari – Docente do Departamento de Biologia Molecular e coordenadora do LIMC

Prof. Newton Antônio Bordin Junior – Departamento de Ginecologia e Obstetrícia - FAMERP

Tialfi Bergamin de Castro – Pós-graduando em genética no Laboratório de Investigação Molecular no Câncer - LIMC

Av. Brigadeiro Faria Lima, no. 5416

FAMERP - Faculdade de Medicina de S.J. Rio Preto São José do Rio Preto, SP - CEP 15090-000

Fone: (17) 3201-5885

e-mails: debora.zuccari@famerp.br; newton\_bordin@terra.com.br, tialfi\_@hotmail.com

*Em caso de dúvidas contatar a secretaria do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, telefone: (0xx17) 3201-5700, ramal 5813.*

## **ANEXO III**

## Questionário

Acordou: \_\_\_\_:\_\_\_\_

Foi dormir: \_\_\_\_:\_\_\_\_

Acorda durante a noite:\_\_\_\_ Quantas vezes:\_\_\_\_ Acende a luz:\_\_\_\_

Dormiu bem: \_\_\_\_\_ Geralmente dorme bem:\_\_\_\_\_

Quantidade de luz no quarto:\_\_\_\_\_ O que fica ligado:\_\_\_\_\_

Medicamento: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

DN: \_\_/\_\_/\_\_

Caso de câncer na família: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Coleta: \_\_\_\_:\_\_\_\_