



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

Lívia Carvalho Ferreira

Papel da melatonina na modulação do miR-148b e miR-210 em
linhagem triplo-negativa de mama

São José do Rio Preto
2017

Lívia Carvalho Ferreira

Papel da melatonina na modulação do miR-148b e miR-210 em
linhagem triplo-negativa de mama

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. 2013/24612-5

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Debora Ap. Pires de Campos Zuccari.

São José do Rio Preto
2017

Ferreira, Livia Carvalho.

Papel da melatonina na modulação do miR-148b e miR-210 em linhagem de câncer de mama triplo-negativo/ Livia Carvalho Ferreira.
-- São José do Rio Preto, 2017

85f. : il.

Orientador: Debora Ap Pires de Campos Zuccari

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

1. Câncer. 2. Mamas – Câncer. 3. Melatonina. 4. Metastase. I. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. II. Título.

CDU – 616-006

Lívia Carvalho Ferreira

Papel da melatonina na modulação do miR-148b e miR-210 em
linhagem-triplo negativa de mama

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. 2013/24612-5

Comissão Examinadora

Prof^a. Dr^a. Debora A. P. Campos Zuccari
UNESP – São José do Rio Preto
Orientadora

Prof. Dr. Wilson Araújo da Silva Filho
USP – Ribeirão Preto

Prof^a. Dr^a. Dorotéia Rossi Souza
FAMERP – São José do Rio Preto

Prof^a. Dr^a Flavia Cristina Rodrigues Lisoni
UNESP – Ilha Solteira

Prof^a. Dr^a Marília de Freitas Calmon
UNESP – São José do Rio Preto

São José do Rio Preto
10 de novembro de 2017

Esse 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 e no *Laboratory of MicroRNAs and adhesion molecules involved in tumor progression – University of Torino, Turin, Italy* sob supervisão da Profa. Dra. Daniela Taverna. Os recursos para o desenvolvimento do projeto foram obtidos na forma de Auxílio à Pesquisa e bolsa de estudos da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

Dedicatória

Dedico este trabalho especialmente aos meus queridos pais Edna e Fernando, meus exemplos de garra e dedicação.

Dedico também ao meu noivo Wilson, que compartilhou com muito carinho, amor e paciência essa fase da minha vida.

Agradecimientos

Agradeço primeiramente a Deus, por conceder paciência e muita garra pra alcançar todos os objetivos da minha vida!

Agradeço a minha orientadora, Profa. Dra. Debora Zuccari, pelo apoio e amizade durante a realização desse trabalho. Agradeço pelos ensinamentos transmitidos e principalmente por ter confiado que eu seria capaz, estando ao meu lado nos momentos de dificuldade e superação.

A FAPESP, pela concessão da bolsa de estudos no país (Processo N. 2013/24612-5) e exterior (Processo N. 2015/20096-8) e Auxílio Financeiro concedido (Processo N. 2015/04780-6) indispensáveis para a realização desse projeto.

Aos meus grandes amigos antigos do LIMC: Bruna V. Jardim-Perassi, Gabriela B. Gelaleti, Juliana R. Lopes, Marina G. Moschetta e Thaíz F. Borin, e aos novos, Fabrício Ventura, Jessica Oliveira, Jessica Mora, Beatriz, Nathalia Sonehara, Paulo, Rubens de Paula e Tialfi Castro pelos conhecimentos compartilhados. Agradeço especialmente a Jéssica Zani, que participou ativamente na realização de alguns experimentos deste projeto. Nós sabemos cada passo, cada superação... Obrigada!

A Dra. Daniela Taverna, por permitir a realização de estágio no exterior no Laboratory of MicroRNAs and adhesion molecules involved in tumor progression – University of Torino, Turin, Italy. Agradeço pelo auxílio no desenvolvimento do trabalho e também pela amizade. Agradeço também a todos os amigos que conheci neste período, Francesca Orso, Federico Virga, Lorena Quirico, Camila Poietti, Desiree Baruffi e Roberto Coppo. Obrigada de coração, por compartilhar comigo essa experiência maravilhosa tanto profissional como pessoal.

A Daniela Dettori, uma grande amiga que tive a oportunidade de conhecer. Obrigada por toda força, paciência, carinho e atenção que você dedicou a mim no período que estive fora, sem você a Itália não seria tão especial.

À banca examinadora da minha tese, Profa. Dra. Dorotéia Rossi Silva Souza, Profa. Dra. Flávia Rodrigues Lisoni, Profa. Dra. Marília de Freitas Calmon, e Prof. Dr. Wilson Araujo da Silva Filho pelo aceite em participar da análise e enriquecimento deste trabalho.

Aos meus pais Edna e Fernando, e minha irmã Cristina, por todo apoio que recebi nessa fase, obrigada por acreditar que eu seria capaz!

Ao meu noivo Wilson, agradeço pela compreensão, por acreditar em mim sempre e por me mostrar que a felicidade só aumenta quando compartilhamos nossos sonhos com quem amamos.

“Leve na sua memória para o resto de sua vida, as coisas boas que surgiram no meio das dificuldades. Elas serão uma prova de sua capacidade em vencer as provas e lhe darão confiança na presença divina, que nos auxilia em qualquer situação, em qualquer tempo, diante de qualquer obstáculo.”

Chico Xavier

Sumário

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas e símbolos.....	14
RESUMO	16
ABSTRACT	18
I. INTRODUÇÃO	21
1. Câncer de mama	21
2. Metástase	23
3. microRNAs.....	26
4. c-Myc.....	30
5. Melatonina.....	32
5.1 Síntese da melatonina	32
5.2 Receptores de melatonina e mecanismos de ação	34
5.3 Melatonina e câncer.....	35
5.4 Melatonina e miRNAs	37
II. OBJETIVOS	39
III. RESULTADOS	41
Artigo I	43
IV. DISCUSSÃO	66
V. CONCLUSÕES	74
VI. REFERÊNCIAS	76
VII. ANEXO	85

Lista de abreviaturas e símbolos

Lista de abreviaturas e símbolos

µg	microgramas
µL	microlitros
µM	micromolar
5-HTP	do inglês triptofano em 5-hidroxitriptofano
AA-NAT	do inglês N-acetiltransferase
ANOVA	análise de variância
ALCAM	do inglês <i>Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule</i>
cAMP	do inglês <i>adenosine 3',5'-cyclic monophosphate</i>
cDNA	DNA complementar
c-Myc	do inglês <i>myelocytomatosis viral oncogene homolog</i>
cm²	centímetros quadrados
CO₂	fórmula química do gás carbônico
CT	do inglês <i>cycle threshold</i>
CREB	do inglês <i>cAMP response element-binding protein</i>
DGCR8	do inglês <i>microprocessor complex subunit</i>
DICER	do inglês <i>endoribonuclease Dicer</i>
DMEM	do inglês <i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DNase	desoxirribonuclease
EMT	do inglês <i>epithelial-mesenchymal transition</i>
FAPERP	Fundação de Amparo à Pesquisa de São José do Rio Preto
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FBS	soro fetal bovino, do inglês fetal bovine serum
FGFRL1	do inglês <i>Fibroblast Growth Factor Receptor-Like 1</i> .
GPCR	do inglês <i>G-protein coupled receptor</i>
HIF	do inglês Hypoxia Inducible Factor
HEPES	(4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid)
HER2	receptor do fator de crescimento epidermal 2
HIOMT	hidroxi-indol-Ometiltransferase
hnRNP A1	do inglês heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1
HRP	do inglês <i>horseradish peroxidase</i>
INCA	Instituto Nacional do Câncer
ITGA5	do inglês <i>Integrina alfa 5</i>
KCl	Cloreto de Potássio
LIMC	Laboratório de Investigação Molecular no Câncer
L-MYC	do inglês <i>Lung Carcinoma Derived</i>
MAPK	gene da família MAPK quinase
MAX	do inglês <i>MYC Associated Factor X</i>
mg	miligrama
mL	mililitro
mM	milimolar
MMPs	matrix metaloproteinases
mRNA	RNA mensageiro

miRNA	Micro RNA
MTNR1A	melatonin receptor-1
MNT	do inglês Max-Binding Protein
N-MYC	do inglês <i>neuroblastoma MYC</i>
NaCl	Cloreto de Sódio
Na₂HPO₄	Fosfato dissódico
NAS	N-acetilserotonina
NFκB	do inglês <i>nuclear factor-κB</i>
Ng	nanograma
°C	graus celsius
P21	do inglês <i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 1</i>
P53	do inglês <i>Tumor protein p53</i>
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PARP	do inglês <i>Poly (ADP-ribose) polymerase</i>
PBS	tampão fosfato salino
pri-miRNA	do inglês <i>primary miRNA</i>
pre-miRNA	do inglês <i>precursor miRNA</i>
qPCR	do inglês <i>quantitative polimerase chain reaction</i>
RE	Receptor de Estrogênio
RNA	Ácido Ribonucléico
ROR	do inglês <i>receptor orphan receptor</i>
RP	receptor de progesterona
RISC	do inglês <i>RNA-induced silencing complex</i>
RNU4,	<i>small nucleolar RNAs</i>
RNU44	<i>small nucleolar RNAs</i>
RU6B	<i>small nucleolar RNAs</i>
RZR	receptor Z para retinóide
RZR/ROR	receptor Z para retinóide/receptor órfão para retinóide
SDS	do inglês sodium dodecyl sulphate
siRNA	do inglês <i>silence RNA</i>
STAT-3	do inglês <i>Signal transducer and activator of transcription 3</i>
TLDA	do inglês <i>Taqman Low-Density Array</i>
TNM	Sistema de estadiamento clínico, T= tumor, N=linfonodo (do inglês node), M= metástase
TPH1	triptofano hidroxilase 1
TRIS/HCL	<i>Tris-Hydrochloride</i>
u.a.	unidades arbitrárias
VEGF	do inglês <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
VEGFR	do inglês <i>Vascular Endothelial Growth Factor Receptor</i>
v-Myc	do inglês <i>viral avian myelocytomatosis</i>

RESUMO

O câncer de mama apresenta altas taxas de incidência e também de mortalidade, sendo a neoplasia mais comum entre as mulheres. MicroRNAs (miRNAs) são pequenas moléculas de RNAs não codificantes que desempenham papel fundamental na regulação gênica. Estudos recentes têm demonstrado que miRNAs estão diretamente envolvidos na iniciação e progressão de vários tipos tumorais, incluindo o câncer de mama. Diversos miRNAs têm sido descritos como promotores ou supressores tumorais, podendo estar associados ao crescimento do tumor e metástase. Atualmente, tem sido demonstrado que a administração exógena da melatonina, um hormônio naturalmente secretado pela glândula pineal, apresenta diversos efeitos oncostáticos em diferentes tipos tumorais. Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar o papel da melatonina em uma possível via metastática envolvendo a regulação de miRNAs em células da linhagem de câncer de mama metastática e triplo-negativa MDA-MB-231. Inicialmente, a expressão de 384 miRNAs foi avaliada utilizando placas “Taqman Low-density Array” (TLDA). Para futuras validações, foram selecionados apenas miRNAs que apresentaram *fold change* >1,5 e <0,5. Os resultados demonstraram que a melatonina modulou a expressão de 17 miRNAs (11 superexpressos e 6 inibidos). Dentre os miRNAs modulados pela melatonina, miR-148b e miR-210 foram confirmados por qRT-PCR, selecionados e utilizados para investigações funcionais. As células MDA-MB-231 foram então transfectadas para inibição de miR-148b e/ou miR-210 (permanente ou transiente, respectivamente), e avaliadas após tratamento com melatonina. Em seguida foram avaliadas a taxa de migração e expressão proteica de c-Myc, possível gene alvo de miR-148b e miR-210. Os resultados demonstraram que a melatonina foi capaz de reduzir a expressão de c-Myc e afetar a taxa de migração das células modificadas ou não com miR-148b. No entanto, nenhum efeito sobre c-Myc ou migração foi observado em células modificadas para miR-148b, quando comparadas as células controle. No que se refere ao miR-210, a melatonina alterou a expressão de c-Myc e migração celular, nas células tratadas com melatonina ou expressando anti-miR-210. Em resumo, nossos resultados demonstraram que apesar da melatonina influenciar

na modulação positiva do miR-148b e miR-210 em células tumorais de mama triplo-negativas, esta regulação não foi necessariamente causativa para alterar a expressão de c-Myc ou diminuir a taxa de migração destas células. Nossos resultados confirmam o efeito da melatonina na inibição da proliferação e migração celular, especialmente em células triplo-negativas, sugerindo seu importante papel no controle da progressão tumoral. No entanto, ainda é necessário estabelecer uma ligação direta entre as modulações de certas proteínas ou miRNAs com os efeitos da melatonina.

Palavras-chave: câncer de mama; metástase; miRNAs; melatonina.

ABSTRACT

Breast cancer has high rates of incidence and mortality, and it is the most common cancer among women. MicroRNAs (miRNAs) are small molecules of non-coding mRNA that play a key role in gene regulation. Recent studies have shown that miRNAs are directly involved in the initiation and progression of various tumor types, including breast cancer. Several miRNAs have been described as promoters or suppressors of metastasis and may be associated with tumor growth and metastasis. Exogenous administration of melatonin, a hormone secreted by the pineal gland, has been shown several oncostatic effects on different types of cancers. Herein, we investigated if the antimetastatic effects of melatonin were coordinated by miRNAs involved in tumor progression. The expression of 384 miRNAs was measured using Taqman Low-density Array (TLDA) cards. Considering the cut-off we imposed (fold change >1.5 and (fold change >1.5 and <0.5) were evidenced the modulation of 17 miRNAs (11 up and 6 down). Among all miRNAs modulated, the selected miR-210 and miR-148b were further confirmed by qRT-PCR and tested for functional investigations. First, we engineered cells for miR-210 or miR-148b overexpression or depletion (stable or transient), then we evaluated the effect of melatonin on c-Myc protein expression and migration. Melatonin reduced c-Myc expression and migration in cell depleted or not for miR-148b. However no effect on c-Myc or migration was observed for cells depleted for miR-148b when compared with control cells. c-Myc and migration were reduced in cells treated with melatonin or expressing anti-miR-210 (depleted). In summary, our results suggest that, even if melatonin alters miRNA expression, the modulations of the miRNAs we studied, miR-210 and miR-148b, are not essential for melatonin inhibition of cell migration and c-Myc expression. One of the hypotheses is that c-Myc is not a target of these miRNAs in MDA-MB-231 cells, and it is believed that melatonin effects on miRNAs could be just “epiphenomenon” due to general Dicer/Drosha deregulations. Nevertheless, melatonin remains a powerful molecule for metastatic traits inhibition, which modulates a set of protein-coding genes, such as c-

Myc. However, a direct link between expression modulations of certain proteins or miRNAs and melatonin effects has still to be established.

Keywords: breast cancer, metastasis, miRNA, melatonin.

Introdução

I. INTRODUÇÃO

1. Câncer de mama

O câncer de mama representa o segundo tipo mais frequente no mundo, sendo o mais comum entre as mulheres. É relativamente raro antes dos 35 anos, e acima desta faixa etária sua incidência cresce de forma rápida e progressiva. Corresponde a 23% dos novos casos de câncer a cada ano, e 14% do total de mortes por câncer no mundo (KRONSKI et al., 2014; SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2015). No Brasil, dados do Instituto Nacional do Câncer - INCA estimam a ocorrência de 57.960 novos casos desse tipo tumoral para 2017. As taxas de mortalidade por câncer de mama ainda permanecem elevadas no Brasil, e isto se deve principalmente ao diagnóstico tardio (KULKARNI; HICKS, 2008).

O câncer de mama está fortemente associado a fatores hormonais, incluindo menarca precoce e menopausa tardia, nuliparidade e idade mais avançada. Recentes estudos apontam que mulheres que amamentam por longo período adquirem maior proteção contra o acometimento do tumor de mama (DESANTIS et al., 2014; FRANK; CRITCHFIELD, 2002). Além desses, o aumento do peso corporal e a idade continuam sendo importantes fatores de risco (DUBEY; GUPTA; JAIN, 2015; LERTKHACHONSUK et al., 2013).

As incidências mais elevadas se encontram nos países do norte da Europa, Austrália, Nova Zelândia e América do Norte. Os países da América do Sul apresentam taxas intermediárias de incidência, já países do continente asiático revelam os menores índices de acometimento do câncer de mama devido à idade mais tardia da menarca, baixo peso corporal principalmente em mulheres pós-menopausa, assim como o estilo

de vida dessa população, que inclui atividade física e alimentação rica em vegetais (DESANTIS et al., 2014; SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2015).

O estabelecimento do prognóstico e do planejamento terapêutico do câncer de mama baseia-se no tipo, grau histológico do tumor e classificação pelo sistema de estadiamento TNM, que abrange a avaliação do tamanho tumoral, presença de metástase em linfonodos regionais e de metástase à distância (MARINO et al., 2013). Além dos fatores clínico-patológicos, o conhecimento das características moleculares dos tumores tem contribuído com a avaliação mais precisa do prognóstico, e com o desenvolvimento e incorporação de novos agentes e estratégias terapêuticas (KULKARNI; HICKS, 2008; ZHANG et al., 2015b). Atualmente, o status do receptor de estrógeno (RE), receptor de progesterona (RP) e do receptor do fator de crescimento epidermal 2 (HER-2/neu) são exemplos de características moleculares dos tumores mamários que foram incorporados à rotina clínica e permitem que se estabeleça um tratamento individualizado (TELLI; SLEDGE, 2015).

Pacientes com tumores RE-positivos podem ser tratados com antagonistas desse receptor, enquanto o uso do trastuzumabe em pacientes com câncer de mama que apresentam superexpressão da proteína HER-2/neu é um exemplo de sucesso da terapia-alvo com anticorpos monoclonais (FERNANDES et al., 2009; HSIAO et al., 2010). Os tumores triplo receptor-negativos (RE-, RP- e HER- 2/neu-) acometem cerca de 15% do total de casos de câncer de mama, apresentam pior prognóstico, uma vez que não respondem a tratamentos específicos, relacionando-se com a ocorrência de metástases e menor sobrevida das pacientes (FERNANDES et al., 2009; MUSTACCHI; DE LAURENTIIS, 2015).

A maioria das mortes por câncer é causada pelas consequências da lesão metastática e não pelo tumor primário, sendo esta a principal causa de morbidade e mortalidade, responsável por cerca de 90% de óbitos (GUAN, 2015; SEYFRIED; HUYSENTRUYT, 2013). Apesar da alta incidência, o diagnóstico precoce e a introdução de tratamentos mais efetivos têm possibilitado o declínio das mortes e melhorado a qualidade de vida das pacientes com a doença (KULKARNI; HICKS, 2008). No entanto, muitas vezes a paciente adquire resistência a determinado tratamento, o que possibilita o crescimento tumoral, invasão e metástase (MCGUIRE; BROWN; KERIN, 2015).

2. Metástase

A transformação neoplásica consiste em um processo multicausal no qual os controles normais da proliferação celular e da interação célula-célula são perdidos. A ativação aberrante dos proto-oncogenes em conjunto com a inibição não regulada dos genes supressores tumorais representam os fundamentos desse processo (SCULLY et al., 2012). A progressão do câncer de mama depende da capacidade das células de invasão, de metástase e colonização de locais distantes (MCGUIRE; BROWN; KERIN, 2015; SHI et al., 2010). O movimento celular é gerado por uma força obtida pela organização dinâmica do citoesqueleto, assim, células metastáticas são altamente migratórias e invasivas, caracterizadas por um citoesqueleto mal estruturado e pouca ancoragem em seu substrato. Durante o processo de metástase, as células tumorais induzem uma alteração nas células adjacentes ao tumor e esta interação é mediada pela

matriz extracelular, que tem função de estabelecer um microambiente favorável para a formação de metástases (GENG; ALEXANDROU; LI, 2014).

Para o desenvolvimento de metástases as células tumorais precisam passar por uma série de etapas para se afastar do tumor primário e se espalhar para vários órgãos. Este processo é conhecido como cascata metastática, e compreende o descolamento de células tumorais do tumor primário, invasão do microambiente tumoral local, sobrevivência na circulação e extravasamento para outros tecidos (TAUBENBERGER, 2014).

Inicialmente, as células do tumor primário sofrem alterações das suas características fenotípicas pelo processo denominado transição epitélio-mesenquimal (EMT, do inglês *epithelial-mesenchymal transition*). Esta transição é caracterizada pela mudança do fenótipo epitelial para mesenquimal, ocasionando a perda ou expressão reduzida dos marcadores das células epiteliais e o aumento da expressão de marcadores de células mesenquimais como e-caderina e vimentina, respectivamente (FORONI et al., 2012; YEUNG; YANG, 2017). Por sua vez, estas características ocasionam ao deslocamento das células do tumor primário possibilitando a migração e invasão celular através do estroma, e consequente entrada nos vasos sanguíneos (FORONI et al., 2012; SIGURDSSON et al., 2011). Uma vez na corrente sanguínea, as células tumorais precisam escapar da resposta imune do hospedeiro e dos sinais apoptóticos para sobreviver e alcançar um novo órgão.

Mesmo as células tumorais utilizando toda maquinaria possível para superar as barreiras impostas pelo sistema imune do hospedeiro, apenas, cerca de 3% das células liberadas na corrente sanguínea são capazes de resistir e formar micrometástases, e uma

porcentagem ainda menor é capaz de se proliferar e formar macrometástases. As células sobreviventes se aderem ao lúmen capilar, e a partir deste ponto, se proliferam até formar uma pequena massa tumoral, que irá romper o endotélio rumo ao estroma do órgão específico. Finalmente, as células invasivas se alojam em microambientes favoráveis a elas, dando início à proliferação celular para desenvolvimento do novo tumor (**Figura 1**) (MA et al., 2015; MCGUIRE; BROWN; KERIN, 2015).

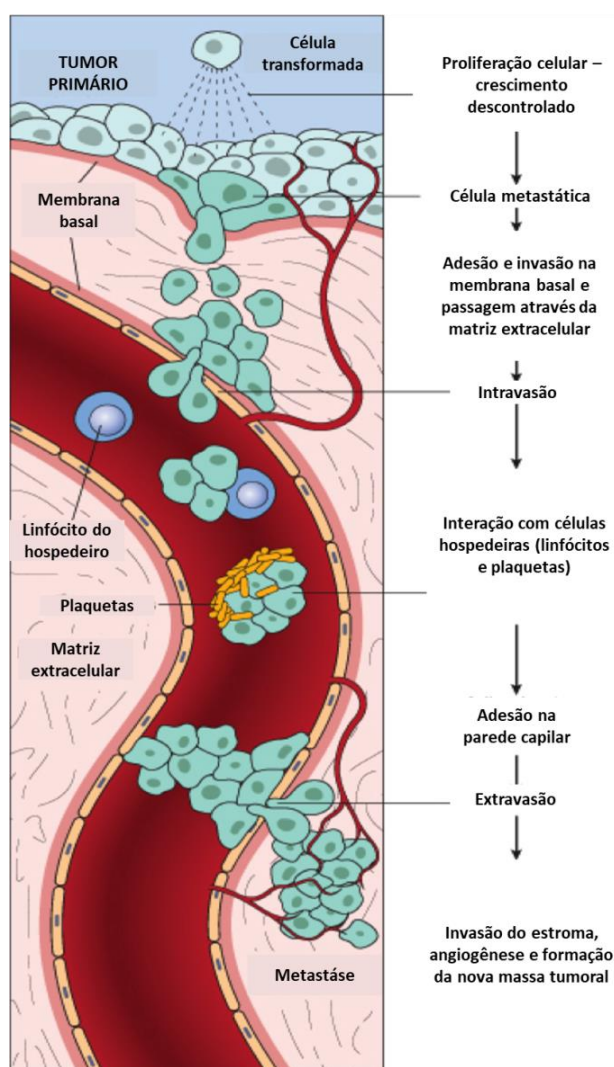


Figura 1. Esquema da cascata metastática mostrando a sequência das etapas da progressão tumoral e formação de metástase. Modificado de: Robbins e Cotran: Patologia: Bases Patológicas das Doenças, 2005.

3. microRNAs

Os microRNAs (miRNAs) são pequenas moléculas de RNA, com cerca de 20 – 22 nucleotídeos, e tem como função regular a expressão gênica em fase pós-transcricional, podendo induzir à superexpressão ou silenciamento gênico através do pareamento específico com moléculas alvos de RNA mensageiro (RNAm), ocasionando a uma estabilização ou degradação desta molécula (**Figura 2**) (CROCE; CALIN, 2005; YANG; HAO; XI, 2013).

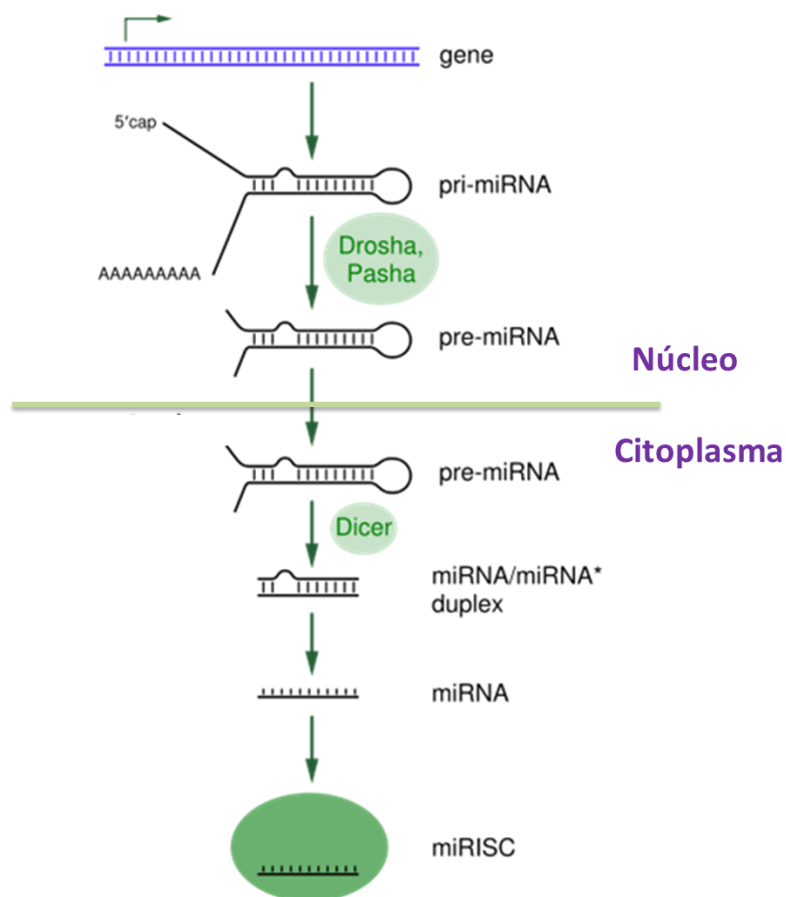


Figura 2. Representação da biogênese dos miRNAs. Modificado de LC Science (<http://www.lcsciences.com>).

Os miRNAs são formados no núcleo, a partir de moléculas de cadeia longa denominados microRNA primários (pri-miRNA), transcritos pela RNA polymerase II.

Ainda no núcleo, o pri-miRNA é processado pela ação da Drosha, uma ribonuclease III e seu cofator DGCR8, que cliva esta longa cadeia, resultando em uma sequência de aproximadamente 70 kb, denominado miRNA precursor (pre-miRNA) (OLIVE; JIANG; HE, 2010). Neste ponto, o pre-miRNA é transportado para o citoplasma com a ajuda da Exportina 5 e seu parceiro Ran-GTP, onde é reconhecido pela enzima Dicer uma outra ribonuclease III. Por sua vez, a Dicer faz o processamento do pre-miRNA, resultando em uma molécula de miRNA maduro fita dupla com aproximadamente 22 nucleotídeos (GAROFALO; LEVA; CROCE, 2014; OLIVE; JIANG; HE, 2010). A fita dupla de miRNA é então separada, e a molécula simples de miRNA alvo madura é incorporada ao complexo RISC (*RNA-induced silencing complex*), para mediar o silenciamento pós-transcricional de mRNAs específicos. O reconhecimento dos alvos de miRNAs se dá com um pareamento imperfeito com a fita complementar, permitindo assim, que um único miRNA seja capaz de regular um maior número de genes codificadores de proteínas (ACUNZO et al., 2015).

Os miRNAs apresentam um significativo papel na regulação dos processos biológicos, e expressões alteradas destas moléculas estão associadas com várias doenças, incluindo o câncer. Aproximadamente 30% dos genes humanos são regulados por miRNAs que residem dentro de íntrons de regiões codificantes ou não (AGOSTINI et al., 2010; EBRAHIMI et al., 2014). A associação entre miRNAs e biologia tumoral foi primeiramente determinada com base em observações de deleções e baixa expressão de miR-15 e miR-16 em leucemia linfocítica crônica (CALIN et al., 2002). Relatos da literatura apontam o envolvimento de miRNAs na supressão tumoral (CHENG et al.,

2014; IWAYA et al., 2013; JEON et al., 2012) e na oncogênese (NI et al., 2015; PENNA; ORSO; TAVERNA, 2015; XIA et al., 2014).

Os miRNAs também atuam regulando a expressão de genes relacionados aos processos de metástase, pela ligação aos seus potenciais alvos complementares, promovendo alterações na atividade das células metastáticas (ZHANG; LI; LAI, 2010). Diversos miRNAs têm sido descritos como promotores (miR-17, miR-10b, miR-373, miR-502, miR-21) ou supressores de metástase (miR-146, miR-335, miR-126, miR-200, miR-206, miR-31) (CORCORAN et al., 2011; GOH et al., 2016).

Um importante foco das pesquisas em câncer de mama tem sido a identificação de possíveis marcadores prognósticos e o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas, que possam inibir a progressão tumoral. Assim, os miRNAs surgiram recentemente como importantes moléculas associadas ao processo de metástase e como possíveis alvos de tratamentos (ACUNZO et al., 2015; LEVASHOVA et al., 2010).

O miR-148b pertence a uma família de três membros (miR-148a, miR-148b e miR-152), os quais apresentam alta expressão em tecidos normais, especialmente em células tronco (CHEN; SONG; WANG, 2013). O miR-148b tem sido investigado em vários tipos tumorais, em que na maioria das vezes atua como supressor tumoral, inibindo a expressão de oncogenes (MOU et al., 2016). De acordo com estudo de Song e colaboradores (2011), células das linhagens de câncer gástrico humano, MGC-803, SGC-7901 e BGC-823 modificadas contendo vetores para alta expressão de miR-148b apresentaram significativa diminuição na taxa de proliferação celular quando comparadas às células normais. A baixa expressão do miR-148b está diretamente envolvida com o aumento da progressão tumoral e número de metástases (GE et al., 2015;

GHASEMKHANI et al., 2015). Além disso, segundo recente estudo de Orso e colaboradores (2016), a regulação negativa do miR-148b favorece a disseminação tumoral, e consequente aumento da expressão de seus alvos diretos, como os oncogenes Integrina alfa 5 (ITGA5) e ALCAM, ambos relacionados ao processo metastático (ORSO et al., 2016).

O miR-210 é considerado preferencialmente um miRNA oncogênico, que exhibe a regulação mediada por HIF-1 α e Von-Hippel Lindau (VHL). HIF-1 α promove o aumento da expressão de miR-210 e este, leva a estabilização de HIF-1 α , sugerindo que ambos, miRNA e seu gene alvo estão envolvidos em um *positive feedback loop* (DANG; MYERS, 2015). De acordo com a literatura, níveis elevados de miR-210 conduzem ao aumento da progressão tumoral, migração e redução da parada do ciclo celular em células tumorais de mama MCF-7 (LIU et al., 2016). Zhang e colaboradores (2009) revelaram que altos níveis de miR-210 em células de carcinoma de cólon humano HCT116 levaram a uma maior expressão de c-Myc através da redução de MNT, um conhecido antagonista de c-Myc, responsável por prejudicar as funções proliferativas de c-Myc (ZHANG et al., 2009). Em concordância, Yang e colaboradores (2002) demonstraram que a baixa expressão de miR-210 em células de hepatocarcinoma induziram à parada do ciclo celular em fase G0/G1, resultando em diminuição da proliferação de células tumorais (YANG et al., 2012).

Atualmente existe uma controvérsia no que se refere ao fato do miR-210 ser caracterizado como um oncogene ou supressor tumoral, no entanto, o motivo dessa aparente discrepância ainda é incerto. De acordo com esta hipótese, Tsuchiya e colaboradores (2010) observaram que a alta expressão de miR-210 em células de

linhagens tumorais do esôfago humano CCEE e KYSE-10 induziu a parada do ciclo celular e conseqüentemente promoveu apoptose. Ainda, após ensaios funcionais, os autores relataram os efeitos oncostáticos do miR-210 são mediados principalmente pelo seu alvo direto, o receptor do fator de crescimento do fibroblasto 1 (FGFRL1) (TSUCHIYA et al., 2011).

4. c-Myc

O gene c-Myc foi primeiramente descrito por Bishop e colaboradores nos meados da década de 80, no entanto foi descoberto bem antes, por Peyton Rous em 1911. Peyton Rous observou que um sarcoma típico de aves poderia ser transmitido através de extratos tumorais não celulares, sugerindo que vírus poderiam ser os possíveis agentes etiológicos dessas neoplasias (KRESS; SABÒ; AMATI, 2015). Posteriormente, ainda de acordo com este estudo, Vennstrom e colaboradores (1982) identificaram o oncogene v-Myc “viral avian myelocytomatosis” a partir de um estudo de retrovírus causadores da mielocitomatose em aves (VENNSTROM et al., 1982). Subseqüentemente, o gene c-Myc foi identificado como o homólogo celular desse oncogene retroviral (v-Myc), sendo sua superexpressão demonstrada em vários tumores humanos e animais.

c-Myc (também denominado MYC) membro da superfamília que compreende N-MYC e L-MYC, é um fator de transcrição que se dimeriza com a proteína MAX, um ligante essencial para a maioria das atividades biológicas exercidas por c-Myc, e responsável por induzir a atividade transcricional deste gene (STINE et al., 2015; CICHON et al., 2016).

c-Myc está envolvido em diversos processos fisiológicos, responsável por regular a replicação do DNA, regulação da transição das fases G0/G1, diferenciação e proliferação celular, migração e apoptose (FARRELL; SEARS, 2014). Sua expressão é fundamental no desenvolvimento embrionário normal, sendo regulada por sinais externos, como fatores de crescimento e componentes da matriz extracelular, bem como por sinais internos, como a maquinaria de ativação do ciclo celular.

Em condições patológicas c-Myc é um fator de transcrição multifatorial que apresenta papel fundamental na regulação de genes envolvidos em vários processos biológicos, incluindo crescimento celular, proliferação e apoptose (DANG, 2012; FARRELL; SEARS, 2014). De acordo com a literatura, a indução ectópica de c-Myc promove mudanças transcricionais generalizadas que impulsionam a progressão do ciclo celular, aumentam a síntese proteica, e desestabilizam o genoma (THOMAS et al., 2015). Da mesma forma, a baixa expressão de c-Myc em células tumorais conduz uma redução da proliferação celular e indução da apoptose. Segundo estudo de Cho e colaboradores (2010), a alta expressão de c-Myc desempenha papel na inibição da apoptose, indução de angiogênese e transição epitelial-mesenquimal (EMT) em células tumorais de mama. Além disso, no câncer de mama, níveis aumentados de c-Myc estão associados a um prognóstico clínico reservado, metastáse e risco elevado de recidivas (CHO et al., 2010).

De certa forma, todas as características pró-tumorigênicas conferidas ao c-Myc no câncer, acentuam o conceito de que o bloqueio da função deste oncogene em células tumorais pode ter um significativo impacto terapêutico (KRESS; SABÒ; AMATI, 2015).

5. Melatonina

5.1 Síntese da melatonina

A melatonina, principal hormônio produzido e secretado pela glândula pineal atua na regulação do ritmo circadiano, possui propriedades antioxidantes, antienvhecimento e imunomoduladoras (DI BELLA et al., 2013; REITER et al., 2017; REITER; TAN; PAPPOLLA, 2004). A síntese da melatonina é realizada seguindo um padrão rítmico, com pico secretório no período noturno e quase nenhuma síntese no período diurno (HILL et al., 2015; RAVINDRA; LAKSHMI; AHUJA, 2006). Sua produção é realizada principalmente pelos pinealócitos, células provenientes da glândula pineal. De forma resumida, a síntese da melatonina ocorre a partir da conversão do aminoácido triptofano em 5-hidroxitriptofano (5-HTP) pela enzima triptofano hidroxilase 1 (TPH1). O 5-HTP é descarboxilado pela 5-HTP descarboxilase em serotonina, a qual é acetilada em N-acetilserotonina (NAS) na reação catalisada pela enzima arilalquilamina N-acetiltransferase (AA-NAT). Então, a NAS é convertida em melatonina pela enzima hidroxí-indol-Ometiltransferase (HIOMT) (**Figura 3**) (HEVIA et al., 2015; VRIEND; REITER, 2016).

A enzima AA-NAT apresenta um ritmo diário, no entanto sua concentração está mais elevada no período noturno, especialmente na fase escura. Esta variação cíclica da AA-NAT faz com que a redução dos níveis de serotonina na fase escura seja acompanhada pelo aumento das concentrações de NAS e melatonina. A melatonina é secretada durante a noite em todas as espécies de mamíferos, independente de possuírem hábito diurno ou noturno. Sua degradação ocorre principalmente no fígado, envolvendo a hidroxilação em 6-hidroximelatonina [6(OH)M], seguida dos processos de sulfatação ou

glicuronidação, e posterior excreção na urina (BILU; KRONFELD-SCHOR, 2013; REITER et al., 2016).

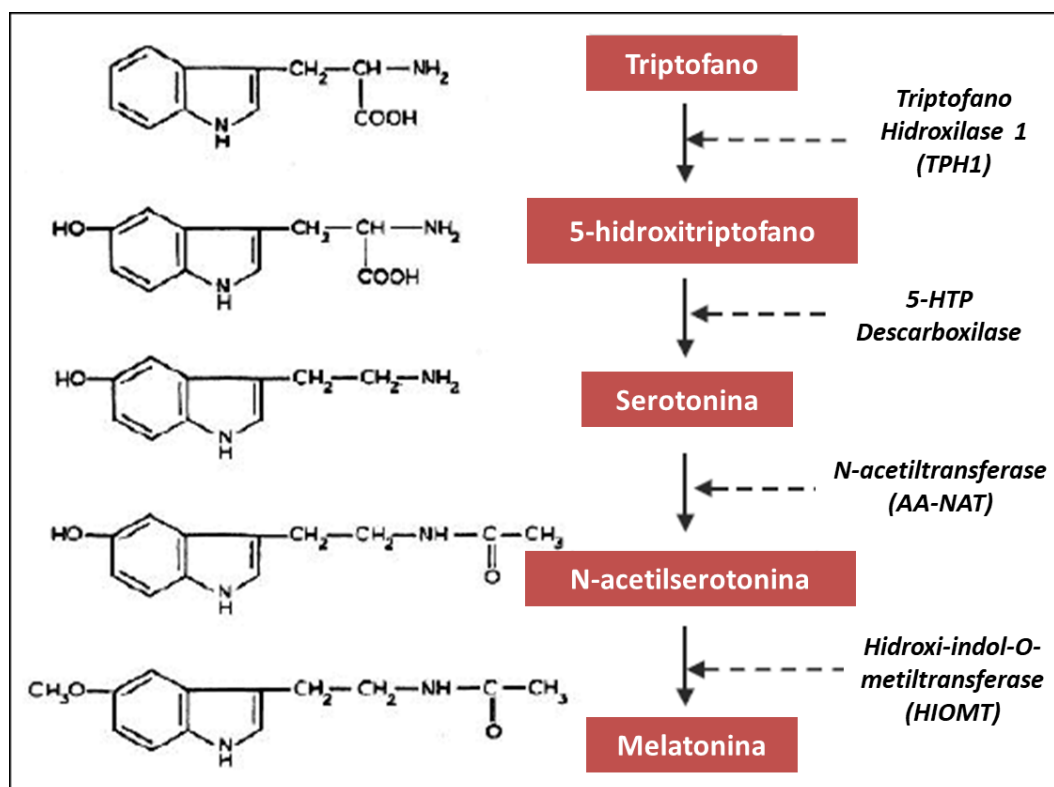


Figura 3. Esquema representativo da via de síntese da melatonina na glândula pineal. Passos envolvidos na conversão do aminoácido triptofano e formação de melatonina pela enzima HIOMT. Modificado BUBENIK1 and KONTUREK, 2010.

Nas últimas décadas houve um progresso na compreensão de como a luz está envolvida com o funcionamento do relógio biológico, e síntese e liberação da melatonina no organismo. O uso excessivo e inadequado da luz artificial durante o período noturno está levando à diminuição de produção de melatonina pelo homem, ocasionando alterações em vários processos biológicos (HILL et al., 2015; REITER; MANCHESTER; TAN, 2010).

5.2 Receptores de melatonina e mecanismos de ação

Os dois mais importantes receptores de membrana conhecidos são MT1 (MTNR1A) e MT2 (MTNR1B), membros da superfamília de receptores acoplados à proteína G. Além dos receptores de membrana, a melatonina também pode atuar por mecanismos diferentes nas células. A natureza lipofílica da melatonina permite sua livre passagem pela membrana celular e sua interação com inúmeros fatores de transcrição e proteínas intracelulares como calmodulina e receptores nucleares RZR/ROR (receptor Z para retinóide/receptor órfão para retinóide) envolvidos na modulação do câncer de mama. Considerando algumas das ações da calmodulina na fisiologia celular, destaca-se por exemplo, a regulação de várias proteínas quinases, incluindo proteínas relacionadas com a formação do citoesqueleto. Além disso, a melatonina apresenta ação independente de receptores celulares, também pela atuação direta na redução de radicais livres (ROS) ou aumento de enzimas antioxidantes (**Figura 4**) (HILL et al., 2015; PROIETTI et al., 2013; REITER; TAN; PAPPOLLA, 2004).

Nas células tumorais, a melatonina é capaz de inibir a expressão de fatores de transcrição incluindo, CREB (*cAMP response element-binding protein*), NFκB (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) e STAT3 (*Signal transducer and activator of transcription 3*) pela forma direta, através da ativação de seu receptor MT1 ou indiretamente, através da sua atividade antioxidante no câncer de mama. Além disso, induz a fosforilação de AKT, uma quinase responsável por ativar vários processos celulares, como apoptose, proliferação e migração celular (KONG et al., 2008). Em recente estudo de Long e colaboradores (2017), a melatonina levou a uma diminuição de

p-AKT, e consequente baixos níveis de c-Myc em células de hepatocarcinoma (HILL et al., 2015; LONG et al., 2017).

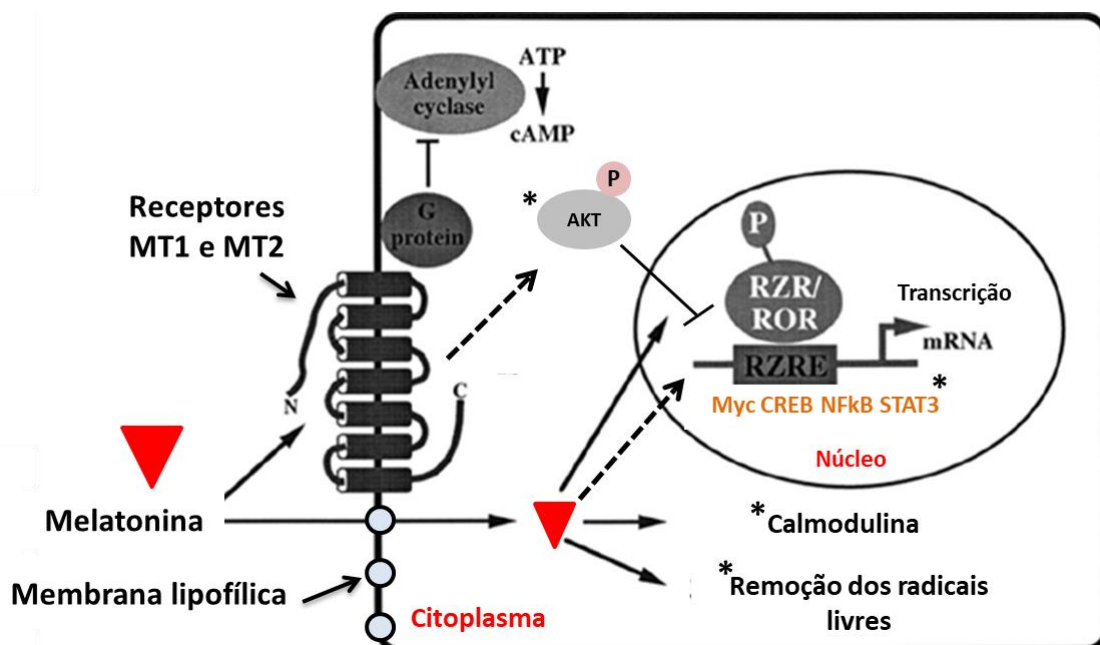


Figura 4. Esquema representativo dos mecanismos de ação da melatonina. *modulados pela melatonina. Modificado de Jung e Ahmad, 2006.

5.3 Melatonina e câncer

O papel da melatonina não se limita apenas em regular funções fisiológicas, mas também apresenta importante ação em processos patológicos, incluindo o câncer. Em 1981, Tamarkin e colaboradores (1981) demonstraram que o tratamento com melatonina inibiu o desenvolvimento de tumores mamários induzidos pelo carcinógeno 7,12-dimethylbenz(alpha)-anthracene (DMBA) em ratas Sprague Dawley e, ao contrário, a remoção da glândula pineal estimulou o desenvolvimento desses tumores (TAMARKIN et al., 1981). Ainda no mesmo ano, o estudo de Bartsch e colaboradores (1981) demonstrou que pacientes com câncer de mama apresentavam menores concentrações de melatonina, quando comparados a pacientes sem presença tumoral

(BARTSCH; BARTSCH, 1981). Desde então, têm sido demonstrado que a melatonina inibe o desenvolvimento e a progressão de diferentes tipos de câncer, atuando através de mecanismos dependentes e independentes de receptores MT1 e MT2 (DI BELLA et al., 2013; LI et al., 2015; LUCHETTI et al., 2010).

Indícios dos primeiros estudos relacionando os efeitos do estrógeno e o câncer de mama ocorreram em meados de 1896, quando Beatson e colaboradores (1896) revelaram que o estrógeno apresentava efeito estimulante e conseqüente fator de risco na progressão do câncer de mama. Ainda, em estudos experimentais utilizando roedores, demonstraram que a retirada total dos ovários levava à inibição do crescimento tumoral de mama (SÁNCHEZ-BARCELÓ et al., 2005). A ação da melatonina no câncer de mama está associada principalmente a tumores RE-positivos, uma vez que apresenta um importante papel na inibição da síntese do estrógeno. Além disso, a melatonina pode interagir com a via de sinalização do estrógeno, atuando na prevenção da ligação deste hormônio com seu receptor específico (RE) (MEDIAVILLA et al., 2010; PROIETTI et al., 2013).

Entre outros mecanismos, a melatonina pode controlar o ciclo celular, atuando como pró-apoptótica e anti-proliferativa e induzindo a diferenciação celular. Possui importante ação antioxidante, reduzindo os danos oxidativos provocados por radicais livres e prevenindo o efeito colateral de tratamentos citotóxicos. Atua ainda na inibição da enzima telomerase, na modulação do sistema imune, inibição de proteínas envolvidas na invasão celular e no processo metastático (DI BELLA et al., 2013; PROIETTI et al., 2013; REITER; TAN; PAPPOLLA, 2004).

5.4 Melatonina e miRNAs

Lee e colaboradores (2011) estudaram pela primeira vez o efeito da melatonina na modulação da expressão de miRNAs na linhagem de câncer de mama RE-positiva MCF-7 (LEE et al., 2011). Os resultados demonstraram que níveis fisiológicos de melatonina modularam a expressão de miRNAs promovendo uma ação antiproliferativa no câncer de mama. Posteriormente, um estudo de Sohn e colaboradores (2015) demonstrou a ação da melatonina no aumento da expressão de miR-3195 e miR-374b em células tumorais de próstata, o que resultou na diminuição da expressão de genes relacionados com a angiogênese e metástase, como HIF-1 α e VEGF (SOHN et al., 2015).

Vários estudos sugerem que a melatonina é capaz de modificar a expressão de inúmeros genes relacionados ao câncer de mama (COS et al., 2014; PROIETTI et al., 2013), indicando seu potencial papel na alteração da expressão de miRNAs (LEE et al., 2011; MORI et al., 2016; SOHN et al., 2015). No entanto, são poucos os estudos que avaliaram o efeito deste hormônio na expressão dos miRNAs no câncer de mama, sendo que a relação com a metástase ainda não foi descrita. Nesse contexto, a melatonina pode ser considerada importante alvo no controle da progressão tumoral, criando assim, um caminho promissor para sua utilização como agente terapêutico no câncer.

Objetivos

II. OBJETIVOS

No presente estudo investigamos a expressão diferencial dos miRNAs associados ao processo metastático em linhagem celular de câncer de mama metastática e triplo-negativa.

- Identificar a expressão diferencial dos miRNAs associados ao processo metastático na linhagem celular de câncer de mama metastática e triplo-negativa MDA-MB-231;
- Realizar o silenciamento do miR-148b e miR-210, selecionados a partir da técnica de PCR-Array, e analisar a expressão de c-Myc, possível gene alvo destes miRNAs em células MDA-MB-231 tratadas ou não com melatonina.

Capítulos

III. RESULTADOS

Artigo I

Título: Melatonin inhibits tumor progression traits of triple-negative breast cancer cells.

Autores: Lívia Carvalho Ferreira, Francesca Orso, Daniela Dettori, Jéssica Zani Lacerda, Thaiz Ferraz Borin, Daniela Taverna, Debora A.P.C. Zuccari.

Periódico: Journal of Pineal Research, submetido.

Resultados

Melatonin role on miRNAs modulation in triple-negative breast cancer cells

Lívia C. Ferreira¹; Francesca Orso³; Daniela Dettori³; Jéssica Z. Lacerda¹; Thaiz F. Borin⁴;
Daniela Taverna³; Debora A.P.C. Zuccari^{1,2}.

Lívia Carvalho Ferreira¹

E-mail: livinha_ferreira@hotmail.com

Francesca Orso³

E-mail: francesca.orso@unito.it

Daniela Dettori³

E-mail: daniela.dettori@unito.it

Jéssica Zani Lacerda¹

E-mail: jessicabio.zani@gmail.com

Thaiz Ferraz Borin⁴

E-mail: thaiz80@yahoo.com.br

Daniela Taverna³

E-mail: daniela.taverna@unito.it

Debora Aparecida Pires de Campos Zuccari^{1,2}

Email: debora.zuccari@famerp.br

¹ Graduate Program in Biosciences /São Paulo State University (Unesp), Institute of Biosciences, Humanities and Exact Sciences (Ibilce), Campus São José do Rio Preto.

² Laboratory of Molecular Investigation of Cancer /Faculty of Medicine of São José do Rio Preto - FAMERP, Sao Jose do Rio Preto (SP).

³ Molecular Biotechnology Center (MBC), University of Torino, Torino, Italy. Department of Molecular Biotechnology and Health Sciences, University of Torino, Torino, Italy. Center for Complex Systems in Molecular Biology and Medicine, University of Torino, Torino, Italy.

⁴ Department of Biochemistry and Molecular Biology, Tumor Angiogenesis Laboratory. Augusta University, Augusta (GA) United States.

Running Title: Melatonin action on triple-negative breast cancer cells

* Corresponding author

Address correspondence to: Debora Aparecida Pires de Campos Zuccari, PhD, Laboratório de Investigação Molecular no Câncer (LIMC), Faculdade de Medicina de Sao Jose do Rio Preto (FAMERP). Avenida Brigadeiro Faria Lima, 5416, Vila Sao Pedro, CEP 15090-000, Sao Jose do Rio Preto, SP, Brasil. Fax: +55-17-3201-5885. E-mail: debora.zuccari@famerp.br

Conflict of Interest statement: No potential conflicts of interest.

Financial support: Funded by Fundacao de Amparo a Pesquisa do Estado de Sao Paulo - FAPESP/Brazil (2015/04780-6). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Abstract

Melatonin, a hormone secreted by pineal gland, shows antimetastatic effects by reducing tumor cell proliferation, migration and invasion. MicroRNAs are small, non-coding RNAs that play a crucial role in regulation of gene expression. Herein, we looked a link between the tumor/metastatic-suppressive actions of melatonin and miRNA expression in triple-negative breast cancer cells. First, we evaluated if and how melatonin could affect triple-negative breast cancer cells and unraveled that melatonin exerts anti-tumor progression actions by reducing proliferation, migration and c-Myc expression of triple-negative cells. To understand whether melatonin could modulate miRNA levels, we examined expression of 365 miRNAs by using Taqman Low-Density-Array (TLDA) or by single Taqman assays and evidenced the modulation of 17 miRNAs. We focused the attention on miR-148b and miR-210 both up-regulated by melatonin and considered, from the literature, respectively, anti-metastatic and oncogenic and studied the effect of their modulation on melatonin tumor progression impairment. Surprisingly, when miR-148b or miR-210 were depleted in triple negative breast cancer cells, using specific miR-148bsponges or anti-miR-210, melatonin effects were not impaired. In fact, migration inhibition and c-myc downregulation by melatonin were still visible suggesting that the increase of miR-148b and miR-210 observed following melatonin treatment was not required for the efficacy of melatonin action. Nevertheless, melatonin remains a powerful compound for metastatic trait inhibition, even if a direct link between modulation of expression of certain proteins or miRNAs and melatonin effects has still to be established.

Keywords: breast cancer, metastasis, miRNA, melatonin

Introduction

Breast cancer is the most common type of cancer and the second cause of death in women worldwide ¹. The high mortality rate due to this neoplasm is intrinsically related to the occurrence of metastasis, which affects more than 90% of the patients. Despite the high incidence, the early diagnosis and the introduction of more effective treatments have allowed the decrease of deaths and improved the quality of life of patients with the disease ². The progression of breast cancer depends on the ability of cells to invade and colonize distant sites ³. Dissemination of tumor cells is a complex multi-step process, including detachment of primary tumor cells, invasion of the local tumor microenvironment, survival in the circulation and extravasation in other tissues ⁴.

Metastasis formation results through several mechanisms, and currently microRNAs (miRNAs) have been investigated as possible determinants of this process ⁵. miRNAs are small molecules of RNA, with about 20 - 22 nucleotides, regulating gene expression at the post-transcriptional level, and able to induce gene silencing after pairing with target molecules of messenger RNA (mRNA), leading to a destabilization or degradation of these targets. One miRNA could bind to hundreds of different mRNAs regulating various cellular processes ^{6,7}. Literature reports the involvement of miRNAs in tumor suppression ⁸ and oncogenesis ⁹. Therefore, miRNA deregulation plays an important role in proliferation, invasion, differentiation, apoptosis and cell resistance in various types of cancer ¹⁰. Because of the complexity of miRNA involvement in breast cancer formation and metastasis process, it becomes essential to investigate miRNA functions for advanced therapeutic strategies.

Melatonin, the principal hormone produced and secreted by the pineal gland is effective to reduce growth and development of several tumors, in particular estrogen-dependent breast cancer^{11,12}. Furthermore, it has modulatory oncostatic effects on the cytoskeleton and it is able to inhibit the invasiveness of tumor cells ¹³⁻¹⁵. Recent study of Mao et al. revealed that melatonin seems to be involved in the suppression of Epithelial to Mesenchymal Transition (EMT), either by promoting Mesenchymal-to-Epithelial Transition (MET), and/or by inhibiting key signaling pathways associated with later stages of metastasis¹⁶. Currently, there is extensive knowledge about intracellular signaling pathways of melatonin, however, its ability to modulate intracellular processes is extremely complex and still requires many studies ^{13,17,18}.

Lee et al. studied for the first time the effect of melatonin on miRNA modulation on the non-metastatic breast cancer cell line MCF-7. The results demonstrated that physiological levels of melatonin can modulate the expression of miRNAs promoting an antiproliferative action in

breast cancer²⁰. Recently, Sohn et al. demonstrated the action of melatonin on increasing expression of miR-3195 and miR-374b in prostate tumor cells²¹. Here, the high expression of these molecules led to decreased levels of genes related to angiogenesis and metastasis, such as hypoxia-inducible factors (HIF-1 α) and VEGF. Considering that only a few studies about miRNA regulation by melatonin exist so far, it remains essential to understand miRNA expression and the mechanisms by which miRNAs can regulate melatonin's anticancer. In this study, we investigate the association between the metastatic-suppressive actions of melatonin and miRNA functions in the MDA-MB-231 triple-negative breast cancer cell line. Based on the findings we suggest that melatonin regulates the metastatic abilities of triple-negative breast cancer cells and leads to miRNA modulations. However, anti-metastatic actions of melatonin are not directly related with specific miRNA modulations.

Methods

Cell culture

Three different breast tumor lines were used: MDA-MB-231 (metastatic and triple-negative), 4175-TGL (metastatic derived from MDA-MB-231 cell line) and MCF-7 (non-metastatic and triple-positive). The breast tumor cells were cultured in DMEM medium supplemented with 10% FBS (Biochrom AG, Berlin, Germany), 1 mM pyruvate sodium, 25 mM HEPES (pH 7.4), and 100 mg/ml Gentamicin (all from Gibco, Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA).

Proliferation assay

Cells were seeded at 5×10^3 cells / in 96 well plates and re-suspended in a medium supplemented with 2% FBS. After 24 h, the cells received treatments with melatonin (100 nM and 1mM) and allowed to grow for 24, 48, 72, 96 and 120 h. After treatment, the cells were fixed with 2.5% glutaraldehyde and stained with 0.2% crystal violet. The dye was solubilized using 10% acetic acid and the samples were homogenized and absorbance at 570 nm read using the Glomax Multi-Detection System (Promega).

Migration assay

A migration assay was performed to evaluate the cell capability to migrate after treatment with melatonin (1 mM). For the experiment, were used 24-well plate including inserts (transwell[®]) having pores approximately 8 μ m in diameter (Costar, Corning Incorporated). Tumor cells were plated at 1×10^5 and re-suspended in 500 μ l of serum-free medium in the upper compartment of the insert, while in the lower compartment was added 600 μ l of medium

supplemented with 20% FBS. The cells were treated with melatonin for a total of 48 h and incubated in a CO₂ chamber 37 °C overnight. Then the remaining in the lower compartment fixed in 2.5% glutaraldehyde for 20 minutes and stained with 0.2% violet crystal for 20 minutes at room temperature. At the end, all remaining cells in the lower part of the insert were counted using Zeiss Axiovert 200M microscope.

Generation of stable modified cell lines and transient transfections

miR-148b depleted 4175-TGL expressed a specific miR-148bsponge with sequences designed to be perfectly complementary to miR-148b seed region as previously described in Orso, Quirico et al ²². For transient transfections, Anti-miR™ Inhibitors, including a scrambled miRNA negative control (Invitrogen Life Technologies) were used. MDA-MB-231 cells were seeded in 6-well plates at 50 % of confluency and immediately transfected using HiPerFect Transfection Reagent (QIAGEN, Stanford, CA), anti-miR and Opti-Mem I medium, as instructed. The cells were incubated at 37 °C in a CO₂ incubator for 24 h, and the medium was replaced with fresh normal growth medium.

RNA extraction, reverse transcription, and real-time PCR

Total RNA was extracted from tumor cells using Trizol reagent (Invitrogen Life Technologies). miRNA were reverse transcribed using TaqMan® microRNA Reverse transcription kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) from 10 ng total RNA according to the manufacturer's instructions. For mRNA detection, 1 µg of DNase-treated RNA (DNA-free kit; Ambion, Austin, TX) was retrotranscribed with RETROscript reagents (Ambion), and qPCRs were performed with gene-specific primers. Quantitative normalization was performed on the expression of the housekeeping U6 for miRNAs or Actin for mRNAs. The relative expression levels between samples were calculated using the comparative delta CT (threshold cycle number) method ($2^{-\Delta\Delta CT}$) with a control sample as reference point.

miRNA profiling (TaqMan Low-Density Array (TLDA))

TLDA human miRNA panel is a quantitative qPCR that can simultaneously evaluate the expression levels of up to 365 different miRNAs on a single card. Briefly, 50 ng of miRNAs were converted into specific cDNAs and subsequently quantified using the TaqMan MicroRNA TLDA card, containing 365 human TaqMan miRNA sequences and including RU6B, RNU4, and RNU44 as endogenous controls. miRNA relative expression was normalized against endogenous controls and no treated breast miRNAs according to the following threshold cycle (CT) calculation: $2^{-\Delta CT}$, where $\Delta CT = (CT \text{ miRNA} - CT \text{ miRNAs endogenous})$. To find consistently

differentially expressed miRNAs after melatonin treatment, the data were subjected to analysis, miRNAs showing at least 1.5-fold regulation were considered to be differentially expressed.

Protein extraction and Western Blotting

To evaluate protein expression, cells were plated and treated with melatonin in a dose of 1 mM during 48 h. At the end of the treatment, total proteins were extracted using a boiling buffer containing 0.125 mol/L Tris/HCl, pH 6.8, and 2.5% sodium dodecyl sulphate (SDS) and heated for 5 min at 95°C. Proteins were separated electrophoretically (25 or 50 µg) by SDS polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and electroblotted on to Nitrocellulose membrane (BioRad®, Milano, Italy). Membranes were blocked in 5% bovine nonfat milk (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) and Phosphate Buffered Saline PBS-Tween buffer (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄, 1.46 mM KH₂PO₄, 0.1% Tween-20) for one hour. The membranes were incubated with appropriate primary antibody for c-Myc at 1:500 (Santa Cruz) and HSP-90 at 1:2000 (Santa Cruz) overnight at 4°C. Then the membrane was incubated with PBS-Tween buffer for 1 h at room temperature and visualized by enhanced chemiluminescence "Clarity Western ECL" (Bio Rad®) for visualization on the "Chemidoc Touch Image Fusion" (Bio Rad®) apparatus. At the end, quantification was performed with the aid of image analyzer software Image J.

Statistical analyses

The results have been previously submitted to a descriptive analysis to determine the normal range. Data are presented as mean ± Standard Error of Mean (SEM) and two tailed Student's t test was used for comparison, with *p<0.05; ** p<0.001; ***p<0.0001 considered to be statistically significant. ns. indicates a not statistically significant p-value. We used the software Image Lab for analysis of membrane protein, and GraphPad Prism4 for statistics.

Results

Melatonin decreases proliferation of MCF-7 and MDA-MB-231 cells

In order to verify the antiproliferative effect of melatonin, MDA-MB-231 and MCF-7 cells were treated with 100 nM or 1 mM of melatonin for 24, 48, 72, 96 and 120 h. A statistically significant inhibitory effect on proliferation was observed only following melatonin treatment (1 mM) at 24 h for Estrogen Receptor (ER)-positive MCF-7 cell line and at 72 h for ER-negative MDA-MB-231 cell line (**Figure 1A**).

Melatonin impairs migration capability and regulates c-Myc expression on breast cancer cells

To investigate the antimetastatic effect of melatonin, transwell migration assays were performed in the presence or in the absence of this hormone on MDA-MB-231 and 4175-TGL cells. MCF-7 cells were not used in this experiment, due their poor migration capacity. As presented in **Figure 1B**, all cell lines treated with 1 mM melatonin showed significantly lower migration ability when compared with control cells, suggesting an anti-migratory effect of melatonin, on triple-negative breast cancer cells.

Alteration of c-Myc expression following melatonin treatment was evaluated by Western Blot analysis. Considering MCF-7 as a positive control, we also evaluated c-Myc expression on this cell line. As a result, melatonin did not modulate c-Myc in 24 h of treatment, however in long-term treatment, melatonin led to a slight decrease of c-Myc expression. Melatonin reduced c-Myc expression on MDA-MB-231 cells after 24 h of treatment, moreover, long-term treatment with melatonin led to a strong c-Myc expression reduction (**Figure 1C**). Given that melatonin modulation of c-Myc was more consistent in MDA-MB-231 cells, we asked whether its effects could be transcriptional. For this reason, we evaluated c-Myc mRNA levels. A significant downregulation of c-Myc was found in cells treated with melatonin, confirming the results obtained by protein analysis and suggesting a potential transcriptional regulation of c-Myc by melatonin in triple-negative cell line (**Figure 1D**).

miRNAs modulated by melatonin

In order to understand the molecular mechanism melatonin action, we investigated whether miRNAs could be involved in these processes. Therefore, we compared the expression of 365 miRNAs in MDA-MB-231 cells treated or not with melatonin using “TaqMan MicroRNA Low-Density Array (TLDA)” cards in duplicate. In addition, we evaluated miR-146a and miR-148b expression by single Taqman assays. Following these analyses, melatonin treatment led to the modulation of 17 miRNAs, 11 upregulated and 6 downregulated. Among these miRNAs, 5 upregulated miRNAs (miR-let-7a, miR-let-7c, miR-10a, miR-210 and miR-148b, see **Table 1**) were selected for further analyses and validations.

We performed qRT-PCR analysis to validate the results obtained from the arrays and from independent investigations. miRNAs were considered significantly altered only when they exhibited a mean fold-change >1.5 relative to the controls, a p value < 0.05 . Furthermore, we investigated the role of melatonin on miRNA modulation in another breast cancer cell line, MCF-7. Consistent with the previous analyses, qRT-PCR data demonstrated that out of 5 deregulated

miRNAs, miR-148b and miR-210 only were significantly modulated by melatonin in MDA-MB-231 cells. Instead, melatonin could not affect miR-148b and miR-210 in MCF-7 cells (**Table 2**).

Is there a functional link between deregulated miRNAs and melatonin efficacy?

Considering that miR-148b and miR-210 were up-regulated by melatonin in MDA-MB-231 cells, we assessed the involvement of these miRNAs in the negative modulation of c-Myc, and the ability of melatonin to reduce cell migration. Therefore, in order to identify whether miR-148b or miR-210 could mediate melatonin effects, MDA-MB-231 or 4175-TGL cells were engineered for a stable downregulation of miR-148bsponges to obtain miR-148b depleted cells or transiently transfected with miRNA-210 inhibitor.

Cells were transduced or transfected with an empty control (pLenti-empty) or a scrambled anti-miRNA (Neg. Control) and were used for comparisons. All cells were then treated or not with melatonin. Transwell assays were used to evaluate migration. Melatonin significantly affected cell migration even in miR-148b depleted cells (**Figure 2A**) suggesting that melatonin-dependent migration reduction is miR-148b independent. In addition, a modulation of c-Myc was evaluated by Western Blot analysis. Melatonin reduced c-Myc expression in 4175-TGL cells previously transduced with miR-148bsponges or pLenti-empty. However, there was no difference in c-Myc expression between empty and miR-148b depleted cells. Thus, downregulation of c-Myc expression seems to be melatonin-dependent but miR-148b-independent (**Figure 2B**). Melatonin-induced miR-148 expression was blocked when cells expressed miR-148bsponges (**Figure 2C**). Based on c-Myc and migration data we can postulate that increased levels of miR-148b are an epiphenomenon induced by melatonin but independent on its action.

Regular and low miR-210 expressing MDA-MB-231 cells were treated or not with melatonin and miR-210 levels were verified. Regarding migration, decreased cell movement was observed for melatonin treated cells, and a moderate decrease was observed in non-treated cells with low levels of miR-210 when compared to controls (**Figure 3A**). When c-Myc expression was evaluated, decreased c-Myc was also found when miR-210 levels were reduced suggesting that melatonin-induced c-Myc decrease was independent from the observed miR-210 up-regulation (**Figure 3B-C**).

Discussion

Melatonin has been considered an important natural antitumor agent and high levels of this hormone negatively correlates with the risk of developing many types of cancers^{23,24}. Herein, our functional studies revealed a role for melatonin on migration inhibition in aggressive triple-negative cell line. In breast cancer, melatonin antitumor actions have been previously evaluated

especially in the ER-positive tumors, where melatonin acts antiestrogenically through its membrane receptors, called MT1 and MT2²⁵⁻²⁸. On this line, considering that melatonin anticancer activities are exerted mainly binding on the estrogen receptors, we considered MCF-7 cells as a positive control for melatonin treatment. Consistent with literature, in our findings regarding ER-positive cells, melatonin induced an inhibitory effect on cell proliferation, which is statistically significant after 24 h. More interestingly, on triple-negative MDA-MB-231 cells, melatonin was also able to impair proliferation, however, a longer time following melatonin treatment was required. Based on these findings, we can suggest that melatonin effectiveness requires long periods on triple-negative cells. Similarly, recent study of Kim and Cho (2017) showed that melatonin reduced cell migration and invasion of triple-negative breast cancer cell line MDA-MB-231, however the authors revealed no effect on proliferation after melatonin treatment²⁹.

It has been established that melatonin binds to membrane receptors MT1 and MT2 and exerts its antiproliferative effects¹⁸. Both ER-positive and ER-negative cell lines express the MT1 receptor; however, relevant studies have shown that ER-positive tumors have an increased expression of MT1 compared to triple-receptor-negative tumors such as MDA-MB-231 line^{19,25}. Since, MDA-MB-231 cells present a molecular deficiency in MT1 signaling pathway, melatonin could also influence ER-negative cells via processes that do not involve the MT1/MT2 membrane receptors. The lipophilic nature of melatonin can allow its passage through the cell membrane and its interactions with a number of transcription factors and nuclear binding sites that are involved in modulation of breast cancer cell proliferation^{19,27,30}.

Relevantly, we observed c-Myc modulation after melatonin treatment in MCF-7 and MDA-MB-231 cell lines. Interestingly, melatonin reduced c-Myc expression on MDA-MB-231 cells after 24 h of treatment, however long-term treatment with melatonin led to a strong c-Myc expression reduction. In contrast, melatonin do not modulate c-Myc expression after 24 h on MCF-7 cells. A significant reduction was possible to be observed just after 72 h. To further explore the metastatic-suppressive actions of melatonin, we performed transwell migration assay using MDA-MB-231 and 4175-TGL (a highly metastatic cell line derived from MDA-MB-231 cell line). As expected, we found that melatonin was able to reduce cell migration in both triple-negative breast cancer cell lines.

We have previously shown that melatonin can reduce HIF-1a and VEGF gene and protein expression^{31,32}. Nevertheless, there is no evidence so far about mechanism underlying between melatonin and oncostatic effects. We can speculate that one possible evidence would be via microRNAs. miRNAs are small non-coding RNA molecules responsible for modulating several encoding genes^{33,34}. Currently, there are several studies presenting evidences that miRNAs play a

crucial role in tumor progression. Therefore, it is essential to understand how miRNAs intervene in melatonin effects on tumor cell proliferation and migration. So far, the mechanism remains obscure. Accordingly, for the first time, the present study identified a set of miRNAs differentially modulated in melatonin-treated triple-negative MDA-MB-231 cells.

Among the mostly differentially expressed miRNAs, miR-210 and miR-148b were found upregulated following melatonin treatment and chosen for functional investigations. miR-148b has been investigated in several tumor types, acting as a tumor suppressor. Its low expression is closely related to an increase in tumor progression and number of metastases³⁵. According to Zhang et al. (2015) high expression of miR-148b in human hepatocarcinoma cells (HepG2) leads to a decrease in c-Myc protein levels. Instead, in our study increased miR-148b does not influence melatonin effect on c-Myc or migration in a positive or negative manner in breast cancer cells³⁶.

miR-210 is considered an oncogenic miRNA, that exhibits HIF-1 α , Von-Hippel Lindau tumor suppressor (VHL) mediated regulation. HIF-1 α promotes increased expression of miR-210, and its miRNA promotes the stabilization of HIF-1 α , suggesting a positive feedback loop³⁷. According to literature, high levels of miR-210 leads to an increased cancer progression, reduced cell cycle arrest and enhanced cancer migration in MCF-7 cells³⁸. Zhang et al. (2009) revealed that high levels of miR-210 in human colon carcinoma cells HCT116 led to increased c-Myc expression through the reduction of MNT, a known MYC antagonist, responsible to impair proliferative and proapoptotic functions of c-Myc³⁹. Conversely, here we show that miR-210 is upregulated by melatonin in tumor cells, however, a positive miR-210 modulation by melatonin in these cells shows no increase on cell proliferation or migration. Many studies suggest that miR-210 can also act as a tumor suppressor, inhibiting tumor initiation. In concordance, Giannakakis et al. (2008) demonstrated that induction of miR-210 down-regulates E2F3, an important transcription factor involved in the regulation of the cell cycle in ovarian cancer cells.⁴⁰ In addition, melatonin negatively alters c-Myc expression and impairs migration on cells showing reduced levels of miR-210.

Similarly, as miR-148b results revealed, melatonin has modulatory action on both miRNAs, however this modulation is not directly associated with the decrease of c-Myc and cell migration. Moreover, treatments of tumor cells with melatonin can lead to miRNA modulations, which are not necessarily causative. Regarding c-Myc modulation, a possible hypothesis could be due this gene do not be directly associated as direct target for miR-148b and miR-210 in triple-negative breast tumor cells. In addition, melatonin may act to decrease c-Myc through negative modulation of other genes, such as HIF-1 α . According to a recent study published by Vriend and Reiter (2016), since melatonin plays an important role as an antioxidant, its action leads to a decrease in ROS (Reactive Oxygen Species) and regulation of several genes, such as HIF-1 and

VEGF, exhibiting an indirect inhibitory function and independent ER action of this hormone 28,41,42.

According to Reiter et al. (2017) the basic role of melatonin at the molecular level remains unclear. Widely beneficial functions of melatonin are being identified and considered only epiphenomena from some melatonin's fundamental function¹⁹. Regarding melatonin-induced miRNAs modulation, we speculate it could be just "epiphenomenon" due to general dicer/drosha deregulations by this hormone. Similarly, in a study of Mori et al. (2016) melatonin was able to downregulate miR-24 expression through inhibition of hnRNP A1, a protein involved in both mRNA splicing and miRNA maturation⁴³. More importantly, the authors observed that mRNA levels were not regulated by melatonin, suggesting that melatonin has a post-transcriptional regulation on hnRNP A1. On this line, the study of Mori et al. (2016) is in concordance with our findings, suggesting the possible miRNA modulation by melatonin in an indirect way. On the other hand, it is also possible that melatonin acts via the subtle modulations of groups of miRNAs and not a specific one, which renders the study of miRNA intervention not easy to perform. It is already known that one miRNA can potentially modulate the expression of hundreds of genes, which makes comprehensive very complex prediction of its effect on the cell.

In this way, further studies must be developed to link melatonin to miRNAs, c-Myc, cell proliferation and migration. The present study was important to understand the role of melatonin in a possible metastatic pathway involving the regulation of miRNAs. Accordingly, these results must be strengthened and further experiments are being performed with the objective of elucidating the specific action of melatonin in this process.

Legends

Table 1. List of Melatonin-Regulated miRNAs in MDA-MB-231 cells.

Table 2. miR-148b and miR-210 are modulated by melatonin on MDA-MB-231 breast cancer cells. Results are shown as fold changes (mean±s.e.m.) relative to control cells, normalized on U6 level. (p * < 0.05, treatment versus control). SEM=Standard Error of Mean.

Figure 1. Melatonin inhibits cell proliferation, impairs migration and reduces c-Myc expression of breast cancer cells. (A) MCF-7 and MDA-MB-231 cells have been treated with melatonin 1 nM and 1 mM for 24, 48, 72, 96 and 120 h. Each point in the graph corresponds the mean ± SEM of the triplicates plus or minus melatonin. The proliferation ratio was measured by optical density (* p < 0.05, ***p < 0.0001 treatment versus control). (B) MDA-MB-231 and 4175-TGL cells have been treated with melatonin for 48 h and subjected to transwell migration assays. Histograms and photographs representing cell migration rate. Data represents the mean ± SEM of the transwell area covered by migrated cells, performed in triplicates plus or minus melatonin (* p < 0.05, ***p < 0.0001 treatment versus control). (C) MCF-7 and MDA-MB-231 cells were treated with melatonin for 24 and 72 h and protein extracts were subjected to Western Blotting with the indicated antibodies. Protein expression was quantified by ImageJ program and calculated relative to controls, normalized with the endogenous HSP90 and expressed as percentages (%). (D) MDA-MB-231 cells were treated for 48 h and mRNA levels measured by qRT-PCR analyses. Results are

shown as fold changes (mean±s.e.m.) relative to control cells, normalized on B-actin level. ($p^{**} < 0.001$ treatment versus control). SEM= Standard Error of Mean; ABS=Absorbance.

Figure 2. Melatonin reduces migration and c-Myc expression independently of miR-148b (A) 4175-TGL cells transduced with miR-148bsponges or pLenti-empty lentivirus have been treated with melatonin (1 mM) for 48 h and subjected to transwell migration assays. Histograms are representing cell migration rate. Data represents the mean ± SEM of the transwell area covered by migrated cells, performed in triplicates plus or minus melatonin ($p^{***} < 0.0001$ treatment versus control). (B) 4175-TGL cells transduced as described above were treated with melatonin for 48 h and protein extracts were subjected to Western Blotting with the indicated antibodies. Protein expression was quantified by ImageJ program and calculated relative to controls, normalized with the endogenous HSP90 and expressed as percentages (%). (C). 4175-TGL cells transduced as described above were treated for 48 h and miRNA levels measured by qRT-PCR analyses. Results are shown as fold changes (mean±s.e.m.) relative to control cells, normalized on U6 level. ($p > 0.05$ treatment versus control). SEM= Standard Error of Mean.

Figure 3. Melatonin reduces migration and c-Myc expression independently of miR-210. (A) MDA-MB-231 cells transiently transfected with anti-miR-210 have been treated with melatonin (1 mM) for 48 h and subjected to transwell migration assays. Histograms are representing cell migration rate. Data represent the mean ± SEM of the transwell area covered by migrated cells, performed in triplicates plus or minus melatonin ($**p < 0.001$, $p^{***} < 0.0001$ treatment versus control) (B) MDA-MB-231 cells transfected as described above were treated with melatonin for 48 h and protein extracts were subjected to Western Blotting with the indicated antibodies. Protein expression was quantified by ImageJ program and calculated relative to controls, normalized with the endogenous HSP90 and expressed as percentages (%) (C) MDA-MB-231 cells transfected as described above were treated with melatonin for 48 h and miRNA levels measured by qRT-PCR analyses. Results are shown as fold changes (mean±s.e.m.) relative to control cells, normalized on U6 level. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$ treatment versus control). SEM= Standard Error of Mean.

References

1. Kronski E, Fiori ME, Barbieri O, et al. miR181b is induced by the chemopreventive polyphenol curcumin and inhibits breast cancer metastasis via down-regulation of the inflammatory cytokines CXCL1 and -2. *Mol Oncol.* 2014;8(3):581-595. doi:10.1016/j.molonc.2014.01.005.
2. Redig AJ, McAllister SS. Breast cancer as a systemic disease: a view of metastasis. *J Intern Med.* 2013;274(2):113-126. doi:10.1111/joim.12084.
3. Shi M, Liu D, Duan H, Shen B, Guo N. Metastasis-related miRNAs, active players in breast cancer invasion, and metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* 2010;29(4):785-799. doi:10.1007/s10555-010-9265-9.
4. Taubenberger A V. In vitro microenvironments to study breast cancer bone colonisation. *Adv Drug Deliv Rev.* 2014;79-80:135-144. doi:10.1016/j.addr.2014.10.014.
5. Di Leva G, Piovan C, Gasparini P, et al. Estrogen mediated-activation of miR-191/425 cluster modulates tumorigenicity of breast cancer cells depending on estrogen receptor status. *PLoS Genet.* 2013;9(3):e1003311. doi:10.1371/journal.pgen.1003311.
6. Croce CM, Calin GA. miRNAs, cancer, and stem cell division. *Cell.* 2005;122(1):6-7.

- doi:10.1016/j.cell.2005.06.036.
7. Yang J, Hao Y, Xi JJ. Therapeutic application of MicroRNAs against human cancers. *J Lab Autom.* 2013;18(1):30-33. doi:10.1177/2211068212453460.
 8. Li T, Xie J, Shen C, et al. miR-150-5p inhibits hepatoma cell migration and invasion by targeting MMP14. *PLoS One.* 2014;9(12):e115577. doi:10.1371/journal.pone.0115577.
 9. Penna E, Orso F, Cimino D, et al. microRNA-214 contributes to melanoma tumour progression through suppression of TFAP2C. *EMBO J.* 2011;30(10):1990-2007. doi:10.1038/emboj.2011.102.
 10. Robertson NM, Yigit M V. The role of microRNA in resistance to breast cancer therapy. *Wiley Interdiscip Rev RNA.* 2014;5(6):823-833. doi:10.1002/wrna.1248.
 11. Di Bella G, Mascia F, Gualano L, Di Bella L. Melatonin anticancer effects: review. *Int J Mol Sci.* 2013;14(2):2410-2430. doi:10.3390/ijms14022410.
 12. Cos S, Alvarez-García V, González A, Alonso-González C, Martínez-Campa C. Melatonin modulation of crosstalk among malignant epithelial, endothelial and adipose cells in breast cancer (Review). *Oncol Lett.* 2014;8(2):487-492. doi:10.3892/ol.2014.2203.
 13. López A, García JA, Escames G, et al. Melatonin protects the mitochondria from oxidative damage reducing oxygen consumption, membrane potential, and superoxide anion production. *J Pineal Res.* 2009;46(2):188-198. doi:10.1111/j.1600-079X.2008.00647.x.
 14. Luchetti F, Canonico B, Betti M, et al. Melatonin signaling and cell protection function. *FASEB J.* 2010;24(10):3603-3624. doi:10.1096/fj.10-154450.
 15. Borin TF, Arbab AS, Gelaleti GB, et al. Melatonin decreases breast cancer metastasis by modulating Rho-associated kinase protein-1 expression. *J Pineal Res.* 2016;60(1):3-15. doi:10.1111/jpi.12270.
 16. Mao L, Summers W, Xiang S, et al. Melatonin Represses Metastasis in Her2-Postive Human Breast Cancer Cells by Suppressing RSK2 Expression. *Mol Cancer Res.* 2016;14(11):1159-1169. doi:10.1158/1541-7786.MCR-16-0158.
 17. Reiter RJ, Manchester LC, Tan DX. Neurotoxins: free radical mechanisms and melatonin protection. *Curr Neuropharmacol.* 2010;8(3):194-210. doi:10.2174/157015910792246236.
 18. Hevia D, González-Menéndez P, Quiros-González I, et al. Melatonin uptake through glucose transporters: a new target for melatonin inhibition of cancer. *J Pineal Res.* 2015;58(2):234-250. doi:10.1111/jpi.12210.
 19. Reiter R, Rosales-Corral S, Tan D-X, et al. Melatonin, a Full Service Anti-Cancer

- Agent: Inhibition of Initiation, Progression and Metastasis. *Int J Mol Sci*. 2017;18(4):843. doi:10.3390/ijms18040843.
20. Lee SE, Kim SJ, Youn JP, Hwang SY, Park CS, Park YS. MicroRNA and gene expression analysis of melatonin-exposed human breast cancer cell lines indicating involvement of the anticancer effect. *J Pineal Res*. 2011;51(3):345-352. doi:10.1111/j.1600-079X.2011.00896.x.
 21. Sohn EJ, Won G, Lee J, Lee S, Kim SH. Upregulation of miRNA3195 and miRNA374b Mediates the Anti-Angiogenic Properties of Melatonin in Hypoxic PC-3 Prostate Cancer Cells. *J Cancer*. 2015;6(1):19-28. doi:10.7150/jca.9591.
 22. Penna E, Orso F, Taverna D. miR-214 as a Key Hub that Controls Cancer Networks: Small Player, Multiple Functions. *J Invest Dermatol*. 2015;135(4):960-969. doi:10.1038/jid.2014.479.
 23. Mao L, Cheng Q, Guardiola-Lemaître B, et al. In vitro and in vivo antitumor activity of melatonin receptor agonists. *J Pineal Res*. 2010;49(3):210-221. doi:10.1111/j.1600-079X.2010.00781.x.
 24. Proietti S, Cucina A, Reiter RJ, Bizzarri M. Molecular mechanisms of melatonin's inhibitory actions on breast cancers. *Cell Mol Life Sci*. 2013;70(12):2139-2157. doi:10.1007/s00018-012-1161-8.
 25. Hill SM, Cheng C, Yuan L, 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 Res Treat*. 2011;127(1):91-98. doi:10.1007/s10549-010-0958-0.
 26. Kiefer TL, Lai L, Yuan L, Dong C, Burow ME, Hill SM. Differential regulation of estrogen receptor alpha, glucocorticoid receptor and retinoic acid receptor alpha transcriptional activity by melatonin is mediated via different G proteins. *J Pineal Res*. 2005;38(4):231-239. doi:10.1111/j.1600-079X.2004.00198.x.
 27. Sanchez-Barcelo EJ, Mediavilla MD, Alonso-Gonzalez C, Rueda N. Breast cancer therapy based on melatonin. *Recent Pat Endocr Metab Immune Drug Discov*. 2012;6(2):108-116. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22369716>.
 28. Vriend J, Reiter RJ. Melatonin and the von Hippel-Lindau/HIF-1 oxygen sensing mechanism: A review. *Biochim Biophys Acta*. 2016;1865(2):176-183. doi:10.1016/j.bbcan.2016.02.004.
 29. Kim TH, Cho SG. Melatonin-induced KiSS1 expression inhibits triple-negative breast cancer cell invasiveness. *Oncol Lett*. 2017;14(2):2511-2516. doi:10.3892/ol.2017.6434.
 30. Mediavilla MD, Sanchez-Barcelo EJ, Tan DX, Manchester L, Reiter RJ. Basic

- mechanisms involved in the anti-cancer effects of melatonin. *Curr Med Chem.* 2010;17(36):4462-4481. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21062257>.
31. Maschio-Signorini LB, Gelaleti GB, Moschetta MG, et al. Melatonin Regulates Angiogenic and Inflammatory Proteins in MDA-MB-231 Cell Line and in Co-culture with Cancer-associated Fibroblasts. *Anticancer Agents Med Chem.* 2016;16(11):1474-1484. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27102277>.
 32. Jardim-Perassi BV, Lourenço MR, Doho GM, et al. Melatonin Regulates Angiogenic Factors under Hypoxia in Breast Cancer Cell Lines. *Anticancer Agents Med Chem.* 2016;16(3):347-358. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25963143>. Accessed October 3, 2017.
 33. Acunzo M, Romano G, Wernicke D, Croce CM. MicroRNA and cancer--a brief overview. *Adv Biol Regul.* 2015;57:1-9. doi:10.1016/j.jbior.2014.09.013.
 34. Yahya SM, Elsayed GH. A summary for molecular regulations of miRNAs in breast cancer. *Clin Biochem.* 2015;48(6):388-396. doi:10.1016/j.clinbiochem.2014.12.013.
 35. Chen Y, Song YX, Wang ZN. The microRNA-148/152 family: multi-faceted players. *Mol Cancer.* 2013;12:43. doi:10.1186/1476-4598-12-43.
 36. Zhang JG, Shi Y, Hong DF, et al. MiR-148b suppresses cell proliferation and invasion in hepatocellular carcinoma by targeting WNT1/ β -catenin pathway. *Sci Rep.* 2015;5:8087. doi:10.1038/srep08087.
 37. Dang K, Myers KA. The role of hypoxia-induced miR-210 in cancer progression. *Int J Mol Sci.* 2015;16(3):6353-6372. doi:10.3390/ijms16036353.
 38. Liu D, Xia H, Wang F, Chen C, Long J. MicroRNA-210 interacts with FBXO31 to regulate cancer proliferation cell cycle and migration in human breast cancer. *Onco Targets Ther.* 2016;9:5245-5255. doi:10.2147/OTT.S110969.
 39. Zhang Z, Sun H, Dai H, et al. MicroRNA miR-210 modulates cellular response to hypoxia through the MYC antagonist MNT. *Cell Cycle.* 2009;8(17):2756-2768. doi:10.4161/cc.8.17.9387.
 40. Giannakakis A, Sandaltzopoulos R, Greshock J, et al. miR-210 links hypoxia with cell cycle regulation and is deleted in human epithelial ovarian cancer. *Cancer Biol Ther.* 2008;7(2):255-264. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18059191>.
 41. Blask DE, Brainard GC, Dauchy RT, et al. Melatonin-depleted blood from premenopausal women exposed to light at night stimulates growth of human breast cancer xenografts in nude rats. *Cancer Res.* 2005;65(23):11174-11184. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-1945.
 42. Kim KJ, Choi JS, Kang I, Kim KW, Jeong CH, Jeong JW. Melatonin suppresses tumor

progression by reducing angiogenesis stimulated by HIF-1 in a mouse tumor model. *J Pineal Res.* 2013;54(3):264-270. doi:10.1111/j.1600-079X.2012.01030.x.

43. Mori F, Ferraiuolo M, Santoro R, et al. Multitargeting activity of miR-24 inhibits long-term melatonin anticancer effects. *Oncotarget.* 2016;7(15):20532-20548. doi:10.18632/oncotarget.7978.

Tables and Figures

Table 1. List of Melatonin-Regulated miRNAs in MDA-MB-231 cells.

<p style="text-align: center;">Down-regulated miRNAs < 0.5-fold down-regulated miRNA</p>	<p>Hsa-miR-518 Hsa-miR-520f Hsa-miR-576 Hsa-miR-545 Hsa-miR-200c Hsa-miR-548d</p>
<p style="text-align: center;">Up-regulated miRNAs > 1.5-fold up-regulated miRNA</p>	<p>Hsa-miR-10a Hsa-miR-452 Hsa-miR-let-7a Hsa-miR-425 Hsa-miR-17 Hsa-miR-296 Hsa-miR-182b Hsa-miR-210 Hsa-miR-let-7c Hsa-miR-10b Has-miR-148b</p>

Table 2. miR-148b and miR-210 are modulated by melatonin (1 mM) on MDA-MB-231 breast cancer cells. Results are shown as fold changes (mean±s.e.m.) relative to control cells, normalized on U6 level. (p * < 0.05, treatment versus control). SEM=Standard Error of Mean.

miRNAs	MDA-MB-231	MCF-7	Timepoints
	Fold change	Fold change	
miR-let-7a	0.91	0.69	24h
	1.25	0.75	72h
miR-let-7c	1.05	1.01	24h
	1.48	0.48	72h
miR-10a	1.03	---	24h
	0.94		72h
miR-10b	1.14	---	24h
	1.72		72h
miR-24	1.17	0.71	24h
	1.08	0.86	72h
miR-100	0.83	---	24h
	0.77		72h
miR-146a	1.18	---	24h
	0.91		72h
miR-148b	1.53* ↑	1.10	24h
	1.41 ↑	1.28	72h
miR-210	1.65* ↑	0.90	24h
	1.81 ↑	0.66	72h

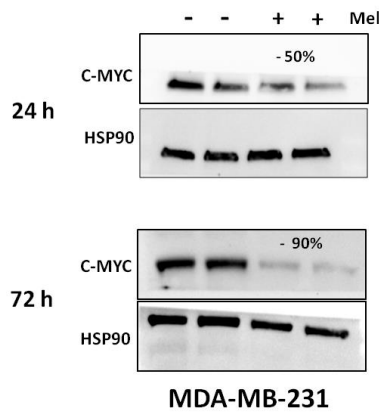
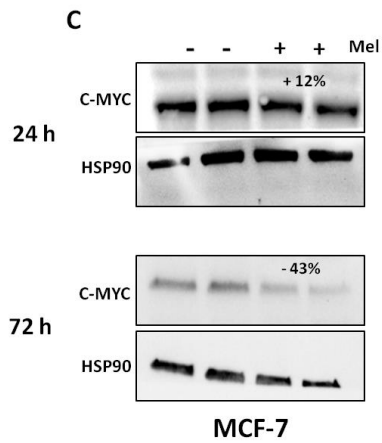
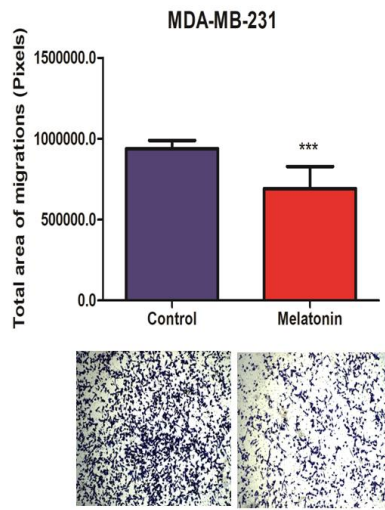
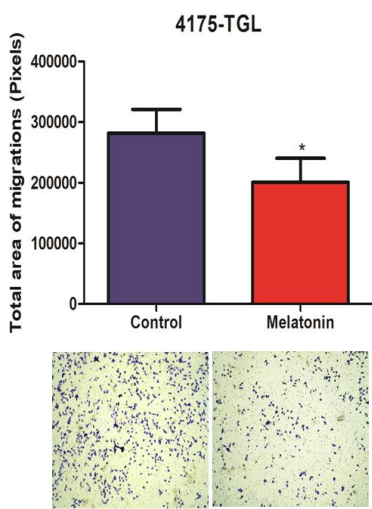
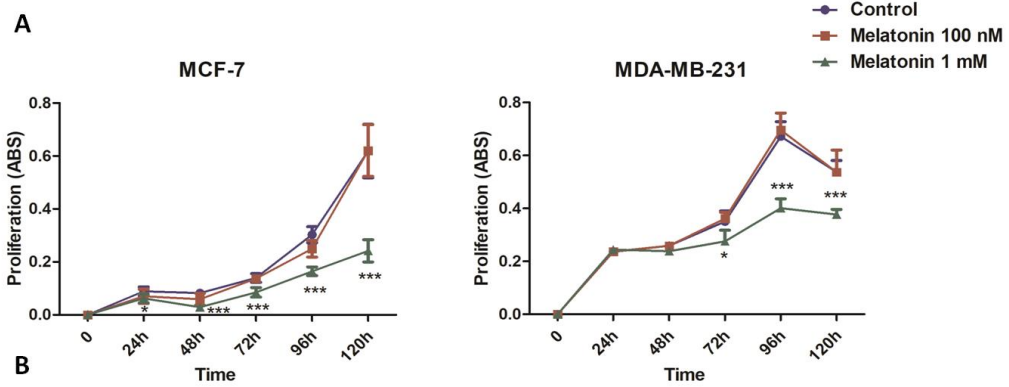


Figure 1. Melatonin inhibits cell proliferation, impairs migration and reduces c-Myc expression of breast cancer cells. (A) MCF-7 and MDA-MB-231 cells have been treated with melatonin (1 mM) for 24, 48, 72, 96 and 120 h. Each point in the graph corresponds the mean \pm SEM of the triplicates plus or minus melatonin. The proliferation ratio was measured by optical density (* $p < 0.05$, *** $p < 0.0001$ treatment versus control). (B) MDA-MB-231 and 4175-TGL cells have been treated with melatonin for 48 h and subjected to transwell migration assays. Histograms and photographs representing cell migration rate. Data represents the mean \pm SEM of the transwell area covered by migrated cells, performed in triplicates plus or minus melatonin (* $p < 0.05$, *** $p < 0.0001$ treatment versus control). (C) MCF-7 and MDA-MB-231 cells were treated with melatonin for 24 and 72 h and protein extracts were subjected to Western Blotting with the indicated antibodies. Protein expression was quantified by ImageJ program and calculated relative to controls, normalized with the endogenous HSP90 and expressed as percentages (%). (D) MDA-MB-231 cells were treated for 48 h and mRNA levels measured by qRT-PCR analyses. Results are shown as fold changes (mean \pm s.e.m.) relative to control cells, normalized on B-actin level. ($p^{**} < 0.001$ treatment versus control). SEM= Standard Error of Mean; ABS=Absorbance.

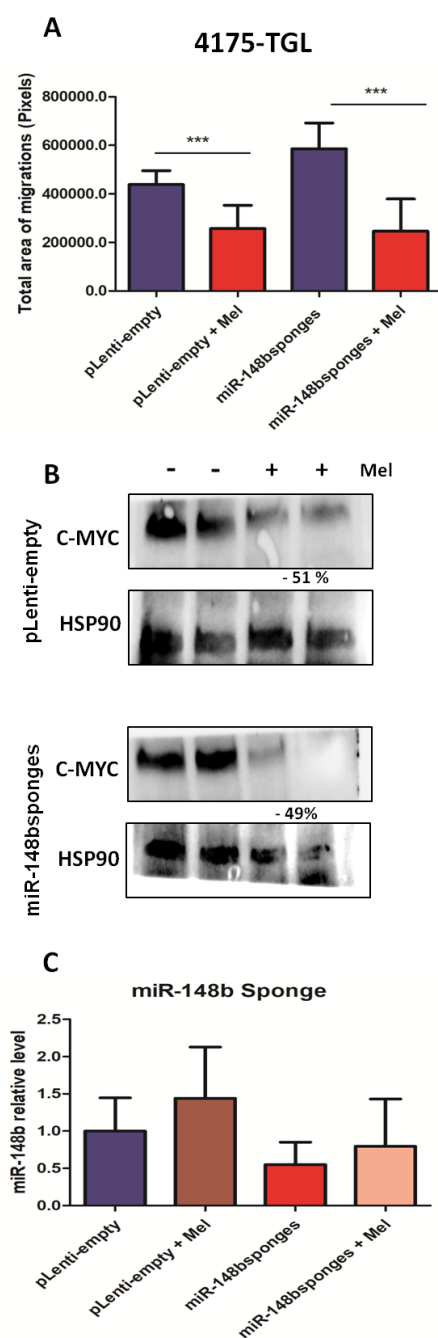


Figure 2. Melatonin reduces migration and c-Myc expression independently of miR-148b (A) 4175-TGL cells transduced with miR-148bsponges or pLenti-empty lentivirus have been treated with melatonin (1 mM) for 48 h and subjected to transwell migration assays. Histograms are representing cell migration rate. Data represents the mean \pm SEM of the transwell area covered by migrated cells, performed in triplicates plus or minus melatonin ($p^{***} < 0.0001$ treatment versus control). (B) 4175-TGL cells transduced as described above were treated with melatonin for 48 h and protein extracts were subjected to Western Blotting with the indicated antibodies. Protein expression was quantified by ImageJ program and calculated relative to controls, normalized with the endogenous HSP90 and expressed as percentages (%). (C). 4175-TGL cells transduced as described above were treated for 48 h and miRNA levels measured by qRT-PCR analyses. Results are shown as fold changes (mean \pm s.e.m.) relative to control cells, normalized on U6 level. ($p > 0.05$ treatment versus control). SEM= Standard Error of Mean.

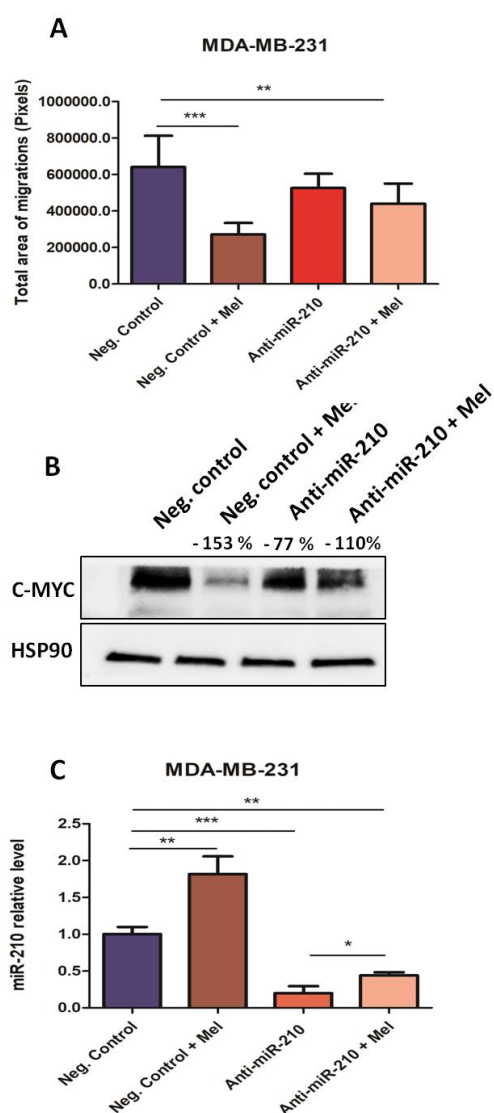


Figure 3. Melatonin reduces migration and c-Myc expression independently of miR-210. (A) MDA-MB-231 cells transiently transfected with anti-miR-210 have been treated with melatonin (1 mM) for 48 h and subjected to transwell migration assays. Histograms are representing cell migration rate. Data represent the mean \pm SEM of the transwell area covered by migrated cells, performed in triplicates plus or minus melatonin (** $p < 0.001$, $p^{***} < 0.0001$ treatment versus control) (B) MDA-MB-231 cells transfected as described above were treated with melatonin for 48 h and protein extracts were subjected to Western Blotting with the indicated antibodies. Protein expression was quantified by ImageJ program and calculated relative to controls, normalized with the endogenous HSP90 and expressed as percentages (%) (C) MDA-MB-231 cells transfected as described above were treated with melatonin for

48 h and miRNA levels measured by qRT-PCR analyses. Results are shown as fold changes (mean±s.e.m.) relative to control cells, normalized on U6 level. (* p < 0.05, **p < 0.001, ***p < 0.0001 treatment versus control). SEM= Standard Error of Mean.

Discussão

IV. DISCUSSÃO

A melatonina tem sido considerada um potencial agente oncostático natural e altos níveis deste hormônio são inversamente proporcionais ao desenvolvimento tumoral (MAO et al., 2010; PROIETTI et al., 2013). No presente estudo nossos resultados revelaram um importante papel da melatonina na inibição da proliferação e migração celular da linhagem de câncer de mama metastática e triplo-negativa.

No câncer de mama, as ações antitumorais da melatonina foram especialmente avaliadas em tumores RE-positivos, atuando através de seus receptores de membrana, denominados MT1 e MT2 (HILL et al., 2015; VRIEND; REITER, 2016). Portanto, considerando a efetividade da melatonina em células receptores de estrógeno-positivas, e a fim de corroborar estes dados, também foram utilizadas no presente estudo células MCF-7. Nossos resultados demonstraram que a melatonina apresentou efeito inibitório sobre a proliferação em células ER-positivas após 24 h de tratamento. Mais interessante, a melatonina foi capaz de inibir a proliferação de células tumorais de mama triplo-negativas MDA-MB-231, no entanto, para atingir uma diminuição estatisticamente significativa, foi necessário 72 h de tratamento quando comparada as células RE-positivas. Com base nestes achados, pode-se inferir que a ação da melatonina no controle da proliferação de células triplo-negativas são tempo-dependente em relação às células RE-positivas. Em recente estudo de Kim e Cho (2017) a melatonina reduziu a taxa de migração e invasão das células da linhagem de câncer de mama triplo-negativo MDA-MB-231, no entanto, os autores não observaram nenhum efeito sobre a proliferação após o tratamento com melatonina por 48 h (KIM; CHO, 2017).

O efeito antiproliferativo da melatonina está intimamente relacionado com sua capacidade de se ligar e interagir com os receptores de membrana MT1 e MT2. Tanto linhagens celulares ER-positivas como ER-negativas expressam o receptor MT1, no entanto, estudos recentes mostraram que tumores ER-positivos possuem maior expressão de MT1 em comparação com tumores triplo-negativos, como células MDA-MB-231 (HILL et al., 2011; REITER et al., 2017). Uma vez que células MDA-MB-231 apresentam menor atividade molecular na via de sinalização MT1, a melatonina mostra também agir em células ER-negativas através de processos que não envolvem os receptores de membrana MT1/MT2. A natureza lipofílica da melatonina proporciona sua passagem através da membrana celular, permitindo assim, sua interação com uma série de fatores de transcrição encontrados no citoplasma, e acesso a sítios de ligação nuclear que estão envolvidos principalmente na regulação da proliferação celular (MEDIAVILLA et al., 2010; PENNA et al., 2011; REITER et al., 2017; SANCHEZ-BARCELO et al., 2012).

Nossos resultados também demonstraram que a melatonina foi capaz de modular negativamente a expressão de c-Myc em ambas linhagens celulares MCF-7 e MDA-MB-231. Essencialmente, a melatonina reduziu a expressão de c-Myc em células MDA-MB-231 após 24 h, além disso, o tratamento em longo prazo levou a uma maior redução da expressão deste oncogene. Em contraste, a melatonina não alterou a expressão de c-Myc após 24 h em células MCF-7 e uma redução significativa foi apenas observada após 72 h. Vale ressaltar que este é o primeiro estudo que verificou o efeito da melatonina na modulação de c-Myc em células triplo-negativas, até o presente momento.

Adicionalmente, a fim de explorar as ações antimetastáticas da melatonina, foi realizado o ensaio de migração celular utilizando as linhagens MDA-MB-231 e, 4175-TGL (linhagem celular altamente metastática derivada das células MDA-MB-231). Como esperado, nossos resultados demonstraram que a melatonina levou a uma redução da taxa de migração celular em ambas linhagens de câncer de mama triplo-negativo. Portanto, não há evidências concretas sobre o mecanismo molecular responsável pelo bloqueio da progressão tumoral pela melatonina. Pode-se supor que uma possível evidência seria através da modulação de microRNAs.

Os miRNAs são pequenas moléculas de RNA não codificantes responsáveis pela modulação de vários genes (ACUNZO et al., 2015; YAHYA; ELSAYED, 2015). Atualmente, uma série de estudos apresentam indícios de que os miRNAs desempenham papel crucial na progressão tumoral. No entanto, até o presente momento, muito pouco se sabe sobre a interação dos miRNAs e melatonina. Portanto, torna-se essencial a compreensão de como estas pequenas moléculas intervêm nos efeitos da melatonina na proliferação e migração de células tumorais.

Desta forma, pela primeira vez, o presente estudo identificou um conjunto de miRNAs diferencialmente modulados pela melatonina em células triplo-negativas MDA-MB-231. Dentre os miRNAs diferencialmente modulados após tratamento com melatonina, o miR-210 e o miR-148b foram selecionados para investigações funcionais. Consistente com os dados do PCR Array, as análises de independentes qRT-PCR revelaram e confirmaram alta expressão de miR-148b e miR-210 nas células tratadas com melatonina.

O miR-148b tem sido verificado em vários tipos tumorais, atuando como supressor tumoral. Sua baixa expressão está intimamente relacionada ao aumento da progressão do tumor e ao número de metástases (CHEN; SONG; WANG, 2013). De acordo com Zhang e colaboradores (2015), a alta expressão de miR-148b em células de hepatocarcinoma humano (HepG2) leva a uma diminuição nos níveis de proteína c-Myc (ZHANG et al., 2015). Ao contrário do estudo acima, nossos resultados demonstraram que apesar da melatonina influenciar na modulação positiva do miR-148b em células tumorais de mama triplo-negativas, esta modulação não foi necessariamente causativa para regular a expressão de c-Myc ou diminuir a taxa de migração destas células.

Uma parte dos estudos aponta o miR-210 como um miRNA oncogênico, que exibe regulação mediada por HIF-1 α e Von-Hippel Lindau (VHL). HIF-1 α promove o aumento da expressão de miR-210, e por sua vez miR-210 promove a estabilização do HIF-1 α , sugerindo um *positive feedback loop* (DANG; MYERS, 2015). De acordo com a literatura, níveis elevados de miR-210 promovem aumento da proliferação celular e redução da parada do ciclo celular em linhagem ER-positiva MCF-7 (LIU et al., 2016). Zhang e colaboradores (2009) revelaram que altos níveis de miR-210 em células de carcinoma de cólon humano HCT116 levaram a uma maior expressão de c-Myc através da redução de MNT, um conhecido antagonista de c-Myc, responsável por prejudicar as funções proliferativas e apoptóticas de c-Myc (ZHANG et al., 2009). Inversamente, aqui mostramos que o miR-210 é regulado positivamente pela melatonina em células tumorais triplo-negativas, no entanto, a modulação positiva desta pequena molécula não levou ao aumento da proliferação ou migração celular. Estudos sugerem que o miR-210 também pode atuar como um supressor tumoral. Em concordância com esta hipótese, He e

colaboradores (2013) demonstraram que células CNE sob condições de hipóxia e modificadas com altos níveis de miR-210 apresentaram diminuição na taxa de proliferação celular. Além disso, os autores observaram que genes relacionados com mitose e ciclo celular, incluindo PLK1, CDc25B e Cyclin F eram alvos diretos de miR-210, sugerindo seu papel inibitório na formação tumoral (HE et al., 2013).

No que diz respeito à ação da melatonina nas células tumorais triplo-negativas modificadas com inibidores de miR-210, foi possível observar que este hormônio modulou negativamente a expressão de c-Myc e afetou a migração das células tumorais. Da mesma forma, como observado nos resultados sobre o miR-148b, a melatonina possui ação modulatória sobre ambos os miRNAs, no entanto esta modulação não está diretamente associada com a diminuição de c-Myc e com a taxa de migração celular. Os resultados encontrados neste estudo sugerem que tratamentos de células tumorais com melatonina podem levar a modulações de miRNAs, no entanto não são necessariamente causativas aos efeitos observados nos experimentos funcionais. Em relação a modulação de c-Myc, uma possível hipótese seria que este gene não está diretamente associado como um alvo direto para miR-148b e miR-210 na linhagem tumoral de mama triplo-negativa. Além disso, a melatonina pode atuar na diminuição de c-Myc através da modulação negativa de outros genes, como por exemplo o HIF-1a. Segundo recente estudo publicado por Vriend e Reiter (2017), uma vez que a melatonina apresenta importante papel como agente antioxidante, sua ação leva a uma diminuição de ROS e regulação de vários genes, como HIF-1 e VEGF, exibindo uma função inibitória indireta e ação independente de RE deste hormônio (BLASK et al., 2005; KIM et al., 2013; VRIEND; REITER, 2016).

De acordo com Reiter e colaboradores (2017), o papel básico da melatonina em nível molecular ainda não está totalmente elucidado. Funções extremamente benéficas da melatonina estão sendo identificadas e consideradas apenas como epifenômenos da função principal deste hormônio (REITER et al., 2017). Quanto à modulação de miRNAs induzidos pela melatonina, especula-se que poderia ser apenas um "epifenômeno" ou uma consequência de um fenômeno primário devido a desregulações gerais das enzimas Dicer/Drosha, ambas responsáveis pela síntese dos miRNAs.

Adicionalmente e ainda de acordo com nossos resultados, em um estudo de Mori e colaboradores (2016), a melatonina foi capaz de minimizar a expressão de miR-24 através da inibição de hnRNP A1, uma proteína envolvida na síntese e maturação dos miRNAs (MORI et al., 2016). Mais importante ainda, os autores observaram que os níveis de mRNA de hnRNP não eram regulados pela melatonina, sugerindo ação pós-transcricional deste hormônio na modulação sobre hnRNP A1. Nesta linha, o estudo de Mori está em concordância com nossos achados, sugerindo uma possível modulação dos miRNAs pela melatonina, no entanto de uma forma indireta. Outra hipótese levantada, é que a melatonina poderia atuar na modulação de miRNAs através de um grupo destas moléculas, e não especificamente regulando apenas um. Vale a pena ressaltar que um único miRNA pode potencialmente modular a expressão de centenas de genes, o que torna abrangente e muito complexo o efeito dos miRNAs nas células (ACUNZO et al., 2015).

Portanto, estudos adicionais devem ser desenvolvidos para melhor compreender a relação entre a melatonina, miRNAs, c-Myc, proliferação celular e migração. Os dados apresentados no presente estudo são importantes para entender o papel da melatonina em

uma possível via metastática envolvendo a regulação de miRNAs em linhagem triplo-negativa. Desta forma, esses resultados devem ser fortalecidos, e outros experimentos estão sendo realizados com o objetivo de elucidar a ação específica da melatonina neste processo, com o objetivo de mais uma vez contribuir para um melhor prognóstico.

Conclusões

V. CONCLUSÕES

O seguinte trabalho permitiu estabelecer as seguintes conclusões:

- A melatonina é capaz de reduzir a proliferação celular das linhagens de câncer de mama metastática e triplo-negativa MDA-MB-231 e não metastática e RE-positiva MCF-7. Além disso, afeta a capacidade de migração celular das linhagens tumorais MDA-MB-231 e 4175-TGL;
- A melatonina regula negativamente a expressão de c-Myc nas linhagens tumorais MDA-MB-231 e 4175-TGL;
- miR-148b e miR-210 são diferencialmente expressos após tratamento com melatonina. No entanto, os efeitos desta regulação não influenciaram os estudos funcionais utilizando o possível alvo c-Myc;
- Em conjunto, nossos resultados confirmam o efeito da melatonina na inibição da proliferação e migração celular, especialmente em células triplo-negativas, evidenciando seu importante papel no controle da progressão tumoral.

Referências

VI. REFERÊNCIAS

- ACUNZO, M. et al. MicroRNA and cancer--a brief overview. **Adv Biol Regul**, v. 57, p. 1–9, 2015.
- AGOSTINI, M. et al. miRNAs in colon and rectal cancer: A consensus for their true clinical value. **Clin Chim Acta**, v. 411, n. 17–18, p. 1181–1186, 2010.
- BARTSCH, H.; BARTSCH, C. Effect of melatonin on experimental tumors under different photoperiods and times of administration. **Journal of neural transmission**, v. 52, n. 4, p. 269–79, 1981.
- BILU, C.; KRONFELD-SCHOR, N. Effects of circadian phase and melatonin injection on anxiety-like behavior in nocturnal and diurnal rodents. **Chronobiology International**, v. 30, n. 6, p. 828–836, 10 jul. 2013.
- BLASK, D. E. et al. Melatonin-depleted blood from premenopausal women exposed to light at night stimulates growth of human breast cancer xenografts in nude rats. **Cancer Res**, v. 65, n. 23, p. 11174–11184, 2005.
- CALIN, G. A. et al. Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 24, p. 15524–9, 26 nov. 2002.
- CHEN, Y.; SONG, Y. X.; WANG, Z. N. The microRNA-148/152 family: multi-faceted players. **Mol Cancer**, v. 12, p. 43, 2013.
- CHENG, Y. et al. miR-137 effects on gastric carcinogenesis are mediated by targeting Cox-2-activated PI3K/AKT signaling pathway. **FEBS letters**, v. 588, n. 17, p. 3274–81, 25 ago. 2014.
- CHO, K. BIN et al. Overexpression of c-myc induces epithelial mesenchymal transition in mammary epithelial cells. **Cancer Letters**, v. 293, n. 2, p. 230–239, 28 jul. 2010.
- CICHON, M. A. et al. MYC Is a Crucial Mediator of TGF β -Induced Invasion in Basal Breast Cancer. **Cancer research**, v. 76, n. 12, p. 3520–30, 15 jun. 2016.
- CORCORAN, C. et al. Intracellular and Extracellular MicroRNAs in Breast Cancer. **Clinical Chemistry**, v. 57, n. 1, p. 18–32, 1 jan. 2011.
- COS, S. et al. Melatonin modulation of crosstalk among malignant epithelial, endothelial and adipose cells in breast cancer (Review). **Oncol Lett**, v. 8, n. 2, p. 487–492, 2014.

- CROCE, C. M.; CALIN, G. A. miRNAs, cancer, and stem cell division. **Cell**, v. 122, n. 1, p. 6–7, 2005.
- DANG, C. V. MYC on the Path to Cancer. **Cell**, v. 149, n. 1, p. 22–35, 30 mar. 2012.
- DANG, K.; MYERS, K. A. The role of hypoxia-induced miR-210 in cancer progression. **Int J Mol Sci**, v. 16, n. 3, p. 6353–6372, 2015.
- DESANTIS, C. et al. Breast cancer statistics, 2013. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 64, n. 1, p. 52–62, jan. 2014.
- DI BELLA, G. et al. Melatonin anticancer effects: review. **Int J Mol Sci**, v. 14, n. 2, p. 2410–2430, 2013.
- DUBEY, A. K.; GUPTA, U.; JAIN, S. Breast cancer statistics and prediction methodology: a systematic review and analysis. **Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP**, v. 16, n. 10, p. 4237–45, 2015.
- EBRAHIMI, F. et al. miR-126 in human cancers: Clinical roles and current perspectives. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 96, n. 1, p. 98–107, fev. 2014.
- FARRELL, A. S.; SEARS, R. C. MYC Degradation. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 4, n. 3, p. a014365–a014365, 1 mar. 2014.
- FERNANDES, R. C. M. et al. Coordinated expression of ER, PR and HER2 define different prognostic subtypes among poorly differentiated breast carcinomas. **Histopathology**, v. 55, n. 3, p. 346–352, set. 2009.
- FORONI, C. et al. Epithelial–mesenchymal transition and breast cancer: Role, molecular mechanisms and clinical impact. **Cancer Treatment Reviews**, v. 38, n. 6, p. 689–697, out. 2012.
- FRANK, T. S.; CRITCHFIELD, G. C. Hereditary risk of women’s cancers. **Best practice & research. Clinical obstetrics & gynaecology**, v. 16, n. 5, p. 703–13, out. 2002.
- GAROFALO, M.; LEVA, G. DI; CROCE, C. M. MicroRNAs as anti-cancer therapy. **Current pharmaceutical design**, v. 20, n. 33, p. 5328–35, 2014.
- GE, H. et al. MicroRNA-148b is down-regulated in non-small cell lung cancer and associated with poor survival. **International journal of clinical and experimental pathology**, v. 8, n. 1, p. 800–5, 2015.
- GENG, S.-Q.; ALEXANDROU, A. T.; LI, J. J. Breast cancer stem cells: Multiple capacities in tumor metastasis. **Cancer Letters**, v. 349, n. 1, p. 1–7, 10 jul. 2014.

GHASEMKHANI, N. et al. RETRACTED ARTICLE: Down-regulated MicroRNA 148b expression as predictive biomarker and its prognostic significance associated with clinicopathological features in non-small-cell lung cancer patients. **Diagnostic Pathology**, v. 10, n. 1, p. 164, 17 dez. 2015.

GOH, J. N. et al. microRNAs in breast cancer: regulatory roles governing the hallmarks of cancer. **Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society**, v. 91, n. 2, p. 409–28, maio 2016.

GUAN, X. Cancer metastases: challenges and opportunities. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 5, n. 5, p. 402–418, set. 2015.

HE, J. et al. MiR-210 disturbs mitotic progression through regulating a group of mitosis-related genes. **Nucleic acids research**, v. 41, n. 1, p. 498–508, 7 jan. 2013.

HEVIA, D. et al. Melatonin uptake through glucose transporters: a new target for melatonin inhibition of cancer. **J Pineal Res**, v. 58, n. 2, p. 234–250, 2015.

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 Res Treat**, v. 127, n. 1, p. 91–98, 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.

HSIAO, Y.-H. et al. Breast cancer heterogeneity: mechanisms, proofs, and implications. **Journal of Cancer**, v. 1, p. 6–13, 1 jun. 2010.

IWAYA, T. et al. Contrasting Expression Patterns of Histone mRNA and microRNA 760 in Patients with Gastric Cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 19, n. 23, p. 6438–6449, 1 dez. 2013.

JEON, H. S. et al. Combining microRNA-449a/b with a HDAC inhibitor has a synergistic effect on growth arrest in lung cancer. **Lung Cancer**, v. 76, n. 2, p. 171–176, 1 maio 2012.

KIM, K. J. et al. Melatonin suppresses tumor progression by reducing angiogenesis stimulated by HIF-1 in a mouse tumor model. **J Pineal Res**, v. 54, n. 3, p. 264–270, 2013.

KIM, T. H.; CHO, S. G. Melatonin-induced KiSS1 expression inhibits triple-negative breast cancer cell invasiveness. **Oncol Lett**, v. 14, n. 2, p. 2511–2516, 2017.

KONG, P.-J. et al. Melatonin Induces Akt Phosphorylation through Melatonin Receptor- and PI3K-Dependent Pathways in Primary Astrocytes. **The Korean journal of physiology & pharmacology: official journal of the Korean Physiological**

Society and the Korean Society of Pharmacology, v. 12, n. 2, p. 37–41, abr. 2008.

KRESS, T. R.; SABÒ, A.; AMATI, B. MYC: connecting selective transcriptional control to global RNA production. **Nature Reviews Cancer**, v. 15, n. 10, p. 593–607, 18 set. 2015.

KRONSKI, E. et al. miR181b is induced by the chemopreventive polyphenol curcumin and inhibits breast cancer metastasis via down-regulation of the inflammatory cytokines CXCL1 and -2. **Mol Oncol**, v. 8, n. 3, p. 581–595, 2014.

KULKARNI, S.; HICKS, D. G. HER2-Positive Early Breast Cancer and Trastuzumab: A Surgeon's Perspective. **Annals of Surgical Oncology**, v. 15, n. 6, p. 1677–1688, 9 jun. 2008.

LEE, S. E. et al. MicroRNA and gene expression analysis of melatonin-exposed human breast cancer cell lines indicating involvement of the anticancer effect. **J Pineal Res**, v. 51, n. 3, p. 345–352, 2011.

LERTKHACHONSUK, A. et al. Cancer prevention in Asia: resource-stratified guidelines from the Asian Oncology Summit 2013. **The Lancet Oncology**, v. 14, n. 12, p. e497–e507, nov. 2013.

LEVASHOVA, Z. et al. Molecular Imaging of Changes in the Prevalence of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor in Sunitinib-Treated Murine Mammary Tumors. **Journal of Nuclear Medicine**, v. 51, n. 6, p. 959–966, 1 jun. 2010.

LI, Y. et al. Melatonin for the prevention and treatment of cancer. **Oncotarget**, v. 8, n. 24, p. 39896–39921, 18 jul. 2015.

LIU, D. et al. MicroRNA-210 interacts with FBXO31 to regulate cancer proliferation cell cycle and migration in human breast cancer. **Onco Targets Ther**, v. 9, p. 5245–5255, 2016.

LONG, F. et al. Melatonin enhances the anti-tumor effect of sorafenib via AKT/p27-mediated cell cycle arrest in hepatocarcinoma cell lines. **RSC Adv.**, v. 7, n. 34, p. 21342–21351, 18 abr. 2017.

LUCHETTI, F. et al. Melatonin signaling and cell protection function. **FASEB J**, v. 24, n. 10, p. 3603–3624, 2010.

MA, R. et al. Mechanisms involved in breast cancer liver metastasis. **Journal of translational medicine**, v. 13, p. 64, 15 fev. 2015.

MAO, L. et al. In vitro and in vivo antitumor activity of melatonin receptor agonists. **J Pineal Res**, v. 49, n. 3, p. 210–221, 2010.

- MARINO, N. et al. Breast Cancer Metastasis. **The American Journal of Pathology**, v. 183, n. 4, p. 1084–1095, out. 2013.
- MCGUIRE, A.; BROWN, J. A. L.; KERIN, M. J. Metastatic breast cancer: the potential of miRNA for diagnosis and treatment monitoring. **Cancer metastasis reviews**, v. 34, n. 1, p. 145–55, mar. 2015.
- MEDIAVILLA, M. D. et al. Basic mechanisms involved in the anti-cancer effects of melatonin. **Curr Med Chem**, v. 17, n. 36, p. 4462–4481, 2010.
- MORI, F. et al. Multitargeting activity of miR-24 inhibits long-term melatonin anticancer effects. **Oncotarget**, v. 7, n. 15, p. 20532–20548, 2016.
- MOU, Z. et al. MicroRNA-148b Acts as a Tumor Suppressor in Cervical Cancer by Inducing G1/S-Phase Cell Cycle Arrest and Apoptosis in a Caspase-3-Dependent Manner. **Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research**, v. 22, p. 2809–15, 9 ago. 2016.
- MUSTACCHI, G.; DE LAURENTIIS, M. The role of taxanes in triple-negative breast cancer: literature review. **Drug Design, Development and Therapy**, p. 4303, ago. 2015.
- NI, F. et al. MicroRNA-362-5p promotes tumor growth and metastasis by targeting CYLD in hepatocellular carcinoma. **Cancer Letters**, v. 356, n. 2, p. 809–818, jan. 2015.
- OLIVE, V.; JIANG, I.; HE, L. mir-17-92, a cluster of miRNAs in the midst of the cancer network. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 42, n. 8, p. 1348–54, ago. 2010.
- ORSO, F. et al. miR-214 and miR-148b Targeting Inhibits Dissemination of Melanoma and Breast Cancer. **Cancer research**, v. 76, n. 17, p. 5151–62, 1 set. 2016.
- PENNA, E. et al. microRNA-214 contributes to melanoma tumour progression through suppression of TFAP2C. **The EMBO journal**, v. 30, n. 10, p. 1990–2007, 18 maio 2011.
- PENNA, E.; ORSO, F.; TAVERNA, D. miR-214 as a Key Hub that Controls Cancer Networks: Small Player, Multiple Functions. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 135, n. 4, p. 960–969, abr. 2015.
- PROIETTI, S. et al. Molecular mechanisms of melatonin's inhibitory actions on breast cancers. **Cell Mol Life Sci**, v. 70, n. 12, p. 2139–2157, 2013.
- RAVINDRA, T.; LAKSHMI, N. K.; AHUJA, Y. R. Melatonin in pathogenesis and therapy of cancer. **Indian journal of medical sciences**, v. 60, n. 12, p. 523–35, dez.

2006.

REITER, R. et al. Melatonin, a Full Service Anti-Cancer Agent: Inhibition of Initiation, Progression and Metastasis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 4, p. 843, 17 abr. 2017.

REITER, R. J. et al. Melatonin as an antioxidant: under promises but over delivers. **J Pineal Res**, v. 61, n. 3, p. 253–278, 2016.

REITER, R. J.; MANCHESTER, L. C.; TAN, D. X. Neurotoxins: free radical mechanisms and melatonin protection. **Curr Neuropharmacol**, v. 8, n. 3, p. 194–210, 2010.

REITER, R. J.; TAN, D.-X.; PAPPOLLA, M. A. Melatonin Relieves the Neural Oxidative Burden that Contributes to Dementias. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1035, n. 1, p. 179–196, 1 dez. 2004.

SANCHEZ-BARCELO, E. J. et al. Breast cancer therapy based on melatonin. **Recent Pat Endocr Metab Immune Drug Discov**, v. 6, n. 2, p. 108–116, 2012.

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

SCULLY, O. J. et al. Breast cancer metastasis. **Cancer genomics & proteomics**, v. 9, n. 5, p. 311–20, [s.d.].

SEYFRIED, T. N.; HUYSENTRUYT, L. C. On the origin of cancer metastasis. **Critical reviews in oncogenesis**, v. 18, n. 1–2, p. 43–73, 2013.

SHI, M. et al. Metastasis-related miRNAs, active players in breast cancer invasion, and metastasis. **Cancer Metastasis Rev**, v. 29, n. 4, p. 785–799, 2010.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2015. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 65, n. 1, p. 5–29, jan. 2015.

SIGURDSSON, V. et al. Endothelial induced EMT in breast epithelial cells with stem cell properties. **PloS one**, v. 6, n. 9, p. e23833, 2011.

SOHN, E. J. et al. Upregulation of miRNA3195 and miRNA374b Mediates the Anti-Angiogenic Properties of Melatonin in Hypoxic PC-3 Prostate Cancer Cells. **J Cancer**, v. 6, n. 1, p. 19–28, 2015.

STINE, Z. E. et al. MYC, Metabolism, and Cancer. **Cancer Discovery**, v. 5, n. 10, p. 1024–1039, 1 out. 2015.

TAMARKIN, L. et al. Melatonin inhibition and pinealectomy enhancement of 7,12-

dimethylbenz(a)anthracene-induced mammary tumors in the rat. **Cancer research**, v. 41, n. 11 Pt 1, p. 4432–6, nov. 1981.

TAUBENBERGER, A. V. In vitro microenvironments to study breast cancer bone colonisation. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 79–80, p. 135–144, 2014.

TELLI, M. L.; SLEDGE, G. W. The future of breast cancer systemic therapy: the next 10 years. **Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)**, v. 93, n. 2, p. 119–25, 9 fev. 2015.

TSUCHIYA, S. et al. MicroRNA-210 regulates cancer cell proliferation through targeting fibroblast growth factor receptor-like 1 (FGFRL1). **The Journal of biological chemistry**, v. 286, n. 1, p. 420–8, 7 jan. 2011.

VENNSTROM, B. et al. Isolation and characterization of c-myc, a cellular homolog of the oncogene (v-myc) of avian myelocytomatosis virus strain 29. **Journal of virology**, v. 42, n. 3, p. 773–9, jun. 1982.

VRIEND, J.; REITER, R. J. Melatonin and the von Hippel-Lindau/HIF-1 oxygen sensing mechanism: A review. **Biochim Biophys Acta**, v. 1865, n. 2, p. 176–183, 2016.

XIA, J. et al. MicroRNA-362 induces cell proliferation and apoptosis resistance in gastric cancer by activation of NF- κ B signaling. **Journal of translational medicine**, v. 12, n. 1, p. 33, 5 fev. 2014.

YAHYA, S. M.; ELSAYED, G. H. A summary for molecular regulations of miRNAs in breast cancer. **Clin Biochem**, v. 48, n. 6, p. 388–396, 2015.

YANG, J.; HAO, Y.; XI, J. J. Therapeutic application of MicroRNAs against human cancers. **J Lab Autom**, v. 18, n. 1, p. 30–33, 2013.

YANG, W. et al. Downregulation of miR-210 expression inhibits proliferation, induces apoptosis and enhances radiosensitivity in hypoxic human hepatoma cells in vitro. **Experimental Cell Research**, v. 318, n. 8, p. 944–954, 1 maio 2012.

YEUNG, K. T.; YANG, J. Epithelial-mesenchymal transition in tumor metastasis. **Molecular oncology**, v. 11, n. 1, p. 28–39, jan. 2017.

ZHANG, H.; LI, Y.; LAI, M. The microRNA network and tumor metastasis. **Oncogene**, v. 29, n. 7, p. 937–948, 18 fev. 2010.

ZHANG, J. G. et al. MiR-148b suppresses cell proliferation and invasion in hepatocellular carcinoma by targeting WNT1/ β -catenin pathway. **Sci Rep**, v. 5, p. 8087, 2015a.

ZHANG, L. et al. Comparative Analysis of Imaging and Pathology Features of

Mucinous Carcinoma of the Breast. **Clinical Breast Cancer**, v. 15, n. 2, p. e147–e154, abr. 2015b.

ZHANG, Z. et al. MicroRNA miR-210 modulates cellular response to hypoxia through the MYC antagonist MNT. **Cell Cycle**, v. 8, n. 17, p. 2756–2768, 2009.

Anexo

VII. ANEXO

Comprovante de submissão do artigo: **Melatonin inhibits tumor progression traits of triple-negative breast cancer cells** ao periódico **Journal of Pineal Research**.

Journal of Pineal Research



Melatonin inhibits tumor progression traits of triple-negative breast cancer cells

Journal:	Journal of Pineal Research
Manuscript ID	Draft
Manuscript Type:	Original Manuscript
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Ferreira, Livia; Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho – IBILCE/UNESP, Genetic Orso, Francesca; Molecular Biotechnology Center (MBC), University of Torino, Torino, Italy, . Department of Molecular Biotechnology and Health Sciences Dettori, Daniela; Molecular Biotechnology Center (MBC), University of Torino, Torino, Italy. , Department of Molecular Biotechnology and Health Sciences Lacerda, Jéssica ; Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho – IBILCE/UNESP, Genetic Borin, Thaiz; Faculdade de Medicina de Sao Jose do Rio Preto - FAMERP, Molecular Biology Taverna, Daniela; Molecular Biotechnology Center (MBC), University of Torino, Torino, Italy. , Department of Molecular Biotechnology and Health Sciences Zuccari, Debora; Faculdade de Medicina de Sao Jose do Rio Preto - FAMERP, Molecular Biology
Keywords:	breast cancer, metastasis, miRNA, Melatonin

SCHOLARONE™
Manuscripts