



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

Juliana Ramos Lopes

AVALIAÇÃO DA AÇÃO DA MELATONINA EM CÉLULAS-
TRONCO TUMORAIS MAMÁRIAS RE-POSITIVAS
TRATADAS COM DISRUPTORES ESTROGÊNICOS:
VERIFICAÇÃO DA VIA DO RECEPTOR DE ESTRÓGENO
MEDIADA PELO GENE *OCT 4*

São José do Rio Preto
2016

Juliana Ramos Lopes

AVALIAÇÃO DA AÇÃO DA MELATONINA EM CÉLULAS-
TRONCO TUMORAIS MAMÁRIAS RE-POSITIVAS
TRATADAS COM DISRUPTORES ESTROGÊNICOS:
VERIFICAÇÃO DA VIA DO RECEPTOR DE ESTRÓGENO
MEDIADA PELO GENE *OCT 4*

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

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

São José do Rio Preto
2016

Lopes, Juliana Ramos.

Avaliação da ação da melatonina em células-tronco tumorais
mamárias re-positivas tratadas com disruptores estrogênicos :
verificação da via do receptor de estrógeno mediada pelo gene OCT 4 /
Juliana Ramos Lopes. -- São José do Rio Preto, 2016
90 f. : il.

Orientador: Debora Aparecida Pires de Campos Zuccari
Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista "Júlio de
Mesquita Filho", Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Genética. 2. Câncer – Aspectos genéticos. 3. Mamas -
Câncer. 4. Células-tronco neoplásicas. 5. Melatonina. 6. Estrogênios.
7. Esferóides celulares. I. Zuccari, Debora Aparecida Pires de Campos.
II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de
Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 616-006.6

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

Juliana Ramos Lopes

AVALIAÇÃO DA AÇÃO DA MELATONINA EM CÉLULAS-
TRONCO TUMORAIS MAMÁRIAS RE-POSITIVAS
TRATADAS COM DISRUPTORES ESTROGÊNICOS:
VERIFICAÇÃO DA VIA DO RECEPTOR DE ESTRÓGENO
MEDIADA PELO GENE *OCT 4*

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

Comissão Examinadora

Prof^a. Dr^a. Debora Ap. Pires de Campos Zuccari
Universidade Estadual Paulista (UNESP) – São José do Rio Preto
Orientadora

Prof^a. Dr^a. Patricia Simone Leite Vilamaior
Universidade Estadual Paulista (UNESP) – São José do Rio Preto

Prof^a. Dr^a. Ana Paula Girol
Faculdades Integradas Padre Albino de Catanduva (FAMECA) -
Catanduva

Prof^a. Dr^a. Patricia Matos Biselli Chicote
Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP) – São José
do Rio Preto

Prof. Dr. Wilson Araújo da Silva Junior
Universidade de São Paulo (USP) – Ribeirão Preto

São José do Rio Preto
06 de maio de 2016

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Investigação Molecular do Câncer (LIMC) na Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP), SP, Brasil, sob orientação da Profa. Dra. Debora Ap. Pires de Campos Zuccari e no *Laboratory of the Department of Biochemistry and Molecular Biology - Michigan State University (MSU)*, East Lansing, Michigan, Estados Unidos, com a supervisão do Dr. David Arnosti. Os recursos para o desenvolvimento do projeto foram obtidos na forma de bolsa de estudos do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais e irmãos pelo exemplo, incentivo, dedicação, carinho e amor. Agradeço pela educação que tive e pela pessoa que me tornei hoje.

“Cada sonho que você deixa para trás é um pedaço do seu futuro que deixa de existir”

Steves Jobs

Agradecimientos

AGRADECIMENTOS

A minha querida orientadora, Prof^a Dr^a Debora Zuccari, pelo exemplo de professora e orientadora, pela amizade e confiança. Agradeço também por ter acreditado na minha capacidade e por todo apoio e ensinamento transmitido ao longo desses anos.

A minha mãe Sônia Aparecida Ramos Lopes e ao meu pai Luiz Lopes Garcia, pois não mediram esforços para que meus sonhos se tornassem realidade, sem vocês nada disso seria possível.

Aos meus irmãos, Victor Luiz Ramos Lopes e João Henrique Ramos Lopes, que mesmo inconscientemente me incentivaram a correr atrás dos meus objetivos.

A minha amiga de infância Nathália Maria Ferreira do Nascimento, por me acompanhar em toda a trajetória da minha vida, onde com ela pude desabafar cada momento difícil e compartilhar os momentos de alegria.

Aos grandes amigos do LIMC: Marina G. Moschetta, Livia C. Ferreira, Camila Leonel, Gabriela B. Gelaleti, Thaíz F. Borin, Bruna V. Jardim-Perassi, Larissa B. Maschio, Gustavo R. Martins, Naiane N. Gonçalves, Giovanna R. Varallo, Jucimara Colombo, Tialfi Castro, Nathália Sonehara, Rubens P. Junior, Jéssica Z. Lacerda, Alexandra P. Fantinatti e André L. Mota pela amizade, companheirismo e pelos momentos de alegrias e tristezas compartilhados. Vocês foram fundamentais durante essa fase da minha vida.

Ao Dr. David Arnosti e ao Dr. James Edward Trosko, por permitirem a realização do estágio no exterior na Michigan State University no Laboratory at the Department of Biochemistry and Molecular Biology. Agradeço pelo auxílio no desenvolvimento do trabalho e a de todos os integrantes do grupo de pesquisa, permitindo meu crescimento pessoal e profissional.

Agradeço com muito carinho a minha “família” de East Lansing, EUA. Em especial, aos amigos Afrand, Ipek, Naihara, Marcelo, Nathália, Stheffn, Hamideh, Bardia, Ramin, Mersedeh, Scott, Zahra, Nastaran, Nima, Kumar, Iman H., Iman B. e Babak. Muito obrigado por me acolherem com tanta gratidão e carinho!

A banca examinadora do exame geral de qualificação, Profa. Dra. Ana Elizabete Silva e Profa. Dra. Dorotéia Rossi Silva Souza pelas valiosas sugestões que permitiram melhorar meu trabalho.

Aos Professores: Profa. Dra. Patricia Simone Leite Vilamaior, Profa. Dra. Ana Paula Girol, Profa. Dra. Patricia Matos Biselli Chicote e Prof. Dr. Wilson Araújo da Silva Junior por aceitarem fazer parte da banca de defesa.

Aos professores, alunos e funcionários da Pós-Graduação em Genética do Ibilce que contribuíram com meu aprendizado.

A CAPES e CNPq, pela concessão da bolsa de estudos no país e no exterior, indispensáveis para a realização desse projeto.

A UNESP/IBILCE e a FAMERP pela infra-estrutura e profissionais que possibilitaram a realização do projeto.

Enfim, agradeço à todos que passaram pela minha vida e de alguma forma contribuíram para minha formação.

Muito obrigada!!!

SUMÁRIO

I. INTRODUÇÃO	23
1. CÂNCER DE MAMA	23
2. ESTRÓGENO E CÂNCER DE MAMA	26
3. DISRUPTORES ENDÓCRINOS	28
4. CÉLULAS-TRONCO TUMORAIS	30
5. OCT4.....	34
6. MELATONINA	35
6.1. Síntese e degradação	35
6.2. Receptores da melatonina	37
6.3. Melatonina e câncer	38
II. OBJETIVOS	42
III. CAPÍTULOS	44
Artigo I.....	45
Artigo II.....	62
IV. CONCLUSÕES	79
V. REFERÊNCIAS	81
VI. ANEXOS	89

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação espacial das taxas de incidência de câncer de Mama	24
Figura 2. Representação gráfica de tumores receptor de estrogênio positivo (RE+) e triplo negativo.....	25
Figura 3. Representação do mecanismo de ação do estrogênio nas células receptores de estrogênio positivo.....	257
Figura 4. Representação da síntese do Bisfenol A	299
Figura 5. Representação do mecanismo de ação do Bisfenol A (BPA).	30
Figura 6. Representação do surgimento do tumor a partir de células-tronco.....	322
Figura 7. Função do OCT4 como regulador da pluripotência das células-tronco.....	355
Figura 8. Esquema representativo da via de síntese da melatonina. Início na conversão do aminoácido triptofano até o último passo para a formação de melatonina pela enzima HIOMT.....	366
Figura 9. Mecanismo dos efeitos antiestrogênicos da melatonina.	399
Artigo I	
Figure 1. Evaluation of cell viability by MTT 3- (4,5-Dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazolium bromide assay of breast cancer cell lines grown in 3-dimensional mammospheres method after 7 days of treatment with melatonin (0.5 mM, 1 mM, 2 mM, 5 mM and 10 mM).	52
Figure 2. Analysis of the octamer-binding transcription factor 4 (OCT4) protein expression by immunocytochemistry, showing MCF-7 cells after 7 days of melatonin treatment (1 mM).....	54
Figure 3. Analysis of the octamer-binding transcription factor 4 (OCT4) protein expression by immunocytochemistry, showing MDA-MB-231 cells after 7 days of melatonina treatment (1 mM).....	55
Artigo II	
Fig. 1. MCF-7 cells grown in 3-dimensional mammospheres, treated with E2 and/or BPA with or without melatonin. (A) Cell suspension treated for 6 days. (B) Anchorage Independent Growth (AIG) treated for 14 days. The magnification was 40 X.	66
Fig. 2. Effect of E2 and/or BPA with or without melatonin on MCF-7 mammospheres. (A) Size of mammospheres. (B) Number of mammospheres. Significant value in ANOVA followed by Bonferroni's test (*P ≤ 0.05).	67

Fig. 3. Chromatin immunoprecipitation to verify the binding activity of ER to the putative ERE sequences in OCT4 transcription site (OCT4 -1999 and OCT4 -3544) after treatment with E2 and/or BPA with or without melatonin in mammospheres..... 68

Fig. 4. Analysis of OCT4 and ER gene and protein expression after treatment with melatonin, E2 and BPA..... 69

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AA-NAT	Arilalquilamina N-acetiltransferase
ANOVA	Análise de variância
ABC	Proteína transportadora, do inglês <i>ATP-binding cassette</i>
ACTB	do inglês <i>Beta Actin</i>
AIG	do inglês <i>anchorage independent growth</i>
ALDH	Aldeído desidrogenase
ATCC	do inglês <i>American type culture collection</i>
ATP	do inglês <i>Adenosine triphosphate</i>
Bcl-2	do inglês <i>B-cell lymphoma 2</i>
Bcl-x	do inglês <i>B-cell lymphoma-extra larg</i>
BCSC	do inglês <i>Breast Cancer Stem Cells</i>
BPA	Bisfenol A
BSA	do inglês <i>Bovine Serum Albumin</i>
cAMP	do inglês <i>adenosine 3',5'-cyclic monophosphate</i>
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
cDNA	DNA complementar
ChIP	Ensaio de imunoprecipitação da cromatina, do inglês <i>Chromatin immunoprecipitation</i>
Cm	Centímetros
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CO ₂	Fórmula química do gás carbônico
CSC	do inglês <i>Cancer Stem Cells</i>
CTTs	Células-tronco tumorais
DAB	Diaminobenzidina 3,3'
DMEM	do inglês <i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DMSO	do inglês <i>dimethylsulfoxide</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
E2	Estrógeno
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EGTA	do inglês <i>ethylene glycol tetraacetic acid</i>
ERE	Elemento de resposta ao estrógeno

HCl	Ácido clorídrico
HEPES	do inglês 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
IgG	Imunoglobulina G
M.O.D.	do inglês <i>Mean Optical Density</i>
FAMERP	Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FBS	Soro fetal bovino, do inglês <i>fetal bovine serum</i>
HER-2/neu	do inglês <i>Human Epidermal growth factor Receptor 2</i>
HIOMT	Hidroxi-indol-Ometiltransferase
IARC	do inglês <i>International Agency for Research on Cancer</i>
IGF	do inglês <i>Insulin-like growth factor</i>
INCA	Instituto Nacional do Câncer
kDa	Kilodaltons
LiCl	Cloreto de lítio
LIMC	Laboratório de Investigação Molecular no Câncer
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mM	Milimolar
μM	Micromolar
nM	Nanomolar
MSU	do inglês <i>Michigan State University</i>
MTT	<i>3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide</i>
NaCl	Cloreto de sódio
NaHCO ₃	Bicarbonato de Sódio
NANOG	do inglês <i>pron. nanOg</i>
NAS	N-acetilserotonina
NP-40	do inglês <i>Tergitol-type NP-40</i>
OCT4	do inglês <i>Octamer-binding transcription fator 4</i>
PBS	Tampão fosfato salino
PCR	do inglês <i>Polymerase Chain Reaction</i>
pH	Potencial hidrogeniônico
qRT-PCR	<i>Real-Time Polymerase Chain Reaction</i>
RE	Receptor de estrógeno

RNA	Ácido ribonucléico
RP	Receptor de Progesterona
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SNC	Sistema Nervoso Central
SOX2	do inglês <i>(sex determining region Y)-box 2</i>
TBST	do inglês <i>Tris-Buffered Saline and Tween 20</i>
TNM	Sistema de estadiamento clínico, T= tumor, N=linfonodo (do inglês node), M= metástase, utilizado pela UICC (<i>Union for International Cancer Control</i>) e pela AJCC (<i>American Joint Committee on Cancer</i>).
Tris	Trisaminometano
TE	Tampão Tris/EDTA
TSE	Tampão Tris/SDS/EDTA
A.U.	do inglês <i>Arbitrary Units</i>
WHO	World Cancer Report
3D	do inglês <i>Three-dimensional</i>

Resumo

RESUMO

As neoplasias mamárias são os tumores de maior ocorrência em mulheres no mundo. A alta incidência deste tipo tumoral deve-se a um conjunto de fatores, entre eles o uso de hormônios, como o estrógeno e a exposição a produtos químicos, entre eles o Bisfenol A (BPA). Apesar da introdução de tratamentos mais efetivos para o câncer de mama, muitas vezes ocorre recorrência e/ou crescimento do tumor, invasão e metástase. As “células-tronco tumorais” (CTTs) vem sendo estudadas em tumores humanos nos últimos anos, consideradas as responsáveis pela recorrência do tumor e resistência a terapias. Devido ao determinante papel das CTTs, é importante a identificação de fatores que controlam sua proliferação. Estudos identificaram o fator de transcrição *OCT4* (*octamer-binding transcription factor 4*), como um dos responsáveis pela auto-renovação e manutenção da pluripotência das células-tronco. Dessa forma, o estudo de potenciais fármacos que atuem sobre esta população específica no câncer de mama tem especial interesse. A melatonina, parece apresentar efeitos oncostáticos no entanto, pouco se sabe sob sua ação terapêutica sobre as células-tronco tumorais mamárias. Dessa forma, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da melatonina sobre a regulação do marcador de células-tronco *OCT4* pelo receptor de estrógeno em células-tronco tumorais mamárias, após o tratamento com estrógeno e bisfenol A. Para o estudo, as células de câncer de mama humano MCF-7 e MDA-MB-231 foram submetidas ao cultivo tridimensional de mamóferas, representando as células-tronco. As CTTs foram cultivadas em suspensão celular ou em crescimento independente de ancoragem. Simultaneamente, as mamóferas foram tratadas com 1 mM melatonina, 10 nM estrógeno e/ou com 10 µM bisfenol A. Ao final, foi avaliado o efeito da melatonina, estrógeno e bisfenol A sobre o crescimento celular, através da contagem do número de células, mensuração do tamanho das mamóferas e por meio do ensaio de viabilidade celular MTT. Além disso, a expressão gênica e proteica do *OCT4* e do receptor de estrógeno (RE) foi avaliada por PCR em tempo real, western blotting e imunocitoquímica, respectivamente. Foi avaliada também a ligação do receptor de estrógeno ao gene *OCT4* através do Ensaio de Imunoprecipitação da Cromatina (ChIP). Foi observado que o aumento no número e no tamanho das mamóferas induzidos pelo estrógeno ou BPA foi reduzido pelo tratamento com melatonina ($P < 0,05$). Além disso, a ligação do receptor de estrógeno ao gene *OCT4* foi reduzida, acompanhada por uma

redução na expressão do OCT4 e do receptor de estrógeno ($P < 0,05$). Nossos resultados demonstram que a melatonina é eficaz no controle da proliferação das células-tronco tumorais mamárias *in vitro*, atuando na via do receptor de estrógeno, demonstrando seu potencial uso terapêutico no câncer de mama.

Palavras-chave: Câncer de mama. Células-tronco tumorais. *POU5F1*. Melatonina. Bisfenol A. Estrógeno. Esferóides.

Abstract

ABSTRACT

Breast neoplasms are the most frequent tumors in women worldwide. The high incidence of this tumor type is due to a number of factors, including the use of hormones such as estrogen and exposure to chemicals, including bisphenol A (BPA). Despite the introduction of more effective treatments for breast cancer often occurs recurrence and/or tumor growth, invasion and metastasis. Recently, it was discovered the existence of "cancer stem cells" (CSCs) in human tumors, being responsible for tumor recurrence and resistance to therapy. Due to the important role of CSCs, the identification of factors that control its proliferation is important. Studies have identified the transcription factor OCT4 (octamer-binding transcription factor 4), as the one responsible for self-renewal and maintenance of pluripotency of stem cells. Thus, it has become interesting the study of potential drugs that target this specific population in breast cancer. Melatonin, seems to have oncostatic effects, however, little is known about its therapeutic action on breast cancer stem cells. Thus, the aim of this study was to evaluate the effect of melatonin on the regulation of the stem cell marker, OCT4, by the estrogen receptor in breast cancer stem cells, after treatment with estrogen and bisphenol A. For the study, human breast cancer cells MCF-7 and MDA-MB-231 cells were submitted to three dimensional growth of mammospheres, representing the stem cells. The CSCs were grown in cell suspension or anchorage independent growth. Simultaneously, mammospheres were treated with 1 mM melatonin, 10 nM estrogen and/or 10 μ M bisphenol A. In the end, it was evaluated the effects of melatonin, estrogen and bisphenol A on cell growth by counting the number of cells, measuring the size of mammospheres and by the MTT cell viability assay. Furthermore, the gene and protein expression of OCT4 and estrogen receptor (ER) was evaluated by real time PCR, western blotting and immunocytochemistry, respectively. It was also evaluated the binding of ER to OCT4 by Chromatin Immunoprecipitation Assay (ChIP). It was observed that the increase in the number and size of mammospheres induced by estrogen and/or BPA was reduced by melatonin treatment ($P < 0.05$). Furthermore, binding of the ER to OCT4 gene was reduced, accompanied by a reduction in expression of OCT4 and ER ($P < 0,05$). Our results demonstrate that melatonin is effective in controlling the proliferation of breast cancer stem cells in vitro, acting on

estrogen receptor pathway, demonstrating their potential therapeutic use in breast cancer.

Keywords: *Breast neoplasms. Neoplastic stem cells. POU5F1. Melatonin. Bisphenol A. Estroge. spheroids.*

I. INTRODUÇÃO

1. CÂNCER DE MAMA

Dados do IARC (Agência Internacional de Pesquisa no Câncer) estimam 14 milhões de novos casos de câncer no mundo para este ano (Iarc, 2016). O câncer de mama é o mais comum em mulheres no mundo e no Brasil, ficando atrás apenas do câncer de pele não melanoma, sendo responsável por cerca de 25% dos novos casos de câncer por ano. Em homens, o câncer de mama é raro, representando apenas 1% dos casos de câncer. Dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA) estimam 57.960 novos casos de câncer de mama em mulheres para este ano (Inca, 2016). Apesar de o câncer de mama ser mais incidente em países ricos, a maioria das mortes ocorre em países em desenvolvimento (69% de todas as mortes por câncer de mama) (Who, 2008). Isso se deve à diferença no acesso ao sistema de saúde com repercussão no diagnóstico precoce e tratamento adequado da doença (Ferlay *et al.*, 2010). As taxas de incidência da doença variam entre as regiões do Brasil (**Figura 1**).

A taxa de mortalidade por câncer de mama também é elevada, e representa a principal causa de morte por câncer na população feminina brasileira (Inca, 2016). No Brasil, este tipo tumoral é o que mais causa mortes entre as mulheres desde 1979 (Inca, 2003). Em 2013, 14.206 mulheres vieram a óbito devido a doença. Na população mundial, a sobrevida média das pacientes após cinco anos de acompanhamento é de 61% e, apesar do progresso no diagnóstico e tratamento nos últimos 30 anos, essa doença é ainda responsável por quase meio milhão de mortes por ano no mundo (Snoussi *et al.*, 2010).

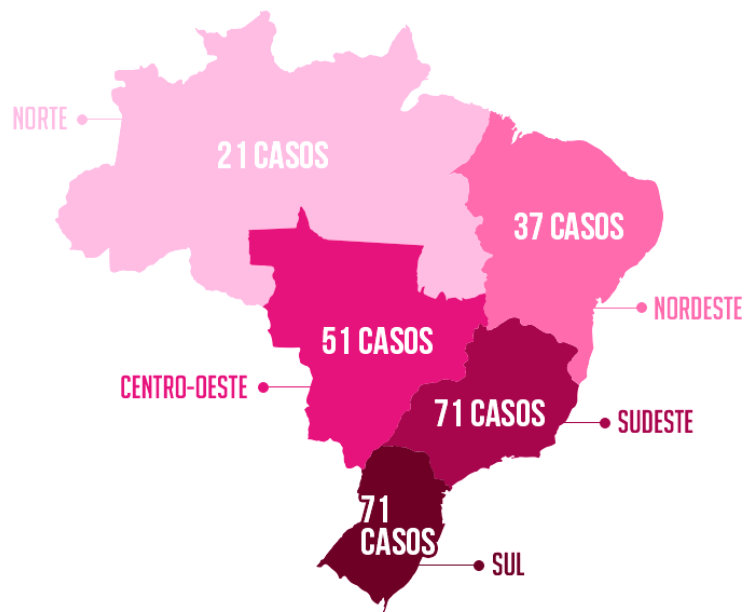


Figura 1. Representação espacial das taxas de incidência de câncer de Mama no Brasil. Casos de câncer de mama divididos de acordo com as regiões do Brasil com base em um grupo de 100 mil mulheres no ano de 2014 (Inca, 2014).

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 (Pedersen *et al.*, 2004). Além dos fatores clínico-patológicos, o conhecimento das características moleculares dos tumores tem contribuído para a avaliação mais precisa do prognóstico, e no desenvolvimento e incorporação de novos agentes e estratégias terapêuticas (Gonzalez-Angulo, Morales-Vasquez e Hortobagyi, 2007; Ozols *et al.*, 2007; Hicks e Kulkarni, 2008); Duffy, O'donovan e Crown, 2011). 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 (Hsiao *et al.*, 2010).

O câncer de mama pode ser classificado em dois grupos, de acordo com a expressão do receptor de estrógeno (RE): aqueles que expressam o receptor de estrógeno chamados RE-positivo e os que não expressam, RE-negativo (Renoir, Marsaud e Lazennec, 2013). Tumores RE-positivos usam o hormônio estradiol como

seu principal estímulo para crescimento, sendo portanto o RE, o alvo direto das terapias endócrinas. Aproximadamente 80% dos tumores de mama são classificados como RE-positivo e essa positividade correlaciona-se com melhor prognóstico e maior capacidade de resposta à terapias (Dowsett *et al.*, 2013). Pacientes com tumores RE positivos podem ser tratados com antagonistas desse receptor, como por exemplo o tamoxifeno (**Figura 2**). Porém, tumores triplo-receptor-negativos (RE-, RP- e HER2/neu-) apresentam pior prognóstico, uma vez que não respondem a tratamentos específicos, relacionando-se a ocorrência de metástases e menor sobrevida das pacientes (Fernandes *et al.*, 2009) (**Figura 2**).

Portanto, a expressão do receptor de estrógeno (RE) é sem dúvida um importante biomarcador em câncer de mama, pois ele fornece o índice de sensibilidade ao tratamento endócrino.

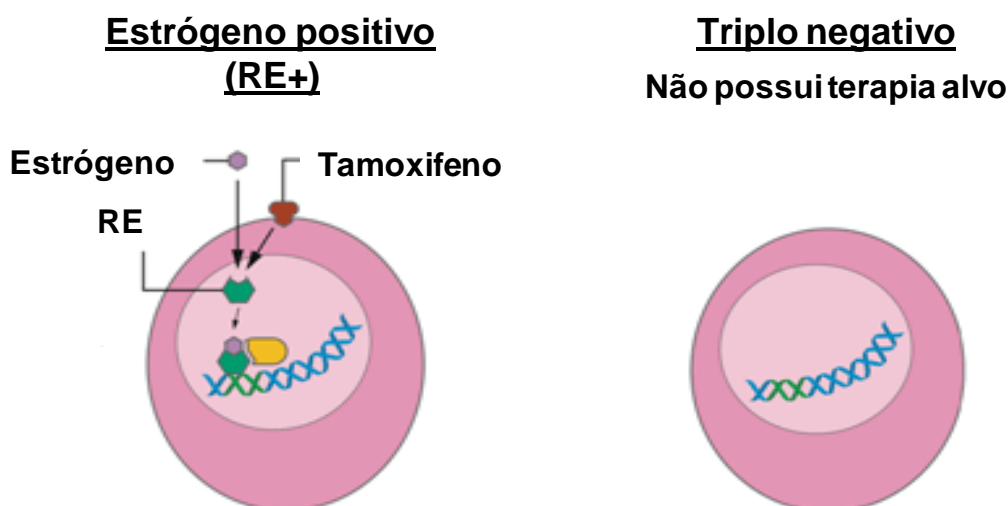


Figura 2. Representação gráfica de tumores receptor de estrógeno positivo (RE+) e triplo negativo (RE-, RP- e HER2/neu-). Características moleculares dos tumores mamários que foram incorporados à rotina clínica e permitem que se estabeleça um tratamento individualizado. Tumores que expressam o receptor de estrógeno podem ser tratados com antagonistas do receptor de estrógeno, como o tamoxifeno. Tumores triplo negativos, não apresentam expressão do HER-2/neu, e receptor de estrogênio e progesterona, e, portanto, não possuem terapia alvo. Adaptado de Kleinsmith *et al.* (2005).

2. ESTRÓGENO E CÂNCER DE MAMA

Os hormônios esteroides possuem um papel muito importante no desenvolvimento da glândula mamária e na tumorigênese, agindo através de receptores nucleares localizados nas células alvo (Zanetti, Oliveira e Ribeiro-Silva, 2011). O estrógeno é um hormônio esteroide lipofílico que atravessa livremente a membrana plasmática (Cremoux, 2011).

Este hormônio possui dois tipos de receptores denominados RE α e RE β . Os receptores, RE α e RE β , pertencem a uma superfamília de receptores nucleares que regulam o crescimento, diferenciação e homeostase em células eucariotas (Hanstein *et al.*, 2004). Embora sejam codificados por genes localizados em diferentes cromossomos, os dois tipos de REs apresentam um elevado grau de homologia tanto ao nível da sequência de aminoácidos que os constitui, como ao nível das suas estruturas tridimensionais (Acconcia e Marino, 2011). Os RE α e β apresentam concentrações variáveis em diferentes tecidos. O RE α é expresso no aparelho reprodutivo (ovários, mamas e útero), sistema nervoso central (SNC), fígado e próstata, enquanto que o RE β é expresso nos ossos, endotélio, pulmões, SNC, próstata, ovários, e tecido urogenital (Maximov, Lee e Jordan, 2013; Kuiper *et al.*, 1997).

Além disso, o estrógeno tem diversos efeitos celulares e pode atuar por meio de duas vias no câncer de mama denominadas via dependente de RE (RE-dependente) e via independente de RE (RE-independente) (Renoir, Marsaud e Lazennek, 2013).

Na via independente de RE, o estrógeno pode ser metabolizado no citoplasma, resultando na produção de espécies reativas de oxigênio, causando o estresse oxidativo (Jung *et al.*, 2011).

Na via dependente de RE, o estrógeno se liga ao seu receptor formando o complexo estrógeno-RE. Esta ligação hormônio-receptor acarreta uma alteração na forma do RE, levando à dissociação das proteínas chaperonas de choque térmico (*heat shock protein* 90 kD - hsp 90) e consequentemente ativando o receptor (Maximov, Lee e Jordan, 2013). Uma vez que o RE foi ativado, ele interage com sequências específicas do DNA chamadas de elemento de resposta ao estrógeno (ERE) (Nagarajan *et al.*, 2014). Acoplados ao ERE, os dímeros do complexo estrógeno-RE ligam-se à proteínas co-reguladoras, que modulam a transcrição dos genes. A partir daí são produzidas moléculas de RNA mensageiro, levando à síntese de proteínas específicas, as quais irão influenciar o comportamento celular dependendo do tipo de célula envolvida (Nagarajan

et al., 2014) (**Figura 3**). Esta via é normalmente inibida por drogas que atuam na interferência da ligação ao receptor (tamoxifeno), bloqueio da biossíntese de estrógeno (inibidores de aromatase) ou “downregulation” – redução do número e/ou da afinidade dos receptores de estrógeno (fulvestrant) (Filipits *et al.*, 2014).

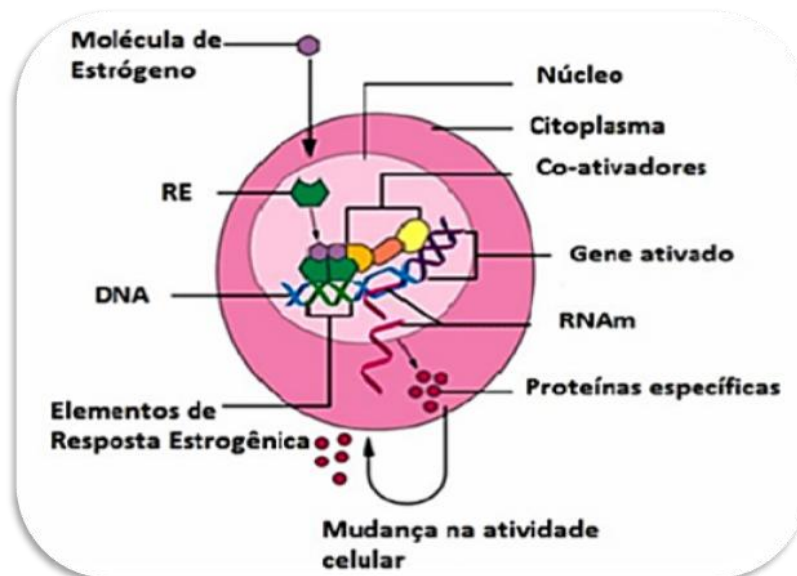


Figura 3. Mecanismo de ação do estrógeno nas células receptoras de estrógeno positivo. O estrógeno se liga ao seu receptor formando o complexo estrógeno-RE. Esta ligação hormônio-receptor acarreta uma alteração na forma do RE, levando à dissociação das proteínas chaperonas de choque térmico (*heat shock protein 90 kD - hsp 90*) e consequentemente ativando o receptor. Uma vez que o RE foi ativado, ele interage com sequências específicas do DNA chamadas de elemento de resposta ao estrógeno (ERE). Acoplados ao ERE, os dímeros do complexo estrógeno-RE ligam-se à proteínas co-reguladoras, que modulam a transcrição dos genes. A partir daí são produzidas moléculas de RNA mensageiro, levando à síntese de proteínas específicas, as quais irão influenciar o comportamento celular dependendo do tipo de célula envolvida. Adaptado de Kleinsmith *et al.* (2005).

O estrógeno pode ser classificado em termos de origem como natural e sintético, sendo que os naturais podem se apresentar na forma de estrona (E1), estradiol (E2) e estriol (E3). Entre estes, o estradiol é o estrógeno natural biologicamente mais ativo (Królik e Milnerowicz, 2012).

A exposição ao estrógeno tem sido fortemente ligada ao risco de câncer de mama. Mulheres submetidas a terapia de reposição hormonal com estrógeno se mostraram mais suscetíveis a desenvolver tumores mamários, comprovando a relação

entre o estrogênio e o câncer de mama (Li *et al.*, 2014; Bakken *et al.*, 2004; Colditz, 2005; Beral e Collaborators, 2003; Chlebowski *et al.*, 2003; Rossouw *et al.*, 2002). Da mesma forma, altos níveis de estrogênio no sangue de mulheres na pós-menopausa estão associados com um aumento no risco de câncer de mama (Friel, Hinchcliffe e Wright, 2005; Key e Allen, 2002).

Sugere-se que o estrogênio atue na iniciação e progressão do câncer de mama aumentando a taxa de proliferação celular (Lapensee *et al.*, 2010). Em seu papel como estimulador da proliferação celular, o estrogênio pode afetar os níveis de acetilação dos oncogenes Bcl-2 e Bcl-xl, aumentando a expressão dos mesmos, e conseqüentemente acelerando a proliferação celular e inibindo a apoptose (Ye *et al.*, 2014). O crescimento dos carcinomas de mama é regulado pelo estrogênio (Eisenberg e Koifman, 2001).

O estrogênio estimula o RE, controlando a taxa de divisão celular. As células em divisão estão mais suscetíveis à mutações genéticas durante a replicação do DNA, e as mutações assim produzidas, podem futuramente conduzir ao desenvolvimento do tumor (Russo e Russo, 2006).

3. DISRUPTORES ENDÓCRINOS

Muitos produtos químicos podem interferir no sistema endócrino e por isso são chamados de disruptores endócrinos. Entre estas substâncias podemos destacar o produto químico industrial bisfenol A ou BPA. A exposição a este produto químico pode mimetizar as funções biológicas do estrogênio, podendo contribuir para a iniciação ou progressão do câncer (Rezg *et al.*, 2014).

O bisfenol A é uma substância sólida, branca, cristalina, com um peso molecular de 228,29 g/mol (Michałowicz, 2014). Este composto é sintetizado pela condensação da acetona (de onde provém o sufixo A no final do nome) com dois equivalentes de fenol. A reação é catalisada por um ácido, como o ácido clorídrico (HCl) (Bernardo *et al.*, 2015) (**Figura 4**).

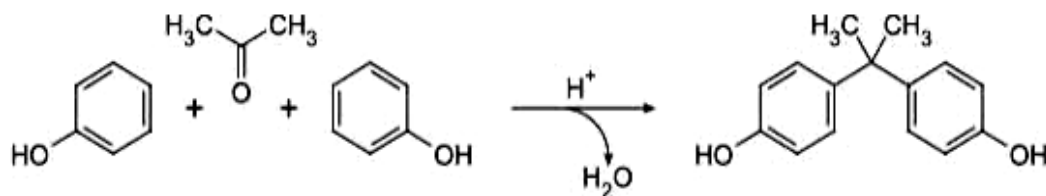


Figura 4. Representação da síntese do Bisfenol A (BPA). O Bisfenol A é sintetizado pela condensação da acetona (de onde provém o sufixo A no final do nome) com dois equivalentes de fenol. A reação é catalisada por um ácido, como o ácido clorídrico (HCl) (Bernardo *et al.*, 2015)

O BPA é um monômero de plástico de policarbonato, muito utilizado na produção comercial. Este composto pode ser encontrado no plástico de garrafas PET, mamadeiras, embalagens de alimentos, em vernizes utilizados para revestimentos de embalagens metálicas de alimentos, garrações retornáveis de água mineral, e também, na área farmacêutica em resinas de implantes médicos e dentários (Gutman e Shoenfeld, 2015).

Nos anos 1970, surgiram as primeiras suspeitas sobre os malefícios do uso do Bisfenol A nos objetos de uso cotidiano (Vogel, 2009). A descoberta de que o bisfenol A poderia ser liberado a partir de recipientes de policarbonato foi feita acidentalmente, quando se verificou que recipientes autoclavados liberavam um composto com propriedades estrogênicas (Krishnan *et al.*, 1993).

Recipientes que apresentam BPA em sua composição, quando aquecidos, liberam este produto tóxico para os alimentos ou bebidas e quando ingerido pode provocar uma série de alterações no metabolismo humano, favorecendo, por exemplo, o desenvolvimento de alguns tipos de câncer (Rezg *et al.*, 2014).

A partir disto, por precaução, alguns países, inclusive o Brasil, optaram por proibir a importação e fabricação de mamadeiras que contenham Bisfenol A, considerando a maior exposição e susceptibilidade dos indivíduos usuários deste produto (Anvisa, 2010). Assim, mamadeiras em policarbonato não podem ser comercializadas no Brasil. Para as demais aplicações, o BPA ainda é permitido, mas a legislação estabelece limite máximo desta substância, que foi definido com base nos resultados de estudos toxicológicos (Anvisa, 2010).

O Bisfenol A age mimetizando o papel do estrógeno na ligação ao seu receptor (RE), ativando a transcrição de genes responsáveis pelo aumento da proliferação de células de câncer de mama (La Rosa *et al.*, 2014) (**Figura 5**). Dessa forma, supõe-se a

participação deste composto na iniciação e progressão do câncer de mama (Lapensee *et al.*, 2010). Entretanto, não é totalmente compreendido como este composto promove carcinogênese mamária.

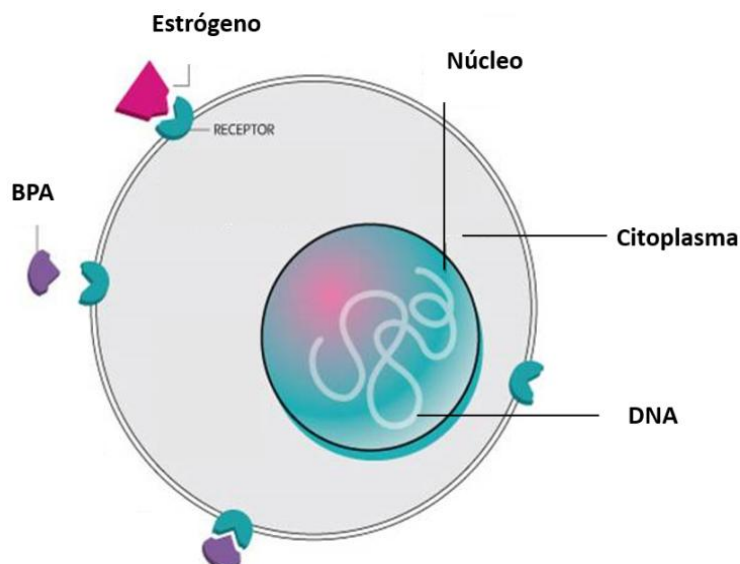


Figura 5. Representação do mecanismo de ação do Bisfenol A (BPA). O Bisfenol A age mimetizando o papel do estrógeno na ligação ao seu receptor (RE), ativando a transcrição de genes responsáveis pelo aumento da proliferação de células de câncer de mama. Adaptado de Mittelstaedt (2010).

4. CÉLULAS-TRONCO TUMORAIS

Existem evidências que muitos cânceres se organizam de maneira hierárquica, com raras células-tronco cancerosas no topo da hierarquia responsável pela manutenção da população de células no tumor (Alberts, Bray e Lewis, 2011).

Normalmente, entre uma célula-tronco e sua progênie totalmente diferenciada existe uma população intermediária conhecida como células amplificadoras transitórias, “transitórias” porque estão em trânsito entre o caráter células-tronco e o caráter diferenciado; “amplificadoras” porque os ciclos de divisão pelos quais estas células passam têm o efeito de amplificar o número da progênie diferenciada que resulta de uma única divisão de células-tronco. A presença destas células amplificadoras transitórias também explica como um tecido pode manter uma produção elevada de células diferenciadas a partir de um pequeno número de células-tronco. Como,

normalmente, as células-tronco possuem um ciclo celular lento, muitas das células em divisão em um determinado tecido são células amplificadoras transitórias, que estão destinadas a se diferenciar após um determinado número de divisões. Desse modo, a capacidade de divisão celular não é por si mesma, um indicador da condição de células-tronco (Alberts, Bray e Lewis, 2011).

As células-tronco apresentam algumas características que indicam tratar-se de uma célula indiferenciada como: a atividade aumentada de fosfatase alcalina, a expressão do fator de transcrição OCT4, alta atividade da telomerase e a presença de uma variedade de marcadores celulares, como os fatores de transcrição SOX2 e NANOG (Donovan e Gearhart, 2001).

Os tumores podem se originar de células-tronco de tecidos normais, que gradualmente acumulam mutações e modificações epigenéticas responsáveis pelo comportamento maligno do câncer ou podem surgir a partir de células mais diferenciadas, como as células amplificadoras transitórias, que sofreram mutações ou alterações epigenéticas que lhe conferiram características de células-tronco (Alberts, Bray e Lewis, 2011) (**Figura 6**).

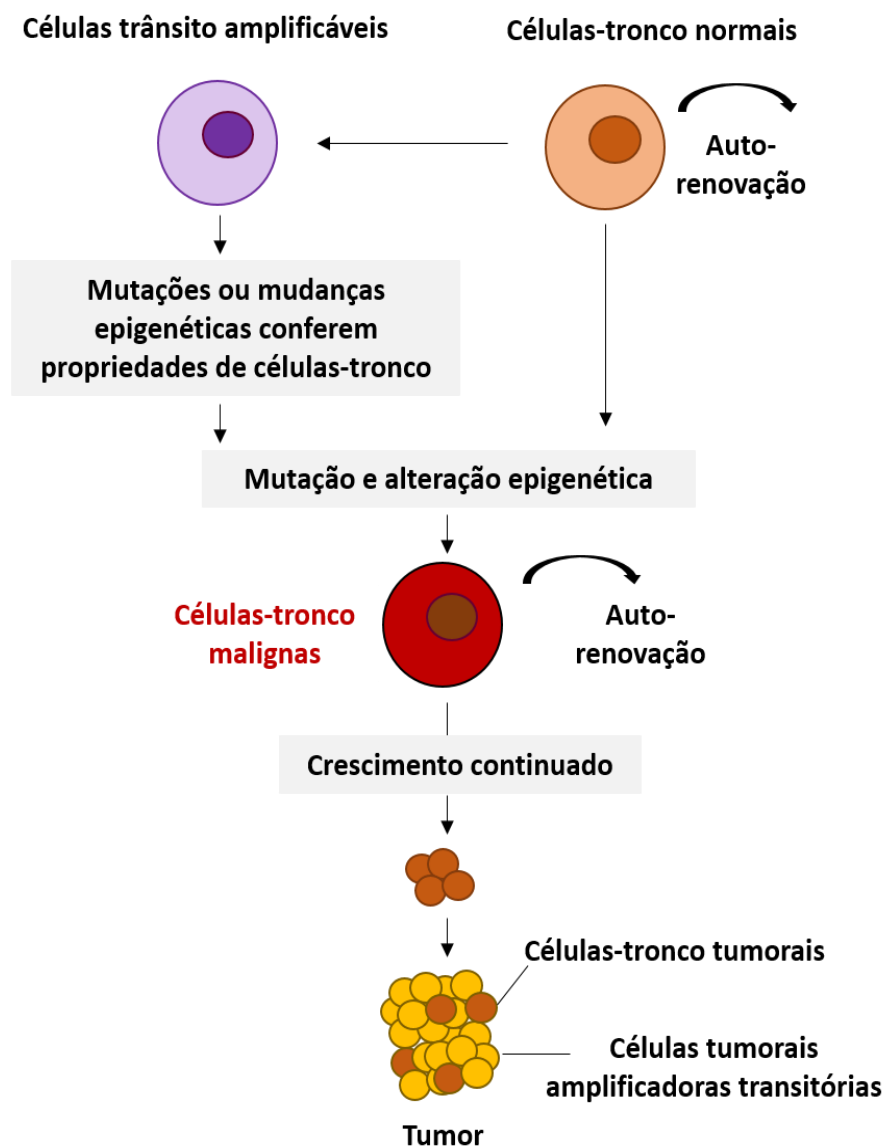


Figura 6. Representação do surgimento do tumor a partir de células-tronco normais e células transitórias amplificáveis. Os tumores podem se originar de células-tronco de tecidos normais, que gradualmente acumulam mutações e modificações epigenéticas responsáveis pelo comportamento maligno do câncer ou podem surgir a partir de células mais diferenciadas, como as células amplificadoras transitórias, que sofreram mutações ou alterações epigenéticas que lhe conferiram características de células-tronco. Adaptado de Alberts, Bray e Lewis (2011).

As células-tronco tumorais, foram inicialmente identificadas na leucemia mielóide aguda humana por Bonnet e Dick (1997), neste estudo os autores verificaram que um pequeno grupo de células tumorais foi capaz de se replicar facilmente *in vitro*, enquanto o mesmo não ocorreu com o restante das células leucêmicas. Posteriormente,

as células-tronco tumorais foram descritas em tumores sólidos, incluindo câncer de mama, cérebro, cólon e outros tipos de tumor (Huang *et al.*, 2015; Al-Hajj *et al.*, 2003; Singh *et al.*, 2004; Ricci-Vitiani *et al.*, 2007).

As células-tronco tumorais, também chamadas de células iniciadoras do tumor, constituem uma fração distinta dentro da massa tumoral e apresentam capacidade de auto-renovação do tumor, recidiva, manutenção da pluripotência, metástase e resistência ao tratamento terapêutico em vários tipos de neoplasias, incluindo câncer de mama (Chen *et al.*, 2015).

A resistência das células-tronco tumorais ao tratamento quimioterápico é baseada na hipótese de que estas células tem características intrínsecas únicas, incluindo a capacidade em reparar danos no DNA; presença de bombas de efluxo que permitem que excluam corantes (as células-tronco são fracamente fluorescentes porque possuem na membrana plasmática uma proteína de transporte tipo ABC (*ATP binding cassette*) responsável pelo bombeamento do corante para fora da célula); atividade proliferativa relativamente baixa e altos níveis de proteínas anti-apoptóticas; além da presença da Aldeído desidrogenase (ALDH), que metaboliza os fármacos quimioterápicos como a ciclofosfamida; e os fatores angiogênicos que ajudam a manter o nicho das células-tronco (Bozorgi, Khazaei e Khazaei, 2015).

As células-tronco do câncer apresentam marcadores de superfície, pelos quais podem ser diferenciadas das células não tronco (Torres *et al.*, 2015). Células do câncer de mama com fenótipo de superfície $CD44^+/CD24^{low/-}$ apresentam propriedades iniciadoras de tumor com características de pluripotência e capacidade invasiva. A transição de um fenótipo epitelial ($CD44^+/CD24^+$) para um fenótipo mesenquimal ($CD44^+/CD24^{low/-}$) capacita a célula a mover-se do tumor primário ao sítio metastático (Mani *et al.*, 2008). Em estudo realizado Ponti *et al.* (2005), os autores verificaram que as células de linhagem primária humana de câncer de mama apresentavam o fenótipo $CD44^+/CD24^{low/-}$ e expressavam o fator transcricional OCT4.

As CTTs quando separadas do restante da população *in vitro*, se arranjam em pequenos agregados denominados de mamosferas, os quais tem se mostrado muito mais resistentes aos tratamentos quimioterápicos e radioterápicos (Calcagno *et al.*, 2010).

Devido ao importante papel das células-tronco na recorrência do câncer e na resistência às drogas, a identificação dos reguladores extrínsecos e intrínsecos, que controlam a sua proliferação e diferenciação é de fundamental importância.

5. OCT4

O OCT4 (*octamer-binding transcription factor 4*), é um fator de transcrição também conhecido como OCT3, OCT3/4, OTF3 ou NF-A3, e é codificado pelo gene POU5F1 (Família POU, classe 5, fator de transcrição 1) (Zeineddine *et al.*, 2014).

Este fator de transcrição foi descoberto em 1990, e está expresso em células-tronco embrionárias, células germinativas e células-tronco adultas (Seymour, Nowak e Kakulas, 2015; Curry *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2015).

O OCT4 é um dos fatores responsável pela auto-renovação e manutenção da pluripotência das células-tronco (Gerrard *et al.*, 2005).

Além de atuar como um regulador essencial da pluripotência das células-tronco, a expressão do OCT4 permite que as células permaneçam no estágio indiferenciado, podendo se multiplicar infinitamente sem que ocorra a diferenciação. No entanto, a diminuição da expressão deste fator de transcrição resulta em diferenciação das células-tronco, e por consequência, gera a perda de pluripotência (Hammachi *et al.*, 2012) (**Figura 7**).

A re-expressão do gene *OCT4* em células de câncer pode ter um importante papel na carcinogênese, além de fornecer um possível mecanismo pelo qual células cancerosas adquirem ou mantêm o fenótipo de resistência à drogas. Linn *et al.* (2010) relacionaram a superexpressão do gene *OCT4* com a resistência a drogas em linhagem de câncer de próstata. Além disso, a superexpressão desse gene estava acompanhada da ativação de um conjunto de seus genes alvos, incluindo os fatores de transcrição envolvidos na auto-renovação das células-tronco, SOX2 e NANOG.

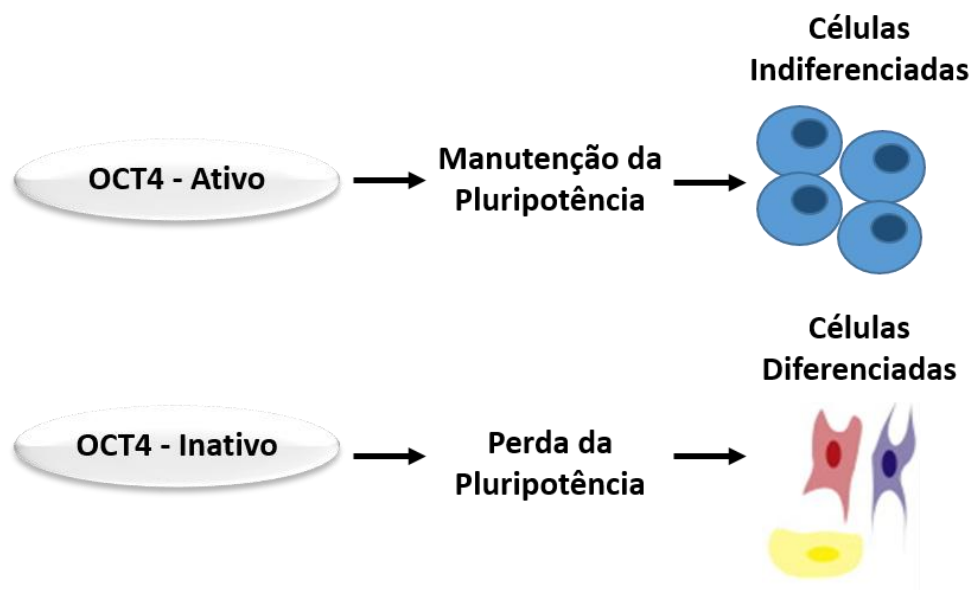


Figura 7. Função do OCT4 como regulador da pluripotência das células-tronco. A expressão do OCT4 permite que as células permaneçam no estágio indiferenciado, podendo se multiplicar infinitamente sem que ocorra a diferenciação. No entanto, a diminuição da expressão deste fator de transcrição resulta em diferenciação das células-tronco, e por consequência, gera a perda de pluripotência. Adaptado de Hammachi *et al.* (2012).

Uma vez que trabalhos recentes indicam que o câncer de mama é principalmente agravado pela resistência a terapias devido a presença das células-tronco tumorais e que a cura da doença requer a eliminação dessas células, tornam-se interessantes estudos que visem verificar a ação de novas drogas contra as células-tronco de câncer.

6. MELATONINA

6.1. Síntese e degradação

A melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina), é um hormônio produzido e secretado principalmente pela glândula pineal, mas também é sintetizado em menor quantidade na retina, pele, trato gastrointestinal, células-tronco e linfócitos (Acuña-Castroviejo *et al.*, 2014). A melatonina possui diversas funções fisiológicas, dentre as quais se destaca a cronobiológica. Esse hormônio é considerado um “tradutor neuroendócrino” do ciclo circadiano, controlando os padrões secretórios de diversas substâncias, como o cortisol e adrenalina, atuando sobre os ciclos de atividade-reposo

e vigília-sono (Maganhin *et al.*, 2008). Além disso, a melatonina atua sobre o sistema reprodutor, cardiovascular, sistema imunológico, crescimento e envelhecimento (Maganhin *et al.*, 2008).

Sua produção segue um padrão rítmico, com pico secretório no período noturno, atingindo níveis plasmáticos máximos entre 03:00 e 04:00 horas em humanos, e quase nenhuma produção no período diurno (Espino, Pariente e Rodríguez, 2012). É sintetizada 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 hidroxil-indol-O-metiltransferase (HIOMT) (Al-Omary, 2013) (**Figura 8**).

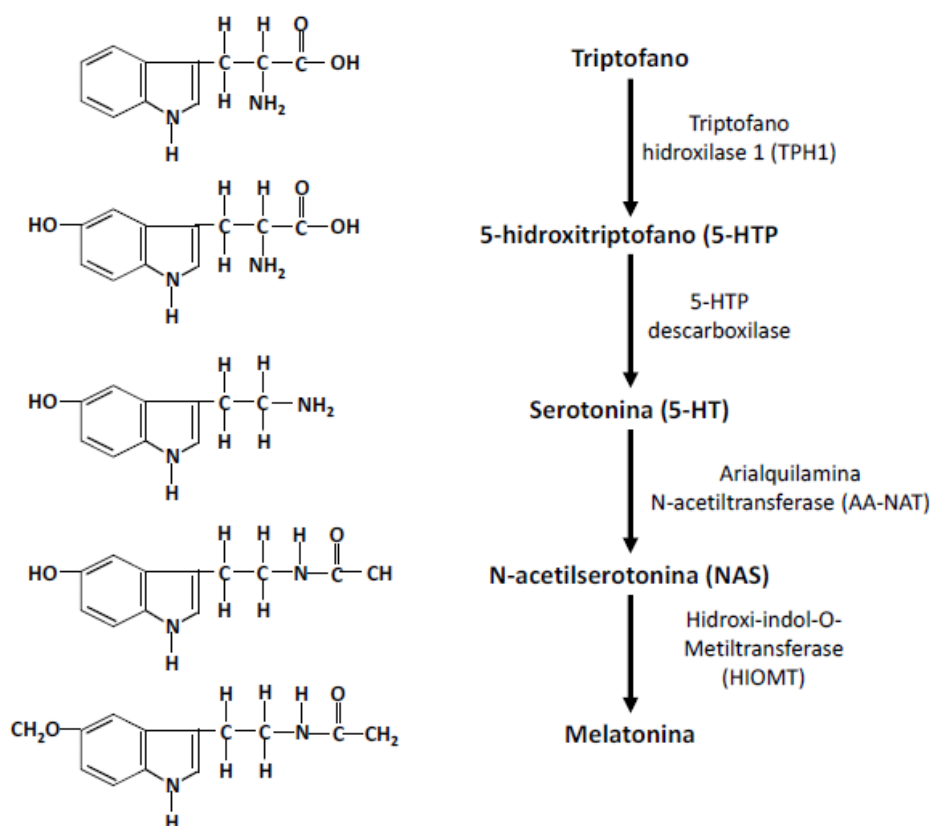


Figura 8. Esquema representativo da via de síntese da melatonina. Início na conversão do aminoácido triptofano até o último passo para a formação de melatonina pela enzima hidroxil-indol-O-metiltransferase (HIOMT). Adaptado de Al-Omary (2013).

A enzima AA-NAT apresenta um ritmo diário, atingindo concentrações 100 vezes superiores na fase escura, quando comparado à fase clara. 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 (Bilu e Kronfeld-Schor, 2013). Sua degradação ocorre principalmente no fígado, envolvendo a hidroxilação em 6-hidroxi-melatonina [6(OH)M], seguida dos processos de sulfatação ou glicuronidação, e posterior excreção na urina (Facciolá *et al.*, 2001).

6.2. Receptores da melatonina

Os mecanismos de ação da melatonina incluem a ligação a receptores localizados na membrana plasmática, ligação a proteínas intracelulares, como a calmodulina, interações com receptores nucleares e atividade oxidante (Jablonska *et al.*, 2013).

A melatonina pode ligar-se e ativar os receptores de membrana MT1 e MT2 em uma variedade de tecidos (Hill *et al.*, 2009). Receptores MT1 pertencem a superfamília de receptores acoplados à proteína G e, quando mediados à subunidade G, os receptores MT1 inibem a atividade da adenil-ciclase, diminuindo a produção de adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (cAMP), tornando possível controlar a atividade das proteínas quinases (PKC, PKA, MAPK), bem como a expressão de genes específicos, envolvidos nos processos de proliferação, angiogênese, migração e diferenciação celulares (Jablonska *et al.*, 2013). Um terceiro receptor com menor afinidade pela melatonina é denominado MT3 e sua ativação ainda não possui papel fisiológico definido, no entanto apresenta 95 % de homologia com a enzima quinona redutase II, envolvida na detoxificação de radicais livres (Foster *et al.*, 2000).

A melatonina também pode atuar por mecanismos independentes de seus receptores de membrana, exercendo atividade antioxidante diretamente na redução de radicais livres ou pelo aumento de enzimas antioxidantes. Ainda, por ser lipossolúvel, a melatonina pode atravessar diretamente a membrana plasmática e interagir com proteínas intracelulares, como a calmodulina, e com receptores nucleares RZR/ROR (receptor Z para retinóide/receptor órfão para retinóide). Apesar dessa capacidade de interação ainda ser controversa, a ligação da melatonina com receptores nucleares

explica muitas de suas funções, inclusive relacionadas à alteração de genes envolvidos na proliferação celular e apoptose (Sánchez-Barceló *et al.*, 2003).

Uma vez produzida, a melatonina, por ser altamente lipossolúvel, difunde-se para a corrente sanguínea e posteriormente para órgãos distantes bem como do fluído cerebrospinal para o hipotálamo e sistema nervoso central (Proietti *et al.*, 2013).

6.3. Melatonina e câncer

Além de estar envolvida em muitas funções fisiológicas, a melatonina tem um importante papel em processos patológicos, incluindo o câncer. Os primeiros indícios de que a melatonina poderia ser útil na terapêutica oncológica surgiram em um estudo realizado por (Cohen, Lippman e Chabner, 1978). Os autores propuseram que a diminuição da função da glândula pineal poderia aumentar o risco de desenvolvimento do câncer de mama, sugerindo que a ausência da síntese de melatonina poderia induzir a exposição prolongada ao estrógeno resultando no desenvolvimento do tumor mamário.

Com base nesta teoria, outros estudos demonstraram que a melatonina exerce o seu efeito oncostático através de propriedades antiestrogênicas (Cos *et al.*, 2014; Del Río *et al.*, 2004). No câncer de mama, a ação da melatonina é principalmente descrita em tumores RE α -positivos, uma vez que pode interagir com a via de sinalização do estrógeno, com maior relevância em tumores de mama (Cos *et al.*, 2014). Alguns estudos demonstraram que a melatonina atuou diminuindo a transcrição do gene *RE* em células MCF-7, inibindo a ligação do complexo RE-Estrógeno ao Elemento de Resposta de Estrógeno (ERE) no DNA (Del Río *et al.*, 2004; Lawson *et al.*, 1992; Molis, Spriggs e Hill, 1994) (**Figura 9**).

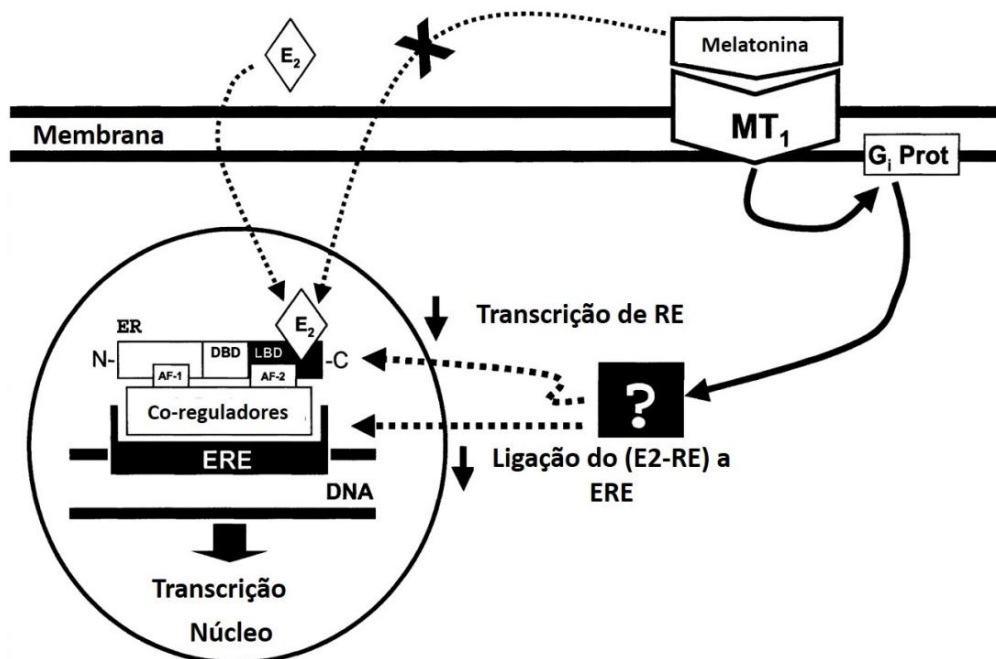


Figura 9. Mecanismo dos efeitos antiestrogênicos da melatonina. A melatonina atua inibindo a ligação do complexo Receptor de Estrógeno-Estrógeno ao Elemento de Resposta de Estrógeno (ERE) no DNA, e consequentemente diminuindo a transcrição do Receptor de Estrógeno. Adaptado de Sánchez-Barceló *et al.* (2003).

Em 1981, Bartsch *et al.* demonstraram que as concentrações de melatonina são diminuídas em pacientes com câncer de mama. Desde então, diversas pesquisas confirmaram que os pacientes com câncer de mama estabelecido têm níveis mais baixos de melatonina mensurável (Bartsch *et al.*, 1981).

Estudos epidemiológicos têm revelado elevado risco de câncer de mama em sociedades industrializadas, sendo que o risco aumenta em mulheres com trabalho noturno com consequente falta de exposição à luz e bloqueio da síntese de melatonina (Proietti *et al.*, 2013). Na década de 90 alguns estudos clínicos foram realizados, demonstrando que a utilização da melatonina, em conjunto com terapias convencionais, apresenta efeitos benéficos em diferentes tipos de tumores avançados intratáveis ou em pacientes com câncer metastático, quer seja aumentando a eficácia do tratamento, ou diminuindo os efeitos colaterais contribuindo com a melhora da qualidade de vida desses pacientes (Lissoni *et al.*, 1992).

Desde então, têm sido demonstrado que a melatonina inibe o desenvolvimento e a progressão de diferentes tipos de câncer, e muitos mecanismos de ação estão sendo investigados (Di Bella *et al.*, 2013).

Diversos mecanismos de ação da melatonina têm sido propostos, incluindo controle do ciclo celular, pró-apoptótica e anti-proliferativa e indutora da 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 (Mediavilla *et al.*, 2010; Di Bella *et al.*, 2013; Proietti *et al.*, 2013).

No entanto, pouco se sabe quanto a influência do tratamento com melatonina na via do receptor de estrógeno mediada pelo *OCT4* em células-tronco tumorais, sendo que existe apenas um estudo descrito na literatura (Yoo *et al.*, 2011) e nenhum para o câncer de mama.

Yoo *et al.* (2011) utilizando células-tronco embrionárias de rato demonstraram através da expressão gênica do *OCT4* que o tratamento com melatonina nestas células inibiu a proliferação e induziu a diferenciação celular. Kannen *et al.* (2011) demonstraram que o tratamento com melatonina em ratos Wistar com câncer de cólon induzido pelo carcinógeno *1,2-Dimethylhydrazine*, reduziu a proliferação celular e induziu a apoptose das células de câncer de cólon, possivelmente através da inibição do CD133(+), uma glicoproteína que é expressa em células-tronco tumorais. Já Radio, Doctor e Witt-Enderby (2006) demonstraram que o tratamento com melatonina em células-tronco mesenquimais adultas estimulou a diferenciação destas células.

Com isso, os estudos *in vitro* têm demonstrado o efeito positivo do hormônio melatonina, inibindo a proliferação das células-tronco.

Objetivos

II. OBJETIVOS

Com base na hipótese de que o tratamento do câncer de mama pode ser ineficiente devido a ação das células-tronco tumorais, e que o controle da doença requer a inibição dessas células, o objetivo geral deste estudo foi avaliar o efeito da melatonina na regulação do *POU5F1* pelo receptor de estrógeno em células-tronco de câncer de mama após a indução com o disruptor endócrino bisfenol A (BPA) e com o estrógeno (E2).

Objetivos Específicos

- Avaliar os efeitos do estímulo com bisfenol A, do estradiol, ambos disruptores estrogênicos, e do tratamento com melatonina sobre o crescimento das mamosferas das linhagens celulares RE α -positivo (MCF-7) e Triplo-negativo (MDA-MB-231);
- Verificar a expressão gênica e protéica do marcador de células-tronco tumorais OCT4 e do receptor de estrógeno, nas mamosferas das linhagens celulares de câncer de mama humano após o estímulo com estradiol e bisfenol A e tratamento com melatonina;
- Avaliar os efeitos do estímulo com bisfenol e estrógeno e do tratamento com melatonina sobre a atividade de ligação do receptor de estrógeno ao gene *OCT4* (*POU5F1*) das mamosferas da linhagem celular de câncer de mama MCF-7, por ocupância.

Capítulos

III. CAPÍTULOS

Os resultados referentes aos objetivos desta Tese serão apresentados a seguir na forma de dois artigos científicos, conforme as normas de publicações específicas de cada periódico.

Artigo I

Título: Evaluation of melatonin effect on human breast cancer stem cells using a three-dimensional growth method of mammospheres

Autores: Juliana Ramos Lopes, Mayume da Silva Kavagutti, Felipe Arthur Faustino de Medeiros, Debora Aparecida Pires de Campos Zuccari

Periódico: Anti-cancer Agents in Medicinal Chemistry, submetido.

Artigo II

Título: Melatonin decreases estrogen receptor binding to estrogen response elements sites on the OCT4 gene in human breast cancer stem cells

Autores: Juliana Ramos Lopes, David N Arnosti, James Edward Trosko, Mei-Hui Tai, Debora AparecidaPires de Campos Zuccari

Periódico: Genes & Cancer, submetido.

Artigo I

Evaluation of melatonin effect on human breast cancer stem cells using a three-dimensional growth method of mammospheres

Juliana Ramos Lopes¹, Mayume da Silva Kavagutti², Felipe Arthur Faustino de Medeiros², and Debora Aparecida Pires de Campos Zuccari^{1,2,*}

¹ Postgraduate program in Genetics, Universidade Estadual Paulista, UNESP/IBILCE, São José do Rio Preto, SP, Brazil. Cristovão Colombo, 2265, Zip code: 15054-000 – São José do Rio Preto, SP, Brazil.

² Laboratory of Molecular Research in Cancer (LIMC), Department of Molecular Biology, FAMERP, Brazil. Brigadeiro Faria Lima, 5416, Zip code: 15090-000 – São José do Rio Preto, SP, Brazil.

“Evaluation of melatonin on mammospheres”

* Corresponding author: Dr. Debora Ap. Pires de Campos Zuccari, Laboratory of Molecular Research in Cancer (LIMC), Faculty of Medicine of São José do Rio Preto (FAMERP), Brigadeiro Faria Lima, 5416, Vila São Pedro, São José do Rio Preto (SP), Brazil, Zip code: 15090-000. Phone number: + 55 (17) 32015885. e-mail adress: debora.zuccari@famerp.br

Abstract

Background: The high rates of women's death from breast cancer occur due to acquired resistance by patients to certain treatments, enabling the recurrence and/or tumor growth, invasion and metastasis. It has been demonstrated the presence of cancer stem cells in human tumors, as responsible for recurrence and resistance to therapy. Studies have identified OCT4 as responsible for self-renewal and maintenance of pluripotency of stem cells. Thus, it is interesting to study potential drugs that target this specific population in breast cancer. Melatonin, appears to have oncostatic effects on cancer cells, however, little is known about its therapeutic effect on cancer stem cells. **Objective:** Evaluate the viability and the expression of OCT4 in breast cancer stem cells, MCF-7 and MDA-MB-231, after melatonin treatment. **Methods:** The cells were grown in a 3-dimensional model of mammospheres, representing the breast cancer stem cell population and treated or no with melatonin. The cell viability of mammospheres were evaluated by MTT assay and the OCT4 expression, a cancer stem cells marker, was verified by immunocytochemistry. **Results:** Our results demonstrated that the melatonin treatment decreased the cell viability of MCF-7 and MDA-MB-231 mammospheres. Furthermore, it was observed that in both cell lines, the expression of OCT4 was decreased in melatonin-treated cells compared to the control group. **Conclusions:** This fact suggests that melatonin is effective against breast cancer stem cells inhibiting the cell viability via OCT 4. Based on that, we believe that melatonin has a high potential to be used as an alternative treatment for breast cancer.

Keywords: Mammospheres, breast cancer, OCT4, melatonin, immunocytochemistry and three-dimensional.

Introduction

Breast cancer is the second most common cancer worldwide, behind only of non-melanoma skin cancer [1]. The early diagnosis of disease improved the life quality of patients and have enabled the decline in deaths. Despite the decline in deaths, incidence rate remains high due to the resistance to breast cancer therapy which leads to the recurrence and/or tumor growth, invasion and metastasis [2]. The tumors are classified into cancer stem cells (CSCs) and tumor cells [2]. The CSCs population are considered as a small population in the tumor mass that are involved in the maintenance of tumor growth, metastasis and drug resistance [3]. The first evidence of the existence of tumor stem cells in human tumors comes of breast cancer studies [4]. The high invasiveness of breast cancer was detected in cells expressing the stem cell properties [5]. CSCs can divide indefinitely, by maintaining at least some of the properties of the tumor tissue of origin [6]. The expression of some transcription factors, including OCT4, also known as POU5F1, is associated with stemness in various tissues and has allowed the identification of cancer stem cells [2]. The octamer-binding transcription factor 4 (OCT4) is one of the responsible for self-renewal and maintenance of pluripotency of embryonic stem cells [7]. The POU5F1 gene is express in adult human stem cells, nontumorigenic cells, tumor cells and cell lines [8]. Since recent studies indicate that breast cancer is especially aggravated by CSCs, is of great interest the discovery of new therapeutic agents that can act against this cancer population. Melatonin (N-acetyl-5-methoxytryptamine), a natural hormone mainly secreted by the pineal gland seems to play an important role in the regulation of neoplastic cell growth [9]. Oncostatic properties of melatonin are relevant on a number of tumor types and especially on estrogen-dependent mammary tumors [10]. The effects of melatonin on estrogen-responsive breast cancer cell lines has been shown by in vivo and in vitro studies [11][12]. These studies confirm that oncostatic action of melatonin on hormone-dependent mammary tumors occurs through interaction with estrogen receptors [13][10]. Furthermore, several studies have suggested another mechanisms of melatonin oncostatic action on cancer cells as follow: regulation of circadian rhythms, enhancement of the immune response, enhancing DNA stability, antioxidant activity, inhibition of angiogenesis, increasing tumor suppressor p53, stimulation of apoptosis, increasing IGF-1, binding to calmodulin, inhibition of aromatase expression [14][15][16][17]. However,

there are few scientists that study the oncostatic effect of melatonin on cancer stem cells [18][19][20] and only one study for breast cancer [21]. Thus, the aim of this study was evaluate the cell viability of MCF-7 and MDA-MB-231 mammospheres after melatonin treatment by MTT assay and verify the melatonin effect on such cells by immunocytochemistry for the antibody anti-OCT4, a stem cell marker.

Material and Methods

Cell culture

This study was performed using human breast cancer cell lines MCF-7 (ERapostive) (ATCC, Manassas, VA, USA) and MDA-MB-231 (ERa-negative) (ATCC, Manassas, VA, USA). Both cell lines were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) high glucose (4.5 g/L) (GIBCO, Grand Island, NY, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (GIBCO), 2 mM L-glutamine (GIBCO), and 1% antimycotic and antibiotic (GIBCO). All cell lines were cultured in a humidified incubator with 5% CO₂ at 37°C. When the cells reached 80-100% of confluence were plated to the 6-wells ultra low attachment plates for the mammospheres growth. In the same time, the cells received treatment with melatonin for 7 days. In the end, the cell viability were analyzed by MTT assay and the expression of OCT4 were verified by immunocytochemistry.

The 3-dimensional growth of mammospheres was conducted following the technique described by Qu et al. [22] in which the cells were grown in Mammocult culture medium (StemCell Technologies) containing hydrocortisone, heparin and Mammocult proliferation supplement (StemCell Technologies).

Cell viability assessment by MTT 3-(4.5-dimethylthiazol-2-yl)-2.5-diphenyltetrazolium bromide assay

The cell viability potential of cells treated or not with melatonin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was measured using a 3-(4.5-dimethylthiazol-2-yl)-2.5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay (Vibrant MTT Cell Proliferation Assay Kit; Molecular Probes, Eugene, OR, USA). Briefly, MCF-7 and MDA-MB-231 cells from the mammospheres

were plated at a density of 5×10^4 cells/ well in 96-wells plates in 100 μ L DMEM with 2% FBS. Then, the cells were treated with different concentrations of melatonin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) (0,5 mM, 1 mM, 2mM, 5 mM and 10 mM) for 7 days. Melatonin was diluted in ethanol (0.01%). In control cells, equivalent amount of ethanol was added as vehicle. Thereafter, 10 μ L of MTT solution was added to each well and the plates were incubated at 37°C for an additional 4 h. To solubilize the MTT formazan crystals, the cells were incubated with dimethyl sulfoxide (DMSO) (Sigma-Aldrich) for 10 min. The absorbance of each well was measured using a 570 nm Multiskan FC (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Cell viability (%) was calculated for all groups compared to control cells and performed in triplicate. Based on the results of MTT assay, two treatment groups were established: group I (control) containing only cells in culture medium with vehicle (0.01% ethanol) and group II containing 1 mM of melatonin.

Immunocytochemistry

To confirm the efficacy of the treatment with melatonin, immunocytochemistry assay was performed for the anti-OCT4 antibody. For the procedure, two treatment groups were established: Group I (control cells) and group II treated with 1 mM of melatonin. Thus, the MCF-7 and MDA-MB-231 cells from mammospheres were incubated for 24 h. Initially, the whole content was taken from the bottles and the cells were washed with phosphate *buffered* saline (PBS). They were then fixed with formaldehyde 4% and rinsed with PBS. After that, the slides were incubated with 3% hydrogen peroxide for 30 min. Antigenic recovery was carried out in a recipient at 95°C in buffer for 35 min and then the slides were covered with bovine serum albumin (BSA) and incubated with the anti-OCT4 primary antibody (1:1000, Abcam). After cooling, the slides were covered with BSA for 30 min and incubated at 4°C overnight with the antibody. In the next stage, they were stabilized at room temperature, washed with PBS buffer solution, and incubated with the EasyPath kit (Erviagas, São Paulo, SP, Brazil) containing the secondary antibody (biotinylated, rabbit, goat immunoglobulins). They were once again rinsed with PBS and incubated with the peroxidase-streptavidin conjugates and then rinsed with PBS. The result was revealed using chromogenic substrate (DAB; Signet Laboratories), 1 drop/ml and

hematoxylin for counterstaining. By the end, the expression of the octamer-binding transcription factor 4 (OCT4) was analyzed.

Evaluation of Immunocytochemical Staining by Optical Densitometry

Various fields were examined on each slide, especially the areas delimited with brown staining. The slides were photographed, and protein was quantified by ImageJ software in the objective lens 40 x of Nikon Eclipse E200 microscope. For each slide, 3 photos were taken, scoring 20 points in each, totaling 60 points for the calculation of the average relative intensity of immunoreactivity. The values were obtained as Arbitrary Units (AU), and the Mean Optical Density (MOD) revealed the intensity of staining in specifically immunoreactive areas.

Statistical Analysis

The cell lines were separated in two groups, according to the treatments (control and melatonin). First, the results were submitted to analysis of normal distribution using Column statistics and the Gaussian distribution test. The average of cell viability were subjected to analysis of variance (ANOVA), followed by Bonferroni's test. The immunohistochemistry analyses were performed following the Student's t test. All values were expressed as the Mean \pm Standard Error of triplicate experiments. The value of $p < 0.05$ was considered statistically significant. All analyses were performed using GraphPad PRISM5 software (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA).

Results

Effects of melatonin treatment on mammospheres viability

The cell viability assay was performed in the MCF-7 and MDA-MB-231 mammospheres treated or no with melatonin. For the MCF-7 mammospheres, the results demonstrated that there was a significant reduction in cell viability in all tested concentrations of melatonin ($p < 0.05$; Figure 1 A). Additionally, when treated with 1 mM of melatonin occurred a reduction of 50.62% in viability compared to control cells, being considered the optimal concentration for cell treatment ($p < 0.05$; Figure 1 A).

For the MDA-MB-231 cell line results showed a reduction in cell viability in most melatonin concentrations tested, except for the concentration of 0.5 mM (Figure 1 B). However, only the concentration of 1 mM of melatonin was able to significantly reduce the viability of MDA-MB-231 mammospheres in 50.13% compared to the control group, and was considered the best concentration for the treatment ($p < 0.05$; Figure 1 B).

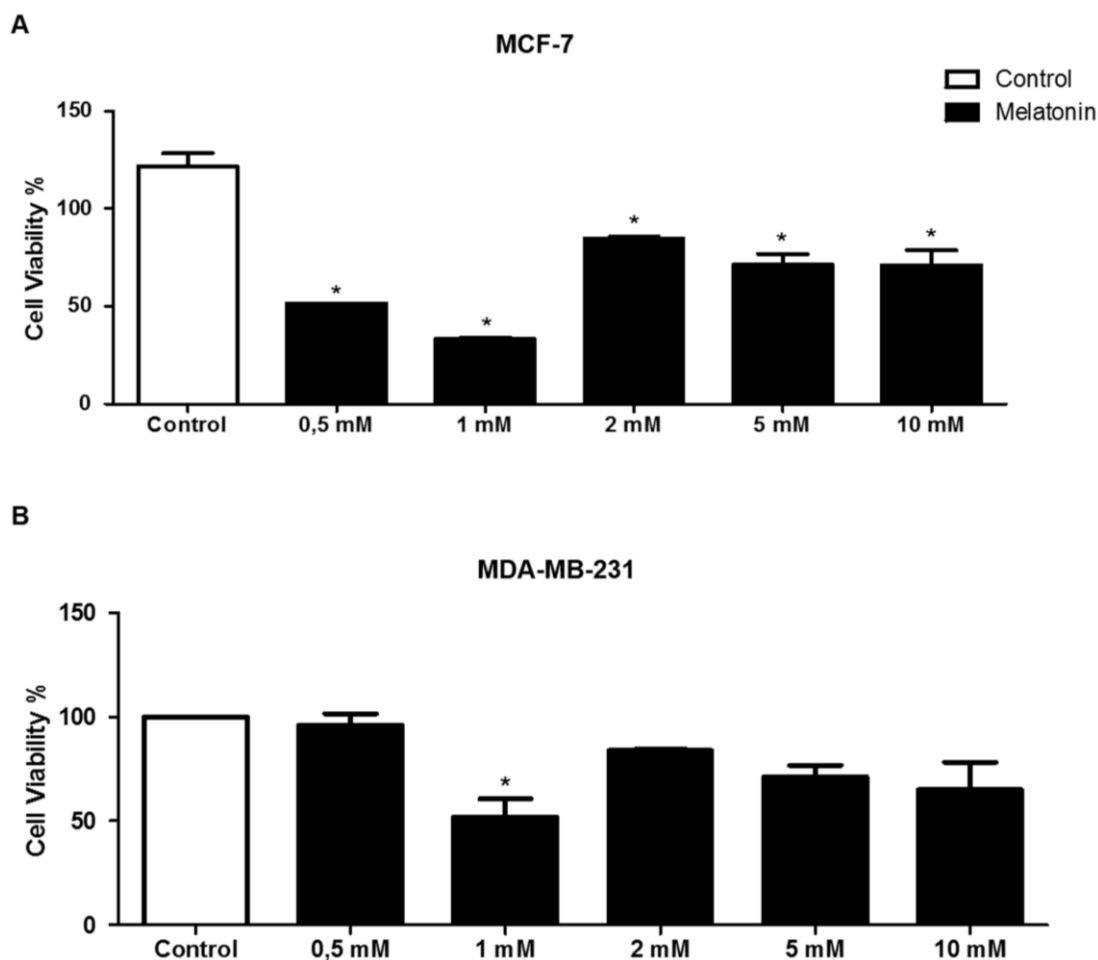


Figure 3. Evaluation of cell viability by MTT 3- (4,5-Dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazolium bromide assay of breast cancer cell lines grown in 3-dimensional mammospheres method after 7 days of treatment with melatonin (0.5 mM, 1 mM, 2 mM, 5 mM and 10 mM). Data are expressed as a percentage of the control group. (A) Analysis of cell viability in the MCF-7 mammospheres and (B) Analysis of cell viability in the MDA-MB-231 mammospheres. The white column corresponds to the control group. Each

column represents the mean \pm standard error of triplicate experiments. *Significant value in ANOVA followed by Bonferroni's test ($p < 0.05$).

Effects of melatonin on OCT4 protein expression

To verify if melatonin treatment has effect on cancer stem cells, immunocytochemistry followed by the quantification of immunostaining by optical densitometry was used to detect the OCT 4 protein expression, a marker of cancer stem cells. The results were obtained in Arbitrary Units (AU) and demonstrated the value of the Mean Optical Density (MOD) + standard error. For the assay, MCF-7 and MDA-MB-231 cells were grown in Mammocult medium for the mammospheres growth. After that, two treatment groups were established: Group I (control) and group II treated with 1 mM of melatonin. The results demonstrated that in both cell lines MCF-7 and MDA-MB-231 cells, there were a statistically significant decrease in immunostaining of OCT4 in cells treated with melatonin, when compared to the control group ($p < 0.05$; Figure 2 and 3).

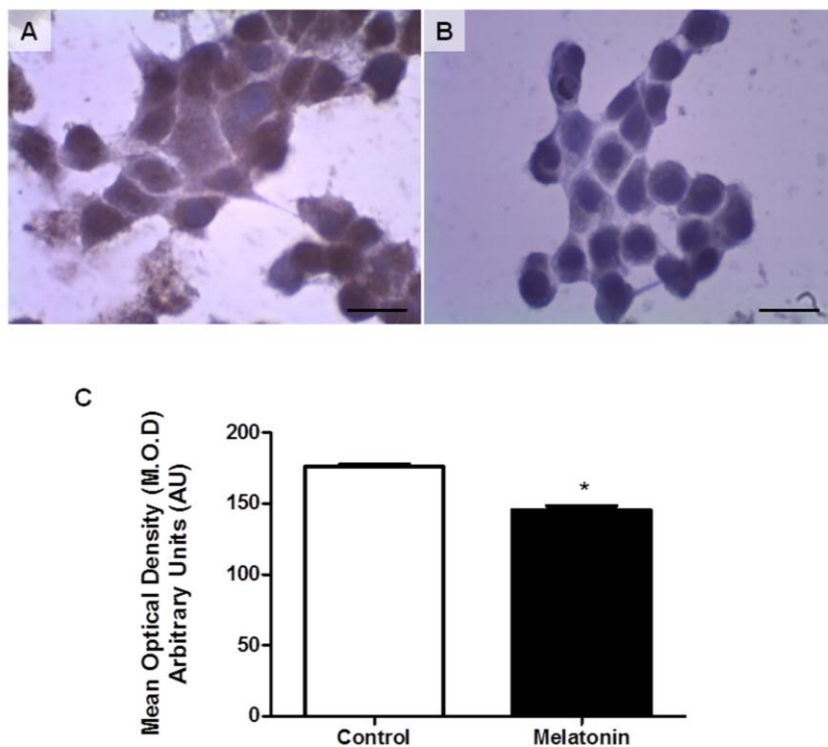


Figure 2. Analysis of the octamer-binding transcription factor 4 (OCT4) protein expression by immunocytochemistry, showing MCF-7 cells after 7 days of melatonin treatment (1 mM). (A) Untreated Cells – control group. (B) Cells treated with melatonin. (C) Statistical analysis of protein expression of OCT4 in the study groups. Images were taken with 40X magnification. Scale bar = 20 μ m. The values of mean optical density and standard error for each group are shown in arbitrary units (au). All the experiments were done in triplicate. * $p < 0.05$ statistically significant difference when compared to control group by Student's t test.

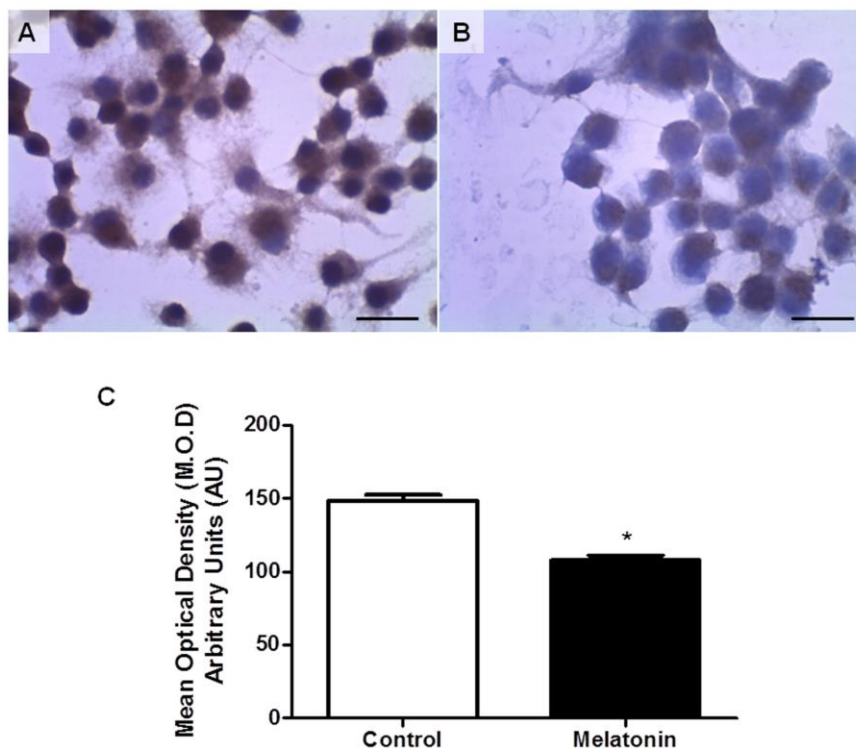


Figure 3. Analysis of the octamer-binding transcription factor 4 (OCT4) protein expression by immunocytochemistry, showing MDA-MB-231 cells after 7 days of melatonin treatment (1 mM). (A) Untreated Cells – control group. (B) Cells treated with melatonin. (C) Statistical analysis of protein expression of OCT4 in the study groups. Images were taken with 40X magnification. Scale bar = 20 μ m. The values of mean optical density and standard error for each group are shown in arbitrary units (au). All the experiments were done in triplicate. * $p < 0.05$ statistically significant difference when compared to control group by Student's t test.

Discussion

In this study, we tested the capacity of melatonin to decrease cell viability of mammospheres, assuming its oncostatic function. Using breast cancer cell lines, ER α -positive (MCF-7) and triple-negative (MDA-MB-231), cultured in a 3-dimensional model of mammospheres, representing the population of breast cancer stem cells, our results demonstrated that pharmacological melatonin concentration (1 mM) decreased the viability of breast cancer stem cells ER α -positive (MCF-7) and triple-negative (MDA-MB-231).

The cells cultured in a 3- dimensional model of mammospheres can be used to detect agents that inhibited the growth of human breast carcinoma cells [23]. In the same way, Cos and collaborators (1990) [21] showed that melatonin treatment decreased the cell proliferation of MCF-7 breast cancer stem cells. Although some studies with epithelial cell lines have demonstrated that melatonin may act in RE α -negative cell lines [24][25], its anti-proliferative action has been described mainly in breast cancer cell lines ER α -positive [26][27]. Jardim-Perassi and collaborators (2014) [28] demonstrated that melatonin treatment (1 mM) in breast cancer cell lines MCF-7 (estrogen receptor positive), was able to reduce the viability of these cells, suggesting that melatonin can be considered an antiestrogenic drug. The mechanisms by which the hormone inhibits cell proliferation are diverse, can occur in a direct manner by binding to membrane receptors and change the lipid metabolism, as well as by indirect pathway, for stimulating the immune system and inhibition of estrogen production [29].

Melatonin also acts in some cancer cells, reducing their invasive and metastatic state, through changes in adhesion molecules and maintenance of intercellular communications. Another possibility that has recently been studied are the effects of melatonin on the molecular markers of stem cells [30][18][19]. However, few studies have evaluated the action of melatonin on the molecular markers of cancer stem cells [18][31] and none for breast cancer stem cells. In the present study, using the OCT4, a cancer stem cell marker, we treated the mammospheres with 1 mM of melatonin for 7 days and we found that melatonin treatment caused a significant decrease in expression of OCT4 in both cell lines, ER-positive cells (MCF-7) and in ER triple-negative cell lines (MDA-MB-231). Ponti and collaborators (2005) [5] showed that breast cancer cell lines that grown as spheroids expressed the transcription factor OCT4. These gene is critically involved in the self-renewal and maintaining stem cell pluripotency [31][32][33]. The expression of OCT4 has an important role in carcinogenesis and provides a possible mechanism by which cancer cells acquire or maintain the resistance to therapy [34]. In accordance with our study, Martín and collaborators (2014) [31] showed that melatonin treatment decreased glioma stem cells proliferation accompanied by a reduction in the expression of the stem cell marker OCT4. Kannen and collaborators (2011) [18], using another cancer stem cell marker, demonstrated that melatonin treatment in rats with colon cancer induced by a

carcinogen 1,2-dimethylhydrazine reduced cell proliferation and induce apoptosis of colon cancer cells, possibly through inhibition of CD133 (+), a glycoprotein who is expressed on tumor stem cells. Similarly, Yoo and collaborators (2011) [19] using embryonic stem cells of mice also demonstrated through the expression of OCT4 gene that treatment with melatonin in these cells inhibited proliferation and induced cell differentiation. These findings suggest that melatonin may act on cancer stem cells through inhibition of OCT4.

Conclusion

Our study suggest that melatonin is effective in the treatment of breast cancer stem cells ER α -positive (MCF-7) and triple-negative (MDA-MB-231), indicating that melatonin treatment may affect the cancer stem cells viability via inhibition of the transcription factor OCT4. Based on our results, we believe that melatonin has a high potential to be used as an alternative treatment for breast cancer.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Acknowledgements

We thank Fundacao de Apoio a Pesquisa e Extensao de Sao Jose do Rio Preto – FAPERP (Grant number 090/2014), Coordenacao de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES foundation, Ministry of Education of Brazil and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for the scholarship.

References

1. JENSEN, J.D.; COLD, S.; NIELSEN, M.H; Jylling, A.M.; Sørensen, K.L.; Larsen, L.B.; Ewertz, M. Trends in breast cancer in the elderly in Denmark, 1980-2012. *Acta Oncologica*, **2016**, 55 (Suppl 1), 59-64.
2. PARK, S.Y.; JANG, W.J.; YI, E.Y. Jang, J.Y.; Jung, Y.; Jeong, J.W.; Kim, Y.J. Melatonin suppresses tumor angiogenesis by inhibiting HIF-1 α stabilization under hypoxia. *Journal of Pineal Research*, **2010**, 48(2), 178-84.

3. LEMMA, S.; AVNET, S.; SALERNO, M.; Chano, T.; Baldini, N. Identification and Validation of Housekeeping Genes for Gene Expression Analysis of Cancer Stem Cells. *PLoS One*, **2016**, 11(2).
4. AL-HAJJ, M.; WICHA, M.S.; BENITO-HERNANDEZ, A; Morrison, S.J.; Clarke, M.F. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proceeding of the National Academy of Sciences*, **2003**, 100(7), 3983-8.
5. PONTI, D.; COSTA, A.; ZAFFARONI, N.; Pratesi, G.; Petrangolini, G.; Coradini, D.; Pilotti, S.; Pierotti, M.A.; Daidone, M.G. Isolation and in vitro propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor cell properties. *Cancer Research*, **2005**, 65(13), 5506-11.
6. TAN, B.T.; PARK, C.Y.; AILLES, L.E.; Weissman, I.L. The cancer stem cell hypothesis: a work in progress. *Laboratory Investigation*, **2006**, 86(12), 1203-7.
7. SAXE, J.P.; TOMILIN, A.; SCHÖLER, H.R.; Plath, K.; Huang, J. Post-translational regulation of Oct4 transcriptional activity. *PLoS One*, **2009**, 4(2).
8. NIU, R.; WANG, Y.; ZHU, M.; Wen, Y.; Sun, J.; Shen, W.; Cheng, Y.; Zhang, J.; Jin, G.; Ma, H.; Hu, Z.; Shen, H.; Dai, J. Potentially Functional Polymorphisms in POU5F1 Gene Are Associated with the Risk of Lung Cancer in Han Chinese. *Biomed Research International*, **2015**, 851320.
9. JABLONSKA, K.; PULA, B.; ZEMLA, A.; Owczarek, T.; Wojnar, A.; Rys, J.; Ambicka, A.; Podhorska-Okolow, M.; Ugorski, M.; Dziegiel, P. Expression of melatonin receptor MT1 in cells of human invasive ductal breast carcinoma. *Journal of Pineal Research*, **2013**, 54(3), 334-45.
10. ALONSO-GONZÁLEZ, C.; GONZÁLEZ, A.; MARTÍNEZ-CAMPA, C.; Menéndez-Menéndez, J.; Gómes-Arozamena, J.; García-Vida, A.; Cos, S. Melatonin enhancement of the radiosensitivity of human breast cancer cells is associated with the modulation of proteins involved in estrogen biosynthesis. *Cancer Letters*, **2016**, 370(1), 145-52.
11. COS, S.; GARCIA-BOLADO, A.; SÁNCHEZ-BARCELÓ, E.J. Direct antiproliferative effects of melatonin on two metastatic cell sublines of mouse melanoma (B16BL6 and PG19). *Melanoma Research*, **2001**, 11(2), 197-201.

12. DAS, A.; WALLACE, G.; REITER, R.J.; Varma, A.K.; Ray, S.K.; Banik, N.L. Overexpression of melatonin membrane receptors increases calcium-binding proteins and protects VSC4.1 motoneurons from glutamate toxicity through multiple mechanisms. *Journal of Pineal Research*, **2013**, 54(1), 58-68.
13. FRANÇA EL, HONORIO-FRANÇA AC, FERNANDES RT et al. The Effect of Melatonin Adsorbed to Polyethylene Glycol Microspheres on the Survival of MCF-7 Cells. *Neuroimmunomodulation*, **2016**, 23(1), 27-32.
14. COS, S.; MARTÍNEZ-CAMPA, C.; MEDIAVILLA, M.D.; Sánchez-Barceló, E.J. Melatonin modulates aromatase activity in MCF-7 human breast cancer cells. *Journal of Pineal Research*, **2005**, 38(2), 136-42.
15. SRINIVASAN, V.; PANDI-PERUMAL, S.R.; BRZEZINSKI, A.; Bhatnagar, K.P.; Cardinali, D.P. Melatonin, immune function and cancer. *Recent Patents Endocrine Metabolic & Immune Drug Discovery*, **2011**, 5(2), 109-23.
16. PROIETTI, S.; CUCINA, A.; REITER, R.J.; Bizzarri, M. Molecular mechanisms of melatonin's inhibitory actions on breast cancers. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **2013**, 70(12), 2139-57.
17. HILL, S.M.; BELANCIO, V.P.; DAUCHY, R.T.; Xiang, S.; Brimer, S.; Mao, L.; Hauch, A.; Lundberg, P.W.; Summers, W.; Yuan, L.; Frasch, T.; Blask. D.E. Melatonin: an inhibitor of breast cancer. *Endocrine-Related Cancer*, **2015**, 22(3), 183-204.
18. KANNEN, V.; MARINI, T.; ZANETTE, D.L.; Frajacom, F.T.; Silva, G.E.; Silva, W.A.; Garcia, S.B. The melatonin action on stromal stem cells within pericryptal area in colon cancer model under constant light. *Biochemical Biophysical Research Communications*, **2011**, 405(4), 593-8.
19. YOO, Y.M.; JUNG, E.M.; CHOI, K.C.; Jeung, E.B. Effect of melatonin on mRNA expressions of transcription factors in murine embryonic stem cells. *Brain Research*, **2011**, 138, 1-7.
20. LOUREIRO, R.; MAGALHÃES-NOVAIS, S.; MESQUITA, K.A.; Baldeiras, I.; Sousa, I.S.; Tavares, L.C.; Barbosa, I.A.; Oliveira, P.J.; Vega-Naredo, I. Melatonin antiproliferative effects require active mitochondrial function in embryonal carcinoma cells. *Oncotarget*, **2015**, 6(19), 17081-96.

21. COS, S.; BLASK, D.E. Effects of the pineal hormone melatonin on the anchorage-independent growth of human breast cancer cells (MCF-7) in a clonogenic culture system. *Cancer Letters*, **1990**, 50(2), 115-9.
22. QU, Y.; HAN, B.; YU, Y.; Yao, W.; Bose, S.; Karlan, B.Y.; Giuliano, A.E.; Cui, X. Evaluation of MCF10A as a Reliable Model for Normal Human Mammary Epithelial Cells. *PLoS One*, **2015**, 10(7).
23. JUNG, J.W.; PARK, S.B.; LEE, S.J.; Seo, M.S.; Trosko, J.E.; Kang, K.S. Metformin represses self-renewal of the human breast carcinoma stem cells via inhibition of estrogen receptor-mediated OCT4 expression. *PLoS One*, **2011**, 6(11).
24. LEMAN, E.S.; SISKEN, B.F.; ZIMMER, S.; Anderson, K.W. Studies of the interactions between melatonin and 2 Hz, 0.3 mT PEMF on the proliferation and invasion of human breast cancer cells. *Bioelectromagnetics*, **2001**, 22(3), 178-84
25. JUNG, J.H.; SOHN, E.J.; SHIN, E.A.; Lee, D.; Kim, B.; Jung, D.B.; Kim, J.H.; Yun, M.; Lee, H.J.; Park, Y.K.; Kim, S.H. Melatonin Suppresses the Expression of 45S Preribosomal RNA and Upstream Binding Factor and Enhances the Antitumor Activity of Puromycin in MDA-MB-231 Breast Cancer Cells. *Evidence-Based Complementary Alternative Medicine*, **2013**.
26. HILL, S.M.; SPRIGGS, L.L.; SIMON, M.A.; Muraoka, H.; Blask, D.E. The growth inhibitory action of melatonin on human breast cancer cells is linked to the estrogen response system. *Cancer Letters*, **1992**, 64(3), 249-56.
27. MAO, L.; YUAN, L.; XIANG, S.; Zeringue, S.B.; Dauchy, R.T.; Blask, D.E.; Hauch, A.; Hill, S.M. Molecular deficiency (ies) in MT₁ melatonin signaling pathway underlies the melatonin-unresponsive phenotype in MDA-MB-231 human breast cancer cells. *Journal of Pineal Research*, **2014**, 56(3), 246-53.
28. JARDIM-PERASSI, B.V.; ARBAB, A.S.; FERREIRA, L.C.; Borin, T.F.; Varma, N.R.; Iskander, A.S.; Shankar, A.; Ali, M.M.; Zuccari, D.A. Effect of melatonin on tumor growth and angiogenesis in xenograft model of breast cancer. *PLoS One*, **2014**, 9(1).
29. ORTÍZ-LÓPEZ, L.; MORALES-MULIA, S.; RAMÍREZ-RODRÍGUEZ, G.; Benítez-King, G. ROCK-regulated cytoskeletal dynamics participate in the

- inhibitory effect of melatonin on cancer cell migration. *Journal of Pineal Research*, **2009**, 46(1), 15-21.
30. GAO, W.; LIN, M.; LIANG, A.; Zhang, L.; Chen, C.; Liang, G.; Xu, C.; Peng, Y.; Chen, C.; Huang, D.; Su, P. Melatonin enhances chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Journal of Pineal Research*, **2014**, 56(1), 62-70.
 31. MARTÍN, V.; SANCHEZ-SANCHEZ, A.M.; PUENTE-MONCADA, N.; Gomez-Lobo, M.; Alvarez-Vega, M.A.; Antolín, I.; Rodriguez, C.; . Involvement of autophagy in melatonin-induced cytotoxicity in glioma-initiating cells. *Journal of Pineal Research*, **2014**, 57(3), 308-16.
 32. CHENG, D.; LEI, L.; LU, Z.; Li, Z.; Wang, H. [Induction and characterization of induced pluripotent stem (iPS) cells: a review]. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao*, **2010**, 26(4), 421-30.
 33. NIWA, H.; MASUI, S.; CHAMBERS, I.; Smith, A.G.; Miyazaki, J. Phenotypic complementation establishes requirements for specific POU domain and generic transactivation function of Oct-3/4 in embryonic stem cells. *Molecular and Cellular Biology*, **2002**, 22(5), 1526-36.
 34. LINN, D.E.; YANG, X.; SUN, F.; Xie, Y.; Chen, H.; Jiang, R.; Chen, H.; Chumsri, S.; Burger, A.M.; Qiu, Y. A Role for OCT4 in Tumor Initiation of Drug-Resistant Prostate Cancer Cells. *Genes Cancer*, **2010**, 1(9), 908-16.

Artigo II

Melatonin decreases estrogen receptor binding to estrogen response elements sites on the OCT4 gene in human breast cancer stem cells

Lopes, JR¹; Arnosti, DN²; Trosko, JE³; Tai, M-H³; Zuccari, DAPC^{1,4,*}

¹ Department of Biology, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto, SP, 15054-000, Brazil.

² Department of Biochemistry and Molecular Biology, Michigan State University, East Lansing, MI, 48824, USA.

³ Department of Pediatrics and Human Development, Michigan State University, East Lansing, MI, 48824, USA.

⁴ Department of Molecular Biology, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, São José do Rio Preto, SP, 15090-000, Brazil.

*Author for mail: Debora Aparecida Pires de Campos Zuccari, PhD,

Laboratorio de Investigacao Molecular no Cancer (LIMC),
Faculdade de Medicina de Sao Jose do Rio Preto (FAMERP).
Av. Brigadeiro Faria Lima, 5416, Vila Sao Pedro,
Sao Jose do Rio Preto, SP - 15090-000, Brazil.
Phone: +55-17-3201-5885
Email: debora.zuccari@famerp.br

Abstract

Cancer stem cells (CSCs) pose a challenge in cancer treatment, as these cells can drive tumor growth and are resistant to chemotherapy. Melatonin exerts its oncostatic effects through the estrogen receptor (ER) pathway in cancer cells, however its action in CSCs is unclear. Here, we evaluated the effect of melatonin on the regulation of the transcription factor *OCT4* (*Octamer Binding 4*) by estrogen receptor alpha ($ER\alpha$) in breast cancer stem cells (BCSCs). The cells were grown as a cell suspension or as anchorage independent growth, for the mammospheres growth, representing the CSCs population and treated with 10 nM estrogen (E2) or 10 μ M of the environmental estrogen Bisphenol A (BPA) and 1 mM of melatonin. At the end, the cell growth as well as OCT4 and $ER\alpha$ expression and the binding activity of $ER\alpha$ to the *OCT4* was assessed. The increase in number and size of mammospheres induced by E2 or BPA was reduced by melatonin treatment. Furthermore, binding of the $ER\alpha$ to *OCT4* was reduced, accompanied by a reduction of OCT4 and $ER\alpha$ expression. Thus, melatonin treatment is effective against proliferation of BCSCs in vitro and impacts the ER pathway, demonstrating its potential therapeutic use in breast cancer.

keywords: melatonin, estrogen receptor, chromatin immunoprecipitation, three-dimensional growth, mammospheres.

Introduction

Approximately 80% of breast tumors are classified as ER positive and is correlated with better prognosis and a greater response to hormonal therapy [1]. ER positive tumors use steroid hormone, estradiol [E2], as their main growth stimulant, therefore ER is the direct target of endocrine therapies [2]. Many chemicals can mimic the biological functions of E2, contributing to the initiation or progression of cancer [3]. These environmental estrogens include Bisphenol A (BPA) is widely used in industry for the manufacture of polymers such as polycarbonate and films used in food containers [4]. BPA activates the transcription of genes responsible for the increase in cell proliferation of the breast cancer cells [5]. In light of high rates of breast cancer, it has become vital to understand the action of new drugs that might be effective against this disease.

The melatonin hormone appears to have an oncostatic effect in different types of cancers [5, 6]. This effect is seen on hormone-dependent tumors, and its action has greater relevance in breast tumors [7]. A suggested mechanism was that melatonin decreases transcription of the *ER* gene in MCF-7 cells, leading to reduced levels of the ER-estrogen complex binding targets in the genome [8-10]. However, the action of melatonin on the ER pathway has not been well studied in cancer stem cells, especially for breast cancer stem cells (BCSCs) [11-12]. Such cancer stem cells are able to re-initiating tumor growth, being responsible for tumor recurrences, metastasis and drug resistance [13]. From studies of cancer stem cells, the transcription factor OCT4, encoded by the *POU5F1* gene, was found to be a critical factor for self-renewal and maintenance of pluripotency of stem cells [14, 15]. Based on the idea that breast cancer treatment is particularly complicated by cancer stem cells, and that the control of the disease requires the inhibition of these cells, the objective of this study was to evaluate the effect of melatonin on regulation of the *OCT4/POU5F1* by the ER α in BCSC after induction with tumor initiation chemical BPA and with E2.

Results

Effect of melatonin on cell suspension and anchorage independent growth (AIG)

To evaluate the effect of melatonin on mammospheres treated with BPA and E2, two methods of 3-dimensional growth were performed (cell suspension and AIG). For the cell suspension and AIG technique, the results were similar (Fig. 1 A, B).

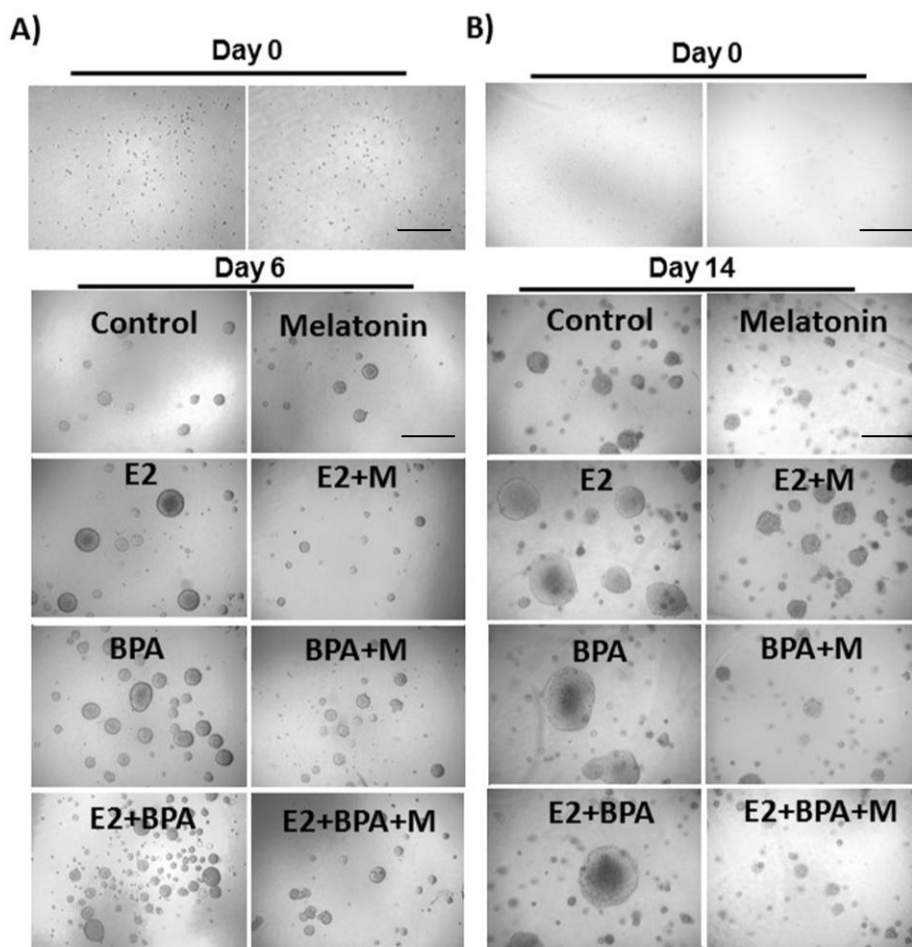


Fig. 4. MCF-7 cells grown in 3-dimensional mammospheres, treated with E2 and/or BPA with or without melatonin. (A) Cell suspension treated for 6 days. (B) Anchorage Independent Growth (AIG) treated for 14 days. The magnification was 40 X.

The treatment with 10 nM E2 and 10 μ M BPA without melatonin increased significantly the number and the size of the mammospheres when compared with the control group (Fig. 2 A, B) in both technique. On the other hand, 1 mM of melatonin decreased significantly the number and size of mammospheres when compared with the cells treated with E2 and BPA (Fig. 2 A, B). Furthermore, when the cells were stimulated by E2 and BPA and treated with melatonin concomitantly, there was a greater reduction in the number and size of mammospheres (Fig. 2 A, B).

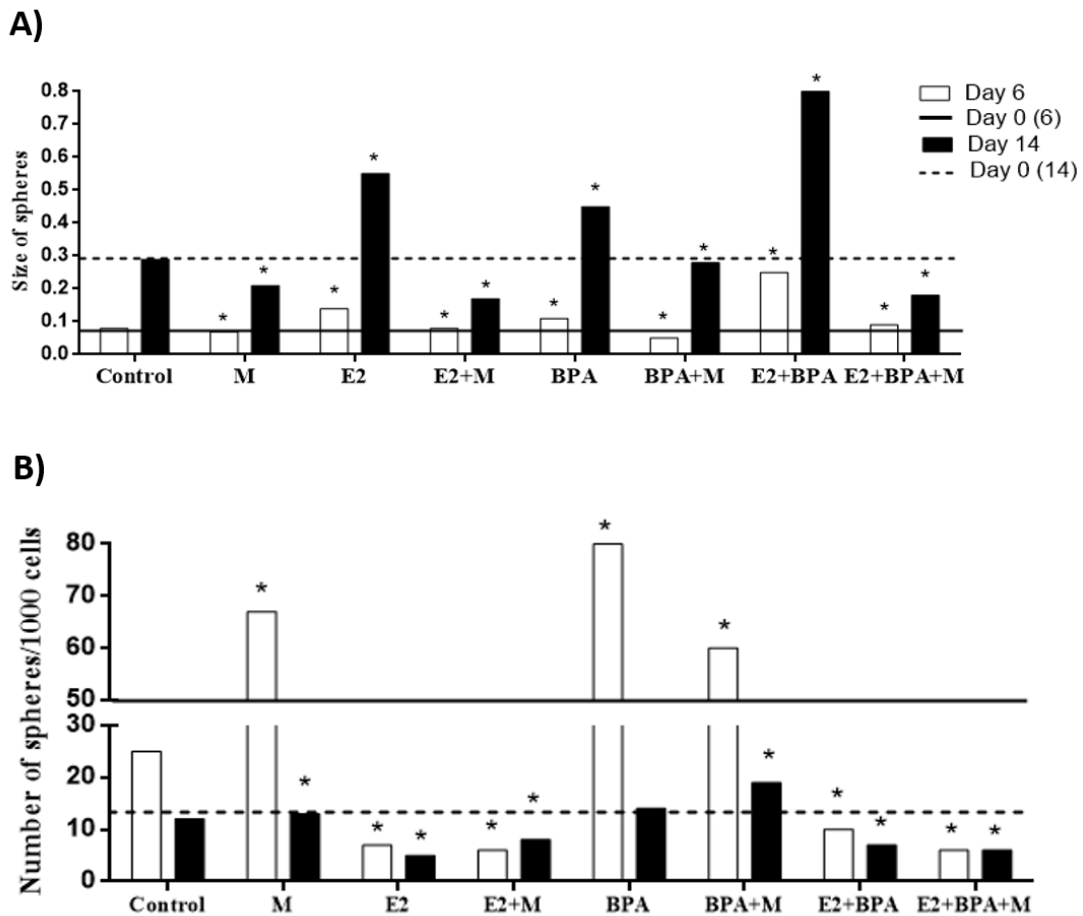


Fig. 2. Effect of E2 and/or BPA with or without melatonin on MCF-7 mammospheres. (A) Size of mammospheres. (B) Number of mammospheres. Significant value in ANOVA followed by Bonferroni's test (* $P \leq 0.05$).

Effect of melatonin on interaction of estrogen receptor with POU5F1 gene

In order to analyze the effect of melatonin on estrogen receptor binding to the *POU5F1* gene, we carried out the Chromatin Immunoprecipitation assay. The results showed that mammospheres treated with 10nM E2 increased significantly the binding of ER to ERE sites at -3544 kb of OCT4 promoter region with similar level when compared to pS2, and the same occurred when treated with 10 μ M BPA (Fig. 3). On the other hand, the cells stimulated by 10nM E2 or 10 μ M BPA and treated with 1mM melatonin showed decreased binding of ER on OCT4 promoter (Fig. 3). In respect of the group treated with E2+BPA, the binding of ER α to ERE sites on OCT4 region was highly increased when compared to control and with similar level to pS2 (Fig. 3). However, when the cells were stimulated by E2+BPA and treated with melatonin concomitantly, occurred a decrease in the binding of ER α on OCT4 promoter site when compared to control and with the E2 + BPA group (Fig. 3).

The another putative binding site at -1999 kb showed a slight increase of ER binding, when treated with E2 and/or BPA, however, the enhancement of binding level was very low and when treated with melatonin this enhancement was decreased (Fig. 3).

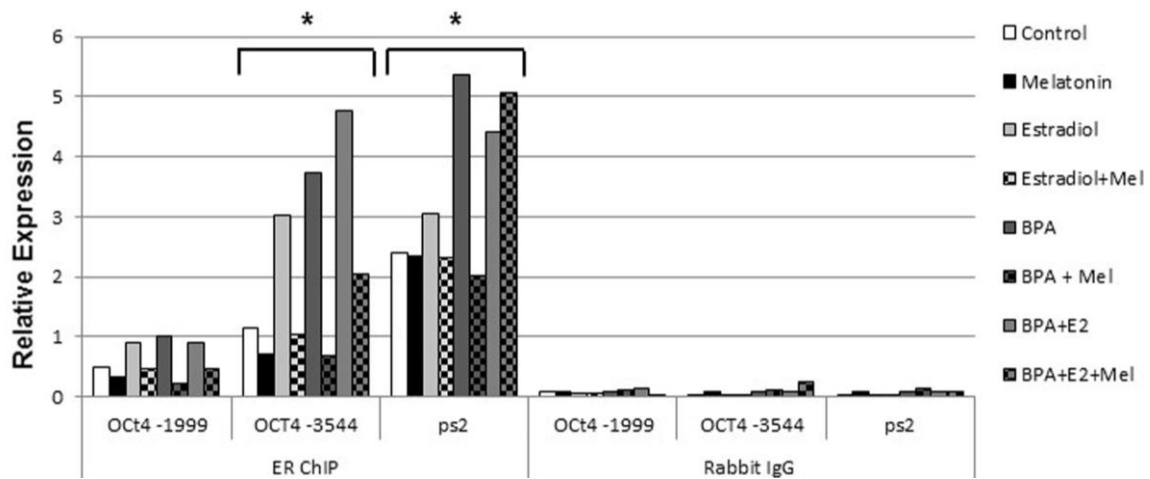


Fig. 3. Chromatin immunoprecipitation to verify the binding activity of ER to the putative ERE sequences in OCT4 transcription site (OCT4 -1999 and OCT4 -3544) after treatment with E2 and/or BPA with or without melatonin in mammospheres. Significant value in ANOVA followed by Bonferroni's test ($*P \leq 0.05$).

Impact of melatonin on transcription of the ER and POU5F1 genes

In order to examine the effects of melatonin on transcription of the *ERα* and *POU5F1*, the expression of these genes were measured. As expected, cells treated with E2 or BPA exhibited increased levels of transcript for OCT4 and *ERα* (Fig. 4 A, B). Combined treatment of E2 and BPA showed an even greater increase of *OCT4* and *ERα* gene expression (Fig. 4 A, B). Melatonin treatment had the opposite effect; levels of *ERα* mRNA were sharply decreased in cells treated with melatonin alone, or in combination with either E2 or BPA (Fig. 4 B). Interestingly, the decrease was much more modest, though still significant, for cells treated with both E2 and BPA (Fig. 4 B). Melatonin had a similar but less dramatic impact on *OCT4* transcript levels (Fig. 4 A).

Impact of melatonin on expression of ER and OCT4 proteins

Also, we tested the impact of estrogen, BPA and melatonin on ER and OCT4 protein levels in these cells. E2 and BPA significantly raised levels of *ERα* protein, although the combination was no more effective than either alone (Fig. 4 C, D). Melatonin alone had no discernible impact on protein levels, despite the decrease in transcript level noted above. *ERα* protein levels were generally decreased in all cells treated with melatonin, but the extent of decrease did not closely mirror the changes in

mRNA levels, suggesting that additional levels of regulation may be impacting ER α levels. Melatonin similarly decreased levels of OCT4 protein (Fig. 4 C); the decrease was quite significant in cells treated with melatonin alone, where no significant change in ER α protein levels had been noted, and only slight changes in OCT4 transcript levels had been observed, suggesting that regulation of protein levels of OCT4 may be controlled at a translational and/or post-translational level (Fig. 4 C, D). OCT4 protein levels were also decreased in cells treated with E2 and/or BPA, although not as dramatically, thus the elevated levels of ER α may contribute to increased expression of OCT4 protein through the transcriptional effects noted above (Fig. 4 C).

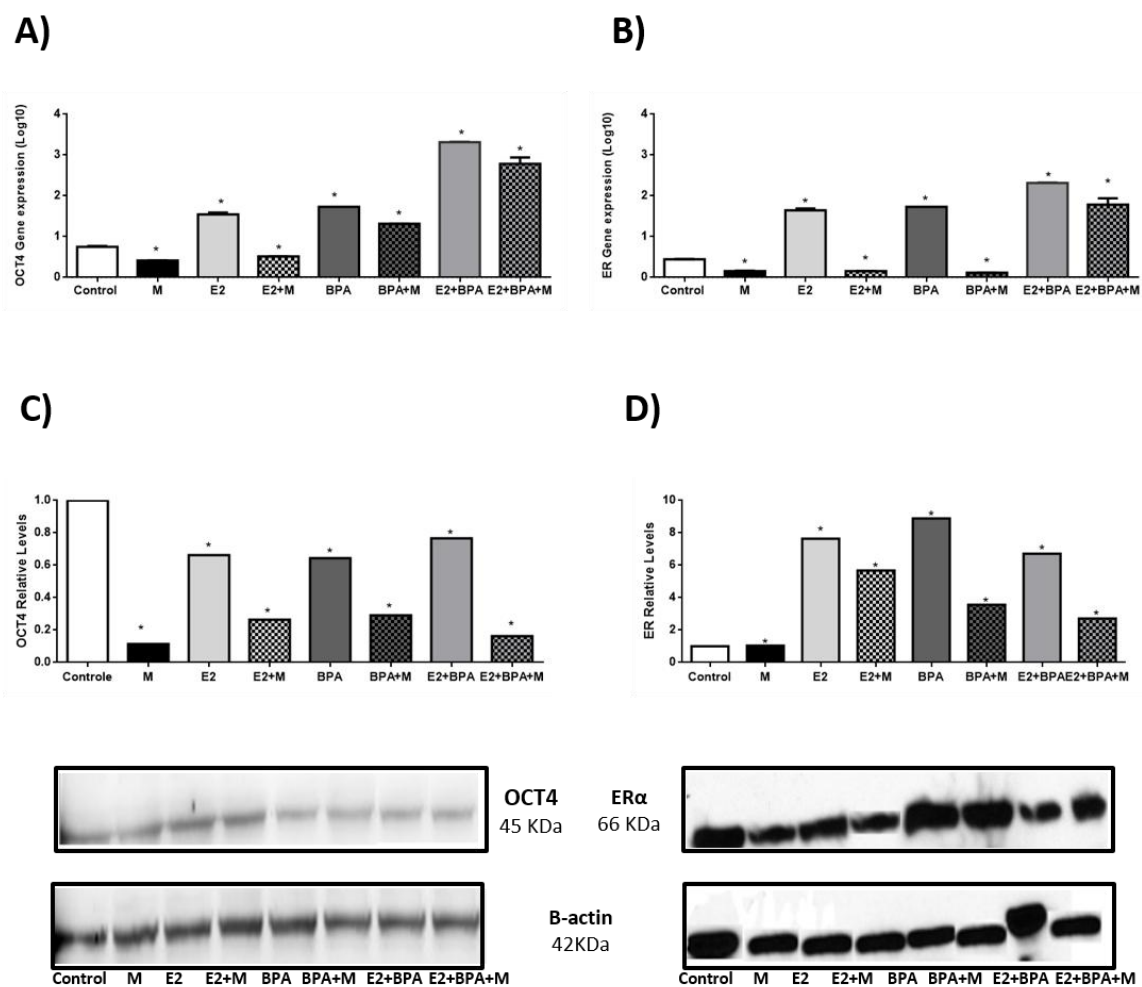


Fig. 4. Analysis of OCT4 and ER gene and protein expression after treatment with melatonin, E2 and BPA. (A) OCT4 gene expression. (B) ER gene expression. (C) OCT4 protein expression. (D) ER protein expression. The gene expression values were log10 represented and protein expression values were represented in relative levels. OCT4 and ER protein levels were normalized to β -actin protein, shown in the boxes. Significant value in ANOVA followed by Bonferroni's test (* $P \leq 0.05$).

Discussion

The purpose of our study was to evaluate the melatonin effect after the induction with tumor initiation chemical BPA and E2 in MCF-7 cells using two different techniques of three-dimensional growth of mammospheres (cell suspension and AIG), representing the CSCs population. The growth in a three-dimensional (3D) model creates an artificial tumor environment where the cells segregate properly to form components of adult tissues analogous to the corresponding found in vivo [2]. This type of cell culture can be used to detect agents that affect the growth of breast cancer stem cells [2]. Our results demonstrated that the treatment with 10nM E2 or 10 μ M BPA increased the number and the size of the mammospheres in both technique. On the other hand, 1mM melatonin decreased the number and size of mammospheres treated with 10nM E2 or 10 μ M BPA. It was suggested the involvement of E2 and BPA in the initiation and progression of breast cancer, increasing the cell proliferation rate [17]. MCF-7 BCSCs treated with E2 and BPA, showed an increase in cell proliferation rate [18, 19].

Estrogen exposure has been strongly linked to breast cancer risk. Women who have had hormone replacement therapy with estradiol have an increased risk of develop breast tumors, consistent with the established relationship between estrogen and breast cancer [20]. Environmental factors may similarly impact the risk of breast cancer; for instance, the estrogenic actions of BPA have been shown in studies where the compound activated estrogen receptors and stimulating the growth of MCF-7 breast cancer cells [21, 22]. From these studies, it is has been suggested that this compound may play a role in the initiation of breast cancer. Conversely, melatonin has been shown to inhibit the proliferation of estrogen-responsive MCF-7 human breast cancer cells [23]. Cos et al. [24] demonstrated the action of melatonin in BCSC, the authors verified that melatonin treatment decreased the number and size of mammospheres. Melatonin administration has also been reported to block estradiol induced proliferation of MCF-7 cells [25, 26]. However, no studies have examined the possible effect of melatonin on breast cancer stem cells that were simultaneously treated with with BPA and E2, as might be expected to happen in natural settings.

We find that melatonin antagonizes the effects of estrogen and BPA; previous studies indicated that this hormone reduces ER binding activity. To determine whether these effects may influence stem cell growth through regulation of the *POU5F1* gene, we looked at direct regulation of the gene by ER α . We found increased binding of ER α to ERE sites of the *POU5F1* promoter region in mammospheres treated with E2 or BPA. This binding was reduced upon melatonin treatment. OCT4, the product of *POU5F1*, controls the self-renewal and pluripotency of stem cells and is expressed in germ cells, embryonic stem cells and human stem cells [27, 28]. Our findings are similar to those of Jung et al. [2], who also showed that MCF-7 mammospheres treated with E2 exhibited increased the

binding of ER α to the ERE site of *POU5F1* at -3544 kb. However, in contrast to our findings, BPA has not changed the binding activity, suggesting that act through different mechanisms on the MCF-7 cells. Rato et al. [25] observed that MCF-7 cells stimulated with estradiol have a high binding activity of estradiol-estrogen receptor complexes (E2-ER) to the estrogen-responsive elements (ERE) in the DNA, which was inhibited by treatment with melatonin. Assuming that melatonin decreased the binding of estradiol to the estrogen receptor, impeding the complexes (E2-ER) formation and, consequently, the binding to the ERE in the DNA. Woo et al. [29] in 2001, also suggested that melatonin suppressed the action of E2, preventing estradiol binding to the estrogen receptor, confirming the participation of melatonin in the estrogen signaling pathway.

In our study, we showed that E2 or BPA treatment upregulated OCT4 and ER α transcript and protein levels. Concomitant treatment with melatonin reduced OCT4 and ER α transcript and protein expression to varying degrees. The action of melatonin on the ER pathway was reported Kiefer et al. [30], the MCF-7 cells were transfected with an estrogen response element (ERE) and treated with melatonin and E2. They demonstrated that melatonin decreases ER α mRNA and protein levels. Therefore, it is suggested that melatonin acts in the ER levels, decreasing its activity.

The effect of melatonin on the OCT4 via was reported in one study [12], however, there are no studies that evaluated the action of melatonin on OCT4 in cancer stem cells. As opposed to this study, in 2011, Yoo et al. [12] demonstrated that melatonin did not change the expression of OCT4 gene in murine embryonic stem cells. Kannen et al. [11] demonstrated that treatment with melatonin in rats with colon cancer induced by a carcinogen 1,2-dimethylhydrazine, reduced cell proliferation and induce apoptosis of colon cancer cells, possibly through inhibition of CD133 (+), a glycoprotein which is expressed on tumor stem cells. OCT4 expression is important to the carcinogenesis process and its action may allow cancer cells to acquire or maintain the chemotherapy resistant phenotype.

In conclusion, our results show that melatonin counteracts the effects of E2 and BPA treatment on mammosphere growth as well as the expression of ER α and the stem cell marker OCT4. Our data suggests that the effect of melatonin on *POU5F1* (OCT4) may be in part a reflection of its impact on expression and activity of the estrogen receptor in BCSC. Due to the highly aggressive potential of cancer stem cells and of their resistance to cancer therapies, it is therefore of great interest to pursue the study of new drugs that act directly on this tumor population. These studies, in addition, provide a mechanistic explanation for the epidemiological observations on the risk to breast cancers in the decrease of melatonin production due to the loss of sleep at night. Our findings of the action of melatonin are therefore relevant to this field of cancer studies.

Material and methods

Cell culture

The breast cancer cell line MCF-7 was obtained from ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA). The cells were grown at 5 % CO₂ at 37 °C in DMEM (E) (Invitrogen, Carlsbad, CA) with 10 % Fetal Bovine Serum (FBS), penicillin (100 IU/mL) and streptomycin (100 mg/mL). When the cells reached 90% - 100% confluence, were grown in two methods of 3-dimensional mammospheres, cell suspension and Anchorage Independent Growth (AIG).

The treatment with melatonin in both methods was done according to (Borin *et al*, 2015) and treatment with E2 and BPA was according to (Jung *et al*, 2011).

Cell suspension

A total of 1×10^4 cells diluted in 2 ml of DMEM (E) were plated on top of 2 ml of prehardened 1% agarose diluted in Phosphate-buffered saline (PBS) in each well of 6 wells plates. Simultaneously, the cells received the treatments for 6 days according to the following groups: I. Control (treated with vehicle); II. 1 mM Melatonin (M) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA); III. 10 nM Estradiol (E2) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA); IV. E2+M; V. 10 μ M Bisphenol A (BPA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA); VI. BPA+M; VII. E2+BPA; VIII. E2+BPA+M. Melatonin, BPA and E2 were diluted in ethanol 100%. In control cells, equivalent amount of ethanol was added as vehicle. At the end, the number and size of the MCF-7 mammospheres were measured. These treatment conditions were used for Chromatin immunoprecipitation (ChIP), quantitative RT-PCR analysis (qPCR) and western blotting.

Anchorage Independent Growth

A total of 5×10^4 cells diluted in 3 ml of 0.33% agarose medium were grown on top of 3 ml of prehardened 0.5% agarose medium in each of triplicate dishes (6 cm). Simultaneously, the cell treatment was performed for 2 weeks according to the following groups: I. Control (treated with vehicle); II. 1 mM of Melatonin (M); III. 10 nM Estradiol (E2); IV. E2+M; V. 10 μ M Bisphenol A (BPA); VI. BPA+M; VII. E2+BPA; VIII. E2+BPA+M. Melatonin, BPA and E2 were diluted in ethanol 100%. In control cells, equivalent amount of ethanol was added as vehicle. At the end, the number and size of the MCF-7 mammospheres were scored.

Chromatin Immunoprecipitation (ChIP)

To verify if ER bound to ERE sites on OCT4 promoter region, the ChIP assay was performed after E2 and BPA addition, with or without melatonin. For the assay, 5×10^6 MCF-7 mammospheres were

grown in cell suspension and treated with 10 μ M BPA and 10 nM E2 with or without 1 mM melatonin for 6 days. After 6 days, cells were crosslinked with 1% formaldehyde for 30 min. Then, cells were pelleted and washed sequentially in PBS (pH 7.4), buffer I (10 mM HEPES [pH 6.5], 10 mM EDTA, 0.5 mM EGTA, 0.25% Triton X-100) and buffer II (10 mM HEPES [pH 6.5], 1 mM EDTA, 0.5 mM EGTA, 150 mM NaCl). The pellet was then suspended in lysis buffer (50 mM Tris, pH 8.0, 10 mM EDTA, 1% sodium dodecyl sulfate [SDS], 0.5 μ M phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 μ M pepstatin A, 1 mM sodium bisulfite, 1 mM benzamidine, 1 mM dithiothreitol). Cells were sonicated seven times 10 pulses each round in lysis buffer using a Branson Sonifier 450D with microtip (Branson, Danbury, CT). After sonication, ChIPs were performed using anti-ER α (sc-8002, SantaCruz Biotechnologies) or rabbit nonspecific IgG (Santa Cruz Biotechnology) overnight at 4°C. Immunoprecipitations were performed with ChIP dilution buffer (20 mM Tris [pH 8.0], 2 mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.5 μ M phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 mM DTT) containing 150 mM NaCl. 40 μ l of Protein A-agarose beads were then added, and the mixture was rocked for 4 h at 4°C. After a brief centrifugation, the immunoprecipitated material was washed sequentially in TSE buffer (20 mM Tris, pH 8.0, 0.1% SDS, 2 mM EDTA, 1% Triton X-100), TSE buffer plus 250 mM NaCl, and TSE buffer plus 500 mM NaCl and in buffer III (10 mM Tris, pH 8.0, 1 mM EDTA, 0.25 M LiCl, 1% NP-40, 1% deoxycholate). Beads were then washed in TE buffer (20 mM Tris, pH 8.0, 2 mM EDTA), and protein complexes were eluted in 300 μ l of 0.1 M NaHCO₃, 1% SDS. Cross-links were reversed overnight at 65°C. qRT-PCR was performed on the DNA extracts for ER, Input and IgG control using SYBR Green Master Mix reagents with an ABI 7500 sequence detection system. Enrichment of ER α at target genes promoters was examined using the following primers: OCT4 -3544 forward (TCC TCC CAG CTC ACC CAC TCC), OCT4 -3544 reverse (TCT CCC CCA TGA GCC CTG CA), OCT4 -1999 forward (GAC AGC TGG CCA CGG GAC AC) and OCT4 -1999 reverse (AGG CCA GGT CTG GAC TGG GC). As positive control, we used a well-characterized ER binding site on the *pS2* promoter: pS2 forward (CCT GCA AGG TCA CGG TGG CC) and pS2 reverse (GGC CCT CCC GCC AGG GTA AA).

RNA Extraction and Gene Expression Analysis Using Quantitative Real Time PCR (qPCR)

To verify the OCT4 and ER α expression levels after E2 and BPA treatment with or without melatonin, we performed qPCR. For the assay, 0.5 X 10⁵ MCF-7 mammospheres were grown in cell suspension and treated with 10 μ M BPA and 10 nM E2 with or without 1 mM melatonin for 6 days. After 6 days, total RNA was extracted from the mammospheres using trizol reagent and the cDNA was synthesized using Super Script II Reverse Transcriptase (Invitrogen) in a total volume of 20 μ l.

The quantitative expression was performed through RT-PCR in triplicate, using Step OnePlus System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and a negative control was included in each reaction. PCR reactions contained 4 μ l of cDNA (100 ng), 10 μ l of SYBR Green Master Mix, 4 μ l of DEPC water and 2 μ l of primers for OCT4, ER α and ACTB were performed. Primers sequences were as follows: ER α - F, CGT CGC CTC TAA CCT CGG, ER α - R, CCC AGA TGC TTT GGT GTG GA, OCT4- F, CTC TGC AGA TTC TGA CCG CA, OCT4- R, CAT GGG TGA GGG TAG TCT GC and ACTB –F, CAC AGA GCC TCG CCT TTG C and ACTB – R, GCG CGG CGA TAT CAT CAT CC. The levels of mRNA of the *POU5F1* and *ER* genes were normalized to *ACTB* gene as an internal control of expression. The relative gene expression was measured by the $\Delta\Delta$ Ct method. The value of Relative Quantification (RQ) of the control group (used as reference) was established as the unit for analysis of the expression of OCT4 and ER.

Western blotting

To measure the effect of E2, BPA and melatonin treatment on OCT4 and ER protein expression, 5 X 10⁵ MCF-7 mammospheres were grown in cell suspension and treated with 10 μ M BPA and 10 nM E2 with or without 1 mM melatonin for 6 days. After 6 days, mammospheres were harvested and the pellet was snap-frozen in liquid nitrogen. Cell extracts were thawed in lysis buffer (50 mM Tris HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100) and centrifuged. The supernatant was used in Bradford assays and Western blot assays. Equal amounts of whole cell extracts (50 μ g) were separated by 12.5% SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes for Western analyses. Endogenous proteins were detected by using the following antibodies: anti-OCT4 (ab27985, mouse polyclonal, 1: 1 000, Abcam), anti-ER α (SC-543, mouse polyclonal, 1: 1 000 SantaCruz Biotechnologies) and anti- β -actin (sc-47778, mouse monoclonal, 1: 5 000 SantaCruz Biotechnologies). The antibody incubation was performed in 5% milk in TBST (20 mM Tris HCl, pH 7.5, 120 mM NaCl, 0.1% Tween20). Blots were developed using peroxidase-conjugated goat anti-mouse secondary antibodies as appropriate (1: 5 000, ThermoScientific, Waltham, MA) and SuperSignal WestPico Chemiluminescent substrate (ThermoScientific). Quantification was performed using Image J software as image analyzer.

Statistical analysis

All results were submitted to descriptive analysis to determine statistical normality. An analysis of variance (ANOVA) was performed, followed by the Bonferroni's test. Values of $P \leq 0.05$ were considered statistically significant. The GraphPad Prism 6 software (GraphPad Software, inc., San Diego, CA, USA) was used.

Acknowledgements

We thank Fundacao de Apoio a Pesquisa e Extensao de Sao Jose do Rio Preto – FAPERP (Grant number 090/2014) and Coordenacao de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES foundation, Ministry of Education of Brazil for the scholarship. We also thank Arnosti Laboratory and Trosko Laboratory from Michigan State University for providing material and facility to carry out this project. In addition, a donation from Dr. Nik Dimitrov, Dept. Of Medicine, College of Medicine, Michigan State University assisted in providing supplies.

Conflict of Interest Statement: None declared.

References

1. Dowsett M, Sestak I, Lopez-Knowles E, et al. Comparison of PAM50 risk of recurrence score with oncotype DX and IHC4 for predicting risk of distant recurrence after endocrine therapy. *J Clin Oncol.* 2013;31: 2783-2790.
2. Jung JW, Park SB, Lee SJ, Seo MS, Trosko JE, Kang KS. Metformin represses self-renewal of the human breast carcinoma stem cells via inhibition of estrogen receptor-mediated OCT4 expression. *PLoS One.* 2011;6: e28068.
3. Nagarajan S, Hossan T, Alawi M, et al. Bromodomain protein BRD4 is required for estrogen receptor-dependent enhancer activation and gene transcription. *Cell Rep.* 2014;8: 460-469.
4. Rezg R, El-Fazaa S, Gharbi N, Mornagui B. Bisphenol A and human chronic diseases: current evidences, possible mechanisms, and future perspectives. *Environ Int.* 2014;64: 83-90.
5. La Rosa P, Pellegrini M, Totta P, Acconcia F, Marino M. Xenoestrogens alter estrogen receptor (ER) α intracellular levels. *PLoS One.* 2014;9: e88961.
6. Vijayalaxmi, Thomas CR, Reiter RJ, Herman TS. Melatonin: from basic research to cancer treatment clinics. *J Clin Oncol.* 2002;20: 2575-2601.
7. 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: 487-492.
8. del Río B, García Pedrero JM, Martínez-Campa C, Zuazua P, Lazo PS, Ramos S. Melatonin, an endogenous-specific inhibitor of estrogen receptor alpha via calmodulin. *J Biol Chem.* 2004;279: 38294-38302.

9. Lawson NO, Wee BE, Blask DE, Castles CG, Spriggs LL, Hill SM. Melatonin decreases estrogen receptor expression in the medial preoptic area of inbred (LSH/SsLak) golden hamsters. *Biol Reprod.* 1992;47: 1082-1090.
10. Molis TM, Spriggs LL, Hill SM. Modulation of estrogen receptor mRNA expression by melatonin in MCF-7 human breast cancer cells. *Mol Endocrinol.* 1994;8: 1681-1690.
11. Kannen V, Marini T, Zanette DL, et al. The melatonin action on stromal stem cells within pericryptal area in colon cancer model under constant light. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011;405: 593-598.
12. Yoo YM, Jung EM, Choi KC, Jeung EB. Effect of melatonin on mRNA expressions of transcription factors in murine embryonic stem cells. *Brain Res.* 2011;1385: 1-7.
13. Huang X, Lee MR, Cooper S, et al. Activation of OCT4 enhances ex vivo expansion of human cord blood hematopoietic stem and progenitor cells by regulating HOXB4 expression. *Leukemia.* 2015.
14. Seymour T, Nowak A, Kakulas F. Targeting Aggressive Cancer Stem Cells in Glioblastoma. *Front Oncol.* 2015;5: 159.
15. Curry EL, Moad M, Robson CN, Heer R. Using induced pluripotent stem cells as a tool for modelling carcinogenesis. *World J Stem Cells.* 2015;7: 461-469.
16. Borin TF, Arbab AS, Gelaleti GB, et al. Melatonin decreases breast cancer metastasis by modulating ROCK-1 expression. *J Pineal Res.* 2015.
17. LaPensee EW, LaPensee CR, Fox S, Schwemberger S, Afton S, Ben-Jonathan N. Bisphenol A and estradiol are equipotent in antagonizing cisplatin-induced cytotoxicity in breast cancer cells. *Cancer Lett.* 2010;290: 167-173.
18. Mlynarcikova A, Macho L, Fickova M. Bisphenol A alone or in combination with estradiol modulates cell cycle- and apoptosis-related proteins and genes in MCF7 cells. *Endocr Regul.* 2013;47: 189-199.
19. Zhang W, Fang Y, Shi X, Zhang M, Wang X, Tan Y. Effect of bisphenol A on the EGFR-STAT3 pathway in MCF-7 breast cancer cells. *Mol Med Rep.* 2012;5: 41-47.
20. Li CI, Malone KE, Porter PL, et al. Relationship between long durations and different regimens of hormone therapy and risk of breast cancer. *JAMA.* 2003;289: 3254-3263.
21. Matthews JB, Twomey K, Zacharewski TR. In vitro and in vivo interactions of bisphenol A and its metabolite, bisphenol A glucuronide, with estrogen receptors alpha and beta. *Chem Res Toxicol.* 2001;14: 149-157.

22. Routledge EJ, White R, Parker MG, Sumpter JP. Differential effects of xenoestrogens on coactivator recruitment by estrogen receptor (ER) alpha and ERbeta. *J Biol Chem.* 2000;275: 35986-35993.
23. Proietti S, Cucina A, Reiter RJ, Bizzarri M. Molecular mechanisms of melatonin's inhibitory actions on breast cancers. *Cell Mol Life Sci.* 2013;70: 2139-2157.
24. Cos S, Blask DE. Effects of the pineal hormone melatonin on the anchorage-independent growth of human breast cancer cells (MCF-7) in a clonogenic culture system. *Cancer Lett.* 1990;50: 115-119.
25. Rato AG, Pedrero JG, Martinez MA, del Rio B, Lazo PS, Ramos S. Melatonin blocks the activation of estrogen receptor for DNA binding. *FASEB J.* 1999;13: 857-868.
26. Cos S, Garcia-Bolado A, Sánchez-Barceló EJ. Direct antiproliferative effects of melatonin on two metastatic cell sublines of mouse melanoma (B16BL6 and PG19). *Melanoma Res.* 2001;11: 197-201.
27. Wang YJ, Herlyn M. The emerging roles of Oct4 in tumor-initiating cells. A Review in the Theme: Cell and Molecular Processes in Cancer Metastasis. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2015: ajpcell.00212.02015.
28. Tai MH, Chang CC, Kiupel M, Webster JD, Olson LK, Trosko JE. Oct4 expression in adult human stem cells: evidence in support of the stem cell theory of carcinogenesis. *Carcinogenesis.* 2005;26: 495-502.
29. Woo MM, Tai CJ, Kang SK, Nathwani PS, Pang SF, Leung PC. Direct action of melatonin in human granulosa-luteal cells. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86: 4789-4797.
30. Kiefer T, Ram PT, Yuan L, Hill SM. Melatonin inhibits estrogen receptor transactivation and cAMP levels in breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat.* 2002;71: 37-45.

Conclusões

IV. CONCLUSÕES

O trabalho permitiu estabelecer as seguintes conclusões:

- O estrógeno e o bisfenol A aumentam a viabilidade celular, o número e o tamanho das mamosferas provenientes das linhagens de câncer de mama humano RE α -positivo (MCF-7) e Triplo-negativo (MDA-MB-231). Entretanto, o tratamento com melatonina reduz a viabilidade celular, o número e o tamanho das mamosferas, mesmo após a indução por Estrógeno e Bisfenol A;
- O estrógeno e o bisfenol A aumentam a expressão gênica e proteica do fator de transcrição de células-tronco OCT4 e do receptor de estrógeno (RE α) das mamosferas provenientes da linhagem MCF-7. No entanto, o tratamento com melatonina reduz a expressão gênica e proteica do OCT4 e do receptor de estrógeno das mamosferas provenientes das linhagens MCF-7 e MDA-MB-231;
- O estrógeno e o bisfenol A aumentam a atividade de ligação do RE α ao OCT4 das mamosferas provenientes da linhagem MCF-7. Ao contrário disso, o tratamento com melatonina reduz a atividade de ligação do receptor de estrógeno (RE α) ao gene OCT4, mesmo após a exposição ao estrógeno e bisfenol A.

Em conjunto, nossos dados sugerem que o efeito da melatonina sobre o *POU5F1* (*OCT4*) ocorre através da via do receptor de estrógeno nas células-tronco tumorais mamárias, sugerindo seu potencial terapêutico no tratamento do câncer de mama. Devido ao potencial altamente agressivo das células-tronco tumorais e de sua resistência a terapias, é de grande interesse estudos de novas drogas que atuam diretamente sobre essa população tumoral.

Referências

V. REFERÊNCIAS

ACCONCIA, F.; MARINO, M. The Effects of 17 β -estradiol in Cancer are Mediated by Estrogen Receptor Signaling at the Plasma Membrane. **Front Physiol**, v. 2, p. 30, 2011. ISSN 1664-042X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21747767> >.

ACUÑA-CASTROVIEJO, D. et al. Extrapineal melatonin: sources, regulation, and potential functions. **Cell Mol Life Sci**, v. 71, n. 16, p. 2997-3025, Aug 2014. ISSN 1420-9071. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24554058> >.

AL-HAJJ, M. et al. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100, n. 7, p. 3983-8, Apr 2003. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12629218> >.

AL-OMARY, F. A. Melatonin: comprehensive profile. **Profiles Drug Subst Excip Relat Methodol**, v. 38, p. 159-226, 2013. ISSN 1871-5125. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23668405> >.

ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J. **Biologia Molecular da Célula**. 5 ed. 2011.

ANVISA. Bisfenol A. Brasília: Ministério da Saúde, 2010.

BAKKEN, K. et al. Hormone replacement therapy and incidence of hormone-dependent cancers in the Norwegian Women and Cancer study. **Int J Cancer**, v. 112, n. 1, p. 130-4, Oct 2004. ISSN 0020-7136. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15305384> >.

BARTSCH, C. et al. Urinary melatonin levels in human breast cancer patients. **J Neural Transm**, v. 52, n. 4, p. 281-94, 1981. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6801199> >.

BERAL, V.; COLLABORATORS, M. W. S. Breast cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study. **Lancet**, v. 362, n. 9382, p. 419-27, Aug 2003. ISSN 1474-547X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12927427> >.

BERNARDO, P. E. M. et al. **Bisfenol A: o uso em embalagens para alimentos, exposição e toxicidade – Uma Revisão**. Revista do Instituto Adolfo Lutz. 74: 1-11 p. 2015.

BILU, C.; KRONFELD-SCHOR, N. Effects of circadian phase and melatonin injection on anxiety-like behavior in nocturnal and diurnal rodents. **Chronobiol Int**, v. 30, n. 6, p. 828-36, Jul 2013. ISSN 1525-6073. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23750894> >.

BONNET, D.; DICK, J. E. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. **Nat Med**, v. 3, n. 7, p. 730-7, Jul 1997. ISSN 1078-8956. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9212098> >.

BOZORGI, A.; KHAZAEI, M.; KHAZAEI, M. R. New Findings on Breast Cancer Stem Cells: A Review. **J Breast Cancer**, v. 18, n. 4, p. 303-12, Dec 2015. ISSN 1738-6756. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26770236> >.

CALCAGNO, A. M. et al. Prolonged drug selection of breast cancer cells and enrichment of cancer stem cell characteristics. **J Natl Cancer Inst**, v. 102, n. 21, p. 1637-52, Nov 2010. ISSN 1460-2105. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20935265> >.

CHEN, C. et al. [Interaction between microRNAs and OCT4]. **Zhongguo Fei Ai Za Zhi**, v. 18, n. 1, p. 55-8, Jan 2015. ISSN 1999-6187. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25603874> >.

CHLEBOWSKI, R. T. et al. Influence of estrogen plus progestin on breast cancer and mammography in healthy postmenopausal women: the Women's Health Initiative Randomized Trial. **JAMA**, v. 289, n. 24, p. 3243-53, Jun 2003. ISSN 1538-3598. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12824205> >.

COHEN, M.; LIPPMAN, M.; CHABNER, B. Role of pineal gland in aetiology and treatment of breast cancer. **Lancet**, v. 2, n. 8094, p. 814-6, Oct 1978. ISSN 0140-6736. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/81365> >.

COLDITZ, G. A. Menopausal hormone therapy after breast cancer. **Breast Cancer Res**, v. 7, n. 4, p. 168-70, 2005. ISSN 1465-542X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15987471> >.

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, Aug 2014. ISSN 1792-1074. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25009641> >.

CREMOUX, P. Hormonothérapie des cancers du sein. **Bull cancer**, p.1311-9, 2011.

CURRY, E. L. et al. Using induced pluripotent stem cells as a tool for modelling carcinogenesis. **World J Stem Cells**, v. 7, n. 2, p. 461-9, Mar 2015. ISSN 1948-0210. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25815129> >.

DEL RÍO, B. et al. Melatonin, an endogenous-specific inhibitor of estrogen receptor alpha via calmodulin. **J Biol Chem**, v. 279, n. 37, p. 38294-302, Sep 2004. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15229223> >.

DI BELLA, G. et al. Melatonin anticancer effects: review. **Int J Mol Sci**, v. 14, n. 2, p. 2410-30, 2013. ISSN 1422-0067. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23348932> >.

DONOVAN, P. J.; GEARHART, J. The end of the beginning for pluripotent stem cells. **Nature**, v. 414, n. 6859, p. 92-7, Nov 2001. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11689953> >.

DOWSETT, M. et al. Comparison of PAM50 risk of recurrence score with oncotype DX and IHC4 for predicting risk of distant recurrence after endocrine therapy. **J Clin Oncol**, v. 31, n. 22, p. 2783-90, Aug 2013. ISSN 1527-7755. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23816962> >.

DUFFY, M. J.; O'DONOVAN, N.; CROWN, J. Use of molecular markers for predicting therapy response in cancer patients. **Cancer Treat Rev**, v. 37, n. 2, p. 151-9, Apr 2011. ISSN 1532-1967. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20685042> >.

EISENBERG, A. L. A.; KOIFMAN, S. Câncer de mama: Marcadores tumorais. **Revista brasileira de cancerologia**, v. 47, p. 377-388, 2001.

ESPINO, J.; PARIENTE, J. A.; RODRÍGUEZ, A. B. Oxidative stress and immunosenescence: therapeutic effects of melatonin. **Oxid Med Cell Longev**, v. 2012, p. 670294, 2012. ISSN 1942-0994. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23346283> >.

FACCIOLÁ, G. et al. Cytochrome P450 isoforms involved in melatonin metabolism in human liver microsomes. **Eur J Clin Pharmacol**, v. 56, n. 12, p. 881-8, Mar 2001. ISSN 0031-6970. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11317475> >.

FERLAY, J. et al. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. **Int J Cancer**, v. 127, n. 12, p. 2893-917, Dec 2010. ISSN 1097-0215. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21351269> >.

FILIPITS, M. et al. The PAM50 risk-of-recurrence score predicts risk for late distant recurrence after endocrine therapy in postmenopausal women with endocrine-responsive early breast cancer. **Clin Cancer Res**, v. 20, n. 5, p. 1298-305, Mar 2014. ISSN 1078-0432. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24520097> >.

FOSTER, C. E. et al. Structures of mammalian cytosolic quinone reductases. **Free Radic Biol Med**, v. 29, n. 3-4, p. 241-5, Aug 2000. ISSN 0891-5849. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11035252> >.

FRIEL, P. N.; HINCHCLIFFE, C.; WRIGHT, J. V. Hormone replacement with estradiol: conventional oral doses result in excessive exposure to estrone. **Altern Med Rev**, v. 10, n. 1, p. 36-41, Mar 2005. ISSN 1089-5159. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15771561> >.

GERRARD, L. et al. Stably transfected human embryonic stem cell clones express OCT4-specific green fluorescent protein and maintain self-renewal and pluripotency. **Stem Cells**, v. 23, n. 1, p. 124-33, 2005. ISSN 1066-5099. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15625129> >.

GONZALEZ-ANGULO, A. M.; MORALES-VASQUEZ, F.; HORTOBAGYI, G. N. Overview of resistance to systemic therapy in patients with breast cancer. **Adv Exp Med Biol**, v. 608, p. 1-22, 2007. ISSN 0065-2598. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17993229> >.

GUTMAN, A.; SHOENFELD, Y. [BISPHENOL A--AN INFAMOUS MOLECULE]. **Harefuah**, v. 154, n. 11, p. 708-10, 742, 741, Nov 2015. ISSN 0017-7768. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26821503> >.

HAMMACHI, F. et al. Transcriptional activation by Oct4 is sufficient for the maintenance and induction of pluripotency. **Cell Rep**, v. 1, n. 2, p. 99-109, Feb 2012. ISSN 2211-1247. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22832160> >.

HANSTEIN, B. et al. Insights into the molecular biology of the estrogen receptor define novel therapeutic targets for breast cancer. **Eur J Endocrinol**, v. 150, n. 3, p. 243-55, Mar 2004. ISSN 0804-4643. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15012607> >.

HICKS, D. G.; KULKARNI, S. Trastuzumab as adjuvant therapy for early breast cancer: the importance of accurate human epidermal growth factor receptor 2 testing. **Arch Pathol Lab Med**, v.

132, n. 6, p. 1008-15, Jun 2008. ISSN 1543-2165. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18517261> >.

HILL, S. M. et al. Molecular mechanisms of melatonin anticancer effects. **Integr Cancer Ther**, v. 8, n. 4, p. 337-46, Dec 2009. ISSN 1552-695X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20050373> >.

HSIAO, Y. H. et al. Breast cancer heterogeneity: mechanisms, proofs, and implications. **J Cancer**, v. 1, p. 6-13, 2010. ISSN 1837-9664. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20842218> >.

HUANG, X. et al. Activation of OCT4 enhances ex vivo expansion of human cord blood hematopoietic stem and progenitor cells by regulating HOXB4 expression. **Leukemia**, Jul 2015. ISSN 1476-5551. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26202933> >.

IARC. International Agency for Research on Cancer. <http://www.iarc.fr/en/research-groups/sec1/index.php>, 2016. Acesso em: 18/04/2016.

INCA. Estimativas da incidência e mortalidade por câncer. www.inca.gov.br, 2003.

INCA. Estimativas da incidência e mortalidade por câncer. www.inca.gov.br, 2016.

INCA. Estimativas da incidência e mortalidade por câncer. www.inca.gov.br, 2014.

IPCT. Células-tronco. 2016.

JABLONSKA, K. et al. Expression of melatonin receptor MT1 in cells of human invasive ductal breast carcinoma. **J Pineal Res**, v. 54, n. 3, p. 334-45, Apr 2013. ISSN 1600-079X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23330677> >.

JUNG, J. W. et al. Metformin represses self-renewal of the human breast carcinoma stem cells via inhibition of estrogen receptor-mediated OCT4 expression. **PLoS One**, v. 6, n. 11, p. e28068, 2011. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22132214> >.

KANNEN, V. et al. The melatonin action on stromal stem cells within pericryptal area in colon cancer model under constant light. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 405, n. 4, p. 593-8, Feb 2011. ISSN 1090-2104. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21266165> >.

KEY, T. J.; ALLEN, N. E. Hormones and breast cancer. **IARC Sci Publ**, v. 156, p. 273-6, 2002. ISSN 0300-5038. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12484186> >.

KLEINSMITH, L. J. et al. Understanding estrogen receptors, tamoxifen and raloxifene. Bethesda, MD, 2005.

KRISHNAN, A. V. et al. Bisphenol-A: an estrogenic substance is released from polycarbonate flasks during autoclaving. **Endocrinology**, v. 132, n. 6, p. 2279-86, Jun 1993. ISSN 0013-7227. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8504731> >.

KRÓLIK, M.; MILNEROWICZ, H. The effect of using estrogens in the light of scientific research. **Adv Clin Exp Med**, v. 21, n. 4, p. 535-43, 2012 Jul-Aug 2012. ISSN 1899-5276. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23240460> >.

KUIPER, G. G. et al. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. **Endocrinology**, v. 138, n. 3, p. 863-70, Mar 1997. ISSN 0013-7227. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9048584> >.

LA ROSA, P. et al. Xenoestrogens alter estrogen receptor (ER) α intracellular levels. **PLoS One**, v. 9, n. 2, p. e88961, 2014. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24586459> >.

LAPENSEE, E. W. et al. Bisphenol A and estradiol are equipotent in antagonizing cisplatin-induced cytotoxicity in breast cancer cells. **Cancer Lett**, v. 290, n. 2, p. 167-73, Apr 2010. ISSN 1872-7980. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19796866> >.

LAWSON, N. O. et al. Melatonin decreases estrogen receptor expression in the medial preoptic area of inbred (LSH/SsLak) golden hamsters. **Biol Reprod**, v. 47, n. 6, p. 1082-90, Dec 1992. ISSN 0006-3363. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1493172> >.

LI, X. et al. Curcumin modulates miR-19/PTEN/AKT/p53 axis to suppress bisphenol A-induced MCF-7 breast cancer cell proliferation. **Phytother Res**, v. 28, n. 10, p. 1553-60, Oct 2014. ISSN 1099-1573. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24831732> >.

LINN, D. E. et al. A Role for OCT4 in Tumor Initiation of Drug-Resistant Prostate Cancer Cells. **Genes Cancer**, v. 1, n. 9, p. 908-16, Sep 2010. ISSN 1947-6027. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21779471> >.

LISSONI, P. et al. Endocrine effects of human recombinant interleukin-3 in cancer patients. **Int J Biol Markers**, v. 7, n. 4, p. 230-3, 1992 Oct-Dec 1992. ISSN 0393-6155. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1337088> >.

MAGANHIN, C. C. et al. [Melatonin effects on the female genital system: a brief review]. **Rev Assoc Med Bras**, v. 54, n. 3, p. 267-71, 2008 May-Jun 2008. ISSN 0104-4230. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18604407> >.

MANI, S. A. et al. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. **Cell**, v. 4, n. 133, p. 704-15, May 2008. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18485877> >.

MAXIMOV, P. Y.; LEE, T. M.; JORDAN, V. C. The discovery and development of selective estrogen receptor modulators (SERMs) for clinical practice. **Curr Clin Pharmacol**, v. 8, n. 2, p. 135-55, May 2013. ISSN 2212-3938. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23062036> >.

MEDIAVILLA, M. D. et al. Basic mechanisms involved in the anti-cancer effects of melatonin. **Curr Med Chem**, v. 17, n. 36, p. 4462-81, 2010. ISSN 1875-533X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21062257> >.

MICHAŁOWICZ, J. Bisphenol A--sources, toxicity and biotransformation. **Environ Toxicol Pharmacol**, v. 37, n. 2, p. 738-58, Mar 2014. ISSN 1872-7077. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24632011> >.

MITTELSTAEDT, M. Canada first to declare Bisphenol A toxic. **The Globe and Mail**, 2010.

MOLIS, T. M.; SPRIGGS, L. L.; HILL, S. M. Modulation of estrogen receptor mRNA expression by melatonin in MCF-7 human breast cancer cells. **Mol Endocrinol**, v. 8, n. 12, p. 1681-90, Dec 1994. ISSN 0888-8809. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7708056> >.

NAGARAJAN, S. et al. Bromodomain protein BRD4 is required for estrogen receptor-dependent enhancer activation and gene transcription. **Cell Rep**, v. 8, n. 2, p. 460-9, Jul 2014. ISSN 2211-1247. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25017071> >.

OZOLS, R. F. et al. Clinical cancer advances 2006: major research advances in cancer treatment, prevention, and screening--a report from the American Society of Clinical Oncology. **J Clin Oncol**, v. 25, n. 1, p. 146-62, Jan 2007. ISSN 1527-7755. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17158528> >.

PEDERSEN, L. et al. The prognostic influence of multifocality in breast cancer patients. **Breast**, v. 13, n. 3, p. 188-93, Jun 2004. ISSN 0960-9776. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15177420> >.

PONTI, D. et al. Isolation and in vitro propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor cell properties. **Cancer Res**, v. 13, n. 65, p. 5506-11, Jul 2005. ISSN 1538-7445. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15994920> >.

PROIETTI, S. et al. Molecular mechanisms of melatonin's inhibitory actions on breast cancers. **Cell Mol Life Sci**, v. 70, n. 12, p. 2139-57, Jun 2013. ISSN 1420-9071. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23007844> >.

RADIO, N. M.; DOCTOR, J. S.; WITT-ENDERBY, P. A. Melatonin enhances alkaline phosphatase activity in differentiating human adult mesenchymal stem cells grown in osteogenic medium via MT2 melatonin receptors and the MEK/ERK (1/2) signaling cascade. **J Pineal Res**, v. 40, n. 4, p. 332-42, May 2006. ISSN 0742-3098. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16635021> >.

RENOIR, J. M.; MARSAUD, V.; LAZENNEC, G. Estrogen receptor signaling as a target for novel breast cancer therapeutics. **Biochem Pharmacol**, v. 85, n. 4, p. 449-65, Feb 2013. ISSN 1873-2968. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23103568> >.

REZG, R. et al. Bisphenol A and human chronic diseases: current evidences, possible mechanisms, and future perspectives. **Environ Int**, v. 64, p. 83-90, Mar 2014. ISSN 1873-6750. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24382480> >.

RICCI-VITIANI, L. et al. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. **Nature**, v. 445, n. 7123, p. 111-5, Jan 2007. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17122771> >.

ROSSOUW, J. E. et al. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. **JAMA**, v. 288, n. 3, p. 321-33, Jul 2002. ISSN 0098-7484. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12117397> >.

RUSSO, J.; RUSSO, I. H. The role of estrogen in the initiation of breast cancer. **J Steroid Biochem Mol Biol**, v. 102, n. 1-5, p. 89-96, Dec 2006. ISSN 0960-0760. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17113977> >.

SEYMOUR, T.; NOWAK, A.; KAKULAS, F. Targeting Aggressive Cancer Stem Cells in Glioblastoma. **Front Oncol**, v. 5, p. 159, 2015. ISSN 2234-943X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26258069> >.

SINGH, S. K. et al. Identification of human brain tumour initiating cells. **Nature**, v. 432, n. 7015, p. 396-401, Nov 2004. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15549107> >.

SNOUSSI, K. et al. Combined effects of IL-8 and CXCR2 gene polymorphisms on breast cancer susceptibility and aggressiveness. **BMC Cancer**, v. 10, p. 283, 2010. ISSN 1471-2407. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20540789> >.

SÁNCHEZ-BARCELÓ, E. J. et al. Melatonin and mammary cancer: a short review. **Endocr Relat Cancer**, v. 10, n. 2, p. 153-9, Jun 2003. ISSN 1351-0088. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12790777> >.

TORRES, C. G.; OLIVARES, A.; STOORE, C. Simvastatin exhibits antiproliferative effects on spheres derived from canine mammary carcinoma cells. **Oncol Rep**, v. 5, n. 33, p. 2235-44, May 2015. ISSN 1791-2431. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25778435> >.

VOGEL, S. A. The politics of plastics: the making and unmaking of bisphenol a "safety". **Am J Public Health**, v. 99 Suppl 3, p. S559-66, Nov 2009. ISSN 1541-0048. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19890158> >.

WHO. **World Cancer Report**. Lyon: International Agency for Research on Cancer. 2008.

YE, X. et al. Garcinol, an acetyltransferase inhibitor, suppresses proliferation of breast cancer cell line MCF-7 promoted by 17 β -estradiol. **Asian Pac J Cancer Prev**, v. 15, n. 12, p. 5001-7, 2014. ISSN 1513-7368. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24998578> >.

YOO, Y. M. et al. Effect of melatonin on mRNA expressions of transcription factors in murine embryonic stem cells. **Brain Res**, v. 1385, p. 1-7, Apr 2011. ISSN 1872-6240. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21349252> >.

ZANETTI, J. S.; OLIVEIRA, L. R.; RIBEIRO-SILVA, A. Câncer de mama: De perfis moleculares a células-tronco. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, v. 9, p. 277-292, 2011.

ZEINEDDINE, D. et al. The Oct4 protein: more than a magic stemness marker. **Am J Stem Cells**, v. 3, n. 2, p. 74-82, 2014. ISSN 2160-4150. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25232507> >.

VI. ANEXOS

ANEXO A - Comprovante de submissão do artigo: Melatonin decreases estrogen receptor binding to estrogen response elements sites on the OCT4 gene in human breast cancer stem cells ao periódico *Genes & Cancer*.

Dear Debora Zuccari,

On April 27, 2016, Genes & Cancer received your manuscript entitled "Melatonin decreases estrogen receptor binding to estrogen response elements sites on the OCT4 gene in human breast cancer stem cells" by Juliana Lopes, David Arnosti, James E. Trosko, Mei-Hui Tai, and Debora Zuccari.

Please refer to manuscript tracking number MS#000125 in any correspondence with the Editors or Publisher.

To view the progress of your manuscript please click on the URL below at any time:

<http://genesandcancer.msubmit.net/cgi-bin/main.plex?el=A7JH6GoY3A5qFD1F5A9ftdsJ2cQovhFzTd2qFVxenBLgZ>

(Press/Click on the above link to be automatically sent to the web page.)

Thank you for submitting your work to Genes & Cancer

Sincerely,

Genes & Cancer Editorial Staff

ANEXO B - Comprovante de submissão do artigo: **Evaluation of melatonin effect on human breast cancer stem cells using a three-dimensional growth method of mammospheres** ao periódico *Anti-cancer agents in Medicinal Chemistry*.

Reference#: BSP-ACAMC-2016-853

Submission Title: Evaluation of melatonin effect on human breast cancer stem cells using a three-dimensional growth method of mammospheres

Dear Dr. Debora Aparecida Pires De Campos Zuccari,

Thank you for your submission to *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*. It will be sent to the Editor in Chief for his approval, and once this is obtained for peer-reviewing, on the understanding that the manuscript contains original work that has neither been published earlier nor has simultaneously been submitted elsewhere. In case this is not so, please let us know immediately.

Please note that Bentham Science uses **CrossCheck's iThenticate software** to check for similarities between the submitted and already published material to minimise any chances of plagiarism.

Further, as per Bentham Science's **Ethical Guidelines for Publication**, all manuscript are processed with the understanding that all authors and co-authors have reviewed and accordingly approved the manuscript before final submission to avoid any conflicts of interest later. Our ethical policies can be viewed at: <http://benthamscience.com/journals/anti-cancer-agents-in-medicinal-chemistry/editorial-policies/#top>.

In case of any doubt or conflict please contact us immediately.

Your manuscript has been assigned to the following Editor/Manager, to whom all correspondence is to be addressed:

Name:Michelle Prudhomme

Affiliation: Universite Blaise Pascal C.N.R.S. U.F.R. de Recherche Scientifique et Te

Country:France

Email:Michelle.PRUDHOMME@univ-bpclermont.fr

Looking forward to the successful publication of your article.

In case of delay, please feel free to write info@benthamscience.org

Sincerely,

Editorial Office

Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry
