



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

Jéssica Zani Lacerda

Efeito da melatonina na modulação dos miRNAs envolvidos na
angiogênese em câncer de mama

São José do Rio Preto
2019

Jéssica Zani Lacerda

Efeito da melatonina na modulação dos miRNAs envolvidos na
angiogênese em câncer de mama

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

Financiadora: CAPES
FAPESP – Proc. 2015/04780-6

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

São José do Rio Preto
2019

L131e Lacerda, Jéssica Zani
Efeito da melatonina na modulação dos miRNAs envolvidos na angiogênese em câncer de mama / Jéssica Zani Lacerda. -- São José do Rio Preto, 2019
91 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto
Orientadora: Debora Aparecida Pires de Campos Zuccari

1. angiogênese. 2. câncer de mama triplo-negativo. 3. melatonina. 4. microRNA. 5. pineal. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Jéssica Zani Lacerda

Efeito da melatonina na modulação dos miRNAs envolvidos na
angiogênese em câncer de mama

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

Financiadora: CAPES
FAPESP – Proc. 2015/04780-6

Comissão Examinadora

Prof^a. Dr^a. Debora Aparecida Pires de Campos Zuccari
FAMERP – Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
Orientador

Prof^a. Dr^a. Sonia Maria Olini
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto

Prof^a. Dr^a. Flávia Cristina Rodrigues Lisoni
UNESP – Câmpus de Ilha Solteira

Prof^a. Dr^a. Dorotéia Rossi Silva Souza
FAMERP – Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto

Prof^a. Dr^a. Marina Gobbe Moschetta
UNIP – Universidade Paulista

São José do Rio Preto
18 de fevereiro de 2019

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Investigação Molecular no Câncer (LIMC) da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP), SP, Brasil, sob orientação da Profa. Dra. Debora Aparecida Pires de Campos Zuccari, com apoio financeiro em forma de bolsa de estudos fornecida pela Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Auxílio à pesquisa da Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, Processo nº 2015/04780-6).

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Katia e Jaudir, pelo amor, apoio e dedicação durante todas as etapas da minha vida. Obrigada por acreditarem nos meus sonhos e me apoiarem em todas as minhas escolhas.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre conceder graças em minha vida e me fazer crescer nas dificuldades encontradas em meu caminho.

Ao Programa de Pós-graduação em Biociências do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE/UNESP), pelo suporte e por possibilitar a realização desse trabalho.

À Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Biociências do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE/UNESP), Profa. Dra. Claudia Regina Bonini Domingos, por sempre estar disposta a ajudar e pelo apoio em todos os momentos da realização desse trabalho.

À Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro na forma de bolsa de estudos. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

À Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, processo nº 2015/04780-6) pelo Auxílio à pesquisa concedido para o desenvolvimento do projeto.

À Fundação de Apoio à Pesquisa e Extensão de São José do Rio Preto (FAPERP) pelo auxílio financeiro concedido.

À Profa. Dra. Debora Aparecida Pires de Campos Zuccari pela orientação, ensinamentos, dedicação, paciência e incentivo em todos os momentos do trabalho.

Ao Prof. Dr. Marcio Chaim Bajgelman pela colaboração e disponibilização do Laboratório de Vetores Virais (LVV) do Centro de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM) - Campinas, SP, para a realização da técnica de clonagem.

Aos membros da banca examinadora do Exame geral de qualificação, Profa. Dra. Claudia Regina Bonini Domingos e Profa. Dra. Patrícia Matos Biselli Chicote, pelas valiosas sugestões que foram de extrema importância para a minha tese.

À banca examinadora Profa. Dra. Sonia Maria Olini, Profa. Dra. Flávia Cristina Rodrigues Lisoni, Profa. Dra. Dorotéia Rossi Silva Souza, Profa. Dra. Marina Gobbe Moschetta, por terem aceitado participar da minha banca de defesa e contribuírem para o enriquecimento do trabalho.

Aos valiosos companheiros do Laboratório de Investigação Molecular no Câncer (LIMC), equipe de exemplar trabalho e dedicação.

Às companheiras Lívia C. Ferreira, Beatriz C. Lopes, Jéssica G. Oliveira, Jéssica H. M. Marques, por estarem presentes em todos os momentos dessa fase da minha vida, pelo apoio, dedicação e amizade.

Ao Felipe Sanches, por sempre estar ao meu lado, pelo carinho, compreensão, ajuda e por sempre acreditar na minha capacidade.

Aos meus familiares e amigos, pelo apoio e incentivo, que de uma ou de outra maneira deram crédito ao meu trabalho.

Enfim, a todos que de alguma maneira contribuíram para a realização desse trabalho e minha formação durante esse tempo. Meu singelo e sincero agradecimento.

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

(Chico Xavier)

RESUMO

O câncer de mama apresenta alta incidência e alta taxa de mortalidade devido a rápida progressão tumoral e disseminação metastática que ocorrem com o incentivo da angiogênese. MicroRNAs (miRNAs) são pequenas moléculas de RNA mensageiro (RNAm) não codificantes que desempenham papel fundamental na regulação gênica. A desregulação dessas moléculas está relacionada com a iniciação e progressão de diferentes tipos tumorais humanos, incluindo o câncer de mama. Existem fortes evidências de miRNAs atuando como oncogenes e supressores tumorais, regulando o processo de angiogênese, crescimento tumoral e metástase. É neste cenário que a melatonina, hormônio secretado pela glândula pineal, vem ganhando destaque como potencial tratamento contra o câncer de mama por apresentar efeitos oncostáticos, antiangiogênicos, além de atuar na regulação da expressão de miRNAs. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o potencial valor terapêutico da melatonina na regulação do supressor tumoral miR-148a-3p e relação com a progressão tumoral e angiogênese. Inicialmente, células tumorais de mama MDA-MB-231 foram cultivadas nas condições experimentais controle e tratamento com melatonina (1 mM). O *PCR Array* foi realizado para análise da expressão de 84 miRNAs relacionados com o câncer de mama e, após análise em banco de dados e literatura, o miR-148a-3p foi selecionado para validação. As células MDA-MB-231 foram cultivadas em quatro grupos experimentais: controle, tratamento com melatonina (1 mM), superexpressão do miR-148a-3p e controle do processo de superexpressão e, após, foi realizado PCR em tempo real para análise da expressão gênica do miR-148a-3p e seus alvos Receptor do fator de crescimento semelhante a insulina-tipo 1 (IGF-1R) e Fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF). Os níveis proteicos de IGF-1R e VEGF foram quantificados por imunocitoquímica e *western blotting*. Ensaio de migração e invasão celular foram realizados para avaliar a potencial capacidade das células tumorais sofrerem metástases. Por fim, células MDA-MB-231 foram implantadas no flanco de camundongos Balb-C nude atímicos para desenvolvimento tumoral, sendo divididos em dois grupos experimentais mantidos por 21 dias: controle e melatonina (40 mg/kg). Após a coleta dos tumores, foi realizada a análise da expressão gênica e

proteica do miR-148a-3p, IGF-1R e VEGF. A análise da expressão dos miRNAs por *PCR array* revelou que a melatonina regulou a expressão de 24 miRNAs negativamente e 8 miRNAs positivamente. Além disso, a melatonina aumentou a expressão gênica do miR-148a-3p, diminuiu a expressão gênica e proteica de IGF-1R e VEGF, e teve efeito inibitório na sobrevivência, migração e invasão celular. O modelo xenográfico mostrou que a melatonina aumentou a expressão do miR-148a-3p e diminuiu a expressão gênica e proteica de IGF-1R e VEGF. Nossos resultados confirmam a ação da melatonina na regulação do miR-148a-3p e processo de angiogênese tumoral, além de desempenhar importante papel na progressão do tumor de mama, sendo crucial para o estabelecimento de novos protocolos terapêuticos.

Palavras-chave: angiogênese, câncer de mama triplo-negativo, melatonina, microRNA, pineal.

ABSTRACT

Breast cancer has a high incidence and high mortality rate due to rapid tumor progression and metastatic dissemination that occur with the encouragement of angiogenesis. MicroRNAs (miRNAs) are small non-coding messenger RNA (mRNA) molecules that play a key role in gene regulation. Deregulation of these molecules is related to the initiation and progression of different human tumor types, including breast cancer. There is strong evidence for miRNAs acting as oncogenes and tumor suppressors, regulating the process of angiogenesis, tumor growth and metastasis. It is in this scenario that melatonin, a hormone secreted by the pineal gland, has been gaining prominence as a potential treatment against breast cancer for having oncostatic and antiangiogenic effects, in addition to regulating the expression of miRNAs. Thus, the objective of this study was to evaluate the potential therapeutic value of melatonin in the regulation of the tumor suppressor miR-148a-3p and its relation to tumor progression and angiogenesis. Initially, MDA-MB-231 breast tumor cells were cultured under the experimental control and treatment conditions with melatonin (1 mM). The PCR Array was performed to analyze the expression of 84 miRNAs related to breast cancer and, after analysis in the database and literature, miR-148a-3p was selected for validation. MDA-MB-231 cells were cultured in four experimental groups: control, treatment with melatonin (1 mM), overexpression of miR-148a-3p and control of the overexpression process, and then real-time PCR was performed for analysis of gene expression of miR-148a-3p and its targets Insulin-like growth factor-1 receptor (IGF-1R) and vascular endothelial growth factor (VEGF). Protein levels of IGF-1R and VEGF were quantified by immunocytochemistry and western blotting. Migration and cell invasion assays were performed to assess the potential ability of tumor cells to undergo metastasis. Finally, MDA-MB-231 cells were implanted on the flank of nude Balb-C mice for tumor development, divided into two experimental groups maintained for 21 days: control and melatonin (40 mg / kg). After collection of the tumors, the analysis of the gene and protein expression of miR-148a-3p, IGF-1R and VEGF was performed. Analysis of miRNA expression by PCR array revealed that melatonin regulated expression of 24 negatively miRNAs and 8 miRNAs positively. In addition, melatonin increased miR-148a-3p gene expression, decreased gene and protein expression of IGF-1R and VEGF, and had an inhibitory

effect on cell survival, migration, and invasion. The xenographic model showed that melatonin increased the expression of miR-148a-3p and decreased the gene and protein expression of IGF-1R and VEGF. Our results confirm the action of melatonin on the regulation of miR-148a-3p and tumor angiogenesis process, and play an important role in the progression of breast tumor, being crucial for the establishment of new therapeutic protocols.

Keywords: *angiogenesis, triple-negative breast cancer, melatonin, microRNA, pineal.*

Lista de figuras

Figura 1. Etapas do processo de angiogênese tumoral	23
Figura 2. Biogênese do miRNA	25
Figura 3. Papel dos miRNAs no câncer.....	27
Figura 4. Ação dos miRNAs na tumorigênese.....	28
Figura 5. Sequência dos miRNAs membros da família miR-148/-152.....	29
Figura 6. Via de sinalização do IGF-1R.....	30
Figura 7. Interação VEGF-VEGFR-2 e vias de sinalização em células endoteliais ..	32
Figura 8. Síntese de melatonina na glândula pineal.....	33
Figura 9. Vias de ação da melatonina.	35

Lista de figuras do manuscrito

Figure 1. Analysis of gene expression after melatonin treatment or miR-148a-3p overexpression	62
Figure 2. Analysis of protein expression by Western blotting	63
Figure 3. Analysis of protein expression by Immunocytochemistry	64
Figure 4. Analysis of clonogenic survival, migration and invasion assays	65
Figure 5. Analysis of the relative gene expression in tumors.....	66
Figure 6. Protein expression of VEGF and IGF-1R by immunohistochemistry in tumors treated and untreated with melatonin	67
Graphical abstract	68
Figure 1S. RT ² Profiler™ PCR Array Human Breast Cancer Plate. Gene profile profile composed of 84 mature miRNAs related to breast cancer	70
Figure 2S. MiRNAs with low (A) and high (B) expression after treatment with melatonin.....	71

Lista de abreviações

5-HTP	5-Hidroxitriptofano
AA-NAT	Arilalquilamina N-acetiltransferase
ACTB	Beta actina
AKT	Proteína quinase B
AU	Unidades arbitrárias
BSA	Albumina do soro bovino
cDNA	DNA complementar
Ct	Limiar de eficiência do ciclo
DGCR8	Gene da região crítica da síndrome de DiGeorge 8
DMEM	Meio Dulbecco modificado por glicose
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DRM2	DNA metiltransferase
Exp5	Exportina-5
FBS	Soro fetal bovino
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GFP	Proteína verde fluorescente
HCC1143	Linhagem celular epitelial humana derivada de carcinoma ductal invasivo sem metástases linfonodais
HCT116	Linhagem celular humana derivada de carcinoma colorretal
HIF-1α	Fator induzível por hipóxia-1 α
HIOMT	Hidroxi-indol O-Metiltransferase
IGF-1	Fator de crescimento semelhante a insulina-tipo 1
IGF-1R	Receptor do fator de crescimento semelhante a insulina-tipo 1
IgG	Imunoglobulina G
IL-2	Interleucina-2
IRS	Substrato do receptor de insulina
MAPK	Proteino-quinases ativadas por mitógenos
MCF-7	Linhagem celular de carcinoma de mama humano, receptor de estrógeno positivo
MDA-MB-231	Linhagem celular de carcinoma de mama humano triplo-negativa
MiRNA	MicroRNA
MMP-2	Metaloproteinase de matriz-2

MMP-9	Metaloproteinase de matriz-9
MMP-13	Metaloproteinase de matriz-13
MT1	Receptor de melatonina tipo 1
MT2	Receptor de melatonina tipo 2
mTOR	Proteína alvo da rapamicina em mamíferos
MOD	Densidade óptica média
NAS	N-acetilserotonina
PI3K	Enzima fosfatidilinositol-3-quinase
PLGF-1	Fator de crescimento placentário
pré-miRNA	MiRNA maduro
Pri-RNA	RNA primário
RAS	RAt Sarcoma vírus
RISC	Complexo de silenciamento induzido por RNA
RNA	Ácido Ribonucleico
RNAm	RNA mensageiro
ROR	Receptor órfão para retinoide
ROS	Radicais livres
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase da transcrição reversa em tempo real
RZR	Receptor Z para retinoide
snRNA	Pequeno RNA nuclear
TNF	Fator de necrose tumoral
TPH1	Triptofano hidroxilase 1
UTR	Região não traduzida
U6	U6 spliceosomal RNA
VEGF	Fator de crescimento do endotélio vascular
VEGFR	Receptor do Fator de crescimento do endotélio vascular
$\Delta\Delta Ct$	Diferença da diferença do ciclo limiar

Sumário

1 Introdução	19
1.1. Câncer de mama	20
1.2. Progressão tumoral e processo de angiogênese	21
1.3. MiRNAs no câncer de mama e angiogênese	24
1.4. MiRNA-148a e seus alvos IGF-1R e VEGF	28
1.5. Melatonina	32
2 Objetivos	37
2.1. Objetivo geral	38
2.2. Objetivos específicos	38
3 Capítulo 1	39
Therapeutic Potential of Melatonin in the Regulation of MiR-148a-3p and angiogenic Factors in Breast Cancer	
3.1. Introduction	42
3.2. Material and methods	43
3.2.1. Cell culture and experimental groups	43
3.2.2. Experimental groups	44
3.2.3. Overexpression of miR-148a-3p	44
3.2.4. Quantitative RT-PCR	44
3.2.5. Protein extraction and Western blotting	45
3.2.6. Immunocytochemistry	46
3.2.7. Clonogenic assay	46
3.2.8. Cell migration and invasion assay	46
3.2.9. Xenograft model	47
3.2.10. RNA extraction	48
3.2.11. Immunohistochemistry	48
3.2.12. Statistical analysis	49
3.3 Results	49
3.3.1. Melatonin treatment and upregulated expression of miR-148a-3p were inversely associated with the gene level of IGF-1R and VEGF	49
3.3.2. Melatonin treatment and upregulated expression of miR-148a-3p decrease the protein expression of IGF-1R and VEGF	50

3.3.3. Melatonin and overexpression of miR-148a-3p on clonogenic survival, cell migration and invasion.....	50
3.3.4. Melatonin inhibits the expression of angiogenic factors	50
3.4. Discussion.....	51
3.5. Conclusion	54
3.6. Conflict of interest	54
3.7. Acknowledgments	54
3.8. Author contributions	54
3.9. List of abbreviations	55
3.10. Ethics approval.....	55
3.11. Human and animal rights	55
3.12. References.....	55
3.13. Figures	62
3.14. Supplementary material	68
4 Discussão	72
5 Conclusões	77
6 Referências	79
7 Anexos	89
7.1. ANEXO 1.....	90
7.2. ANEXO 2.....	91

Apresentação

Os resultados dessa tese de Doutorado originaram o manuscrito intitulado “Therapeutic Potential of Melatonin in the Regulation of MiR-148a-3p and Angiogenic Factors in Breast Cancer” (**CAPÍTULO 1**) que foi submetido para a revista *MicroRNA* (**ANEXO 1**).

Paralelamente ao trabalho de Doutorado, participei de outras investigações desenvolvidas com linhagens de câncer de mama, melatonina e outros miRNAs. O artigo intitulado “Melatonin restrains angiogenic factors in triple-negative breast cancer by targeting miR-152-3p: *In vivo* and *in vitro* studies.” foi publicado na revista *Life Science* (**ANEXO 2**) e os artigos “Melatonin role on miRNAs modulation in triple-negative breast cancer cells” e “Melatonin down-regulates microRNA-10a and decreases invasion and migration of triple-negative breast cancer cells” foram submetidos e aguardam publicação.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Câncer de mama

O câncer de mama é a neoplasia mais comum entre as mulheres no Brasil e no mundo, depois do de pele do tipo não melanoma, respondendo por cerca de 25% dos casos novos a cada ano. No Brasil, foi estimada a ocorrência de 59.700 novos casos e 15.403 mortes por câncer de mama para 2018. Acredita-se que aproximadamente uma a cada oito mulheres será afetada por este mal durante a vida (“INCA - Instituto Nacional de Câncer”, 2018).

O desenvolvimento dessa neoplasia não apresenta uma causa única e específica. Diversos fatores aumentam o risco de desenvolver a doença, tais como a idade, fatores endócrinos, história reprodutiva, fatores comportamentais ou ambientais e fatores genéticos ou hereditários. A idade, o acúmulo de exposições ambientais e alterações biológicas são os principais fatores que aumentam o risco de desenvolver câncer de mama. Sua ocorrência é relativamente rara antes dos 35 anos e, acima dessa idade, sua incidência cresce de forma progressiva, especialmente após os 50 anos (“INCA - Instituto Nacional de Câncer”, 2018).

O alto índice de mortalidade por essa neoplasia ocorre, principalmente, devido ao seu diagnóstico tardio e aquisição de resistência a determinados tratamentos (WALKER et al., 1997; HICKS; KULKARNI, 2008; REDIG; MCALLISTER, 2013; “INCA - Instituto Nacional de Câncer”, 2018). A detecção precoce é de extrema importância para reduzir a mortalidade por essa doença e muitos marcadores para diagnóstico e prognóstico estão sendo estudados (NÚÑEZ, 2018).

O principal fator responsável pela evolução maligna da doença é a disseminação metastática. A metástase ocorre quando as células tumorais se desprendem do tumor primário e se espalham para outras regiões do corpo, formando tumores secundários, aumentando a agressividade tumoral e frequentemente resultando em um diagnóstico fatal (MCGUIRE; BROWN; KERIN, 2015).

Apesar de sua reconhecida importância na evolução da doença, os mecanismos moleculares da formação das metástases ainda não estão completamente estabelecidos (FIDLER, 2003). Entretanto, sabe-se que para o crescimento da massa tumoral primária e disseminação metastática, é imprescindível a ocorrência da angiogênese, crescimento de novos vasos

sanguíneos a partir da vasculatura pré-existente (KARAMYSHEVA, 2008; CRAWFORD; FERRARA, 2009; REDIG; MCALLISTER, 2013).

1.2. Progressão tumoral e processo de angiogênese

A angiogênese consiste na formação de novos capilares a partir dos vasos sanguíneos pré-existentes. Também denominada neovascularização, é um complexo processo fisiológico que ocorre ao longo da vida tanto em tecidos normais como no desenvolvimento de doenças. No câncer, é o principal fator que possibilita o crescimento e evolução tumoral (KAZEROUNIAN; LAWLERCORRESPONDING, 2018).

Os tumores necessitam do rápido desenvolvimento de uma rede vascular para fornecer suporte à alta taxa proliferativa de células tumorais e, por isso, os vasos sanguíneos tumorais representam o principal alvo para a terapia do câncer (VIALARD; LARRIVÉE, 2017). No início da formação neoplásica, as células tumorais recebem nutrientes e oxigênio por simples difusão para sua manutenção e crescimento. Porém, quando o tumor excede 1-2 mm de diâmetro, o processo de difusão torna-se insuficiente e resulta na restrita irrigação sanguínea de algumas regiões, principalmente as mais internas e distantes da superfície da massa tumoral. Com o menor fornecimento de metabólitos e oxigênio, é necessário o crescimento de novos vasos sanguíneos por angiogênese para nutrir o ambiente tumoral em expansão e permitir sua progressão (FOLKMAN, 1971; BERGERS; BENJAMIN, 2003; BOUDREAU; MYERS, 2003; TOMINAGA; KATSUDA; OCHIYA, 2015).

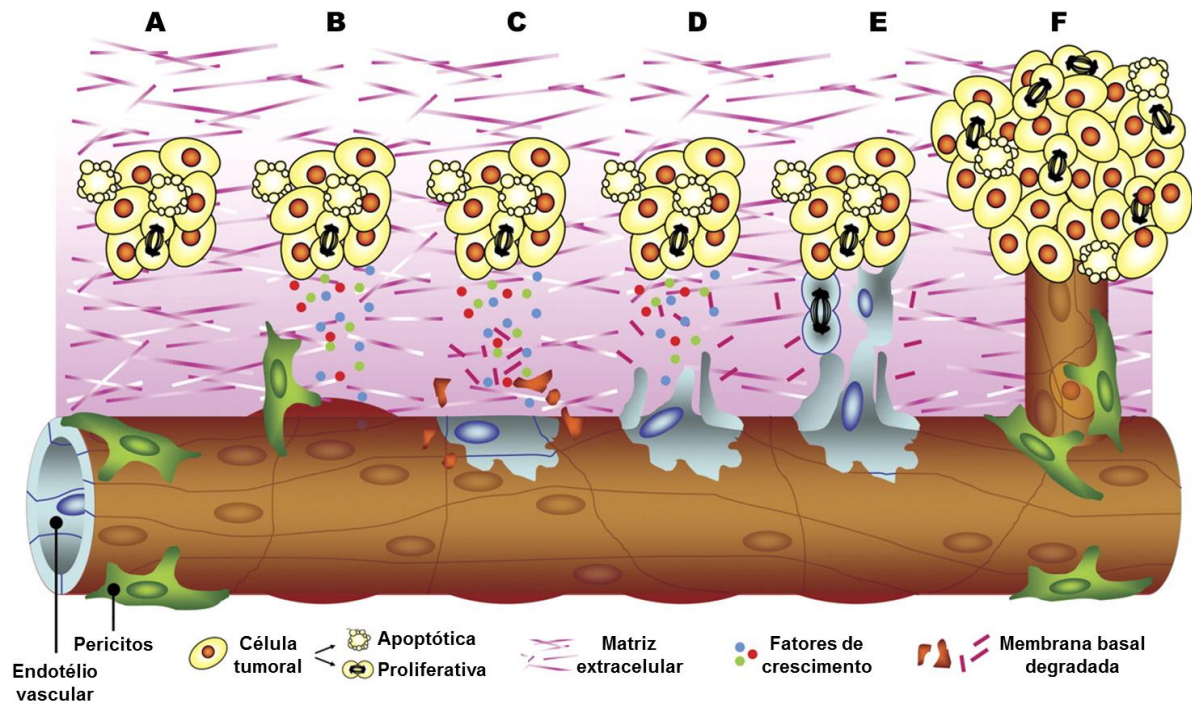
A indução do processo de angiogênese ocorre pelo denominado *switch angiogênico* que estimula o crescimento de novos vasos sanguíneos a partir da vasculatura pré-existente, permitindo a ocorrência de metástases, levando à disseminação tumoral e formação de tumores secundários (KARAMYSHEVA, 2008; CRAWFORD; FERRARA, 2009). O *switch angiogênico* ocorre quando há um desequilíbrio favorável para os fatores pró-angiogênicos estimulados por eventos fisiológicos, como a hipóxia, ativação de oncogenes ou mutação de genes supressores tumorais (BERGERS; BENJAMIN, 2003; SIVEEN et al., 2017; KAZEROUNIAN; LAWLERCORRESPONDING, 2018).

A hipóxia é o principal evento fisiológico responsável por desencadear a cascata de sinalização que inicia a angiogênese. O crescimento de novos vasos

sanguíneos permite que a célula tumoral mantenha suas funções metabólicas e biológicas, além de exercer papel crucial no crescimento tumoral e fornecimento de rotas para a disseminação do tumor pelo deslocamento dessas células para a circulação (BOUDREAU; MYERS, 2003; TOMINAGA; KATSUDA; OCHIYA, 2015). Os estudos clínicos e dados experimentais indicam que o estabelecimento do câncer de mama é dependente da formação de novos vasos e, portanto, tem sido sugerido que a intensidade da angiogênese é inversamente proporcional ao tempo de sobrevivência de pacientes com câncer de mama invasivo (LI et al., 2015).

A angiogênese é um complexo processo constituído pela sincronia de vários eventos celulares. Inicialmente, uma célula com alterações genéticas passa a se proliferar, escapa da morte celular por apoptose e resulta na formação de uma pequena massa tumoral denominada tumor primário (**Figura 1A**). Com a expansão dessa massa tumoral, o fornecimento de oxigênio e nutrientes torna-se insuficiente e as células tumorais induzem a angiogênese por meio da liberação de fatores de crescimento que atuam nos vasos sanguíneos mais próximos. Inicialmente, os pericitos se afastam dos vasos sanguíneos para permitir sua vasodilação (**Figura 1B**). As células endoteliais iniciam a produção de proteases para degradação da membrana basal e da matriz extracelular (**Figura 1C**), migram para o espaço perivascular, proliferam-se (**Figura 1D**) e formam estruturas semelhantes a tubos (**Figura 1E**). As proteínas da matriz são depositadas ao redor dessas novas estruturas tubulares que são novamente estabilizadas por pericitos. A nova vasculatura formada no interior da massa tumoral permite seu crescimento e a possibilidade de vias para a disseminação metastática (**Figura 1F**) (THIJSEN et al., 2007).

Figura 1 - Etapas do processo de angiogênese tumoral. A angiogênese é o processo de formação de novos vasos sanguíneos a partir de capilares ou vênulas pré-existentes e consiste em uma série de eventos celulares



FONTE: Modificado de THIJSEN et al., 2007.

Os vasos sanguíneos tumorais são caracterizados por serem imaturos e apresentarem uma prejudicada funcionalidade (VIALARD; LARRIVÉE, 2017). Diferem dos vasos sanguíneos normais pelo formato irregular e não organização em veias, artérias e capilares. Seus principais componentes, células endoteliais e pericitos, regulam a função vascular e a circulação sanguínea. Os pericitos garantem a estabilidade e fornecem suporte mecânico às células endoteliais localizadas na parede interna dos vasos sanguíneos (BERGERS; BENJAMIN, 2003; GERHARDT et al., 2003; CAPPELLARI; COSSU, 2013).

Dessa forma, por desempenhar um papel fundamental para a continuidade e progressão da doença, a inibição da angiogênese tem sido considerada um alvo de estratégias terapêuticas para o câncer, em especial para os invasivos (WANG et al., 2015). O processo de angiogênese é regulado por diversos mecanismos e, por isso, o envolvimento de mecanismos epigenéticos com microRNAs (miRNAs) estão sendo investigados (DANZA et al., 2015).

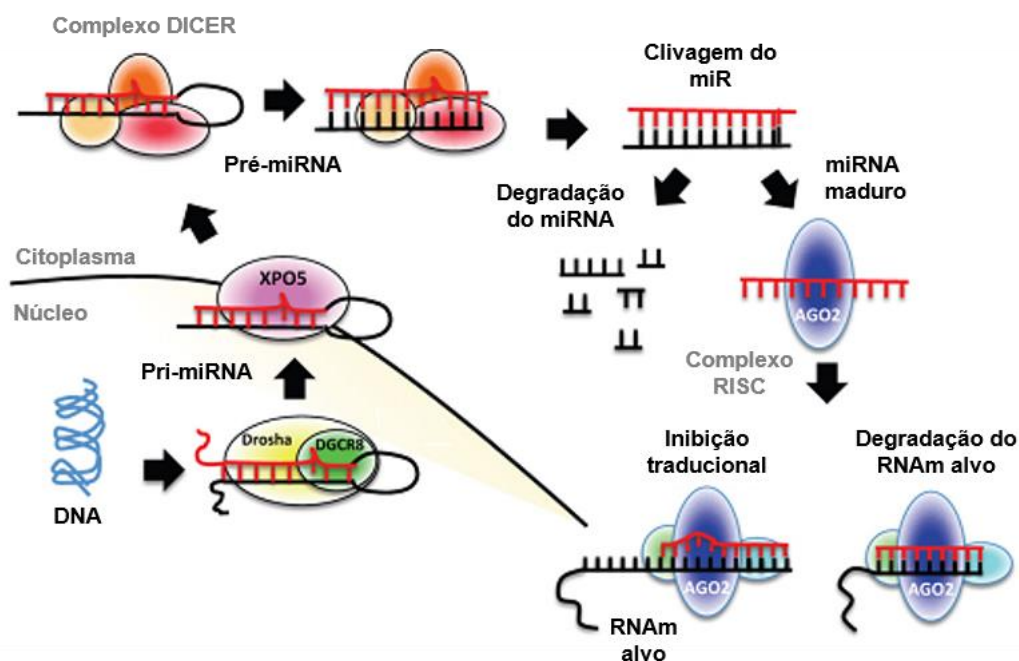
1.3. MiRNAs no câncer de mama e angiogênese

Os miRNAs são pequenas moléculas de RNA não-codificantes, com cerca de 18-25 nucleotídeos, amplamente encontrados em animais e plantas. Apresentam a função de controlar numerosas vias celulares por meio da inibição da expressão gênica pela degradação pós-transcricional ou repressão translacional. Estima-se que 3.000 miRNAs controlam quase um terço de todos os transcritos de RNAm humanos (BARTEL, 2004; CALIN et al., 2005; MA; TERUYA-FELDSTEIN; WEINBERG, 2007; LI et al., 2012).

O primeiro miRNA foi identificado em 1993 por Lee, Wightman e colaboradores. O *lin-4*, encontrado no nematódeo *Caenorhabditis elegans*, apresenta complementaridade a uma sequência repetitiva na região 3'-não traduzida (UTR) de *lin-14* e realiza sua regulação pós-transcricional por silenciamento (LEE; FEINBAUM; AMBROS, 1993; WIGHTMAN; HA; RUVKUN, 1993). Desde então, mais de 28.000 miRNAs foram encontrados em animais, plantas e vírus, sendo conservados em um grande número de espécies de organismos vivos (MCGUIRE; BROWN; KERIN, 2015; NISHIDA-AOKI; OCHIYA, 2015).

A biogênese e funcionalidade dos miRNAs é complexa e orquestrada por muitas proteínas (FRIEDRICH et al., 2017). Sua síntese é iniciada com a transcrição de seu gene pela RNA polimerase que resulta em um longo transcrito de miRNA primário (pri-RNA). O pri-RNA apresenta uma estrutura denominada *hairpin* que é clivada pela enzima Drosha e seu cofator DGCR8 (do inglês *DiGeorge syndrome critical region gene 8*) no núcleo, gerando uma molécula precursora do miRNA maduro (pré-miRNA) que apresenta aproximadamente 70 nucleotídeos. Em seguida, o pré-miRNA é transportado para o citoplasma pela exportina-5 (Exp5) e é processado pelo complexo Dicer, gerando um miRNA fita dupla com aproximadamente 22 nucleotídeos. Esse produto é incorporado ao complexo RISC (do inglês *RNA-induced silence complex*) que inclui as proteínas Argonautas como principais componentes. Apenas uma das fitas do duplex de miRNA permanece no complexo RISC para controlar a expressão pós-transcricional de genes alvo e a outra é degradada (**Figura 2**) (ACUNZO et al., 2015; BERTOLI; CAVA; CASTIGLIONI, 2015).

Figura 2 - Biogênese do miRNA. A formação dos miRNAs inicia-se no núcleo e termina no citoplasma. Inicialmente, o miRNA é transcrito pela RNA polimerase II (pri-miRNA) a partir do DNA genômico. O pri-miRNA é reconhecido pelo Drosha e DGCR8, processado em pré-miRNA e exportado para o citoplasma pela Exportina-5, onde é clivado pelo complexo Dicer, gerando um miRNA de fita dupla. Após a clivagem pelo complexo RISC, o miRNA pode induzir a degradação de seu miRNA alvo ou realizar sua inibição traducional.



FONTE: Adaptado de BERTOLI; CAVA; CASTIGLIONI, 2015.

Os miRNAs são regulados por mecanismos semelhantes a outros RNAs, como ativação ou inibição transcricional, repressão epigenética e taxas de degradação controlada. Aproximadamente 52% dos miRNAs humanos estão localizados em regiões intergênicas, 40% estão dentro de regiões intrônicas de genes e 8% são exônicos. Estima-se que os miRNAs sejam capazes de regular até 30% dos genes codificadores de proteínas no genoma humano (HSU et al., 2006).

Um único miRNA específico pode regular a expressão de mais de 100 transcritos diferentes e diversos miRNAs podem coordenar um mesmo RNAm alvo (RNA mensageiro) (FELEKKIS et al., 2010). Assim, uma complexa rede regulatória é formada por muitos miRNAs e seus genes alvo estão envolvidos em várias funções e processos celulares (HWANG; MENDELL, 2006; INUI; MARTELLO; PICCOLO, 2010).

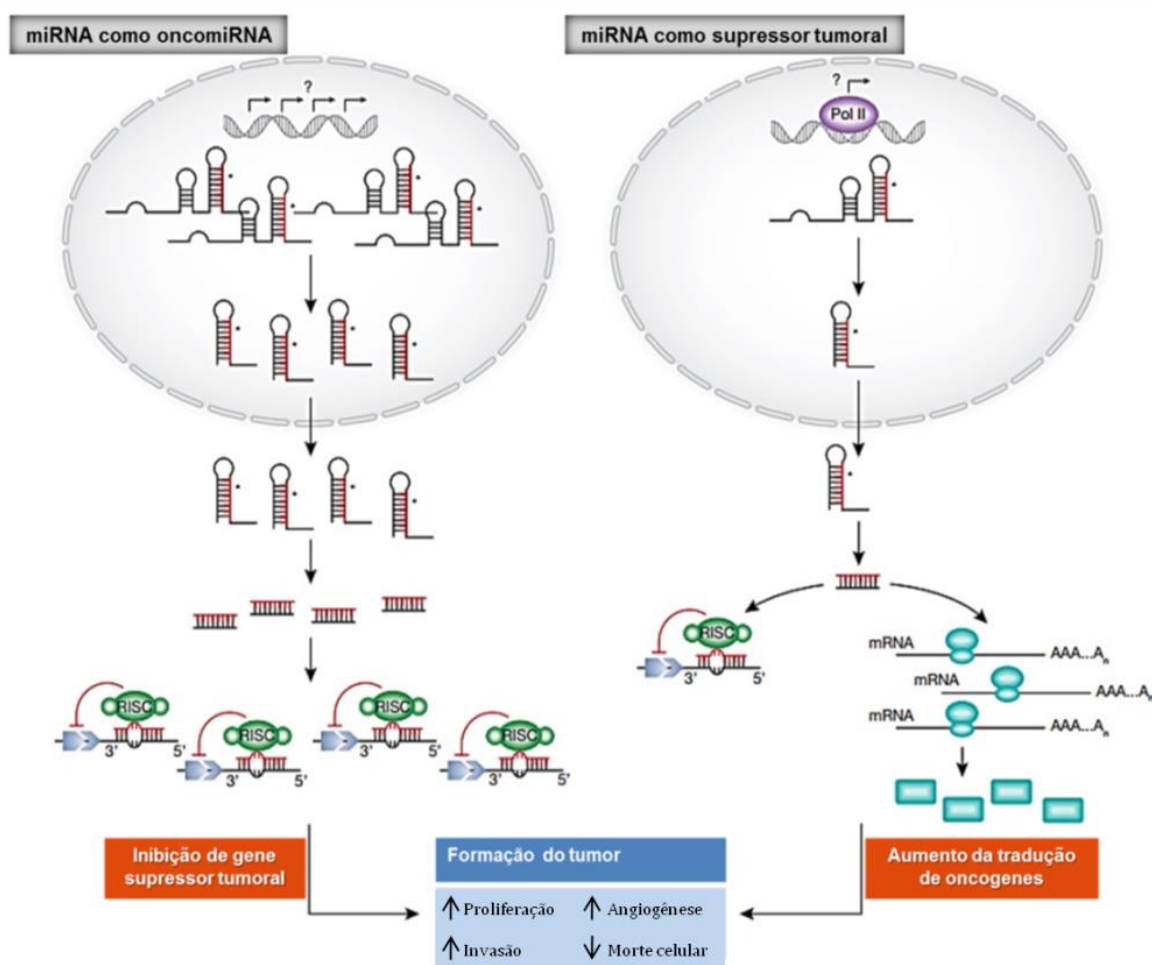
Como os miRNAs são agentes reguladores altamente funcionais dos processos celulares essenciais, sabe-se que sua expressão alterada está relacionada a muitas doenças humanas, incluindo o câncer (FELEKKIS et al., 2010). Cerca de 50% dos miRNAs estão localizados em regiões genômicas frágeis relacionadas ao desenvolvimento tumoral, o que evidencia seu crucial papel nessa doença (LI et al., 2016a). Os miRNAs aberrantemente expressos apresentam relação com a maioria dos tipos tumorais e interagem direta ou indiretamente na regulação da expressão de oncogenes e genes supressores tumorais (ADAMS; KASINSKI; SLACK, 2014). Por atuarem na iniciação e progressão da doença e controlarem os processos de proliferação, apoptose, angiogênese, invasão e metástase tumoral (PENG; CROCE, 2016), revelam-se como potenciais marcadores tumorais e constituem novos alvos para desenvolvimento de terapias antitumorais (LI et al., 2016b).

Os miRNAs apresentam a capacidade de induzir o silenciamento gênico pelo pareamento específico com moléculas-alvo de RNAm. Dependendo do grau de homologia desse pareamento, o miRNA pode levar a sua degradação pós-transcricional ou a repressão translacional por inibição da tradução da proteína. Os miRNAs que se ligam completamente a sequências complementares de seus RNAm alvo induzirão a degradação do RNAm (comum em plantas). Já em situações nas quais os miRNAs se ligam incompletamente, a repressão translacional é induzida, o que diminui a expressão da proteína, não alterando a estabilidade do RNAm (comum em mamíferos) (LI et al., 2016b). O principal mecanismo de ação dos miRNAs consiste na ligação com complementaridade parcial de 6-8 nucleotídeos de sua extremidade 5' a qualquer região do RNAm, sendo mais frequente em sua região UTR 3' não traduzida (ACUNZO et al., 2015; BERTOLI; CAVA; CASTIGLIONI, 2015).

Em tecidos normais, ou seja, não tumorais, a expressão fisiológica do miRNA bloqueia a tradução do RNAm alvo, mantendo os níveis normais de crescimento celular. Diferentemente, em tecidos tumorais, os miRNAs podem assumir dois diferentes papéis, sendo o de supressor tumoral e o de oncomiR. Dessa forma, no câncer, os miRNAs supressores tumorais apresentam-se em baixa quantidade e não possuem capacidade para bloquear os possíveis oncogenes alvos. Porém, ao atuarem como oncomiRs, apresentam-se em grande quantidade, inibem os genes supressores alvos, resultando em crescimento tumoral com o aumento da

proliferação celular, invasão e metástase, além de diminuição da morte celular (ESQUELA-KERSCHER; SLACK, 2006; IORIO; CROCE, 2012; DI LEVA; GAROFALO; CROCE, 2014) (**Figura 3**).

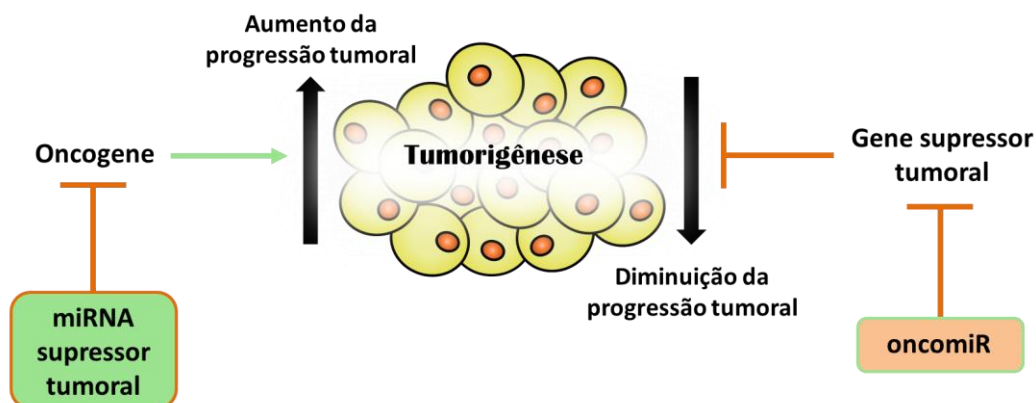
Figura 3 - Papel dos miRNAs no câncer. Os miRNAs podem assumir dois diferentes papéis no câncer: supressor tumoral ou oncomiR. Esse papel varia de acordo com o tipo tumoral, sendo que um mesmo miRNA pode apresentar diferentes funções em diferentes tumores.



FONTE: Modificado de IORIO; CROCE, 2012.

Portanto, os miRNAs podem agir como supressores tumorais quando resultam na inibição de oncogenes (JEON et al., 2012; IWAYA et al., 2013; CHENG et al., 2014; LI et al., 2014) ou como oncomiRs quando levam ao aumento da expressão de supressores tumorais (XIA et al., 2014; NI et al., 2015) (**Figura 4**).

Figura 4 - Ação dos miRNAs na tumorigênese. Os oncomiRs atuam na supressão da função de genes supressores tumorais, estimulando o processo tumorigênico, e os miRNAs supressores tumorais suprimem a expressão de oncogenes, controlando a progressão do tumor.



FONTE: Modificado de SHAH et al., 2013.

Um importante foco das pesquisas em câncer de mama tem sido a identificação de possíveis marcadores prognósticos e o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas que possam inibir a progressão tumoral (KHORDADMEH et al., 2018). A desregulação dos miRNAs está envolvida com a iniciação e progressão de vários tipos tumorais humanos, incluindo o câncer de mama, o qual apresenta fortes evidências da atuação de miRNAs como oncogenes e genes supressores tumorais (BERTOLI; CAVA; CASTIGLIONI, 2015). Assim, a confirmação da associação dos miRNAs com o desenvolvimento tumoral e processo de angiogênese poderá fornecer novos alvos terapêuticos para inibição da progressão do câncer de mama (WANG; OLSON, 2009).

1.4. MiRNA-148a e seus alvos IGF-1R e VEGF

A família altamente conservada miR-148/-152 é composta por três membros, miR-148a, miR-148b e miR-152, e está localizada nos cromossomos 7,12 e 17 em humanos, e nos cromossomos 6, 15 e 11 em camundongos. Os membros dessa família apresentam de 21 a 22 nucleotídeos de comprimento e exibem a mesma sequência inicial *seed* para o reconhecimento do alvo (**Figura 5**) (CHEN; SONG; WANG, 2013).

Figura 5 - Sequência dos miRNAs membros da família miR-148/-152. Sequências humanas maduras de miR-148a, miR-148b e miR-152. As sequências iniciais *seed* estão destacadas em vermelho.



miR-148a-3p 5'-UCAGUGCACUACAGAACUUUGU-3'
miR-148b-3p 5'-UCAGUGCAUCACAGAACUUUGU-3'
miR-152-3p 5'-UCAGUGCAUGACAGAACUUGG-3'

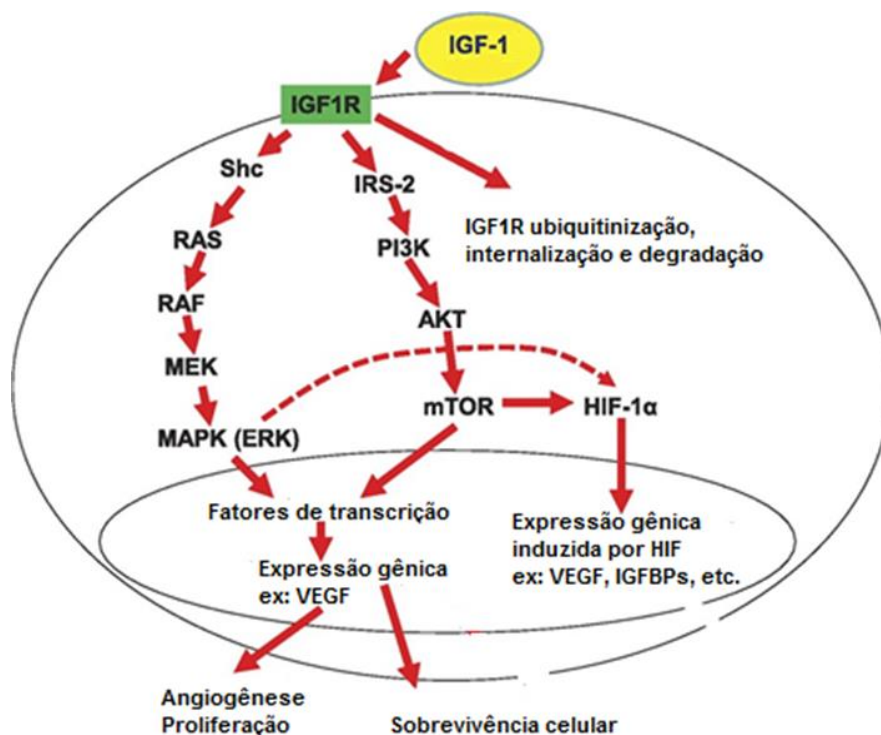
FONTE: Retirado de FRIEDRICH et al., 2017.

Expressão desregulada desses miRNAs tem sido frequentemente detectada em muitas doenças tumorais e não tumorais. Essa família apresenta papel na proliferação celular, formação de colônias, invasão e angiogênese tumoral, atuando predominantemente como supressores tumorais (FRIEDRICH et al., 2017). Especificamente, o miR-148a tem sido associado a esses processos em diferentes neoplasias como mama (XU et al., 2013), endométrio (HIROKI et al., 2010; TSURUTA et al., 2011), ovário (ZHOU et al., 2012) e colangiocarcinoma (BRACONI; HUANG; PATEL, 2010).

Tumores de mama foram associados a baixa expressão da família miR-148/-152. Essa baixa expressão está relacionada à alta expressão de IGF-1 (Fator de crescimento semelhante à insulina - tipo 1) e IGF-1R (Receptor do fator de crescimento semelhante à insulina - tipo 1), proteínas altamente expressas em mais de 40% dos tumores de mama e alvos desses miRNAs. O IGF-1R é um receptor tetramérico composto por duas subunidades β e duas subunidades α (MOTALLEBNEZHAD et al., 2016). A ativação do receptor IGF-1R ocorre com sua ligação à proteína IGF-1 que provoca o desencadeamento de diversas vias, desencadeando a angiogênese, proliferação celular, sobrevivência e metástase de células tumorais de mama (MOTALLEBNEZHAD et al., 2016). Quando o IGF-1 se liga ao receptor IGF-1R, ocorre ativação da via da tirosina quinase intrínseca e fosforilação de membros da família do substrato do receptor de insulina (IRS). Essa ligação desencadeia a via proteína quinase a qual é ativada por Ras-MAPK e a via fosfatidilinositol-3 quinase PI3K/AKT/mTOR. Ainda, a cascata MAPK pode levar à indução de expressão de genes como o Fator de crescimento do endotélio vascular

(VEGF), e a cascata PI3K/AKT, por meio da via mTOR, induz a expressão de Fator induzido por hipóxia 1 α (HIF-1 α) e VEGF. A indução dessas vias leva ao estímulo da proliferação e sobrevivência celular, além do processo de angiogênese (**Figura 6**) (CHIU et al., 2011; XU et al., 2013).

Figura 6 - Via de sinalização do IGF-1R. As vias de transdução de sinais demonstram as diferentes consequências moleculares da ativação de IGF1R pelo IGF-1, incluindo o desencadeamento das cascatas de MAPK e PI3K/AKT, que, por sua vez, induz expressão de genes, tais como VEGF.



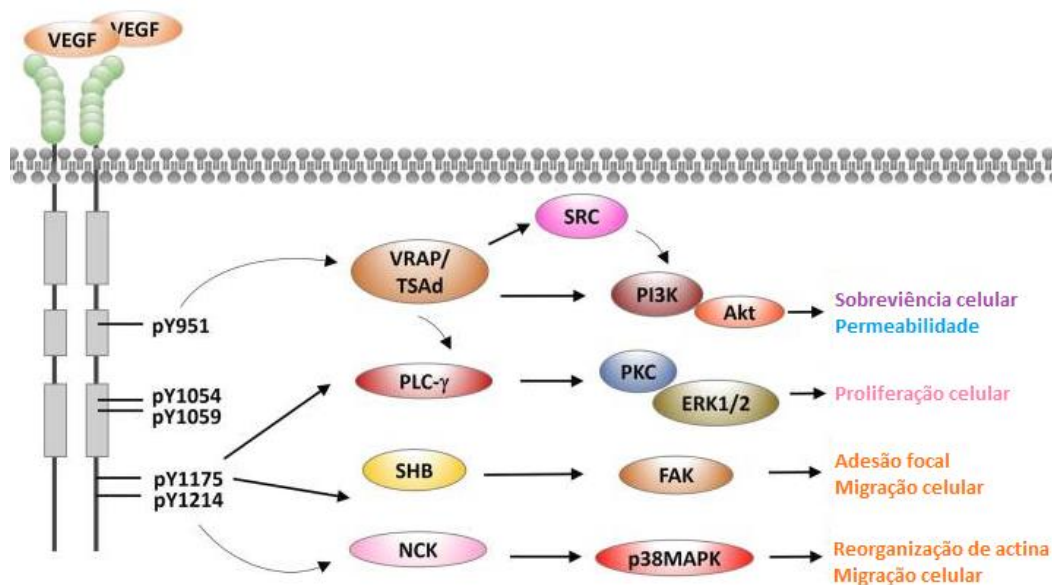
FONTE: Modificado de CHIU et al., 2011.

O VEGF está diretamente envolvido na angiogênese. Sua família é composta por sete membros, sendo VEGF-A (também conhecido como VEGF), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-E, VEGF-F, Fator de crescimento placentário PLGF-1 e PLGF-2. Esses membros se ligam aos receptores do tipo tirosina quinase Fator de crescimento endotelial vascular tipo 1 (VEGFR-1), tipo 2 (VEGFR-2) e tipo 3 (VEGFR-3) (KIERAN; KALLURI; CHO, 2012; KRISTENSEN et al., 2014). O receptor VEGFR-1 está localizado na superfície de células hematopoiéticas, macrófagos e monócitos. Já o receptor VEGFR-2 é encontrado no endotélio vascular e linfático e o VEGFR-3 exclusivo do endotélio linfático (STEFANINI et al., 2008; TANEJA et al.,

2010). A interação do VEGF-A com seu receptor VEGFR-2 estimula predominantemente a angiogênese (KRISTENSEN et al., 2014). No câncer de mama, o VEGF vem sendo relacionado como principal fator envolvido na angiogênese, sendo amplamente detectado em células tumorais, e seu receptor VEGFR-2 detectado em células endoteliais (STEFANINI et al., 2008).

Quando o VEGF se liga ao VEGFR-2, ocorre a dimerização do receptor e sua autofosforilação. Os resíduos de tirosina fosforilados Y951, Y1054, Y1059, Y1175 e Y1214 servem de ligação para proteínas adaptadoras, incluindo VRAP/TSAd, PLC- γ , SHB e NCK. Essas proteínas são responsáveis pelos efeitos gerados com a ligação VEGF-VEGFR-2, incluindo as atividades de proliferação celular, permeabilidade, sobrevivência celular e migração celular (**Figura 7**) (CHUNG; LEE; FERRARA, 2010; ZHU; ZHOU, 2015).

Figura 7 - Interação VEGF-VEGFR-2 e vias de sinalização em células endoteliais. O VEGFR-2 apresenta um domínio extracelular, um domínio transmembrânico e domínios intracelulares. O domínio extracelular é formado por sete domínios do tipo IgG e é responsável pela interação com VEGF. O domínio intracelular apresenta resíduos de fosforilação (Y951, Y1054, Y1059, Y1175 e Y1214) que atraem proteínas adaptadoras (VRAP/TSAd, PLC- γ , SHB e NCK) para mediar os efeitos do VEGFR-2, incluindo proliferação celular, permeabilidade, sobrevivência celular e migração celular.



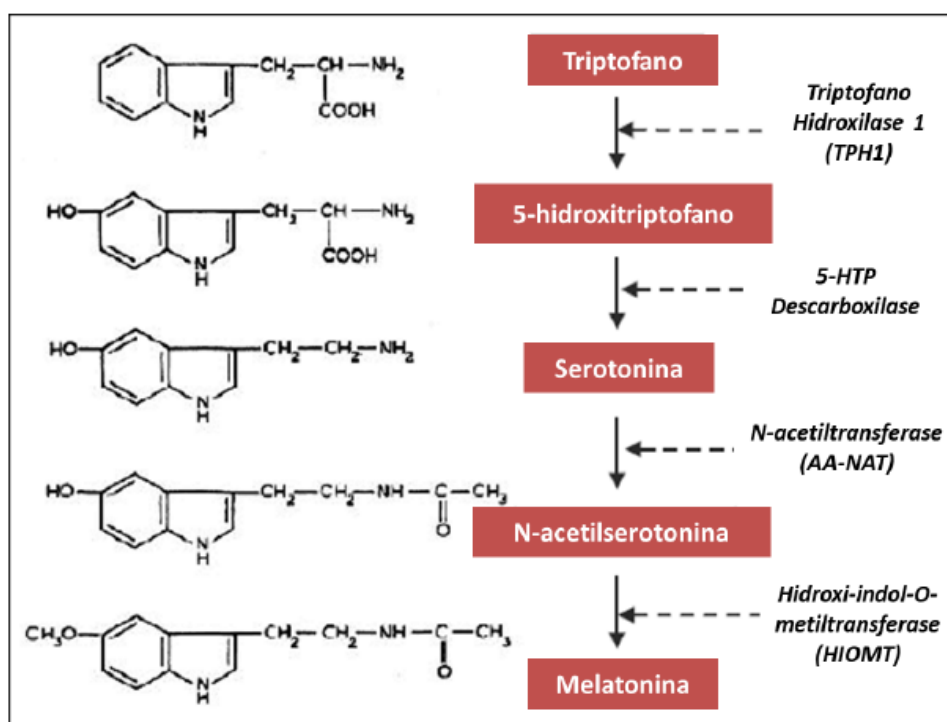
FONTE: Modificado de ZHU; ZHOU, 2015.

1.5. Melatonina

A melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina), principal hormônio naturalmente produzido e secretado na glândula pineal, vem ganhando destaque como potencial tratamento contra o câncer de mama. Esse hormônio apresenta importantes funções fisiológicas, atuando sobre o controle do sono, ritmo circadiano, sistema imunológico, fertilidade, função cardiovascular, temperatura corporal, atividade da telomerase, eliminação de radicais livres, entre outros (MAGANHIN et al., 2008; REITER; TAN; FUENTES-BROTO, 2010). Além disso, já foram descritas importantes ações antitumorais desse hormônio, como o controle da diferenciação celular, modulação da sinalização do estrogênio, indução da apoptose, estimulação da diferenciação celular, inibição da proliferação celular, invasão celular, metástase e angiogênese (JÚLIO ANSELMO SOUSA NETO, 2005; ALVAREZ-GARCÍA et al., 2013b; DI BELLA et al., 2013b; JARDIM-PERASSI et al., 2014).

Em mamíferos, a síntese da melatonina é bloqueada na presença de luz e ocorre principalmente na glândula pineal, porém, sua produção extra-pineal já foi demonstrada em células inflamatórias (REITER; TAN; FUENTES-BROTO, 2010; LI et al., 2013; HILL et al., 2015). Na glândula pineal, a melatonina é produzida a partir do aminoácido triptofano, que é absorvido pela corrente sanguínea e, após, metabolizado na mitocôndria em 5-hidroxitriptofano (5-HTP) pela enzima triptofano hidroxilase 1 (TPH1). No citosol, o 5-HTP é descarboxilado pela 5-HTP descarboxilase em serotonina. Por sua vez, a serotonina é acetilada pela enzima arilalquilamina N-acetiltransferase (AA-NAT) em N-acetilserotonina (NAS). Então, a NAS é convertida em melatonina pela enzima hidroxí-indol-ometiltransferase (HIOMT) (HEVIA et al., 2015; VRIEND; REITER, 2016) (**Figura 8**).

Figura 8 - Síntese de melatonina na glândula pineal. Etapas da síntese de melatonina a partir do Triptofano pela via da Serotonina.



FONTE: Modificado de BUBENIK; KONTUREK, 2011.

A proteína citosólica AA-NAT tem expressão praticamente indetectável durante o dia e aumenta de 70 a 150 vezes durante o período da noite. Dessa forma, essa enzima é considerada um fator limitante para a síntese de melatonina. A variação da AA-NAT reduz os níveis de serotonina na fase escura, o que leva ao

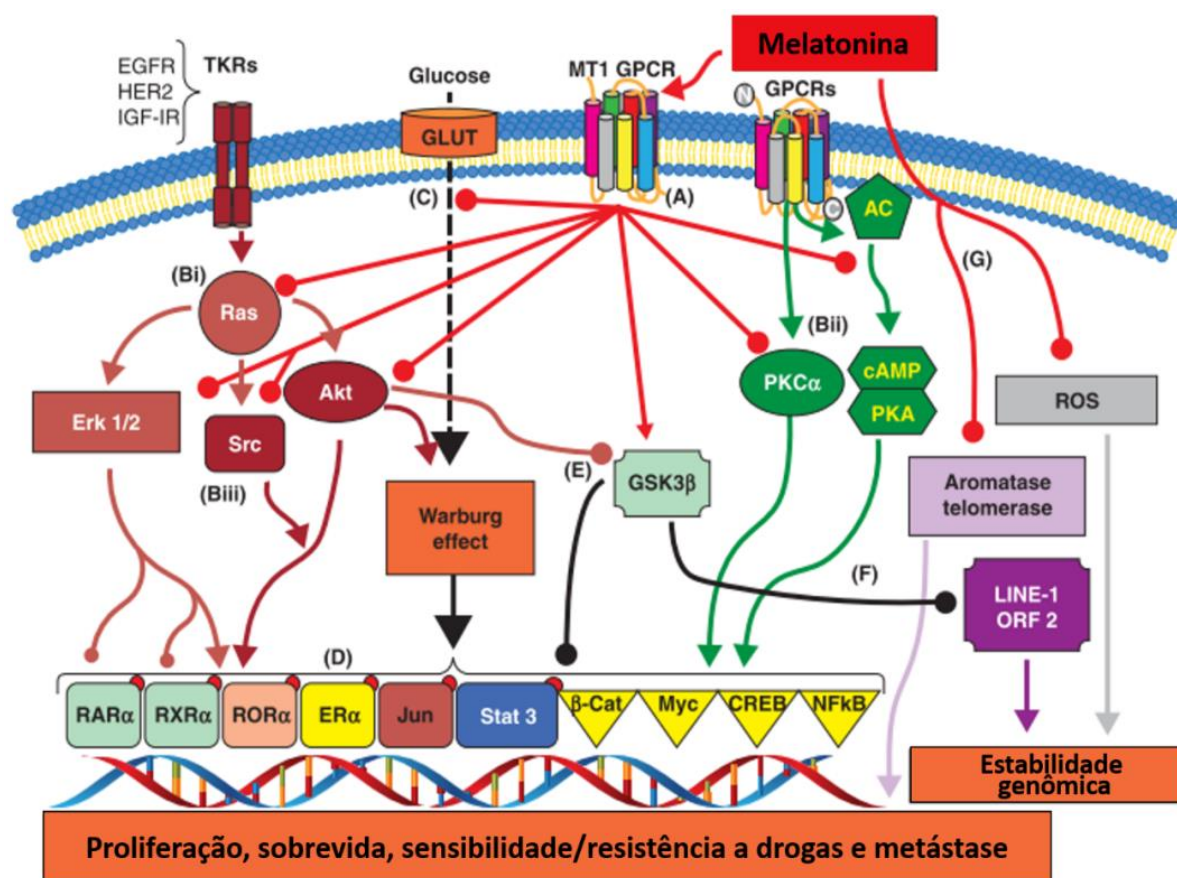
aumento das concentrações de NAS e melatonina. A degradação da melatonina ocorre principalmente no fígado, envolvendo a hidroxilação em 6-hidroximelatonina [6(OH)M], seguida dos processos de sulfatação ou glicuronidação e posterior excreção na urina (SIMONNEAUX et al., 2003; BILU; KRONFELD-SCHOR, 2013; VRIEND; REITER, 2016).

A presença da luz, bem como o uso excessivo e inadequado de luz artificial durante o período noturno, acarreta na menor produção de melatonina pelo homem. A melatonina é secretada durante o período noturno em todas as espécies de mamíferos independentemente de possuírem hábito diurno ou noturno (REITER; TAN; FUENTES-BROTO, 2010; HILL et al., 2015). A exposição à luz durante a noite está diretamente relacionada à inibição rápida e completa da atividade de AA-NAT e síntese de melatonina. Esse efeito inibitório envolve diversos eventos e estruturas neurais, podendo se originar na retina (SIMONNEAUX et al., 2003). A molécula de melatonina é lipofílica e não é armazenada, sendo diretamente liberada por difusão. Sua meia vida plasmática é de aproximadamente 20 minutos (HEVIA et al., 2015; VRIEND; REITER, 2016).

Muitas ações e atividades antitumorais da melatonina são realizadas por meio da ligação dessa molécula a seus receptores. Os dois mais importantes receptores de membrana conhecidos são os receptores de melatonina tipo 1 (MT1) e tipo 2 (MT2), membros da superfamília de receptores acoplados à proteína G. Esses receptores são encontrados em diversos tecidos, incluindo mama, vasos sanguíneos, células do sistema imune, entre outros (DUBOCOVICH; MARKOWSKA, 2005; HILL et al., 2015). É por meio desses receptores que a melatonina pode inativar diversas vias relacionadas ao processo de angiogênese, proliferação e metástase em câncer de mama (**Figura 9A**) (HILL et al., 2015).

Por apresentar natureza lipofílica, a melatonina pode atravessar livremente a membrana celular e atuar por mecanismos independentes de receptores. No interior celular, interage com inúmeros fatores de transcrição e proteínas intracelulares como a calmodulina e receptores nucleares RZR/ROR (receptor Z para retinóide/receptor órfão para retinóide) envolvidos na modulação do câncer de mama. Além disso, pode atuar na redução direta de radicais livres (ROS) (**Figura 9G**) ou no aumento de enzimas antioxidantes (COS; SÁNCHEZ-BARCELÓ, 2000; HILL et al., 2015).

Figura 9 - Vias de ação da melatonina. A melatonina pode agir por meio da ligação ao receptor MT1 acoplado a proteínas G ou desencadear atividades no interior celular por simples difusão.



FONTE: Modificado de HILL et al., 2015.

Atualmente, tem-se amplo conhecimento sobre as vias de sinalização intracelulares da melatonina. O modo de ação é desencadeado por sua entrada nas células por meio de receptores específicos ou difusão simples, deflagrando diferentes vias de sinalização e resultando em diversas ações antitumorais (LI et al., 2017; SU et al., 2017).

Vários estudos sugerem que a melatonina é capaz de modificar a expressão de inúmeros genes relacionados ao câncer de mama (CUCINA et al., 2009; GIRGERT et al., 2009; MARTÍNEZ-CAMPA et al., 2009), indicando seu potencial papel na regulação de miRNAs (LEE et al., 2011). No entanto, são escassos os estudos que avaliam o efeito deste hormônio na expressão de miRNAs no câncer de mama, sendo que a relação com a angiogênese ainda não foi descrita.

Lee e colaboradores estudaram pela primeira vez o efeito da melatonina na modulação da expressão de miRNAs na linhagem de câncer de mama MCF-7 (não

metastática e receptor de estrógeno positivo - RE+) (LEE et al., 2011). Os resultados demonstraram que níveis fisiológicos de melatonina podem modular a expressão de miRNAs e promover ação antiproliferativa no câncer de mama. Além disso, esse hormônio aumentou a expressão do miR-155 em linhagens celulares de glioma, diminuindo a proliferação, migração e invasão, pela inibição do c-MYB, proto-oncogene altamente expresso em células hematopoiéticas imaturas (GU et al., 2017). A melatonina diminui a expressão do miR-24 em linhagens de câncer de mama HCC1143 e MCF-7, e de cólon HCT116, reduzindo os níveis de seus genes-alvo que estão relacionados a processos de proliferação, invasão e metástase (MORI et al., 2016). Recentemente, um estudo de Sohn e colaboradores (2015) demonstrou a ação da melatonina no aumento da expressão de miR-3195 e miR-374b em células tumorais de próstata, o que resultou na diminuição da expressão de genes relacionados com a angiogênese e metástase, como HIF-1 α e VEGF (SOHN et al., 2015). Em células provenientes de testículo de camundongo (GC-1 spg), foram identificados 176 miRNAs modulados pela melatonina, 171 aumentados e cinco diminuídos e a análise de seus possíveis alvos demonstrou que a melatonina pode estar envolvida na modulação do câncer, em processos como a apoptose e vias de sinalização envolvendo o VEGF, Fator de necrose tumoral (TNF), oncogene Ras e receptor de membrana *Notch* (ZHU et al., 2017).

Os resultados demonstraram a capacidade da melatonina em alterar a expressão de miRNAs, promovendo inibição no crescimento das células tumorais mamárias. Ainda que esses estudos tenham mostrado a ação do hormônio na regulação de miRNAs, não existem estudos que investigam miRNAs modulados pela melatonina e envolvidos diretamente com a angiogênese do câncer de mama. Nesse contexto, a melatonina pode ser considerada importante alvo no controle da progressão tumoral, criando assim, um caminho promissor para sua utilização como agente terapêutico no câncer.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar o potencial valor terapêutico da melatonina no processo de angiogênese mediado por miRNAs no câncer de mama.

2.2. Objetivos Específicos

Estudo in vitro

- Identificar a expressão diferencial dos miRNAs associados ao processo de angiogênese por *PCR Array* na linhagem celular de câncer de mama MDA-MB-231 tratada ou não com melatonina;
- Selecionar, *in silico*, potenciais genes alvo dos miRNAs diferencialmente expressos;
- Realizar o silenciamento ou induzir a superexpressão dos miRNAs que se mostrarem relevantes na análise do *PCR Array* e a resposta de seus genes alvo;
- Após os tratamentos, analisar a expressão gênica e proteica dos alvos dos miRNAs candidatos em células MDA-MB-231, tratadas ou não com melatonina, por PCR em tempo real e *western blotting*.

Estudo in vivo

- Desenvolver modelo tumoral em camundongos Balb/c nude atímicos pela implantação de células de câncer de mama MDA-MB-231;
- Realizar o silenciamento ou induzir a superexpressão dos miRNAs validados na etapa *in vitro*, nos animais tratados ou não com melatonina, para verificar sua eficácia na diminuição da angiogênese e crescimento tumoral;
- Avaliar a expressão dos miRNAs e seus genes alvo identificados por *PCR Array* no estudo *in vitro* nos fragmentos tumorais dos animais tratados ou não com melatonina, além da expressão proteica por imuno-histoquímica destes mesmos alvos.

Manuscrito submetido à revista “*MicroRNA*”

Publisher: *Bentham Science*

ISSN: 2211-5374

Therapeutic Potential of Melatonin in the Regulation of MiR-148a-3p and Angiogenic Factors in Breast Cancer

RUNNING TITLE: Melatonin Impairs the Angiogenesis Process

Jéssica Zani Lacerda^{1,2}, Livia Carvalho Ferreira², Beatriz Camargo Lopes^{1,2}, Andrés Felipe Aristizábal-Pachón³, Marcio Chaim Bajgelman⁴, Thaiz Ferraz Borin⁵, Debora Aparecida Pires de Campos Zuccari^{1,2*}

¹Sao Paulo State University (Unesp), Institute of Biosciences, Humanities and Exact Sciences (Ibilce), Sao Jose do Rio Preto (SP), Brazil.

²Laboratory of Molecular Research in Cancer (LIMC), Medical School of Sao Jose do Rio Preto (FAMERP), Sao Jose do Rio Preto (SP), Brazil.

³Laboratory of Molecular Genetics and Bioinformatics (LGMB), Faculty of Medicine of Ribeirao Preto, University of Sao Paulo (FMRP/USP), Ribeirao Preto (SP), Brazil.

⁴Laboratory of Biosciences of the National Center of Research in Energy and Materials (LNBio/CNPEM), Campinas (SP), Brazil.

⁵Augusta University, 1120 15th Street, Augusta, GA 30912, United States.

*Corresponding author

Address correspondence to: Debora Aparecida Pires de Campos Zuccari, PhD, Laboratory of Molecular Research in Cancer (LIMC), Medical School of Sao Jose do Rio Preto (FAMERP), Avenue Brigadeiro Faria Lima, 5416, Vila Sao Pedro, CEP 15090-000, Sao Jose do Rio Preto, SP, Brasil. Fax: +55-17-3201-5885. E-mail: debora.zuccari@famerp.br.

Keywords: triple negative breast cancer, miRNA, pineal gland, angiogenic proteins, tumor cells, xenograft model.

Abstract

Background: The high mortality rate of breast cancer is related to the occurrence of metastasis, a process that is promoted by tumor angiogenesis. MicroRNAs are small molecules of non-coding mRNA that play a key role in gene regulation and are directly involved in the progression and angiogenesis of various tumor types, including breast cancer. Several miRNAs have been described as promoters or suppressors angiogenesis and may be associated with tumor growth and metastasis. Melatonin is an oncostatic agent with capacity of modifying the expression of innumerable genes and miRNAs related to cancer. **Objective:** The aim of this study was to evaluate the role of melatonin and the tumor suppressor miR-148a-3p on angiogenesis of breast cancer. **Method:** MDA-MB-231 cells were treated with melatonin and modified with the overexpression of miR-148a-3p. The gene relative quantification of miR-148a-3p, IGF-1R and VEGF was performed by real-time PCR. The protein expression of these targets were performed by immunocytochemistry and immunohistochemistry. Survival, migration and invasion rates of tumor cells were evaluated. Finally, the xenograft model of breast cancer was performed to confirm the role of melatonin in the tumor. **Results:** The melatonin was able of increase the gene level of miR-148a-3p and decreased the gene and protein expression of IGF-1R and VEGF, both *in vitro* and *in vivo*. In addition, it also had an inhibitory effect on the survival, migration and invasion of breast tumor cells. **Conclusion:** Our results indicate the role of melatonin in the regulation of miR-148a-3p and decrease of angiogenic factors.

3.1. Introduction

Breast cancer is a notable worldwide preoccupation confirmed by high incidence and mortality rates. It is the most common neoplasia among women and fifth leading cause of cancer-related death. The high mortality rate due to this neoplasia is intrinsically related to the occurrence of metastasis, which affects more than 90% of patients [1].

Tumor progression and metastatic dissemination require the development of a new vascularization, process denominated angiogenesis [2,3]. Despite a high mortality rate, the early diagnosis and the introduction of more effective treatments have enabled the decline of the deaths and improved the quality of life of the patients with the disease [4]. However, often the patient acquires resistance to a particular treatment, which allows tumor growth, invasion and metastasis [5]. Thus, because it plays a key role in the continuity of disease, inhibition of angiogenesis has been considered a therapeutic strategy for cancer, especially for invasive cancer [6]. The angiogenesis process is regulated by several mechanisms and, currently, the involvement of epigenetic mechanisms with microRNAs (miRNAs) are being investigated [7].

The miRNAs are small molecules of non-coding RNA (20-22 nucleotides), which have the function of controlling numerous cellular pathways through the regulation of gene expression in the post-transcriptional phase [8,9]. Deregulation of these molecules is involved with the initiation and progression of various human tumor types, including breast cancer, which presents strong evidence for miRNAs acting as oncogenes or as tumor suppressor genes [10]. An important focus of research on breast cancer has been the identification of possible prognostic markers and the development of new therapeutic strategies that may inhibit tumor progression. The confirmation of the association of miRNAs with the angiogenesis process and the regulation of these molecules may provide new therapeutic targets for inhibition of tumor growth in breast cancer [11].

Melatonin (N-acetyl-5-methoxytryptamine), the main hormone naturally produced and secreted in the pineal gland, has been getting space as a potential treatment for breast cancer. This hormone acts on the regulation of the circadian rhythm, control of cellular differentiation, inhibition of telomerase activity, epigenetic, immunomodulatory, with activities antioxidant, pro-apoptotic, anti-proliferative, anti-

invasive and anti-metastatic effects [12,13], as well as the antiangiogenic [14], already confirmed by our research group [15]. From this finding, several mechanisms of action antitumor of melatonin are being identified in different types of tumors and many are still under investigation. Several studies suggest that melatonin is capable of modifying the expression of innumerable genes related to breast cancer [16–18], indicating its potential role in regulation of miRNAs [19]. However, there are few studies that evaluate the effect of this hormone on the expression of miRNAs in breast cancer, and the relationship with angiogenesis has not yet been described.

The miR-148/152 family (composed of the members miR-148a, miR-148b and miR-152) is directly involved with the initiation and progression of various diseases, including cancer [20]. Deregulated expression of these miRNAs has been frequently detected in many tumoral and non-tumoral diseases. This family has a role in cell proliferation, colony formation, invasion and tumor angiogenesis, acting predominantly as tumor suppressors [21]. Specifically, the miR-148a has been associated with these processes in different neoplasms such as mammary [22], endometrial [23,24] and cholangiocarcinoma [25].

Based on the aforementioned findings, the purpose of this study was to determine the effect of melatonin and function of miR-148a-3p in MDA-MB-231 cells and xenograft model for the development of a new therapeutic alternative for an inhibition of angiogenesis and tumor progression of breast cancer. Our findings suggest a possible modulation role of melatonin in the regulation of miR-148a-3p tumor suppressor and inhibition of the angiogenic factors.

3.2. Material and methods

3.2.1. Cell culture and experimental groups

The breast tumor cells MDA-MB-231 (metastatic, triple-negative) (ATCC, Manassas, VA, USA) was cultured in 75 cm² culture flasks (Sarstedt, Nümbrecht, Germany) with Dulbecco's modified Eagle's medium high glucose (DMEM) (Cultilab, Campinas, SP, Brazil) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Cultilab, Campinas, SP, Brazil), penicillin (100 IU/mL) and streptomycin (10 mg/mL) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) in a humidified incubator at 5% CO₂ and 37°C.

3.2.2. Experimental groups

The tumor cells were divided into four different experimental groups, maintained for 24 h. Group I: unmodified cells, melatonin vehicle exposure (absolute ethanol solution and Phosphate-buffered saline - 1:1); Group II: viral-modified cells containing a GFP reporter gene sequence (Green fluorescent protein); Group III: cells treated with melatonin (1 mM); Group IV: modified cells infected with lentiviral system to overexpression of *miR-148a-3p*.

3.2.3. Overexpression of *miR-148a-3p*

The oligonucleotides with encoding the overexpression sequence of *miR-148a-3p* were cloned into the lentiviral transfer plasmid pBABE-GFP/pure (STEWART et al., 2003). Recombinant lentivirus were generated by Viral Vector Laboratory at LNBio-CNPEM, specialized in the development of experimental approaches to cancer therapy, based on the supply of inhibitory molecules to tumor cells. MDA-MB-231 cells were transduced with lentivirus and selected with 1µg/mL of puromycin (Gibco, Grand Island, NY, USA). Cells were expanded and the overexpression of *miR-148a-3p* was confirmed by qPCR. The target sequences selected for *miR-148a-3p* overexpression were: forward, 5'-GGGAATTCTCCATTATCGGTCGCATCCTG-3'; and reverse 5'-ATCTCGAGCACCCGCTTCAAGGGAATTG-3'. The same method was used to transduce the negative control virus containing a shRNA against green fluorescent protein (GFP) reporter into cells to control for the impact of the lentivirus vector into cells. The oligonucleotides (insert) were ligated to the vector pBABE-GFP/pure between EcoRI (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) and Sall (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) restriction sites. After transformation into DH5-α bacteria and selection by ampicillin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), clones from each insert were selected and checked by sequencing to verify the sequences of interest. QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) and Plasmid Midi Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) was used to extract the plasmidial DNA.

3.2.4. Quantitative RT-PCR

MiR-148a-3p, *IGF-1R* and *VEGF* genes expression were determined by real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR), according to Bustin et al. (2009) (BUSTIN et al., 2009). Total RNA was isolated from tumors cells using the MiRNeasy

Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. The concentration of RNA from each sample was determined using a NanoDrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific - Waltham, MA, USA). Each sample of total RNA was subjected to reverse transcription using a High Capacity cDNA kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The qRT-PCR reaction was performed by StepOne Plus Real Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and using TaqMan Universal Master Mix kit (Applied Biosystems). TaqMan inventoried probes were used: for *hsa-miR-148a-3p* (000470), *IGF-1R* (Hs00609566_m1), *VEGF* (Hs00900055_m1) and, *actin beta* (ACTB) (Hs99999903_m1), *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* (GAPDH) (Hs99999905_m1) and *U6 snRNA* (001973) as endogenous control for reaction standardizers. The expression level of genes of interest was determined by relative quantification (RQ) value using the average of normalizing genes ($\Delta\Delta Ct$). The samples were tested in triplicate and all experiments included a negative control, lacking cDNA.

3.2.5. Protein extraction and Western blotting

Tumors cells were washed in ice-cold PBS and lysed in NP40 cell lysis buffer (Invitrogen, Camarillo, CA, USA) supplemented with 1mM phenylmethanesulfonyl (PMSF) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). After incubation for 30 min with intermittent vortexing, the cell lysate was centrifuged and the proteins were collected from supernatant. Proteins extracts were quantified by the bicinchoninic acid (BCA) with Pierce™ CA protein assay kit (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA), separated on 8% SDS-PAGE and transferred onto PVDF membranes (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). The membranes were incubated with the desired primary antibody for IGF-1R (1:500 - Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), VEGF (1:50 - Santa Cruz Biotechnology, INC, Europe) and Tubulin (1:5000 - Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) overnight at 4°C, followed by incubation with the appropriate secondary antibody for 2 h at room temperature. The detection of tubulin was used as a loading control. The proteins were detected using the Clarity Western ECL kit (Bio-Rad), and quantification was performed using Image J software (NIH, Bethesda, MD, USA) as image analyzer. The values were obtained in arbitrary units (au) and showed the mean optical density (MOD) to each sample.

3.2.6. Immunocytochemistry

For immunocytochemistry technique, 0.5×10^6 cells in culture were transferred to a slide with coupled bottle (Thermo Fisher Scientific, NY, USA) and incubated at 37°C for 24 h. After this period, the culture medium was removed and the cells were washed with PBS. For fixing the cells, the bottle was incubated with 1 mL of 4% paraformaldehyde for 24 h. Soon afterwards, the bottles were separated from the slides and incubated with 10% of hydrogen peroxide for 30 min to block endogenous peroxidase. Antigen retrieval was performed in a pressure cooker (ARNO, Sao Paulo, SP, Brazil) at 95°C with citrate buffer (pH 6) for 30 min. After cooling, the slides were covered with a solution of bovine albumin (BSA) and incubated for 30 min at (4°C) overnight with antibodies for IGF-1R (1:50 - Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and VEGF (1:200 - Santa Cruz Biotechnology, INC, Europe) proteins. Subsequently, they were washed with buffered saline solution (PBS) with phosphate for 15 min and incubated for with the Starr TREK Universal HRP Detection Kit (Medical Biocare, Concord, CA, USA), which consisted of biotinylated secondary antibody anti-mouse, anti-rabbit and anti-goat immunoglobulins for 20 min and streptavidin-peroxidase complex for 10 min, followed by washing with PBS for 15 min. 0.5% tetrachloride of 3,3-diaminobenzidine (DAB Signet Laboratories, Dedham, MA, USA) was applied range of 2 min to 5 min slides at 20-22°C. The slides were contrasted with Harris Hematoxylin for 40 s.

3.2.7. Clonogenic assay

Clonogenic survival was performed to evaluate the effectiveness of melatonin on the survival, proliferation and ability of tumor cells to proliferate and form colonies. Cells were plated in 6-well culture dishes at a density of 200 cells per well. After 10 days, the cells were washed with PBS, fixed in 3.7% paraformaldehyde and stained with crystal violet for 20 min. The plates were washed in running water and the cell colonies were quantified. The survival factor of tumor cells was calculated by dividing the number of colonies formed in the control group by the number of colonies formed by the other experimental groups.

3.2.8. Cell migration and invasion assay

The migration and invasiveness of tumor cells were tested with ThinCert™ inserts (Greiner Bio One, Frickenhausen, Germany) and BioCoat™ Matrigel®

Invasion Chambers (Corning, NY, USA), respectively. Both were 8 μ m pore inserts and fit in 24 well plates. Before starting the assay, the cells were treated or not treated with melatonin (1 mM) and then seeded into upper compartment of the chamber in the concentrations of 1×10^5 (migration assay) and 4×10^5 cells/insert (invasion assay) with serum free culture medium. In the lower compartment was added 600 μ L of culture medium supplemented with 10% FBS. After 24 h, the membranes were washed and cells from the upper face were removed with a cotton swab and the cells that migrate to the lower face of the filter were fixed in 4% paraformaldehyde for 10 min, washed with PBS and stained with crystal violet 0.5% for 20 min to detect the migrated cells. The counting was made with an inverted optic microscope (Nikon Eclipse E200, Melville, NY, USA) and photographed five fields per insert. The number of migrating cells was counted using ImageJ software by putting the insert over a plate containing glycerol at 50%. The migration and invasion rate were calculated by dividing the average number of treated cells that migrated and invaded the matrigel membrane by the average of the positive control cells that did so.

3.2.9. Xenograft model

Athymic nude female mice (n = 5 animal per group) 6-8 week old and weighing 20-25 g were randomly separated into different groups of treatment, kept under pathogen-free conditions at room temperature (21-25°C) on exposure to light for 12 h and 12 h in the dark. Food and water were offered ad libitum. Mice were purchased from the Bioterio Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) and the experiment was carried out at the Centro Regional de Bioterismo da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP). MDA-MB-231 cells were cultured as described above. When they reached 80% confluency they were trypsinized, centrifuged and resuspended in 100 μ L of serum free DMEM culture medium at the concentration of 5×10^6 cells. For the development of the primary breast tumor, this volume was injected subcutaneously into the flank region. This cell line presents 90% efficiency in the formation of tumors in animal models, generating more vascularization and less necrosis (JARDIM-PERASSI et al., 2014). Concomitantly with tumor induction, the animals received treatment for 3 weeks with melatonin (100 mg/kg per day) or vehicle as control containing PBS, intraperitoneally (i.p.) for 5 days during the week (Monday through Friday). Melatonin was

administered at 5:00 p.m. just before turning off the light of the animal facility. As an indicator of overall animal health, the body weight was measured twice weekly.

3.2.10. RNA extraction

After 3 weeks of treatment the animals were euthanized with overdosage of pentobarbital (100 mg/kg). Tumor tissue was removed fresh, one part was frozen for the extraction of total RNA for real-time PCR (previously described) and the other part was fixed in 4% paraformaldehyde, included in paraffin blocks for immunohistochemical analysis (IHC). Tumor fragments were processed for RNA extraction using the Trizol reagent (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). The frozen tissue was macerated by adding liquid nitrogen to a sample that did not thaw. 1000 μ L of Trizol was added for each 50 mg of the sample. The mixture was transferred to a tube, allowed to stand for 5 min at room temperature and centrifuged at 12,000 g for 10 min at 4°C. The supernatant was transferred to a new tube and 200 μ L of chloroform was added to each 1000 μ L of Trizol, homogenizing by inversion and maintaining a room temperature for 5 min. After centrifugation at 12,000 g for 15 min at 4°C, an aqueous phase was transferred to a new tube containing 0.5 mL of isopropyl alcohol and stirred by inversion. A sample was stored overnight in a freezer at -20°C. Subsequently, a sample was centrifuged for 30 min at 14,000 g at 4°C. The supernatant was discarded and 1 mL of 70% ice cold ethanol, diluted with DEPC water (Amersham), was added, and a sample was centrifuged for 2 min at 14,000 g at 4°C; repeating this step. Discarding the supernatant and the exit tubes for absorbent paper again until drying of the pellet. Once this was done, 20 μ L of DEPC water was added to dilute the RNA pellet.

3.2.11. Immunohistochemistry

Immunohistochemical procedure was performed as recommended by the suppliers of primary antibodies. The following antibodies were used to delineate the expression of corresponding antigens: IGF-1R (1:50 - Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and VEGF (1:200 - Santa Cruz Biotechnology, INC, Europe). Briefly, the slides containing tumor tissues were deparaffinized, rehydrated, incubated with citrate buffer at 96°C for 30 min and blocked with 0.1% of hydrogen peroxide and 1% of BSA for 20 min each. Following this process, sections were incubated with the primary antibody (anti-IGF-1R and anti-VEGF) at 4°C overnight. Then, incubated with

Starr Trek Universal HRP Detection System kit (Biocare Medical, Concord, CA, USA) containing the secondary antibody (biotinylated anti-mouse, -rabbit, -goat immunoglobulins), peroxidase-streptavidin conjugates, and diaminobenzidine tetrachloride (DAB) chromogenic substrate. Finally, all sections were counter stained with haematoxylin, dehydrated and cover slipped with Ver Mount (Easypath, Sao Paulo, SP, Brazil).

3.2.12. Statistical analysis

The results were accurate for the descriptive analysis for the determination of normality. For samples with normal distribution, Student (two samples) or analysis of variance (ANOVA) is used or tested, followed by Bonferroni's test (more than two samples). Values of $p \leq 0.05$ were considered statistically significant and all were analyzed using the GraphPad Prism 5 software (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA).

3.3. Results

Based on the results of the PCR Array test (shown on the Supplementary Material), search for information and analysis in the database, it was selected the miR-148a-3p for *in vitro* and *in vivo* validation.

3.3.1. Melatonin treatment and upregulated expression of *miR-148a-3p* were inversely associated with the gene level of *IGF-1R* and *VEGF*

MiR-148a is an important tumor suppressor that regulates the IGF-1R and VEGF genes involved in angiogenesis [28]. Thus, we evaluated the level of gene expression of these important cancer regulatory factors in breast tumor cells treated with melatonin or miR-148a-3p overexpression. The relative quantification of expression by RT-PCR showed that melatonin has a modest but significant effect on increasing the expression of miR-148a-3p ($p < 0.001$) when compared to the experimental group of miR-148a-3p overexpression ($p < 0.0001$) (Fig. 1A, B). However, melatonin has a similar effect to this group in the decrease of IGF-1R ($p < 0.01$) and VEGF ($p < 0.0001$) gene levels (Fig. 1C, D).

3.3.2. Melatonin treatment and upregulated expression of *miR-148a-3p* decrease the protein expression of IGF-1R and VEGF

Since there was a decrease in the gene expression of IGF-1R and VEGF in response to treatment with melatonin and *miR-148a-3p* overexpression, the protein expression was assessed by western blotting and immunocytochemistry, in order to validate the results obtained by the quantitative RT-PCR technique. Western blotting analysis showed that melatonin and *miR-148a-3p* overexpression decreased expression levels of IGF-1R (Fig. **2A**) and VEGF (Fig. **2B**) proteins relative to control group expression ($p < 0.01$ and $p < 0.001$ respectively). Immunocytochemistry followed by the quantification of immunostaining by optical densitometry was used to detect the expression of these proteins. The results were obtained in Arbitrary Units (A.U.) and demonstrated the value of the Mean Optical Density (M.O.D.) + standard error. Immunostaining of the analyzed proteins decreased after treatment with melatonin ($p < 0.001$, $p < 0.01$) or with increased expression of *miR-148a-3p* ($p < 0.0001$, $p < 0.001$) (Fig. **3**).

3.3.3. Melatonin and overexpression of *miR-148a-3p* on clonogenic survival, cell migration and invasion

To verify whether melatonin or affect the survival and migration potential of invasive breast tumor cells, clonogenic survival, migration and invasion assays were performed (Fig. **4**). After of melatonin treatment, there was a significant decrease in survival ($p < 0.0001$), migration ($p < 0.001$) and invasion ($p < 0.001$) of MDA-MB-231 cells. Similar effect was observed in cells with high expression of *miR-148a-3p*, also occurring the decrease of cell survival ($p < 0.0001$), migration ($p < 0.001$) and invasion ($p < 0.001$). Considering that the GFP experimental group did not undergo significant changes in gene and protein quantification assays, we did not analyze them in these functional assays.

3.3.4. Melatonin inhibits the expression of angiogenic factors

To determine the role of melatonin and validate the results obtained *in vitro* step, we investigated its effects using a mouse model of breast cancer of tumoral induction (xenograft model). The results demonstrated that animals treated with melatonin for 3 weeks had increased tumor expression of *miR-148a-3p* ($p < 0.01$) and decreased gene level of *IGF-1R* ($p < 0.001$) and *VEGF* ($p < 0.01$) (Fig. **5**). In

addition to gene expression analysis, we also analyzed protein expression and confirmed that treatment with melatonin decreases the level of IGF-1R ($p < 0.0001$) and VEGF ($p < 0.001$) in tumors (Fig. 6).

3.4. Discussion

The angiogenesis process allows the growth and progression of the tumor, in addition to allow the metastatic spread of tumor cells and so has been focus for the development of new anti-tumor therapies [29,30]. Melatonin has been considered an important natural oncostatic agent in studies with tumor cells and in xenografts models of breast cancer. Furthermore, studies have shown that this hormone is directly related to the modulation of the complex angiogenesis process [31–34]. Our results demonstrated that melatonin may be able to regulate the gene expression of the tumor suppressor miR-148a-3p which, in turn, is related to the IGF-1R and VEGF, both involved in angiogenesis and progression tumor.

The effect of melatonin is being studied and our research group has identified that concentrations higher than the physiological level can have antitumor actions, such as decreased cell proliferation, angiogenesis and metastasis in MDA-MB-231 and MCF-7 breast cancer cells [15,32,34,35]. Melatonin has been shown to have a direct inhibitory action on the proliferation of MCF-7 human breast cancer cells [36]. Furthermore, melatonin has several pronounced vascular effects, reduces arterial blood pressure, contracts or dilates blood vessels and has a protective function schematic neurovascular accident [37]. On vascular function, melatonin is a natural antiangiogenic molecule capable of reducing the secretion of VEGF and control tumor growth [38]. Study with co-culture model with MCF-7 and HUVEC endothelial cells showed that that melatonin simultaneously coordinates downregulation of angiopoietins with a reduction in VEGF, which could be effective therapeutic strategy for blocking tumor angiogenesis [39]. As an adjuvant tumor immunotherapeutic agent have a fundamental role as a system regulator in haemopoiesis and immuno-enhancement, appears to be closely involved in several fundamental aspects of host defense [40].

The concentration of 1 mM melatonin was previously defined in the MDA-MB-231 cell line. Jardim-Perassi et al. (2014) evaluated different concentrations of melatonin by MTT assay and showed that only a pharmacological concentration of 1 mM of melatonin significantly decreased the cell viability. Furthermore, this study also

showed that the melatonin at the dose of 40 mg/kg significantly reduced the tumor size induced by MDA-MB-231 after 21 days of treatment [15].

Studies indicate melatonin as an important regulator of the expression of several miRNAs. Altered miRNA expression has been shown to result in various diseases, including cancer [41–45]. Wang et al. (2018) showed that the melatonin inhibits the progression and metastasis of hepatocellular carcinoma through the induction of the expression of miRNA Let7i-3p [46]. Recent study revealed that melatonin improves tunicamycin-induced hepatic steatosis and inflammation by decrease of miR-23a in mouse primary hepatocytes and the mouse liver cell line [47]. Long-term treatment with melatonin may decrease post-transcriptional levels of miR-24 and regulate genes involved in cell proliferation, DNA damage, RNA metabolism, cell shape and transformation, inhibit cell proliferation and migration of tumor cells [48]. Melatonin also had a regular anti-tumor effect via the miR-16-5p-Smad3 pathway that inhibits the growth of gastric cancer [49]. Another study revealed that melatonin exhibits antiglioma mechanisms by decreasing the expression of miR-155 by regulating c-MYB [50].

Recent study published by our research group showed that melatonin increases the gene expression of miR-152-3p and decreases your target genes in MDA-MB-468 cells and xenograft model [51]. Analysis of miR-148a-3p gene expression revealed a low level of this miRNA in MDA-MB-231 breast cancer cell line. MiR-148a is poorly expressed in various tumors, indicating that miR-148a can serve as a biomarker for diagnosis and prognosis [52]. Moreover, this miRNA can regulate various target genes and its corresponding pathways, which is related to cell proliferation, invasion and metastasis and angiogenesis [52]. Similar result was observed by Xu et al. (2013) that showed low expression of miR-148a in breast cancer cell lines and other tumor tissue types [28]. Li et al. (2016) observed that compared to the normal breast Hs578Bst cells, miR-148a expression was decreased in MCF-7 cells [53]. Another study observed that the levels of miR-148a in MCF-7, T47D, MDA-MB-231 breast cancer cells were decreased when compared to immortalized breast epithelial MCF-10A cells [28].

There is also evidence of low expression in other types of tumors. In lung cancer, Huang (2016) found that the circulating level of all three members of the miRNA-148/152 family was significantly lower in plasma samples from cancer patients compared to healthy controls [54]. Furthermore, the expression levels of

miR-148a, miR-148b and miR-152 in the late stage lung cancer group were lower than the early stage lung cancer group [54]. Zhao et al. (2016) found that miR-148a was significantly downregulated in ovarian cancer tissues compared to their matched adjacent non-tumor tissues [55].

After analysis of miR-148a-3p basal expression, we observed a small effect of melatonin on the increase of gene expression of miR148-3p when was overexpressed by lentiviral infection. This effect was already expected because although melatonin is able to modify the expression of innumerable genes related to breast cancer, its role in the regulation of miRNAs is not entirely clear [16,17,56,57]. Thus, although there are studies involving melatonin and miR-148a [58], there are still no studies in breast cancer.

In addition to evaluate the gene expression of miR-148a, we performed the quantification of the gene expression of its IGF-1R and VEGF possible target genes. Our results show that melatonin decreases the gene expression of these proteins, similar to the effect caused by the overexpression of miR-148a-3p. We also performed the relative quantification of the protein expression of IGF-1R and VEGF target genes. As expected, the results showed that melatonin decreases the expression of these pro-angiogenic proteins, which agrees with the results obtained in the analysis of gene expression. Our results agree with Xu et al. (2013) that showed by using western blot and immunohistochemical with that the expression level of IGF-1R were significantly up-regulated in breast cancer tissues and cell lines compared with matched normal breast tissues and MCF-10A, respectively [28].

The functional tests showed with the melatonin treatment decreased survival, migration and invasion rates of tumor cells. These results corroborate another study published by our research group, which shows the inhibitory action of melatonin on the migration and invasion of breast tumor cells [31]. Nooshin et al. (2017) have shown that melatonin inhibits proliferation, cell invasion, angiogenesis and metastasis [59]. Mao et al. (2010) have shown that melatonin exerts an inhibitory effect on the invasion of breast cancer cells by regulating the P38 pathway and inhibiting the expression and activity of MMP-2 and MMP-9 (matrix metalloproteinases 2 and 9) [60].

A similar inhibitory effect on survival rates, migration and invasion cell was observed with overexpression of miR-148a-3p. Recently, Jiang et al. (2016) showed that miR-148a inhibits the migration and invasion of MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cells by directly targeting WNT-1 and downregulating the Wnt/ β -catenin

signaling pathway [61]. Xue et al. (2016) found that miR-148a inhibits the migration of breast cancer cells by targeting MMP-13 [62].

To validate the data obtained in the *in vitro* study, we evaluated the response to treatment with melatonin in a xenograft model with MDA-MB-231 cells. The results validate the data obtained with breast tumor cells and showed that melatonin can modulate the expression of the tumor suppressor miR-148a-3p and, consequently, decrease the gene and protein levels of IGF-1R and VEGF in the breast tumors. Further experiments are necessary to clarify the pathways and mechanisms involved in the antiangiogenic action of melatonin.

3.5. Conclusion

In view of the results obtained, our study for the first time demonstrated that melatonin modulates the miR-148a-3p and decreased the angiogenic factors IGF-1R and VEGF in MDA-MB-231 cells and breast tumor derived of xenograft model. Thus, this hormone has action in the angiogenesis process and plays a crucial role in tumor progression.

3.6. Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest, financial or otherwise.

3.7. Acknowledgments

The authors thank the Funded by Fundacao de Amparo a Pesquisa do Estado de Sao Paulo (FAPESP/Brazil, grant 2015/04780-6), Conselho Nacional de Pesquisa e Tecnologia (CNPq) and Coordenacao de Aperfeicoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) supporting fellowship. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

3.8. Author contributions

J.Z.L. performed all *in vitro* experiments with MDA-MB-231 and xenograft model. L.C.F. assisted in the analysis of the data obtained. B.C.L. and A.F.A.P. performed the migration and invasion cell assays. M.C.B. and T.F.B. contributed to miR-148a-3p overexpression in the cells. D.A.P.C.Z. supervise *in vitro* and *in vivo* studies, contribute to a data analysis and manuscript writing.

3.9. List of abbreviations

GFP = Green fluorescent protein

HIF-1 α = Hypoxia Inducible Factor-1 α

IGF-1 = Insulin-like Growth Factor-1

IGF-1R = Insulin-like Growth Factor Receptor-1

miRNA = MicroRNA

mRNA = Messenger RNA

VEGF = Vascular Endothelial Growth Factor

3.10. Ethics approval

This study was approved by the ethics committee on animal use (CEUA) of the Faculty of Medicine of Sao Jose do Rio Preto (FAMERP), #001-002745/2015, which are developed following national and international standards of ethics in animal experimentation.

3.11. Human and animal rights

No human were used in this study. The reported experiments on animal were in accordance with the ethical standards of the committee responsible for animal experimentation (institutional and national), and with the ARRIVE (Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments) guidelines published in 2010.

3.12. References

1. INCA - Instituto Nacional de Câncer. INCA. 2018
2. Walker RA, Jones JL, Chappell S, Walsh T, Shaw JA. Molecular pathology of breast cancer and its application to clinical management. *Cancer Metastasis Ver* 1997; 16(1–2):5–27.
3. Redig AJ, McAllister SS. Breast cancer as a systemic disease: a view of metastasis. *J Intern Med* 2013; 274(2):113–26. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23844915>
4. Hicks DG, 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* 2008; 132(6):1008–15.
5. Park S-Y, Jang W-J, Yi E-Y, Jang J-Y, Jung Y, Jeong J-W, et al. Melatonin suppresses tumor angiogenesis by inhibiting HIF-1 α stabilization under

- hypoxia. *J Pineal Res* 2010; 48(2):178–84.
6. Wang Z, Dabrosin C, Yin X, Fuster MM, Arreola A, Rathmell WK, et al. Broad targeting of angiogenesis for cancer prevention and therapy. *Seminars in Cancer Biology* 2015; p. S224–43.
7. Danza K, De Summa S, Pinto R, Pilato B, Palumbo O, Merla G, et al. MiR-578 and miR-573 as potential players in BRCA-related breast cancer angiogenesis. *Oncotarget* 2015; 6(1):471–83.
8. Calin GA, Ferracin M, Cimmino A, Di Leva G, Shimizu M, Wojcik SE, et al. A MicroRNA Signature Associated with Prognosis and Progression in Chronic Lymphocytic Leukemia. *N Engl J Med* 2005; 353(17):1793–801.
9. Ma L, Teruya-Feldstein J, Weinberg RA. Tumour invasion and metastasis initiated by microRNA-10b in breast cancer. *Nature* 2007; 449(7163):682–8.
10. Bertoli G, Cava C, Castiglioni I. MicroRNAs: New Biomarkers for Diagnosis, Prognosis, Therapy Prediction and Therapeutic Tools for Breast Cancer. *Theranostics* 2015; 5(10):1122–43.
11. Wang S, Olson EN. AngiomiRs—Key regulators of angiogenesis. *Curr Opin Genet Dev* 2009; 19(3):205–11.
12. Di Bella G, Mascia F, Ricchi A, Colori B. Evaluation of the safety and efficacy of the first-line treatment with somatostatin combined with melatonin, retinoids, vitamin D3, and low doses of cyclophosphamide in 20 cases of breast cancer: a preliminary report. *Neuro Endocrinol Lett* 2013; 34(7):660–8.
13. Sousa-Neto, J.A.; Scaldaferrri PM. Melatonina e câncer -revisão da literatura. *Rev Bras Cancerol* 2005; 51(1):49–58.
14. Alvarez-García V, González A, Alonso-González C, Martínez-Campa C, Cos S. Regulation of vascular endothelial growth factor by melatonin in human breast cancer cells. *J Pineal Res* 2013; 54(4):373–80.
15. Jardim-Perassi BV, Arbab AS, Ferreira LC, Borin TF, Varma NRS, Iskander ASM, et al. Effect of Melatonin on Tumor Growth and Angiogenesis in Xenograft Model of Breast Cancer. Rocha S, editor. *PLoS One* 2014; 9(1):e85311.
16. Cucina A, Proietti S, D’Anselmi F, Coluccia P, Dinicola S, Frati L, et al. Evidence for a biphasic apoptotic pathway induced by melatonin in MCF-7 breast cancer cells. *J Pineal Res* 2009; 46(2):172–80.
17. Girgert R, Hanf V, Emons G, Gründker C. Membrane-bound melatonin receptor MT1 down-regulates estrogen responsive genes in breast cancer cells. *J Pineal*

- Res 2009; 47(1):23–31.
18. Martínez-Campa CM, Alonso-González C, Mediavilla MD, Cos S, González A, Sanchez-Barcelo EJ. Melatonin down-regulates hTERT expression induced by either natural estrogens (17beta-estradiol) or metalloestrogens (cadmium) in MCF-7 human breast cancer cells. *Cancer Lett* 2008; 268(2):272–7.
 19. Lee SE, Kim SJ, Youn J-P, Hwang SY, Park C-S, Park YS. MicroRNA and gene expression analysis of melatonin-exposed human breast cancer cell lines indicating involvement of the anticancer effect. *J Pineal Res* 2011; 51(3):345–52.
 20. Chen Y, Song Y-X, Wang Z-N. The microRNA-148/152 family: multi-faceted players. *Mol Cancer* 2013; 12:43.
 21. Friedrich M, Pracht K, Mashreghi M-F, Jäck H-M, Radbruch A, Seliger B. The role of the miR-148/-152 family in physiology and disease. *Eur J Immunol* 2017; 47(12):2026–38.
 22. Xu Q, Jiang Y, Yin Y, Li Q, He J, Jing Y, et al. A regulatory circuit of miR- 148 a / 152 and DNMT 1 in modulating cell transformation and tumor angiogenesis through IGF-IR and IRS 1. *J Mol Cell Biol* 2013; 5:3–13.
 23. Hiroki E, Akahira J, Suzuki F, Nagase S, Ito K, Suzuki T, et al. Changes in microRNA expression levels correlate with clinicopathological features and prognoses in endometrial serous adenocarcinomas. *Cancer Sci* 2010; 101(1):241–9.
 24. Tsuruta T, Kozaki K -i., Uesugi A, Furuta M, Hirasawa A, Imoto I, et al. miR-152 Is a Tumor Suppressor microRNA That Is Silenced by DNA Hypermethylation in Endometrial Cancer. *Cancer Res* 2011; 71(20):6450–62.
 25. Braconi C, Huang N, Patel T. MicroRNA-dependent regulation of DNA methyltransferase-1 and tumor suppressor gene expression by interleukin-6 in human malignant cholangiocytes. *Hepatology* 2010; 51(3):NA-NA.
 26. Stewart SA, Dykxhoorn DM, Palliser D, Mizuno H, Yu EY, An DS, et al. Lentivirus-delivered stable gene silencing by RNAi in primary cells. *RNA* 2003; 9(4):493–501.
 27. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, et al. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clin Chem* 2009; 55(4):611–22.
 28. Xu Q, Jiang Y, Yin Y, Li Q, He J, Jing Y, et al. A regulatory circuit of miR-148a/152 and DNMT1 in modulating cell transformation and tumor angiogenesis

- through IGF-IR and IRS1. *J Mol Cell Biol* 2013; 5(1):3–13.
29. Boudreau N, Myers C. Breast cancer-induced angiogenesis: multiple mechanisms and the role of the microenvironment. *Breast Cancer Res* 2003; 5(3):140–6.
 30. Tominaga N, Katsuda T, Ochiya T. Micromanaging of tumor metastasis by extracellular vesicles. *Semin Cell Dev Biol* 2015; 40:52–9.
 31. Borin TF, Arbab AS, Gelaleti GB, Ferreira LC, Moschetta MG, Jardim-Perassi BV, et al. Melatonin decreases breast cancer metastasis by modulating Rho-associated kinase protein-1 expression. *J Pineal Res* 2016; 60(1):3–15.
 32. Gelaleti GB, Borin TF, Maschio-Signorini LB, Moschetta MG, Jardim-Perassi BV, Calvinho GB, et al. Efficacy of melatonin, IL-25 and siIL-17B in tumorigenesis-associated properties of breast cancer cell lines. *Life Sci* 2017; 183:98–109.
 33. Lopes JR, Kavagutti M da S, de Medeiros FAF, de Campos Zuccari DAP. Evaluation of Melatonin Effect on Human Breast Cancer Stem Cells Using a Threedimensional Growth Method of Mammospheres. *Anticancer Agents Med Chem* 2017; 17(7):961–5.
 34. Jardim-Perassi BV, Lourenço MR, Doho GM, Grígoilo IH, Gelaleti GB, Ferreira LC, et al. Melatonin Regulates Angiogenic Factors under Hypoxia in Breast Cancer Cell Lines. *Anticancer Agents Med Chem* 2016; 16(3):347–58.
 35. Maschio-Signorini LB, Gelaleti GB, Moschetta MG, Borin TF, Jardim-Perassi BV, Lopes JR, et al. Melatonin regulates angiogenic and inflammatory proteins in MDA-MB-231 cell line and in co-culture with cancer-associated fibroblasts. *Mini-Reviews Med Chem* 2016; 16(17).
 36. Cos S, Blask DE, Lemus-Wilson A, Hill AB. Effects of melatonin on the cell cycle kinetics and “estrogen-rescue” of MCF-7 human breast cancer cells in culture. *J Pineal Res* 1991; 10(1):36–42.
 37. Kilic E, Kilic Ü, Reiter RJ, Bassetti CL, Hermann DM. Prophylactic use of melatonin protects against focal cerebral ischemia in mice: role of endothelin converting enzyme-1. *J Pineal Res* 2004; 37(4):247–51.
 38. Lissoni P, Rovelli F, Malugani F, Bucovec R, Conti A, Maestroni GJ. Anti-angiogenic activity of melatonin in advanced cancer patients. *Neuro Endocrinol Lett* 2001; 22(1):45–7.
 39. Alicia González-González, Alicia González, Carolina Alonso-González, Javier Menéndez-Menéndez, Carlos Martínez-Campa SC. Complementary actions of

- melatonin on angiogenic factors, the angiopoietin/Tie2 axis and VEGF, in co-cultures of human endothelial and breast cancer cells. *Oncol Rep* 2017; 39(1):433–41.
40. Miller SC, Pandi-Perumal SR, Pandi PSR, Esquifino AI, Cardinali DP, Maestroni GJM. The role of melatonin in immuno-enhancement: potential application in cancer. *Int J Exp Pathol* 2006; 87(2):81–7.
 41. Das R, Gregory PA, Fernandes RC, Denis I, Wang Q, Townley SL, et al. MicroRNA-194 Promotes Prostate Cancer Metastasis by Inhibiting SOCS2. *Cancer Res* 2017; 77(4):1021–34.
 42. Smolle MA, Leithner A, Posch F, Szkandera J, Liegl-Atzwanger B, Pichler M. MicroRNAs in Different Histologies of Soft Tissue Sarcoma: A Comprehensive Review. *Int J Mol Sci* 2017; 18(9):1960.
 43. Qu S, Liu Z, Yang X, Zhou J, Yu H, Zhang R, et al. The emerging functions and roles of circular RNAs in cancer. *Cancer Lett* 2018; 414:301–9.
 44. Kennedy L, Francis H, Meng F, Glaser S, Alpini G. Diagnostic and therapeutic potentials of microRNAs in cholangiopathies. *Liver Res* 2017; 1(1):34–41.
 45. Duggal B, Gupta MK, Naga Prasad S V. Potential Role of microRNAs in Cardiovascular Disease: Are They up to Their Hype? *Curr Cardiol Ver* 2016; 12(4):304–10.
 46. Wang T-H, Hsueh C, Chen C-C, Li W-S, Yeh C-T, Lian J-H, et al. Melatonin Inhibits the Progression of Hepatocellular Carcinoma through MicroRNA Let7i-3p Mediated RAF1 Reduction. *Int J Mol Sci* 2018; 19(9).
 47. Kim S-J, Kang HS, Lee J-H, Park J-H, Jung CH, Bae J-H, et al. Melatonin ameliorates ER stress-mediated hepatic steatosis through miR-23a in the liver. *Biochem Biophys Res Commun* 2015; 458(3):462–9.
 48. Mori F, Ferraiuolo M, Santoro R, Sacconi A, Goeman F, Pallocca M, et al. Multitargeting activity of miR-24 inhibits long-term melatonin anticancer effects. *Oncotarget* 2016;7(15):20532–48.
 49. Zhu C, Huang Q, Zhu H. Melatonin Inhibits the Proliferation of Gastric Cancer Cells Through Regulating the miR-16-5p-Smad3 Pathway. *DNA Cell Biol* 2018; 37(3):244–52.
 50. Gu J, Lu Z, Ji C, Chen Y, Liu Y, Lei Z, et al. Melatonin inhibits proliferation and invasion via repression of miRNA-155 in glioma cells. *Biomed Pharmacother* 2017; 93:969–75.

51. Marques JHM, Mota AL, Oliveira JG, Lacerda JZ, Stefani JP, Ferreira LC, et al. Melatonin restrains angiogenic factors in triple-negative breast cancer by targeting miR-152-3p: In vivo and in vitro studies. *Life Sci* 2018; 208.
52. Mu J, Zhu D, Shen Z, Ning S, Liu Y, Chen J, et al. The repressive effect of miR-148a on Wnt/ β -catenin signaling involved in Glabridin-induced anti-angiogenesis in human breast cancer cells. *BMC Cancer* 2017; 17(1):307.
53. Li F, Liu W, Song Z, Chang D. miR-148a overexpression inhibits cell proliferation and induces cell apoptosis by suppressing the Wnt/ β -catenin signal pathway in breast cancer MCF-7 cells. *Int J Clin Exp Pathol* 2016; 9(3):3349–56.
54. Huang M-X. Down-expression of circulating micro ribonucleic acid (miRNA)-148/152 family in plasma samples of non-small cell lung cancer patients. *J Cancer Res Ther* 2016; 12(2):671.
55. Zhao M, Su Z, Zhang S, Zhuang L, Xie Y, Li X. Suppressive Role of MicroRNA-148a in Cell Proliferation and Invasion in Ovarian Cancer Through Targeting Transforming Growth Factor- β -Induced 2. *Oncol Res* 2016; 24:353–60.
56. Martínez-Campa C, González A, Mediavilla MD, Alonso-González C, Alvarez-García V, Sánchez-Barceló EJ, et al. Melatonin inhibits aromatase promoter expression by regulating cyclooxygenases expression and activity in breast cancer cells. *Br J Cancer* 2009; 101(9):1613–9.
57. Lee SE, Kim SJ, Youn J-P, Hwang SY, Park C-S, Park YS. MicroRNA and gene expression analysis of melatonin-exposed human breast cancer cell lines indicating involvement of the anticancer effect. *J Pineal Res* 2011; 51(3):345–52.
58. Ge H, Shrestha A, Liu C, Wu P, Cheng B. MicroRNA 148a-3p promotes Thrombospondin-4 expression and enhances angiogenesis during tendinopathy development by inhibiting Krüppel-like factor 6. *Biochem Biophys Res Commun* 2018; 502(2):276–82.
59. Nooshinfar E, Safaroghli-Azar A, Bashash D, Akbari ME. Melatonin, an inhibitory agent in breast cancer. *Breast Cancer* 2017; 24(1):42–51.
60. Mao L, Yuan L, Slakey LM, Jones FE, Burow ME, Hill SM. Inhibition of breast cancer cell invasion by melatonin is mediated through regulation of the p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathway. *Breast Cancer Res* 2010; 12(6):R107.
61. Jiang Q, He M, Ma M-T, Wu H-Z, Yu Z-J, Guan S, et al. MicroRNA-148a inhibits breast cancer migration and invasion by directly targeting WNT-1. *Oncol Rep*

2016; 35(3):1425–32.

62. Xue J, Chen Z, Gu X, Zhang Y, Zhang W. MicroRNA-148a inhibits migration of breast cancer cells by targeting MMP-13. *Tumor Biol* 2016; 37(2):1581–90.

3.13. Figures

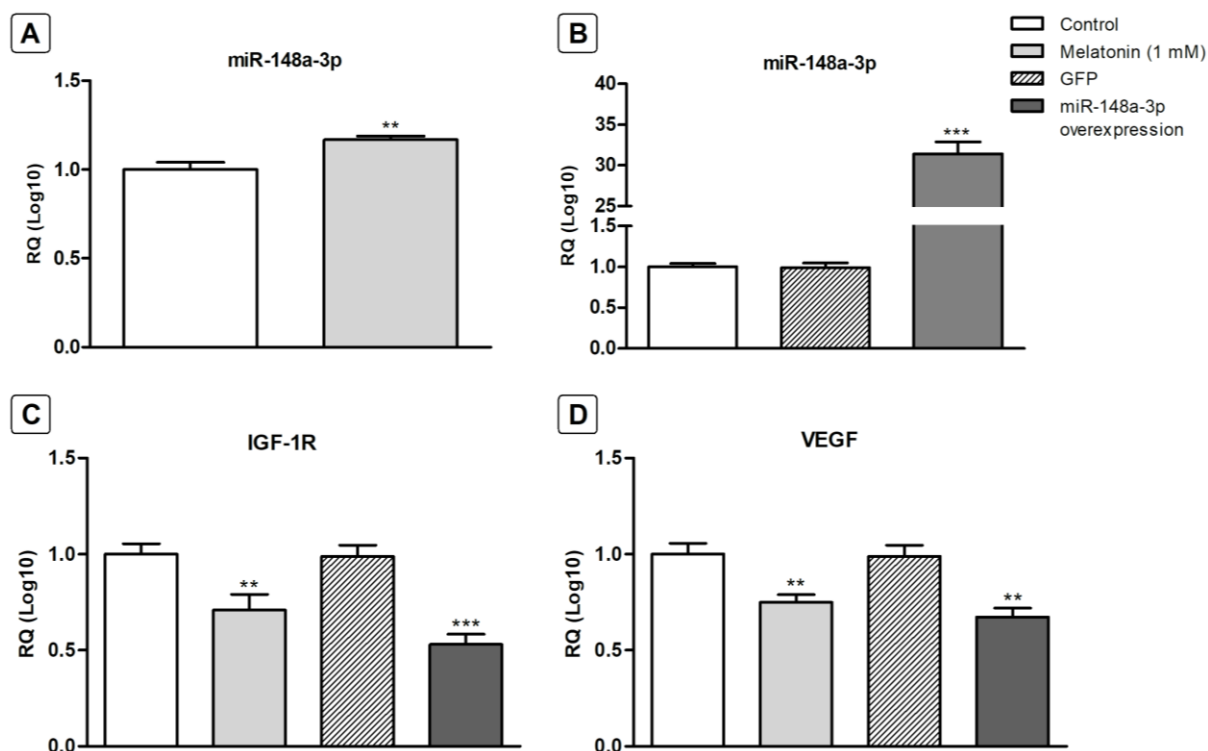


Fig. (1). Analysis of gene expression after melatonin treatment or miR-148a-3p overexpression. Gene expression of *miR-148a-3p* (A, B), *IGF-1R* (C) and *VEGF* (D) of after melatonin treatment (1 mM), compared to control of untreated parental cells and control of *miR-148a-3p* overexpression cells. The gene expression values were relative quantification (RQ) represented and protein expression values were represented in relative levels. Each column is the mean $\pm$ standard three independent experiments in triplicate. Significant value in t-test ($\pm$ S.E.M. **p < 0.001 and ***p < 0.0001 versus control).

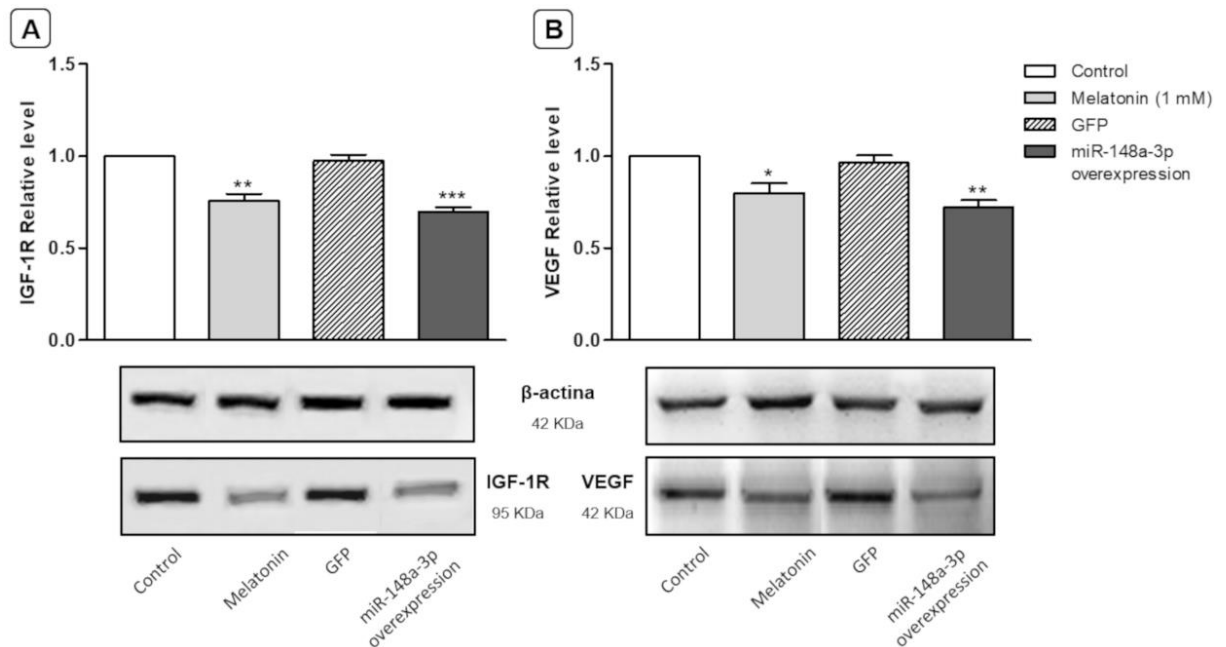


Fig. (2). Analysis of protein expression by Western blotting. Protein expression of IGF-1R (**A**) and VEGF (**B**) values were represented in relative levels. IGF-1R and VEGF protein levels were normalized by β -actin protein, presented in the boxes. Each column is the mean $\pm$ standard error of two independent experiments. Significant value in ANOVA followed by Bonferroni's test ($\pm$ S.E.M. * $p < 0.01$, ** $p < 0.001$ and *** $p < 0.0001$ versus control).

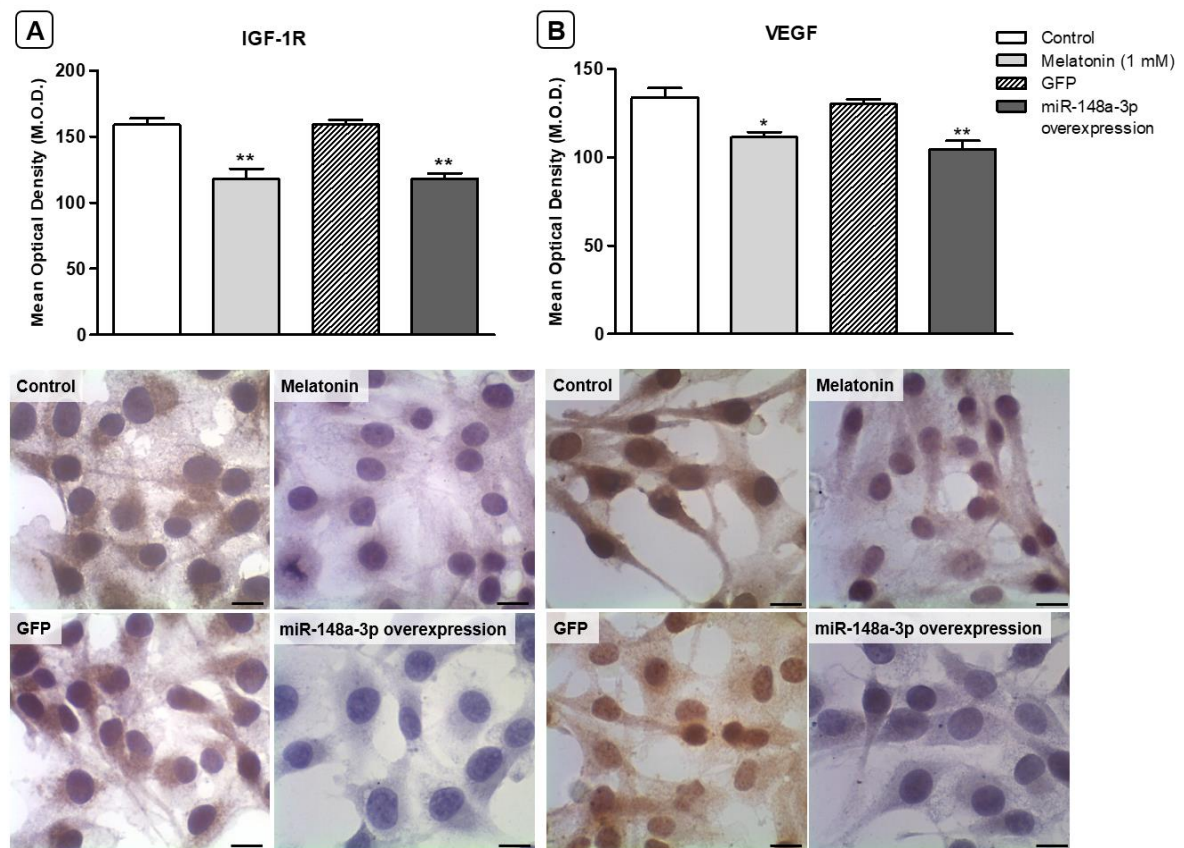


Fig. (3). Analysis of protein expression by Immunocytochemistry. Statistical analysis of protein expression of the protein IGF-1R (**A**) and VEGF (**B**) in the study groups and photomicrographs of the immunocytochemical reaction for the anti-IGF-1R and anti-VEGF antibody. Scale bar: 10 μ m. Each column is the mean $\pm$ standard error two independent experiments in triplicate. The values of mean optical density and standard error for each group are shown in arbitrary units (au). Significant value in ANOVA followed by Bonferroni's test ($\pm$ S.E.M. * $p < 0.01$, ** $p < 0.001$ and *** $p < 0.0001$ versus control).

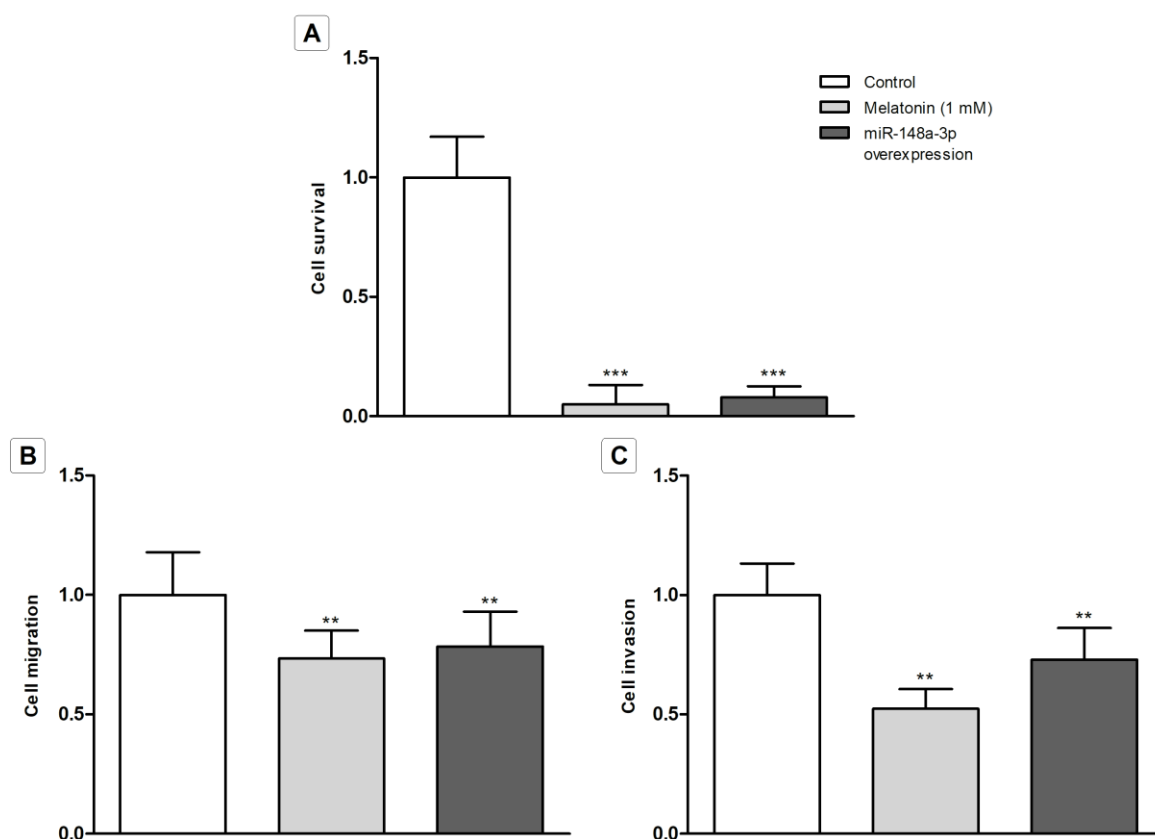


Fig. (4). Analysis of clonogenic survival, migration and invasion assays. Functional assays with tumor cells were performed to assess clonogenic survival (**A**), migration (**B**) and invasion (**C**) assays. Each column is the mean $\pm$ standard error two independent experiments in triplicate. Significant value in ANOVA followed by Bonferroni's test ($\pm$ S.E.M. ** $p < 0.001$ and *** $p < 0.0001$ *versus* control).

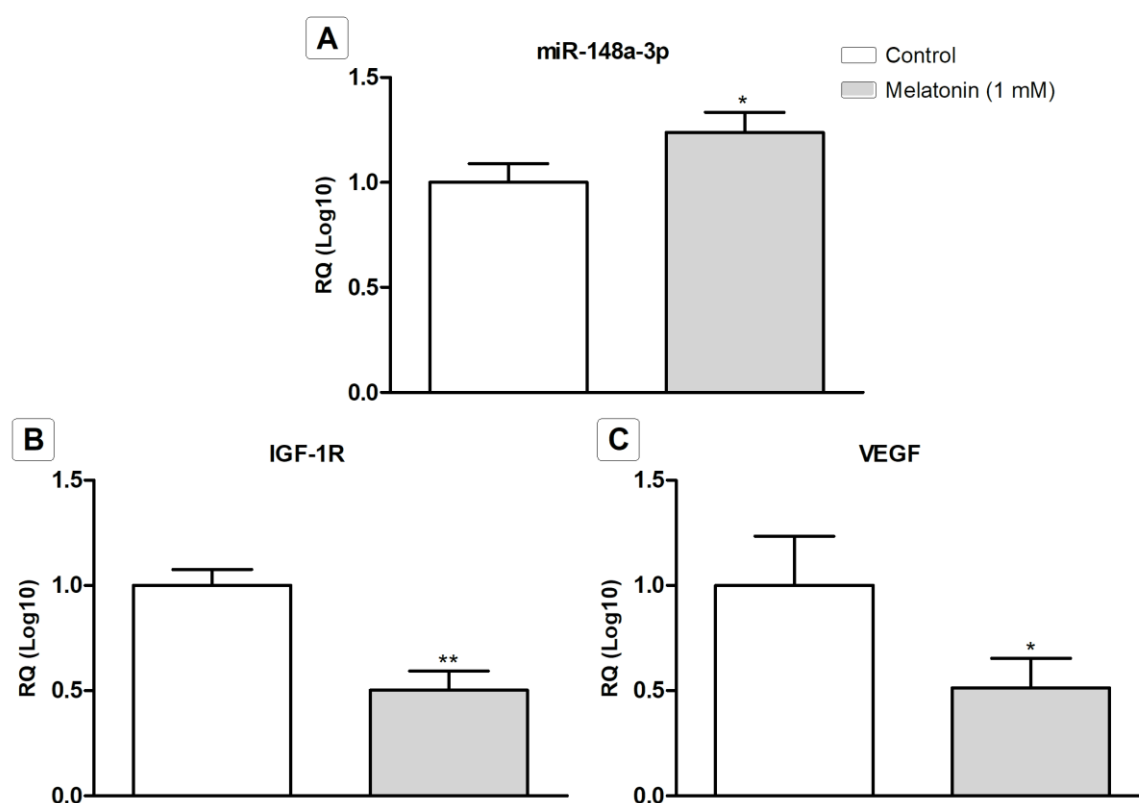


Fig. (5). Analysis of the relative gene expression in tumors. Gene expression of *miR-148a-3p* (A), *IGF-1R* (B) and *VEGF* (C) in the control group and treated with melatonin (1 mM) was performed on tumors. The gene expression values were relative quantification (RQ) represented and protein expression values were represented in relative levels. Each column is the mean $\pm$ standard error of five animals. Significant value in t-test ($\pm$ S.E.M. * $p < 0.01$ and ** $p < 0.001$ versus control).

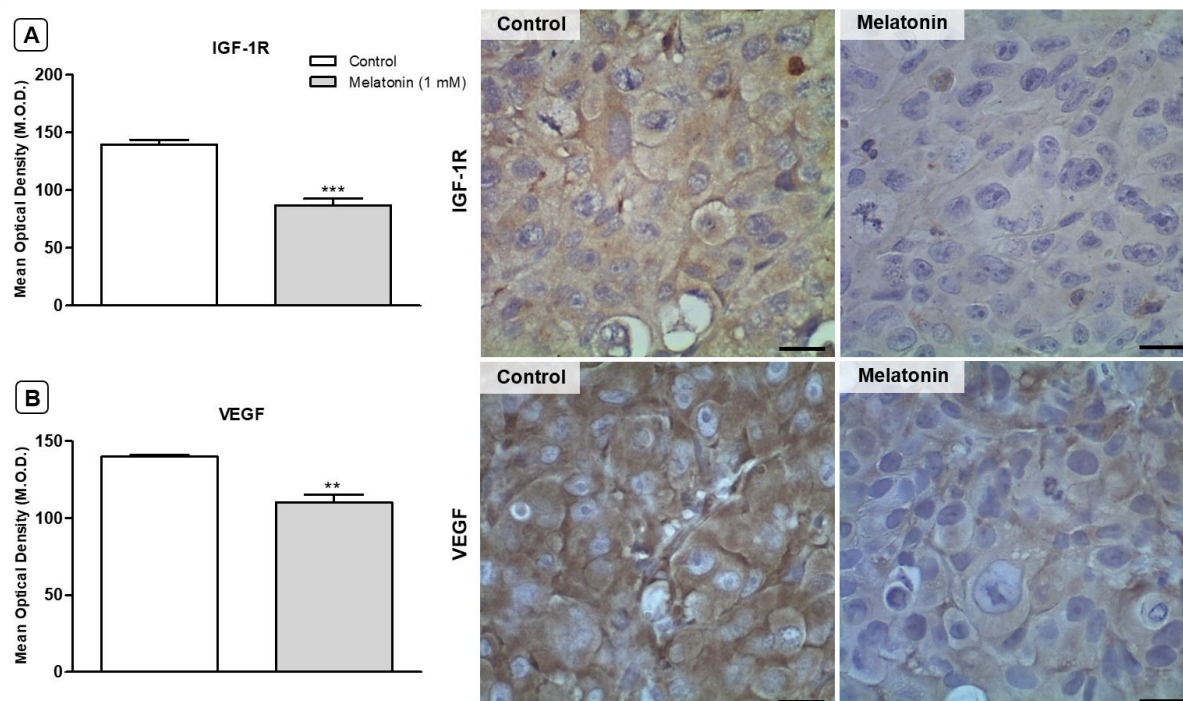
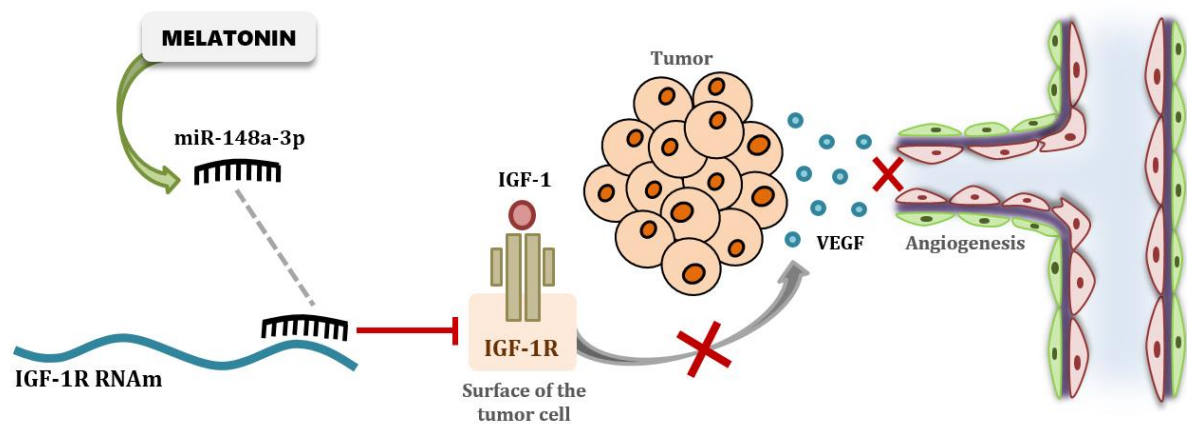


Fig. (6). Protein expression of IGF-1R (**A**) and VEGF (**B**) by immunohistochemistry in tumors treated and untreated with melatonin. Statistical analysis of protein expression in the study groups and photomicrographs of the immunocytochemical reaction for the anti-IGF-1R and anti-VEGF antibody. Scale bar: 10 μ m. Each column is the mean $\pm$ standard error of two independent experiments in triplicate. The values of mean optical density and standard error for each group are shown in arbitrary units (au). Each column is the mean $\pm$ standard error of five animals. Significant value in ANOVA followed by Bonferroni's test ($\pm$ S.E.M. ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$ *versus* control).

Graphical abstract



3.14. Supplementary material

Material and methods

In vitro experimental groups

To evaluate the effect of melatonin treatment on miRNAs, MDA-MB-231 cells were plated and divided into two groups maintained for 24 hours: control (no treatment) and melatonin (1 mM).

Extraction of miRNAs

Extraction of miRNAs was performed on tumor cells in culture after treatment with melatonin. The QIAzol reagent (Qiagen) and the miRNeasy Mini Kit (Qiagen) extraction kit were used to preserve the miRNAs that could be dissipated in a conventional total RNA extraction. Initially, the culture medium was discarded from the culture plates and 500 μ L of QIAzol was added to each well. Then, the homogenate was incubated for 5 min at room temperature, and 40 μ L of chloroform was added to each 0.2 mL of QIAzol, homogenizing by inversion, and kept at room temperature for 3 min. The tubes were centrifuged at 12,000 g for 20 min at 4°C, resulting in a lower phase with phenol and a higher aqueous phase, in which the RNA is concentrated. The aqueous phase was transferred to a new tube containing the same volume of absolute ethanol for RNA precipitation and then transferred to a column. The sample was again centrifuged for 2 min at 10,000 g at 4°C for retention

of the RNA in the column and washed three times with wash solutions from the extraction kit. Then 30 μ L DEPC water (Amersham) was added to elute the total RNA pellet and the miRNAs that were adhered to the column. The RNA concentration of each sample was determined using the NanoDrop 2000 C Spectrophotometer (Thermo Scientific) apparatus. In order to test the integrity and quality of extracted RNA, an aliquot of each sample was submitted to 1% agarose gel electrophoresis for analysis of the specific bands of the 18S and 28S subunits, representative of rRNA.

Obtaining the cDNA

The cDNA (complementary DNA) was used to evaluate the gene expression of the miRNAs by means of the Reverse Transcriptase (Polymerase Chain Reaction) with the miScript II RT kit (Qiagen). The RNA samples were diluted to a concentration of 250 ng/ μ L. The MyScript Hispec 5 $\times$ buffer was used to make the complementary DNA strand and create the mature miRNA. Reagents miScript Nucleics Mix 10 $\times$, miScript Hispec 5 $\times$, RNase-free water and 250 μ g RNA were combined in a final concentration of 20 μ L. The reverse transcription reaction mixture was incubated at 37°C for 60 min and 95°C for 5 min to inactivate the action of the reverse transcriptase. Samples were stored at -20°C for the following steps.

Analysis of miRNA expression by PCR Array

The PCR Array assay allows the analysis of a panel of genes specific to a biological process or pathway. The RT² Profiler™ PCR Array Human Breast Cancer is composed of 84 mature miRNAs (A1-G12) (Fig. 1) and control groups. The controls consist of duplicates of *C. elegans* (miR-39), used as reaction normalizers (H1 and H2) and six interfering RNAs that can be used to normalize the internal control of the reaction: SNORD61 (H3), SNORD68 (H4), SNORD72 (H5), SNORD95 (H6), SNORD96A (H7) and RNU6-2 (H8). In addition, the plate contains duplicates of miRTC for the control of the reverse transcription reaction (H9 and H10) and PPC which consist of positive controls of the PCR reaction (H11 and H12) (Fig. 1). To perform the assay, a mix containing 100 μ L of diluted cDNA (20 μ L of cDNA previously synthesized + 80 μ L of water) was prepared, 1375 μ L of 2 $\times$ QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix, 275 μ L of 10 $\times$ miScript Universal Primer, and 1000 μ L of RNase-free water according to the manufacturer's guidelines. In the 96-well plate, 25 μ L of the PCR-Array reaction mixture was added to each well. The apparatus

used was the StepOnePlus real-time PCR (Applied Biosystems). To activate the Go Taq DNA polymerase enzyme the plate was heated to 95°C for 15 min. Thereafter, forty three-step cycles were performed, which included denaturation at 94°C for 15 s, annealing at 55°C for 30 s, and extension at 70°C for 30 s. Fluorescence data were collected during the extension step. The value of the relative expression of the miRNAs of interest was determined using the DataAssist 3.0 software (Applied Biosystem), by the method of quantification in relation to the mean of normalizing genes used as endogenous control ($\Delta\Delta C_t$).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Let-7a	Let-7b	Let-7c	Let-7d	Let-7e	Let-7f	Let-7g	Let-7i	miR-1	miR-100	miR-107	miR-10a
B	miR-10b	miR-125b	miR-125b1	miR-128	miR-129	miR-130a	miR-130b	miR-132	miR-140	miR-141	miR-145	miR-148
C	miR-152	miR-155	miR-15a	miR-15b	miR-16	miR-17	miR-181a	miR-181b	miR-181c	miR-181d	miR-182	miR-186
D	miR-18a	miR193b	miR-195	miR-199a3p	miR-199a5p	miR-19a	miR-19b	miR-200a	miR-200b	miR-200c	miR-202	miR-203
E	miR-204	miR-205	miR-206	miR-20a	miR-20b	miR-21	miR-210	miR-212	miR-214	miR-22	miR-222	miR-223
F	miR-25	miR-26a	miR-26b	miR-27a	miR-27b	miR-29a	miR-29b	miR-29c	miR-31	miR-328	miR-340	miR-424
G	miR-429	miR-485	miR-489	miR-495	miR-497	miR-548	miR-607	miR-613	miR-7	miR-93	miR-96	miR-98
H	cel-miR-39	cel-miR-39	SNORD 61	SNORD 68	SNORD 72	SNORD 95	SONOR D96A	RNU6-6P	miRTC	miRTC	PPC	PPC

Fig. (1S). RT² Profiler™ PCR Array Human Breast Cancer Plate. Gene profile profile composed of 84 mature miRNAs related to breast cancer.

Results

Selection of miR-148a-3p for validation

For the selection of miRNAs related to angiogenesis, a search was performed on the mirDIP database (<http://ophid.utoronto.ca/mirDIP>) and bibliographic references. Analysis of the miRNAs of the MDA-MB-231 strain by PCR Array showed 24 positively regulated miRNAs (Fig. 2A) and 8 negatively regulated miRNAs (Fig. 2B) after treatment with melatonin. Among the differentially expressed miRNAs, the miR-148a-3p have been chosen for the next validation steps because they are of scientific relevance in the studies of breast cancer and paper in the angiogenic process.

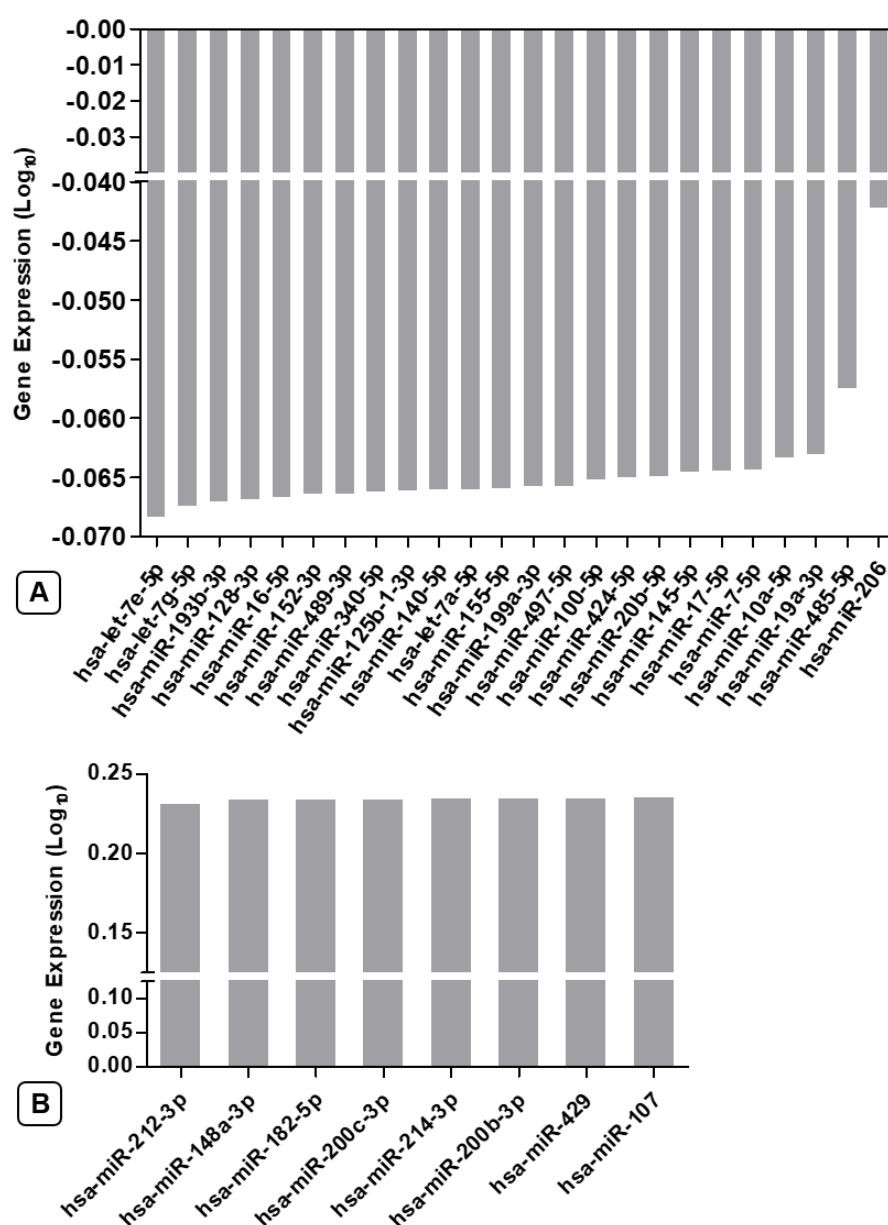


Fig. (2S). MiRNAs with low (A) and high (B) expression after treatment with melatonin. The profile of miRNAs, whether or not treated with melatonin, was performed by miScript® miRNA PCR Array (Qiagen) containing 84 miRNAs related to breast cancer. The results demonstrate the mean $\pm$ S.E.M. of three independent trials in triplicate ($p < 0.0001$ *versus* control).

4. DISCUSSÃO

O processo de angiogênese permite o crescimento e a progressão tumoral, além de facilitar a ocorrência da disseminação metastática das células tumorais (BOUDREAU; MYERS, 2003; TOMINAGA; KATSUDA; OCHIYA, 2015). Devido a importância desse processo, sua regulação tem sido alvo para o desenvolvimento de novas terapias e estudos indicam a melatonina como um agente oncostático natural, além de estar diretamente relacionada à modulação da formação de novos vasos sanguíneos (BORIN et al., 2016; JARDIM-PERASSI et al., 2016; GELALETI et al., 2017; LOPES et al., 2017). Nossos resultados demonstram que a melatonina é capaz de regular a expressão do supressor tumoral miR-148a-3p que, por sua vez, está envolvido na regulação dos genes alvo IGF-1R e VEGF, ambos relacionados com a angiogênese e progressão tumoral.

O efeito da melatonina está sendo estudado e nosso grupo de pesquisa identificou ações antitumorais como a diminuição da proliferação celular, angiogênese e metástase em células de câncer de mama MDA-MB-231 e MCF-7 em concentrações superiores às fisiológicas (JARDIM-PERASSI et al., 2014, 2016; MASCHIO-SIGNORINI et al., 2016; GELALETI et al., 2017). A concentração de 1 mM de melatonina foi definida previamente na linhagem celular MDA-MB-231. Jardim-Perassi e colaboradores (2014) avaliaram diferentes concentrações de melatonina por meio do teste MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) e mostraram que apenas a concentração farmacológica de 1 mM diminuiu significativamente a viabilidade celular da MDA-MB-231. Além disso, o esse estudo *in vivo* também mostrou que a melatonina na dose de 40 mg/kg reduziu significativamente o tamanho do tumor induzido pelas células MDA-MB-231 após 21 dias de tratamento (JARDIM-PERASSI et al., 2014).

A análise da expressão gênica de miR-148a-3p revelou um baixo nível basal deste supressor tumoral na linhagem MDA-MB-231. O miR-148a apresenta baixa expressão em vários tipos tumorais, podendo ser indicando como biomarcador para o diagnóstico e prognóstico do câncer. Além disso, esse miRNA atua na regulação de vários genes e vias de sinalização relacionadas à proliferação celular, invasão, metástase e angiogênese (MU et al., 2017). Resultado semelhante ao que obtivemos foi observado por Xu e colaboradores (2013) que mostraram baixa expressão de miR-148a em linhagens celulares de câncer de mama e outros tipos tumorais (XU et al., 2013). Li e colaboradores (2016) observaram que o miR-148a encontra-se significativamente reduzido nas células de câncer de mama MCF-7

quando comparadas com as células normais de mama (LI et al., 2016). Outro estudo mostrou que os níveis de miR-148a nas células tumorais de mama MCF-7, T47D, MDA-MB-231 estavam dramaticamente reduzidos quando comparados aos das células epiteliais normais de mama MCF-10A (XU et al., 2013).

A baixa expressão desse miRNA também foi encontrada em outros tipos tumorais, mostrando não ser uma característica relacionada especificamente com o câncer de mama. No câncer de pulmão, Huang (2016) verificou que o nível circulante de todos os três membros da família miRNA-148/152 (miR-148a, miR-148b e miR-152) foi significativamente menor em amostras de plasma de pacientes com câncer em comparação com controles saudáveis. Além disso, os níveis de expressão dessa família de miRNAs em pacientes com câncer de pulmão nos estágios mais avançados foram menores do que em pacientes com câncer de pulmão em estágio inicial (HUANG, 2016). Zhao e colaboradores (2016) mostraram que o miR-148a tem reduzida expressão em câncer de ovário quando comparados com os seus tecidos adjacentes não tumorais (ZHAO et al., 2016).

Após a análise da expressão basal do miR-148a, observamos efeito regulatório positivo da melatonina em seu nível gênico, efeito semelhante ao observado com a superexpressão de miR-148a-3p por transfecção viral. Foi demonstrado que a melatonina é capaz de modificar a expressão de inúmeros genes relacionados ao câncer de mama (MARTÍNEZ-CAMPA et al., 2008; CUCINA et al., 2009; GIRGERT et al., 2009), indicando seu potencial papel na regulação de níveis de miRNAs (LEE et al., 2011). No entanto, não existem estudos envolvendo o miR-148a e a melatonina, o que torna este estudo inédito.

Estudo recente publicado pelo nosso grupo de pesquisa mostrou que a melatonina aumenta a expressão gênica do miR-152-3p e diminui seus genes alvo em células MDA-MB-468 e modelo tumoral (MARQUES et al., 2018). Wang e colaboradores (2018) mostraram que a melatonina inibe a progressão e a metástase do carcinoma hepatocelular através da indução da expressão do Let7i-3p (WANG et al., 2018). Já foi descrito que a melatonina melhora o quadro de esteatose hepática e inflamação induzida por tunicamicina pela diminuição de miR-23a em cultura primária de hepatócitos e na linhagem celular de fígado de camundongo (KIM et al., 2015). O tratamento a longo prazo com melatonina pode diminuir os níveis pós-transcricionais de miR-24 e regular genes envolvidos na proliferação celular, danos no DNA, metabolismo de RNA, forma e transformação celular, inibição da

proliferação e migração de células tumorais (MORI et al., 2016). A melatonina também teve um efeito anti-tumoral por meio da regulação da via miR-16-5p-Smad3 que inibe o crescimento do câncer gástrico (ZHU; HUANG; ZHU, 2018). Além disso, foi demonstrado que a melatonina exibe mecanismos antitumorais de antiglioma diminuindo a expressão do miR-155 e regulando o c-MYC (GU et al., 2017).

Além de avaliar a expressão gênica do miR-148a-3p, realizamos a quantificação da expressão gênica de seus possíveis genes alvos, IGF-1R e do VEGF. A quantificação dos níveis gênicos de IGF-1R e VEGF mostrou que a melatonina diminui a expressão gênica desses alvos, efeito semelhante ao causado pela superexpressão de miR-148a-3p. Concordando com estes dados de expressão gênica, a quantificação proteica de IGF-1R e VEGF mostrou que a melatonina diminui também a expressão dessas proteínas pró-angiogênicas. Nossos resultados foram equivalentes aos obtidos por Xu e colaboradores (2013) que mostraram redução significativa do nível proteico de IGF-1R por *western blotting* e imunohistoquímica em tecidos de câncer de mama e linhagens celulares em comparação com os tecidos de mama normais e MCF-10A, respectivamente (XU et al., 2013).

O miR-148a é um importante supressor tumoral que inibe a proliferação e formação de colônias por células de câncer de mama, além de atuar na angiogênese tumoral através do bloqueio de IGF-1 e seu receptor IGF-1R (FÜRSTENBERGER; MORANT; SENN, 2003; XU et al., 2013), proteínas altamente expressas em mais de 40% dos tumores mamários (XU et al., 2013). Estudos envolvendo membros da família miR-148 e seu papel de supressão no câncer de mama são escassos. IGF-1R regula a angiogênese em vários tipos de tumores e atua na migração e formação de tubos capilares por células endoteliais. Além disso, esse receptor aumenta a expressão de HIF-1 α e VEGF em várias linhas celulares de câncer de mama (FÜRSTENBERGER; MORANT; SENN, 2003; XU et al., 2013). A alta expressão de miR-148 inibe a expressão de IGF-1R através da sua ligação à região 3'-UTR, levando ao bloqueio da expressão de HIF-1 α e VEGF e consequentemente do processo de formação de novos vasos sanguíneos (XU et al., 2013).

Concluídas as quantificações gênicas e proteicas, realizamos as análises funcionais para verificar a efetiva ação da melatonina na atividade das células MDA-MB-231 relacionadas com a progressão tumoral por meio dos testes de

sobrevivência, migração e invasão celular. Esses ensaios mostraram que a melatonina apresenta efeito inibitório nessas funções celulares. Nossos resultados corroboram outro estudo publicado por nosso grupo de pesquisa que mostrou que a melatonina diminui as taxas de migração e invasão de células tumorais de mama (BORIN et al., 2016). Nooshinfar e colaboradores (2017) mostraram que a melatonina inibe a proliferação, invasão celular, angiogênese e metástase de células tumorais de mama. Outro estudo também mostrou que a melatonina exerce um efeito inibitório na invasão de células de câncer de mama pela regulação da via P38 e inibição da expressão e atividade das metaloproteinases 2 e 9 (MMP-2 e MMP-9) (MAO et al., 2010).

Efeito inibitório semelhante foi observado com a superexpressão de miR-148a-3p nas taxas de sobrevivência clonogênica, migração e invasão celular. Estudo mostra que o miR-148a inibe a migração e a invasão das células de câncer de mama MCF-7 e MDA-MB-231 pela regulação negativa da via de sinalização Wnt/ β -catenina (JIANG et al., 2016). Xue e colaboradores (2016) descobriram que o miR-148a inibe a migração de células de câncer de mama por meio da metaloproteinase 13 (MMP-13) (XUE et al., 2016).

Com a finalidade de validar os dados obtidos no estudo *in vitro*, avaliamos a resposta ao tratamento com melatonina em modelo xenográfico por implantação tumoral com células MDA-MB-231. Os resultados obtidos validaram o estudo *in vitro* e mostraram que a melatonina foi capaz de aumentar a expressão do supressor tumoral miR-148a-3p e, conseqüentemente, diminuir a expressão dos seus genes alvo IGF-1R e VEGF no tecido tumoral. Além disso, a quantificação proteica confirmou a redução dos níveis de IGF-1R e VEGF em amostras de tumores tratadas com melatonina.

Os resultados obtidos mostram que a melatonina está envolvida no processo de angiogênese pela regulação da expressão do supressor tumoral miR-148a-3p e seus genes alvo IGF-1R e VEGF. A regulação desse processo pela melatonina foi eficaz em ambos modelos, *in vitro* e *in vivo*. Estudos e pesquisas que buscam a ação terapêutica deste hormônio no câncer confirmam ser efetivos para sua utilização na inibição da progressão tumoral.

5. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos com as células tumorais de mama MDA-MB-231 e modelo xenográfico, nas condições propostas, permitem concluir que a melatonina:

1. Modifica a expressão de 24 miRNAs negativamente e 8 miRNAs positivamente por *PCR Array*;
2. Aumenta a expressão gênica do miR-148a-3p e diminui os níveis de IGF-1R e VEGF por PCR em tempo real;
3. Atua na diminuição dos níveis proteicos de IGF-1R e VEGF quantificados por imunocitoquímica e *western blotting*;
4. Apresenta efeito inibitório nas taxas de sobrevivência clonogênica, migração e invasão das células tumorais;
5. Aumenta a expressão gênica do miR-148a-3p, IGF-1R e VEGF por PCR em tempo real e diminui a expressão proteica de IGF-1R e VEGF por imunohistoquímica nos tumores.

Associadas, essas conclusões indicam que a melatonina é capaz de modular o miR-148a-3p e diminuir os fatores angiogênicos IGF-1R e VEGF em células MDA-MB-231 e modelo xenográfico de tumor de mama. Os resultados obtidos mostram que esse hormônio regula o desenvolvimento do câncer de mama, apresenta ação no processo de angiogênese, desempenha um papel crucial na progressão do tumor, estabelecendo-se como um potencial agente terapêutico para o câncer de mama triplo-negativo.

6. REFERÊNCIAS

-
- ACUNZO, M. et al. MicroRNA and cancer – A brief overview. **Advances in Biological Regulation**, v. 57, p. 1–9, 2015.
- ADAMS, B. D.; KASINSKI, A. L.; SLACK, F. J. Aberrant regulation and function of microRNAs in cancer. **Current biology: CB**, v. 24, n. 16, p. R762-76, 2014.
- ALVAREZ-GARCÍA, V. et al. Regulation of vascular endothelial growth factor by melatonin in human breast cancer cells. **Journal of Pineal Research**, v. 54, n. 4, p. 373–380, maio 2013a.
- ALVAREZ-GARCÍA, V. et al. Antiangiogenic effects of melatonin in endothelial cell cultures. **Microvascular Research**, v. 87, p. 25–33, 2013b.
- BARTEL, D. P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. **Cell**, v. 116, n. 2, p. 281–97, 2004.
- BERGERS, G.; BENJAMIN, L. E. Tumorigenesis and the angiogenic switch. **Nature reviews. Cancer**, v. 3, n. 6, p. 401–10, 2003.
- BERTOLI, G.; CAVA, C.; CASTIGLIONI, I. MicroRNAs: New Biomarkers for Diagnosis, Prognosis, Therapy Prediction and Therapeutic Tools for Breast Cancer. **Theranostics**, v. 5, n. 10, p. 1122–1143, 2015.
- BILU, C.; KRONFELD-SCHOR, N. Effects of circadian phase and melatonin injection on anxiety-like behavior in nocturnal and diurnal rodents. **Chronobiology international**, v. 30, n. 6, p. 828–36, 2013.
- BORIN, T. F. et al. Melatonin decreases breast cancer metastasis by modulating Rho-associated kinase protein-1 expression. **Journal of Pineal Research**, v. 60, n. 1, p. 3–15, 2016.
- BOUDREAU, N.; MYERS, C. Breast cancer-induced angiogenesis: multiple mechanisms and the role of the microenvironment. **Breast cancer research: BCR**, v. 5, n. 3, p. 140–6, 2003.
- BRACONI, C.; HUANG, N.; PATEL, T. MicroRNA-dependent regulation of DNA methyltransferase-1 and tumor suppressor gene expression by interleukin-6 in human malignant cholangiocytes. **Hepatology**, v. 51, n. 3, p. NA-NA, 2010.
- BUBENIK, G. A.; KONTUREK, S. J. Melatonin and aging: prospects for human treatment. **Journal of physiology and pharmacology**, n. 4, p. 3–7, 2011.
- CALIN, G. A. et al. A MicroRNA Signature Associated with Prognosis and Progression in Chronic Lymphocytic Leukemia. **New England Journal of Medicine**, v. 353, n. 17, p. 1793–1801, 2005.
- CAPPELLARI, O.; COSSU, G. Pericytes in Development and Pathology of Skeletal Muscle. **Circulation Research**, v. 113, n. 3, p. 341–347, 2013.
- CHEN, Y.; SONG, Y.X.; WANG, Z.N. The microRNA-148/152 family: multi-faceted

players. **Molecular cancer**, v. 12, p. 43, 2013.

CHENG, Y. et al. miR-137 effects on gastric carcinogenesis are mediated by targeting Cox-2-activated PI3K/AKT signaling pathway. **FEBS Letters**, v. 588, n. 17, p. 3274–3281, 2014.

CHIU, C.-J. et al. Associations between Genetic Polymorphisms of Insulin-like Growth Factor Axis Genes and Risk for Age-Related Macular Degeneration. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 52, n. 12, p. 9099, 2011.

CHUNG, A. S.; LEE, J.; FERRARA, N. Targeting the tumour vasculature: insights from physiological angiogenesis. **Nature Reviews Cancer**, v. 10, n. 7, p. 505–514, 2010.

COS, S.; SÁNCHEZ-BARCELÓ, E. J. Melatonin and Mammary Pathological Growth. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 21, n. 2, p. 133–170, 2000.

CRAWFORD, Y.; FERRARA, N. VEGF inhibition: insights from preclinical and clinical studies. **Cell and Tissue Research**, v. 335, n. 1, p. 261–269, 2009.

CUCINA, A. et al. Evidence for a biphasic apoptotic pathway induced by melatonin in MCF-7 breast cancer cells. **Journal of Pineal Research**, v. 46, n. 2, p. 172–180, 2009.

DANZA, K. et al. MiR-578 and miR-573 as potential players in BRCA-related breast cancer angiogenesis. **Oncotarget**, v. 6, n. 1, p. 471–83, 2015.

DI BELLA, G. et al. Evaluation of the safety and efficacy of the first-line treatment with somatostatin combined with melatonin, retinoids, vitamin D3, and low doses of cyclophosphamide in 20 cases of breast cancer: a preliminary report. **Neuro endocrinology letters**, v. 34, n. 7, p. 660–8, 2013a.

DI BELLA, G. et al. Melatonin Anticancer Effects: Review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 2, p. 2410–2430, 2013b.

DI LEVA, G.; GAROFALO, M.; CROCE, C. M. MicroRNAs in Cancer. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 9, n. 1, p. 287–314, 2014.

DUBOCOVICH, M. L.; MARKOWSKA, M. Functional MT1 and MT2 Melatonin Receptors in Mammals. **Endocrine**, v. 27, n. 2, p. 101–110, 2005.

ESQUELA-KERSCHER, A.; SLACK, F. J. Oncomirs — microRNAs with a role in cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 6, n. 4, p. 259–269, 2006.

FELEKKIS, K. et al. microRNAs: a newly described class of encoded molecules that play a role in health and disease. **Hippokratia**, v. 14, n. 4, p. 236–40, 2010.

FIDLER, I. J. Timeline: The pathogenesis of cancer metastasis: the “seed and soil” hypothesis revisited. **Nature Reviews Cancer**, v. 3, n. 6, p. 453–458, 2003.

FOLKMAN, J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. **The New England Journal of Medicine**, v. 285, n. 21, p. 1182-6, 1971.

FRIEDRICH, M. et al. The role of the miR-148/-152 family in physiology and disease. **European Journal of Immunology**, v. 47, n. 12, p. 2026–2038, 2017.

FÜRSTENBERGER, G.; MORANT, R.; SENN, H. J. Insulin-like growth factors and breast cancer. **Onkologie**, v. 26, n. 3, p. 290–4, 2003.

GE, H. et al. MicroRNA 148a-3p promotes Thrombospondin-4 expression and enhances angiogenesis during tendinopathy development by inhibiting Krüppel-like factor 6. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 502, n. 2, p. 276–282, 2018.

GELALETI, G. B. et al. Efficacy of melatonin, IL-25 and siIL-17B in tumorigenesis-associated properties of breast cancer cell lines. **Life Sciences**, v. 183, p. 98–109, 2017.

GERHARDT, H. et al. VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. **The Journal of cell biology**, v. 161, n. 6, p. 1163–77, 2003.

GIRGERT, R. et al. Membrane-bound melatonin receptor MT1 down-regulates estrogen responsive genes in breast cancer cells. **Journal of Pineal Research**, v. 47, n. 1, p. 23–31, 2009.

GONZÁLEZ-GONZÁLEZ A. GONZÁLEZ A., ALONSO-GONZÁLEZ C., MENÉNDEZ-MENÉNDEZ J., MARTÍNEZ-CAMPA C., C. S. Complementary actions of melatonin on angiogenic factors, the angiopoietin/Tie2 axis and VEGF, in co-cultures of human endothelial and breast cancer cells. **Oncology Reports**, v. 39, n. 1, p. 433–441, 2017.

GU, J. et al. Melatonin inhibits proliferation and invasion via repression of miRNA-155 in glioma cells. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 93, p. 969–975, 2017.

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

HICKS, D. G.; KULKARNI, S. Trastuzumab as adjuvant therapy for early breast cancer: the importance of accurate human epidermal growth factor receptor 2 testing. **Archives of pathology & laboratory medicine**, v. 132, n. 6, p. 1008–15, 2008.

HILL, S. M. et al. Melatonin: an inhibitor of breast cancer. **Endocrine-related cancer**, v. 22, n. 3, p. R183-204, 2015.

HIROKI, E. et al. Changes in microRNA expression levels correlate with clinicopathological features and prognoses in endometrial serous adenocarcinomas. **Cancer Science**, v. 101, n. 1, p. 241–249, 2010.

HSU, P. W. C. et al. miRNAMap: genomic maps of microRNA genes and their target

genes in mammalian genomes. **Nucleic acids research**, v. 34, n. Database issue, p. D135-9, 2006.

HUANG, M.X. Down-expression of circulating micro ribonucleic acid (miRNA)-148/152 family in plasma samples of non-small cell lung cancer patients. **Journal of Cancer Research and Therapeutics**, v. 12, n. 2, p. 671, 2016.

HWANG, H.W.; MENDELL, J. T. MicroRNAs in cell proliferation, cell death and tumorigenesis. **British Journal of Cancer**, v. 94, n. 6, p. 776–780, 2006.

INCA - Instituto Nacional de Câncer. **INCA**, 2018.

INUI, M.; MARTELLO, G.; PICCOLO, S. MicroRNA control of signal transduction. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 11, n. 4, p. 252–263, 2010.

IORIO, M. V.; CROCE, C. M. MicroRNA dysregulation in cancer: diagnostics, monitoring and therapeutics. A comprehensive review. **EMBO Molecular Medicine**, v. 4, n. 3, p. 143–159, 2012.

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

JARDIM-PERASSI, B. V. et al. Effect of Melatonin on Tumor Growth and Angiogenesis in Xenograft Model of Breast Cancer. **PLoS ONE**, v. 9, n. 1, p. e85311, 2014.

JARDIM-PERASSI, B. V. et al. Melatonin Regulates Angiogenic Factors under Hypoxia in Breast Cancer Cell Lines. **Anti-cancer agents in medicinal chemistry**, v. 16, n. 3, p. 347–58, 2016.

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

JIANG, Q. et al. MicroRNA-148a inhibits breast cancer migration and invasion by directly targeting WNT-1. **Oncology Reports**, v. 35, n. 3, p. 1425–1432, 2016.

JÚLIO ANSELMO SOUSA NETO, P. M. S. Melatonina e câncer -revisão da literatura. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 51, p. 49–58, 2005.

KAZEROUNIAN, S.; LAWLERCORRESPONDING, J. Integration of pro- and anti-angiogenic signals by endothelial cells. **Journal of Cell Communication and Signaling**, v. 12, n. 1, p. 171–179, 2018.

KARAMYSHEVA, A. F. Mechanisms of angiogenesis. **Biochemistry. Biokhimiia**, v. 73, n. 7, p. 751–62, 2008.

KIERAN, M. W.; KALLURI, R.; CHO, Y.-J. The VEGF pathway in cancer and disease: responses, resistance, and the path forward. **Cold Spring Harbor**

perspectives in medicine, v. 2, n. 12, p. a006593, 2012.

KIM, S.J. et al. Melatonin ameliorates ER stress-mediated hepatic steatosis through miR-23a in the liver. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 458, n. 3, p. 462–9, 2015.

KHORDADMEHR, M. et al. Key microRNAs in the biology of breast cancer; emerging evidence in the last decade. **Journal of Cellular Physiology**, 2018.

KRISTENSEN, T. B. et al. Anti-vascular endothelial growth factor therapy in breast cancer. **International journal of molecular sciences**, v. 15, n. 12, p. 23024–41, 2014.

LEE, R. C.; FEINBAUM, R. L.; AMBROS, V. The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. **Cell**, v. 75, n. 5, p. 843–54, 1993.

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

LI, C. et al. A novel enzyme-dependent melatonin metabolite in humans. **Journal of pineal research**, v. 54, n. 1, p. 100–6, 2013.

LI, F. et al. miR-148a overexpression inhibits cell proliferation and induces cell apoptosis by suppressing the Wnt/ β -catenin signal pathway in breast cancer MCF-7 cells. **International Journal Of Experimental Pathology Journal**, v. 9, n. 3, p. 3349–3356, 2016a.

LI, J. et al. MiRNA-26b inhibits cellular proliferation by targeting CDK8 in breast cancer. **International journal of clinical and experimental medicine**, v. 7, n. 3, p. 558–65, 2014.

LI, S. et al. The progress of studies on the relation between circadian rhythm disruption and cancer. **Journal of biomedical engineering**, v. 29, n. 5, p. 991–4, 2012.

LI, W. et al. The association between expressions of Ras and CD68 in the angiogenesis of breast cancers. **Cancer cell international**, v. 15, n. 1, p. 17, 2015.

LI, Y. et al. The Role of Mir-148a in Cancer. **Journal of Cancer**, v. 7, n. 10, p. 1233–41, 2016b.

LI, Y. et al. Melatonin for the prevention and treatment of cancer. **Oncotarget**, v. 8, n. 24, p. 39896–39921, 2017.

LOPES, J. R. et al. Evaluation of Melatonin Effect on Human Breast Cancer Stem Cells Using a Threedimensional Growth Method of Mammospheres. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 7, p. 961–965, 2017.

-
- MA, L.; TERUYA-FELDSTEIN, J.; WEINBERG, R. A. Tumour invasion and metastasis initiated by microRNA-10b in breast cancer. **Nature**, v. 449, n. 7163, p. 682–688, 2007.
- MAGANHIN, C. C. et al. Efeitos da melatonina no sistema genital feminino: breve revisão. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 54, n. 3, p. 267–271, 2008.
- MAO, L. et al. Inhibition of breast cancer cell invasion by melatonin is mediated through regulation of the p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathway. **Breast Cancer Research**, v. 12, n. 6, p. R107, 2010.
- MARQUES, J. H. M. et al. Melatonin restrains angiogenic factors in triple-negative breast cancer by targeting miR-152-3p: In vivo and in vitro studies. **Life Sciences**, v. 208, 2018.
- MARTÍNEZ-CAMPA, C. et al. Melatonin inhibits aromatase promoter expression by regulating cyclooxygenases expression and activity in breast cancer cells. **British Journal of Cancer**, v. 101, n. 9, p. 1613–1619, 2009.
- MARTÍNEZ-CAMPA, C. M. et al. Melatonin down-regulates hTERT expression induced by either natural estrogens (17beta-estradiol) or metalloestrogens (cadmium) in MCF-7 human breast cancer cells. **Cancer letters**, v. 268, n. 2, p. 272–7, 2008.
- MASCHIO-SIGNORINI, L. B. et al. Melatonin regulates angiogenic and inflammatory proteins in MDA-MB-231 cell line and in co-culture with cancer-associated fibroblasts. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 17, 2016.
- MCGUIRE, A.; BROWN, J. A. L.; KERIN, M. J. Metastatic breast cancer: the potential of miRNA for diagnosis and treatment monitoring. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 34, n. 1, p. 145–155, 2015.
- MORI, F. et al. Multitargeting activity of miR-24 inhibits long-term melatonin anticancer effects. **Oncotarget**, v. 7, n. 15, p. 20532–20548, 2016.
- MOTALLEBNEZHAD, M. et al. The insulin-like growth factor-I receptor (IGF-IR) in breast cancer: biology and treatment strategies. **Tumor Biology**, v. 37, n. 9, p. 11711–11721, 2016.
- MU, J. et al. The repressive effect of miR-148a on Wnt/ β -catenin signaling involved in Glabridin-induced anti-angiogenesis in human breast cancer cells. **BMC cancer**, v. 17, n. 1, p. 307, 2017.
- NI, F. et al. MicroRNA-362-5p promotes tumor growth and metastasis by targeting CYLD in hepatocellular carcinoma. **Cancer Letters**, v. 356, n. 2, p. 809–818, 2015.
- NISHIDA-AOKI, N.; OCHIYA, T. Interactions between cancer cells and normal cells via miRNAs in extracellular vesicles. **Cellular and molecular life sciences: CMLS**, v. 72, n. 10, p. 1849–61, 2015.
- NOOSHINFAR, E. et al. Melatonin, an inhibitory agent in breast cancer. **Breast**

Cancer, v. 24, n. 1, p. 42–51, 2017.

NÚÑEZ, C. Blood-based protein biomarkers in breast cancer. **Clinica Chimica Acta**, v. 490, p. 113-127, 2018.

PENG, Y.; CROCE, C. M. The role of MicroRNAs in human cancer. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 1, n. 1, p. 15004, 2016.

QU, S. et al. The emerging functions and roles of circular RNAs in cancer. **Cancer Letters**, v. 414, p. 301–309, 2018.

REDIG, A. J.; MCALLISTER, S. S. Breast cancer as a systemic disease: a view of metastasis. **Journal of Internal Medicine**, v. 274, n. 2, p. 113–126, 2013.

REITER, R. J.; TAN, D.-X.; FUENTES-BROTO, L. Melatonin: A Multitasking Molecule. In: **Progress in brain research**, v. 181, p. 127–151, 2010.

SHAH, N. M. et al. Understanding the role of NRF2-regulated miRNAs in human malignancies. **Oncotarget**, v. 4, n. 8, p. 1130–1142, 2013.

SIVEEN, K.S. et al. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) signaling in tumour vascularization: potential and challenges. **Current Vascular Pharmacology**, v. 15, n. 4, p. 339-351, 2017.

SIMONNEAUX, V. et al. Generation of the melatonin endocrine message in mammals: a review of the complex regulation of melatonin synthesis by norepinephrine, peptides, and other pineal transmitters. **Pharmacological reviews**, v. 55, n. 2, p. 325–95, 2003.

SOHN, E. J. et al. Upregulation of miRNA3195 and miRNA374b mediates the anti-angiogenic properties of melatonin in hypoxic PC-3 prostate cancer cells. **Journal of Cancer**, v. 6, n. 1, p. 19–28, 2015.

SOUSA-NETO, J.A.; SCALDAFERRI, P. M. Melatonina e câncer -revisão da literatura. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 51, n. 1, p. 49–58, 2005.

STEFANINI, M. O. et al. A compartment model of VEGF distribution in blood, healthy and diseased tissues. **BMC systems biology**, v. 2, p. 77, 2008.

SU, S. C. et al. Cancer metastasis: Mechanisms of inhibition by melatonin. **Journal of Pineal Research**, v. 62, n. 1, p. 1–11, 2017.

TANEJA, P. et al. Classical and Novel Prognostic Markers for Breast Cancer and their Clinical Significance. **Clinical Medicine Insights. Oncology**, v. 4, p. 15–34, 2010.

THIJSSSEN, V. L. J. L. et al. Galectins in the tumor endothelium: opportunities for combined cancer therapy. **Blood**, v. 110, n. 8, p. 2819–2827, 2007.

TOMINAGA, N.; KATSUDA, T.; OCHIYA, T. Micromanaging of tumor metastasis by

extracellular vesicles. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 40, p. 52–59, 2015.

TSURUTA, T. et al. miR-152 Is a Tumor Suppressor microRNA That Is Silenced by DNA Hypermethylation in Endometrial Cancer. **Cancer Research**, v. 71, n. 20, p. 6450–6462, 2011.

VIALARD, C.; LARRIVÉE, B. Tumor angiogenesis and vascular normalization: alternative therapeutic targets. **Angiogenesis**, v. 20, n. 4, p. 409–426, 2017.

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

WALKER, R. A. et al. Molecular pathology of breast cancer and its application to clinical management. **Cancer metastasis reviews**, v. 16, n. 1–2, p. 5–27, 1997.

WANG, S.; OLSON, E. N. AngiomiRs—Key regulators of angiogenesis. **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 19, n. 3, p. 205–211, jun. 2009.

WANG, T.H. et al. Melatonin Inhibits the Progression of Hepatocellular Carcinoma through MicroRNA Let7i-3p Mediated RAF1 Reduction. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 9, 2018.

WANG, Z. et al. Broad targeting of angiogenesis for cancer prevention and therapy. **Seminars in Cancer Biology**, Elsevier, 2015.

WIGHTMAN, B.; HA, I.; RUVKUN, G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. **Cell**, v. 75, n. 5, p. 855–62, 1993.

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

XU, Q. et al. A regulatory circuit of miR- 148 a / 152 and DNMT 1 in modulating cell transformation and tumor angiogenesis through IGF-IR and IRS 1. **Journal of Molecular Cell Biology**, v. 5, p. 3–13, 2013.

XUE, J. et al. MicroRNA-148a inhibits migration of breast cancer cells by targeting MMP-13. **Tumor Biology**, v. 37, n. 2, p. 1581–1590, 2016.

ZHOU, X. et al. Altered expression of miR-152 and miR-148a in ovarian cancer is related to cell proliferation. **Oncology Reports**, v. 27, n. 2, p. 447–54, 2012.

ZHU, C.; HUANG, Q.; ZHU, H. Melatonin Inhibits the Proliferation of Gastric Cancer Cells Through Regulating the miR-16-5p-Smad3 Pathway. **DNA and Cell Biology**, v. 37, n. 3, p. 244–252, 2018.

ZHU, X. et al. Analysis of miRNA expression profiles in melatonin-exposed GC-1 spg

cell line. **Gene**, 2017.

ZHU, X.; ZHOU, W. The Emerging Regulation of VEGFR-2 in Triple-Negative Breast Cancer. **Frontiers in Endocrinology**, v. 6, p. 159, 2015.

7. ANEXOS

7.1. ANEXO 1

De: MicroRNA <admin@jms.eurekaselect.com>

Data: 31 de outubro de 2018 12:10:41 BRT

Para: debora.zuccari@famerp.br

Cc: mirna@benthamscience.org, hira@benthamscience.org

Assunto: Submission Acknowledgement | BMS-MicroRNA-2018-33

Responder A: MicroRNA <mirna@benthamscience.org>

Reference#: BMS-MicroRNA-2018-33

Submission Title: Melatonin Inhibits the Angiogenic Factors in Triple Negative Breast Cancer by Regulation of MiR-148a-3p Tumor Suppressor

Dear Dr. Zuccari,

Thank you for your submission to "MicroRNA(MicroRNA)". It will be sent to the Editor in Chief for his initial provisional 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/microrna/editorial-policies/#top>.

The recommended number of references as per norm (<https://clarivate.com/essays/impact-factor/>) for Review Articles is approximately 100 or more and for Research Articles 75 or more. Articles which are well referenced (100 or more references) may have high chances of acceptance by referees and they are likely to attract a greater number of citations.

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: Alberto Izzoti

Affiliation: University of Genoa, University of Genoa

Country: Italy

Università degli Studi di Genova, Department of Health Sciences (DISSAL), Genoa, Italy

Country: ITALY

Email: izzotti@unige.it

7.2. ANEXO 2

Life Sci. 2018 Sep 1;208:131-138. doi: 10.1016/j.lfs.2018.07.012. Epub 2018 Jul 7.

Melatonin restrains angiogenic factors in triple-negative breast cancer by targeting miR-152-3p: In vivo and in vitro studies.

Marques JHM¹, Mota AL¹, Oliveira JG², Lacerda JZ³, Stefani JP¹, Ferreira LC¹, Castro TB¹, Aristizábal-Pachón AF⁴, Zuccari DAPC⁵.

⊕ Author information

Abstract

AIMS: Breast cancer represents the second most prevalent tumor-related cause of death among women. Although studies have already been published regarding the association between breast tumors and miRNAs, this field remains unclear. MicroRNAs (miRNAs) are defined as non-coding RNA molecules, and are known to be involved in cell pathways through the regulation of gene expression. Melatonin can regulate miRNAs and genes related with angiogenesis. This hormone is produced naturally by the pineal gland and presents several antitumor effects. The aim of this study was to understand the action of melatonin in the regulation of miRNA-152-3p in vivo and in vitro.

MAIN METHODS: In order to standardize the melatonin treatment in the MDA-MB-468 cells, we carried out the cell viability assay at different concentrations. PCR Array plates were used to identify the differentiated expression of miRNAs after the treatment with melatonin. The relative quantification of the target gene expression (IGF-IR, HIF-1 α and VEGF) was performed by real-time PCR. For the tumor development, MDA-MB-468 cells were implanted in female BALB/c mice, and treated or not treated with melatonin. Moreover, the quantification of the target genes protein expression was performed by immunocytochemistry and immunohistochemistry.

KEY FINDINGS: Relative quantification shows that the melatonin treatment increases the gene expression of miR-152-3p and the target genes, and decreased protein levels of the genes both in vitro and in vivo.

SIGNIFICANCE: Our results confirm the action of melatonin on the miR-152-3p regulation known to be involved in the progression of breast cancer.

Copyright © 2018 Elsevier Inc. All rights reserved.

KEYWORDS: Angiogenic proteins; Breast neoplasms; MicroRNA; Pineal gland; Xenograft model

PMID: 29990486 DOI: [10.1016/j.lfs.2018.07.012](https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.07.012)

[Indexed for MEDLINE]

TERMO DE REPRODUÇÃO XEROGRÁFICA

Autorizo a reprodução xerográfica do presente Trabalho de Conclusão, na íntegra ou em partes, para fins de pesquisa.

São José do Rio Preto, ____/____/____

Assinatura do autor