



Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

Jéssica Helena de Mora Marques

**Ação antiangiogênica da melatonina pela
modulação do supressor tumoral miR-152-3p em
linhagens de câncer de mama**

São José do Rio Preto

2018

Jéssica Helena de Mora Marques

**Ação antiangiogênica da melatonina pela
modulação do supressor tumoral miR-152-3p em
linhagens de câncer de mama**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde, junto ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Eixo temático Medicina e Ciências Correlatas, da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto - FAMERP.

Orientadora: Profa. Dra. Debora Ap. Pires de Campos
Zuccari

São José do Rio Preto

2018

Marques, Jéssica Helena de Mora.

Ação antiangiogênica da melatonina pela modulação do supressor tumoral miR-152-3p em linhagens de câncer de mama / Jéssica Helena de Mora Marques

São José do Rio Preto, 2018.

109p.

Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP

Eixo Temático: Medicina e Ciências Correlatas

Orientadora: Profa. Dra. Debora Aparecida Pires de Campos Zuccari

1. Melatonina; 2. MicroRNAs; 3. Inibidores da Angiogênese;
4. Neoplasias de Mama Triplo-Negativo.

JÉSSICA HELENA DE MORA MARQUES

Ação antiangiogênica da melatonina pela modulação
do supressor tumoral miR-152-3p em linhagens de
câncer de mama

BANCA EXAMINADORA

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU
DE MESTRE

Presidente e Orientadora: Profa. Dra. Debora

Aparecida Pires de Campos Zuccari

2º Examinador: Profa. Dra. Rejane Maira Goes

3º Examinador: Profa. Dra. Márcia Maria Urbanin
Castanhole-Nunes

Suplentes: Profa. Dra. Ana Elizabete Silva e Profa.
Dra. Marcela Augusta de Souza Pinhel

São José do Rio Preto, 23/02/2018.

Sumário

Dedicatória	i
Agradecimentos.....	ii
Epígrafe	v
Lista de Figuras	vi
Lista de Tabelas e Quadros	viii
Lista de Abreviaturas e Símbolos	ix
Resumo.....	xiv
Abstract	xvi
I. INTRODUÇÃO.....	1
II. MATERIAL E MÉTODO	24
Considerações Éticas.....	25
1. Delineamento Experimental.....	25
2. Cultivo Celular	26
3. Desagregação Enzimática	26
4. Contagem das Células na Câmara de <i>Neubauer</i>	27
5. Ensaio de Viabilidade Celular (MTT).....	27
6. Grupos Experimentais	28
7. Extração.....	29
8. Obtenção do cDNA Para o PCR <i>Array</i>	30
9. Análise da Expressão de miRNAs por PCR <i>Array</i>	30
10. Seleção do miRNA Relacionado ao Processo Angiogênico	32
11. Modificação Transiente de Células Tumorais.....	33
12. Obtenção de cDNA para PCR em Tempo Real	34
13. PCR Quantitativa em Tempo Real (qPCR).....	35
14. Imunocitoquímica	35
15. Análise Estatística	37
III. RESULTADOS	38
1. Estabelecimento do Cultivo Celular.....	39
2. Ensaio de Viabilidade Celular – Linhagem MDA-MB-468	40
3. PCR <i>Array</i> e Escolha do miRNA Candidato	40
4. PCR em Tempo Real (qPCR)	42
5. Imunocitoquímica	47

IV. DISCUSSÃO.....	52
V. CONCLUSÕES.....	59
VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61
VI. APÊNDICES.....	77
VII. ANEXOS	108

Dedicatória

Com amor, dedico esse trabalho ao meu esposo Fernando, pelo incentivo e apoio em todas as minhas escolhas e decisões, e aos meus pais Antônio e Maria “In Memoriam” pelos ensinamentos e por não medirem esforços para que eu conquistasse vitórias através de meus estudos.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus, por iluminar o meu caminho.

À FAMERP pela infraestrutura e profissionais que possibilitaram a realização de mais essa etapa da minha vida.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP) por possibilitar a realização desse trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de Mestrado concedida no período 10/2016 a 02/2017, que me acompanhou no início do mestrado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de estudos que me acompanhou durante o mestrado no período 03/2017 a 02/2018 (Proc. nº 2016/14280-3) e recursos para o desenvolvimento do trabalho na forma de Auxílio à Pesquisa FAPESP (2015/04780-6).

À minha querida orientadora, Profa. Dra. Debora Zuccari, pela oportunidade da realização desse mestrado. Agradeço também pela confiança depositada e por todo apoio e ensinamento transmitido ao longo desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Wilson Araújo da Silva Junior do Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP)

e ao querido Andrés, por todo o apoio durante a realização deste trabalho, pelas técnicas realizadas, pela parceria construída.

Aos membros da banca examinadora do meu exame geral de qualificação, Profa. Dra. Patrícia Matos Biselli Chicote e Profa. Dra. Cláudia Regina Bonini Domingos, pelas valiosas sugestões que com certeza foram importantes para a minha dissertação.

As Professoras Dras. Rejane Maira Goes e Márcia Maria Urbanin Castanhole-Nunes, por gentilmente aceitarem fazer parte da minha banca de defesa.

A todos os colegas do Laboratório de Investigação Molecular do Câncer (LIMC): Nathália, Rubens, Beatriz, Fabrício, André, Tialfi, Paulo, Bruna, Jucimara, Marina e Giovana pela amizade, companheirismo e pelos momentos de alegrias e tristezas compartilhados. Vocês foram fundamentais durante essa fase da minha vida.

As queridas Jéssica Oliveira, Jéssica Zani e Livia, por me acompanharem em todos os momentos e técnicas, onde com elas pude viver e superar cada dificuldade dessa etapa e compartilhar os momentos de alegria.

À minha amiga Jacqueline por todo apoio e carinho que me dedicou nessa etapa, conversas de incentivo e desabafo, que foram cruciais para esse momento e todos os amigos que estiveram sempre presentes em minha vida.

À minha querida família, em especial a Tia Silvana, que sempre me apoiaram e comemoraram todas as minhas conquistas, minha avó, meus tios e primos pelo companheirismo desde sempre, e pela paciência durante minha ausência nesse período.

Aos meus pais, Antônio Geraldo de Mora e Maria Aparecida Donadão, falecidos em 2009 e 2010, por quem tenho todo o amor e gratidão, agradeço pelo apoio, pelo sacrifício de suas vidas para me dar a oportunidade de alcançar os meus sonhos.

Ao meu esposo Fernando Marques de Jesus, agradeço pelo apoio, companheirismo e, sobretudo, pela força que me dá para superar obstáculos. Agradeço também a sua mãe, pelo carinho e preocupação. Agradeço as suas tias, Cleusa, Edwardes, Áurea e Neusa, pelo incentivo e por compartilharem momentos difíceis, pelas palavras de incentivo e por todos os momentos.

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

Epígrafe

“O período de maior ganho em conhecimento e experiência é o período mais difícil da vida de alguém”.

(Dalai Lama)

Lista de Figuras

Figura 1. Subtipos moleculares do câncer de mama.....	3
Figura 2. Etapas da angiogênese.....	5
Figura 3. Via de sinalização do IGF-1R	7
Figura 4. Ativação do HIF-1 α	8
Figura 5. Ação do VEGF.	9
Figura 6. Mecanismo tradicional já descrito de ação do miRNAs	10
Figura 7. Esquema da biogênese de miRNAs.....	12
Figura 8. Papel dos miRNAs no câncer.....	13
Figura 9. miRNAs identificados no câncer de mama	14
Figura 10. Esquema representativo da síntese de melatonina.	16
Figura 11. Ações da melatonina	18
Figura 12. Ação da família miR-148 em genes relacionados com a angiogênese em câncer de mama	21
Figura 13. Esquema representativo da câmara de <i>Neubauer</i>	27
Figura 14. Composição da placa <i>RT² ProfilerTM PCR Array Human Breast Cancer</i>	32
Figura 15. Fotomicrografias das células tumorais MDA-MB-468.....	39
Figura 16. Fotomicrografias das células tumorais MDA-MB-231.....	39
Figura 17. Ensaio de MTT para verificação da viabilidade das células tumorais MDA-MB-468, após o tratamento com melatonina durante 48 horas	40
Figura 18. Efeito da melatonina (1 mM) na expressão de miRNAs na linhagem MDA-MB-468.....	41
Figura 19. Células MDA-MB-468 transfectadas com <i>Mimic</i> miR-152-3p e submetidas ao tratamento com melatonina (1 mM) durante 24 horas	43
Figura 20. Expressão gênica de <i>IGF-1R</i> , <i>HIF-1α</i> e <i>VEGF</i> por PCR em tempo real em células MDA-MB-468 tratadas ou não com melatonina 1mM.....	44

Figura 21. Células MDA-MB-468 submetidas ao tratamento com melatonina (1 mM) durante 24 horas.....	45
Figura 22. Células MDA-MB-231 transfectadas com <i>Mimic</i> miR-152-3p e submetidas ao tratamento com melatonina (1 mM) durante 24 horas.....	46
Figura 23. Expressão gênica de <i>IGF-1R</i> , <i>HIF-1α</i> e <i>VEGF</i> por PCR em tempo real em células MDA-MB-231 tratadas ou não com 1mM de melatonina.....	47
Figura 24. Expressão proteica de IGF-1R, HIF-1 α e VEGF por imunocitoquímica em células MDA-MB-468.....	48
Figura 25. Fotomicrografias do procedimento imunocitoquímico realizado em células MDA-MB-468.....	49
Figura 26. Expressão proteica de IGF-1R, HIF-1 α e VEGF por imunocitoquímica em células MDA-MB-231.....	50
Figura 27. Fotomicrografias do procedimento imunocitoquímico realizado em células MDA-MB-231.....	51

Lista de Tabelas e Quadros

Quadro 1. Placa <i>RT² Profiler™ PCR Array Human Breast Cancer</i> ..	31
Quadro 2. Descrição do Mimic miR-152-3p	34
Quadro 3. Anticorpos primários utilizados nas técnicas de imunocitoquímica e suas respectivas especificações.....	37
Quadro 4. miRNA e seus genes-alvo.....	42
Tabela 1. miRNAs diferencialmente expressos após tratamento com melatonina.....	41

Lista de Abreviaturas e Símbolos

µg	Micrograma (10 ⁻⁶ grama)
µL	Microlitro
µm	Micrômetro
3'-UTR	Região 3 não traduzida
5HTP	Hidroxitriptofano
AA-NAT	Arilalquilamina N-acetiltransferase
Ago	Argonauta
AKT	Proteína quinase B
AMP	Adenosina monofosfato
ATP	Adenosina trifosfato
bFGF/FGF-2	Fator de crescimento de fibroblastos
BSA	Albumina do soro bovino
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CD4	Grupamento de diferenciação 4
cDNA	DNA complementar
CK	Citoqueratina
CH3	Grupamento metil
c-MYB	Proto-oncogene altamente expresso em células hematopoiéticas imaturas.
CO₂	Fórmula química do gás carbônico
Ct	do inglês <i>Cycle threshold</i>
D.O.M	Densidade Óptica Média
DAB	Diaminobenzidina
DMEM	do inglês <i>Dulbecco's Modified Eagles Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico

DNMT1	DNA-metiltransferase-1
DRM2	DNA metiltransferase
EGFR	Receptor tipo 1 do fator de crescimento epidérmico
EMT	Transição Epitélio Mesenquimal
ERK	Quinase extracelular
FAMERP	Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FMRP-USP	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
g	Força G
GC-1 spg	Células provenientes de testículo de camundongo com espermatogonia
GTP	Guanosina trifosfato
HCC1143	Linhagem celular de carcinoma de mama humano triplo-negativa
HCT116	Linhagem celular de carcinoma de cólon humano
HER2	Receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano
HIF-1	Fator induzido por hipóxia 1
HIOMT	Hidroxi-indol-Ometiltransferase
HUVEC	Células endoteliais de veias umbilicais humanas
IGF-1	Fator de crescimento semelhante à insulina
IGF-1R	Receptor tipo 1 do fator de crescimento semelhante à insulina
IL-2	Interleucina 2
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IRS	Substrato do receptor de insulina
Ki-67	Índice de proliferação celular
LIMC	Laboratório de Investigação Molecular no Câncer
MAPK	Via das proteínas quinases ativadas por mitógenos
MCF-7	Linhagem celular de carcinoma de mama humano,

	receptor de estrogênio positivo
MDA-MB-231	Linhagem celular de carcinoma de mama humano triplo-negativa
MDA-MB-435	Linhagem celular de carcinoma de mama humano metastática
MDA-MB-468	Linhagem celular de carcinoma de mama humano triplo-negativa
miRISC	miRNA ligado a RISC
miRNA/miR	microRNA
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimol
MT1	Receptor da melatonina tipo 1
T2	Receptor da melatonina tipo 2
MT3-037	Medicamento em testes
mTOR	Proteína alvo da rapamicina em mamíferos
MTT	3 {4,5- dimetiliazol-2-il}-2,5difeniltetrazolium bromídeo
NAS	N-acetilserotonina
NCK	Proteína citoplasmática
ng	Nanograma (10^{-9} grama)
Nm	Nanômetro
nM	Nanomol
Notch	Receptor de membrana
°C	Graus Celsius
Oncomir	Fusão dos termos <i>oncology</i> e miRNA
PBS	Solução tampão fosfato
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PHD	Protil hidroxilase
PI3K	Fosfatidilinositol-3 quinase

PLC-γ	Fosfolipase C gamma
PLGF	Fator de crescimento placentário tipo 1
Pré-miRNA	miRNA precursor
Pri-miRNA	miRNA primário
pVHL	Proteína de Von Hippel-Lindau
qPCR	PCR quantitativa em tempo real
RE	Receptor de Estrógeno
RISC	do inglês <i>RNA-induced silencing complex</i>
RNA	Ácido Ribonucléico
RNA_m	RNA mensageiro
ROS	Radicais livres
RP	Receptor de Progesterona
rpm	Rotações por minuto
RZR/ROR	Receptor Z para retinóide/receptor órfão para retinóide
S.E.M	Erro Padrão da Média
SFB	Soro Fetal Bovino
SHB	Proteína B do adaptador contendo homologia 2SRC
T47D	Linhagem celular de carcinoma de RE+
TGF-β1	Fator de transformação do crescimento beta 1
TNBC	Câncer de mama triplo-negativo
TNF	Fator de necrose tumoral
TPH1	Triptofano hidroxilase 1
TSAα	Proteína do adaptador específico de células T
u.a.	Unidades Arbitrárias
U6	do inglês <i>U6 spliceosomal RNA</i>
VEGF	Fator de Crescimento Endothelial Vascular
VEGFR	Receptor do VEGF

VRAP	Receptores associados à proteína VEGF
$\Delta\Delta C_t$	Diferença da diferença do ciclo limiar

Resumo

Introdução: O câncer de mama representa o segundo tipo tumoral que possui os maiores índices de mortalidade, sendo o mais comum entre as mulheres. As causas desses altos índices de mortalidade têm relação com a alta proliferação e formação de metástases, e para a progressão tumoral, é necessário o crescimento de novos vasos sanguíneos, a angiogênese. Este evento pode ser estimulado por diversos fatores, como o receptor tipo 1 do fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1R), o fator induzido por hipóxia 1 alfa (HIF-1 α) e o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF). Os miRNAs podem induzir o silenciamento de genes relacionados com a angiogênese pelo pareamento com determinado RNA mensageiro (RNAm) específico, resultando na degradação desta molécula. A melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina), principal hormônio produzido e secretado pela glândula pineal, possui diversas funções fisiológicas e comprovada ação antitumoral, inclusive ação antiangiogênica. Esse hormônio pode regular miRNAs e genes relacionados a esse processo. **Objetivo:** Avaliar a capacidade da melatonina em modular o miR-152-3p e seus alvos, em células de câncer de mama triplo-negativo. **Material e Método:** Após a definição da concentração de melatonina a ser utilizada pelo ensaio de viabilidade celular, foi avaliada a expressão diferencial dos miRNAs na linhagem MDA-MB-468, após o tratamento com melatonina, utilizando-se a placa *RT² ProfilerTM PCR Array Human Breast Cancer* que contém 84 miRNAs relacionados ao câncer de mama. Uma análise *in silico* foi realizada para seleção de um miRNA envolvido na angiogênese e seus potenciais genes-alvo. A superexpressão do miR-152-3p foi realizada nas células MDA-MB-468 e MDA-MB-231 por transfecção transiente e após, a quantificação relativa de sua expressão e de seus genes-alvo *IGF-1R*, *VEGF* e *HIF-1 α* foram avaliadas por PCR

em tempo real. A quantificação da expressão proteica dos genes foi verificada por imunocitoquímica. **Resultados:** O ensaio de viabilidade celular na linhagem MDA-MB-468, demonstrou que as células tratadas com 1 mM de melatonina tiveram os menores valores de viabilidade ($p < 0,05$). A análise dos miRNAs por PCR *Array* na linhagem MDA-MB-468 apontou seis miRNAs regulados positivamente e sete miRNAs regulados negativamente, após o tratamento com a melatonina. A avaliação da expressão gênica demonstrou que a superexpressão do miR-152-3p foi influenciada pela melatonina, levando ao aumento da expressão dos genes *IGF-1R*, *HIF-1 α* e *VEGF* na linhagem MDA-MB-468. Já na linhagem MDA-MB-231 a melatonina não influenciou a expressão do miR-152-3p e diminuiu a expressão dos genes-alvo. Por fim, a imunocitoquímica revelou que a melatonina e a superexpressão do miR-152-3p foram capazes de diminuir a expressão proteica de IGF-1R, HIF-1 α e VEGF nas linhagens MDA-MB-468 e MDA-MB-231. **Conclusões:** A melatonina foi capaz de modular a expressão do miR-152-3p e de seus genes-alvo envolvidos com a angiogênese no câncer de mama triplo-negativo. Portanto, este estudo confirma a ação da melatonina no importante evento celular de angiogênese, processo determinante para a progressão da doença e ainda indicá-la como potencial protocolo terapêutico para o câncer de mama triplo-negativo.

Palavras-chave: Melatonina, MicroRNAs, Inibidores da Angiogênese, Neoplasias de Mama Triplo-Negativo.

Abstract

Introduction: Breast cancer represents the second type of tumor that has the highest mortality rates, being the most common among women. The causes of these high mortality rates are related to high proliferation and metastasis, and for tumor progression, the growth of new blood vessels, angiogenesis is required. This event can be stimulated by several factors, such as insulin-like growth factor 1 receptor (IGF-1R), hypoxia-inducible factor 1-alpha (HIF-1 α) and vascular endothelial growth factor (VEGF). Several molecules are involved in the control of angiogenesis such as melatonin and microRNAs (miRNAs). The miRNAs can induce the gene silencing of genes related to angiogenesis by pairing with certain specific messenger RNA (mRNA), resulting in the degradation of this molecule. Melatonin (N-acetyl-5-methoxytryptamine), the main hormone produced and secreted by the pineal gland, has several physiological functions and a proven antiangiogenesis action. This hormone can regulate miRNAs and genes related to this process. **Objective:** To evaluate the ability of melatonin to modulate miR-152-3p and its targets in triple-negative breast cancer cells. **Material and Method:** After the determination of the melatonin concentration to be used, the differential expression of the miRNAs in the MDA-MB-468 strain after the melatonin treatment was evaluated using the plate *RT² ProfilerTM PCR Array Human Breast Cancer* containing 84 miRNAs related to breast cancer. An in-silico analysis was performed to select a miRNA involved in angiogenesis and its potential target genes. Overexpression of miR-152-3p was performed on MDA-MB-468 and MDA-MB-231 cells by transient transfection and after relative quantification of their expression and their target genes IGF-1R, VEGF and HIF-1 α was evaluated by real-time PCR. Quantification of the protein expression of the genes was verified by

immunocytochemistry. **Results:** The cell viability assay in the MDA-MB-468 cell line demonstrated that cells treated with 1 mM melatonin had the lowest viability ($p < 0.05$). Analysis of the miRNAs by PCR Array in the MDA-MB-468 cell line showed six positively regulated miRNAs and seven negatively regulated miRNAs after treatment with melatonin. Evaluation of gene expression demonstrated that miR-152-3p overexpression was influenced by melatonin, leading to increased expression of the genes IGF-1R, HIF-1 α and VEGF in MDA-MB-468 cells. In the MDA-MB-231 cell line, melatonin did not influence the expression of miR-152-3p and decreased the expression of the target genes. Finally, immunocytochemistry revealed that melatonin and overexpression of miR-152-3p were able to decrease the protein expression of IGF-1R, HIF-1 α and VEGF in the MDA-MB-468 and MDA-MB-231 cells. **Conclusions:** Melatonin was able to modulate the expression of miR-152-3p and its target genes involved in angiogenesis in triple-negative breast cancer. Therefore, this study confirms the action of melatonin on the important cellular event of angiogenesis, a determinant process for the progression of the disease and also indicates it as a potential therapeutic protocol for triple-negative breast cancer.

Keywords: Melatonin, MicroRNAs, Angiogenesis, Triple-Negative Breast Cancer.

I. INTRODUÇÃO

I. INTRODUÇÃO

1. Aspectos Gerais

O câncer de mama representa o segundo tipo tumoral mais prevalente e causador de mortes no mundo, sendo o mais comum entre as mulheres.⁽¹⁾ Todo ano, mais de um milhão de mulheres são diagnosticadas com câncer de mama e mais de 400 mil vem a óbito em decorrência desta doença.⁽²⁾ Para o biênio 2018/2019, são esperados 59.700 casos novos deste tipo tumoral no Brasil.⁽³⁾ Acredita-se que aproximadamente uma a cada oito mulheres será afetada por este mal durante a vida.⁽⁴⁾ Por ser uma doença crescente e de alta mortalidade, é de grande importância a identificação de biomarcadores que possibilitem novas estratégias terapêuticas.

A classificação histopatológica destes tumores é complexa e nem sempre revela o prognóstico destas pacientes. Portanto, foram incorporados na rotina clínica os subtipos moleculares, utilizando marcadores que caracterizam os tumores pela presença/ausência (+/-) de receptores de estrógeno (RE), de progesterona (RP), do receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2) e outros marcadores, como o receptor tipo 1 do fator de crescimento epidérmico (EGFR), a citoqueratina 5 (CK5) e o índice Ki-67 (índice de proliferação celular).⁽⁵⁾ Assim, os tumores são classificados em: Luminal A (RE+ e/ou RP+, HER2- e Ki-67 < 14 %),^(6,7) Luminal B (RE+ e/ou RP+, HER2- e Ki-67 ≥ 14 %, se HER2+ pode ser chamado de Luminal HER2)^(8,9), Superexpressão HER2 (RE-, RP- e HER2+),⁽¹⁰⁾ Triplo-negativo basalóide (RE-, RP-, HER2-, CK5+ e/ou EGFR+)^(11,12) ou Triplo-negativo não basalóide (RE-, RP-, HER2-, CK5- e EGFR-).^(5,13,14) Além disso, os tumores triplo-negativos

podem ser classificados como *Claudin-low*, se baixa expressão de genes das claudinas 3, 4 e 7, e ausência de E-caderina (Figura 1).⁽¹⁵⁾

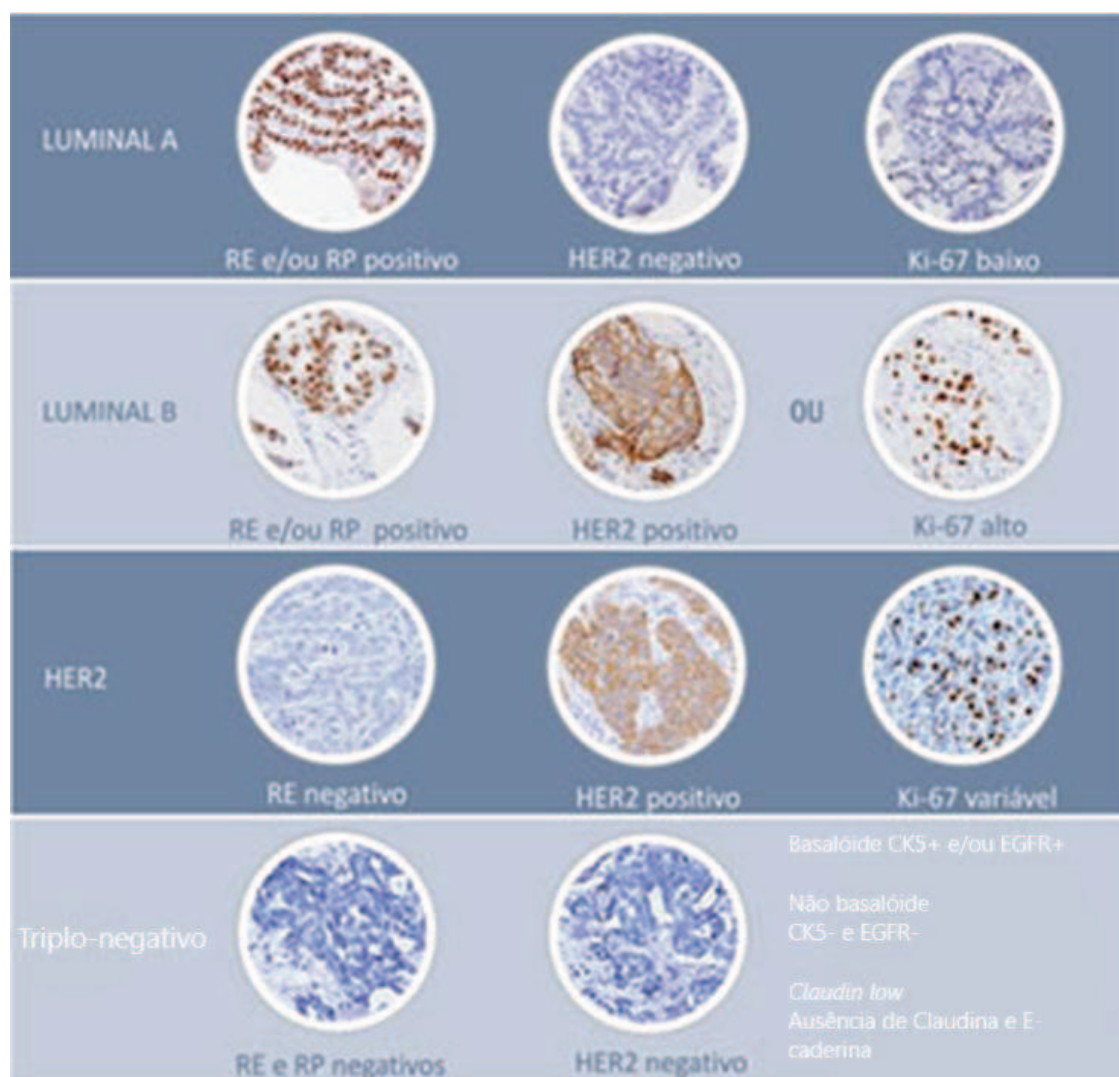


Figura 1. Subtipos moleculares do câncer de mama. Modificado de Fonte diagnóstica (2018).⁽¹⁶⁾

Em geral, a terapia do câncer é tradicionalmente baseada em estratégias de tratamento citotóxico, levando à completa destruição de tumores, o que melhora a sobrevivência do paciente. As opções de tratamento tradicionais, utilizando quimioterápicos e altas doses de radiação podem resultar em efeitos colaterais graves nos pacientes.⁽¹⁷⁾ Nos últimos anos, as terapias-alvo contra o câncer de mama

aumentaram notavelmente, especialmente contra tumores com receptores hormonais e HER2 positivos.⁽¹⁷⁾ Sendo assim, esta classificação define estratégias terapêuticas específicas, tornando os tumores triplo-negativos os de pior prognóstico por não apresentarem resposta a terapias-alvo.⁽¹⁸⁾

2. Angiogênese

A evolução maligna de uma neoplasia ocorre quando as células se desprendem e se espalham para outras regiões do corpo, levando à metástase e corroborando a agressividade tumoral.⁽⁴⁾ Para que isso ocorra, a angiogênese ou crescimento de novos vasos sanguíneos a partir da vasculatura pré-existente é imprescindível para o progressão do tumor primário, assim como para a formação das metástases.^(19,20)

No início da progressão do câncer, as células tumorais que se localizam num raio máximo de 100 a 200 μm de distância dos vasos sanguíneos, distância limite de difusão para o oxigênio,⁽²¹⁾ conseguem receber nutrientes e oxigênio por difusão simples para a manutenção e crescimento da massa tumoral. Porém, quando o tumor excede 1-2 mm de diâmetro, apresenta um menor fornecimento de metabólitos devido à restrita irrigação sanguínea, principalmente nas regiões mais internas e distantes da massa tumoral. Com a insuficiência do processo de difusão e, portanto, a falta de oxigênio, a hipóxia, desencadeia uma cascata de eventos de sinalização que dá início à angiogênese.^(9,10) Neste caso, há a necessidade de recrutamento de novos vasos sanguíneos por vasculogênese, que devido ao ambiente anormal do tumor, este pode recrutar células precursoras de vasos sanguíneos na medula óssea e angiogênese.^(24,25) Assim, a angiogênese é fundamental para que a célula tumoral mantenha suas funções

metabólicas e biológicas, favorecendo o crescimento e progressão tumoral, e fornecendo rotas potenciais para a disseminação do tumor através das metástases.^(26,27)

Vasos tumorais são distintos de vasos normais, possuem forma irregular, e não estão organizados em veias, artérias e capilares. Regulando a função vascular estão envolvidas as células endoteliais e os pericitos, células mesenquimais de suporte perivascular. Assim para garantir um suporte mecânico e estabilidade, as células endoteliais estão localizadas na parede interna dos vasos sanguíneos e os pericitos ficam em torno das células endoteliais.⁽²⁸⁻³⁰⁾

No processo de angiogênese os vasos sanguíneos são formados a partir de capilares ou vênulas já existentes, através de estimulação de fatores pró-angiogênese (a). Primeiramente os pericitos se destacam e os vasos dilatam (b). Assim, células endoteliais migram para o espaço perivascular (c). Guiadas pelos pericitos, as células endoteliais proliferam (d). As células endoteliais aderem umas as outras, formando um lúmen, que é suportado pelos pericitos (e) (Figura 2).⁽²⁹⁾

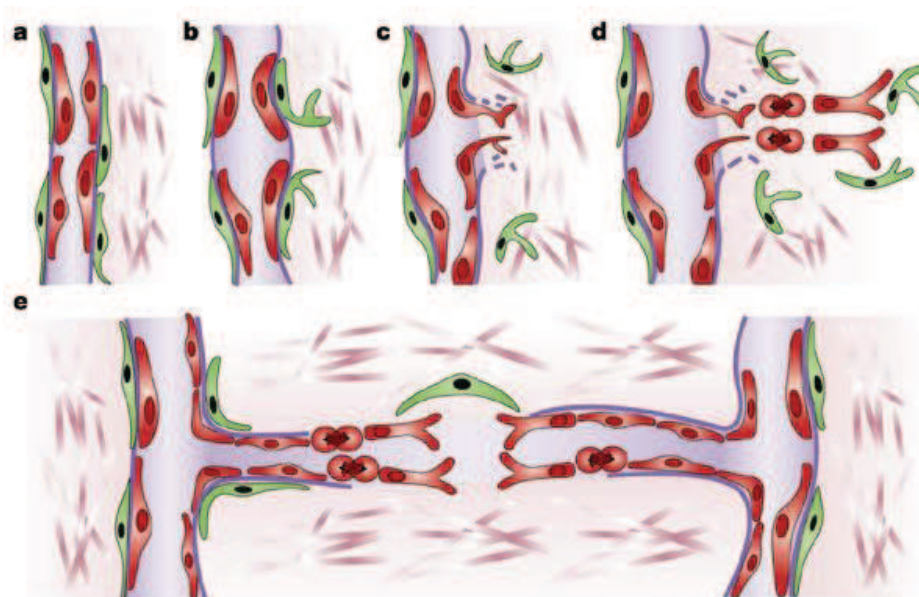


Figura 2. Etapas da angiogênese. Modificado de Bergers & Benjamin (2003).⁽²⁹⁾

A angiogênese tumoral é um processo muito complexo e pode ser regulada por diversos mecanismos envolvendo todo o microambiente tumoral.⁽³¹⁾ O receptor tipo 1 do fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1R) quando ativo, pode regular a angiogênese através do aumento dos níveis do fator de crescimento endotelial vascular (*VEGF*).⁽³²⁾ Além disso, a hipóxia, modula a expressão do fator induzido por hipóxia 1 alfa (*HIF- α*), ocorrendo um aumento dos níveis de *VEGF*.⁽³³⁾ A angiogênese pode ainda ser controlada por mecanismos epigenéticos envolvendo microRNAs (miRNAs)⁽³⁴⁾ e pela melatonina.⁽³⁵⁾

2.1. IGF-1R

A ativação da via de sinalização IGF-1R promove a angiogênese, proliferação, sobrevivência e metástase de células de câncer de mama. O IGF-1R é um receptor tetramérico composto de duas subunidades β e duas subunidades α .⁽³⁶⁾ A ativação desse receptor está envolvida com diversas vias, quando o fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1) se liga, ativa a via da tirosina quinase intrínseca e a fosforilação de membros da família do substrato do receptor de insulina (IRS). Essa ligação ocasiona a ativação da via proteína quinase 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 *VEGF*, e a cascata PI3K/AKT através da via mTOR, induzem a expressão de *HIF-1 α* e *VEGF* (Figura 3).⁽³⁷⁾ A indução dessas vias induz além da angiogênese, a proliferação e a sobrevivência celular.^(37,38)

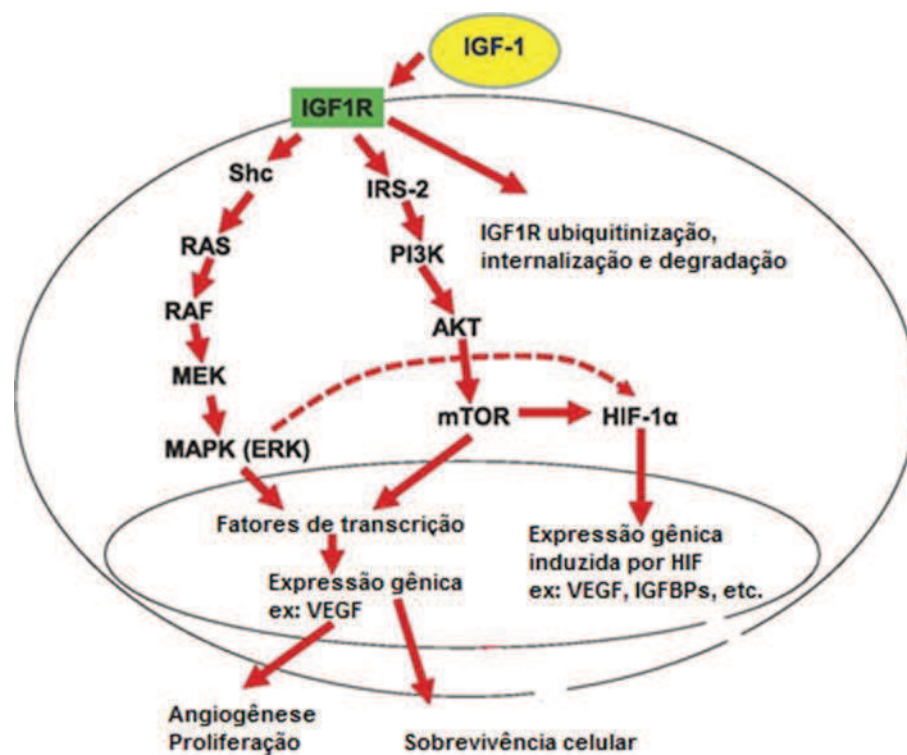


Figura 3. Via de sinalização do IGF-1R. Modificado de Chiu et al. (2011).⁽³⁹⁾

2.2. HIF-1 α

Durante o crescimento tumoral, são formadas áreas de hipóxia e as células tumorais sofrem adaptações, principalmente pela ativação do HIF-1.^(40,41) HIF-1 é um fator de transcrição heterodimérico constituído por duas subunidades HIF-1 α e HIF-1 β .⁽⁴²⁾ Sob condições fisiológicas normais, a normóxia, HIF-1 β é expresso e HIF-1 α é mantido em níveis baixos. No caso da hipóxia, as células tumorais aumentam a expressão do HIF-1 α ,⁽²²⁾ que é responsável pelo controle da expressão de vários genes envolvidos no metabolismo da glicose, angiogênese e outros.⁽⁴³⁾ Na normóxia, o HIF-1 α é hidroxilado por proteínas que contêm domínio prolin hidroxilase (PHD), então se liga a pVHL, um supressor tumoral, e é degradado por um proteossoma. Sob condições de hipóxia, a ligação HIF-1 α -pVHL não ocorre, pois não há hidroxilação de HIF-1 α pela enzima PHD e o pVHL é S-nitrozilado, portanto, a produção de HIF-1 α é estimulada e a

sua degradação é bloqueada. O HIF-1 α , por sua vez, se move para o núcleo, onde estimulará à expressão de vários genes que contribuem para a angiogênese, como o *VEGF* (Figura 4).⁽⁴²⁾

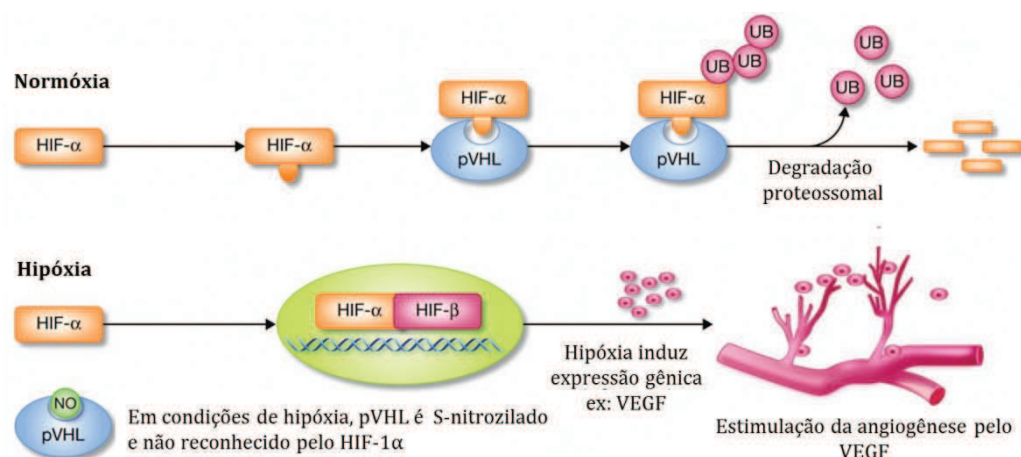


Figura 4. Ativação do HIF-1 α . Modificado de Rahimi (2012).⁽⁴⁴⁾

2.3. VEGF

O VEGF está diretamente envolvido na angiogênese, sua família inclui oito membros, VEGF-A (também conhecido como VEGF), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-E, VEGF-F, fator de crescimento placentário PLGF-1 e PLGF-2. Estes se ligam em receptores tirosina quinase: receptor do fator de crescimento endotelial vascular tipo 1 VEGFR-1, tipo 2 VEGFR-2 e tipo 3 VEGFR-3.^(45,46) 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.^(47,48) A interação do VEGF-A e seu receptor VEGFR-2 é predominante para a angiogênese.⁽⁴⁵⁾ No câncer de mama o VEGF vem sendo relacionado como principal fator envolvido na angiogênese, sendo que este é

amplamente detectado em células tumorais, e seu receptor VEGFR-2 detectado em células endoteliais.⁽⁴⁸⁾

Quando o VEGF se liga a VEGFR-2, ocorre uma dimerização do receptor, que é autofosforilado. 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. Esses são responsáveis pelo efeito da ligação VEGF-VEGFR-2, incluindo a proliferação celular, permeabilidade, sobrevivência celular e migração celular (Figura 5).^(49,50)

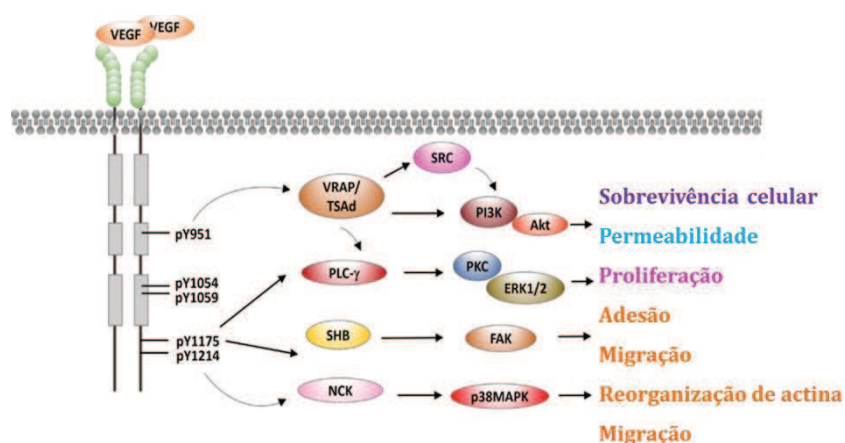


Figura 5. Ação do VEGF. Modificado de Zhou et al. (2015).⁽⁵⁰⁾

Assim a ligação VEGF-VEGFR-2 pode desencadear proliferação, brotação e formação de tubos de células endoteliais; aumentar a permeabilidade vascular; suprimir a apoptose para a estabilização do vaso; recrutamento de células imunes na supressão da resposta imune antitumoral; e na promoção do crescimento tumoral; e promovendo a angiogênese sustentada.⁽³⁰⁾

3. microRNAs

Os microRNAs (miRNAs) são definidos como moléculas de RNA não-codificantes com cerca de 18-25 nucleotídeos, atuando nas vias celulares através da regulação da expressão gênica em fase pós-transcricional e podendo induzir o silenciamento gênico por meio do pareamento específico com moléculas-alvo de RNA mensageiro (RNAm), e com isso levar à degradação desta molécula (Figura 6) ou à repressão da tradução do RNAm alvo da mesma.^(38,51-54)

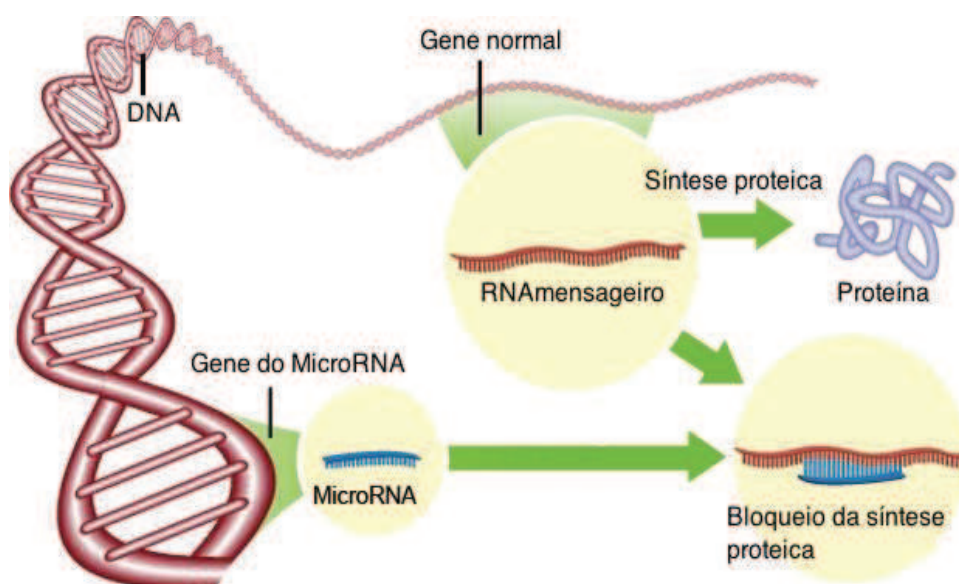


Figura 6. Mecanismo tradicional já descrito de ação do miRNAs. Um gene normal é transcrito em RNAm que será traduzido em uma proteína. Quando o miRNA é transcrito ele não leva à síntese proteica e sim pode levar ao bloqueio de um RNAm, este bloqueio inibe a síntese proteica. Modificado de Kirton et al. (2010).⁽⁵⁵⁾

Outros mecanismos de ação já foram identificados dessas moléculas, como o silenciamento transcricional e outros considerados inesperados. No silenciamento transcricional mediado por miRNAs, o complexo miRNA se liga a RISC (*RNA Induced Silencing Complex*) e seria capaz de se ligar ao transcrito nascente, recrutando a DNA

metiltransferase (DRM2), que promoveria a metilação (-CH₃) de sequências próximas no DNA. Essa modificação levaria ao silenciamento do gene-alvo.⁽⁵⁶⁾ Além disso, mecanismos inesperados foram descritos, como a promoção da transcrição ocasionada pelo let-7i sobre o promotor do gene da Interleucina 2 (IL-2) em linfócitos T CD4+,⁽⁵⁷⁾ e o aumento da eficiência de tradução ocasionada pelo miRNA-10a, este se liga a proteínas ribossômicas e aumenta a tradução em células embrionárias implantadas em camundongos.⁽⁵⁸⁾

Descobertos por Lee, Wightman e colaboradores^(51,59) através de estudos voltados para a biologia do desenvolvimento em *C. elegans*. No núcleo os miRNAs são transcritos pela RNA polimerase II/III a partir de seu gene ou de regiões intrônicas em pri-miRNA, molécula de cadeia longa. Esse transcrito primário contém uma extremidade 5' cap e uma extremidade 3' com cauda poli A. O pri-miRNA é reconhecido pela Drosha, uma ribonuclease III, e seu cofator DGCR8, como uma sequência não perfeitamente complementar e assim é gerado o miRNA precursor (pré-miRNA) de 70 nucleotídeos. Esse pré-miRNA sofre uma exportação nuclear pela Exportina 5, juntamente com uma molécula de Ran e outra de GTP que o exporta para o citoplasma. No citoplasma, o complexo DICER, uma ribonuclease III cliva o pré-miRNA, mudando sua estrutura, gerando um *duplex* miRNA-miRNA. O *duplex* pode gerar duas fitas de miRNA maduro, porém geralmente uma das fitas do *duplex* é degradada e a outra é incorporada ao complexo de silenciamento RISC. O miRNA maduro será guiado pela proteína AGO (Argonauta) e o complexo RISC até seu alvo complementar (Figura 7).⁽⁶⁰⁻⁶³⁾

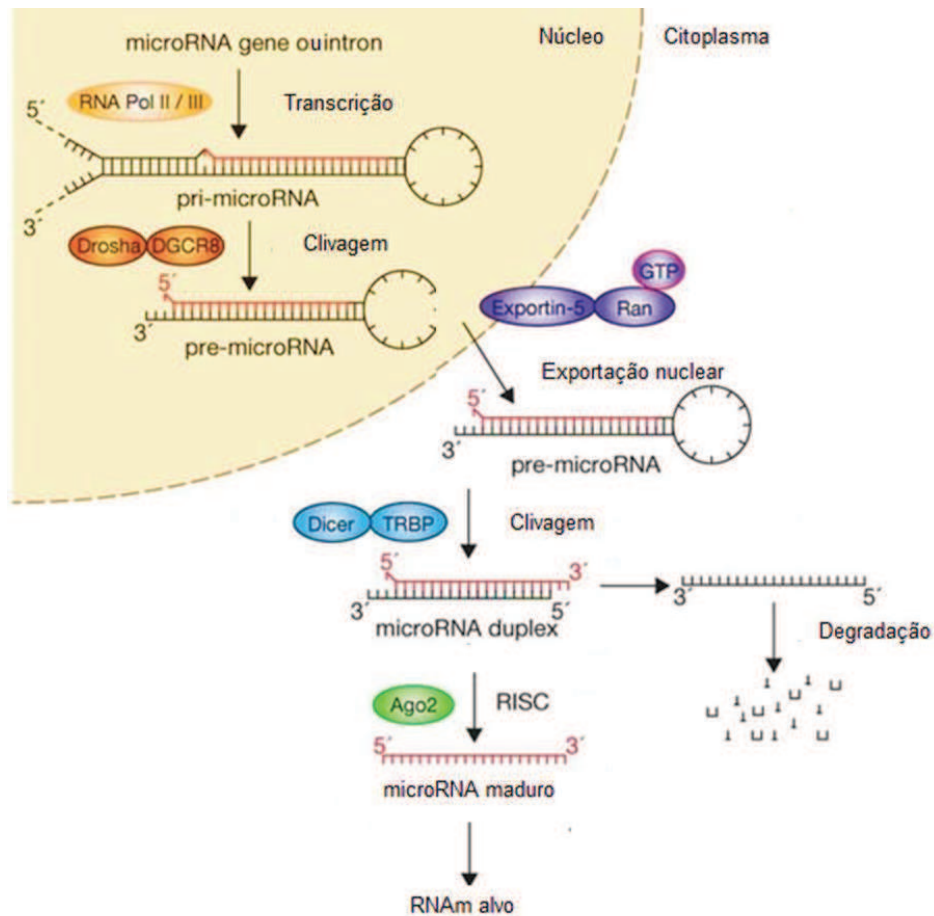


Figura 7. Esquema da biogênese de miRNAs. Modificado de Winter et al. (2009).⁽⁶⁴⁾

O pareamento perfeito entre miRNAs e genes-alvo só ocorre nas plantas, nos demais organismos esse pareamento é imperfeito, gerando o bloqueio da síntese proteica ou degradação do RNAm. Sua sequência de ligação 5', chamada de *seed*, é determinante para a ligação, esta contém 6-8 nucleotídeos e encontra complementaridade parcial em diversos locais do RNAm, porém é mais frequente na sequência 3'-UTR do RNAm alvo. A *seed* semeia, iniciando a hibridização entre o miRNA e o alvo, o restante do RNA fecha a sequência. Um miRNA pode regular diversos RNAm, um RNA mensageiro pode ser alvo de diversos miRNA, além disso, diversos genes podem regular um determinado miRNA. Os miRNAs são reguladores de

mais de 30 % de todos os genes que estão localizados dentro de íntrons de regiões codificantes ou não.^(65,66)

Em tecidos não tumorais, o miRNA na sua expressão fisiológica pode bloquear a tradução do RNAm alvo, mantendo os níveis normais de crescimento celular. Já em tecidos tumorais os miRNAs podem assumir dois papéis. Se o miRNA atua como oncomiR, ele pode inibir um gene alvo supressor, gerando assim o crescimento tumoral, proliferação, invasão e metástase. Se o miRNA atua como supressor tumoral, e está em baixa quantidade, o que normalmente ocorre em tumores, este não bloqueia o possível oncogene alvo. Assim oncogenes continuam a ser traduzidos, e a formação tumoral, proliferação, invasão e metástase aumentam, diminuindo a morte celular. Porém se esse supressor tumoral é aumentado, ocorre o inverso, sendo este um efeito protetor (Figura 8).^(62,67)

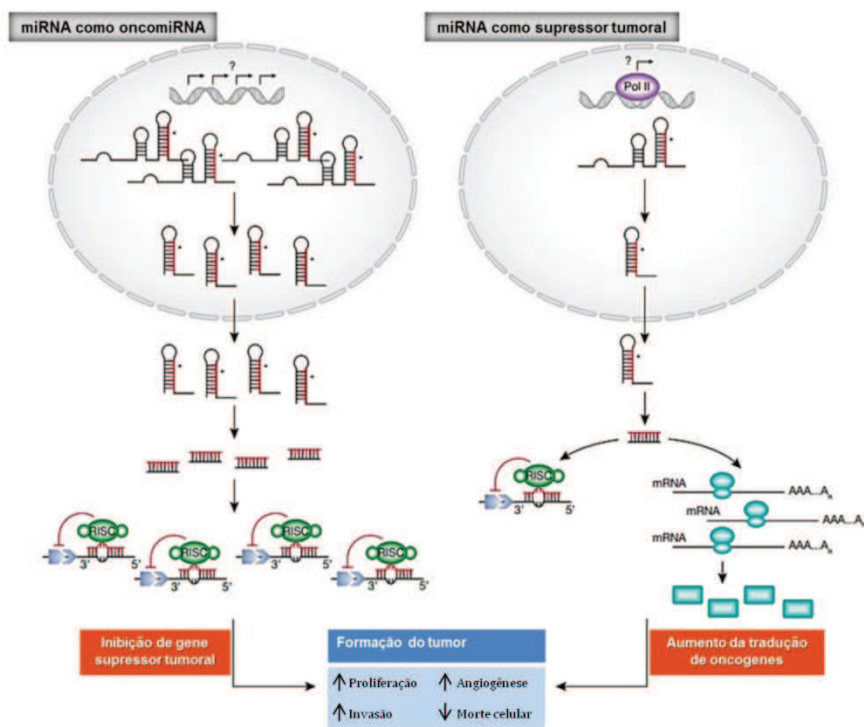


Figura 8. Papel dos miRNAs no câncer. Modificado Iorio & Croce (2012).⁽⁶⁸⁾

Já foram identificados miRNAs envolvidos no câncer de mama (Figura 9). Através da técnica de *array*, estudos têm identificado diversos conjuntos de genes altamente expressos em tumores mamários e muitos possuem importante papel na angiogênese.⁽⁶⁹⁾ No processo angiogênico, os miRNAs atuam regulando a expressão de genes pela ligação aos seus potenciais alvos complementares, induzindo ou reduzindo a formação de novos vasos sanguíneos tumorais.⁽⁷⁰⁾

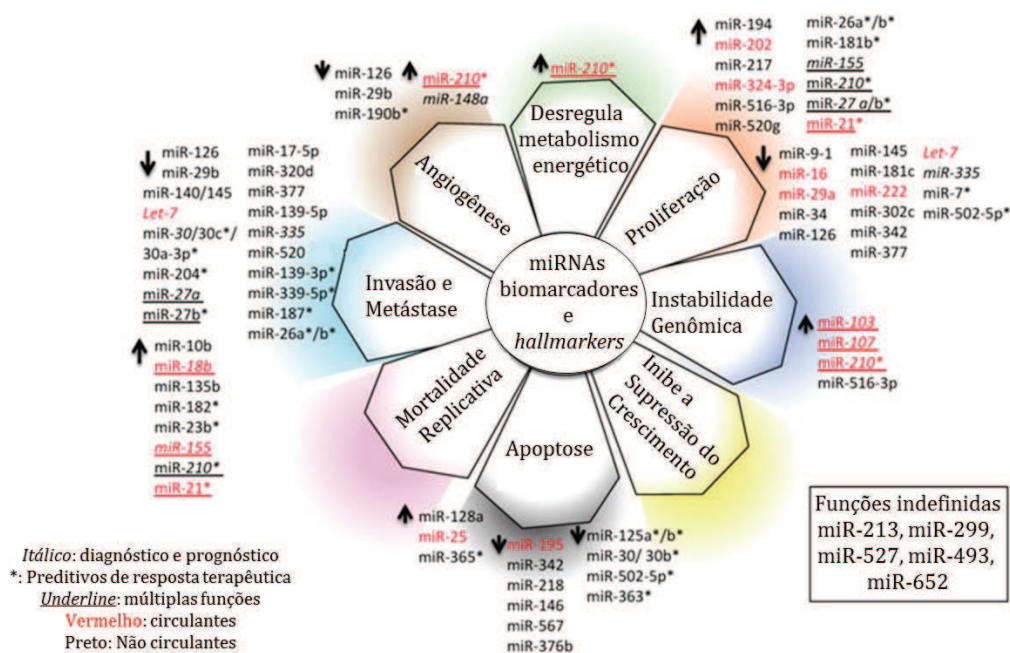


Figura 9. miRNAs identificados no câncer de mama. São diversos miRNAs relacionados ao câncer de mama. Estão desregulados na angiogênese, proliferação, instabilidade genômica, apoptose, invasão e metástase. Foram identificados como biomarcadores de diagnóstico e prognóstico (em itálico), preditivos de resposta terapêutica (*) e com múltiplas funções (underline), sendo que muitos deles ainda possuem funções indefinidas. Além disso, podem estar circulantes no plasma/soro (em vermelho) ou presentes nos tecidos (em preto). Modificado de Bertoli et al. (2015).⁽⁶⁹⁾

Assim, diversos miRNAs têm sido descritos como promotores ou supressores da angiogênese.⁽⁷¹⁾ Estudos *in vitro* e *in vivo* mostram que o aumento de microRNAs

promotores da angiogênese, induz a migração de células endoteliais.⁽⁷²⁾ Distintos miRNAs foram relacionados com a angiogênese em diferentes tipos tumorais. Estimulando o VEGF, o miR-10b e o miR-196b promoveu a angiogênese em células endoteliais de câncer de mama.⁽⁷³⁾ O miR-210 aumentou esse fator em células HUVEC (células endoteliais de veias umbilicais humanas) e conseqüente ocorrência de metástase, através da indução de hipóxia.⁽⁷⁴⁻⁷⁶⁾ Em tecido endometrial o miR-200 suprimiu esse fator.⁽⁷⁷⁾ Além disso, a alta expressão do miR-18 em câncer gástrico leva a diminuição da sinalização pelo VEGF e do HIF-1 α , inibindo a angiogênese.⁽⁷⁸⁾ miR-125b e miR-199a apresentam propriedades antiangiogênicas em câncer de ovário, suprimindo a angiogênese tumoral *in vitro* e *in vivo*, diminuindo a expressão da proteína HIF-1 α e os níveis de RNAm do *VEGF*.⁽⁷⁹⁾

4. Melatonina

A melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina), hormônio naturalmente produzido e secretado pela glândula pineal, cuja síntese é bloqueada na presença de luz, tem se revelado um potencial agente terapêutico contra o câncer de mama.⁽⁸⁰⁾ Em humanos, a melatonina é sintetizada principalmente pela glândula pineal, no entanto, sua produção extra-pineal já foi demonstrada.^(81,82)

Na glândula pineal esse hormônio é produzido a partir do aminoácido triptofano, que é absorvido pela corrente sanguínea. Este aminoácido é metabolizado pela enzima triptofano hidroxilase 1 (TPH1) na mitocôndria em 5-hidroxitriptofano (5-HTP). No citosol, o 5-HTP é descarboxilado pela 5-HTP descarboxilase em serotonina. A serotonina é acetilada pela enzima arilalquilamina N-acetiltransferase (AA-NAT) em N-

acetilserotonina (NAS). Então, a NAS é convertida em melatonina pela enzima hidroxindol-Ometiltransferase (HIOMT) (Figura 10).^(83,84)

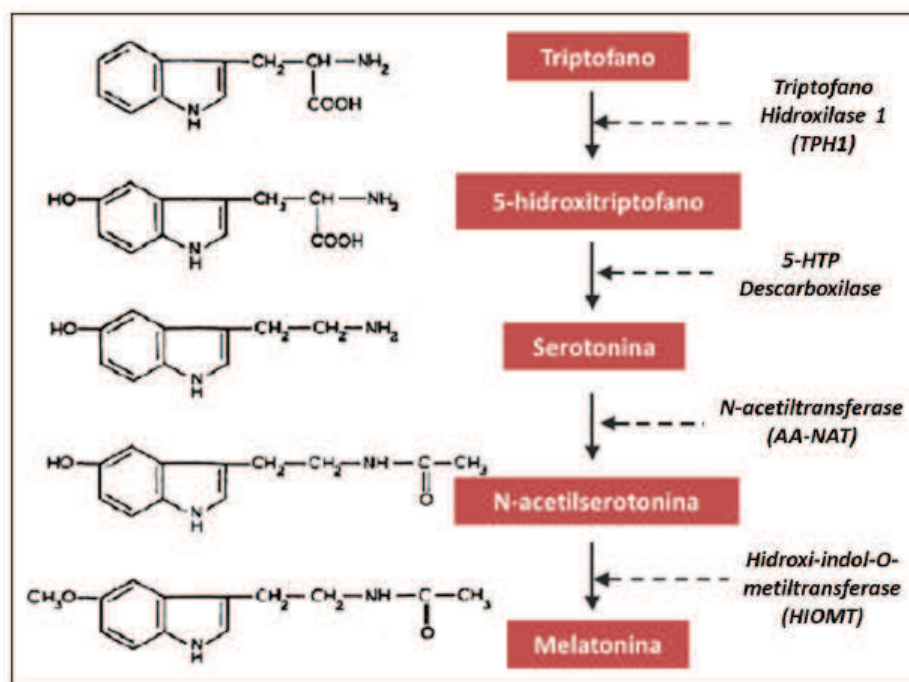


Figura 10. Esquema representativo da síntese de melatonina. Modificado de BUBENIK & KONTUREK (2011).⁽⁸⁵⁾

A proteína citosólica AA-NAT tem a sua expressão na glândula pineal praticamente indetectável durante o dia e aumenta de 70 a 150 vezes durante a noite. Assim essa enzima é considerada fator limitante para a síntese de melatonina. A variação da AA-NAT reduz 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.^(84,86,87) A presença da luz, bem como o uso excessivo e inadequado da luz artificial durante o período noturno, leva à diminuição de produção de melatonina pelo

homem. A melatonina é secretada durante a noite em todas as espécies de mamíferos, independente de possuírem hábito diurno ou noturno.^(81,88) A exposição à luz à noite está diretamente relacionada à inibição rápida e completa da atividade de AA-NAT e síntese de melatonina, este efeito inibitório envolve diversos eventos e estruturas neurais, podendo se originar na retina.⁽⁸⁷⁾

Essa molécula é lipofílica e não é armazenada, sendo diretamente liberada por difusão. Sua meia vida plasmática é de aproximadamente 20 minutos.^(83,84) Ela possui importantes funções fisiológicas, atuando sobre o controle do sono, regulação da fertilidade, da função cardiovascular, da temperatura corporal, papel antioxidante e no sistema imune.^(81,89) Já foram descritas importantes ações antitumorais deste hormônio, entre elas o controle da diferenciação celular, modulação da sinalização do estrógeno, inibição da proliferação celular, indução da apoptose, estimulação da diferenciação celular, ação anti-inflamatória, pró-apoptótica, antiproliferativa, anti-invasiva e antimetastática^(90,91) além dos efeitos antiangiogênicos⁽⁹²⁾ comprovados recentemente por nosso grupo de pesquisa.⁽⁹³⁾

Muitas ações antitumorais da melatonina são realizadas através 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, evidenciando sua ação em células RE+.^(82,94) Através desses receptores, a melatonina pode inativar diversas vias relacionadas à angiogênese, proliferação e metástase em câncer de mama (Figura 11A).⁽⁸²⁾

Devido a sua natureza lipofílica, a melatonina pode atuar por mecanismos independentes de receptores, pois essa sua natureza permite sua livre passagem pela membrana celular. Ocorre a interação 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. Pode atuar na redução direta na redução de radicais livres (ROS) (Figura 11G) ou no aumento de enzimas antioxidantes.^(88,95)

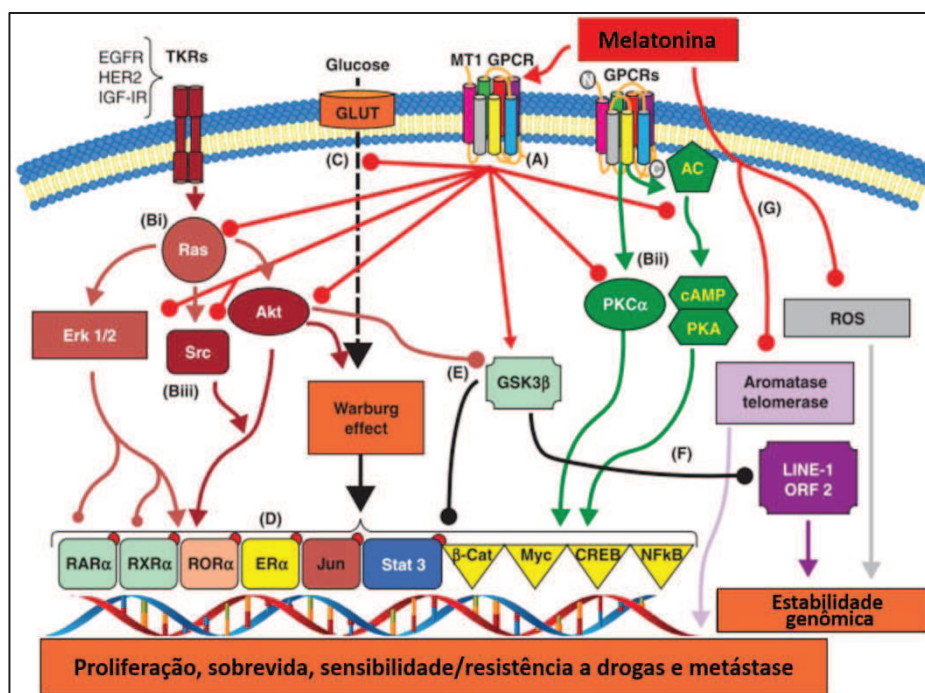


Figura 11. Ações da melatonina. Através do receptor MT1 acoplado a proteínas G (A), ativação das proteínas G α i pode reprimir várias vias de sinalização, incluindo as rotas TRK e GPCR, que ativam cascatas de sinalização como MAPK/ERK1/2 (Bi), PI3K/AKT, PKC (Bii) e cAMP/PKA, bem como vias de cinases não receptoras, incluindo c-SRC (Biii) e FAK. Imagem modificada de Hill et al. (2015).⁽⁸²⁾

Atualmente, tem-se um amplo conhecimento sobre as vias de sinalização intracelulares da melatonina sendo que, ela entra nas células por receptores específicos

ou permeia a membrana e deflagra diferentes vias de sinalização resultando em ações antitumorais.^(96,97) No entanto, sua capacidade de modular processos intracelulares é extremamente complexa e requer ainda muitos estudos.⁽⁸¹⁾ Ainda, vários estudos sugerem que a melatonina é capaz de modificar a expressão de inúmeros genes associados ao câncer de mama,⁽⁹⁸⁻¹⁰⁰⁾ indicando seu potencial papel na regulação de miRNAs.⁽¹⁰¹⁾ Porém, são escassos os estudos que avaliaram o efeito da melatonina na expressão de miRNAs no câncer, especialmente no câncer de mama triplo-negativo.

5. Melatonina e miRNAs

Lee e colaboradores⁽¹⁰¹⁾ estudaram pela primeira vez o efeito da melatonina na modulação da expressão de miRNAs na linhagem de câncer de mama não metastático e RE+ MCF-7. Os resultados demonstraram que níveis fisiológicos de melatonina podem modular a expressão de miRNAs promovendo 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.⁽¹⁰²⁾

A melatonina diminui a expressão do miR-24 em linhagens de câncer de mama HCC1143 e MCF-7, e de cólon HCT116, reduzindo seus genes-alvo que estão relacionados a processos de proliferação, invasão e metástase.⁽¹⁰³⁾ Recentemente, um estudo de Sohn e colaboradores (2015)⁽¹⁰⁴⁾ 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*. Em células provenientes de testículo de camundongo (GC-1 spg), foram identificados 176 miRNAs modulados pela melatonina, 171

aumentados (incluindo o miR-152-3p) 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 VEGF, o fator de necrose tumoral (TNF), o oncogene Ras e o receptor de membrana *Notch*.⁽¹⁰⁵⁾

6. miRNA Candidato a Alvo: miR-152-3p

O miR-152 tem sido associado a processos de proliferação celular, invasão e angiogênese em diferentes neoplasias como mama,⁽³⁸⁾ endométrio,^(106,107) ovário⁽¹⁰⁸⁾ e colangiocarcinoma.⁽¹⁰⁹⁾ Este miRNA faz parte da família miR-148/152, que é composta por miR-148a, miR-148b e miR-152, estes possuem a mesma sequência inicial *seed*.⁽¹¹⁰⁾ O miR-152 possui duas sequências maduras, o miR-152-5p e o miR-152-3p, sendo que o miR-152-3p está mais expresso em tumores.⁽¹¹¹⁾ No câncer de mama, os níveis do miR-152-3p estão diminuídos comparados aos tecidos mamários normais.⁽³⁸⁾ O mecanismo pelo qual o miR-152 aparece em níveis diminuídos em células tumorais de mama pode ser explicado pela hipermetilação da região promotora do gene que codifica este microRNA, resultando em redução da expressão do gene metilado. Esse processo é ocasionado pelo aumento da expressão da DNA-metiltransferase-1 (DNMT1) em células tumorais.⁽³⁸⁾ Além do câncer de mama, este miRNA já foi indicado como sendo substancialmente diminuído em tumores sólidos, no câncer endometrial, no câncer de ovário, no colangiocarcinoma e no hepatocarcinoma relacionado ao vírus da hepatite B.⁽¹¹²⁾

Este miRNA foi identificado como inibidor do processo da angiogênese em diversas doenças. Em células endoteliais da retina humana, em condições hiperglicêmicas, seus níveis de expressão estavam diminuídos. Neste estudo, constatou-

se que a presença do miR-152 diminui a ação do VEGF, do VEGFR2 e do fator de transformação do crescimento beta 1 (TGF- β 1),⁽¹¹³⁾ contribuintes da angiogênese e também da proliferação celular. Em câncer de mama tendo como alvo o IGF-1R e o substrato 1 do receptor de insulina (IRS1), induz à inibição de algumas vias de sinalização celulares, culminando na inibição do HIF-1 α e do VEGF, fatores que promovem a síntese de novos vasos sanguíneos (Figura 12).^(38,114) Além das funções antiangiogênicas, o miR-152 está envolvido no processo de resistência a tratamento quimioterápico no câncer de ovário, confirmando que a superexpressão desse miRNA aumenta a sensibilidade das células ao quimioterápico cisplatina, inibindo diversos mecanismos envolvidos com a progressão tumoral, como a proliferação celular, levando ao processo apoptótico via supressão da DNMT1.^(111,115)

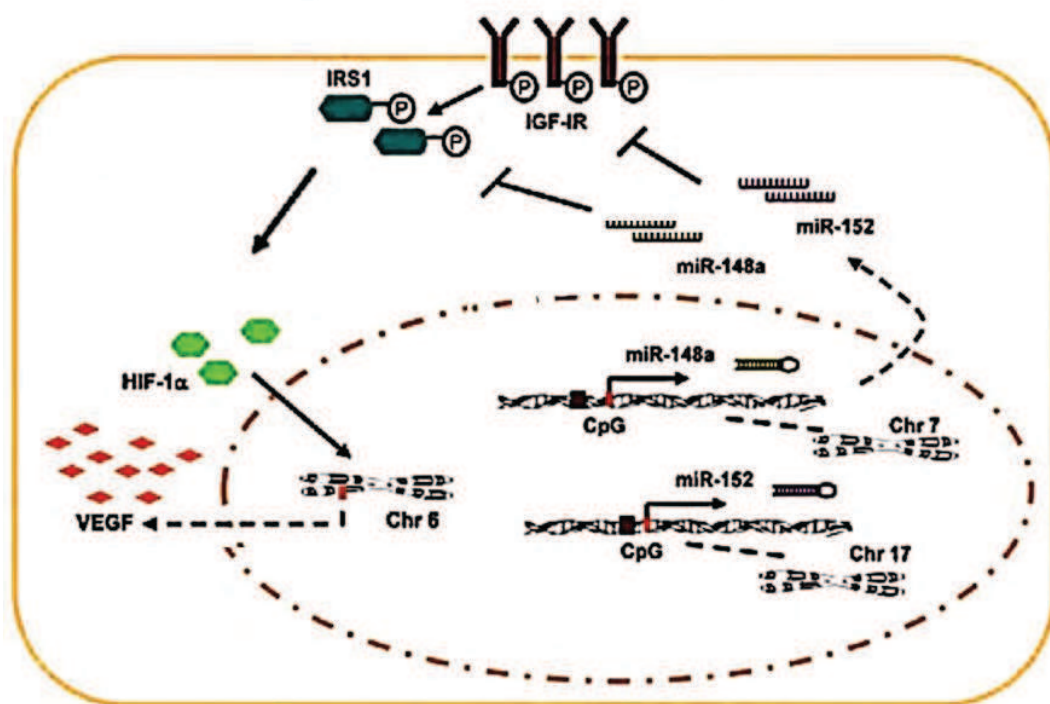


Figura 12. Ação da família miR-148 em genes relacionados com a angiogênese em câncer de mama. Modificado de Xu et al. (2013).⁽³⁸⁾

Os tumores mamários são altamente invasivos e metastáticos, e a angiogênese é um fator determinante do conseqüente aumento da mortalidade por esta neoplasia. Experimentos *in vitro* e *in vivo* mostram que o aumento de miRNAs e seus genes alvos, associam-se ao crescimento tumoral e angiogênese, enquanto a inibição da sinalização destas moléculas resulta em uma supressão significativa da angiogênese tumoral e, portanto, da progressão tumoral e metástase. Nesse sentido, verificamos que a melatonina apresenta diversas propriedades oncostáticas e antiangiogênicas, mas seus mecanismos de ação ainda não são totalmente compreendidos. Como visto, alguns estudos demonstram que este tratamento diminui a expressão de genes e miRNAs relacionados à progressão tumoral. Assim, a associação da melatonina com a angiogênese na modulação dos miRNAs e a ausência de estudos dessa relação no câncer de mama, tornou a questão de especial interesse.

7. Objetivo

7.1 Objetivo Geral

Avaliar a ação modulatória da melatonina no processo de angiogênese mediado por miRNA no câncer de mama.

7.2 Objetivos Específicos

- Identificar a concentração ideal de melatonina para diminuir a viabilidade celular da linhagem MDA-MB-468;
- Identificar a expressão diferencial dos miRNAs associados ao câncer de mama em células MDA-MB-468 tratadas ou não com melatonina;

- Selecionar e validar um miRNA candidato e seus potenciais genes-alvo relacionados ao processo de angiogênese;
- Após os tratamentos, analisar a expressão gênica e proteica dos genes-alvo e do miRNA candidato em células MDA-MB-468 e MDS-MB-231, tratadas ou não com melatonina.

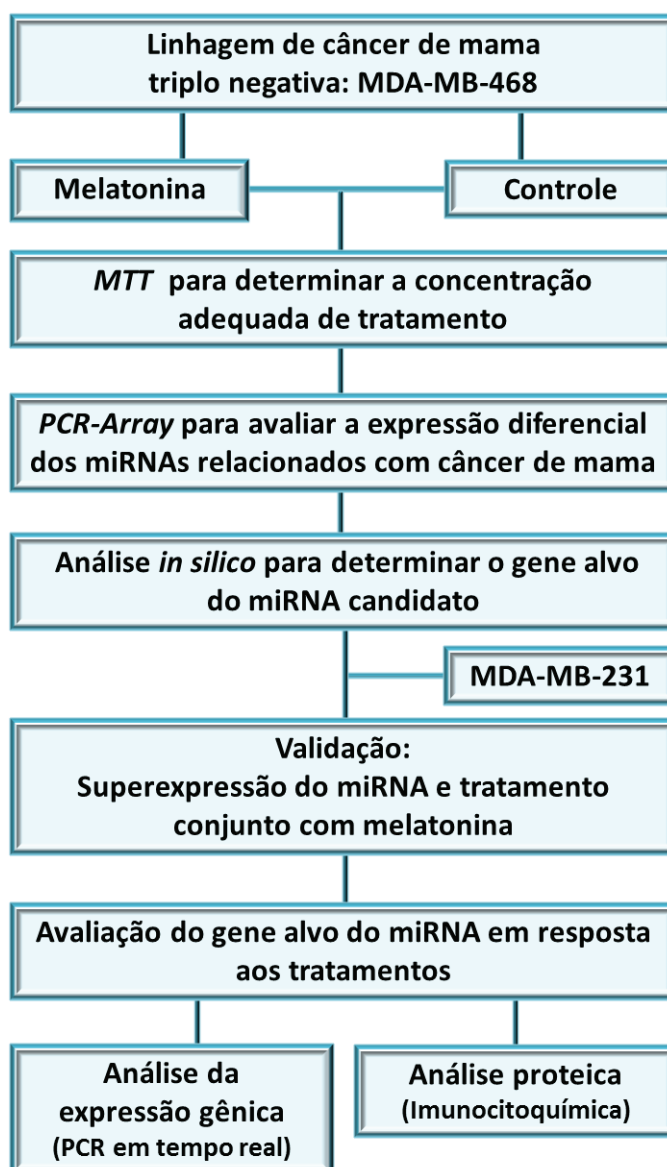
II. MATERIAL E MÉTODO

II. MATERIAL E MÉTODO

Considerações Éticas

O presente estudo foi dispensado de certificação do comitê de ética por ter utilizado linhagens celulares humanas imortalizadas.

1. Delineamento Experimental



2. Cultivo Celular

As células MDA-MB-468 e MDA-MB-231, ambas triplo-negativas (RE, RP e HER2 negativos), permaneceram em dimetilsulfóxido (DMSO) (*Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA*) e soro fetal bovino (SFB) a -80 °C até o momento de uso. As células MDA-MB-468 foram cedidas gentilmente pelo Prof. Dr. Wilson Araújo da Silva Junior, do Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP). No banco de linhagens celulares do LIMC (Laboratório de Investigação Molecular no Câncer) já constavam as células MDA-MB-231.

Após o descongelamento, as células foram cultivadas em estufa com 5 % de CO₂ a 37 °C, em meio de cultura DMEM[®] alta glicose (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium-High Glucose*), suplementado com 10 % de soro fetal bovino (SFB) e 1 % de Penicilina e Estreptomicina (LGC Biotecnologia, SP, BR). O crescimento e a morfologia celular foram avaliados diariamente em microscópio de luz invertido. Quando as células atingiram a confluência de 80 % foram iniciados os demais experimentos.

3. Desagregação Enzimática

As células foram lavadas com solução tampão fosfato (PBS) e foram incubadas com tripsina por 5 minutos. Após, foi adicionado meio de cultivo, e o tubo centrifugado a 2000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuscitado com novo meio de cultura.

4. Contagem das Células na Câmara de *Neubauer*

Após tripsinizadas, as células foram centrifugadas e ressuspensas em 5 mL (fator de diluição) de meio de cultura DMEM. Foram utilizado 10 μ L dessa solução para a contagem na câmara de *Neubauer*. A contagem foi realizada nos quatro quadrantes laterais externos (Figura 13) e o resultado colocado na fórmula abaixo, onde X é a quantidade de células por mL:

$$X = \frac{\text{Soma do n}^\circ \text{ de células em cada quadrante} \times 10^4 \times \text{fator de diluição}}{\text{Total de quadrantes contados}}$$

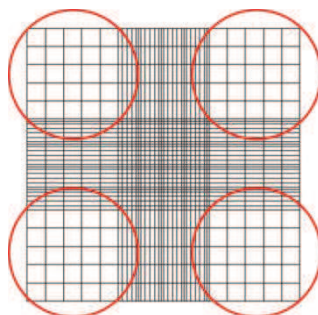


Figura 13. Esquema representativo da câmara de *Neubauer*. A figura demonstra os quadrantes laterais que foram utilizados para a contagem.

5. Ensaio de Viabilidade Celular (MTT)

O ensaio MTT foi realizado para avaliar o efeito da melatonina sobre a viabilidade das células MDA-MB-468. Este procedimento consiste em um ensaio colorimétrico utilizado para avaliação da atividade metabólica celular.⁽¹¹⁶⁾ Quando adicionado às células com metabolismo ativo, o sal MTT (*-3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide*) é reduzido e forma cristais de cor púrpura.⁽¹¹⁷⁾

Para o experimento, 100 μ L de meio de cultura suplementado com soro fetal bovino (2 %) contendo 5×10^4 células tumorais foram colocadas em poços individuais

(placa de 96 poços) e incubados em atmosfera úmida, com 5 % de CO₂ a 37 °C, por 24 horas. Os tratamentos foram realizados utilizando quatro concentrações diferentes de melatonina (0,001 mM, 0,01 mM, 0,1 mM e 1 mM) (*Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA*), todas elas superiores aos valores fisiológicos. As células do grupo controle receberam apenas o veículo de diluição da melatonina (etanol e tampão PBS). Após 48 horas de tratamento foram adicionados 10 µL de solução de MTT (*Vibrant Mtt Cell Proliferation Assay Kit-Invitrogen®*) em cada amostra, seguida de incubação por 1 hora. Posteriormente, as células foram incubadas com 100 µL de DMSO por 10 minutos para que houvesse a solubilização dos cristais formados a partir da metabolização do MTT. A absorbância foi medida em comprimento de onda de 570 nm utilizando-se o leitor de placas *FLUOstar Omega Microplate Reader*.

O ensaio de viabilidade foi realizado apenas para a linhagem MDA-MB-468, e para a linhagem MDA-MB-231 foram utilizados os resultados já obtidos por nosso grupo de pesquisa.⁽⁹³⁾

6. Grupos Experimentais

As células provenientes das linhagens MDA-MB-468 e MDA-MB-231 foram plaqueadas na concentração de 5×10^6 células por poço em placas de 6 poços, sendo divididas nos seguintes grupos experimentais:

- Controle: células não tratadas (solução de diluição de melatonina);
- Melatonina: células tratadas com 1 mM de melatonina;
- Controle negativo da transfecção;
- Superexpressão do miR-152-3p.

O tratamento com melatonina foi realizado utilizando a solução mãe de melatonina (100 mM), previamente diluída em etanol a 100 % e PBS, que foi re-diluída em meio DMEM com 2 % soro fetal bovino, para obter uma concentração final de 1mM. Os tratamentos foram realizados em triplicata, com duração de 24 horas.

7. Extração

As amostras de RNA total foram extraídas dos grupos experimentais utilizando o *miRNeasy Mini Kit (QIAGEN, Hilden, GER)* seguindo as orientações do fabricante. Foi utilizado o reagente *QIAzol[®]* e o *kit* de extração para preservar os miRNAs que poderiam ser dissipados em uma extração de RNA total convencional. Inicialmente, as células plaqueadas em placas de 6 poços, foram analisadas no microscópio invertido, o meio de cultura desprezado, e então, lavadas com PBS. Em cada poço foram adicionados 500 µL de *QIAzol[®]* gelado, em seguida, o homogeneizado foi incubado por 5 minutos em temperatura ambiente. Foram acrescentados 140 µL de clorofórmio para cada 700 µL de amostra, homogeneizando por inversão, sendo mantido à temperatura ambiente por 3 minutos. Os tubos foram centrifugados a 12.000 g por 15 minutos a 4 °C, resultando em uma fase inferior com fenol e uma fase superior aquosa, na qual o RNA se concentra. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo, evitando que a pipeta tocasse na outra fase, adicionado etanol absoluto 100 % gelado em quantidade suficiente para precipitação do RNA (quantidade de amostra × 1,5) e, então, a solução foi transferida para um tubo com uma coluna integrada. A amostra foi novamente centrifugada por 1 minuto a 12.000 g a 22 °C para retenção do RNA na coluna e o filtrado foi descartado. Em seguida, 700 µL de *Buffer RWT* foram adicionados na coluna e esta foi centrifugada por 1 minuto, 12.000 g a 22° C. Foram adicionados 500 µL

Buffer RPE na coluna e centrifugada por 1 minuto, 12.000 g a 22° C, descartado o filtrado, esse procedimento repetido por mais 2 minutos. A coluna foi transferida para um novo tudo, foram adicionados 30 µL de *RNase-free water* e centrifugado por 2 minutos, 12.000 g a 22 °C para eluir o *pellet* de RNA total e os miRNAs que estavam aderidos à coluna. A concentração de RNA de cada amostra foi determinada utilizando o equipamento *NanoDrop 2000 C Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)*.

8. Obtenção do cDNA Para o PCR Array

O RNA extraído das células MDA-MB-468 foi utilizado para obtenção do cDNA (fita simples - DNA complementar), utilizando o *miScript II RT Kit (QIAGEN, Hilden, GER)*. Para cada amostra, o *mix* da reação foi preparado com 4 µL de *Hispec Buffer*, 2 µL de *mix* de nucleotídeos, 2 µL de *mix* transcriptase reversa e *RNase-free water* em quantidade variável para cada amostra, totalizando 20 µL e concentração final de 250 ng de RNA. Após, as amostras foram colocadas no termociclador a 37 °C por 60 minutos, em seguida a 95 °C por 5 minutos, e então mantidas a 4 °C. Ao final da transcrição, o cDNA foi estocado a temperatura de -20 °C até sua utilização.

9. Análise da Expressão de miRNAs por PCR Array

O ensaio de *PCR Array* permite a análise de um painel de genes específicos de um processo ou via biológica. A placa *RT² Profiler™ PCR Array Human Breast Cancer* é composta por 84 miRNAs maduros (A1-G12) e grupos controle (Quadro 1 e Figura 14), relacionados com o câncer de mama. Para a realização do ensaio foi preparado um *mix* contendo 100 µL de cDNA diluído (20 µL de cDNA sintetizados anteriormente +

80 μL de *RNase-free water*), 1375 μL de $2\times$ *QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix*[®], 275 μL de $10\times$ *miScript Universal Primer*, e 1000 μL de *RNase-free water* conforme as orientações do fabricante. Na placa de 96 poços, foram adicionados a cada um, 25 μL da mistura de reação de PCR *Array*. A placa foi selada com adesivo e centrifugada por 1 minuto a 1000 g, para a remoção de bolhas. Para ativar a enzima *Go Taq DNA polimerase* a placa foi aquecida a 95 °C durante 15 minutos. Em seguida, foram realizados 40 ciclos de três passos, que incluiu a desnaturação a 94 °C durante 15 segundos, emparelhamento a 55 °C durante 30 segundos, e a extensão a 70 °C durante 30 segundos. Os dados de fluorescência foram recolhidos durante a etapa de extensão. O valor da expressão relativa dos miRNAs de interesse foi determinado pelo método de quantificação em relação à média dos genes normalizadores utilizados como controle endógeno ($\Delta\Delta\text{Ct}$). O equipamento utilizado para o ensaio foi o *StepOnePlus* de PCR em tempo real (*Applied Biosystems*[™]).

Quadro 1. Placa *RT² Profiler[™] PCR Array Human Breast Cancer*. Placa de perfil gênico composta por 84 miRNAs maduros relacionados ao câncer de mama.

	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

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
B	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
C	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36
D	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48
E	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
F	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72
G	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84
H	Ce	Ce	SN1	SN2	SN3	SN4	SN5	SN6	miRTC	miRTC	PPC	PPC
	Primer de <i>C. elegans</i> (miR-39)		snoRNA/snRNA Controles da reação de PCR				Controle da transcrição reversa		Controle positivo do PCR			

Figura 14. Composição da placa *RT² ProfilerTM PCR Array Human Breast Cancer*. Os poços A01 - G12 contém 84 miRNAs maduros associados ao câncer de mama; H01 e H02 contém o primer de miR-39 de *C. elegans* para ser utilizado como normalizador do ensaio; H3 - H8 contém RNAs de interferência snoRNA/snRNA para serem utilizados como controles internos da reação de PCR; H9 e H10 contém *miRTC miScript Primer* para serem utilizados como controles da reação de transcrição reversa; H11 e H12 são utilizados como controles positivos da reação de PCR.

10. Seleção do miRNA Relacionado ao Processo Angiogênico

Dentre os miRNAs que foram diferencialmente expressos pela melatonina, o miR-152-3p foi selecionado. Esse miRNA foi analisado na base de dados mirDIP (<http://ophid.utoronto.ca/mirDIP>), sendo um potencial regulador dos genes *IGF-1R*, *HIF-1 α* e *VEGF*, relacionados ao processo de angiogênese. Essa ferramenta utiliza algoritmos disponibilizados pelas principais ferramentas de predição de RNAm alvos de miRNAs e a sequência 3' UTR de transcritos humanos disponíveis nos bancos de dados de transcriptomas, utilizando diversos critérios como parâmetros para avaliar a possibilidade de interação como por exemplo, a estabilidade termodinâmica e validação experimental observados em literatura (*DIANA-microT*, *miRBase*, *microCosm Targets*,

microRNA.org, *PicTar*, *PITA*, *RNA22 predictions* e *TargetScan*). As interações apresentaram *score* acima de 50 % em regiões conservadas dos RNAm dos genes relacionados à angiogênese, inflamação e metástase foram escolhidas para as análises por PCR em tempo real.

11. Modificação Transiente de Células Tumorais

Para a realização da modificação transiente das células MDA-MB-468 e MDA-MB-231 foi utilizado o reagente *MirVanaTM miRNA Mimics* (*Ambion*[®]) miR-152-3p (Quadro 2), que são pequenas moléculas de RNA de dupla fita que mimetizam um miRNA endógeno e possibilitam análises funcionais pela superexpressão do mesmo. Além disso, foi utilizado um controle negativo que contém uma sequência de nucleotídeos sem homologia com qualquer gene, descrita em mamíferos, e embaralhada (*Ambion*[®]). O *Mimic* e o controle negativo foram diluídos separadamente em água *nuclease-free* para obter uma solução de trabalho na concentração de 10 µM. Foram preparados dois tubos: um contendo 0,075 µl *Mimic* acrescido de 100 µl de meio de cultivo DMEM sem SFB e o 3 µl de reagente *HiPerfect* (*Qiagen*[®]), ideal para a transfecção de *mimics*, e o outro contendo o controle negativo com o mesmo meio e reagente. A solução de transfecção foi incubada por 10 minutos e adicionada às células plaqueadas para a posterior realização dos experimentos. Os grupos da transfecção estão descritos no item no item 6.

Quadro 2. Descrição do Mimic miR-152-3p

miR-152-3p	
<i>Chromosome Location</i>	Chr. 17 - 48037161 - 48037247 [-] <i>on Build</i> GRCh38
<i>Mature miRNA Sequence</i>	UCAGUGCAUGACAGAACUUGG
<i>Stem Loop</i>	UGUCCCCCCCCGGCCCAGGUUCUGUGAUAC ACUCCGACUCGGGCUCUGGAGCAGUCAGU GCAUGACAGAACUUGGGCCCCGGAAGGACC

Fonte: miRBase.⁽¹¹⁸⁾

12. Obtenção de cDNA para PCR em Tempo Real

A concentração e pureza do RNA total foram analisadas usando o *NanoDrop 2000C Spectrophotometer*. A obtenção do cDNA (fita simples - DNA complementar) foi realizada usando o *TaqMan™ MicroRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)* para miRNAs, e o *High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)* para genes, conforme especificações do fabricante. Nesta etapa foram utilizados *primers* em forma de *loop*, os quais apresentam uma região complementar a sequência de cada miRNA maduro ou genes. Para cada amostra foram adicionados 5 µL (miRNA) e 10 µL (gene) de RNA na concentração de 1 µg/µL e 10 µL de *mix*, obtendo-se uma solução com volume final de 15 µL (miRNA) e 20 µL (gene). Para análise de miRNAs, as preparações foram colocadas no termociclador a 16 °C por 30 minutos, em seguida a 42 °C por 30 minutos, a 85 °C por 5 minutos e então mantidas a 4 °C. Para análise de genes, as preparações foram colocadas no termociclador a 25 °C por 10 minutos, em seguida a 37 °C por 120 minutos, a 85 °C por 5 minutos e então mantidas a 4 °C. Ao final da transcrição, o cDNA foi estocado a temperatura de -20 °C.

13. PCR Quantitativa em Tempo Real (qPCR)

Como foco principal do trabalho, o miR-152-3p e os genes *IGF-1R*, *HIF-1 α* e *VEGF* foram analisados por reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qPCR), e para complementar os resultados na linhagem MDA-MB-468, foram analisados os miRNAs 148a e 148b, pertencentes a família miR-148/152. Para a qPCR foi utilizado o equipamento *StepOnePlus Real-Time PCR System*. As reações foram realizadas em triplicata utilizando 10 μ L de *TaqMan™ Universal PCR Master Mix*, 1 μ L de *TaqMan RNA Assay (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)* e 10 ng de cDNA em volume final de 20 μ L. As preparações foram submetidas a 50 °C por 2 minutos e 95 °C por 10 minutos, seguidos de 40 ciclos a 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 1 minuto. Para normalizar a expressão do miRNA e do RNAm dos genes-alvo em estudo, foram utilizados controle endógenos: U6 e beta-actina, respectivamente, estes comumente escolhidos para serem utilizados em estudos de câncer. Os níveis de expressão relativa entre as amostras foram calculados usando a comparação $\Delta\Delta CT$ menos cada controle específico das amostras em estudo.

14. Imunocitoquímica

O procedimento de imunocitoquímica foi realizado nas células MDA-MB-468 e MDA-MB-231 a fim de avaliar a expressão dos marcadores IGF-1R, HIF-1 α e VEGF (proteínas sintetizadas a partir dos genes-alvo da família miR-148/152). Esse ensaio permite avaliar a expressão de proteínas mediante a introdução de antígenos específicos.

As células em cultivo foram transferidas para uma lâmina com silicone acoplado com oito poços, onde foi adicionado meio de cultura específico. As células foram tratadas e transfectadas por 24 horas, de acordo com os grupos descritos no item 6.

Após, foi retirado o meio de cultura e cada poço da lâmina incubado com 250 µL de fixador paraformaldeído a 4 % durante a noite. O paraformaldeído foi retirado e as lâminas foram incubadas com Albumina do Soro Bovino (BSA) 5 % gelada por 1 hora. Posteriormente esse bloqueio foi retirado e anticorpos primários (Quadro 3) foram adicionados a 4 °C, e incubados durante a noite. Na sequência, as lâminas foram lavadas 2 vezes em solução tampão PBS por 5 minutos e incubadas com reagente complemento (*REVEAL-Biotin-Free Polyvalent DAB-Spring Bioscience, Pleasanton, CA*) por 10 minutos. Posteriormente foram incubadas com o reagente conjugado HRP (*REVEAL-Biotin-Free Polyvalent DAB-Spring Bioscience, Pleasanton, CA*) por 15 minutos. As lâminas foram lavadas em solução tampão PBS por 5 minutos, sendo esse processo repetido 2 vezes. A revelação foi realizada com substrato cromogênico DAB (Diaminobenzidina 3,3') por 3 minutos, e após, as lâminas foram novamente lavadas como descrito acima e a contra-coloração realizada com Hematoxilina de *Harris* por 40 segundos. A montagem das lâminas foi realizada em glicerol.

Todas as imunorreações foram acompanhadas de um controle positivo para o anticorpo testado (IGF-1R e HIF-1 α - carcinoma mamário humano; VEGF - rim humano) e um controle negativo (células sem anticorpo primário).

Após o procedimento imunocitoquímico, as lâminas foram observadas na objetiva de 40 \times do microscópio *Nikon Eclipse E200*[®] e analisadas por densitometria óptica. Para cada amostra foram fotografados 3 diferentes campos apenas nas áreas imunorreativas, nas quais foram quantificados 20 pontos com o *software IMAGE J*[®], totalizando 60 pontos quantificados para cada lâmina. Os valores foram obtidos em unidades arbitrárias (u.a.) e demonstraram a densidade óptica média (D.O.M.) para cada amostra.

Quadro 3. Anticorpos primários utilizados nas técnicas de imunocitoquímica e suas respectivas especificações.

Anticorpo	Empresa	Clone	Diluição	Marcação
IGF-1R	<i>Sigma- Aldrich, St. Louis, MO, USA</i>	C-terminal	1:50	Nuclear e citoplasmática
HIF-1α	<i>Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA</i>	H1alpha67	1:25	Citoplasmática
VEGF	<i>Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA</i>	A-20	1:25	Nuclear e citoplasmática

Fonte: Sigma-Aldrich,⁽¹¹⁹⁾ Santa Cruz Biotechnology.^(120,121)

15. Análise Estatística

Os resultados foram inicialmente submetidos à análise descritiva para determinação da normalidade. Para amostras com distribuição normal, utilizou-se o teste *t* de *Student* (duas amostras) ou a Análise de Variância (ANOVA), seguido do teste de *Bonferroni* (mais de duas amostras). Os dados foram apresentados como média \pm erro padrão de média (SEM). Os valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos e todas as análises foram realizadas usando o software *GraphPad Prism 5* (*GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA*).

III. RESULTADOS

III. RESULTADOS

1. Estabelecimento do Cultivo Celular

O cultivo das células tumorais de mama MDA-MB-468 e MDA-MB-231 foi estabelecido com o meio de cultura DMEM suplementado com 10 % de SFB e 1 % de antimicótico e antibiótico, apresentando 80 % de confluência em 5 dias de cultivo (Figura 15 e 16).

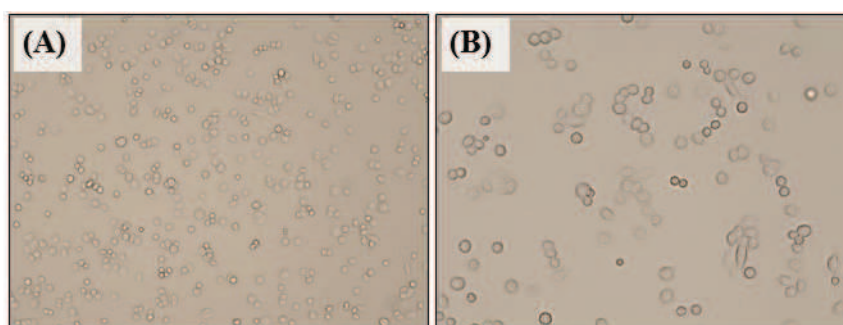


Figura 15. Fotomicrografias das células tumorais MDA-MB-468. As imagens evidenciam a morfologia da linhagem de origem epitelial glandular, mostrando células arredondadas que formam colônias do tipo “cacho de uva”. (A) Aumento aproximado de 100×. (B) Aumento aproximado de 400×.

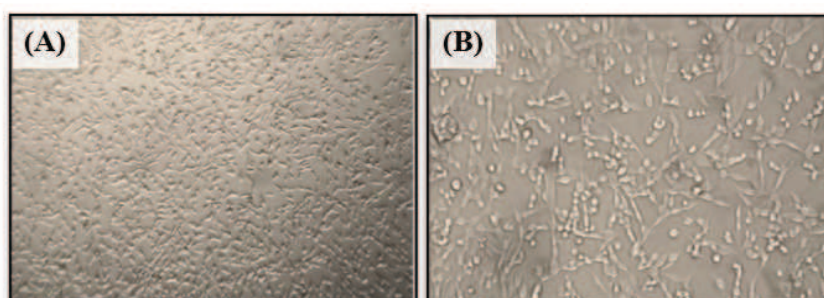


Figura 16. Fotomicrografias das células tumorais MDA-MB-231. As imagens evidenciam a morfologia da linhagem de origem epitelial glandular, mostrando células arredondadas levemente fusiformes. (A) Aumento aproximado de 100×. (B) Aumento aproximado de 400×.

2. Ensaio de Viabilidade Celular – Linhagem MDA-MB-468

A viabilidade celular foi realizada com diferentes concentrações de melatonina, para definir a melhor dose a ser utilizada nos experimentos subsequentes. Os resultados obtidos mostraram que as concentrações de 0,01, 0,1 e 1 mM reduziram significativamente a viabilidade celular, e a concentração de 1 mM apresentou a menor taxa de viabilidade (Figura 17), sendo esta selecionada para os experimentos seguintes.

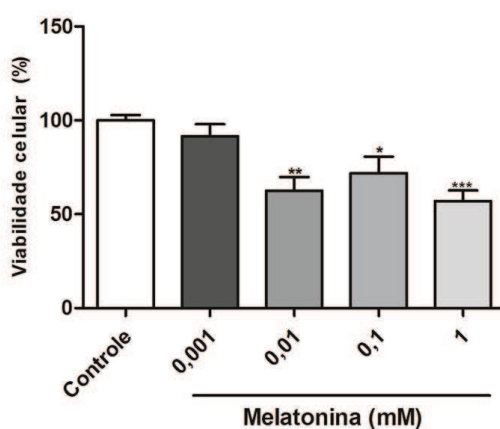


Figura 17. Ensaio de MTT para verificação da viabilidade das células tumorais MDA-MB-468, após o tratamento com melatonina durante 48 horas. Os resultados expressam a média \pm o Erro Padrão da Média (S.E.M.) (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ versus controle).

3. PCR Array e Escolha do miRNA Candidato

Os resultados demonstram que a melatonina aumentou significativamente a expressão de seis miRNAs e diminuiu significativamente a expressão de sete miRNAs. Foram considerados superexpressos aqueles que obtiveram valores de expressão relativa (*fold change*) maiores que um, e subexpressos aqueles com *fold change* menores que um (Figura 18 e Tabela 1).

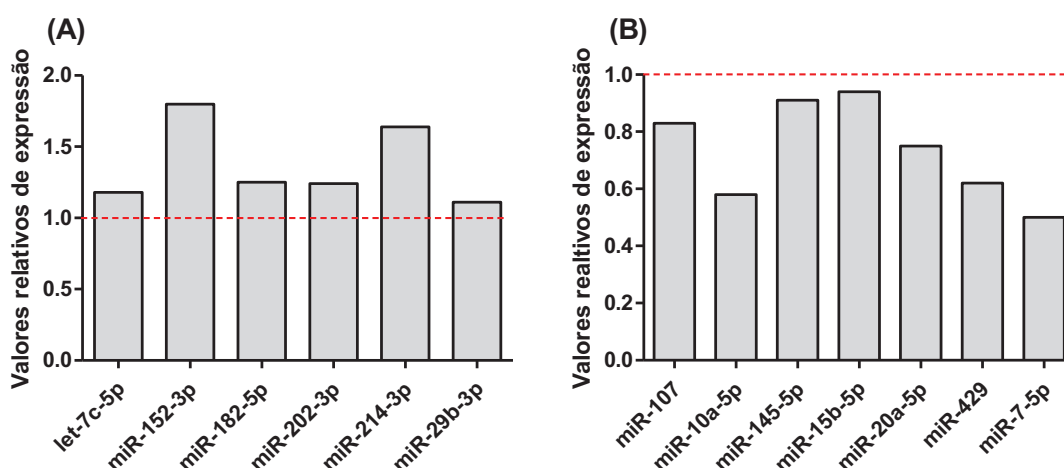


Figura 18. Efeito da melatonina (1 mM) na expressão de miRNAs na linhagem MDA-MB-468. O perfil de miRNAs, tratados ou não com melatonina, foi realizado utilizando a placa *RT² ProfilerTM PCR Array Human Breast Cancer* que contém 84 miRNAs relacionados com o câncer de mama. **(A)** miRNAs superexpressos após tratamento com melatonina. **(B)** miRNAs subexpressos após tratamento com melatonina. Os resultados demonstram a média \pm S.E.M. de três ensaios independentes realizados em triplicata. ($p < 0,05$ versus controle).

Tabela 1. miRNAs diferencialmente expressos após tratamento com melatonina.

miRNAs superexpressos	<i>Fold change</i>	Valor de p*	miRNAs subexpressos	<i>Fold change</i>	Valor de p*
hsa-let-7c-5p	1,18	0,023	hsa-miR-107	0,83	0,007
hsa-miR-152-3p	1,80	0,019	hsa-miR-10a-5p	0,58	0,047
hsa-miR-182-5p	1,25	0,013	hsa-miR-145-5p	0,91	0,039
hsa-miR-202-3p	1,24	0,024	hsa-miR-15b-5p	0,94	0,011
hsa-miR-214-3p	1,64	0,034	hsa-miR-20a-5p	0,75	0,041
hsa-miR-29b-3p	1,11	0,041	hsa-miR-429	0,62	0,003
			hsa-miR-7-5p	0,50	0,026

*Valores de p quando comparado grupo controle com grupo tratado com 1 mM de melatonina ao grupo controle.

Dentre os miRNAs diferencialmente expressos, o miR-152-3p foi escolhido para as próximas etapas de validação por apresentar *fold change* $> 1,5$ (1,80) e relevância científica nos estudos de câncer de mama e papel no processo angiogênico.

O miR-152-3p é um supressor tumoral que regula os genes *IGF-1R*, *HIF-1 α* e *VEGF*, e o tratamento com melatonina foi capaz de aumentar a sua expressão gênica. A escolha do miRNA foi baseada em sua ação no câncer de mama e em seus genes-alvo. O quadro 4 resume a ação do miRNA escolhido e indica a possível regulação da melatonina sobre seus genes-alvo.

Quadro 4. miRNA e seus genes-alvo.

Ação	Processo tumoral*	Melatonina
Supressor tumoral	\downarrow miR-152-3p \uparrow <i>IGF-1R</i> , \uparrow <i>HIF-1α</i> e \uparrow <i>VEGF</i>	\uparrow miR-152-3p \downarrow <i>IGF-1R</i> , \downarrow <i>HIF-1α</i> e \downarrow <i>VEGF</i>

*Fonte: Xu et al.⁽³⁸⁾

4. PCR em Tempo Real (qPCR)

Em seguida, devido à possibilidade da ocorrência de resultados falsos positivos e com a finalidade de validar os dados obtidos pelo PCR *Array*, foram realizadas investigações independentes por qPCR do miRNA selecionado. Para avaliar a modulação do miR-152-3p pela melatonina, células MDA-MB-468 foram transfectadas com o reagente *miRVana Mimics* para a indução da sua superexpressão. Em concordância com os dados do PCR *Array*, observamos que nas células tratadas com melatonina mostraram aumento nos níveis gênicos do miR-152-3p na linhagem MDA-MB-468. A avaliação da expressão gênica mostra que a superexpressão do miR-152-3p é influenciada tanto pela melatonina quanto pela superexpressão do miR-152-3p (Figura 19). Além disso, a melatonina e o *mimic* aumentam a expressão gênica dos genes-alvo *IGF-1R*, *HIF-1 α* e *VEGF* na linhagem MDA-MB-468 (Figura 20).

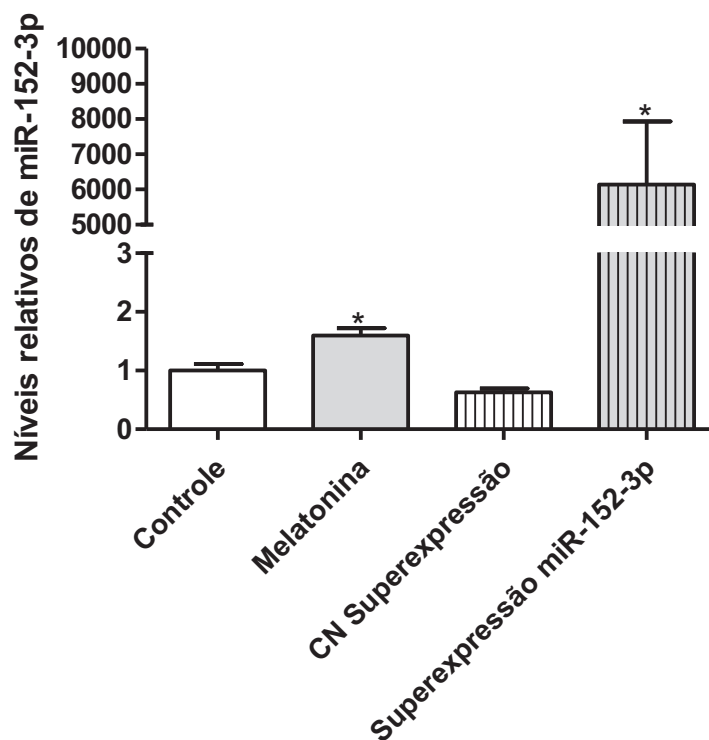


Figura 19. Células MDA-MB-468 transfectadas com *Mimic* miR-152-3p e submetidas ao tratamento com melatonina (1 mM) durante 24 horas. A melatonina e a transfecção aumentam a expressão do miRNA (* $p < 0,05$ versus controle) (CN: Controle Negativo).

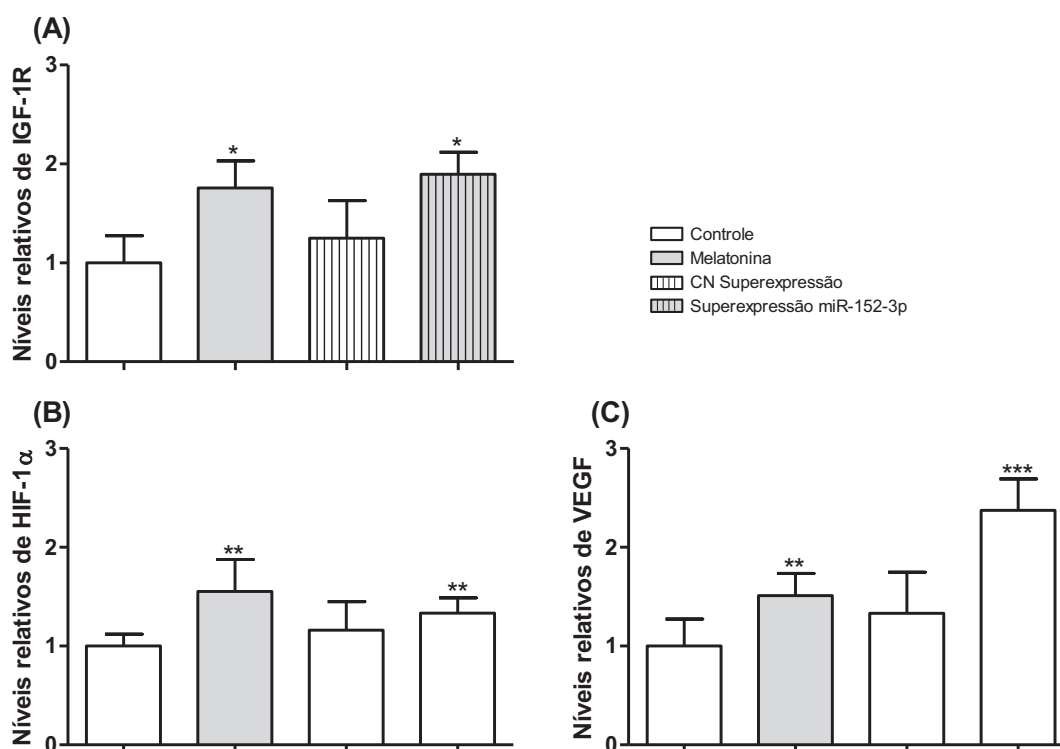


Figura 20. Expressão gênica de *IGF-1R*, *HIF-1 α* e *VEGF* por PCR em tempo real em células MDA-MB-468 tratadas ou não com melatonina 1mM. A melatonina e o a superexpressão do miR-152-3p aumentam a expressão dos genes-alvo: *IGF-1R* (A), *HIF-1 α* (B) e *VEGF* (C) (* $p < 0,05$, ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$ versus controle) (CN: Controle Negativo).

A ação da melatonina também foi avaliada nos miRNAs pertencentes a família 148/152, miR-148a-3p (Figura 21A) e miR-148b-3p (Figura 21B), na linhagem MDA-MB-468, demonstrando que esse hormônio também aumenta a expressão desses miRNAs.

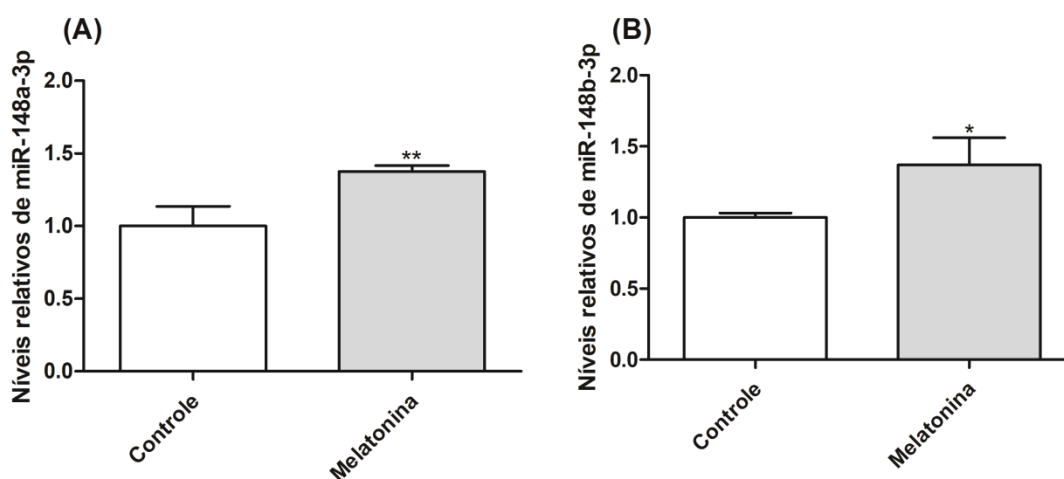


Figura 21. Células MDA-MB-468 submetidas ao tratamento com melatonina (1 mM) durante 24 horas. A melatonina aumenta a expressão dos miRNAs miR-148a-3p (A) e miR-148b-3p (B) (* $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ versus controle).

Para complementar os resultados encontrados com a linhagem MDA-MB-468, o miR-152-3p também foi investigado na linhagem MDA-MB-231. A transfecção aumenta a expressão do miRNA, porém a melatonina não modula o mesmo (Figura 22), e ainda, esse hormônio diminui a expressão dos genes-alvo *IGF-1R*, *HIF-1 α* e *VEGF* (Figura 23A-C).

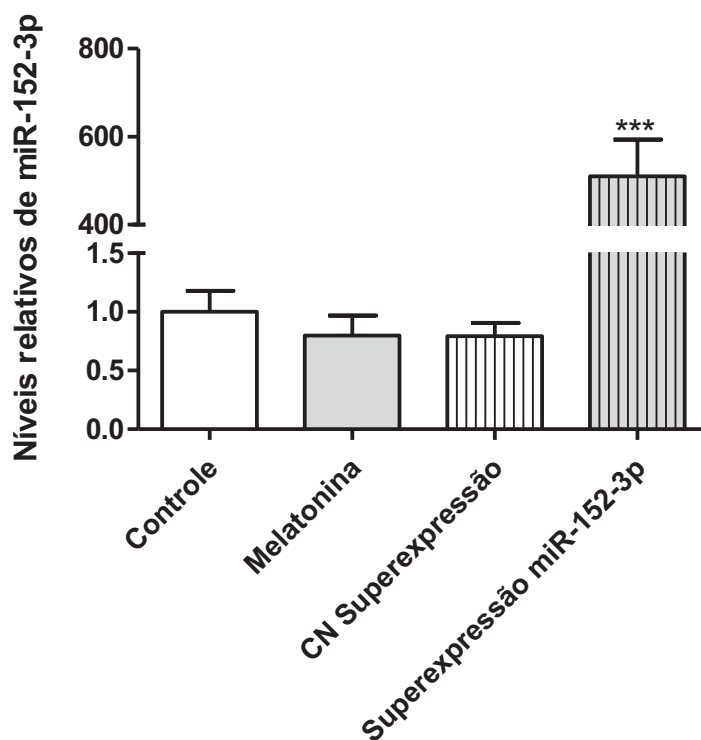


Figura 22. Células MDA-MB-231 transfectadas com *Mimic* miR-152-3p e submetidas ao tratamento com melatonina (1 mM) durante 24 horas. A melatonina não aumenta a expressão do miRNA, enquanto a transfecção aumenta (***) $p < 0,001$ versus controle) (CN: Controle Negativo).

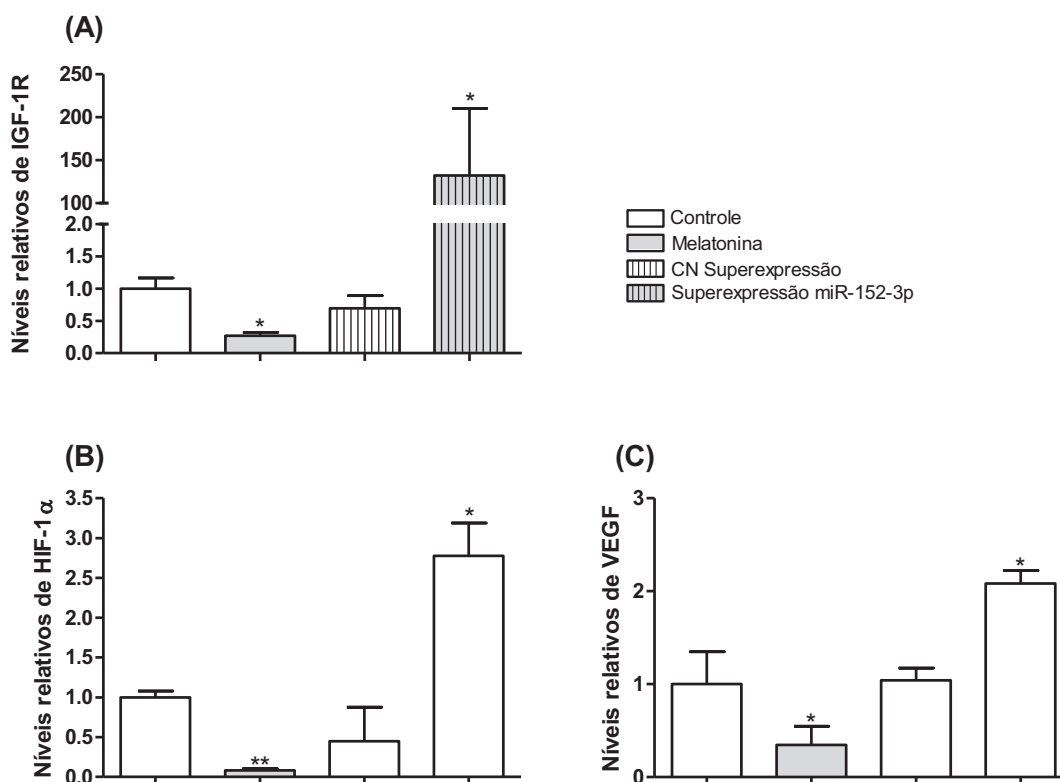


Figura 23. Expressão gênica de *IGF-1R*, *HIF-1 α* e *VEGF* por PCR em tempo real em células MDA-MB-231 tratadas ou não com 1mM de melatonina. A melatonina diminui a expressão dos genes-alvo e o reagente *mimic* aumenta a expressão dos mesmos: *IGF-1R* (A), *HIF-1 α* (B) e *VEGF* (C) (* $p < 0,05$ e ** $p < 0,001$ versus controle) (CN: Controle Negativo).

5. Imunocitoquímica

A quantificação relativa das proteínas dos genes-alvo *IGF-1R*, *HIF-1 α* e *VEGF* por imunocitoquímica demonstra que o tratamento com melatonina e a superexpressão do miR-152-3p diminuem a expressão proteica dos alvos IGF-1R, HIF-1 α e VEGF, para as linhagens MDA-MB-468 (Figuras 24 e 25) e MDA-MB-231 (Figuras 26 e 27).

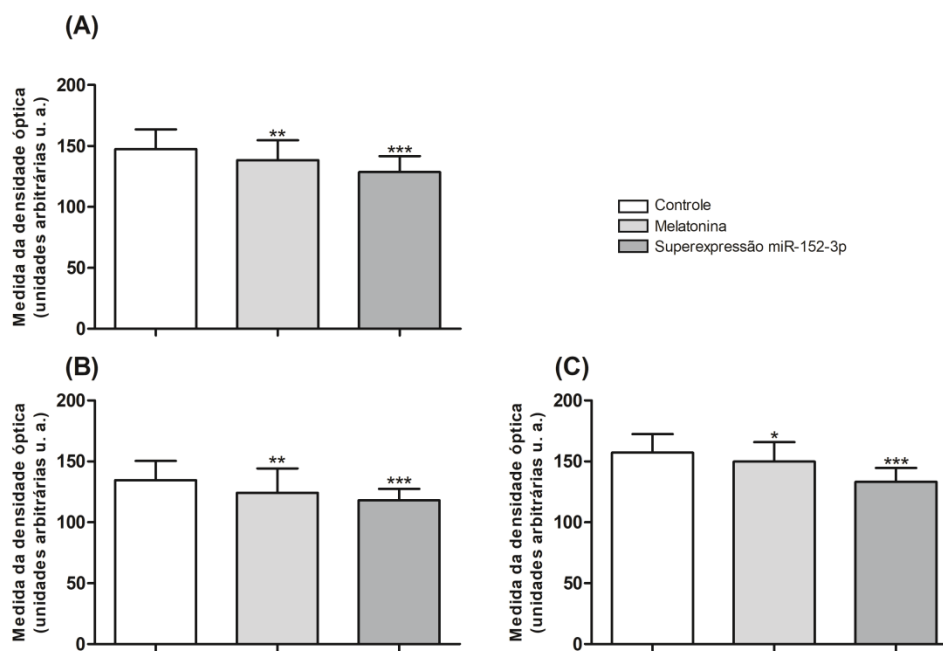


Figura 24. Expressão proteica de IGF-1R, HIF-1 α e VEGF por imunocitoquímica em células MDA-MB-468. As células foram transfectadas com *Mimic* miR-152-3p e submetidas ou não tratamento com melatonina (1 mM) durante 24 horas. A melatonina e a superexpressão do miR-152-3p diminuem a expressão proteica do IGF-1R (A), HIF-1 α (B) e VEGF (C). O valor da expressão proteica foi quantificado pelo programa *ImageJ* e a intensidade de marcação dos alvos observada foi obtida utilizando teste estatístico *t* de *Student* (*p<0,5, **p<0,01 e ***p<0,001 versus controle).

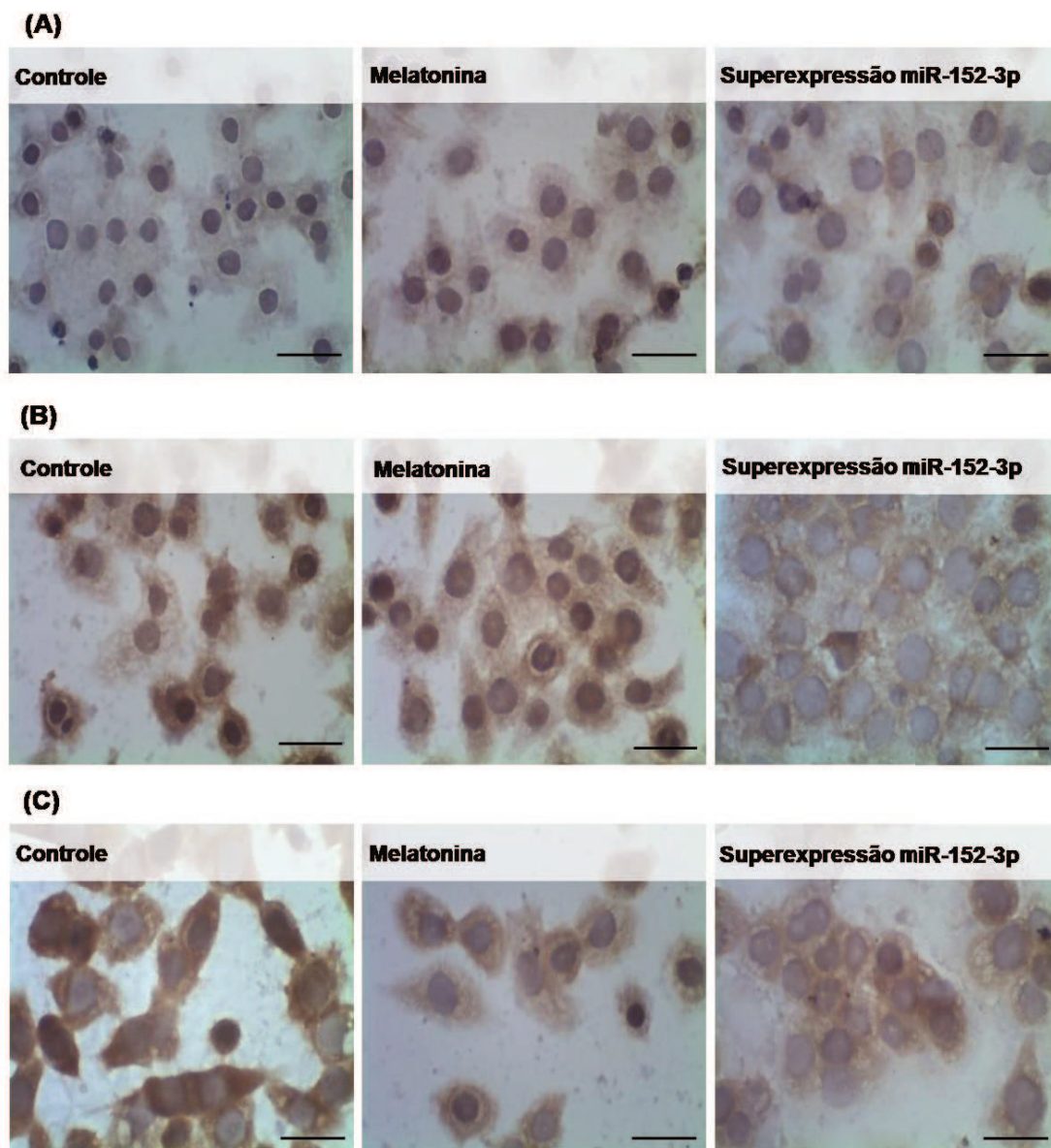


Figura 25. Fotomicrografias do procedimento imunocitoquímico realizado em células MDA-MB-468. As células foram tratadas ou não com melatonina (1 mM) e transfectadas com o *Mimic* miR-152-3p. Os anticorpos anti-IGF-1R (A), anti-HIF-1 α (B) e anti-VEGF (C) foram utilizados. As imagens demonstram uma forte marcação no grupo controle dos alvos e fraca nos grupos melatonina e superexpressão miR-152-3p. Aumento: 40 \times . Barra: 20 μ m.

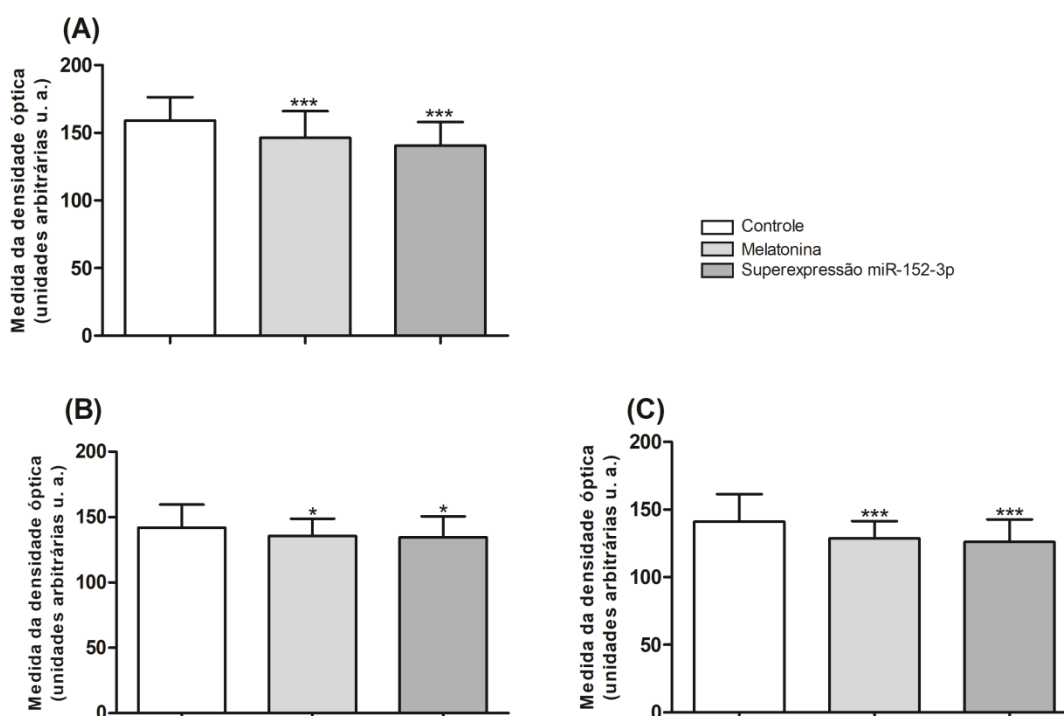


Figura 26. Expressão proteica de IGF-1R, HIF-1 α e VEGF por imunocitoquímica em células MDA-MB-231. As células foram transfectadas com *Mimic* miR-152-3p e tratadas ou não com melatonina (1 mM) durante 24 horas. A melatonina e a superexpressão do miR-152-3p diminuem a expressão proteica dos genes-alvo IGF-1R (A), HIF-1 α (B) e VEGF (C). O valor da expressão proteica foi quantificado pelo programa *ImageJ* e a intensidade de marcação dos alvos observada foi obtida utilizando teste estatístico *t* de *Student* (* $p < 0,5$ e *** $p < 0,001$ versus controle).

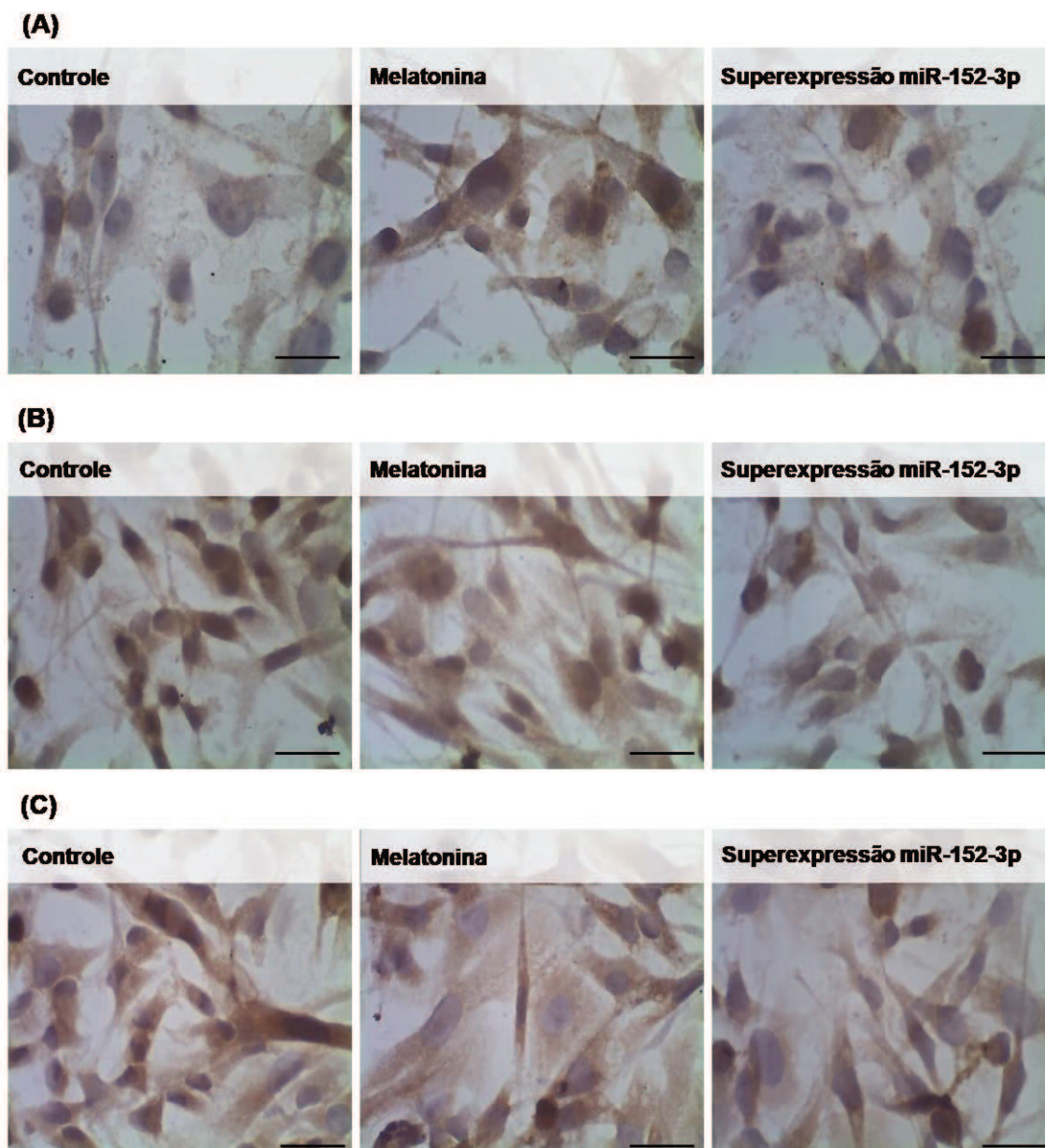


Figura 27. Fotomicrografias do procedimento imunocitoquímico realizado em células MDA-MB-231. As células foram tratadas ou não com melatonina (1 mM) e transfectadas com o *Mimic* miR-152-3p. Os anticorpos anti-IGF-1R (A), anti-HIF-1 α (B) e anti-VEGF (C) foram utilizados. As imagens demonstram uma forte marcação no grupo controle dos alvos e fraca nos grupos melatonina e superexpressão miR-152-3p. Aumento: 40 \times . Barra: 20 μ m.

IV. DISCUSSÃO

IV. DISCUSSÃO

Nossos resultados demonstram o potencial terapêutico da melatonina no controle da angiogênese, na regulação gênica pós-transcricional através do aumento da expressão do miR-152-3p em células da linhagem MDA-MB-468, uma linhagem celular de câncer de mama triplo-negativo (TNBC). Já na linhagem triplo-negativa MDA-MB-231, a melatonina também regulou a angiogênese, através da diminuição da expressão gênica e proteica dos alvos IGF-1R, HIF-1 α e VEGF, porém independente do miR-152-3p. Demonstramos que esse hormônio age regulando miRNAs e genes relacionados à angiogênese em células de câncer de mama triplo-negativo.

Apesar da baixa expressão de receptores MT1 em tumores triplo-negativos,⁽¹²²⁾ a ação protetora da melatonina já foi estudada, sendo que nosso grupo de pesquisa identificou que em concentrações maiores que a fisiológica, a melatonina consegue ter ações antitumorais, como a diminuição da proliferação celular, angiogênese e metástase, em células MDA-MB-231 e MCF-7.^(35,93,123,124) Neste presente estudo, a melatonina diminui a viabilidade celular da linhagem MDA-MB-468 na concentração de 1mM. Corroborando nossos resultados, outros estudos mostraram que 1 mM foi capaz de diminuir a proliferação de células MDA-MB-231^(93,125) e em contra partida, este hormônio não foi capaz de diminuir esse processo em MDA-MB-435, células altamente metastáticas.⁽¹²⁵⁾ Além disso, Hill et al. (2009)⁽¹²⁶⁾ identificaram que 1nM (concentração fisiológica) já seria capaz de diminuir a proliferação das células MDA-MB-468. Porém como não há outros estudos utilizando doses farmacológicas na linhagem MDA-MB-468, a dose 1mM foi utilizada para todos os experimentos. Isso define um possível uso desta substância como adjuvante na terapia do câncer de mama triplo-negativo pela utilização de concentrações maiores que a fisiológica.

Os tumores triplo-negativos se caracterizam por possuírem opções de tratamento limitadas, gerando um prognóstico ruim e alta mortalidade do hospedeiro.⁽¹⁸⁾ Essa linhagem já foi utilizada em estudos relacionados à transição epitelial mesenquimal (EMT).⁽¹²⁷⁾ Além disso, algumas substâncias foram investigadas nesta linhagem celular como a (Boc)2-creatina e metformina na relação ATP / AMP que diminuiu a viabilidade celular;⁽¹²⁸⁾ a leptina promovendo a EMT nas células de câncer de mama,⁽¹²⁹⁾ MT3-037 (medicamento em estudo) e o sunitinib que inibiram a angiogênese.^(75,76) Não há estudos que investigaram a ação da melatonina atuando em miRNAs em células MDA-MB-468.

Neste estudo constatamos que miRNAs são modulados pela melatonina na linhagem celular MDA-MB-468. Os miRNAs que estão pouco expressos nos tumores, possuem função de supressores tumorais, pois estão envolvidos na inativação de oncogenes, e assim os que estão fortemente expressos possuem funções de oncomiRs, por estarem envolvidos no bloqueio de genes supressores tumorais.⁽⁶⁷⁾ No geral, a melatonina aumentou a expressão de miRNAs que são pouco expressos e aqueles que o hormônio diminuiu são fortemente expressos. A melatonina aumentou os miRNAs considerados supressores tumorais let-7c, miR-152, miR-214, miR-29b, e também diminuiu os considerados oncomiRs miR-107, miR-10a, miR-15b, miR-20a, que estão alterados nos tumores mamários. Estes miRNAs regulam os genes promotores / inibidores da proliferação celular, indutores da apoptose, migração celular e metástase, angiogênese e tumorigênese.^(111,132-138) Apesar da escassez de trabalhos relacionando miRNAs e melatonina, nosso estudo corrobora a literatura, uma vez que esse hormônio atuou inibindo oncomiRs, como o miR-155 em células de glioma⁽¹⁰²⁾ e o miR-24 em células de câncer de cólon e mama (MCF-7).⁽¹⁰³⁾ Nestes casos, essa modulação causou a diminuição do crescimento tumoral, proliferação celular e invasão.

Alguns resultados alcançados no *array* foram inesperados. No nosso estudo, a melatonina aumentou a expressão do mir-182 que é considerado um oncomiR, que age incentivando a progressão no câncer de mama.⁽¹³⁹⁾ Além disso, esse hormônio diminuiu o miR-7, o miR-145 e o miR-429, considerados supressores tumorais⁽¹⁴⁰⁻¹⁴²⁾ e o biomarcador miR-202.⁽¹⁴³⁾ De acordo com esses resultados e em discordância com os nossos resultados finais, a ação da melatonina na modulação de miRNAs pode nem sempre ser positiva, no entanto, não podemos confirmar uma ação negativa desse hormônio, visto que o estudo não abrange todos os miRNAs desregulados por ela e nem seus possíveis alvos que demonstrariam a ação final desse hormônio, e sim propor que a melatonina e miRNAs podem atuar de formas diferentes em células e tumores podendo regular diversos genes.⁽⁹⁷⁾ Os miRNAs são moléculas muito complexas, além de um miRNA ser capaz de regular inúmeros genes e vias de sinalização,⁽⁶⁹⁾ eles podem ainda ser regulados por diversos genes⁽¹⁴⁴⁾ e substâncias. Os mecanismos moleculares desencadeados pela melatonina permanecem desconhecidos, ainda não foram identificados denominadores comuns de suas ações em tecidos tumorais e por isso suas ações em miRNAs podem ser consideradas um epifenômeno devido aos desregulamentos gerais em sua formação envolvendo enzimas da biogênese DROSHA / DICER. Assim, a melatonina precisa ser estudada em diversos miRNAs e tipos tumorais para determinar o seu papel na regulação destes. Nossos resultados indicam alto poder modulatório da melatonina, porém estudos específicos necessitam ser realizados para identificar a ação desse hormônio em miRNAs e seus genes-alvo, pois estas moléculas possuem atividades complexas e precisam ser melhor entendidas.

São diversos os mecanismos de ação identificados dos miRNAs, porém como já explicado essas moléculas atuam principalmente em nível pós-transcricional, regulando

genes. Finalmente a literatura mostra que esse hormônio pode atuar inibindo miRNAs em nível pós-transcricional, modulando a expressão proteica sem alterar a expressão gênica dos genes-alvo.⁽¹⁰³⁾ Apontamos que a melatonina foi capaz de aumentar a expressão do candidato mir-152 na linhagem celular MDA-MB-468, porém não o modulou na linhagem MDA-MB-231, demonstrando que os miRNAs podem ser regulados de formas diferentes em linhagens celulares de mesmo perfil fenotípico. Mesmo não modulando o miRNA-152, a melatonina foi capaz de controlar a angiogênese na linhagem MDA-MB-231, pois os níveis proteicos dos genes-alvo foram diminuídos, sugerindo uma caminho independente do miRNA nessa linhagem. No processo de angiogênese, os miRNAs atuam regulando a expressão de genes, vinculando-se aos seus potenciais alvos complementares, induzindo ou reduzindo a formação de novos vasos sanguíneos tumorais.⁽¹⁴⁵⁾ O miR-152 diminuído tem sido associado ao processo de proliferação celular, invasão e angiogênese, em diferentes neoplasias como mama,⁽¹⁴⁶⁾ hepatocarcinoma,⁽¹⁴⁵⁾ ovário⁽¹⁰⁸⁾ e gástrico.⁽¹⁴⁷⁾

Vários estudos conferem à melatonina a inibição da angiogênese, por diminuição dos genes relacionados a este processo. A melatonina inibiu a angiogênese em co-culturas de células endoteliais humanas (HUVECs) e câncer de mama (MCF-7).⁽¹⁴⁸⁻¹⁵⁰⁾ Devido à ampla expressão dos receptores MT1 e MT2 nas células endoteliais, a melatonina demonstrou inibir diretamente a formação de fatores endoteliais nas células RE+; além disso, esta substância foi estudada em células RE.⁽¹⁵¹⁾ Já foi demonstrado pelo nosso grupo que a melatonina regula proteínas angiogênicas na linhagem celular MDA-MB-231 e na co-cultura com fibroblastos associados ao câncer.⁽¹²⁴⁾ Esse hormônio também regula a angiogênese sob hipóxia nas células MCF-7 e MDA-MB-231⁽³⁵⁾ e diminui a expressão de genes relacionados a este processo em células MDA-

MB-231 e MCF-7 em cultura tridimensional.⁽¹²³⁾ Assim, os genes relacionados a este processo podem ser regulados por vários mecanismos e moléculas, incluindo miRNAs⁽¹⁴⁴⁾ e melatonina.⁽¹⁵²⁾

Por causa do papel fundamental do IGF-1R, HIF-1 α e VEGF no processo de angiogênese, escolhemos esses alvos para verificar a ação da melatonina. Estes alvos estão altamente expressos em TNBC em comparação com tumores não TNBC.⁽¹⁵³⁾ Nos genes-alvo da família 148/152, IGF-1R, HIF-1 α e VEGF, a melatonina diminuiu a expressão proteica, sugerindo uma função pós-transcricional deste hormônio. Esses genes estão envolvidos com o processo de angiogênese.^(29,38,104) A ativação da via de sinalização de IGF-1R promove a proliferação, sobrevivência e metástase de células de câncer de mama. Quando este receptor está bloqueado, também pode bloquear a expressão de HIF-1 α e VEGF.⁽³⁸⁾ Sob condições de hipoxia, o HIF-1 α é estimulado e a sua degradação é bloqueada, este se move para o núcleo, onde estimulará a expressão de vários genes que contribuem para a progressão do tumor, como o VEGF.⁽⁸⁴⁾ O VEGF é amplamente produzido em tumores, gerando uma vasta e caótica rede vascular. Esta expressão elevada é capaz de formar novos vasos em uma vasculatura quiescente, através de uma vasodilatação inicial, permeabilidade vascular de capilares pré-existentes. O extravasamento das proteínas plasmáticas ocorre, estabelecendo uma matriz onde as células endoteliais migram.⁽²⁹⁾

Já foi descrito em nosso grupo que a melatonina atua em genes relacionados à angiogênese, como HIF-1 α e VEGF em células de câncer de mama MCF-7 e MDA-MB-231 em condições hipóxicas.⁽³⁵⁾ Em outro estudo, nosso grupo identificou que o hormônio aumenta a expressão de IGF-1R em MDA-MB-231 quando relacionado ao processo apoptótico.⁽¹²³⁾ No entanto, não há estudos sobre a modulação da melatonina

em IGF-1R e angiogênese. Apesar do aumento da expressão gênica de IGF-1R, HIF-1 α e VEGF, ocasionado pela melatonina, esse hormônio aumentou o miR-152-3p, fundamental para o processo de angiogênese. Além disso, Tahiri et al. (2018)⁽¹⁵⁴⁾ definem que de acordo com a ação dos miRNAs, este pode levar a degradação do RNA mensageiro, gerando uma correlação negativa entre miRNA e RNAm do alvo. Se o miRNA inibe pós-transcricional, pode não ser observadas correlações negativas entre o miRNA e o RNAm do alvo. A alta expressão de miR-152-3p está relacionada à inibição da expressão de IGF-1R através da sua ligação à região 3'-UTR, levando ao bloqueio da expressão de HIF-1 α e VEGF.⁽³⁸⁾ Nossos resultados corroboram os de Xu e colaboradores,⁽³⁸⁾ uma vez que a alta expressão de miR-152 nas células MDA-MB-468 levou a uma diminuição na expressão proteica dos genes IGF-1R, HIF-1 α e VEGF. Estes resultados sugerem que a melatonina atua diminuindo o HIF-1 α e o VEGF pela regulação do IGF-1R na linhagem MDA-MB-231, e na linhagem MDA-MB-468 atua pelo mesmo processo, porém aumentando o miR-152. Os autores demonstraram o aumento desses genes pelo miR-152 nas células MCF-10a, MCF-7, T47D e MDA-MB-231. Embora este miRNA seja descrito como um supressor tumoral em diferentes linhagens de células tumorais,⁽¹¹¹⁾ é inédita sua ação nas células MDA-MB-468.

V. CONCLUSÕES

V. CONCLUSÕES

O presente trabalho permite concluir que:

- O tratamento com melatonina na dose de 1 mM é eficiente em diminuir a viabilidade da linhagem celular MDA-MB-468;
- A melatonina aumenta a expressão de seis miRNAs e diminui a expressão de sete miRNAs na linhagem celular MDA-MB-468;
- A melatonina aumenta a expressão do miR-152-3p na linhagem MDA-MB-468, porém não tem efeito sobre o mesmo na linhagem MDA-MB-231;
- A melatonina e a superexpressão do miR-152-3p diminuíram a expressão proteica dos alvos IGF-1R, HIF-1 α e VEGF nas linhagens MDA-MB-468 e MDA-MB-231.

Assim sugerimos que a ação da melatonina na linhagem MDA-MB-468, se dê através no aumento do miR-152-3p, o que ocasiona a inibição pós-transcricional dos alvos IGF-1R, HIF-1 α e VEGF. Já na linhagem MDA-MB-231, sugerimos ação da melatonina na diminuição de genes e proteínas dos alvos IGF-1R, HIF-1 α e VEGF.

A melatonina foi capaz de modular a expressão do miR-152-3p e seus genes-alvo envolvidos com a angiogênese no câncer de mama. Portanto, este estudo confirma a ação da melatonina no importante evento celular de angiogênese, processo determinante para a progressão da doença, e ainda indicá-la como potencial terapêutico para o câncer de mama triplo-negativo.

VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Instituto Nacional do Câncer. Câncer de mama [Internet]. 2016 [cited 2017 Dec 6]. Available from: http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/mama/cancer_mama++.
2. Hagrass HA, Sharaf S, Pasha HF, Tantawy EA, Mohamed RH, Kassem R. Circulating microRNAs - a new horizon in molecular diagnosis of breast cancer. *Genes Cancer* [Internet]. 2015;6(5–6):281–7. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4482248&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
3. Instituto Nacional do Câncer. Estimativa 2018 [Internet]. 2018 [cited 2018 Feb 26]. Available from: <http://www1.inca.gov.br/estimativa/2018/estimativa-2018.pdf>.
4. McGuire A, Brown JAL, Kerin MJ. Metastatic breast cancer: the potential of miRNA for diagnosis and treatment monitoring. *Cancer Metastasis Rev* [Internet]. 2015;34(1):145–55. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10555-015-9551-7>.
5. Cirqueira MB, Amaral M, Moreira R, Soares LR, Freitas-Júnior R. Palavras-chave Neoplasias da mama Classificação Imunoistoquímica Prognóstico. [cited 2017 Dec 14];74645–140. Available from: <http://files.bvs.br/upload/S/0100-7254/2011/v39n10/a2965.pdf>.
6. Sotiriou C, Neo S-Y, McShane LM, Korn EL, Long PM, Jazaeri A, et al. Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2003 Sep 2 [cited 2017 Dec 14];100(18):10393–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12917485>.
7. Kennecke H, Yerushalmi R, Woods R, Cheang MCU, Voduc D, Speers CH, et al. Metastatic Behavior of Breast Cancer Subtypes. *J Clin Oncol* [Internet]. 2010 Jul 10 [cited 2017 Dec 14];28(20):3271–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20498394>.
8. Cheang MCU, Chia SK, Voduc D, Gao D, Leung S, Snider J, et al. Ki67 Index, HER2 Status, and Prognosis of Patients With Luminal B Breast Cancer. *JNCI J Natl Cancer Inst* [Internet]. 2009 May 20 [cited 2017 Dec 14];101(10):736–50. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19436038>.
9. Sørlie T, Tibshirani R, Parker J, Hastie T, Marron JS, Nobel A, et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2003 Jul 8 [cited 2017 Dec 14];100(14):8418–23. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12829800>.
10. Cianfrocca M, Goldstein LJ. Prognostic and Predictive Factors in Early-Stage

- Breast Cancer. *Oncologist* [Internet]. 2004 Nov 1 [cited 2017 Dec 14];9(6):606–16. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15561805>.
11. Irvin WJ, Carey LA. What is triple-negative breast cancer? *Eur J Cancer* [Internet]. 2008 Dec [cited 2017 Dec 14];44(18):2799–805. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19008097>.
 12. Cheang MCU, Voduc D, Bajdik C, Leung S, McKinney S, Chia SK, et al. Basal-Like Breast Cancer Defined by Five Biomarkers Has Superior Prognostic Value than Triple-Negative Phenotype. *Clin Cancer Res* [Internet]. 2008 Mar 1 [cited 2017 Dec 14];14(5):1368–76. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18316557>.
 13. Herschkowitz JI, Simin K, Weigman VJ, Mikaelian I, Usary J, Hu Z, et al. Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. *Genome Biol* [Internet]. 2007 [cited 2017 Dec 14];8(5):R76. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17493263>.
 14. Prat A, Parker JS, Karginova O, Fan C, Livasy C, Herschkowitz JI, et al. Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Res* [Internet]. 2010 [cited 2017 Dec 14];12(5):R68. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20813035>.
 15. Carlos A, Dornellas De Barros S, Ramos K, Leite M. Classificação molecular dos carcinomas de mama: uma visão contemporânea Molecular classification of breast cancer: a contemporary view. [cited 2018 Jan 30]; Available from: http://www.rbmastologia.com.br/wp-content/uploads/2015/12/MAS-v25n4_146-155.pdf.
 16. FONTE MEDICINA DIAGNÓSTICA. IMUNO-HISTOQUÍMICA | FONTE MEDICINA DIAGNÓSTICA [Internet]. 2018 [cited 2018 Feb 26]. Available from: <http://fontemd.com/exames/imuno-histoquimica/>.
 17. Stovgaard ES, Nielsen D, Hogdall E, Balslev E. Triple negative breast cancer – prognostic role of immune-related factors: a systematic review. *Acta Oncol (Madr)* [Internet]. 2017 Nov 23 [cited 2017 Nov 28];1–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29168430>.
 18. Seiffert K, Schmalfeldt B, Müller V, Therapieansätze N, Subtypen D, Hormon-ZT. Zielgerichtete Therapie des Mammakarzinoms Einführung Zielgerichtete Therapie des HER2-. *Dtsch med Wochenschr*. 2017;142(22):1669–75.
 19. Karamysheva AF. Mechanisms of angiogenesis. *Biochemistry (Mosc)* [Internet]. 2008 Jul [cited 2017 Dec 14];73(7):751–62. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18707583>.
 20. Crawford Y, Ferrara N. VEGF inhibition: insights from preclinical and clinical studies. *Cell Tissue Res* [Internet]. 2009 Jan 3 [cited 2017 Dec 14];335(1):261–9. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00441-008-0675-8>.

21. Park W, Amin ARMR, Chen ZG, Shin DM. New perspectives of curcumin in cancer prevention. *Cancer Prev Res (Phila)* [Internet]. 2013 May [cited 2017 Dec 14];6(5):387–400. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23466484>.
22. Semenza GL. HIF-1 and tumor progression: Pathophysiology and therapeutics. *Trends Mol Med*. 2002;8(4 SUPPL.):62–7.
23. Flamant L, Notte A, Ninane N, Raes M, Michiels C. Anti-apoptotic role of HIF-1 and AP-1 in paclitaxel exposed breast cancer cells under hypoxia. *Mol Cancer* [Internet]. 2010 Jul 13 [cited 2017 Dec 14];9(1):191. Available from: <http://molecular-cancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/1476-4598-9-191>.
24. Wang Z, Dabrosin C, Yin X, Fuster MM, Arreola A, Rathmell WK, et al. Broad targeting of angiogenesis for cancer prevention and therapy. *Semin Cancer Biol* [Internet]. 2015;35:S224–43. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.semcancer.2015.01.001>.
25. Li W, Liang R-R, Zhou C, Wu M-Y, Lian L, Yuan G-F, et al. The association between expressions of Ras and CD68 in the angiogenesis of breast cancers. *Cancer Cell Int* [Internet]. 2015 [cited 2017 Nov 9];15(1):17. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25685069>.
26. Boudreau N, Myers C. Breast cancer-induced angiogenesis: multiple mechanisms and the role of the microenvironment. *Breast Cancer Res* [Internet]. 2003 [cited 2017 Dec 14];5(3):140–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12793895>.
27. Tominaga N, Katsuda T, Ochiya T. Micromanaging of tumor metastasis by extracellular vesicles. *Semin Cell Dev Biol* [Internet]. 2015 Apr [cited 2017 Dec 14];40:52–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25746922>.
28. Cappellari O, Cossu G. Pericytes in Development and Pathology of Skeletal Muscle. *Circ Res* [Internet]. 2013 Jul 19 [cited 2018 Jan 30];113(3):341–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23868830>.
29. Bergers G, Benjamin LE. Angiogenesis: Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer* [Internet]. 2003;3(6):401–10. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nrc1093>.
30. Gerhardt H, Golding M, Fruttiger M, Ruhrberg C, Lundkvist A, Abramsson A, et al. VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *J Cell Biol* [Internet]. 2003 Jun 23 [cited 2018 Jan 30];161(6):1163–77. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12810700>.
31. Castañeda-Gill J, Vishwanatha J. Antiangiogenic mechanisms and factors in breast cancer treatment. *J Carcinog* [Internet]. 2016;15(1):1. Available from: <http://www.carcinogenesis.com/text.asp?2016/15/1/1/176223>.
32. Samani AA, Yakar S, LeRoith D, Brodt P. The Role of the IGF System in Cancer Growth and Metastasis: Overview and Recent Insights. *Endocr Rev* [Internet].

- 2007 Feb [cited 2017 Dec 14];28(1):20–47. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16931767>.
33. Rahimi N. The Ubiquitin-Proteasome System Meets Angiogenesis. *Mol Cancer Ther* [Internet]. 2012 Mar 1 [cited 2018 Jan 20];11(3):538–48. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22357635>.
 34. Danza K, Summa S De, 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* [Internet]. 2015;6(1):471–83. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4381608/>.
 35. Jardim-Perassi BV, Lourenço MR, Doho GM, Grígolo IH, Gelaleti GB, Ferreira LC, et al. Melatonin Regulates Angiogenic Factors under Hypoxia in Breast Cancer Cell Lines. *Anticancer Agents Med Chem* [Internet]. 2016 [cited 2017 Nov 9];16(3):347–58. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25963143>.
 36. Motallebnezhad M, Aghebati-Maleki L, Jadidi-Niaragh F, Nickho H, Samadi-Kafil H, Shamsasenjan K, et al. The insulin-like growth factor-I receptor (IGF-IR) in breast cancer: biology and treatment strategies. *Tumor Biol* [Internet]. 2016;37(9):11711–21. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s13277-016-5176-x>.
 37. Chiu C-J, Conley YP, Gorin MB, Gensler G, Lai C-Q, Shang F, et al. Associations between Genetic Polymorphisms of Insulin-like Growth Factor Axis Genes and Risk for Age-Related Macular Degeneration. *Investig Ophthalmology Vis Sci* [Internet]. 2011 Nov 24 [cited 2018 Jan 10];52(12):9099. Available from: <http://iovs.arvojournals.org/article.aspx?doi=10.1167/iovs.11-7782>.
 38. Xu Q, Jiang Y, Yin Y, Li Q, He J, Jing Y, et al. A regulatory circuit of miR-148a / 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.
 39. Chiu C-J, Conley YP, Gorin MB, Gensler G, Lai C-Q, Shang F, et al. Associations between Genetic Polymorphisms of Insulin-like Growth Factor Axis Genes and Risk for Age-Related Macular Degeneration. *Investig Ophthalmology Vis Sci* [Internet]. 2011 Nov 24 [cited 2018 Jan 29];52(12):9099. Available from: <http://iovs.arvojournals.org/article.aspx?doi=10.1167/iovs.11-7782>.
 40. Carmeliet P, Jain RK. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature*. 2011;473(7347):298–307.
 41. Rundqvist H, Johnson RS. Tumour oxygenation: Implications for breast cancer prognosis. *J Intern Med*. 2013;274(2):105–12.
 42. Karakashev S V., Reginato MJ. Progress toward overcoming hypoxia-induced resistance to solid tumor therapy. *Cancer Manag Res*. 2015;7:253–64.

43. Ke Q., Costa M. Hypoxia-Inducible Factor-1. *Mol Pharmacol*. 2006;70(5):1469–80.
44. Rahimi N. The Ubiquitin-Proteasome System Meets Angiogenesis. *Mol Cancer Ther* [Internet]. 2012 Mar 1 [cited 2018 Feb 7];11(3):538–48. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22357635>.
45. Kristensen T, Knutsson M, Wehland M, Laursen B, Grimm D, Warnke E, et al. Anti-Vascular Endothelial Growth Factor Therapy in Breast Cancer. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2014;15(12):23024–41. Available from: <http://www.mdpi.com/1422-0067/15/12/23024/>.
46. Kieran MW, Kalluri R, Cho Y-J. The VEGF pathway in cancer and disease: responses, resistance, and the path forward. *Cold Spring Harb Perspect Med* [Internet]. 2012 Dec 1 [cited 2018 Jan 30];2(12):a006593. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23209176>.
47. Taneja P, Maglic D, Kai F, Zhu S, Kendig RD, Fry EA, et al. Classical and Novel Prognostic Markers for Breast Cancer and their Clinical Significance. *Clin Med Insights Oncol* [Internet]. 2010 Apr 20 [cited 2018 Jan 30];4:15–34. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20567632>.
48. Stefanini MO, Wu FTH, Mac Gabhann F, Popel AS. A compartment model of VEGF distribution in blood, healthy and diseased tissues. *BMC Syst Biol* [Internet]. 2008 Aug 19 [cited 2018 Jan 30];2:77. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18713470>.
49. Chung AS, Lee J, Ferrara N. Targeting the tumour vasculature: insights from physiological angiogenesis. *Nat Rev Cancer* [Internet]. 2010 Jul 1 [cited 2018 Jan 30];10(7):505–14. Available from: <http://www.nature.com/articles/nrc2868>.
50. Zhu X, Zhou W. The Emerging Regulation of VEGFR-2 in Triple-Negative Breast Cancer. *Front Endocrinol (Lausanne)* [Internet]. 2015 Oct 9 [cited 2018 Feb 7];6:159. Available from: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fendo.2015.00159/abstract>.
51. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* [Internet]. 1993 Dec 3 [cited 2017 Dec 15];75(5):843–54. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8252621>.
52. 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* [Internet]. 2005;353(17):1793–801. Available from: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa050995>.
53. Ma L, Teruya-Feldstein J, Weinberg RA. Tumour invasion and metastasis initiated by microRNA-10b in breast cancer. *Nature* [Internet]. 2007 Oct 11 [cited 2017 Dec 15];449(7163):682–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17898713>.

54. Hao J, Zhao S, Zhang Y, Zhao Z, Ye R, Wen J, et al. Emerging Role of MicroRNAs in Cancer and Cancer Stem Cells. *J Cell Biochem* [Internet]. 2014 Apr 1 [cited 2017 Dec 15];115(4):605–10. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/jcb.24702>.
55. Lauren Kirton. Analysis of miRNA and mRNA associated with Epithelial Mesenchymal Transition [Internet]. 2010 [cited 2018 Jan 29]. Available from: <https://archive.cnx.org/contents/45283c3f-c8cc-4659-94b5-d2faa9c2cf2f@2/analysis-of-mirna-and-mrna-associated-with-epithelial-mesenchymal-transition>.
56. Wu L, Zhou H, Zhang Q, Zhang J, Ni F, Liu C, et al. DNA Methylation Mediated by a MicroRNA Pathway. *Mol Cell* [Internet]. 2010 May 14 [cited 2018 Jan 29];38(3):465–75. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20381393>.
57. Zhang Y, Fan M, Zhang X, Huang F, Wu K, Zhang J, et al. Cellular microRNAs up-regulate transcription via interaction with promoter TATA-box motifs. *RNA* [Internet]. 2014 Dec 1 [cited 2018 Jan 29];20(12):1878–89. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25336585>.
58. Ørom UA, Nielsen FC, Lund AH. MicroRNA-10a Binds the 5'UTR of Ribosomal Protein mRNAs and Enhances Their Translation. *Mol Cell* [Internet]. 2008 May 23 [cited 2018 Jan 29];30(4):460–71. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18498749>.
59. Wightman B, Lihon H, Ruvkun G. Mediates Temporal Pattern Formation in *C. elegans*. 1993 [cited 2018 Jan 29];75:855–62. Available from: [http://www.cell.com/cell/pdf/0092-8674\(93\)90530-4.pdf?_returnURL=http%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2F0092867493905304%3Fshowall%3Dtrue](http://www.cell.com/cell/pdf/0092-8674(93)90530-4.pdf?_returnURL=http%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2F0092867493905304%3Fshowall%3Dtrue).
60. Acunzo M, Romano G, Wernicke D, Croce CM. MicroRNA and cancer – A brief overview. *Adv Biol Regul* [Internet]. 2015 Jan [cited 2018 Jan 29];57:1–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25294678>.
61. Winter J, Jung S, Keller S, Gregory RI, Diederichs S. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nat Cell Biol*. 2009 Mar;11(3):228–34.
62. Leva G Di, Garofalo M, Croce CM. microRNAs in cancer. *Annu Rev Pathol*. 2014;9:287–314.
63. Chamorro AC, Ambrosio-albuquerque EP, Augusto V, Rosa D. MICRO-RNAs E CÂNCER : ABORDAGENS E PERSPECTIVAS. *Pnas*. 2015;16(2):119–24.
64. Winter J, Jung S, Keller S, Gregory RI, Diederichs S. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nat Cell Biol* [Internet]. 2009 Mar 1 [cited 2018 Jan 29];11(3):228–34. Available from: <http://www.nature.com/articles/ncb0309-228>.

65. Agostini M, Pucciarelli S, Calore F, Bedin C, Enzo M, Nitti D. miRNAs in colon and rectal cancer: A consensus for their true clinical value. *Clin Chim Acta* [Internet]. 2010 Sep 6 [cited 2018 Jan 29];411(17–18):1181–6. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009898110003074?via%3DiHub>.
66. Ebrahimi F, Gopalan V, Smith RA, Lam AK-Y. miR-126 in human cancers: Clinical roles and current perspectives. *Exp Mol Pathol* [Internet]. 2014 Feb 1 [cited 2018 Jan 29];96(1):98–107. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014480013001500>.
67. Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs — microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer* [Internet]. 2006;6(4):259–69. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nrc1840>.
68. Di Leva G, Garofalo M, Croce CM. MicroRNAs in Cancer. *Annu Rev Pathol Mech Dis* [Internet]. 2014;9(1):287–314. Available from: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-pathol-012513-104715>.
69. Bertoli G, Cava C, Castiglioni I. Micronas: New biomarkers for diagnosis, prognosis, therapy prediction and therapeutic tools for breast cancer. *Theranostics*. 2015;5(10):1122–43.
70. Zhang H, Li Y, Lai M. The microRNA network and tumor metastasis. *Oncogene* [Internet]. 2010 Feb 18 [cited 2017 Nov 9];29(7):937–48. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19935707>.
71. Corcoran C, Friel AM, Duffy MJ, Crown J, O’Driscoll L. Intracellular and extracellular microRNAs in breast cancer. *Clin Chem*. 2011;57(1):18–32.
72. Wang S, Olson EN. AngiomiRs—Key regulators of angiogenesis. *Curr Opin Genet Dev* [Internet]. 2009 Jun [cited 2017 Dec 15];19(3):205–11. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19446450>.
73. Plummer PN, Freeman R, Taft RJ, Vider J, Sax M, Umer BA, et al. MicroRNAs regulate tumor angiogenesis modulated by endothelial progenitor cells. *Cancer Res* [Internet]. 2013 Jan 1 [cited 2017 Dec 15];73(1):341–52. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22836757>.
74. Devlin C, Greco S, Martelli F, Ivan M. miR-210: More than a silent player in hypoxia. *IUBMB Life* [Internet]. 2011 Feb [cited 2017 Dec 15];63(2):n/a-n/a. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21360638>.
75. Kosaka N, Iguchi H, Hagiwara K, Yoshioka Y, Takeshita F, Ochiya T. Neutral Sphingomyelinase 2 (nSMase2)-dependent Exosomal Transfer of Angiogenic MicroRNAs Regulate Cancer Cell Metastasis. *J Biol Chem* [Internet]. 2013 Apr 12 [cited 2017 Dec 15];288(15):10849–59. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23439645>.
76. Hong L, Han Y, Zhang H, Zhao Q, Qiao Y. miR-210: a therapeutic target in cancer. *Expert Opin Ther Targets* [Internet]. 2013 Jan 22 [cited 2017 Dec

- 15];17(1):21–8. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1517/14728222.2012.732066>.
77. Chuang T-D, Panda H, Luo X, Chegini N. miR-200c is aberrantly expressed in leiomyomas in an ethnic-dependent manner and targets ZEBs, VEGFA, TIMP2, and FBLN5. *Endocr Relat Cancer* [Internet]. 2012 Aug [cited 2017 Dec 15];19(4):541–56. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22685266>.
 78. Zheng Y, Li S, Ding Y, Wang Q, Luo H, Shi Q, et al. The role of miR-18a in gastric cancer angiogenesis. *Hepatogastroenterology* [Internet]. 2013 Oct [cited 2017 Dec 15];60(127):1809–13. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24624454>.
 79. He J, Jing Y, Li W, Qian X, Xu Q, Li F-S, et al. Roles and Mechanism of miR-199a and miR-125b in Tumor Angiogenesis. Cheng JQ, editor. *PLoS One* [Internet]. 2013 Feb 20 [cited 2017 Dec 15];8(2):e56647. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0056647>.
 80. Li C, Li G, Tan DX, Li F, Ma X. A novel enzyme-dependent melatonin metabolite in humans. *J Pineal Res*. 2013;54(1):100–6.
 81. Reiter RJ, Tan D-X, Fuentes-Broto L. Melatonin: A Multitasking Molecule. *Prog Brain Res* [Internet]. 2010 Jan 1 [cited 2017 Dec 15];181:127–51. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0079612308810084?via%3Dihub>.
 82. Hill SM, Belancio VP, Dauchy RT, Xiang S, Brimer S, Mao L, et al. Melatonin: an inhibitor of breast cancer. *Endocr Relat Cancer* [Internet]. 2015 Jun 1 [cited 2017 Nov 27];22(3):R183-204. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25876649>.
 83. Hevia D, González-Menéndez P, Quiros-González I, Miar A, Rodríguez-García A, Tan D-X, et al. Melatonin uptake through glucose transporters: a new target for melatonin inhibition of cancer. *J Pineal Res* [Internet]. 2015 Mar [cited 2017 Nov 23];58(2):234–50. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25612238>.
 84. Vriend J, Reiter RJ. Melatonin and the von Hippel-Lindau/HIF-1 oxygen sensing mechanism: A review. *Biochim Biophys Acta - Rev Cancer*. 2016;1865(2):176–83.
 85. BUBENIK GA, KONTUREK SJ. Melatonin in gastroprotection against stress-induced aduced acute gastric lesions and in healing of chronic gastric ulcers. *J Physiol Pharmacol*. 2011;(4):3–7.
 86. Bilu C, Kronfeld-Schor N. Effects of circadian phase and melatonin injection on anxiety-like behavior in nocturnal and diurnal rodents. *Chronobiol Int* [Internet]. 2013 Jul 10 [cited 2018 Jan 29];30(6):828–36. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/07420528.2013.773439>.

87. Simonneaux V, Ribelayga C, Basille M, Yon L, Fournier A, Vaudry H. Generation of the melatonin endocrine message in mammals: a review of the complex regulation of melatonin synthesis by norepinephrine, peptides, and other pineal transmitters. *Pharmacol Rev* [Internet]. 2003 Jun 1 [cited 2018 Jan 29];55(2):325–95. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10835102>.
88. Hill SM, Belancio VP, Dauchy RT, Xiang S, Brimer S, Mao L, et al. Melatonin: An inhibitor of breast cancer. *Endocr Relat Cancer*. 2015;22(3):R183–204.
89. Maganhin CC, Carbonel AAF, Hatty JH, Fuchs LFP, Oliveira-Júnior IS de, Simões M de J, et al. Efeitos da melatonina no sistema genital feminino: breve revisão. *Rev Assoc Med Bras* [Internet]. 2008 Jun [cited 2017 Dec 15];54(3):267–71. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-42302008000300022&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt.
90. Sousa Neto, Júlio Anselmo ; Scaldaferrri PM. Melatonina e câncer -revisão da literatura. *Rev Bras Cancerol* [Internet]. 2005 [cited 2017 Dec 15];51(1):49–58. Available from: http://www.inca.gov.br/rbc/n_51/v01/pdf/revisao2.pdf.
91. Di Bella G, Mascia F, Gualano L, Di Bella L. Melatonin Anticancer Effects: Review. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2013 Jan 24 [cited 2017 Dec 15];14(2):2410–30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23348932>.
92. Alvarez-García V, González A, Alonso-González C, Martínez-Campa C, Cos S. Antiangiogenic effects of melatonin in endothelial cell cultures. *Microvasc Res* [Internet]. 2013 May [cited 2017 Nov 27];87:25–33. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23473980>.
93. 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. *PLoS One*. 2014;9(1).
94. Dubocovich ML, Markowska M. Functional MT1 and MT2 Melatonin Receptors in Mammals. *Endocrine* [Internet]. 2005 Jul [cited 2018 Jan 29];27(2):101–10. Available from: <http://link.springer.com/10.1385/ENDO:27:2:101>.
95. Cos S, Sánchez-Barceló EJ. Melatonin and Mammary Pathological Growth. *Front Neuroendocrinol* [Internet]. 2000 Apr 1 [cited 2018 Jan 6];21(2):133–70. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0091302299901942?via%3Dihub>.
96. Li Y, Li S, Zhou Y, Meng X, Zhang J-J, Xu D-P, et al. Melatonin for the prevention and treatment of cancer. *Oncotarget* [Internet]. 2017;8(24):39896–921. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28415828> <http://www.oncotarget.com/abstract/16379>.
97. Su SC, Hsieh MJ, Yang WE, Chung WH, Reiter RJ, Yang SF. Cancer metastasis:

- Mechanisms of inhibition by melatonin. *J Pineal Res.* 2017;62(1):1–11.
98. 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.
 99. 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.
 100. 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* [Internet]. 2009 Nov 3 [cited 2017 Dec 15];101(9):1613–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19773750>.
 101. Lee SE, Kim SJ, Youn JP, Hwang SY, Park CS, Park YS. MicroRNA and gene expression analysis of melatonin-exposed human breast cancer cell lines indicating involvement of the anticancer effect. *J Pineal Res.* 2011;51(3):345–52.
 102. 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* [Internet]. 2017;93:969–75. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2017.07.010>.
 103. 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* [Internet]. 2016;7(15):20532–48. Available from: <http://www.oncotarget.com/fulltext/7978>.
 104. Sohn EJ, Won G, Lee J, Lee S, Kim SH. Upregulation of miRNA3195 and miRNA374b mediates the anti-angiogenic properties of melatonin in hypoxic PC-3 prostate cancer cells. *J Cancer.* 2015;6(1):19–28.
 105. Zhu X, Chen S, Jiang Y, Xu Y, Zhao Y, Chen L, et al. Analysis of miRNA expression profiles in melatonin-exposed GC-1 spg cell line. *Gene* [Internet]. 2017 Nov [cited 2017 Dec 7]; Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S037811191731034X>.
 106. 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* [Internet]. 2010 Jan 1 [cited 2017 Dec 15];101(1):241–9. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1349-7006.2009.01385.x>.
 107. 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* [Internet]. 2011 Oct 15 [cited 2017 Dec 15];71(20):6450–62. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21868754>.

108. Zhou X, Wang Z-N, Zhao F, Wang Z-N, Song Y-X, Chang H, et al. Altered expression of miR-152 and miR-148a in ovarian cancer is related to cell proliferation. *Oncol Rep* [Internet]. 2012 Oct 3 [cited 2017 Nov 9];27(2):447–54. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21971665>.
109. 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* [Internet]. 2010 Mar [cited 2017 Dec 15];51(3):NA-NA. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20146264>.
110. Chen Y, Song Y-X, Wang Z-N. The MicroRNA-148/152 Family: Multi-faceted Players. *Mol Cancer* [Internet]. 2013;12(1):43. Available from: <http://molecular-cancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/1476-4598-12-43>.
111. Liu X, Li J, Qin F, Dai S. MiR-152 as a tumor suppressor microRNA: Target recognition and regulation in cancer. *Oncol Lett*. 2016;11(6):3911–6.
112. Huang S, Xie Y, Yang P, Chen P, Zhang L. HCV core protein-induced down-regulation of microRNA-152 promoted aberrant proliferation by regulating Wnt1 in HepG2 cells. *PLoS One*. 2014;9(1).
113. Haque R, Hur EH, Farrell AN, Iuvone PM, Howell JC. MicroRNA-152 represses VEGF and TGF β 1 expressions through post-transcriptional inhibition of (Pro)renin receptor in human retinal endothelial cells [Internet]. Vol. 21, *Molecular Vision*. 2015. p. 224–35. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25802486>.
114. Sengupta D, Deb M, Rath SK, Kar S, Parbin S, Pradhan N, et al. DNA methylation and not H3K4 trimethylation dictates the expression status of miR-152 gene which inhibits migration of breast cancer cells via DNMT1/CDH1 loop. *Exp Cell Res*. 2016;346(2):176–87.
115. Xiang Y, Ma N, Wang D, Zhang Y, Zhou J, Wu G, et al. MiR-152 and miR-185 co-contribute to ovarian cancer cells cisplatin sensitivity by targeting DNMT1 directly: a novel epigenetic therapy independent of decitabine. *Oncogene* [Internet]. 2014;33(3):378–86. Available from: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/onc.2012.575>.
116. Berridge M V., Herst PM, Tan AS. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction. In: *Biotechnology annual review* [Internet]. 2005 [cited 2017 Dec 5]. p. 127–52. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16216776>.
117. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* [Internet]. 1983 Dec 16 [cited 2017 Dec 5];65(1–2):55–63. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6606682>.
118. The University of Manchester. Stem-loop sequence hsa-mir-152 [Internet]. 2014. Available from: http://www.mirbase.org/cgi-bin/mirna_entry.pl?acc=MI0000462

119. Merck. Anti-IGF1R (Ab-1161) antibody produced in rabbit [Internet]. 2017 [cited 2017 Dec 12]. Available from: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/sab4300359?lang=pt®ion=BR>.
120. SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY I. VEGF Antibody (C-1): sc-7269 [Internet]. [cited 2017 Nov 12]. Available from: <https://www.scbt.com/scbt/product/vegf-antibody-c-1>.
121. SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY I. HIF-1 α Antibody (H1alpha 67): sc-53546 [Internet]. [cited 2017 Nov 12]. Available from: <https://www.scbt.com/scbt/product/hif-1alpha-antibody-h1alpha-67?requestFrom=search>.
122. Hill SM, Spriggs LL, Simon MA, Muraoka H, Blask DE. The growth inhibitory action of melatonin on human breast cancer cells is linked to the estrogen response system. *Cancer Lett* [Internet]. 1992 Jul 10 [cited 2018 Jan 6];64(3):249–56. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1638517>.
123. 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* [Internet]. 2017;183:98–109. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2017.06.013>.
124. B. Maschio-Signorini L, B. Gelaleti G, G. Moschetta M, F. Borin T, V. Jardim-Perassi B, R. Lopes J, et al. Melatonin Regulates Angiogenic and Inflammatory Proteins in MDA-MB-231 Cell Line and in Co-culture with Cancer-associated Fibroblasts. *Anticancer Agents Med Chem* [Internet]. 2016 Oct 3 [cited 2017 Nov 27];16(11):1474–84. Available from: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1871-5206&volume=16&issue=11&spage=1474>.
125. Leman ES, Siskin BF, Zimmer S, Anderson KW. Studies of the interactions between melatonin and 2 Hz, 0.3 mT PEMF on the proliferation and invasion of human breast cancer cells. *Bioelectromagnetics* [Internet]. 2001 Apr [cited 2018 Jan 6];22(3):178–84. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11255213>.
126. Hill SM, Frasch T, Shulin Xiang, Lin Yuan, Duplessis T, Lulu Mao. Molecular Mechanisms of Melatonin Anticancer Effects. *Integr Cancer Ther* [Internet]. 2009;8(4):337–46. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1534735409353332>.
127. Azimi I, Petersen RM, Thompson EW, Roberts-Thomson SJ, Monteith GR. Hypoxia-induced reactive oxygen species mediate N-cadherin and SERPINE1 expression, EGFR signalling and motility in MDA-MB-468 breast cancer cells. 2017;(October 2016):1–11.
128. Garbati P, Ravera S, Scarfi S, Salis A, Rosano C, Poggi A, et al. Effects on Energy Metabolism of Two Guanidine Molecules, (Boc)₂-Creatine and

- Metformin. *J Cell Biochem.* 2017;118(9):2700–11.
129. Wei L, Li K, Pang X, Guo B, Su M, Huang Y, et al. Leptin promotes epithelial-mesenchymal transition of breast cancer via the upregulation of pyruvate kinase M2. *J Exp Clin Cancer Res.* 2016;35(1):166.
 130. Chang LC, Yu YL, Hsieh MT, Wang SH, Chou RH, Huang WC, et al. A novel microtubule inhibitor, MT3-037, causes cancer cell apoptosis by inducing mitotic arrest and interfering with microtubule dynamics. *Am J Cancer Res.* 2016;6(4):747–63.
 131. Chinchar E, Makey KL, Gibson J, Chen F, Cole SA, Megason GC, et al. Sunitinib significantly suppresses the proliferation, migration, apoptosis resistance, tumor angiogenesis and growth of triple-negative breast cancers but increases breast cancer stem cells. *Vasc Cell.* 2014;6(1):12.
 132. Han HB, Gu J, Zuo HJ, Chen ZG, Zhao W, Li M, et al. Let-7c functions as a metastasis suppressor by targeting MMP11 and PBX3 in colorectal cancer. *J Pathol.* 2012;226(3):544–55.
 133. Yi S-J, Li L-L, Tu W-B. MiR-214 negatively regulates proliferation and WNT/ β -catenin signaling in breast cancer. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* [Internet]. 2016 Dec [cited 2017 Nov 13];20(24):5148–54. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28051254>.
 134. Li Y, Cai B, Shen L, Dong Y, Lu Q, Sun S, et al. MiRNA-29b suppresses tumor growth through simultaneously inhibiting angiogenesis and tumorigenesis by targeting Akt3. *Cancer Lett.* 2017;397(2):111–9.
 135. Zhang L, Ma P, Sun L, Han Y, Li B, Mi X, et al. MiR-107 down-regulates SIAH1 expression in human breast cancer cells and silencing of miR-107 inhibits tumor growth in a nude mouse model of triple-negative breast cancer. *Mol Carcinog* [Internet]. 2016;55(5):768–77. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/mc.22320>.
 136. Kedmi M, Ben-Chetrit N, Körner C, Mancini M, Ben-Moshe NB, Lauriola M, et al. EGF induces microRNAs that target suppressors of cell migration: miR-15b targets MTSS1 in breast cancer. *Sci Signal* [Internet]. 2015 Mar 17 [cited 2017 Nov 14];8(368):ra29. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25783158>.
 137. Liu L, He J, Wei X, Wan G, Lao Y, Xu W, et al. MicroRNA-20a-mediated loss of autophagy contributes to breast tumorigenesis by promoting genomic damage and instability. *Oncogene* [Internet]. 2017;(1):5874–84. Available from: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/onc.2017.193>.
 138. Wang W, Luo Y. MicroRNAs in breast cancer: oncogene and tumor suppressors with clinical potential. *J Zhejiang Univ B* [Internet]. 2015;16(1):18–31. Available from: <http://link.springer.com/10.1631/jzus.B1400184>.
 139. Chiang CH, Chu PY, Hou MF, Hung WC. MiR-182 promotes proliferation and

- invasion and elevates the HIF-1 α -VEGF-A axis in breast cancer cells by targeting FBXW7. *Am J Cancer Res* [Internet]. 2016 [cited 2017 Nov 14];6(8):1785–98. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27648365>.
140. Johannessen C, Moi L, Kiselev Y, Pedersen MI, Dalen SM, Braaten T, et al. Expression and function of the miR-143/145 cluster in vitro and in vivo in human breast cancer. Ahmad A, editor. *PLoS One* [Internet]. 2017 Oct 26 [cited 2017 Nov 22];12(10):e0186658. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29073169>.
 141. Cui Y-X, Bradbury R, Flamini V, Wu B, Jordan N, Jiang WG. MicroRNA-7 suppresses the homing and migration potential of human endothelial cells to highly metastatic human breast cancer cells. *Br J Cancer* [Internet]. 2017;117(1):89–101. Available from: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/bjc.2017.156>.
 142. Li D, Wang H, Song H, Xu H, Zhao B, Wu C, et al. The microRNAs miR-200b-3p and miR-429-5p target the LIMK1/CFL1 pathway to inhibit growth and motility of breast cancer cells. *Oncotarget* [Internet]. 2017 Oct 16 [cited 2017 Nov 22];8(49):85276–89. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29156719>.
 143. Joosse SA, Müller V, Steinbach B, Pantel K, Schwarzenbach H. Circulating cell-free cancer-testis MAGE-A RNA, BORIS RNA, let-7b and miR-202 in the blood of patients with breast cancer and benign breast diseases. *Br J Cancer* [Internet]. 2014;111(5):909–17. Available from: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/bjc.2014.360>.
 144. Shenouda SK, Alahari SK. MicroRNA function in cancer: Oncogene or a tumor suppressor? *Cancer Metastasis Rev*. 2009;28(3–4):369–78.
 145. Zhang H, Li Y, Lai M. The microRNA network and tumor metastasis. *Oncogene* [Internet]. 2010;29(7):937–48. Available from: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/onc.2009.406>.
 146. Maimaitiming A, Wusiman A, Aimudula A, Tudahong T, Aisimutula D. Downregulation of MicroRNA-152 and Inhibition of Cell Proliferation, Migration, and Invasion in Breast Cancer. *Oncol Res Featur Preclin Clin Cancer Ther* [Internet]. 2017; Available from: <http://www.ingentaconnect.com/content/10.3727/096504017X14974821032421>.
 147. Zhai R, Kan X, Wang B, Du H, Long Y, Wu H, et al. miR-152 suppresses gastric cancer cell proliferation and motility by targeting CD151. *Tumor Biol*. 2014;35(11):11367–73.
 148. Alvarez-García V, González A, Alonso-González C, Martínez-Campa C, Cos S. Antiangiogenic effects of melatonin in endothelial cell cultures. *Microvasc Res* [Internet]. 2013;87:25–33. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mvr.2013.02.008>.
 149. 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* [Internet]. 2013 May [cited 2017 Nov 27];54(4):373–80. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23013414>.
150. González-González A, González A, Alonso-González C, Menéndez-Menéndez J, Martínez-Campa C, Cos S. 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* [Internet]. 2017 Nov 2 [cited 2017 Nov 27];39(1):433–41. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29115538>.
 151. Nooshinfar E, Safaroghli-Azar A, Bashash D, Akbari ME. Melatonin, an inhibitory agent in breast cancer. *Breast Cancer*. 2017;24(1):42–51.
 152. Goradel NH, Asghari MH, Moloudizargari M, Negahdari B, Haghi-Aminjan H, Abdollahi M. Melatonin as an angiogenesis inhibitor to combat cancer: Mechanistic evidence. Vol. 335, *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2017. p. 56–63.
 153. Bahnassy A, Mohanad M, Ismail MF, Shaarawy S, El-Bastawisy A, Zekri ARN. Molecular biomarkers for prediction of response to treatment and survival in triple negative breast cancer patients from Egypt. *Exp Mol Pathol* [Internet]. 2015;99(2):303–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.yexmp.2015.07.014>.
 154. Tahiri A, Aure MR, Kristensen VN. MicroRNA Networks in Breast Cancer Cells. In 2018 [cited 2018 Jan 24]. p. 55–81. Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-7493-1_4.

VI. APÊNDICES

VI. APÊNDICES

Apêndice A: Artigo submetido à publicação na revista *Journal of Pineal Research*.

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

Jéssica H. M. Marques^{1,3}; André L. Mota³; Jessica G. Oliveira^{1,3}; Jéssica Z. Lacerda^{1,2};
Júlia P. Stefani³; Lívia C. Ferreira³; Tialfi B. Castro³; Andrés F. Aristizábal-Pachón⁴;
Debora A.P.C. Zuccari^{1,2,3,*}.

Jéssica Helena de Mora Marques^{1,3}

E-mail: jessica.helena.mora@hotmail.com

André Lima Mota³

E-mail: andre.biomedic@gmail.com

Jéssica Gisleine de Oliveira^{1,3}

E-mail: jessicag.oliveira21@outlook.com

Jéssica Zani Lacerda^{2,3}

E-mail: jessicabio.zani@gmail.com

Júlia Pivrotto Stefani³

E-mail: jupstefani@gmail.com

Lívia Carvalho Ferreira³

E-mail: livinha_ferreira@hotmail.com

Tialfi Bergamini de Castro³

E-mail: tialfi_@hotmail.com

Andrés Felipe Aristizábal-Pachón⁴

E-mail: afaristizabal@usp.br

Debora Aparecida Pires de Campos Zuccari^{1,2,3}

Email: debora.zuccari@famerp.br

¹ Graduate Program in Health Science / Medical School of Sao Jose do Rio Preto - FAMERP, Sao Jose do Rio Preto (SP).

² Graduate Program in Biosciences / Paulista State University- UNESP/IBILCE, Sao Jose do Rio Preto (SP).

³ Laboratory of Cancer Molecular Investigation - LIMC / Medical School of Sao Jose do Rio Preto - FAMERP, Sao Jose do Rio Preto (SP).

⁴ Laboratory of Molecular Genetics and Bioinformatics - LGMB / Ribeirao Preto Medical School - University of Sao Paulo.

Running Title: Melatonin restrains angiogenesis factors

* Corresponding author

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

Conflict of interest statement: No potential conflicts of interest.

Financial support: Funded by Fundacao de Amparo a Pesquisa do Estado de Sao Paulo - FAPESP/Brazil (2016/14280-3). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Key words: MicroRNA, Pineal gland, Angiogenic proteins, Xenograft model, Breast neoplasms.

ABSTRACT:

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 tumor 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*. 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-1R, 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. 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*. Our results confirm the action of melatonin on the miR-152-3p regulation known to be involved in the progression of breast cancer.

Introduction

Breast cancer (BC) represents the second most prevalent type of tumor with the highest mortality rate in the world among women. Annually, more than one million women are diagnosed with breast cancer and more than 400,000 die from this disease ¹. Because it is an increasingly prevalent disease and has a high mortality rate, it is important to identify biomarkers and targets that make new therapeutic strategies possible. The evolution of this neoplasm occurs when the cells break off and spread to other regions of the body, leading to metastasis ². In this case, there is a need for recruitment of new blood vessels by angiogenesis ^{3,4}. Tumor angiogenesis is a very complex process and can be regulated by several mechanisms involving different cell types of the tumor microenvironment that release pro-angiogenic factors such as vascular endothelial growth factor (VEGF) ⁵.

At the cancer progression, when the tumor exceeds 1-2 mm in diameter, hypoxia regions are formed ⁶. Moreover, the hypoxia increase the expression of pro-angiogenic factors such as pVHL and HIF-1 α , or even control epigenetic mechanisms involving microRNAs (miRNAs) ⁷. Recent studies demonstrate that the increase of IGF-IR (Insulin-like growth factor 1 receptor) in angiogenesis might be related to other genes, such as HIF-1 α (Hypoxia-Inducible Factor) and VEGF leading to angiogenesis ^{8,9}. The understanding of angiogenesis mechanisms and factors that contribute to this process, as well as the study of pathways linked to miRNAs, is very important ^{5,10}.

Several studies suggest that melatonin is capable of modifying the expression of innumerable genes related to breast cancer ^{11,12,13} indicating its potential role in the regulation of miRNAs ¹⁴. Melatonin (N-acetyl-5-methoxytryptamine), a hormone naturally produced and secreted in the pineal gland, and whose synthesis is blocked in

the presence of light, has been shown to be important as a new therapy against breast cancer ¹⁵. In addition, this hormone has important functions even as antiangiogenic effects ¹⁶ confirmed by our research group *in vitro* and *in vivo* ¹⁷.

miRNAs are endogenous small molecules of non-coding RNA composed of 19-24 nucleotides that act in the cellular pathways through the regulation of gene expression in post-transcriptional level. These molecules can induce gene silencing through specific pairing with target messenger RNA (mRNA) and culminate with its degradation or transcriptional repression. It is already known that one gene can be repressed by a wide variety of miRNAs, in the meantime one miRNA can regulate several target genes ^{18,19,20}.

In breast tumors, miRNAs can act as tumor suppressors or oncogenes, regulating several genes that lead to cell proliferation, apoptosis, genomic instability, metastasis, angiogenesis and tumor growth ^{21,22}. Among miRNAs, the miR-152 demands special interest, because its decrease has been associated with the process of cell proliferation, invasion and angiogenesis in different neoplasms such as breast ⁹. In breast cancer, miR-152-3p levels are relatively decreased compared to normal mammary tissues. This miRNA can act on the pathway of angiogenesis, targeting IGF-IR and IRS1, which leads to the inhibition of some signaling pathways in the cell, culminating in the inhibition of HIF-1 α and VEGF, factors that promote the synthesis of new blood vessels ^{9,23}.

There are no studies evaluating the effect of melatonin on the expression of miRNAs in triple-negative breast cancer (TNBC). In this manuscript, we investigated how melatonin impairs angiogenesis increasing microRNA-152-3p in triple-negative

breast cancer cell line. Our findings suggest a modulating role of melatonin in the tumor suppressor miR-152-3p and in genes related to angiogenesis.

MATERIALS AND METHODS

Cell Culture

TNBC MDA-MB-468 cell line was cultured in 5 % CO₂ at 37 °C in Dulbecco's Modified Eagle's Medium-High Glucose (DMEM[®]) medium, supplemented with 10 % fetal bovine serum (FBS) and 1 % Penicillin and Streptomycin (LGC Biotechnologia, SP, BR).

Cell Viability Assay (MTT)

MDA-MB-468 cells at a concentration of 5×10^4 were placed in individual wells of a 96-well plate and incubated for 24 hours in DMEM with 2 % FBS. The treatments were performed using four different concentrations of melatonin (0.001 mM, 0.01 mM, 0.1 mM and 1 mM) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Control group received only the vehicle (1: 1 - 100 % ethanol and PBS). After 48 hours of treatment, 10 μ L of MTT solution (Vibrant Mtt Cell Proliferation Assay Kit-Invitrogen[®]) was added to each sample, followed by incubation for 1 hour. Subsequently, for solubilization of the crystals formed from the metabolism of MTT, the cells were incubated with 100 μ L of dimethyl sulfoxide (DMSO) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) for 10 minutes. The absorbance was measured at 570 nm wavelength using the FLUOstar Omega Microplate Reader[®] plate reader.

Real time quantitative PCR (RQ-qPCR)

RNA samples were extracted from the cell line using the miRNeasy Mini Kit[®] (QIAGEN, Hilden, GER) following the manufacturer's guidelines. The QIAzol reagent[®] and the extraction kit were used to preserve the miRNAs that could be dissipated in a conventional total RNA extraction. The cDNA was obtained through miScript II RT Kit (QIAGEN, Hilden, GER). The qPCR was performed using the RT² Profiler[™] PCR Array Human Breast Cancer; this array is composed of 84 mature miRNAs related with breast cancer and controls. StepOnePlus real-time PCR (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) was used and fluorescence data were collected during the extension step. We determined specific gene expression for miRNA and its targets. The cDNA (single strand - complementary DNA) was obtained using the TaqMan[™] MicroRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) for miRNAs, and the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) for genes, according to the manufacturer's specifications. The quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR) was performed using the StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Reactions for miR-152-3p and its target genes (IGF-IR, HIF-1 α and VEGF) expression analysis were performed in triplicate using TaqMan[™] Universal PCR Master Mix, TaqMan[™] RNA Assay (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and 10 ng of cDNA. To normalize miRNA and mRNA expression, we used housekeeping genes U6 and β -actin, respectively. The relative expression values of the miRNAs of interest were determined by the quantification method in relation to the mean of normalizing genes used as endogenous control ($2^{-\Delta\Delta C_t}$).

Transient modification of cells

In order to perform the transient modification, the MirVana™ miRNA Mimic 152-3p (Ambion®) was used; this reagent is made up of small molecules of double-stranded RNAs that mimic an endogenous miRNA and allows functional analyzes due to its overexpression. Additionally, a negative control containing a nucleotide sequence without homology to any gene (scramble) described in mammals was used. The MDA-MB-468 cells were seeded in 6-well plates and transfected using HiPerFect Transfection Reagent (QIAGEN, Hilden, GER).

Immunocytochemistry

The protein expression of the target genes IGF-IR, HIF-1 α and VEGF was performed by immunocytochemical assay (ICC). The cell line was transferred to a slide with coupled silicone, where the culture medium was added, treated and transfected for 24 hours. After the medium was removed, the slide was incubated overnight with 250 μ L of 4 % paraformaldehyde. The primary antibodies were used (**Table 1**) and the slides were incubated at 4 °C overnight. The Complement and HRP Conjugate (REVEAL-Biotin-Free Polyvalent DAB-Spring Bioscience, Pleasanton, CA) were applied, followed by the chromogenic substrate (DAB) and Harris Hematoxylin. The assembly of the slides was performed in 50 % glycerol and sealed. All immunoreactions were accompanied by a positive control for the antibody tested and a negative control (no primary antibody). The slides were observed on the 40 \times objective (Nikon Eclipse E200®) microscope and analyzed by optical densitometry. For each sample, three different fields were photographed only in the immunoreactive areas, and IMAGE J® software was used to quantify the immunostained intensity.

Animals and tumor implantation model

Ten female BALB/c nude mice (body weight of 20-25 g) were used. The animals were kept in pathogen free conditions in a temperature controlled environment (21 to 25 °C), exposed to light for 12 hours and 12 hours in the dark, and fed ration and water *ad libitum*. Mice were acquired from Faculdade de Medicina da Universidade de Sao Paulo (FMUSP) and the experiment was carried out at Faculdade de Medicina de Sao Jose do Rio Preto (FAMERP). MDA-MB-468 cells were trypsinized, centrifuged and resuspended in 100 µL of serum free DMEM at the concentration of 5×10^6 cells. For the development of the tumor, this volume was injected subcutaneously in the flank. The treatment was performed for five days per week during three weeks, was used melatonin 40 mg/kg in the treated group and the just the dilution of this hormone in the control group. After the treatment period, the animals were euthanized with pentobarbital overdose (100 mg/kg). Tumor tissue was removed and one part was used for real-time PCR, while another part was fixed in 10 % formalin for histological and immunohistochemical analysis. The study was carried out following the national and international standards for ethics in animal experimentation. The project was approved by the Ethics Committee on the Use of Animals of the Faculdade de Medicina de Sao Jose do Rio Preto (02/2015).

Immunohistochemistry

The protein expression of the target genes IGF-IR, VEGF and HIF-1 α was performed by immunohistochemistry assay. The tumor tissue was paraffin embedded, cut into a 3 µm slice and placed on a silanized slide. The desparaffinization of the xylol sections was carried out followed by hydration with decreasing ethanol. Endogenous

peroxidase blockade was performed with 10 V oxygenated water for 30 minutes and antigenic recovery in a steam pan for 30 minutes with buffer as indicated by the manufacturer. The material was incubated with the primary antibodies and the corresponding concentrations (Table 1) in a darkroom for 18 hours at 4 °C. After the incubation period, the slides were washed with saline (PBS), incubated with secondary, tertiary antibody, and developed with DAB chromogen according to instructions from REVEAL-Biotin-Free Polyvalent DAB-Spring (Bioscience, Pleasanton, CA). The counter-staining was performed with Harris Hematoxylin for 40 seconds and assembly of the slides in Ery-mount resin (*Erviagas, Sao Paulo, SP, BR*). The immunoreactions were accompanied by a positive control and a negative control. The slides were observed under a 40× objective of the Nikon Eclipse E200[®] microscope and analyzed by optical densitometry. For each sample, three different fields were photographed in the immunoreactive areas only, and IMAGE J[®] software was used to quantify the immunostained intensity.

Statistical analysis

The results were initially submitted to descriptive analysis for determination of normality. For samples with normal distribution, Student's t-test (two samples) or Analysis of Variance (ANOVA), followed by Bonferroni test (more than two samples) was used. Data were presented as mean ± Standard Error of Mean (SEM). Values of $p < 0.05$ were considered significant and all analyses were performed using GraphPad Prism 5 software (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA).

RESULTS

Melatonin affects cell viability

Cell viability was evaluated for different concentrations of melatonin to determine cytotoxic effects by MTT assay. Analysis shows that melatonin caused a significant decrease ($p < 0.05$) of cell survival compared to control group in concentration equal or higher than 0.01 mM. We choose the 1mM concentration for the further experiments because it was more significant ($p < 0.001$) (**Fig. 1**).

Melatonin regulates miRNAs

We evaluated 84 mature miRNAs expression level in MDA-MB-468 cells by PCR-array. Table 2 shows the fold change (FC) value for 13 different miRNAs regulated for melatonin treatment ($p < 0.05$). Six were up-regulated including hsa-let-7c-5p, hsa-miR-152-3p, hsa-miR-182-5p, hsa-miR-202-3p, has-miR-214-3p, hsa-miR-29b-3p; seven were down-regulated including hsa-miR-107, hsa-miR-10a-5p, hsa-miR-145-5p, hsa-miR-15b-5p, hsa-miR-20a-5p, hsa-miR-429 and hsa-miR-7-5p. Among the miRNAs differentially regulated by melatonin, a significant increase was observed in miR-152-3p level expression (FC and p value). This miRNA was chosen for the next steps because it has scientific relevance in breast cancer and angiogenesis process²⁴.

Melatonin increases miR-152-3p and target genes expression

We validated by RT-qPCR the higher expression of miR-152-3p in MDA-MB-468 cells in different conditions and also observed that the expression is increased in cells treated with melatonin (**Fig. 2A**) ($p < 0.05$). To identify the effect of melatonin in

breast tumor development, we ectopically expressed miR-152-3p in MDA-MB-468 cell line. We consistently achieved 80 % transfection efficiency in this cell line and miRNA expression reached above 6,000 (**Fig. 2A**) ($p < 0.05$) in comparison to control cells, without transfection or treatment. The action of melatonin was also verified in xenograft model after implantation of MDA-MB-468 cell line. Melatonin was able to increase the expression of miR-152-3p in tumor tissue (**Fig. 2E**) ($p < 0.001$).

The evaluation of genes related with angiogenesis revealed that both up-regulated miR-152-3p and melatonin increased the gene expression of IGF-IR ($p < 0.05$), HIF-1 α ($p < 0.001$) and VEGF ($p < 0.0001$) in MDA-MB-468 cells (**Fig. 2B-D**). This hormone also increased IGF-IR, HIF-1 α and VEGF in tumor (**Fig. 2F-H**), but in this case was not statistically significant. To complement the results found with the MDA-MB-468 cell line, miR-152-3p was also investigated in the MDA-MB-231 cell line. The reagent increases miRNA expression ($p < 0.0001$), but melatonin does not modulate the same (**Fig. 3**).

Melatonin and miR-152-3p decreases target genes protein expression

Evaluation of protein expression by immunocytochemistry showed that melatonin and up-regulated miR-152-3p decreased the protein levels of IGF-IR ($p < 0.001$ and $p < 0.0001$), HIF-1 α ($p < 0.001$ and $p < 0.0001$) and VEGF ($p < 0.05$ and $p < 0.0001$) and in MDA-MB-468 cells (**Fig. 4A-C**). Protein expression measured by immunohistochemistry revealed reduced levels of HIF-1 α ($p < 0.001$) and VEGF ($p < 0.05$) (**Fig. 4E, F**) in melatonin treated groups. The slight reduction observed for IGF-IR (**Fig. 4D**) was not statistically significant, although it was possible to observe a more pronounced marking in the control group compared to the melatonin treatment.

DISCUSSION

Melatonin appears to play a key role in protecting against breast cancer. This hormone interacts with several transcription factors and in nuclear binding sites contributing to the reduction of cell proliferation²⁵. Several studies confer on melatonin the inhibition of angiogenesis by reducing the genes related to this process. Melatonin inhibited angiogenesis in co-cultures of human endothelial cells (HUVECs) and breast cancer (MCF-7)^{99,100,101}. It has already been demonstrated by our group that melatonin regulates angiogenic proteins in the MDA-MB-231 cell line and in the co-culture with cancer-associated fibroblasts²⁸. This hormone also regulates angiogenesis under hypoxia in MCF-7 and MDA-MB-231 cells²⁹ and decreases the expression of genes related to this process in MDA-MB-231 and MCF-7 cells in three-dimensional culture³⁰. Thus, genes related to angiogenesis can be regulated by various mechanisms and molecules, including miRNAs³¹ and melatonin³².

There are no studies investigating the action of melatonin on miRNAs in MDA-MB-468 cells. Our results demonstrate the therapeutic potential of melatonin in the control of angiogenesis, in post-transcriptional gene regulation by increasing miR-152-3p expression in MDA-MB-468 cells, a triple-negative breast cancer cell line (TNBC), and decreasing the miRNA target genes (IGF-1R, HIF-1 α and VEGF) protein expression. We also identified the same results after implantation tumoral of these cells in BALB/c mice. We have shown that this hormone acts by regulating miRNAs and genes related to angiogenesis in triple-negative breast cancer (TNBC).

We choose a triple-negative breast cancer cell line for this study, MDA-MB-468, because triple-negative tumors are characterized by limited treatment options, leading to poor prognosis and high host mortality³³. This lineage has already been used in studies

related to the epithelial-mesenchymal transition (EMT) ³⁴. In addition, some molecules were investigated in this cell line such as (Boc) 2-creatine and metformin in the ATP / AMP ratio that decreased cell viability ³⁵; the leptin promoting EMT in breast cancer cells ³⁶, MT3-037 (drug in study) and sunitinib which inhibited angiogenesis ^{75,76}. Through the MT1 and MT2 receptors, melatonin stimulates apoptosis, regulates survival signalling and tumor metabolism, inhibits angiogenesis and metastasis ^{39,40}. In addition, since melatonin is a derivative of the amino acid tryptophan can easily crosses biological membranes due to its amphipathic nature, it can still be transported by glucose transporters ^{39,41}, performing its functions independent of its MT1 and MT2 receptors. Despite the low expression of MT1 receptors in triple-negative tumors ⁴⁰ the protective action of melatonin has already been studied, and our research group has identified that in concentrations higher than the physiological level, melatonin can have antitumor actions, such as decreased cell proliferation, angiogenesis and metastasis in MDA-MB-231 and MCF-7 cells ^{17,28-30}.

In this present study, melatonin decreases the cell viability of the MDA-MB-468 cell line at 1mM concentration. Corroborating our results, other studies have shown that 1 mM was sufficient to decrease the proliferation of MDA-MB-231 cells ^{17,42} and in contrast, this hormone was not able to decrease the process in MDA-MB-435, highly metastatic cells ⁴². However, as there are no studies using pharmacological doses in the MDA-MB-468 cells, this result of 1mM dose was used for all experiments. This defines a possible use of this molecule as adjuvant in triple-negative breast cancer therapy by using higher than physiological concentrations.

We found that miRNAs are modulated by melatonin in the MDA-MB-468 cell line. Overall, melatonin increased the expression of miRNAs which are poorly

expressed and those that the hormone decreased are strongly expressed. Melatonin increased the miRNAs considered to be tumor suppressors let-7c, miR-152, miR-214, miR-29b, and also decreased those considered oncomiRs miR-107, miR-10a, miR-15b, miR-20a, which are altered in mammary tumors. These miRNAs regulate the cell proliferation promoter / inhibitor genes, inducers of apoptosis, cell migration and metastasis, angiogenesis and tumorigenesis ^{4,24,44-49}. Despite the scarcity of work relating miRNAs and melatonin, our study corroborates literature, since this hormone has been shown to inhibit oncomiRs, such as miR-155 in glioma cells ⁵⁰ and miR-24 in colon and breast cancer cells (MCF-7) ⁵¹. In these cases, this modulation caused a decrease in tumor growth, cell proliferation and invasion.

We note that melatonin was able to enhance the expression of mir-152 in the MDA-MB-468 cell line but did not modulate it in the MDA-MB-231 cell line, demonstrating that the miRNAs can be regulated in different ways in cell lines of the same phenotypic profile. We also identified that melatonin increase this miRNA *in vivo*, after implantation of MDA-MB-468 cells in BALB/c mice. Decreased miR-152 has been associated with the process of cell proliferation, invasion and angiogenesis in different neoplasms such as breast ⁵², hepatocarcinoma ⁵³, ovary ⁵⁴ and gastric cancer ⁵⁵. The high expression of miR-152-3p is related to the inhibition of IGF-1R expression through its binding to the 3'-UTR region, leading to the blockade of HIF-1 α and VEGF expression ⁹. Because of the key role of IGF-1R, HIF-1 α and VEGF in the angiogenesis process and them were already identified to be targets of miR-152-3p, we chose these them to verify the action of melatonin. These targets are highly expressed in TNBC compared to non-TNBC tumors ⁵⁶.

We found decrease in the protein expression of IGF-1R, HIF-1 α and VEGF caused by melatonin and the up-regulated miR-152-3p Thus suggesting a post-transcriptional function of melatonin, and confirm the action of this miRNA. Our results corroborate those of XU and collaborators ⁹, since the high expression of miR-152 in MDA-MB-468 cells led to a decrease in the protein expression of the IGF-1R, HIF-1 α and VEGF genes. The authors demonstrated the increase of these genes by miR-152 in MCF-10a, MCF-7, T47D and MDA-MB-231 cells. Although this miRNA is described as a tumor suppressor in different tumor cell lines ²⁴, its action on the MDA-MB-468 cells is unprecedented. Several studies confer on melatonin the inhibition of angiogenesis by reducing the genes related to this process. Others studies by our group described how melatonin acts on genes related to angiogenesis, such as HIF-1 α and VEGF in breast cancer cells MCF-7 and MDA-MB-231 under hypoxic conditions ²⁹. In another study, our group identified that the hormone increases IGF-1R expression in MDA-MB-231 when related to the apoptotic process ³⁰. However, there are no studies on the modulation of melatonin in IGF-1R and angiogenesis. Activation of the IGF-1R signalling pathway promotes the proliferation, survival, and metastasis of breast cancer cells. When this receptor is blocked, it may also block the expression of HIF-1 α and VEGF ⁹. Under conditions of hypoxia, HIF-1 α is stimulated and its degradation is blocked. It moves to the nucleus, where it will stimulate the expression of several genes that contribute to tumor progression, such as VEGF ⁵⁷. VEGF is widely produced in tumors, generating a vast and chaotic vascular network. This elevated expression is able to form new vessels in a quiescent vasculature, through an initial vasodilation, vascular permeability of pre-existing capillaries. The extravasation of plasma proteins occurs, establishing a matrix where the endothelial cells migrate ⁵⁸.

In summary, our study for the first time demonstrated that melatonin increases miR-152-3p and decreases the protein expression of IGF-1R, HIF-1 α and VEGF in MDA-MB-468 cells and MDA-MB-468 cell line derived xenograft, suggesting a post-transcriptional action of this hormone. Our results contribute to the understanding of the action of melatonin in triple negative breast cancer and in the miR-152 / IGF-1R, HIF-1 α , VEGF pathway. This pathway is well known to contribute to angiogenesis, so melatonin appears as a molecule for adjuvant therapeutic use against this important tumor process.

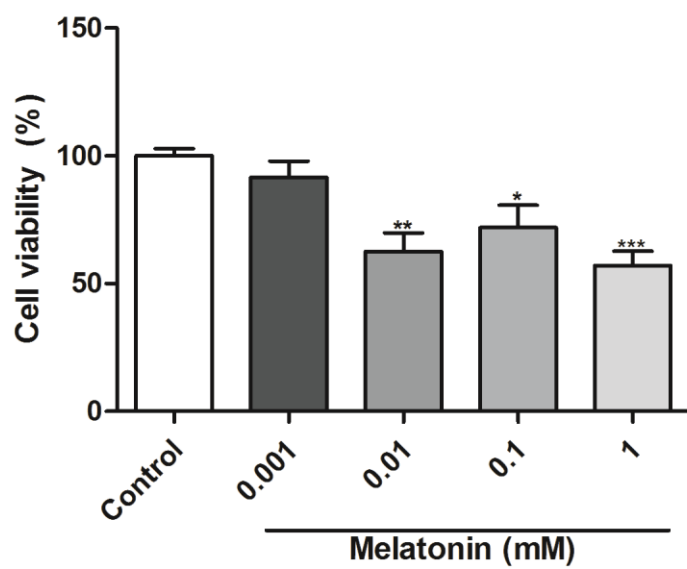
Figures and tables

Table 1. Primary antibodies used in immunocytochemistry and immunohistochemistry techniques and their respective applications

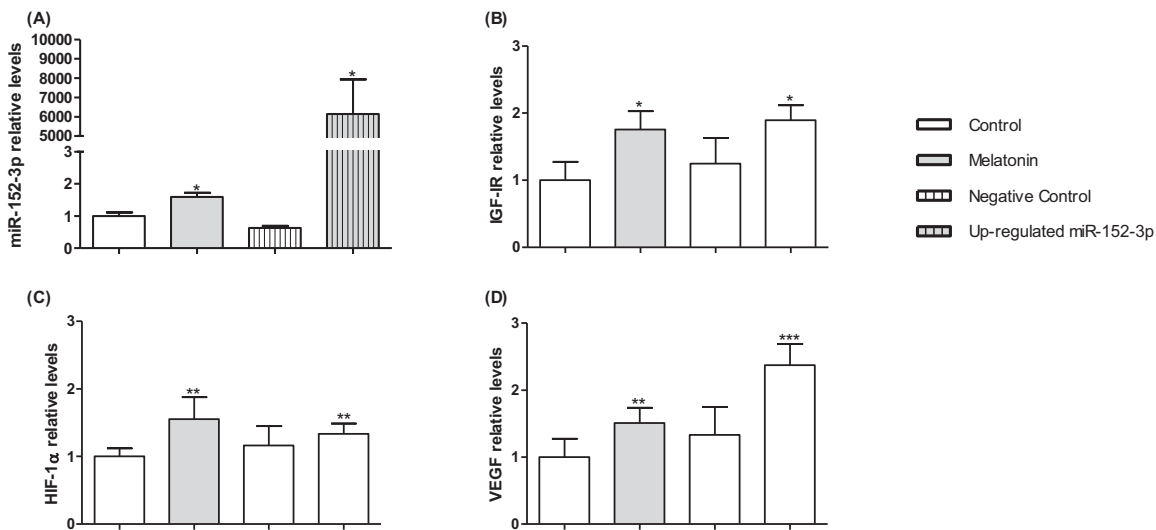
<i>Antibody</i>	<i>Company</i>	<i>Clone</i>	<i>Dilution</i> <i>ICC</i>	<i>Dilution</i> <i>IHC</i>	<i>Marking</i>
IGF-IR	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA	C-terminal	1:50	1:400	Nuclear and cytoplasmatic
VEGF	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA	A-20	1:25	1:50	Nuclear and cytoplasmatic
HIF-1α	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA	H1alpha67	1:25	1:40	Cytoplasmatic

Table 2. Expressed miRNAs after melatonin treatment

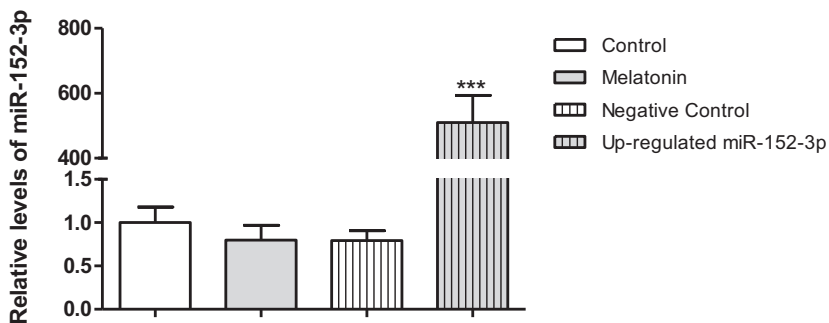
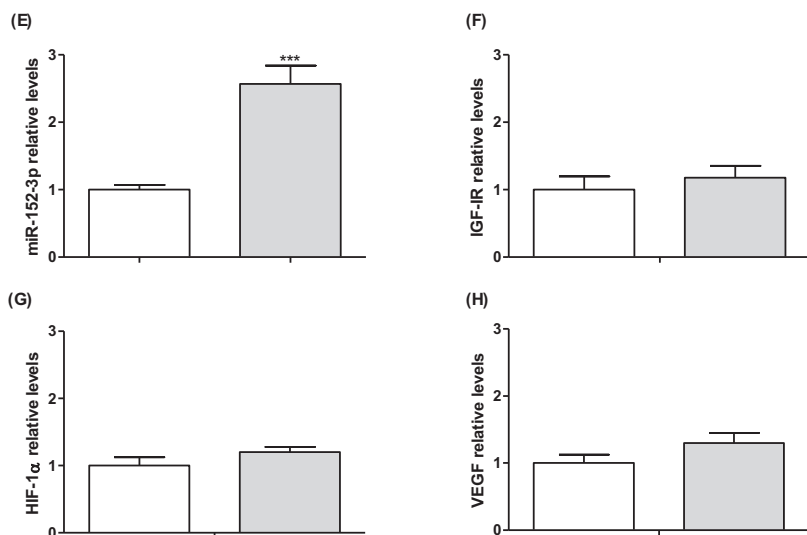
<i>Up-regulated</i> <i>miRNAs</i>	<i>Fold</i> <i>change</i>	<i>p value</i>	<i>Down-regulated</i> <i>miRNAs</i>	<i>Fold</i> <i>change</i>	<i>p value</i>
hsa-let-7c-5p	1,18	0,023	hsa-miR-107	0,83	0,007
hsa-miR-152-3p	1,80	0,019	hsa-miR-10a-5p	0,58	0,047
hsa-miR-182-5p	1,25	0,013	hsa-miR-145-5p	0,91	0,039
hsa-miR-202-3p	1,24	0,024	hsa-miR-15b-5p	0,94	0,011
hsa-miR-214-3p	1,64	0,034	hsa-miR-20a-5p	0,75	0,041
hsa-miR-29b-3p	1,11	0,041	hsa-miR-429	0,62	0,003
			hsa-miR-7-5p	0,50	0,026



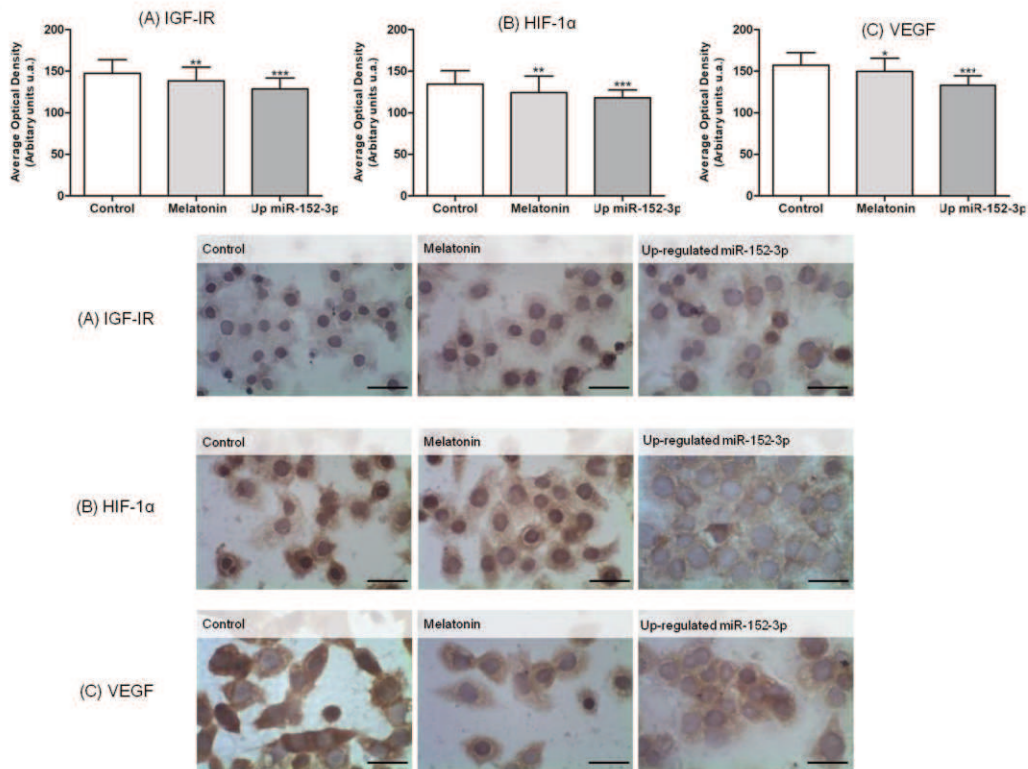
In vitro - MDA-MB-468 cells



In vivo - Animals



In vitro – MDA-MB-468 cells



In vivo – animals

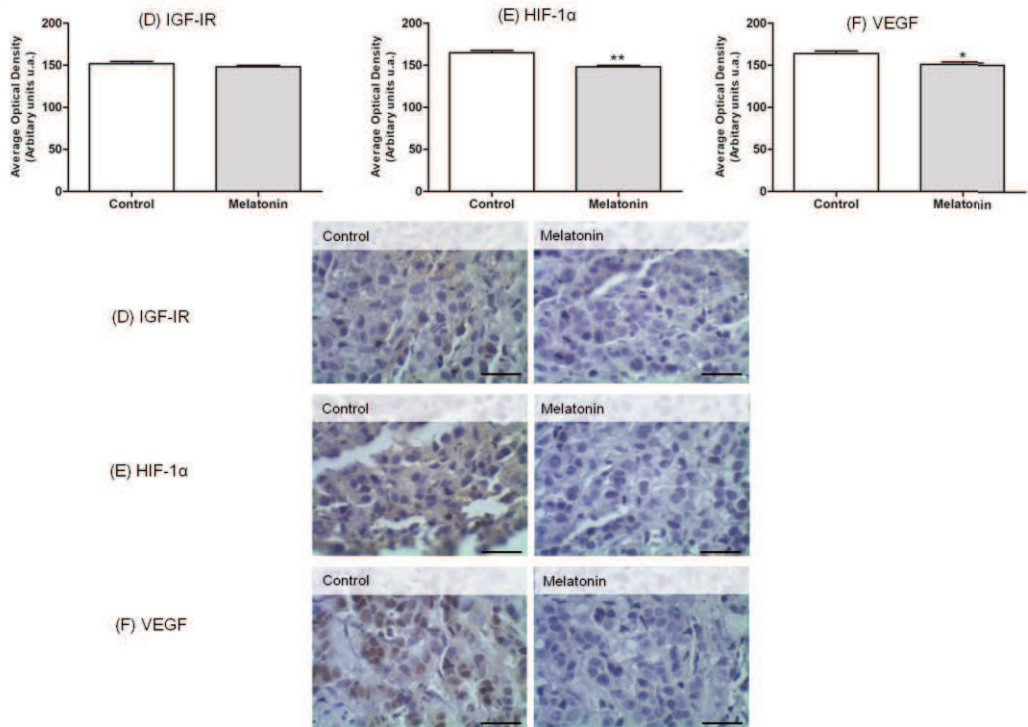


Figure legends

Figure 1. Melatonin modifies cell viability of MDA-MB-468 cells. The cell viability was performed by MTT assay. The MDA-MB-468 cells were treated for 48 hours with different concentrations of melatonin (0.001 mM, 0.01 mM, 0.1 mM and 1 mM). The ideal concentration of melatonin for treatment was 1 mM. The results express the distribution model according to the three experiments performed. The data reveal the mean \pm the Standard Error of Mean (S.E.M.). (* p <0.05, ** p <0.01 and *** p <0.001 treatment versus control). (ANOVA one-way and post-hoc Bonferroni).

Figure 2. Melatonin increases the relative expression of miR-152-3p and its target genes in vitro and in vivo. MDA-MB-468 cells were transfected with Mimic miR-152-3p and subjected to treatment with melatonin (1 mM) for 24 hours. Furthermore, the cells without transfection were implanted in BALB/c nude mice and treated with melatonin (1 mM). The results showed that melatonin increases expression of miR-152-3p (A, E), IGF-IR (B, F), HIF-1 α (C, G) and VEGF (D, H). The up-regulated miR-152-3p also raised the expression of the target genes *in vitro* (B-D). The data were determined on a log₂ scale, since fold change varies with the mean of the Ct \pm SEM of the triplicates of the groups after analysis. (* p <0.05, ** p <0.001 and *** p <0.0001 treatment versus control).

Figure 3. Melatonin does not increase the relative expression of miR-152-3p in MDA-MB-231. MDA-MB-231 cells were transfected with Mimic miR-152-3p and subjected to treatment with melatonin (1 mM) for 24 hours. The results showed that melatonin does not increase expression of miR-152-3p. The data were determined on a log₂ scale, since fold change varies with the mean of the Ct \pm SEM of the triplicates of the groups after analysis. (*** p <0.0001 treatment versus control).

Figure 4. Melatonin decreases protein expression of IGF-IR, HIF-1 α and VEGF by ICC and IHC. MDA-MB-468 cells were transfected with Mimic miR-152-3p and subjected to treatment with melatonin (1 mM) for 24 hours. The results showed that it decreases protein expression of IGF-IR, HIF-1 α and VEGF *in vitro* and *in vivo* (A-F). The up-regulated miR-152-3p decreased the protein expression of the target genes *in vitro* (A-C). Photomicrographs show the reactions for the antibodies anti-IGF-IR (G, J), anti-HIF-1 α (H, K), and anti-VEGF (I, L). The values express the mean \pm S.E.M versus control. The value of the protein expression was quantified by ImageJ program, and the labeling intensity of the different targets observed in the tumors was obtained using Student's t-test (* p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001). Magnification of 40 \times . Bar: 20 μ m. (Up miR-152-3p: Up-regulated miR-152-3p).

REFERENCES

1. Hagrass HA, Sharaf S, Pasha HF, Tantawy EA, Mohamed RH, Kassem R. Circulating microRNAs - a new horizon in molecular diagnosis of breast cancer. *Genes Cancer*. 2015;6(5-6):281-287. doi:10.18632/genesandcancer.66.
2. McGuire A, Brown JAL, Kerin MJ. Metastatic breast cancer: the potential of miRNA for diagnosis and treatment monitoring. *Cancer Metastasis Rev*. 2015;34(1):145-155. doi:10.1007/s10555-015-9551-7.
3. Xu Q, Liu L-Z, Yin Y, et al. Regulatory circuit of PKM2/NF- κ B/miR-148a/152-modulated tumor angiogenesis and cancer progression. *Oncogene*. 2015;34(43):5482-5493. doi:10.1038/onc.2015.6.
4. Wang W, Luo Y. MicroRNAs in breast cancer: oncogene and tumor suppressors

- with clinical potential. *J Zhejiang Univ B*. 2015;16(1):18-31. doi:10.1631/jzus.B1400184.
5. Castañeda-Gill J, Vishwanatha J. Antiangiogenic mechanisms and factors in breast cancer treatment. *J Carcinog*. 2016;15(1):1. doi:10.4103/1477-3163.176223.
 6. Madu C, Li L, Lu Y. Selection, analysis and improvement of anti-angiogenesis compounds identified by an anti-HIF-1 α screening and validation system. *J Cancer*. 2016;7(14):1926-1938. doi:10.7150/jca.15603.
 7. Danza G, Serio C Di, Rosati F, et al. Notch Signalling Modulates Hypoxia - Induced Neuroendocrine. 2015;10(2):230-238. doi:10.1158/1541.
 8. Xu Y, Chen B, George SK, Liu B. Downregulation of microRNA-152 contributes to high expression of DKK1 in multiple myeloma. *RNA Biol*. 2015;12(12):1314-1322. doi:10.1080/15476286.2015.1094600.
 9. Xu Q, Jiang Y, Yin 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.
 10. Flores-Pérez A, Marchat LA, Rodríguez-Cuevas S, et al. Dual targeting of ANGPT1 and TGFBR2 genes by miR-204 controls angiogenesis in breast cancer. *Sci Rep*. 2016;6(1):34504. doi:10.1038/srep34504.
 11. 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. doi:10.1111/j.1600-079X.2009.00684.x.
 12. Cucina A, Proietti S, D'Anselmi F, et al. Evidence for a biphasic apoptotic pathway induced by melatonin in MCF-7 breast cancer cells. *J Pineal Res*. 2009;46(2):172-180. doi:10.1111/j.1600-079X.2008.00645.x.
 13. Martínez-Campa C, González A, Mediavilla MD, et al. Melatonin inhibits aromatase promoter expression by regulating cyclooxygenases expression and activity in breast cancer cells. *Br J Cancer*. 2009;101(9):1613-1619. doi:10.1038/sj.bjc.6605336.
 14. Lee SE, Kim SJ, Youn JP, Hwang SY, Park CS, Park YS. MicroRNA and gene expression analysis of melatonin-exposed human breast cancer cell lines indicating involvement of the anticancer effect. *J Pineal Res*. 2011;51(3):345-

352. doi:10.1111/j.1600-079X.2011.00896.x.
15. Li C, Li G, Tan DX, Li F, Ma X. A novel enzyme-dependent melatonin metabolite in humans. *J Pineal Res.* 2013;54(1):100-106. doi:10.1111/jpi.12003.
 16. Alvarez-García V, González A, Alonso-González C, Martínez-Campa C, Cos S. Antiangiogenic effects of melatonin in endothelial cell cultures. *Microvasc Res.* 2013;87:25-33. doi:10.1016/j.mvr.2013.02.008.
 17. Jardim-Perassi BV, Arbab AS, Ferreira LC, et al. Effect of melatonin on tumor growth and angiogenesis in xenograft model of breast cancer. *PLoS One.* 2014;9(1). doi:10.1371/journal.pone.0085311.
 18. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. the *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell.* 1993;75:843-854. doi:10.1016/0092-8674(93)90529-Y.
 19. Calin GA, Ferracin M, Cimmino A, et al. A MicroRNA Signature Associated with Prognosis and Progression in Chronic Lymphocytic Leukemia. *N Engl J Med.* 2005;353(17):1793-1801. doi:10.1056/NEJMoa050995.
 20. Kutanzi KR, Yurchenko O V., Beland FA, Checkhun VF, Pogribny IP. MicroRNA-mediated drug resistance in breast cancer. *Clin Epigenetics.* 2011;2(2):171-185. doi:10.1007/s13148-011-0040-8.
 21. O'Day E, Lal A. MicroRNAs and their target gene networks in breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2010;12(2):201. doi:10.1186/bcr2484.
 22. Bertoli G, Cava C, Castiglioni I. Micrnas: New biomarkers for diagnosis, prognosis, therapy prediction and therapeutic tools for breast cancer. *Theranostics.* 2015;5(10):1122-1143. doi:10.7150/thno.11543.
 23. Sengupta D, Deb M, Rath SK, et al. DNA methylation and not H3K4 trimethylation dictates the expression status of miR-152 gene which inhibits migration of breast cancer cells via DNMT1/CDH1 loop. *Exp Cell Res.* 2016;346(2):176-187. doi:10.1016/j.yexcr.2016.07.023.
 24. Liu X, Li J, Qin F, Dai S. MiR-152 as a tumor suppressor microRNA: Target recognition and regulation in cancer. *Oncol Lett.* 2016;11(6):3911-3916. doi:10.3892/ol.2016.4509.
 25. Reiter R, Rosales-Corral S, Tan D-X, et al. Melatonin, a Full Service Anti-Cancer Agent: Inhibition of Initiation, Progression and Metastasis. *Int J Mol Sci.*

- 2017;18(4):843. doi:10.3390/ijms18040843.
26. 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):373-380. doi:10.1111/jpi.12007.
 27. González-González A, González A, Alonso-González C, Menéndez-Menéndez J, Martínez-Campa C, Cos S. 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):433-441. doi:10.3892/or.2017.6070.
 28. B. Maschio-Signorini L, B. Gelaleti G, G. Moschetta M, et al. Melatonin Regulates Angiogenic and Inflammatory Proteins in MDA-MB-231 Cell Line and in Co-culture with Cancer-associated Fibroblasts. *Anticancer Agents Med Chem.* 2016;16(11):1474-1484. doi:10.2174/1871520616666160422105920.
 29. Jardim-Perassi BV, Lourenço MR, Doho GM, et al. Melatonin Regulates Angiogenic Factors under Hypoxia in Breast Cancer Cell Lines. *Anticancer Agents Med Chem.* 2016;16(3):347-358. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25963143>. Accessed November 9, 2017.
 30. Gelaleti GB, Borin TF, Maschio-Signorini LB, 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. doi:10.1016/j.lfs.2017.06.013.
 31. Shenouda SK, Alahari SK. MicroRNA function in cancer: Oncogene or a tumor suppressor? *Cancer Metastasis Rev.* 2009;28(3-4):369-378. doi:10.1007/s10555-009-9188-5.
 32. Goradel NH, Asghari MH, Moloudizargari M, Negahdari B, Haghi-Aminjan H, Abdollahi M. Melatonin as an angiogenesis inhibitor to combat cancer: Mechanistic evidence. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2017;335:56-63. doi:10.1016/j.taap.2017.09.022.
 33. Seiffert K, Schmalfeldt B, Müller V, Therapieansätze N, Subtypen D, Hormon-ZT. Zielgerichtete Therapie des Mammakarzinoms Einführung Zielgerichtete Therapie des HER2-. *Dtsch med Wochenschr.* 2017;142(22):1669-1675. doi:10.1055/S-0043-108468.
 34. Azimi I, Petersen RM, Thompson EW, Roberts-Thomson SJ, Monteith GR.

- Hypoxia-induced reactive oxygen species mediate N-cadherin and SERPINE1 expression, EGFR signalling and motility in MDA-MB-468 breast cancer cells. 2017;(October 2016):1-11. doi:10.1038/s41598-017-15474-7.
35. Garbati P, Ravera S, Scarfi S, et al. Effects on Energy Metabolism of Two Guanidine Molecules, (Boc)₂-Creatine and Metformin. *J Cell Biochem.* 2017;118(9):2700-2711. doi:10.1002/jcb.25914.
 36. Wei L, Li K, Pang X, et al. Leptin promotes epithelial-mesenchymal transition of breast cancer via the upregulation of pyruvate kinase M2. *J Exp Clin Cancer Res.* 2016;35(1):166. doi:10.1186/s13046-016-0446-4.
 37. Chang LC, Yu YL, Hsieh MT, et al. A novel microtubule inhibitor, MT3-037, causes cancer cell apoptosis by inducing mitotic arrest and interfering with microtubule dynamics. *Am J Cancer Res.* 2016;6(4):747-763.
 38. Chinchar E, Makey KL, Gibson J, et al. Sunitinib significantly suppresses the proliferation, migration, apoptosis resistance, tumor angiogenesis and growth of triple-negative breast cancers but increases breast cancer stem cells. *Vasc Cell.* 2014;6(1):12. doi:10.1186/2045-824X-6-12.
 39. Li Y, Li S, Zhou Y, et al. Melatonin for the prevention and treatment of cancer. *Oncotarget.* 2017;8(24):39896-39921. doi:10.18632/oncotarget.16379.
 40. Hill SM, Spriggs LL, Simon MA, Muraoka H, Blask DE. The growth inhibitory action of melatonin on human breast cancer cells is linked to the estrogen response system. *Cancer Lett.* 1992;64(3):249-256.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1638517>. Accessed January 6, 2018.
 41. Hevia D, González-Menéndez P, Quiros-González I, et al. Melatonin uptake through glucose transporters: a new target for melatonin inhibition of cancer. *J Pineal Res.* 2015;58(2):234-250. doi:10.1111/jpi.12210.
 42. Leman ES, Sisken BF, Zimmer S, Anderson KW. Studies of the interactions between melatonin and 2 Hz, 0.3 mT PEMF on the proliferation and invasion of human breast cancer cells. *Bioelectromagnetics.* 2001;22(3):178-184.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11255213>. Accessed January 6, 2018.
 43. Hill SM, Frasc T, Shulin Xiang, Lin Yuan, Duplessis T, Lulu Mao. Molecular Mechanisms of Melatonin Anticancer Effects. *Integr Cancer Ther.* 2009;8(4):337-346. doi:10.1177/1534735409353332.

44. Han HB, Gu J, Zuo HJ, et al. Let-7c functions as a metastasis suppressor by targeting MMP11 and PBX3 in colorectal cancer. *J Pathol.* 2012;226(3):544-555. doi:10.1002/path.3014.
45. Yi S-J, Li L-L, Tu W-B. MiR-214 negatively regulates proliferation and WNT/ β -catenin signaling in breast cancer. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2016;20(24):5148-5154. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28051254>. Accessed November 13, 2017.
46. Li Y, Cai B, Shen L, et al. MiRNA-29b suppresses tumor growth through simultaneously inhibiting angiogenesis and tumorigenesis by targeting Akt3. *Cancer Lett.* 2017;397(2):111-119. doi:10.1016/j.canlet.2017.03.032.
47. Zhang L, Ma P, Sun L, et al. MiR-107 down-regulates SIAH1 expression in human breast cancer cells and silencing of miR-107 inhibits tumor growth in a nude mouse model of triple-negative breast cancer. *Mol Carcinog.* 2016;55(5):768-777. doi:10.1002/mc.22320.
48. Kedmi M, Ben-Chetrit N, Körner C, et al. EGF induces microRNAs that target suppressors of cell migration: miR-15b targets MTSS1 in breast cancer. *Sci Signal.* 2015;8(368):ra29. doi:10.1126/scisignal.2005866.
49. Liu L, He J, Wei X, et al. MicroRNA-20a-mediated loss of autophagy contributes to breast tumorigenesis by promoting genomic damage and instability. *Oncogene.* 2017;(1):5874-5884. doi:10.1038/onc.2017.193.
50. Gu J, Lu Z, Ji C, et al. Melatonin inhibits proliferation and invasion via repression of miRNA-155 in glioma cells. *Biomed Pharmacother.* 2017;93:969-975. doi:10.1016/j.biopha.2017.07.010.
51. Mori F, Ferraiuolo M, Santoro R, et al. Multitargeting activity of miR-24 inhibits long-term melatonin anticancer effects. *Oncotarget.* 2016;7(15):20532-20548. doi:10.18632/oncotarget.7978.
52. Maimaitiming A, Wusiman A, Aimudula A, Tudahong T, Aisimutula D. Downregulation of MicroRNA-152 and Inhibition of Cell Proliferation, Migration, and Invasion in Breast Cancer. *Oncol Res Featur Preclin Clin Cancer Ther.* 2017. doi:10.3727/096504017X14974821032421.
53. Zhang H, Li Y, Lai M. The microRNA network and tumor metastasis. *Oncogene.* 2010;29(7):937-948. doi:10.1038/onc.2009.406.

54. Zhou X, Wang Z-N, Zhao F, et al. Altered expression of miR-152 and miR-148a in ovarian cancer is related to cell proliferation. *Oncol Rep.* 2012;27(2):447-454. doi:10.3892/or.2011.1482.
55. Zhai R, Kan X, Wang B, et al. miR-152 suppresses gastric cancer cell proliferation and motility by targeting CD151. *Tumor Biol.* 2014;35(11):11367-11373. doi:10.1007/s13277-014-2471-2.
56. Bahnassy A, Mohanad M, Ismail MF, Shaarawy S, El-Bastawisy A, Zekri ARN. Molecular biomarkers for prediction of response to treatment and survival in triple negative breast cancer patients from Egypt. *Exp Mol Pathol.* 2015;99(2):303-311. doi:10.1016/j.yexmp.2015.07.014.
57. Vriend J, Reiter RJ. Melatonin and the von Hippel-Lindau/HIF-1 oxygen sensing mechanism: A review. *Biochim Biophys Acta - Rev Cancer.* 2016;1865(2):176-183. doi:10.1016/j.bbcan.2016.02.004.
58. Bergers G, Benjamin LE. Angiogenesis: Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer.* 2003;3(6):401-410. doi:10.1038/nrc1093.

Author contributions

J.H.M.M. performed all in vitro experiments and analyzed the data obtained. J.H.M.M. and J.G.O. performed the PCR assay and analyzed the data obtained. A.L.M. and T.B.C. performed all in vivo experiments and analyzed the data obtained. J. P. S. performed PCR assay for MDA-MB-231 cell line. A.F.A. performed the cell viability assay and contributed for the analyses and the writing of the manuscript. J.Z.L., L.C.F and D.A.P.C.Z. supervised the in vitro and in vivo studies, analyzed the data and contributed to the writing of the manuscript.

Figure legends

Figure 1. Melatonin modifies cell viability of MDA-MB-468 cells. The cell viability was performed by MTT assay. The MDA-MB-468 cells were treated for 48 hours with different concentrations of melatonin (0.001 mM, 0.01 mM, 0.1 mM and 1 mM). The ideal concentration of melatonin for treatment was 1 mM. The results express the distribution model according to the three experiments performed. The data reveal the mean \pm the Standard Error of Mean (S.E.M.). (* p <0.05, ** p <0.01 and *** p <0.001 treatment versus control). (ANOVA one-way and post-hoc Bonferroni).

Figure 2. Melatonin increases the relative expression of miR-152-3p and its target genes in vitro and in vivo. MDA-MB-468 cells were transfected with Mimic miR-152-3p and subjected to treatment with melatonin (1 mM) for 24 hours. Furthermore, the cells without transfection were implanted in BALB/c nude mice and treated with melatonin (1 mM). The results showed that melatonin increases expression of miR-152-3p (**A, E**), IGF-IR (**B, F**), HIF-1 α (**C, G**) and VEGF (**D, H**). The up-regulated miR-152-3p also raised the expression of the target genes *in vitro* (**B-D**). The data were determined on a log₂ scale, since fold change varies with the mean of the Ct \pm SEM of the triplicates of the groups after analysis. (* p <0.05, ** p <0.001 and *** p <0.0001 treatment versus control).

Figure 3. Melatonin does not increase the relative expression of miR-152-3p in MDA-MB-231. MDA-MB-231 cells were transfected with Mimic miR-152-3p and subjected to treatment with melatonin (1 mM) for 24 hours. The results showed that melatonin does not increase expression of miR-152-3p. The data were determined on a log₂ scale, since fold change varies with the mean of the Ct \pm SEM of the triplicates of the groups after analysis. (*** p <0.0001 treatment versus control).

Figure 4. Melatonin decreases protein expression of IGF-IR, HIF-1 α and VEGF by ICC and IHC. MDA-MB-468 cells were transfected with Mimic miR-152-3p and subjected to treatment with melatonin (1 mM) for 24 hours. The results showed that it decreases protein expression of IGF-IR, HIF-1 α and VEGF *in vitro* and *in vivo* (**A-F**). The up-regulated miR-152-3p decreased the protein expression of the target genes *in vitro* (**A-C**). Photomicrographs show the reactions for the antibodies anti-IGF-IR (**G, J**), anti-HIF-1 α (**H, K**), and anti-VEGF (**I, L**). The values express the mean \pm S.E.M versus control. The value of the protein expression was quantified by ImageJ program, and the labeling intensity of the different targets observed in the tumors was obtained using Student's t-test (* p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001). Magnification of 40 \times . Bar: 20 μ m. (Up miR-152-3p: Up-regulated miR-152-3p).

VII. ANEXOS

VII. ANEXOS

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Investigação Molecular no Câncer (LIMC) da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP.

Apoio financeiro na forma de bolsa de estudos fornecida pela CAPES no período 10/2016 a 02/2017 e pela FAPESP (Processo n° 2016/14280-3) no período 03/2017 a 02/2018 e recursos para o desenvolvimento do trabalho na forma de Auxílio à Pesquisa FAPESP (2015/04780-6).