



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

---

**André de Lima Mota**

**Ação da melatonina no microambiente  
tumoral anaeróbico verificada por  
marcadores de hipóxia e metabolismo  
energético em modelo experimental de  
câncer de mama**

**São José do Rio Preto  
2017**

**André de Lima Mota**

**Ação da melatonina no microambiente tumoral  
anaeróbico verificada por marcadores de hipóxia  
e metabolismo energético em modelo  
experimental de câncer de mama**

**Dissertação apresentada à Faculdade  
de Medicina de São José do Rio Preto  
para obtenção do Título de Mestre no  
programa de Pós-Graduação em  
Ciências da Saúde, Eixo Temático:  
Medicina e Ciências Correlatas.**

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

São José do Rio Preto  
2017

Mota, André de Lima

Ação da melatonina no microambiente tumoral anaeróbico verificada por marcadores de hipóxia e metabolismo energético em modelo experimental de câncer de mama

São José do Rio Preto, 2017

98p

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

Eixo Temático: Medicina e Ciências Correlatas

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

1. Câncer de mama; 2. Hipóxia; 3. Heterogeneidade intratumoral; 4. Melatonina; 5. HIF-1 $\alpha$ .

---

André de Lima Mota

Ação da melatonina no microambiente tumoral  
anaeróbico verificada por marcadores de hipóxia e  
metabolismo energético em modelo experimental 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:** \_\_\_\_\_

**3º Examinador:** \_\_\_\_\_

**Suplentes:** \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

São José do Rio Preto, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2017.

## SUMÁRIO

Dedicatória.....	i
Agradecimentos .....	iii
Epígrafe .....	viii
Lista de Abreviaturas e Símbolos .....	x
Resumo .....	xiii
Abstract .....	xv
1. INTRODUÇÃO .....	2
1.3 Objetivo Geral .....	11
1.3.1 Objetivos específicos .....	11
2. RESULTADOS .....	14
Artigo 1 .....	15
Artigo 2 .....	48
3. CONCLUSÃO .....	67
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	69

# *Dedicatória*

---

Com muito amor, dedico este trabalho à minha mãe Odilia, meu porto seguro, que sempre me supre de forças. Ao meu Pai José, um exemplo de superação, caráter e honestidade. Aos meus irmãos, Joslaine e Wellington pelo incentivo e companheirismo e à minha amada, Amanda, por toda a força provinda de nosso amor.

# *Agradecimientos*



É neste momento tão especial, após a superação de complexos desafios, que venho expressar minha sincera e eterna gratidão a tantos adoráveis familiares e amigos, aos de longa data e aos que surgiram durante esse árduo percurso. Considerando as inúmeras pessoas que me auxiliaram nesta trajetória, sinto-me incapaz de expressar de forma equiparada, o meu muitíssimo obrigado. É difícil demonstrar o quanto foram valorosas essas energias verdadeiramente positivas. O desafio era grande, mas o incentivo e o companheirismo de pessoas tão queridas eram imensos, transformavam momentos de ansiedade e angústia em momentos de calma e perseverança.

Com amor e gratidão, agradeço ao meu Pai José de Sousa Mota, pelo apoio e incentivo desde os momentos iniciais deste longo percurso, exprimindo confiança nos momentos mais difíceis, com sua inestimável compreensão e amor que tanto me fortalecem.

Com amor imensurável e eterna gratidão, agradeço à minha mãe Odília Alves de Lima Mota, minha eterna fonte de inspiração, força e amor. Agradeço por tudo que sempre fez e continua fazendo para a concretização de meus objetivos. Você me ensinou a ser forte, confiante e sempre ir à luta com honestidade e caráter. Dentre tantas coisas ensinadas por você, as mais importantes foram confiar e agradecer à Deus, sem Ele não somos nada. Sempre existe um amanhecer onde Deus renova nossas forças para prosseguir. Sua confiança, seus conselhos, seus gestos de compreensão, carinho, afeto, ternura e amor são essenciais para que eu continue firme, sempre focado em meus objetivos e metas. Como sempre digo, você é, e sempre será a mulher de minha vida, o amor que tenho por você é infinito, “ Te amo para sempre”.

Aos meus familiares, em especial aos meus irmãos Joslaine de Lima Mota e Wellington de Lima Mota, aos meus avós João e Antônia, à minha tia Olinda, minha

madrinha Ozélia, meu saudoso e inesquecível tio Ogue e demais tios e primos que sempre se dispuseram a incentivos tão necessários durante todo o decorrer de meus estudos. Obrigado por tudo, amo cada um de vocês!

Aos meus maiores tesouros, minha namorada Amanda Gonçalves e minha filhinha Alice Gonçalves Mota que em breve nascerá, obrigado pelo amor, combustível que me traz humanidade e forças ilimitadas na luta pelo nosso futuro. Deus as façam felizes! Aos meus sogros e amigos Sérgio Gonçalves e Erika Gonçalves que sempre me proporcionaram dias de descontração e alegria, além de todo o incentivo e apoio fornecidos.

Aos meus queridos amigos de infância Danilo Daroz e Rômulo Monteiro, aos meus amigos de escola Felipe, Bruno, Marlos e Carlos e a todos meus amigos e notáveis músicos de banda, entre eles Sidnei, Arthur, Juliano, Rodolfo, Henrique e Luiz obrigado pela sincera amizade e por me proporcionarem momentos de descontração.

À minha orientadora de iniciação científica, Profa. Dra. Márcia M. C. Marques Silveira. Obrigado pelo acolhimento, por acreditar no meu trabalho e pelos ensinamentos científicos a mim transmitidos com tanta eficiência. Pela oportunidade de estágio e iniciação científica durante a graduação que tanto me enriqueceram e permitiram conhecer os caminhos da pesquisa.

À minha orientadora, Profa. Dra. Débora Zuccari, minha gigantesca gratidão, carinho e admiração. Obrigado pela orientação, estímulo e credibilidade que tanto me auxiliaram durante todo o percurso deste mestrado. Agradeço pelo apoio em todos os momentos, por acreditar em meu trabalho e colaborar de forma essencial para o meu desenvolvimento científico e pessoal. Sou eternamente grato pela oportunidade de conviver e aprender contigo!

À minha co-orientadora, Dra. Bruna Jardim Perassi pelos ensinamentos, paciência e dedicação. Agradeço ainda a colaboração em cada etapa deste trabalho com críticas construtivas. MUITÍSSIMO OBRIGADO!

Ao amigo e companheiro de bancada Tialfi Castro, o qual durante este período fui padrinho de casamento, pela amizade, pelas viagens e pelos cafés recheados de descontrações e reflexões que tanto acrescentaram aos meus estudos e à minha vida pessoal. Obrigado pela energia positiva.

Aos amigos do grupo de pesquisa (LIMC), Fabrício Ventura, Jucimara Colombo, Jéssica Mora, Jéssica Oliveira, Jéssica Lacerda, Beatriz Lopes, Paulo Custódio, Lívia Carvalho, Marina Moschetta, Nathália Sonehara, Rubens de Paula, Victor Keniti e Vinicius Pierri pela amizade, parceria e contribuição em momentos importantes deste trabalho.

À todas as pessoas que auxiliaram na realização dos diferentes experimentos deste estudo, em especial, Emerson Bernardes (IPEN), Bruno Cogliati (USP) e Roger Chamas (ICESP). O meu muito obrigado pela parceria.

Ao Company of Biologists pela importante premiação de nosso trabalho, fornecendo recursos financeiros imprescindíveis para a apresentação de nossos resultados no NCRI Conference na cidade de Liverpool.

À Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto e ao Hospital de Base de São José do Rio Preto, pela cooperação e apoio institucional.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da FAMERP e todos os seus colaboradores, pela oportunidade oferecida, atenção e eficiência, auxiliando-me em todos os processos necessários.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo essencial apoio financeiro destinado à todas as etapas deste trabalho.

Finalizando, agradeço à Deus e a todos que estiveram comigo ao longo do meu mestrado, aqueles que gentilmente a mim dedicaram seu tempo, atenção e carinho. Agradeço pelos conselhos e ensinamentos tão necessários ao meu desenvolvimento pessoal e científico.

# *Epígrafe*

*“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o  
que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê”  
(Arthur Schopenhauer)*

## *Lista de Abreviaturas e Símbolos*

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

$\alpha$	Alfa
$\beta$	Beta
$\Delta$	Delta
$\mu\text{L}$	Microlitro
$\chi$	Qui
%	Porcentagem
/	Por
<	Menor
>	Maior
$\geq$	Maior ou igual
®	Marca registrada
<b>13-HODE</b>	Ácido 13- hidroxidienoico
<b>ACTB</b>	Beta actina
<b>ANOVA</b>	Análise de Variância
<b>CA</b>	Anidrases carbônicas
<b>CA-IX</b>	Anidrase carbônicas 9
<b>CA-XII</b>	Anidrase carbônica 12
<b>cAMP</b>	Adenosina monofosfato cíclica
<b>CO<sub>2</sub></b>	Dióxido de carbono
<b>FDG</b>	Fluorodesoxiglicose
<b>GLUT-1</b>	Transportador de glicose tipo 1
<b>GLUT-3</b>	Transportador de glicose tipo 3
<b>HIFs</b>	Fatores de transcrição induzidos pela hipóxia
<b>HIF-1<math>\alpha</math></b>	Fator de transcrição induzido por hipóxia 1-alpha
<b>INCA</b>	Instituto Nacional do Câncer
<b>MCTs</b>	Transportadores de monocarboxilato
<b>miRNA</b>	MicroRNA
<b>mm<sup>3</sup></b>	Milímetros Cúbicos



<b>MT1</b>	Receptor de melatonina tipo 1
<b>MT2</b>	Receptor de melatonina tipo 2
<b>O<sub>2</sub></b>	Oxigênio
<b>PET/CT</b>	Positron Emission Tomography/Computed Tomography
<b>PHDs</b>	Enzimas prolilhidroxilase
<b>pHe</b>	PH extracelular
<b>pHi</b>	PH intracelular
<b>pO<sub>2</sub></b>	Pressão parcial de oxigênio
<b>pVHL</b>	Von Hippel-Lindau
<b>RE</b>	Receptor de estrógeno
<b>ROS</b>	Espécies reativas de oxigênio
<b>RP</b>	Receptor de progesterona
<b>RZR/ROR</b>	Receptor Z para retinoide / receptor órfão para retinoide

## *Resumo*

## RESUMO

**Introdução** - O câncer de mama é o mais comum entre as mulheres, e apresenta alta taxa de mortalidade. O rápido crescimento tumoral dificulta a perfusão de O<sub>2</sub>, principalmente na região central do tumor, assim condições adversas no microambiente tumoral, como hipóxia e acidose, podem exercer pressão seletiva no microambiente tumoral, selecionando subpopulações de células tumorais com vantagens para sobrevivência em tal ambiente. Neste contexto, agentes terapêuticos com potencial para serem utilizados no controle destas condições precisam ser explorados. A melatonina, além de seus efeitos fisiológicos tem demonstrado importantes ações antitumorais e, recentemente, tem sido associada ao controle da hipóxia e do efeito Warburg em células tumorais. **Objetivos** – Avaliar a ação da melatonina na viabilidade celular, crescimento tumoral e no controle do metabolismo do tumor, verificado através da expressão de marcadores relacionados à hipóxia e metabolismo energético (HIF-1 $\alpha$ , transportadores de glicose GLUT-1, GLUT-3 e anidrases carbônicas IX e XII), em modelos *in vitro* e *in vivo* de câncer de mama triplo negativo. **Métodos** - A viabilidade celular *in vitro* foi investigada pelo ensaio MTT (methyl-thiazol-tetrazolium) e a expressão gênica e proteica por meio de PCR em tempo real e imunocitoquímica, respectivamente. A ação da melatonina foi verificada *in vivo*, utilizando camundongos Balb/c nude atímicos inoculados com células MDA-MB-231 (modelo de xenoinxerto). Crescimento tumoral e necrose foram avaliados por imagens obtidas por tomografia por emissão de pósitrons (PET/CT). **Resultados** - O tratamento com melatonina reduziu a viabilidade das células MDA-MB-231 e controlou o crescimento tumoral e necrose em camundongos Balb/c nude ( $p < 0,05$ ). O tratamento também diminuiu a expressão gênica e proteica de HIF-1 $\alpha$  concomitantemente com a expressão dos marcadores do metabolismo energético ( $p < 0,05$ ). **Conclusão** - Tomados em conjunto, estes resultados mostram que a melatonina regula negativamente a expressão de HIF-1 $\alpha$  e conseqüentemente, atua na regulação dos marcadores do metabolismo energético (GLUT-1, GLUT-3, CA-IX and CA-XII) em células de tumor de mama, controlando a hipóxia e progressão tumoral.

**Palavras-chave:** Câncer de mama. Hipóxia. Heterogeneidade intratumoral. Melatonina. HIF-1 $\alpha$ .

*Abstract*

## ABSTRACT

**Introduction** - Breast cancer is the most common cancer among women and has a high mortality rate. The rapid tumor growth hinders the infusion of O<sub>2</sub>, mainly in the central region of the tumor, thus, adverse conditions in the tumor microenvironment, such as hypoxia and acidosis, may exert selective pressure on the tumor, selecting subpopulations of tumor cells with advantages for survival in this environment. In this context, therapeutic agents that can be used to control these conditions, and consequently the intratumoral heterogeneity need to be explored. Melatonin, in addition to its physiological effects has demonstrated important anti-tumor actions and recently has been associated with the control of hypoxia and Warburg effect. **Objetives** - In this study, we evaluated the action of melatonin on cell viability, tumor growth and tumor metabolism evaluated by different markers of hypoxia and energy metabolism (HIF-1 $\alpha$ , glucose transporters GLUT1 and GLUT3 and carbonic anhydrases CA-IX and CA-XII) in triple negative breast cancer *in vitro* and *in vivo* model. **Methods** - *In vitro* cell viability was investigated by the MTT (methyl-thiazole-tetrazolium) assay and gene and protein expressions by quantitative real-time PCR and immunocytochemistry, respectively. Melatonin effects were tested *in vivo*, using athymic nude mice injected with MDA-MB-231 cells (xenograft model). Tumor growth and necrosis were evaluated by images obtained by positron emission tomography (PET / CT). **Results** - Results showed that melatonin treatment reduced the viability of MDA-MB-231 cells and controls tumor growth and necrosis in Balb/c nude mice (p <0.05). The treatment also decreased HIF-1 $\alpha$  gene and protein expression, concomitantly with the expression of energy metabolism markers (p <0.05). **Conclusion** - Taken together, these results show that melatonin down-regulates HIF-1 $\alpha$  expression and consequently, it can regulates energy metabolism markers (GLUT-1, GLUT-3, CA-IX and CA-XII) in breast tumor cells, controlling hypoxia and tumor progression.

**Keywords:** Breast cancer. Hypoxia. Intratumoral heterogeneity. Melatonin. HIF-1 $\alpha$ .

# *Introdução*

---

## 1. INTRODUÇÃO

O câncer de mama representa o segundo tipo de neoplasia maligna mais frequente no mundo, e o mais comum entre as mulheres, sendo a quinta maior causa de morte relacionada ao câncer <sup>1</sup>. A Organização Mundial da Saúde estima que, por ano, ocorram mais de 1.050.000 novos casos de câncer de mama em todo o mundo. No Brasil, dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA) estimaram a ocorrência de 57.960 casos de câncer de mama para o ano de 2016 <sup>1</sup>. Esses dados são preocupantes visto que o câncer de mama possui elevada taxa de mortalidade <sup>2,3</sup>, sendo o que mais causa mortes entre as mulheres no Brasil desde 1979 <sup>1</sup>. As taxas de mortalidade por câncer de mama continuam elevadas, principalmente porque a doença é frequentemente diagnosticada em estágios avançados e os tumores mamários apresentam grande heterogeneidade, tanto em nível histopatológico como molecular, ocasionando dificuldades na compreensão dos mecanismos de resistência a terapias e no desenvolvimento de novos fármacos eficazes <sup>4,5</sup>. Em um estudo em que foi possível a identificação de variações no padrão de expressão de mais de 8.000 genes em 42 pacientes com câncer de mama, Perou *et al.* (2000) classificaram os tumores mamários em 4 subtipos moleculares: tumores triplo negativo (ou *basal-like*), luminal A, luminal B e HER2-positivo <sup>6</sup>. As diferenças moleculares encontradas nestes quatro grupos refletem em diferenças clínicas relevantes e de resposta ao tratamento. O subtipo triplo negativo é caracterizado como o mais agressivo visto que além de possuir características metastáticas, não expressa receptores alvo de resposta a terapias <sup>7</sup>.

Os tumores sólidos são reconhecidos por um microambiente complexo que envolve interações de diferentes componentes celulares e moleculares <sup>8,9</sup>; estando sujeito a condições de neovascularização, oxigenação e necrose tecidual <sup>10-13</sup>. Cerca de

40% dos tumores mamários apresentam regiões de hipóxia, esta condição tem sido associada ao aumento da taxa de metástase, recorrência e diminuição na taxa de sobrevivência dos pacientes <sup>14-16</sup>. Durante seu crescimento, o tumor pode alcançar aproximadamente 1-2 mm<sup>3</sup> antes que suas demandas metabólicas sejam restritas devido ao limite de difusão de oxigênio e nutrientes no local <sup>17</sup>. A baixa oxigenação é caracterizada como hipóxia, resultante da proliferação celular descontrolada, rápido crescimento tumoral e consequente perfusão inadequada em parte do tecido, principalmente, na região central do tumor <sup>18-21</sup>. Hipóxia intratumoral é considerada uma condição que remete a um prognóstico ruim em pacientes com câncer, sendo associada com quimiorresistência, radiorresistência, promoção da angiogênese, invasão e metástase em diferentes tipos de tumores <sup>22-24</sup>.

Condições adversas no microambiente tumoral, como a hipóxia, podem exercer uma pressão seletiva durante a evolução do tumor, criando e selecionando subpopulações com adaptações vantajosas. Desta forma, são gerados grupos distintos de células tumorais, isto é, células com comportamentos funcionais diferenciados e organizados em diferentes locais sub-anatômicos dentro do tumor <sup>25-30</sup>.

O efeito da hipóxia sob as células tumorais é multifacetado, podendo promover apoptose e necrose, ou induzir a expressão de um grande número de genes, visando a adaptação e sobrevivência celular em condições adversas que o microambiente tumoral intrinsecamente proporciona. Hipóxia, acidose e estresse oxidativo são exemplos de condições que contribuem para a ativação de mecanismos adaptativos durante o crescimento tumoral, fazendo a “seleção natural” de subpopulações com fenótipo agressivo, proliferativo e metastático dentro do próprio tumor <sup>21,31-33</sup>. Cada subpopulação apresentará um perfil gênico e proteico distinto, e que difere quanto à



agressividade e à sensibilidade ao tratamento, caracterizando a heterogeneidade intratumoral<sup>34-36</sup>. Como relatado por Samanta *et al.* (2015) a expressão de fatores de transcrição induzidos pela hipóxia (HIFs) e seus genes alvo, conduzem o aumento da resistência a múltiplos fármacos, podendo agravar o fenótipo tumoral e aumentar a disseminação tumoral<sup>37</sup>.

Inúmeros são os mecanismos adaptativos de sobrevivência desenvolvidos pelas células neoplásicas em condições adversas no microambiente tumoral. Nesse contexto, proteínas relacionadas a alterações no metabolismo energético e oxigenação tecidual são especialmente importantes.

As células tumorais sofrem adaptações à hipóxia, principalmente pela ativação do fator de transcrição induzido por hipóxia (HIF-1)<sup>38-40</sup>. O HIF-1 é o principal componente na resposta celular à hipóxia, é um fator de transcrição heterodímero que consiste de duas subunidades HIF-1 $\alpha$  e HIF-1 $\beta$ <sup>33</sup>. Em condições fisiológicas normais, o HIF-1 $\beta$  é constitutivamente expresso e o HIF-1 $\alpha$  é mantido em baixos níveis<sup>41</sup>. HIF-1 $\alpha$  é hidroxilado por enzimas prolin hidroxilase (PHDs), após sua hidroxilação, este é reconhecido pela proteína supressora de tumor pVHL (von Hippel-Lindau), e é degradado pelo sistema ubiquitina-proteossoma. Em condições de hipóxia, a ligação HIF-1 $\alpha$ -pVHL não ocorre porque não há hidroxilação do HIF-1 $\alpha$  por enzimas PHDs, uma vez que estas últimas são inibidas pelo acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS), dessa forma, a degradação do HIF-1 $\alpha$  é bloqueada e seus níveis são aumentados<sup>42-45</sup>. Deste modo, em condições hipóxicas, os altos níveis de HIF-1 $\alpha$  são frequentemente descritos, sendo este responsável pelo controle da expressão de diversos genes envolvidos no metabolismo da glicose, angiogênese, entre outros<sup>46,47</sup>. Portanto, o

HIF-1 $\alpha$  é superexpresso em regiões hipóxicas de uma variedade de neoplasias, sendo utilizado como marcador para detecção do nível de oxigenação tecidual <sup>48</sup>.

Além do HIF-1 $\alpha$ , uma importante molécula utilizada para identificação de áreas hipóxicas é o pimonidazole <sup>49,50</sup>, um nitroimidazole, cuja forma reduzida se liga a peptídeos contendo o grupo tiol (-SH), como o presente na glutatona. A sua redução é dependente da pressão parcial de oxigênio (pO<sub>2</sub>), pois o O<sub>2</sub> compete com o pimonidazole pela adição de elétrons na própria molécula. Logo, regiões de oxigenação deficiente são favoráveis à redução do pimonidazole. Essa molécula é comercializada como sonda de hipóxia (do inglês *hypoxyprobe*) padrão ouro e pode ser visualizada por imunohistoquímica após horas a dias de sua administração. O pimonidazole pode ser injetado em modelos animais formando adutos com proteínas em regiões hipóxicas, e, após a excisão tumoral, pode ser detectado por anticorpos específicos, resultando em uma representação visual do gradiente hipóxico <sup>49-51</sup>.

Em áreas intratumorais onde a oxigenação é escassa, outro mecanismo adaptativo consiste na alta expressão do transportador de glicose GLUT-1, que leva a maior captação de glicose <sup>38,39</sup>, contribuindo com o aumento da glicólise anaeróbica em detrimento da fosforilação oxidativa <sup>52</sup>. Mesmo quando o oxigênio é abundante, as células tumorais optam pela glicólise ao invés da fosforilação oxidativa, (evento este denominado de “efeito Warburg”) deste modo, ao contrário das células normais, as células tumorais podem converter glicose em lactato mesmo na presença de oxigênio <sup>53,54</sup>. Estudos sugerem que as células tumorais preferem a via metabólica não oxidativa, o ciclo das pentoses, pois elas utilizam preferencialmente a glicose para processos anabólicos, como síntese de nucleotídeos ribose, necessários para produção de DNA e RNA <sup>55</sup>.

Outro transportador de glicose, GLUT-3, também é expresso em tecidos tumorais, mas não com tanta frequência como GLUT-1<sup>56</sup>. Um estudo de Krzeslak *et al.*, (2012) demonstrou que o GLUT-3 apresenta maior expressão em tumores de mama indiferenciados, em comparação com tumores diferenciados<sup>57</sup>. Estudos mostram que a alta expressão de GLUT-1 e GLUT-3, relaciona-se com altas taxas de proliferação celular, baixa diferenciação, tumores mamários com alto grau histológico e receptores de estrógeno (RE) e progesterona (RP) negativos<sup>58-60</sup>. Esses receptores de glicose estão sendo estudados em terapias antitumorais e sua baixa expressão está relacionada com diminuição do crescimento tumoral<sup>61,62</sup>. Estudos sugerem que estes transportadores de glicose são positivamente regulados por HIF-1 $\alpha$  e superexpressos em tumores hipóxicos<sup>61</sup>.

Com a baixa vascularização e tendo como metabolismo energético prevalente a glicólise anaeróbica, existe maior produção de lactato juntamente com íons de hidrogênio, que são então exportados para fora da célula acidificando o microambiente tumoral<sup>39,52,63</sup>. Naturalmente, o pH extracelular (pHe) baixo induz a apoptose em células normais<sup>64,65</sup>, evento este que não ocorre em células tumorais<sup>52</sup>, ao contrário, o pHe ácido parece conferir vantagens para as células tumorais, uma vez que estas possuem diversas adaptações, responsáveis por promover sobrevivência e proliferação<sup>52,66-68</sup>. Neste contexto, as anidrases carbônicas (CA) são enzimas que têm papel importante no transporte do CO<sub>2</sub> e no controle do pH intracelular (pHi) e do sangue. As CA-IX e CA-XII são proteínas transportadoras de íons hidrogênio e que contribuem para o transporte de lactato através de interações com transportadores de monocarboxilato (MCTs), sendo componentes fundamentais na homeostase do pHi, e, conseqüentemente, na acidificação do meio extracelular<sup>69-74</sup>. Em células normais

adultas o pHi é geralmente  $\sim 7,2$  e o pHe  $\sim 7,4$ <sup>68,75</sup>. Entretanto, células tumorais possuem um pHi maior que 7,4 e um pHe menor que 6,<sup>76-78</sup>.

O estudo dessas enzimas no câncer é promissor, pois pode auxiliar no desenvolvimento de tratamentos mais eficazes para tumores agressivos, que apresentam grande número de áreas hipóxicas<sup>74,79</sup>. Estudos *in vivo* demonstraram que a inibição somente da CA-IX reduziu o volume tumoral em 40% e a inibição tanto da CA-IX quanto da CA-XII reduziu o volume tumoral em 85% em tumores gerados por diferentes linhagens celulares tumorais<sup>73</sup>.

O pHi de células tumorais é mantido na normalidade por uma série de mecanismos. Dentre eles, podemos citar o aumento de proteínas de membrana responsáveis por exportar ácidos para fora da célula, como transportadores de lactato e anidrases carbônicas<sup>39,52,75</sup>. Foi descrito também que o pHe pode tornar ineficiente o tratamento com certos tipos de quimioterápicos, pois alguns fármacos tendem a se acumular no meio ácido por suas propriedades químicas, ficando concentrados fora da célula<sup>75</sup>. Neste sentido, acredita-se que a acidose do microambiente é um fator estratégico, contribuindo para a progressão da malignidade do tumor e resistência a terapias<sup>66</sup>.

Além dos marcadores específicos citados anteriormente, áreas intratumorais hipóxicas podem ser identificadas por técnicas de imagem *in vivo*, como o PET/CT (*Positron Emission Tomography/Computed Tomography*). O uso do PET/CT encontra-se em grande expansão, estabelecendo um lugar essencial e, muito importante no diagnóstico e avaliação pré e pós-terapêutica<sup>80</sup>. O radiofármaco mais comumente utilizado é o <sup>18</sup>F-Fluorodesoxiglicose (FDG), um análogo da glicose administrado por via endovenosa. O <sup>18</sup>F-FDG segue a distribuição do metabolismo da glicose, por esta ser

a principal fonte de energia para as células. Devido a estas propriedades, este radiofármaco é frequentemente utilizado para identificação de tumores além de áreas intratumorais hipóxicas <sup>81-83</sup>. Zhao *et al.* (2005) observaram distribuição intratumoral heterogênea de <sup>18</sup>F-FDG em tumores malignos, e associaram essa heterogeneidade com a superexpressão de transportadores de glicose em regiões de hipóxia no tumor <sup>81</sup>. O PET/CT com <sup>18</sup>F-FDG, é uma técnica que permite avaliar, no mesmo exame, metabolismo e anatomia. A captação de <sup>18</sup>F-FDG é proporcional à taxa de atividade metabólica das células tumorais <sup>80</sup>. Além disso, como demonstrado por Folpe *et al.* (2000) o PET/CT com <sup>18</sup>F-FDG pode ser usado como uma técnica não-invasiva para avaliar de forma confiável a presença de necrose em sarcomas <sup>84</sup>. Estudos sugerem que a necrose metabólica diagnosticada por PET/CT com <sup>18</sup>F-FDG pode servir como um marcador de substituição bastante confiável para necrose patologicamente diagnosticada <sup>85</sup>. A presença de necrose metabolicamente diagnosticada e um volume significativamente maior de necrose intratumoral indicam tumores mais agressivos, além de correlacionar-se com uma sobrevida global e sobrevida livre de doença mais pobres <sup>85</sup>.

De acordo com o exposto, nota-se que a heterogeneidade intratumoral, hipóxia e acidose constituem um obstáculo a terapia, já que um tratamento que tem como alvo terapêutico uma população celular com determinadas características, como a quimioterapia, pode não ser eficaz para eliminar as células tumorais na sua totalidade <sup>81</sup>.

É nesse cenário que novos agentes terapêuticos como a melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina), hormônio naturalmente produzido e secretado na glândula pineal, vem ganhando espaço como possível tratamento contra o câncer de mama. A melatonina é o principal hormônio sintetizado pela glândula pineal, cuja produção é

inibida na presença da luz <sup>86</sup>. Sua produção segue um padrão rítmico com pico secretório à noite e baixa produção no período diurno <sup>87</sup>. Fisiologicamente, esse hormônio tem um papel sobre eventos importantes na regulação de fenômenos endócrinos independentes do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal, termorregulação, regulação do sistema cardiovascular, ciclos de atividade-reposo e vigília-sono, sistema imunológico, crescimento e envelhecimento <sup>88</sup>.

Os primeiros indícios de que a melatonina poderia ser útil na terapêutica oncológica surgiram no estudo do câncer de mama, quando em 1978, propuseram que a diminuição da função da glândula pineal poderia aumentar o risco de desenvolvimento do câncer de mama. A partir de então, foi constatado que a administração exógena da melatonina tem sido eficaz na inibição do crescimento tumoral *in vitro* e *in vivo* em diferentes tipos de câncer <sup>89,90</sup>.

Alguns trabalhos sugerem que a melatonina pode exercer efeito inibitório na atividade das enzimas aromatase <sup>91</sup> e da enzima telomerase <sup>92,93</sup> no tecido mamário neoplásico. Outros verificam que a melatonina inibe a atividade invasiva e migratória das células de câncer de mama, mediadas pela supressão do miR-24 <sup>94</sup>. Demais propriedades já descritas incluem a indução da diferenciação celular, efeitos epigenéticos, imunomodulatórios, antioxidantes, pró-apoptóticos, antiproliferativos, anti-invasivos, <sup>95-99</sup> além dos efeitos antiangiogênicos <sup>100</sup> e antimetastáticos comprovados recentemente por nosso grupo de pesquisa <sup>102</sup>. A melatonina pode atuar por meio de receptores de membrana acoplados a proteína G, denominados MT1 e MT2, os quais são encontrados em diversos tecidos <sup>103</sup>. O receptor MT1 é o principal mediador de suas ações anti-tumorais por diversas vias de sinalização <sup>104</sup>. Em células de câncer de mama RE- $\alpha$  positivas, a melatonina pode reduzir a expressão gênica do RE- $\alpha$

e a atividade transcricional de genes induzidos pelo estrógeno, por meio da via de sinalização ativada pelo receptor MT1 e redução dos níveis de AMP cíclico (cAMP). A melatonina também regula a atividade transcricional de receptores nucleares, enzimas envolvidas no metabolismo do estrógeno, e genes relacionados ao ciclo circadiano<sup>93,105</sup>.

Hill *et al.* (2009) demonstraram que a melatonina inibe de forma variável a proliferação de linhagens RE $\alpha$ -positivas e RE- $\alpha$  negativas, sendo que apenas concentrações mais elevadas de melatonina são eficazes em algumas linhagens RE $\alpha$ -negativas, evidenciando que parte de seu efeito anti-proliferativo é mediado pela via de sinalização do estrógeno<sup>104,107</sup>. Tanto linhagens RE $\alpha$ -positivas como RE $\alpha$ -negativas expressam o receptor MT1<sup>108</sup>, no entanto, recentes pesquisas demonstraram que tumores RE $\alpha$ -positivos, apresentam maior expressão de MT1 em relação a tumores triplo-receptor negativo, como a linhagem MDA-MB-231<sup>105,109</sup>.

A utilização de antagonistas dos receptores MT1 e MT2, revertem os efeitos antiproliferativos da melatonina enquanto a superexpressão do receptor MT1 em linhagens celulares de câncer de mama aumenta sua resposta inibitória<sup>93</sup>.

Estudos demonstram que a melatonina também possui mecanismos independentes de seus receptores de membrana, exibindo propriedades anti-inflamatórias<sup>110</sup> e antioxidantes, diretamente pela neutralização de efeitos deletérios promovidos por radicais livres<sup>111</sup>, e pelo aumento da expressão gênica e/ou atividade de enzimas antioxidantes<sup>112</sup>. Ainda, por ser lipossolúvel, a melatonina pode atravessar diretamente qualquer membrana celular e interagir com proteínas intracelulares, como a calmodulina, e com receptores nucleares RZR/ROR (receptor Z para retinoide / receptor órfão para retinoide)<sup>113</sup>.

Recentemente, estudos demonstram o impacto do desequilíbrio do ciclo circadiano sobre o efeito Warburg. Os autores demonstraram que durante a fase clara, na qual os níveis de melatonina são baixos, o cAMP estimula a captação de ácido linoleico pelo tumor, e conseqüentemente a sinalização mitogênica estimulada por 13-HODE. O aumento de 13-HODE estimula a ativação de AKT resultando no aumento da glicólise anaeróbica, proliferação celular e crescimento tumoral. Durante a fase escura, as altas concentrações de melatonina, reduzem a formação de cAMP, bloqueando a captação de ácido linoleico e sua conversão em 13-HODE, reduzindo a ativação de AKT, que leva a diminuição da glicólise anaeróbica, proliferação celular e crescimento tumoral <sup>114-116</sup>.

A ação protetora da melatonina contra hipóxia é sugerida principalmente pela inibição de HIF-1 $\alpha$  e alguns de seus genes alvo <sup>44,117,118</sup>. Além disso, este hormônio parece inativar HIF-1 $\alpha$  e diminuir a glicólise ou o efeito Warburg em células altamente dependentes desta via metabólica, tais como células de sarcoma de Ewing <sup>119</sup>.

Dessa forma, este estudo investigou o efeito do tratamento com melatonina em diferentes marcadores relacionados à hipóxia e metabolismo energético (pimonidazole, HIF-1 $\alpha$ , transportadores de glicose GLUT1 e GLUT3, e anidrases carbônicas CA-IX e CA-XII) em modelo experimental de câncer de mama triplo negativo.



## **1.1 Objetivo Geral**

Avaliar a ação da melatonina sobre o microambiente tumoral em condições adversas em modelo experimental de câncer de mama triplo negativo.

## **1.2 Objetivos Específicos:**

### **1.2.1 Estudo *in vitro***

Realizar o cultivo da linhagem de câncer de mama MDA-MB-231 e avaliar a ação da melatonina sobre a:

- Viabilidade celular;
- Expressão proteica de marcadores relacionados à hipóxia e metabolismo energético anaeróbico (HIF-1 $\alpha$ , GLUT1, GLUT3, CA-IX e CA-XII);
- Expressão gênica dos marcadores: HIF-1 $\alpha$ , GLUT1 e CA-XII.

### **1.2.2 Estudo *in vivo***

Avaliar a ação da melatonina sobre o microambiente tumoral em modelo animal de câncer de mama triplo negativo por meio da:

- Detecção de áreas hipóxicas com predomínio do metabolismo energético anaeróbico por meio da expressão proteica dos marcadores HIF-1 $\alpha$ ,

pimonidazole, transportadores de glicose GLUT-1 e GLUT-3 e anidrases carbônicas CA-IX e CA-XII;

- Expressão gênica dos marcadores: HIF-1 $\alpha$ , GLUT1 e CA-XII;
- Realização da tomografia por emissão de pósitrons (PET) com o radiofármaco <sup>18</sup>F-FDG para identificar o controle do crescimento e necrose tumoral.

## *Resultados*

## 2. RESULTADOS

Os objetivos deste estudo resultaram em 2 artigos. O **artigo 1**, intitulado: *Melatonin controls tumor hypoxia and metabolism inhibiting HIF-1 $\alpha$  and markers of energy metabolism in an experimental model of breast cancer* submetido à publicação no *Journal of Pineal Research*. O **artigo 2**, intitulado: “*A melatonina controla o crescimento e necrose tumoral verificada por PET/CT com 18F-FDG em modelo experimental de câncer de mama*” será submetido à publicação no: *Molecular Carcinogenesis Journal*.

## Artigo 1

**Melatonin controls tumor hypoxia and metabolism inhibiting HIF-1 $\alpha$  and markers of energy metabolism in an experimental model of breast cancer**

André de Lima Mota<sup>1</sup>, Bruna Victorasso Jardim-Perassi<sup>1</sup>, Tialfi Bergamin de Castro<sup>2</sup>, Nathália Martins Sonehara<sup>1</sup>, Victor Keniti Gomes Nishiyama<sup>1</sup>, Vinicius Augusto Gonçalves Pierri<sup>1</sup>, Debora Aparecida Pires de Campos Zuccari<sup>1,2</sup>,

<sup>1</sup>Laboratory of Molecular Investigation of Cancer – LIMC, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto/FAMERP, São José do Rio Preto, Brazil

<sup>2</sup>Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, São José do Rio Preto, Brazil

**Contact Information:**

André de Lima Mota

Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP)

Av. Brigadeiro Faria Lima, 5416 – Vila São Pedro

São José do Rio Preto SP/Brazil/ CEP: 15090-000

Phone: +55 (17) 3201-5700 / +55 (17) 99258.7182

Fax number: +55 (17) 3229-1777

Email: [andre.biomedic@gmail.com](mailto:andre.biomedic@gmail.com)

## Abstract

Breast cancer is the most common cancer among women and has a high mortality rate. Adverse conditions in the tumor microenvironment, such as hypoxia and acidosis, may exert selective pressure on the tumor, selecting subpopulations of tumor cells with advantages for survival in this environment. In this context, therapeutic agents that can be used to control these conditions, and consequently the intratumoral heterogeneity, need to be explored. Melatonin, in addition to its physiological effects, has demonstrated important anti-tumor actions and recently has been associated with the control of hypoxia and the Warburg effect. In this study we evaluated the action of melatonin on tumor growth and tumor metabolism, evaluated by different markers of hypoxia and glucose metabolism (HIF-1 $\alpha$ , glucose transporters GLUT1 and GLUT3 and carbonic anhydrases CA-IX and CA-XII) in triple negative breast cancer model. *In vitro* cell viability was investigated by the MTT (methyl-thiazole-tetrazolium) assay and gene and protein expressions, by quantitative real-time PCR and immunocytochemistry, respectively. The effects of melatonin were tested *in vivo*, using athymic nude mice injected with MDA-MB-231 cells (xenograft model). Results showed that melatonin treatment reduced the viability of MDA-MB-231 cells and tumor growth in Balb/c nude mice (p <0.05). The treatment also decreased HIF-1 $\alpha$  gene and protein expression concomitantly with the expression of metabolism markers (GLUT1, GLUT3, CA-IX and CA-XII) (p <0.05). Taken together, these results show that melatonin down-regulates HIF-1 $\alpha$  expression, and consequently it can regulate glucose metabolism markers in breast tumor cells, controlling hypoxia and tumor progression.

**Keywords:** Breast cancer, Hypoxia, Intratumoral heterogeneity, Melatonin, HIF-1 $\alpha$ .

## 1 INTRODUCTION

Breast cancer is the second most incident neoplasia in the world, the most common type of tumor among women, and the fifth largest cancer-related cause of death<sup>1</sup>. About 40% of breast tumors have hypoxic regions, which have been associated with an increased metastasis, higher relapse rate, and a reduced rate of survival<sup>2-4</sup>. When tumors reach about 1-2 mm<sup>3</sup>, its metabolic demands become restricted due to limited diffusion of oxygen and nutrients<sup>5</sup>. The low O<sub>2</sub> levels characterize the hypoxia, which results in uncontrolled cell proliferation, fast tumor growth and consequent inadequate perfusion<sup>6-9</sup>.

Intratumoral hypoxia is considered a marker of poor prognosis in cancer patients and is associated with resistance to chemotherapy and radiotherapy, promotion of angiogenesis, tumor cells invasion and metastasis<sup>10-12</sup>. Hypoxia effects under tumor cells are multifaceted, which may promote apoptosis and necrosis, or induce the expression of a large number of genes, promoting cellular adaptation and survival under adverse conditions imposed by the tumor microenvironment. Hypoxia, acidosis and oxidative stress are examples of conditions that may exert selective pressure during tumor evolution, forcing "natural selection" of subpopulations within the tumor, characterizing the intratumoral heterogeneity<sup>9-15</sup>. Each subpopulation of tumor cells can have different phenotypes, presenting differences as to the aggressiveness and sensitivity to treatment<sup>16-18</sup>.

HIF-1 is the main component in the cellular response to hypoxia. It is a heterodimeric transcription factor with two subunits, HIF-1 $\alpha$  and HIF-1 $\beta$ <sup>15</sup>. Under physiological conditions, HIF-1 $\beta$  is constitutively expressed and HIF-1 $\alpha$  is maintained at low levels<sup>19</sup>. In hypoxia, tumor cells overexpress HIF-1 $\alpha$ , which is responsible for the

control of the expression of several genes, including those involved in glucose metabolism and angiogenesis<sup>20,21</sup>. Therefore, HIF-1 $\alpha$  is overexpressed in tumor hypoxic regions and it can be used as a marker for detection of tissue oxygenation level<sup>22</sup>. Another important molecule used for the identification of hypoxic areas is the pimonidazole<sup>23,24</sup>, a nitroimidazole drug whose reduced form binds to peptides containing the thiol group (-SH), as present in glutathione. Its reduction is dependent on pO<sub>2</sub>, since O<sub>2</sub> competes with pimonidazole for the addition of electrons in the molecule itself. Therefore, low O<sub>2</sub> regions are favorable for the reduction of pimonidazole<sup>23-25</sup>.

In hypoxic intratumoral areas, an adaptive mechanism consists in the high expression of the glucose transporter 1 (GLUT-1), leading to increased glucose uptake<sup>26,27</sup>, which contributes to increased anaerobic glycolysis rather than oxidative phosphorylation (Warburg effect) by tumor cells<sup>28</sup>. GLUT-3 also has higher expression in tumor tissues, especially in breast cancer. However, the increase of its expression is less frequent when compared to GLUT-1<sup>29,30</sup>. Studies suggest that these transporters are positively regulated by HIF-1 $\alpha$  and overexpressed in hypoxic tumors<sup>19,31</sup>. The high expression of GLUT-1 and GLUT-3 are related to high proliferation rates, low differentiation, breast tumors with high histologic grade and estrogen receptor (ER) and progesterone (PR) negative status<sup>32-34</sup>. These glucose receptors are being studied in antitumor therapies, and their low expression is associated with decreased tumor growth<sup>35,36</sup>.

With the low vascularization and prevalence of Warburg effect, there is an increase in the lactate production and hydrogen ions, which are then exported to the

extracellular space, acidifying the tumor microenvironment<sup>27,28,37</sup>. Naturally, the low pH induces apoptosis in normal cells<sup>38,39</sup>, which does not occur in tumor cells<sup>40</sup>. Instead, the acid pH seems to confer advantages to tumor cells<sup>40-43</sup>. In this context, carbonic anhydrases (CA) are enzymes that play an important role in the CO<sub>2</sub> transport and in the control of intracellular pH. The CA-IX and CA-XII are hydrogen ions carrier proteins that contribute to the transport of lactate through interactions with monocarboxylate transporter (MCT). The CA are fundamental components in the homeostasis of the intracellular pH and therefore in the acidification of the extracellular space<sup>40,44-49</sup>.

In this context, intratumoral heterogeneity, hypoxia and acidosis constitute an obstacle to therapy, and agents that can be used to control the adverse condition in the tumor microenvironment must be explored.

Melatonin (N-acetyl-5-methoxytryptamine) has been noted as a possible treatment against breast cancer. Melatonin is the principal hormone synthesized mainly by the pineal gland and its production is inhibited in the presence of light<sup>50</sup>. Studies have reported that exogenous melatonin administration is effective in inhibiting the tumor growth *in vitro* and *in vivo* in different types of cancer<sup>51,52</sup>. Many oncoprotective and oncostatic properties have been assigned to melatonin and recent studies demonstrate the impact of circadian rhythm disruption on the Warburg effect<sup>53-60</sup>. It was demonstrated that exposure to light at night induces a constant stimulation of tumor growth, since melatonin production is discontinued. Exposure to light at night deregulates the circadian rhythm, which consequently disrupts tumor balance in favor of its constant growth<sup>62-64</sup>.



The protective effects of melatonin against hypoxia are mainly suggested by inhibition of HIF-1 $\alpha$  expression and some of its target genes<sup>65-68</sup>. This molecule appears to inactivate the HIF-1 $\alpha$  and to reduce the glycolysis or Warburg effect on cells highly dependent on this pathway, such as Ewing's sarcoma cells<sup>69</sup>.

Thus, this study investigated the effect of melatonin treatment on different markers of hypoxia and glucose metabolism (pimonidazole, HIF-1 $\alpha$ , GLUT1, GLUT3 and carbonic anhydrases IX and XII) in an experimental model of triple-negative breast cancer.

## **2 METHODS**

### **Ethical Considerations**

This study was approved by the Ethics Committee on the Use of Animals of the Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (Prot. 001-003336 / 2014 - License CEUA 06/2014). The study was carried out following the national and international standards of ethics in animal experimentation.

### ***In vitro* study**

#### **2.1 Cell culture**

Triple negative human breast cancer cell line (MDA-MB-231) (ATCC, Manassas, VA, USA) was cultured with Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (GIBCO, Grand Island, NY, USA) supplemented with 10% of fetal bovine serum (FBS) (GIBCO, Grand Island, NY, USA), penicillin (100 IU/mL) and

streptomycin (100 mg/mL) (GIBCO, Grand Island, NY, USA) until cells reached 80–90% confluent. For the *in vitro* study, the cells were divided into two groups: Melatonin treated group (1 mM) and control group treated with vehicle (0.5% ethanol).

## 2.2 Cell viability

MDA-MB-231 cells were grown on a 96 well plate (Sarstedt, Nümbrecht, Germany) with 100  $\mu$ L of medium containing  $0.05 \times 10^6$  cells/well. The cells were incubated under the different experimental conditions described above. Then the cells were washed and pulsed with 10 $\mu$ L of MTT at 0.5 mg/mL (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) to each well and the plate was incubated at 37 °C for 4 hours. The solubilization of the MTT formazan crystals was made adding 10mM SDS-HCl (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) for 4 hours at 37°C. Measurement of the absorbance was carried out on ELISA reader (Thermo Fisher, Waltham, MA, EUA) at 570 nm and the results were expressed as percentage of viable cells compared to the control group. All treatments were performed in triplicate.

## 2.3 Immunocytochemistry

The immunocytochemical procedure was performed to evaluate the protein expression of HIF-1 $\alpha$ , GLUT-1, GLUT-3, CA-IX and CA-XII markers after treatment with melatonin. The information and dilutions for each antibody are shown in **Table 1**.

**Table 1:** Antibodies information and different dilutions used for immunostaining.

<b>Antibody</b>	<b>Company</b>	<b>Clone</b>	<b>Dilution</b>
HIF-1 $\alpha$	Santa Cruz	H1alpha 67	1:50
GLUT-1	Abcam	ab115830	1:1200
GLUT-3	Sigma	6515	1:400
CA IX	Sigma	2D3	1:1000
CA XII	Sigma	CLO280	1:400

Cells were trypsinized, re-suspended and seeded in silicone-plates adhered to silanized slides at  $0.6 \times 10^6$  cells per well. After treatment, the medium was removed and cells were washed with phosphate buffered saline (PBS). Slides were incubated with 1 ml of 4% formaldehyde (Sigma-Aldrich) for 20 min to fixation. Subsequently, the silicones were uncoupled from the slides, which were incubated with 10% of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 30 minutes to block endogenous peroxidase activity. Antigen exposure was performed in Triton solution (0.3%). Cells were washed with PBS between each step. Slides were incubated with the specific primary antibody in a dark wet chamber for 18 hours at 4°C. Subsequently they were washed with PBS for 15 minutes and incubated with the REVEAL - Biotin - Free Polyvalent DAB-HRP Kit (Spring Bioscience, USA), which consisted of the secondary biotinylated antibody anti-mouse, rabbit, and goat immunoglobulins for 20 min and streptavidin -peroxidase complex for 10 min. Slides were revealed using DAB chromogen at 0.5 % for 2-5 minutes (DAB, Signet® Covance Laboratories, Dedham, MA, USA). The slides were counterstained with hematoxylin for 40 seconds. The reactions were accompanied by a positive control for the primary antibody and negative control.

Slides were observed on the 40X objective of the Nikon Eclipse E200 microscope and analyzed by optical densitometry. For each sample, three different fields were photographed only in immunoreactive areas, quantified 20 points using *ImageJ Software* (NIH, Bethesda, MD, USA), totaling 60 points quantified for each slide. The values were obtained as arbitrary units (au) and the mean optical density (MOD) showed the staining intensity specifically in the immunoreactive areas.

#### **2.4 Gene expression by quantitative real-Time PCR (qPCR)**

qPCR was performed to evaluate the gene expression of HIF-1 $\alpha$ , GLUT-1 and CA-XII after treatment with melatonin (1 mM). Cells were seeded into 6-wells plate (10-cm<sup>2</sup> each) at  $0.5 \times 10^6$  cells per well and separated into treated and control groups. The treatments were performed for 24 hours. Total RNA was extracted from the cells using Trizol reagent (Invitrogen Life Technologies – Eugene, OR, USA), as the manufacturer recommends. The RNA concentration of each sample was determined with NanoDrop2000 (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA). The RNA from each sample was reverse-transcribed to complementary DNA (cDNA) using a High Capacity cDNA kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). First, the standard curve was calculated, and analyses for the differential expression of HIF-1 $\alpha$  or GLUT-1 or CA-XII and endogenous control ACTB were performed using SystemStepOnePlus (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and TaqMan Universal Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The assays used were: HIF-1 $\alpha$  (Hs00153153\_m1), GLUT-1 (Hs00892681\_m1), CA-XII (Hs01080902\_m1) and ACTB (Hs99999903\_m1) (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Each reaction consisted of 10  $\mu$ L of Master Mix, 1  $\mu$ L of TaqMan, 8  $\mu$ L of DEPC water and 1  $\mu$ L of

cDNA (100 ng/mL). The qPCR conditions were 95°C for 10 minutes followed by 40 cycles of 95°C for 15 seconds and 60°C for 1 minute. The expression of each gene was calculated relative to the normalized expression of gene used as endogenous control ( $\Delta\Delta Ct$ ). The samples were tested in triplicate, and all experiments included the negative control.

### ***In vivo* study**

#### **2.5 Animal model**

Female Balb/c nude athymic mice were purchased from São Paulo University Medical School (USP-SP) and were transported to Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP). Mice were housed in pathogen free conditions at room temperature (21°C at 25°C), in light exposure for 12 hours and 12 hours in the dark. Food and water were offered *ad libitum*. MDA-MB-231 cells were injected in the right flank at  $5 \times 10^6$  in 50  $\mu$ L of FBS-free medium.

#### **2.6 Melatonin administration**

Mice were randomly assigned to either melatonin administration (n = 7) or control group (vehicle treated, n = 7). Vehicle solution was prepared with 8 ml of phosphate buffered saline (PBS), 1 ml of dimethyl sulfoxide (DMSO) and 1 ml of Cremophor (Sigma, St. Louise, MO, USA) and given in 100  $\mu$ L of solution by intraperitoneal injection (IP). Melatonin (Sigma, St. Louise, MO, USA) was diluted in vehicle, and mice received IP of 100  $\mu$ L of melatonin (at dose of 40 mg/kg of body weight as performed in a previous study<sup>60</sup>). Melatonin was administered 1 hour before

room lighting was switched off. Treatment started 10 days after tumor cells injection and continued for 14 days, with treatment given 5 days a week.

During treatment, tumor size was measured weekly with caliper. Length and width values were recorded and tumor volume was calculated using the formula: Length x (Width)<sup>2</sup> x 0.52.

## 2.7 Immunohistochemistry

The immunohistochemical procedure was performed on the tumor tissue to evaluate the expression of the HIF-1 $\alpha$ , pimonidazole, glucose transporters GLUT-1 and GLUT-3 and carbonic anhydrases CA-IX and CA-XII.

The standard dilutions for each antibody were described in the **Table 1**. The kit for detection of pimonidazole (Hypoxyprobe <sup>TM</sup>-1 Omni Kit Inc., USA) was kindly provided by Dr. Alessandra Gambero from University of São Francisco (USF). Pimonidazole was injected intraperitoneally at 60 mg/kg, 1 hour before the mice were euthanized.

After euthanasia, tumor was extracted and cut longitudinally, and tissue was histologically processed. Histological sections of 4 $\mu$ m were obtained from the paraffin embedded material. Subsequently, deparaffinization of the slides was performed, initially in an oven at 60°C, followed by xylol and hydration with decreasing ethanol concentrations. Antigen retrieval was done in a cooker pan (ARNO, São Paulo, SP, Brazil) at 95°C with citrate buffer (pH 6.0) for 30 min. After cooling, the slides were incubated with 3% hydrogen peroxidase for 30 min to block endogenous peroxidase activity. Subsequently, the HRP (horseradish peroxidase) enzyme method in the

presence of primary antibody, secondary antibody and peroxidase-biotin-streptavidin revealed with DAB Chromogen, was performed as described above in **Item 2.2**. Note: for pimonidazole, antigen exposure was performed in Triton solution (0.3%) diluted in distilled water. Endogenous peroxidase blockade was performed in solution of methanol and hydrogen peroxide for 30 minutes.

After the immunohistochemical procedure, slides were analyzed by optical densitometry as described in item **Item 2.3**.

### **2.8 Gene expression by quantitative Real-Time PCR for tumor tissues**

Total RNA was extracted from the tumor fragments following the Trizol reagent protocol (Invitrogen®). Initially, tumor fragments were stored in polypropylene falcon tubes containing RNA stabilization solution (RNA later). Tumors were cut manually with the aid of a razor. Each fragment, weighting 100 mg, was inserted into a falcon tube already containing 1 mL of the Trizol reagent. The fragments were macerated with the aid of the macerator (Politron®), and another 1 ml of Trizol was added to the tube resulting in 2 ml of the Trizol reagent for each 100 mg of tumor fragment, divided into 2 eppendorf tubes (1 ml each tube). Subsequently, 200 µL of chloroform was added to each 1 mL of Trizol, and kept at room temperature for 3 minutes. The tubes were centrifuged at 14,000 rcf for 20 minutes at 4°C. The resulting aqueous phase was transferred to a new tube, and 400 µL of isopropyl alcohol was added for precipitation of the RNA followed by incubation at room temperature for 15 minutes. Then, it was centrifuged at 14,000 rcf for 20 minutes at 4°C, and RNA pellet was washed with 1 ml of 75% ethanol and centrifuged again at 7,500 rcf for 7 minutes at 4°C. The supernatant

was discarded and the pellet diluted in 30  $\mu$ L of DEPC (diethyl pyrocarbonate) water (Invitrogen®).

To analyze the expression of HIF-1 $\alpha$  gene, GLUT1 and CA-XII, cDNA synthesis with the reverse transcriptase enzyme and real time PCR were performed as described above in **Item 2.4**.

## **2.9 Statistical analysis**

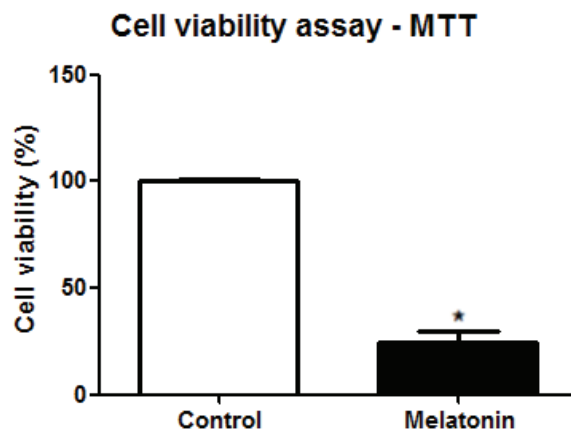
For normal distribution samples, the comparison of two parameters was performed by *Student t* test. For comparison of more than two parameters, we used the analysis of variance (ANOVA) followed by *Bonferroni's* test. P values <0.05 were considered significant and all analyses were performed using *Prism 6.0 software* (GraphPad, La Jolla, CA, USA).

## **3 RESULTS**

### **3.1 Melatonin inhibits cell viability in vitro**

MTT assay was performed to verify whether melatonin treatment (1mM) has an effect on cell viability of MDA-MB-231 cell line. As shown in **Figure 1**, melatonin treatment significantly decreased the cell viability compared to control cells (p < 0.05 **Figure 1**).



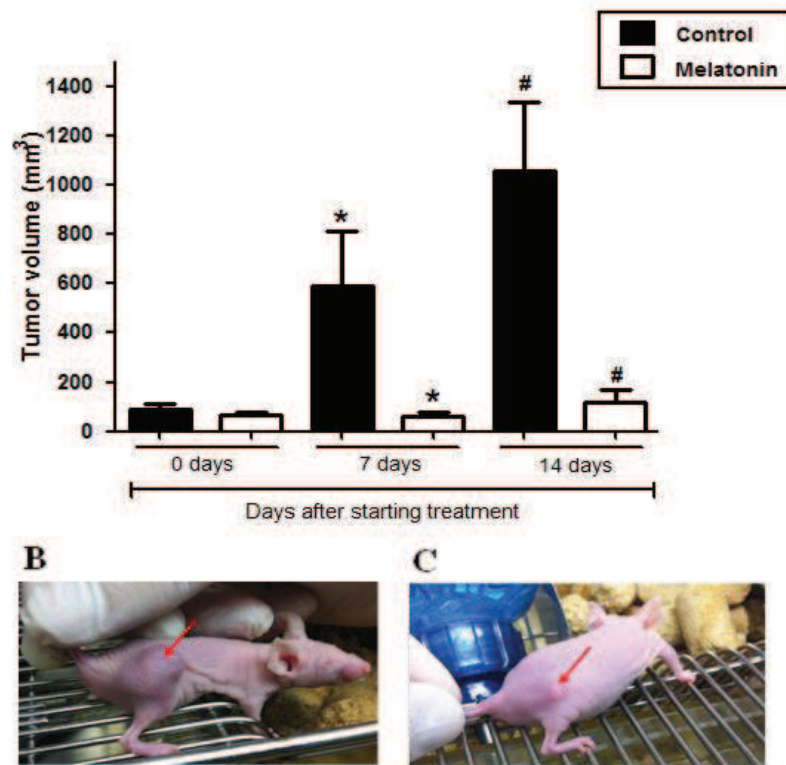


**Fig. 1:** Inhibitory effect of melatonin on viability of MDA-MB-231 cell line. The cell viability was measured by MTT assay. Data are shown as mean  $\pm$  standard deviation. \* $p < 0.05$ , 1 mM of melatonin vs. Control.

### 3.2 Melatonin controls tumor growth in vivo

The weight of the mice was monitored during the experiment, and neither melatonin therapy nor vehicle had any effect on the animal weights.

Treatments started 10 days after cell injection, and tumor volumes were measured weekly. Tumors reached large volume, especially in control group, with ulceration 24 days after tumor cell injection. Results showed that tumor growth was slower in the treated group when compared with the control-group ( $p < 0.05$ ; **Figure 2A**). **Figure 2B** shows an animal from the control group with tumor volume of 878,8 mm<sup>3</sup> and an animal from the treated group with tumor volume of 41,6 mm<sup>3</sup> (**Figure 2C**). One melatonin-treated mouse had tumor remission, showing a tumor of 18.72 mm<sup>3</sup> on day 7 which was not detected after 7 days of treatment. Tumor absence was confirmed in necropsy.



**Fig. 2:** (A) Tumor volume measured 5 and 10 days after tumor cell injection in control and treated groups. And tumor volume measured 7 and 14 days after the start of melatonin treatment. \* $p < 0.05$ , melatonin vs. Control group after 7 days under treatment; # $p < 0.05$ , melatonin vs. Control after 14 days under treatment. The red arrow indicates the tumors of one mouse control and one mouse treated with melatonin are showed in (B) and (C) respectively.

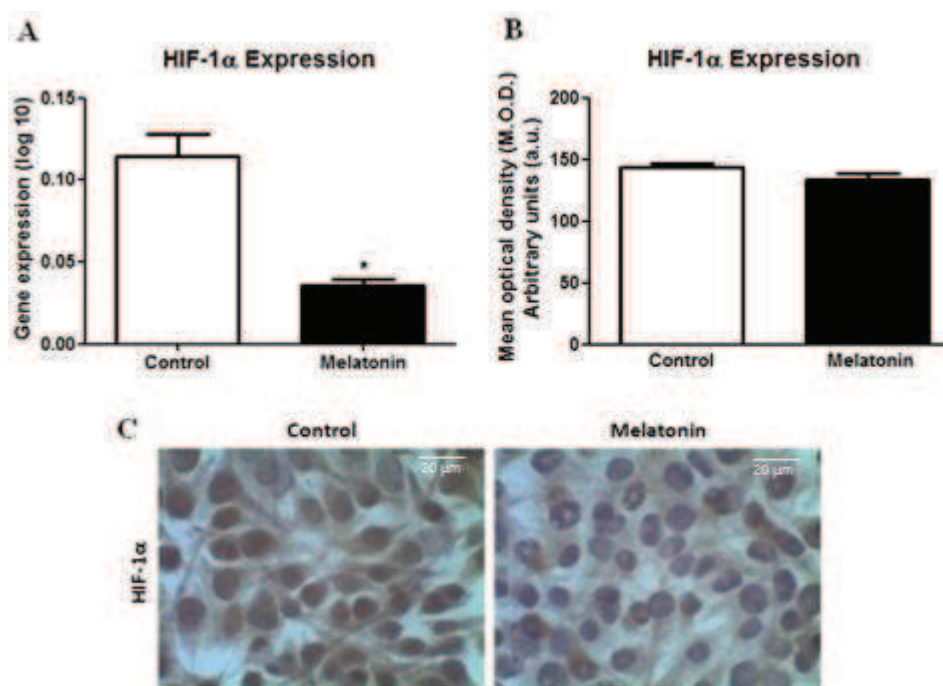
### 3.3 Melatonin controls tumor hypoxia inhibiting HIF-1 $\alpha$ at gene and protein levels

#### *In vitro* study

qPCR was performed to analyze HIF1A gene expression in MDA-MB-231 cells treated with melatonin or vehicle (control). Results showed that melatonin treatment for

24 hours was able to decrease the HIF1A gene expression compared with the control group ( $p = 0.0311$ ; **Figure 3A**).

HIF-1 $\alpha$  protein expression was also reduced by melatonin as verified by immunocytochemistry. However, the statistical significance level was not reached ( $p > 0,05$ ; **Figure 3B**). The immunostaining for HIF-1 $\alpha$  is shown in **Figure 3C**.

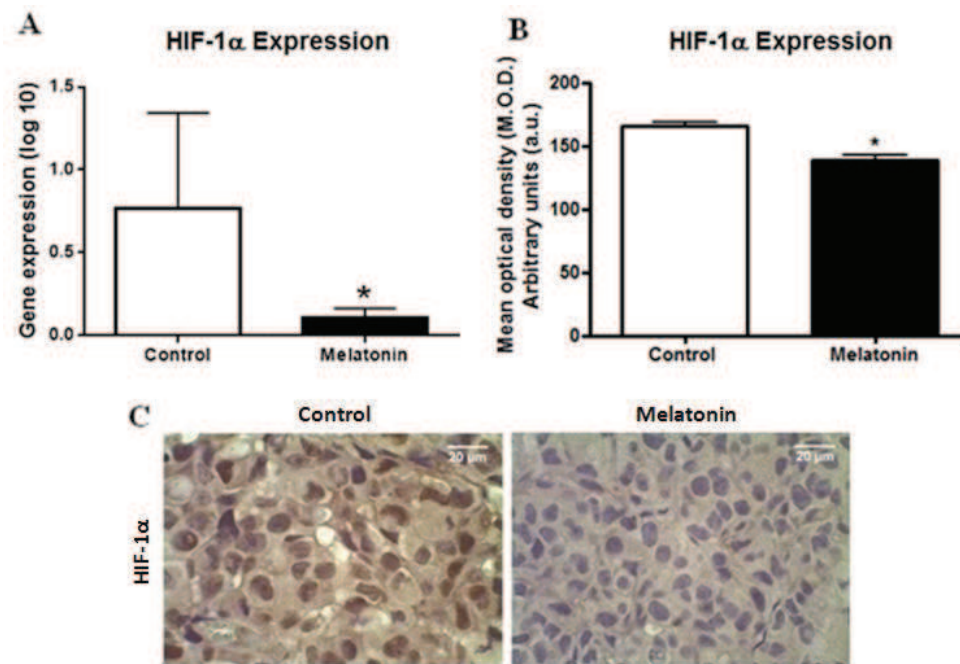


**Fig. 3:** (A) Statistical analysis of HIF1A gene expression (log 10). \* $p < 0.05$ ; 1 mM of melatonin vs. Control. (B) Statistical analysis of HIF-1 $\alpha$  protein expression in the control and treated cells. Data are showed as M.O.D.  $\pm$  standard error. Melatonin-treated vs. control cells group. (C) Representative images of immunostaining for HIF-1 $\alpha$  in control and treated cells (40X magnification).

#### ***In vivo* study:**

**Figure 4A** shows the results of HIF1A gene expression in tumor samples. In accordance with *in vitro* study, a reduction of HIF1A gene expression was also

observed *in vivo* in melatonin-treated mice ( $p = 0,03$ ; **Figure 4A**) and its reduction was more evident at protein levels ( $p < 0,0001$ ; **Figure 4B**). The immunohistochemistry of HIF-1 $\alpha$  in tumor samples is shown in **Figure 4C**.

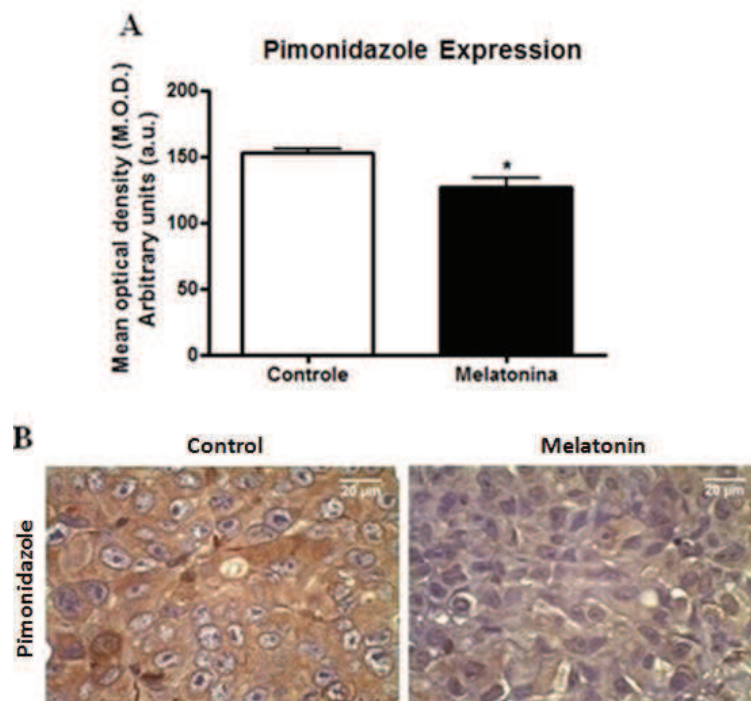


**Fig. 4:** (A) Statistical analysis of HIF1A gene expression (log 10). \* $p < 0.05$ , 1 mM of melatonin vs. Control. (B) Statistical analysis of HIF-1 $\alpha$  protein expression. Data are showed as M.O.D  $\pm$  standard error. \* $p < 0.05$ ; melatonin-treated vs.control group. (C) Representative images of immunostaining for HIF-1 $\alpha$  in control and treated tumors (40X magnification).

### 3.4 Melatonin controls tumor hypoxia

Pimonidazole was used to analyze tumor hypoxia. The immunostaining was observed predominantly in cytoplasm of tumor cells (**Figure 5B**). Results showed that melatonin was able to control tumor hypoxia as the quantitative (**Figure 5A**). The quantitative analyze by densitometry showed that intensity of pimonidazole was

significantly lower in melatonin-treated tumors ( $p = 0,0033$ ; **Figure 5A**) than in the control tumors.



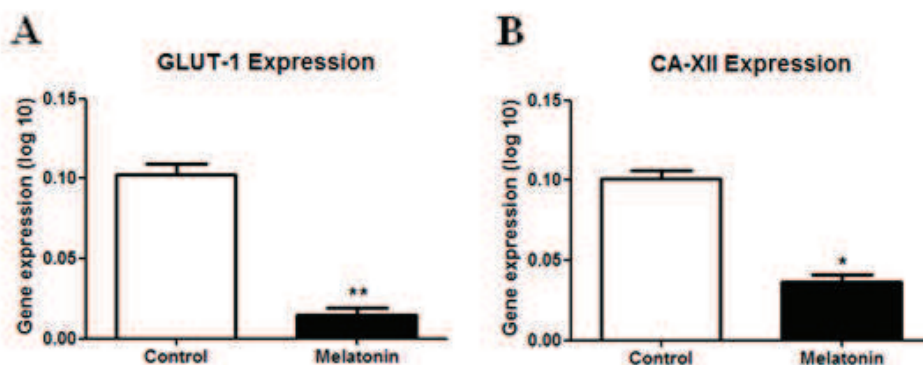
**Fig. 5:** (A) Statistical analysis of pimonidazole immunostaining. Data are showed as M.O.D  $\pm$  standard error. \* $p < 0.05$ ; melatonin-treated vs.control group. (B) Representative images of immunostaining for pimonidazole in control and treated tumors (40X magnification).

### 3.5 Melatonin inhibits glucose transporters (GLUT-1 and GLUT-3) and carbonic anhydrases (CA-IX and CA-XII) through its action in HIF-1 $\alpha$

Because HIF-1 $\alpha$  can induce the expression of several genes under hypoxia, we tested the effect of melatonin on the HIF-1 $\alpha$  targets genes, GLUTs and CAs.

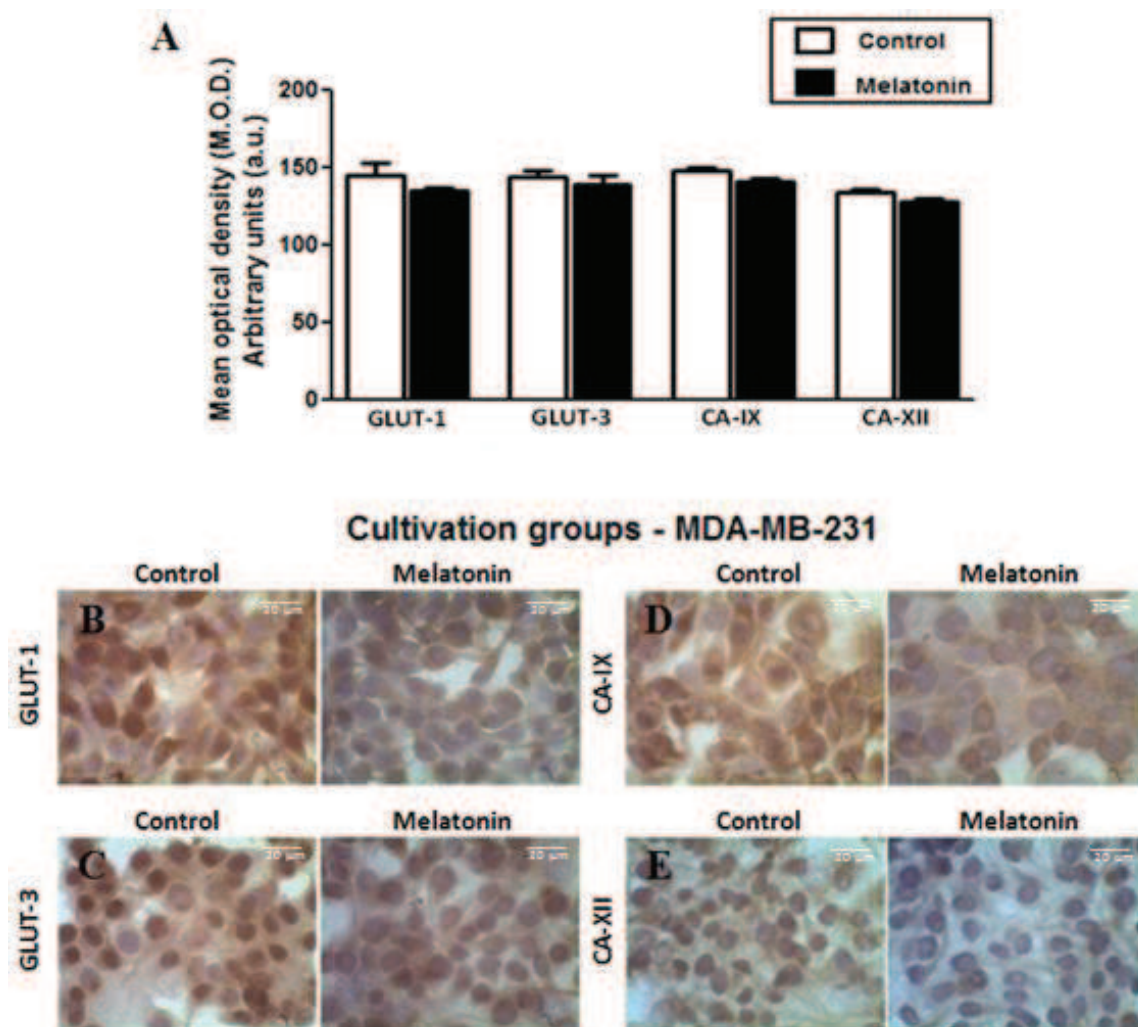
### *In vitro* study

Melatonin significantly reduced gene expression of GLUT-1 ( $p = 0,0075$ ; **Figure 6A**) and CA-XII ( $p = 0,0117$ ; **Figure 6B**) *in vitro*.



**Fig. 6:** (A) Statistical analysis of GLUT1 gene expression (log 10). (B) Statistical analysis of CAXII gene expression (log 10). \* $p < 0.05$ ; 1 mM of melatonin vs. Control.

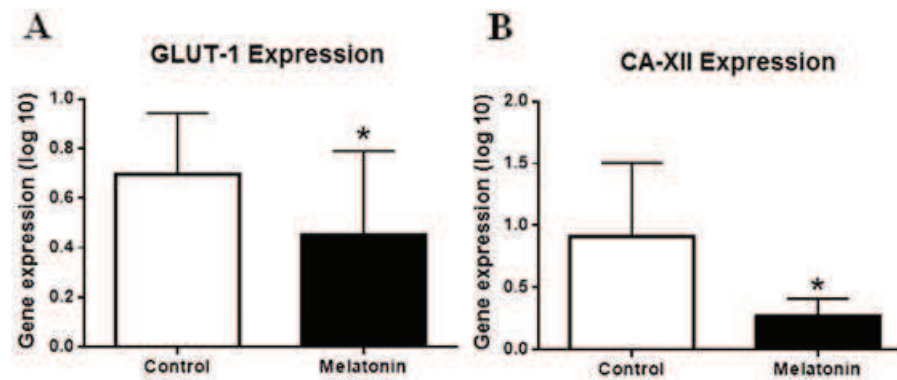
Quantifications of protein expression by densitometry for GLUT-1, GLUT-3, CA-IX and CA-XII in MDA-MB-231 cell line are shown in **Figure 7**. Melatonin-treated groups showed lower values of M.O.D for all markers evaluated, although statistical analysis did not show a significant difference between melatonin and control-groups ( $p > 0.05$ ; **Figure 7A**). The immunostaining of the different markers are represented respectively: GLUT-1 (**Figure 7B**), GLUT-3 (**Figure 7C**), CA-IX (**Figure 7D**) and CA-XII (**Figure 7E**).



**Fig. 7:** (A) Statistical analysis of GLUT-1, GLUT-3, CA-IX and CA-XII protein expression in the *in vitro* study. Data are showed as M.O.D.  $\pm$  standard error. Representative images showing the immunostaining for (B) GLUT-1, (C) GLUT-3, (D) CA-IX and (E) CA-XII in control and treated groups, respectively (40X magnification).

### *In vivo* study

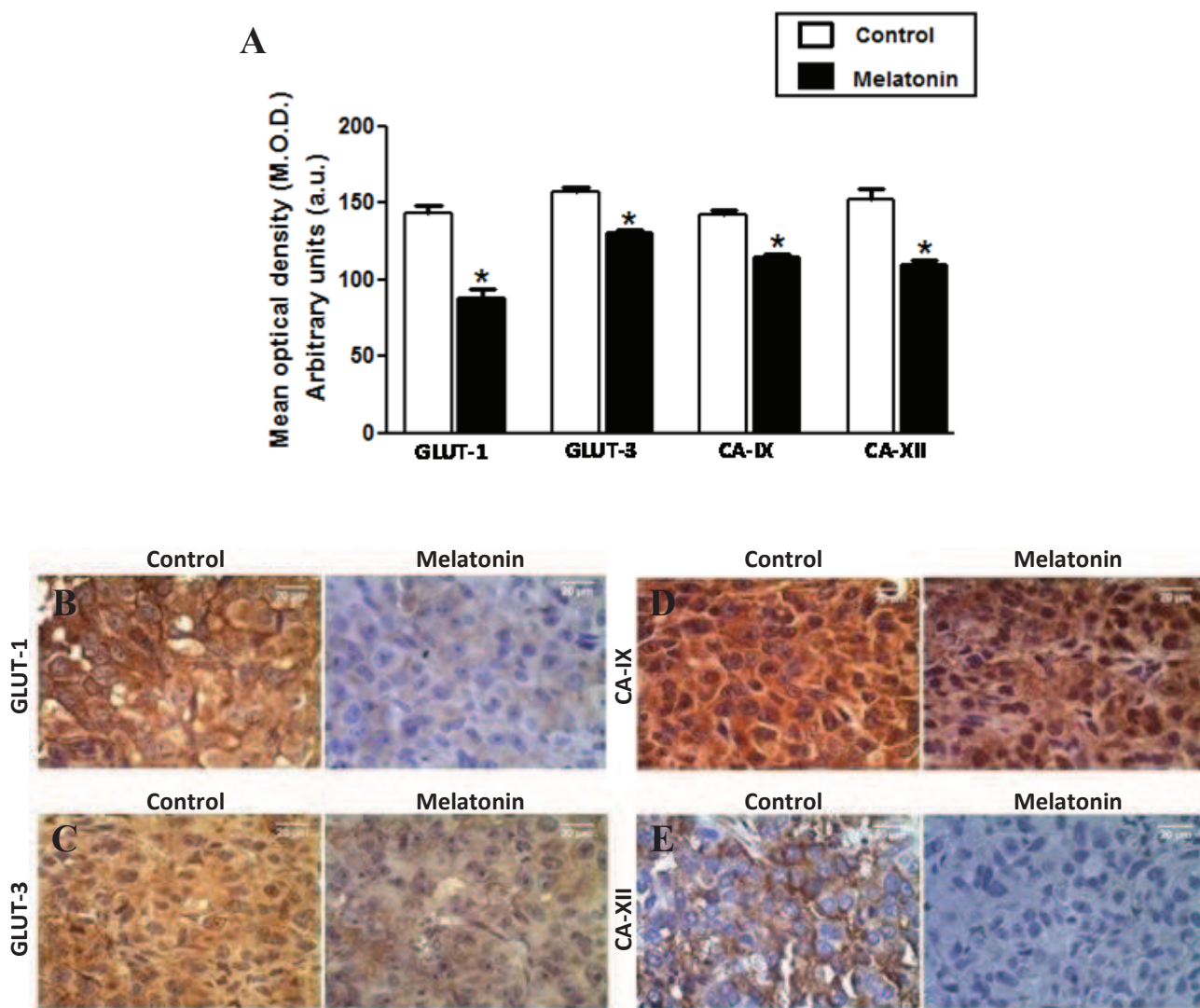
In accordance with *in vitro* results, melatonin-treated tumors showed low gene expression of GLUT1 ( $p = 0.009$ ) and CAXII ( $p = 0.008$ ) when compared with tumors treated with vehicle ( $p < 0,05$ ; **Figure 8A-B**).



**Fig. 8:** Statistical analysis of GLUT1 (**A**) and CAXII (**B**) gene expression (log 10) in the *in vivo* study. \* $p < 0.05$ , 1 mM of melatonin vs Control.

Quantifications of protein expression by densitometry for GLUT-1, GLUT-3, CA-IX and CA-XII in tumor samples are shown in **Figure 9**. Optical densitometry analysis revealed that all markers evaluated showed significantly lower M.O.D values in the melatonin-treated group when compared with the control group ( $p < 0.05$ ; **Figure 9A**). The statistical analysis (**Figure 9A**) showed respectively: GLUT-1: ( $p < 0.0001$ ), GLUT-3: ( $p < 0.0001$ ), CA-IX: ( $p < 0.0001$ ) and CA-XII: ( $p = 0.0002$ ). Immunohistochemistry staining is shown in **Figure 9**. It is observed that GLUT-1 and GLUT-3 (**Figure 9B and 9C**), as well as CA-IX and CA-XII (**Figure 9D and 9E**) were strongly expressed in cytoplasm. In addition, GLUT-1 and CA-XII were also expressed in membrane.





**Fig. 9:** (A) Statistical analysis of GLUT-1, GLUT-3, CA-IX and CA-XII protein expression in the *in vivo* study. Data are showed as M.O.D. ( $p < 0.05$ )  $\pm$  standard error. Representative images showing the immunostaining for (B) GLUT-1, (C) GLUT-3, (D) CA-IX and (E) CA-XII in control and treated tumors, respectively (40X magnification).

#### 4 DISCUSSION

This study revealed that melatonin has an important effect, reducing the cell viability *in vitro*. Some studies report that melatonin can act in ER $\alpha$ -negative cell line<sup>70,71</sup>. However, melatonin's anti-proliferation effect in ER $\alpha$ -positive cell lines has

mainly been studied<sup>72</sup>. In agreement with in vitro cell viability reduction, our study showed that melatonin treatment in vivo was able to control the tumor growth in a xenograft breast cancer model. This study is in agreement with other studies that demonstrate melatonin effectiveness in tumor growth of different types of cancer<sup>60,73,74</sup>.

It is known that the anti-proliferation effect of melatonin is mediated by MT1 receptor<sup>75</sup>. However, melatonin also shows important receptor-independent actions<sup>76</sup>. Melatonin is a lipophilic molecule able to cross the cellular membrane without transporter, and exhibits antioxidant properties by neutralizing the deleterious effect of reactive oxygen species<sup>77</sup>, and increasing antioxidant enzymes<sup>78</sup>. Recently, Burattini et al. (2016) showed that melatonin was able to activate apoptotic pathway and therefore promote tumor cell death in rhabdomyosarcoma with or without the use of MT1 or MT2 receptors<sup>77</sup>.

Besides its anti-proliferation action, this study shows that melatonin treatment can control tumor hypoxia, reducing HIF-1 $\alpha$  at both gene and protein levels, in mouse models of breast cancer. The inhibition of HIF-1 $\alpha$  gene expression after melatonin treatment was also confirmed in vitro. These results confirm other studies, which showed the ability of melatonin to inhibit the HIF-1 $\alpha$  expression in different tumors<sup>67,79-81</sup>. In normoxia, HIF-1 $\alpha$  is hydroxylated by prolyl hydroxylase domain (PHD) enzymes, and after hydroxylation HIF-1 $\alpha$  is identified by von Hippel-Lindau protein (pVHL) and degraded by ubiquitin-proteasome system. In hypoxic conditions, HIF-1 $\alpha$ -pVHL binding does not occur because HIF-1 $\alpha$  is not hydroxylated by PHDs, as these enzymes are inhibited by ROS. Thus HIF-1 $\alpha$  degradation is blocked and its levels are increased<sup>65,79,82,83</sup>. Park et al. (2010) suggested that melatonin is able to restore HIF-1 $\alpha$ -

pVHL binding under hypoxia in tumor cells, normalizing HIF-1 $\alpha$  levels, through its antioxidant action<sup>65</sup>. Thus, melatonin contributes to normalizing high levels of HIF-1 $\alpha$  in hypoxia. Studies demonstrated the ability of melatonin to inhibit HIF-1 $\alpha$  protein expression in hypoxia<sup>65,79,82,84</sup>. Park et al. (2009) showed that melatonin can reduce HIF-1 $\alpha$  protein expression but does not affect its gene levels<sup>79</sup>. However, corroborating with our results, Sohn et al. (2015) showed the inhibitory effect of melatonin on HIF-1 $\alpha$  is not only limited to protein levels, as melatonin inhibited HIF-1 $\alpha$  expression in RNAm levels. In addition, authors revealed that melatonin is able to enhance miRNA3195 and miRNA374b expression, which inhibits HIF-1 $\alpha$  gene expression<sup>67</sup>.

Our study showed lower staining takes in a hypoxia marker, pimonidazole in the melatonin-treated group, which can be associated with the decrease of HIF-1 $\alpha$  expression. Thus, our results suggested that melatonin can reduce intratumor hypoxia. Sorace et al. (2017) showed a decreased in pimonidazole staining in hypoxic BT474 tumors treated with trastuzumab<sup>85</sup>.

In hypoxic conditions, HIF-1 $\alpha$  regulates several genes in order to promote the cellular adaptation to adverse conditions. The high expression of glucose transporters regulated by HIF-1 $\alpha$ , in special GLUT-1 and GLUT-3, increase the glucose uptake<sup>26,27,29,31</sup>. Consequently, it can enhance the glycolysis, which is predominant in hypoxia tumor cells<sup>28</sup>. HIF-1 $\alpha$  inhibition is responsible for glycolytic activity downregulation in the majority of cancers, affecting in tumor adaptive mechanisms, once glycolysis is the alternative pathway to generate energy under hypoxic conditions<sup>69,86</sup>. Park et al. (2016) demonstrated that the pharmacological inhibition of HIF-1 $\alpha$  intracellular pathways reduced the expression of GLUT-1 and GLUT-3

hypoxia-induced in adipose-derived stem cells (ASCs)<sup>31</sup>. Our results showed that melatonin treatment reduced GLUT-3 protein expression and GLUT-1 at gene and protein levels in mammary tumors. In addition, inhibition of GLUT-1 was also verified in *in vitro* after melatonin treatment. Thus, we suggest that melatonin, through its action in HIF-1 $\alpha$ , can regulate GLUT-1 and GLUT-3 in intratumoral hypoxia, contributing to decreased glycolytic activity in tumor cells.

The effects of melatonin in GLUTs expression are not well established. Hevia et al. (2015) showed that melatonin competes with glucose to bind the receptor GLUT-1 decreasing the glucose uptake and GLUT-1 expression in prostate cancer cells. The authors suggested that melatonin can be transported by GLUT-1, increasing its intracellular levels<sup>87</sup>.

Our results demonstrated that the reduction of GLUT-1 in mice treated with melatonin is more evident than GLUT-3 reduction. GLUT-3 is expressed in tumor tissue, but is less extensive than GLUT-1<sup>29</sup>. Many studies showed that GLUT-3 expression is associated with aggressiveness and poor prognosis in gastric tumors, squamous oropharyngeal carcinoma and gliomas<sup>88-90</sup>. Thus results of this study indicated that melatonin is able to control tumor microenvironment by regulating HIF-1 $\alpha$ , and reducing GLUT-1 and GLUT-3 expression, which are associated with tumorigenesis, cellular proliferation and lower survival rates in different types of cancer<sup>29,30,32</sup>.

In hypoxia intratumoral areas, CA-IX and CA-XII contribute to intracellular pH homeostasis through transport of hydrogen ions and transport of lactate to extracellular environment. Thus, these enzymes provide adaptive and survival mechanisms to tumor

cells<sup>48,91</sup>. Recent studies involving CA-IX knockdown showed that this enzyme contributes to tumor cell proliferation *in vitro* and *in vivo*, which has been associated with its role in regulating the intracellular pH<sup>92,93</sup>. CA-IX knockdown induces the increase of CA-XII levels in colon tumor cells, showing a potential mechanism to compensate the absence of pH-regulatory enzymes in order to preserve the cell proliferation and survival<sup>93</sup>. Sowa et al (2017) demonstrated that high HIF-1 $\alpha$  and CA-IX expression induced chemoresistance under hypoxia, and its inhibition re-established chemo sensibility in lung carcinoma cells, suggesting that HIF-1 $\alpha$  and CA-IX inhibition can improve prognosis in lung cancer patients after chemotherapy<sup>94</sup>.

In our study, in accordance with results observed with others markers, melatonin inhibited CA-IX and CA-XII protein expression in mammary tumors in addition to the inhibition of CA-XII gene expression *in vivo* and *in vitro*. In the literature there is little information about the relation of CA-IX and CA-XII expression and melatonin<sup>95</sup>, and the effects are not established yet. As already known, in hypoxic conditions CA-IX expression is induced by HIF-1 $\alpha$  while the molecular mechanisms that enhance CA-XII expression are still unknown<sup>44,96</sup>. Here we suggest that melatonin modulates HIF-1 $\alpha$  and consequently controls CA-IX and CA-XII expression in triple negative breast cancer model. In addition, our *in vivo* results showed that the reduction of CA-XII protein expression by melatonin was more evident than CA-IX reduction. Enhancement of CA-XII expression in hypoxia conditions is described in MCF-10A breast cell line<sup>96</sup>, and high CA-IX and CA-XII expression was observed concomitant with pimonidazole in hypoxia tumor areas subjacent to necrosis in MDA-MB-231 xenograft tumors<sup>96</sup>. Recent studies showed that the inhibition of CA-IX can reduce significantly the invasive capacity in MDA-MB-231 cell line in hypoxic conditions<sup>97</sup> and show that CA-IX is an

independent prognosis marker, which can be clinically useful in predicting tumor progression, invasion and metastasis in breast cancer<sup>98</sup>.

This study verified that melatonin was able to control tumor hypoxia by reducing HIF-1 $\alpha$  gene and proteic expression. And we suggest that through its action in HIF-1 $\alpha$ , melatonin has an effect in glucose metabolism by inhibiting GLUT-1 and GLUT-3 and CA-IX and CA-XII. Taken together, our results suggest that melatonin can reverse adverse conditions in tumor microenvironment, controlling hypoxia and tumor progression.

## References

1. INCA. Tipos de câncer: mama. 2015. Available in: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/sintese-de-resultados-comentarios.asp>>. Acess in: 23 jun.2016.
2. SULLIVAN R , GRAHAM CH Hypoxia prevents etoposide-induced DNA damage in cancer cells through a mechanism involving hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cancer Ther* 2009; **8**:1702-13.
3. FLAMANT L, NOTTE A, NINANE N et al. Anti-apoptotic role of HIF-1 and AP-1 in paclitaxel exposed breast cancer cells under hypoxia. *Mol Cancer* 2010; **9**:191.
4. EL GUERRAB A, CAYRE A, KWIATKOWSKI F et al. Quantification of hypoxia-related gene expression as a potential approach for clinical outcome prediction in breast cancer. *PLoS One* 2017; **12**:e0175960.
5. CARMELIET P , JAIN RK Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature* 2011; **473**:298-307.
6. HARRIS AL Hypoxia--a key regulatory factor in tumour growth. *Nat Rev Cancer* 2002; **2**:38-47.
7. MILANI M , HARRIS AL Targeting tumour hypoxia in breast cancer. *Eur J Cancer* 2008; **44**:2766-73.
8. VORDERMARK D Hypoxia-specific targets in cancer therapy: role of splice variants. *BMC Med* 2010; **8**:45.
9. GILKES DM Implications of Hypoxia in Breast Cancer Metastasis to Bone. *Int J Mol Sci* 2016; **17**.
10. HARRIS AL Hypoxia--a key regulatory factor in tumour growth. *Nat Rev Cancer* 2002; **2**:38-47.

11. MROZ EA, TWARD AD, PICKERING CR et al. High intratumor genetic heterogeneity is related to worse outcome in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer* 2013; **119**:3034-42.
12. MANOOCHEHRI KHOSHINANI H, AFSHAR S , NAJAFI R Hypoxia: A Double-Edged Sword in Cancer Therapy. *Cancer Invest* 2016; **34**:536-545.
13. SADRI N , ZHANG PJ Hypoxia-inducible factors: mediators of cancer progression; prognostic and therapeutic targets in soft tissue sarcomas. *Cancers (Basel)* 2013; **5**:320-33.
14. KHRAMTSOV VV , GILLIES RJ Janus-faced tumor microenvironment and redox. *Antioxid Redox Signal* 2014; **21**:723-9.
15. KARAKASHEV SV , REGINATO MJ Progress toward overcoming hypoxia-induced resistance to solid tumor therapy. *Cancer Manag Res* 2015; **7**:253-64.
16. CAMERON D, KUNKLER I, DIXON M et al. Intraoperative radiotherapy for early breast cancer. *Lancet* 2010; **376**:1142; author reply 1143-4.
17. ERLICH F, CAMISÃO C, NOGUEIRA-RODRIGUES A et al. 18F-FDG-PET-based tumor delineation in cervical cancer: threshold contouring and lesion volumes. *Rev Esp Med Nucl Imagen Mol* 2013; **32**:162-6.
18. HU Z, SUN R , CURTIS C A population genetics perspective on the determinants of intra-tumor heterogeneity. *Biochim Biophys Acta* 2017; **1867**:109-126.
19. SEMENZA GL HIF-1 and tumor progression: pathophysiology and therapeutics. *Trends Mol Med* 2002; **8**:S62-7.
20. DANG CV , SEMENZA GL Oncogenic alterations of metabolism. *Trends Biochem Sci* 1999; **24**:68-72.
21. KE Q , COSTA M Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). *Mol Pharmacol* 2006; **70**:1469-80.
22. UEHARA M, SANO K, IKEDA H et al. Hypoxia-inducible factor 1 alpha in oral squamous cell carcinoma and its relation to prognosis. *Oral Oncol* 2009; **45**:241-6.
23. VARIA MA, CALKINS-ADAMS DP, RINKER LH et al. Pimonidazole: a novel hypoxia marker for complementary study of tumor hypoxia and cell proliferation in cervical carcinoma. *Gynecol Oncol* 1998; **71**:270-7.
24. BUSK M, JAKOBSEN S, HORSMAN MR et al. PET imaging of tumor hypoxia using 18F-labeled pimonidazole. *Acta Oncol* 2013; **52**:1300-7.
25. MASCINI NE, CHENG M, JIANG L et al. Mass Spectrometry Imaging of the Hypoxia Marker Pimonidazole in a Breast Tumor Model. *Anal Chem* 2016; **88**:3107-14.
26. MEKHAIL K, GUNARATNAM L, BONICALZI ME et al. HIF activation by pH-dependent nucleolar sequestration of VHL. *Nat Cell Biol* 2004; **6**:642-7.
27. SWIETACH P, VAUGHAN-JONES RD , HARRIS AL Regulation of tumor pH and the role of carbonic anhydrase 9. *Cancer Metastasis Rev* 2007; **26**:299-310.
28. XU Y, XIA X , PAN H Active autophagy in the tumor microenvironment: A novel mechanism for cancer metastasis. *Oncol Lett* 2013; **5**:411-416.
29. KOCDOR MA, KOCDOR H, PEREIRA JS et al. Progressive increase of glucose transporter-3 (GLUT-3) expression in estrogen-induced breast carcinogenesis. *Clin Transl Oncol* 2013; **15**:55-64.
30. CHEN X, LU P, ZHOU S et al. Predictive value of glucose transporter-1 and glucose transporter-3 for survival of cancer patients: A meta-analysis. *Oncotarget* 2017; **8**:13206-13213.

31. PARK HS, KIM JH, SUN BK et al. Hypoxia induces glucose uptake and metabolism of adipose-derived stem cells. *Mol Med Rep* 2016; **14**:4706-4714.
32. PINHEIRO C, SOUSA B, ALBERGARIA A et al. GLUT1 and CAIX expression profiles in breast cancer correlate with adverse prognostic factors and MCT1 overexpression. *Histol Histopathol* 2011; **26**:1279-86.
33. CHEN CL, CHU JS, SU WC et al. Hypoxia and metabolic phenotypes during breast carcinogenesis: expression of HIF-1alpha, GLUT1, and CAIX. *Virchows Arch* 2010; **457**:53-61.
34. KIM KJ, CHOI JS, KANG I et al. Melatonin suppresses tumor progression by reducing angiogenesis stimulated by HIF-1 in a mouse tumor model. *J Pineal Res* 2013; **54**:264-70.
35. BARRON CC, BILAN PJ, TSAKIRIDIS T et al. Facilitative glucose transporters: Implications for cancer detection, prognosis and treatment. *Metabolism* 2016; **65**:124-39.
36. OH S, KIM H, NAM K et al. Glut1 promotes cell proliferation, migration and invasion by regulating epidermal growth factor receptor and integrin signaling in triple-negative breast cancer cells. *BMB Rep* 2017; **50**:132-137.
37. WU H, DING Z, HU D et al. Central role of lactic acidosis in cancer cell resistance to glucose deprivation-induced cell death. *J Pathol* 2012; **227**:189-99.
38. PARK HJ, LYONS JC, OHTSUBO T et al. Acidic environment causes apoptosis by increasing caspase activity. *Br J Cancer* 1999; **80**:1892-7.
39. WILLIAMS AC, COLLARD TJ, PARASKEVA C An acidic environment leads to p53 dependent induction of apoptosis in human adenoma and carcinoma cell lines: implications for clonal selection during colorectal carcinogenesis. *Oncogene* 1999; **18**:3199-204.
40. XU K, MAO X, MEHTA M et al. Elucidation of how cancer cells avoid acidosis through comparative transcriptomic data analysis. *PLoS One* 2013; **8**:e71177.
41. GATENBY RA, SMALLBONE K, MAINI PK et al. Cellular adaptations to hypoxia and acidosis during somatic evolution of breast cancer. *Br J Cancer* 2007; **97**:646-53.
42. GATENBY RA, GAWLINSKI ET, GMITRO AF et al. Acid-mediated tumor invasion: a multidisciplinary study. *Cancer Res* 2006; **66**:5216-23.
43. DE MILITO A, CANESE R, MARINO ML et al. pH-dependent antitumor activity of proton pump inhibitors against human melanoma is mediated by inhibition of tumor acidity. *Int J Cancer* 2010; **127**:207-19.
44. WYKOFF CC, BEASLEY N, WATSON PH et al. Expression of the hypoxia-inducible and tumor-associated carbonic anhydrases in ductal carcinoma in situ of the breast. *Am J Pathol* 2001; **158**:1011-9.
45. POTTER CP, HARRIS AL Diagnostic, prognostic and therapeutic implications of carbonic anhydrases in cancer. *Br J Cancer* 2003; **89**:2-7.
46. IVANOV S, LIAO SY, IVANOVA A et al. Expression of hypoxia-inducible cell-surface transmembrane carbonic anhydrases in human cancer. *Am J Pathol* 2001; **158**:905-19.
47. WATSON PH, CHIA SK, WYKOFF CC et al. Carbonic anhydrase XII is a marker of good prognosis in invasive breast carcinoma. *Br J Cancer* 2003; **88**:1065-70.
48. CHICHE J, ILC K, LAFERRIÈRE J et al. Hypoxia-inducible carbonic anhydrase IX and XII promote tumor cell growth by counteracting acidosis through the regulation of the intracellular pH. *Cancer Res* 2009; **69**:358-68.



49. WARD C, MEEHAN J, MULLEN P et al. Evaluation of carbonic anhydrase IX as a therapeutic target for inhibition of breast cancer invasion and metastasis using a series of in vitro breast cancer models. *Oncotarget* 2015; **6**:24856-70.
50. LI C, LI G, TAN DX et al. A novel enzyme-dependent melatonin metabolite in humans. *J Pineal Res* 2013; **54**:100-6.
51. LUCHETTI F, CANONICO B, BETTI M et al. Melatonin signaling and cell protection function. *FASEB J* 2010; **24**:3603-24.
52. CUTANDO A, LÓPEZ-VALVERDE A, ARIAS-SANTIAGO S et al. Role of melatonin in cancer treatment. *Anticancer Res* 2012; **32**:2747-53.
53. MEDIAVILLA MD, SANCHEZ-BARCELO EJ, TAN DX et al. Basic mechanisms involved in the anti-cancer effects of melatonin. *Curr Med Chem* 2010; **17**:4462-81.
54. DI BELLA G, MASCIA F, GUALANO L et al. Melatonin anticancer effects: review. *Int J Mol Sci* 2013; **14**:2410-30.
55. PROIETTI S, CUCINA A, REITER RJ et al. Molecular mechanisms of melatonin's inhibitory actions on breast cancers. *Cell Mol Life Sci* 2013; **70**:2139-57.
56. ORDOÑEZ R, CARBAJO-PESCADOR S, PRIETO-DOMINGUEZ N et al. Inhibition of matrix metalloproteinase-9 and nuclear factor kappa B contribute to melatonin prevention of motility and invasiveness in HepG2 liver cancer cells. *J Pineal Res* 2014; **56**:20-30.
57. MORI F, FERRAIUOLO M, SANTORO R et al. Multitargeting activity of miR-24 inhibits long-term melatonin anticancer effects. *Oncotarget* 2016.
58. NOOSHINFAR E, SAFAROGHLI-AZAR A, BASHASH D et al. Melatonin, an inhibitory agent in breast cancer. *Breast Cancer* 2017; **24**:42-51.
59. ALVAREZ-GARCÍA V, GONZÁLEZ A, ALONSO-GONZÁLEZ C et al. Antiangiogenic effects of melatonin in endothelial cell cultures. *Microvasc Res* 2013; **87**:25-33.
60. 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**:e85311.
61. BORIN TF, ARBAB AS, GELALETI GB et al. Melatonin decreases breast cancer metastasis by modulating Rho-associated kinase protein-1 expression. *J Pineal Res* 2016; **60**:3-15.
62. BLASK DE, BRAINARD GC, DAUCHY RT et al. Melatonin-depleted blood from premenopausal women exposed to light at night stimulates growth of human breast cancer xenografts in nude rats. *Cancer Res* 2005; **65**:11174-84.
63. BLASK DE, DAUCHY RT, BRAINARD GC et al. Circadian stage-dependent inhibition of human breast cancer metabolism and growth by the nocturnal melatonin signal: consequences of its disruption by light at night in rats and women. *Integr Cancer Ther* 2009; **8**:347-53.
64. BLASK DE, DAUCHY RT, DAUCHY EM et al. Light exposure at night disrupts host/cancer circadian regulatory dynamics: impact on the Warburg effect, lipid signaling and tumor growth prevention. *PLoS One* 2014; **9**:e102776.
65. PARK SY, JANG WJ, YI EY et al. Melatonin suppresses tumor angiogenesis by inhibiting HIF-1alpha stabilization under hypoxia. *J Pineal Res* 2010; **48**:178-84.

66. ZHANG Y, LIU Q, WANG F et al. Melatonin antagonizes hypoxia-mediated glioblastoma cell migration and invasion via inhibition of HIF-1 $\alpha$ . *J Pineal Res* 2013; **55**:121-30.
67. SOHN EJ, WON G, LEE J et al. Upregulation of miRNA3195 and miRNA374b Mediates the Anti-Angiogenic Properties of Melatonin in Hypoxic PC-3 Prostate Cancer Cells. *J Cancer* 2015; **6**:19-28.
68. AL-RASHEED NM, FADDA L, ATTIA HA et al. Original research paper. Pulmonary prophylactic impact of melatonin and/or quercetin: A novel therapy for inflammatory hypoxic stress in rats. *Acta Pharm* 2017; **67**:125-135.
69. SANCHEZ-SANCHEZ AM, ANTOLIN I, PUENTE-MONCADA N et al. Melatonin Cytotoxicity Is Associated to Warburg Effect Inhibition in Ewing Sarcoma Cells. *PLoS One* 2015; **10**:e0135420.
70. LEMAN ES, SISKEN BF, ZIMMER S et al. 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**:178-84.
71. JUNG JH, SOHN EJ, SHIN EA et al. Melatonin Suppresses the Expression of 45S Preribosomal RNA and Upstream Binding Factor and Enhances the Antitumor Activity of Puromycin in MDA-MB-231 Breast Cancer Cells. *Evid Based Complement Alternat Med* 2013; **2013**:879746.
72. HILL SM, SPRIGGS LL, SIMON MA et al. The growth inhibitory action of melatonin on human breast cancer cells is linked to the estrogen response system. *Cancer Lett* 1992; **64**:249-56.
73. RAO GN, NEY E , HERBERT RA Effect of melatonin and linolenic acid on mammary cancer in transgenic mice with c-neu breast cancer oncogene. *Breast Cancer Res Treat* 2000; **64**:287-96.
74. SHARMAN EH, SHARMAN KG , BONDY SC Extended exposure to dietary melatonin reduces tumor number and size in aged male mice. *Exp Gerontol* 2011; **46**:18-22.
75. HILL SM, CHENG C, YUAN L et al. Declining melatonin levels and MT1 receptor expression in aging rats is associated with enhanced mammary tumor growth and decreased sensitivity to melatonin. *Breast Cancer Res Treat* 2011; **127**:91-8.
76. BURATTINI S, BATTISTELLI M, CODENOTTI S et al. Melatonin action in tumor skeletal muscle cells: an ultrastructural study. *Acta Histochem* 2016; **118**:278-85.
77. REITER RJ, TAN DX, MAYO JC et al. Melatonin as an antioxidant: biochemical mechanisms and pathophysiological implications in humans. *Acta Biochim Pol* 2003; **50**:1129-46.
78. RODRIGUEZ C, MAYO JC, SAINZ RM et al. Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. *J Pineal Res* 2004; **36**:1-9.
79. PARK JW, HWANG MS, SUH SI et al. Melatonin down-regulates HIF-1 alpha expression through inhibition of protein translation in prostate cancer cells. *J Pineal Res* 2009; **46**:415-21.
80. KIM KK, ABELMAN S, YANO N et al. Tetrathiomolybdate inhibits mitochondrial complex IV and mediates degradation of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  in cancer cells. *Sci Rep* 2015; **5**:14296.

81. COLOMBO J, MACIEL JM, FERREIRA LC et al. Effects of melatonin on HIF-1 $\alpha$  and VEGF expression and on the invasive properties of hepatocarcinoma cells. *Oncol Lett* 2016; **12**:231-237.
82. DAI M, CUI P, YU M et al. Melatonin modulates the expression of VEGF and HIF-1 alpha induced by CoCl<sub>2</sub> in cultured cancer cells. *J Pineal Res* 2008; **44**:121-6.
83. VRIEND J , REITER RJ Melatonin and the von Hippel-Lindau/HIF-1 oxygen sensing mechanism: A review. *Biochim Biophys Acta* 2016; **1865**:176-83.
84. CARBAJO-PESCADOR S, ORDOÑEZ R, BENET M et al. Inhibition of VEGF expression through blockade of Hif1 $\alpha$  and STAT3 signalling mediates the anti-angiogenic effect of melatonin in HepG2 liver cancer cells. *Br J Cancer* 2013; **109**:83-91.
85. SORACE AG, SYED AK, BARNES SL et al. Quantitative [(18)F]FMISO PET Imaging Shows Reduction of Hypoxia Following Trastuzumab in a Murine Model of HER2+ Breast Cancer. *Mol Imaging Biol* 2017; **19**:130-137.
86. LEVINE AJ , PUZIO-KUTER AM The control of the metabolic switch in cancers by oncogenes and tumor suppressor genes. *Science* 2010; **330**:1340-4.
87. 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**:234-50.
88. LIU Y, LI YM, TIAN RF et al. The expression and significance of HIF-1alpha and GLUT-3 in glioma. *Brain Res* 2009; **1304**:149-54.
89. AYALA FR, ROCHA RM, CARVALHO KC et al. GLUT1 and GLUT3 as potential prognostic markers for Oral Squamous Cell Carcinoma. *Molecules* 2010; **15**:2374-87.
90. SCHLÖBER HA, DREBBER U, URBANSKI A et al. Glucose transporters 1, 3, 6, and 10 are expressed in gastric cancer and glucose transporter 3 is associated with UICC stage and survival. *Gastric Cancer* 2017; **20**:83-91.
91. JAMALI S, KLIER M, AMES S et al. Hypoxia-induced carbonic anhydrase IX facilitates lactate flux in human breast cancer cells by non-catalytic function. *Sci Rep* 2015; **5**:13605.
92. LOU Y, MCDONALD PC, OLOUMI A et al. Targeting tumor hypoxia: suppression of breast tumor growth and metastasis by novel carbonic anhydrase IX inhibitors. *Cancer Res* 2011; **71**:3364-76.
93. PARKS SK, CORMERAIS Y, DURIVAUT J et al. Genetic disruption of the pHi-regulating proteins Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger 1 (SLC9A1) and carbonic anhydrase 9 severely reduces growth of colon cancer cells. *Oncotarget* 2017; **8**:10225-10237.
94. SOWA T, MENJU T, CHEN-YOSHIKAWA TF et al. Hypoxia-inducible factor 1 promotes chemoresistance of lung cancer by inducing carbonic anhydrase IX expression. *Cancer Med* 2017; **6**:288-297.
95. CROOKE A, HUETE-TORAL F, MARTÍNEZ-ÁGUILA A et al. Involvement of carbonic anhydrases in the ocular hypotensive effect of melatonin analogue 5-MCA-NAT. *J Pineal Res* 2012; **52**:265-70.
96. TAFRESHI NK, LLOYD MC, PROEMSEY JB et al. Evaluation of CAIX and CAXII Expression in Breast Cancer at Varied O<sub>2</sub> Levels: CAIX is the Superior Surrogate Imaging Biomarker of Tumor Hypoxia. *Mol Imaging Biol* 2016; **18**:219-31.

97. MEEHAN J, WARD C, TURNBULL A et al. Inhibition of pH regulation as a therapeutic strategy in hypoxic human breast cancer cells. *Oncotarget* 2017.
98. CHU CY, JIN YT, ZHANG W et al. CA IX is upregulated in CoCl<sub>2</sub>-induced hypoxia and associated with cell invasive potential and a poor prognosis of breast cancer. *Int J Oncol* 2016; **48**:271-80.

**A melatonina controla o crescimento e necrose tumoral verificada por PET/CT  
com 18F-FDG em modelo experimental de câncer de mama**

André de Lima Mota<sup>1</sup>, Bruna Victorasso Jardim-Perassi<sup>1</sup>, Sofia Nascimento dos Santos<sup>2</sup>, Emerson Soares Bernardes<sup>2</sup>, Lorena Pozzo<sup>2</sup>, Bruno Cogliati<sup>2</sup>, Debora Aparecida Pires de Campos Zuccari<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Investigação Molecular do Câncer – LIMC, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto/FAMERP, São José do Rio Preto, Brazil

<sup>2</sup>Instituto de pesquisas energéticas e nucleares – IPEN, São Paulo, São Paulo, Brazil

**Informações de contato:**

André de Lima Mota

Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP)

Av. Brigadeiro Faria Lima, 5416 – Vila São Pedro

São José do Rio Preto SP/Brazil/ CEP: 15090-000

Telefone: +55 (17) 3201-5700 / +55 (17) 99258.7182

Email: [andre.biomedic@gmail.com](mailto:andre.biomedic@gmail.com)

## Resumo

Durante seu crescimento, o tumor pode alcançar aproximadamente 1-2 mm<sup>3</sup> antes que suas demandas de oxigênio e nutrientes sejam restritas. A baixa oxigenação é caracterizada como hipóxia, resultante da proliferação celular descontrolada, rápido crescimento tumoral e consequente perfusão inadequada em parte do tecido. Em áreas intratumorais, onde há escassez de oxigênio, as células podem sucumbir, evoluindo para apoptose ou necrose. A necrose central é uma característica comum no câncer de mama invasivo e está associada à agressividade tumoral, capacidade metastática e pior prognóstico. A melatonina, além de seus efeitos fisiológicos tem demonstrado importantes ações oncostáticas e oncoprotetoras caracterizadas como antioxidantes, pró-apoptóticas, anti-angiogênicas e controladoras da hipóxia e volume tumoral. Neste estudo avaliamos a ação da melatonina no controle do crescimento e necrose tumoral, verificados por imagens obtidas pela tomografia por emissão de pósitrons (PET) com o radiofármaco <sup>18</sup>F-FDG, em modelo *in-vivo* de câncer de mama triplo negativo. Os efeitos da melatonina foram avaliados *in vivo* utilizando camundongos nude atímicos injetados com as células MDA-MB-231 (modelo de xenoenxerto). Os resultados mostraram que o tratamento com melatonina controlou o crescimento tumoral e, conseqüentemente, a extensão das áreas de necrose intratumoral.

**Palavras-chave:** Câncer de mama; Hipóxia; Crescimento tumoral; Necrose; Melatonina.

## 1 INTRODUÇÃO

Como resultado da proliferação celular descontrolada e do rápido crescimento tumoral, áreas intratumorais com menor aporte vascular são frequentemente relatadas, principalmente na região central dos tumores <sup>1</sup>. A baixa oxigenação tecidual é caracterizada como hipóxia, resultante da menor vascularização e perfusão inadequada em regiões intratumorais <sup>2</sup>. Recentemente, áreas hipóxicas intratumorais foram identificadas como marcadores de prognóstico ruim em pacientes com câncer, estando associadas a malignidade tumoral e alta capacidade metastática <sup>3,4</sup>.

Em áreas intratumorais, onde há escassez de oxigênio, as células podem sofrer apoptose ou necrose. A necrose central é uma característica comum no câncer de mama invasivo e está associada a agressividade tumoral e pior prognóstico <sup>5</sup>. No câncer de mama, a necrose tumoral mostra-se correlacionada com o aumento do tamanho do tumor, alto grau histológico, status negativo do receptor de estrogênio, alta densidade de microvasos e infiltrações de macrófagos responsáveis pela expressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) <sup>6,7,5</sup>. Esses achados sugerem que as células tumorais com elevada taxa de proliferação poderiam levar a um crescimento tumoral além da sua capacidade nutritiva e de oxigenação. Deste modo, em tumores de grande volume e que possuem rápido crescimento, a hipóxia severa pode predispor ao aparecimento de necrose intratumoral <sup>5</sup>. Neste contexto, estudos clínicos indicam que, de todas as características clínicas, de neuroimagem e histopatológicas, a necrose visível em imagens de ressonância magnética tem o maior valor prognóstico e está inversamente relacionada à sobrevida de pacientes com glioblastoma <sup>8,9</sup>.

Áreas intratumorais hipóxicas podem ser identificadas por técnicas de imagem *in vivo*, como o PET/CT (Positron Emission Tomography/Computed Tomography). O

uso do PET/CT encontra-se em grande expansão, estabelecendo um valor essencial e, muito importante no diagnóstico e avaliação pré e pós-terapêutica <sup>10</sup>. O radiofármaco mais comumente utilizado é o <sup>18</sup>F-Fluorodesoxiglicose (FDG), um análogo da glicose administrado por via endovenosa. O <sup>18</sup>F-FDG segue a distribuição do metabolismo da glicose, por esta ser a principal fonte de energia para as células. Dessa forma, o <sup>18</sup>F-FDG é captado por células que têm grande consumo de glicose, com maior atividade metabólica como as células tumorais <sup>10</sup>. Devido a estas propriedades, este radiofármaco é frequentemente utilizado para identificação de tumores além de áreas intratumorais hipóxicas <sup>11,12,13</sup>. Zhao *et al.* (2005) observaram uma distribuição intratumoral heterogênea de <sup>18</sup>F-FDG em tumores malignos, e associaram essa heterogeneidade com a superexpressão de transportadores de glicose em regiões de hipóxia no tumor <sup>11</sup>. O PET/CT com <sup>18</sup>F-FDG, é uma técnica que permite avaliar, no mesmo exame, o metabolismo e a anatomia. Permite a identificação de alterações metabólicas em células neoplásicas e melhora a capacidade de detecção tumoral. A captação de <sup>18</sup>F-FDG é proporcional à taxa de atividade metabólica das células tumorais <sup>10</sup>. Além disso, como demonstrado por Folpe *et al.* (2000) o PET/CT com <sup>18</sup>F-FDG pode ser usado como uma técnica não-invasiva para avaliar de forma confiável a presença de necrose em sarcomas <sup>14</sup>. Estudos sugerem que a necrose metabólica diagnosticada por PET/CT com <sup>18</sup>F-FDG pode servir como um marcador de substituição bastante confiável para necrose patologicamente diagnosticada <sup>15</sup>. A presença de necrose metabolicamente diagnosticada e um volume significativamente maior de necrose intratumoral indicam tumores mais agressivos, além de correlaciona-las a uma menor sobrevida global e menor tempo livre de doença <sup>15</sup>.



De acordo com o exposto acima nota-se que o rápido crescimento tumoral, hipóxia e necrose constituem importantes obstáculos correlacionados com o alto grau histológico, capacidade metastática e pior prognóstico.

É nesse cenário que novos agentes terapêuticos como a melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina), vem ganhando espaço como possível tratamento contra o câncer de mama. A melatonina é o principal hormônio sintetizado pela glândula pineal, cuja produção é inibida na presença da luz<sup>16</sup>. Estudos relatam que a administração exógena da melatonina tem sido eficaz na inibição do crescimento tumoral *in vitro* e *in vivo* em diferentes tipos de câncer<sup>17,18</sup>. Além disso, inúmeras propriedades oncoprotetoras e oncostáticas vêm sendo atribuídas à melatonina<sup>19-27</sup>.

Estudos *in vivo* (xenograft model) demonstram que a melatonina é capaz de diminuir o crescimento tumoral em tumores de mama, RE positivos<sup>28</sup> ou RE negativos<sup>26</sup>. Para JARDIM-PERASSI *et al.* (2014) a melatonina diminuiu o crescimento tumoral e inibiu a proliferação celular verificada pelo marcador Ki-67<sup>26</sup>. Além de seus efeitos na diminuição do crescimento tumoral, um grande número de estudos demonstram que este homônimo controla a hipóxia tumoral. A ação protetora da melatonina contra hipóxia é sugerida principalmente pela inibição da expressão do fator de transcrição induzido por hipóxia (HIF-1 $\alpha$ ) e alguns de seus genes alvo<sup>29-31</sup>.

Dessa forma, este estudo investigou o efeito do tratamento com melatonina no controle do crescimento tumoral e de áreas de necrose intratumorais por meio de PET/CT com <sup>18</sup>F-FDG em modelo experimental de câncer de mama triplo negativo.

## 2 MATERIAS E MÉTODOS

### Considerações éticas

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (Prot. 001-003336/2014 – Licença CEUA 06/2014 - referente ao Projeto Temático no qual o presente estudo esteve inserido, intitulado “Melatonina no câncer de mama: Estudo experimental e translacional”). O estudo foi realizado seguindo os padrões nacionais e internacionais de ética em experimentação animal.

### 2.1 Cultivo celular

A linhagem celular de câncer de mama triplo negativa MDA-MB-231 (ATCC, Manassas, VA, USA) foi cultivada em estufa a 37 °C e 5 % de CO<sub>2</sub>, em frascos de cultura de 75 cm<sup>2</sup> com meio de cultura DMEM alta glicose (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium-High Glucose*) (GIBCO, Grand Island, NY, USA) suplementado com 10 % de soro fetal bovino (FBS) (GIBCO, Grand Island, NY, USA) e 1 % de penicilina e estreptomicina (GIBCO, Grand Island, NY, USA).

### 2.2 Desenvolvimento do modelo animal

Os camundongos Balb/c nude atímicos (fêmeas) foram adquiridos no Biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (USP-SP) e ao chegarem ao Biotério da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP) foram mantidos em condições livres de patógenos, a temperatura ambiente (21 °C a 25 °C), em exposição a luz por 12 horas e 12 horas no escuro. A ração e água foram oferecidas *ad libitum*. A linhagem MDA-MB-231 cultivada *in vitro* foi tripsinizada, centrifugada e

ressuspendida em meio de cultura livre de soro. Os camundongos receberam uma injeção com 50  $\mu\text{L}$  de meio de cultura contendo  $5 \times 10^6$  células viáveis no flanco.

### 2.3 Tratamento com melatonina

Os animais foram separados aleatoriamente entre os grupos controle ( $n = 5$ ) e tratado com melatonina ( $n = 5$ ). A solução veículo foi preparada utilizando 8ml de Solução salina com tampão fosfatos (PBS), 1 ml de dimetilsulfóxido (DMSO) e 1 ml de Cremophor (Sigma, St. Louise, MO, EUA). Os animais do grupo controle receberam 100  $\mu\text{L}$  de solução veículo por injeção intraperitoneal (IP). A melatonina (Sigma, St. Louise, MO, EUA) foi diluída na solução veículo e os animais do grupo tratado receberam IP de 100  $\mu\text{L}$  de melatonina (a uma dose de 40 mg/kg) durante cinco dias por semana. A melatonina foi administrada 1 hora antes que a iluminação da sala fosse desligada. O tratamento foi iniciado 10 dias após o implante do tumor e teve duração de 14 dias.

### 2.4 Micro-PET/CT

A técnica de imagem molecular foi realizada utilizando o equipamento de imageamento Albira  $\mu\text{PET/SPECT/CT}$  no Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN). O radiofármaco  $^{18}\text{F-FDG}$  é usualmente sintetizado de forma automatizada no IPEN, e, portanto, é facilmente obtido.

Os camundongos foram mantidos em jejum durante 4 horas antes da realização do procedimento. O radiofármaco  $^{18}\text{F-FDG}$  foi injetado via retro-orbital (**Figura 1**). As injeções de  $^{18}\text{F-FDG}$  foram realizadas contendo de 15.0 a 20.0 MBq diluídos em 100  $\mu\text{L}$ .

de solução fisiológica estéril. Seguindo outros estudos, as imagens do radiofármaco  $^{18}\text{F}$ -FDG foram obtidas 1 hora após sua aplicação <sup>32</sup>.



**Figura 1:** Injeção retro-orbital realizada nos camundongos para análise da captação do radiofármaco no tecido tumoral.

Após a injeção do radiofármaco  $^{18}\text{F}$ -FDG e do tempo de captação (1hora), os animais foram submetidos à anestesia inalatória com isoflurano a 2 % sob  $\text{O}_2$  a 100 % (1L/min), e posicionados no equipamento Albira  $\mu\text{PET}/\text{SPECT}/\text{CT}$  Carestream *Molecular Imaging* para aquisição das imagens (**Figura 2**) seguindo o protocolo de 5 minutos PET simples – 60mm *offset* 55mm e CT *Best* 35kv 400 $\mu\text{A}$  *offset* 55mm (aproximadamente 15 minutos). Durante a realização da imagem, a temperatura dos animais foi mantida em 37 °C. A reconstrução e a exportação das imagens foram realizadas no próprio *software* do equipamento e no *software* Amide.

Para a análise das imagens obtidas com o  $\mu\text{PET}/\text{SPECT}/\text{CT}$ , inicialmente a região tumoral de interesse foi delimitada e o volume tumoral obtido. O volume de necrose foi delimitado após aplicação de um “threshold”, no qual valores abaixo de 50 pixels foram considerados negativos (sem captação de FDG) e portanto,

correspondentes ao volume de necrose. A correlação entre o volume total dos tumores e o volume correspondente às áreas de necrose foi realizada utilizando-se o *software* PMOD (*PMOD Technologies Ltd, Zurich, Switzerland*).



**Figura 2:** Equipamento de micro-PET/CT do IPEN e detalhe do local onde o camundongo é posicionado e mantido sob anestesia inalatória para aquisição das imagens.

### **Análise Estatística**

Os resultados foram submetidos à análise descritiva para determinação da normalidade. Para a comparação de dois parâmetros foi realizado o Teste *t* de *Student*. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados significantes e todas as análises foram realizadas utilizando o software *Prism 6.0* (GraphPad, La Jolla, CA, USA).

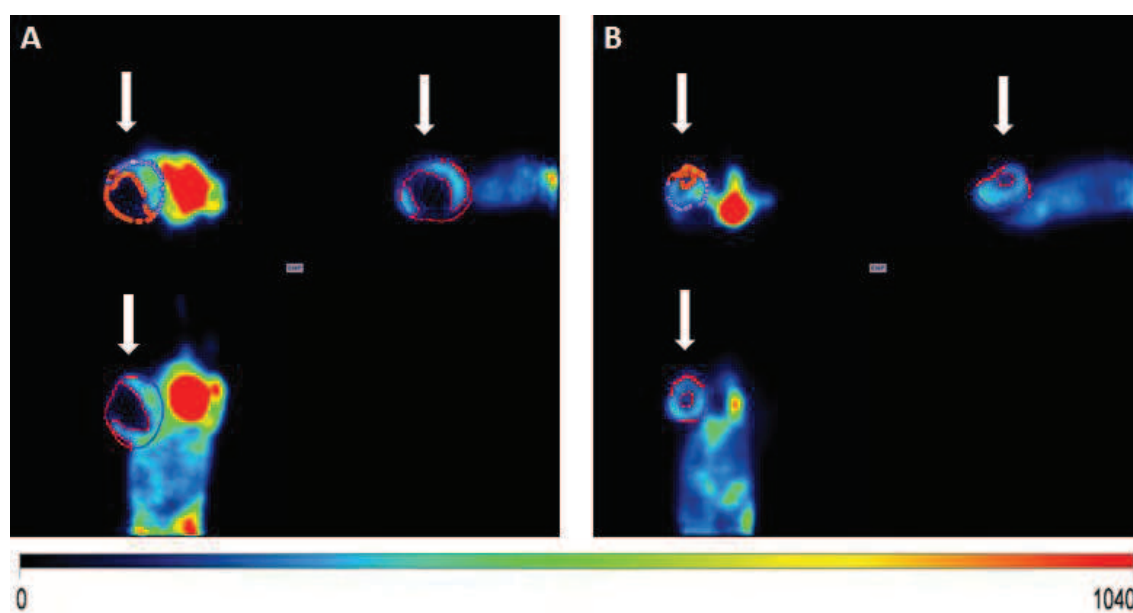
## **3 RESULTADOS**

### **A melatonina controla o crescimento e necrose tumoral**

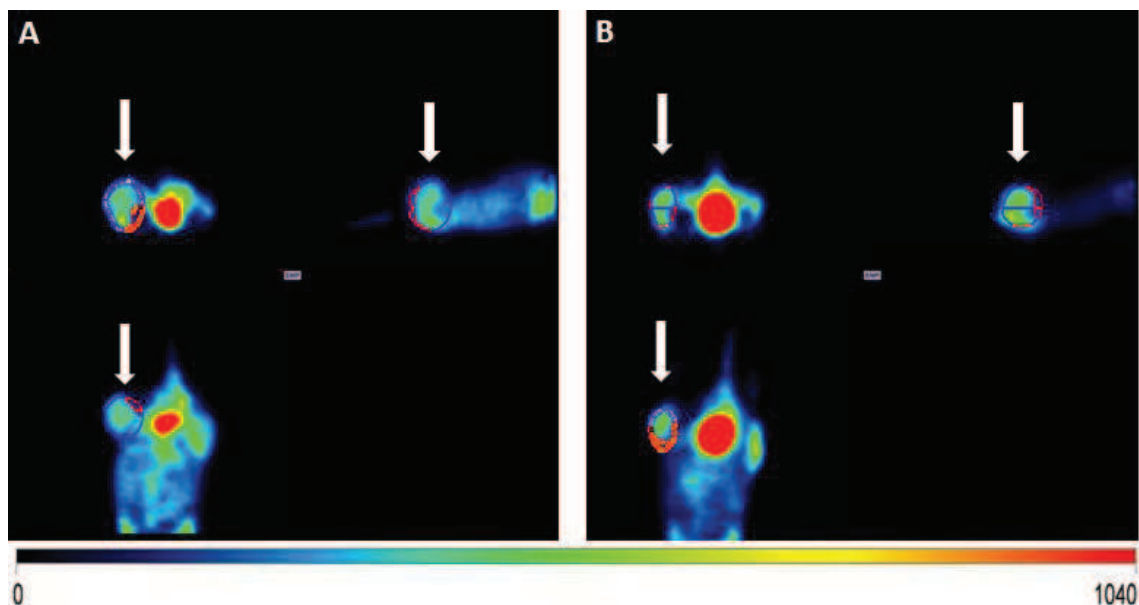
As delimitações das áreas tumorais e de necrose estão representadas nas **Figuras 3 e 4**. Como é possível observar nas imagens obtidas com o radiofármaco  $^{18}\text{F}$ -FDG, os animais do grupo controle (**Figuras 3A e 3B**) apresentam grande volume tumoral acompanhado de extensas áreas de necrose identificadas pela baixa captação do

radiofármaco. As áreas de necrose no grupo controle podem ser predominantemente identificadas nas regiões centrais dos tumores.

O grupo de animais tratados com melatonina (**Figuras 4A e 4B**) apresentou tumores nitidamente menores, com pequenas áreas de necrose. Neste grupo, a captação de  $^{18}\text{F}$ -FDG foi mais homogênea em toda a região tumoral.

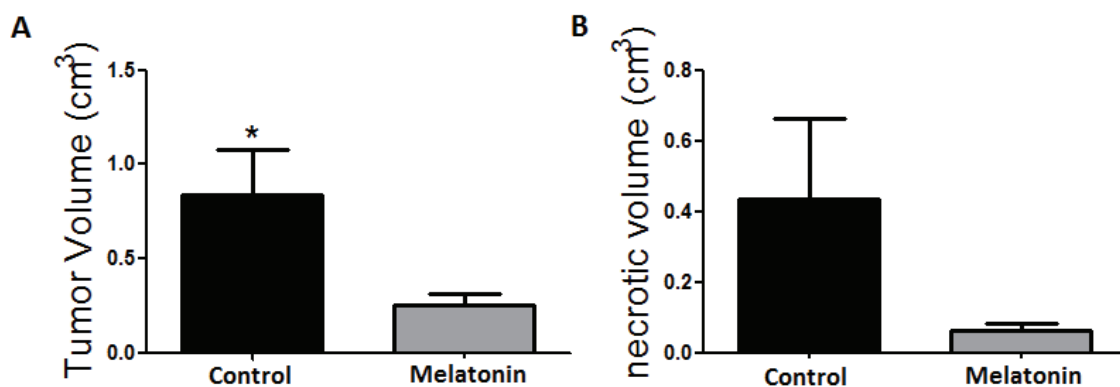


**Figura 3:** Imagens representativas da captação do radiofármaco  $^{18}\text{F}$ -FDG (região tumoral e áreas de necrose delimitadas) em dois animais do grupo controle, representadas nos cortes transversal, coronal e sagital. O local indicado pelas setas indica a região onde o tumor foi implantado no flanco direito dos camundongos.



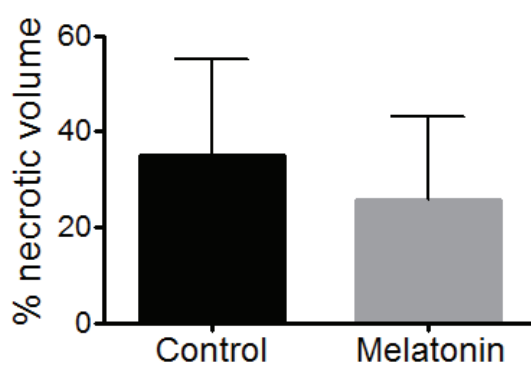
**Figura 4:** Imagens representativas da captação do radiofármaco  $^{18}\text{F}$ -FDG (região tumoral e áreas de necrose delimitadas) em dois animais do grupo tratado com melatonina, representadas nos cortes transversal, coronal e sagital. O local indicado pelas setas indica a região onde o tumor foi implantado no flanco direito dos comundongos.

A **Figura 5A** revela média do volume tumoral em animais do grupo controle e tratado com melatonina. A análise estatística mostrou que o grupo controle apresentou um maior volume tumoral quando comparado ao grupo tratado ( $p = 0.0498$ ; **Figura 5A**). A média do volume correspondente à área de necrose está representada na **Figura 5B**. A comparação do volume de necrose entre os grupos controle e tratado com melatonina demonstrou que apesar de o volume ser graficamente maior no grupo controle, a significância estatística não foi alcançada ( $p > 0,05$ ; **Figura 5B**), provavelmente porque o grupo controle apresentou um grande desvio padrão, uma vez que as áreas de necrose foram muito extensas em alguns animais deste mesmo grupo.



**Figura 5:** Representação gráfica do volume tumoral e de necrose nos grupos controle e tratado com melatonina. O gráfico **A** mostra a média do volume tumoral nos grupos controle e tratado. O gráfico **B** representa a média do volume correspondente à área de necrose para os dois grupos (grupo controle *versus* grupo tratado com melatonina).

A **Figura 6** mostra a percentagem de volume necrótico em relação ao volume total do tumor entre os grupos controle e tratado com melatonina. Não houve diferença estatisticamente significante entre os dois grupos ( $p > 0,05$ ; **Figura 5**), provavelmente devido ao alto desvio padrão encontrado nos mesmos. No entanto, graficamente, o grupo controle apresenta uma percentagem notadamente superior quando comparado ao grupo tratado.



**Figura 6:** Representação gráfica da percentagem de volume necrótico em relação ao volume total do tumor entre os grupos controle e tratado com melatonina.



## 4 DISCUSSÃO

Inúmeros estudos relatam as propriedades oncoprotetoras e oncostáticas atribuídas à melatonina, em especial no câncer de mama<sup>33,34,19-21,24,25,27</sup>.

Em nosso estudo, o tratamento com melatonina *in vivo* (40 mg/kg) foi capaz de controlar o crescimento tumoral em modelo xenográfico de câncer de mama triplo negativo. Esses resultados estão de acordo com outros estudos que demonstram a ação da melatonina no controle do crescimento de diferentes tipos de tumores<sup>28,35,26</sup>.

Sabe-se que um dos mecanismos que garantem a ação anti-proliferativa da melatonina é mediado pela ativação de seu receptor MT1<sup>36</sup>. No entanto, a melatonina também pode atuar por mecanismos independentes de seus receptores de membrana<sup>37</sup>. A melatonina consegue atravessar a membrana celular por ser lipofílica e exibir propriedades antioxidantes pela neutralização de efeitos deletérios promovidos por radicais livres<sup>38</sup>, e pelo aumento da expressão gênica e/ou atividade de enzimas antioxidantes<sup>39</sup>. Recentemente, Burattini *et al.* (2016) concluiu que a melatonina foi capaz de ativar a via apoptótica e, portanto, promover a morte de células tumorais de rhabdomiosarcoma, mediada ou não pelos receptores MT1 ou MT2<sup>37</sup>.

Além de sua ação no controle do crescimento tumoral, nossos resultados *in vivo* demonstram que o tratamento com melatonina foi capaz de diminuir áreas de necrose intratumorais. As áreas de necrose foram observadas principalmente na região central dos tumores, as quais possuem menor vascularização, e dessa forma a captação do radiofármaco pode ser observada de forma mais acentuada apenas na periferia dos tumores. De acordo com nossos resultados, um recente estudo avaliou a captação de <sup>18</sup>F-FDG em tumores de vesícula com grande percentual de necrose central, observando maior captação do radiofármaco na periferia dos tumores<sup>40</sup>. Além disso, sabe-se que a

captação de radiofármacos depende do fluxo sanguíneo, perfusão tecidual, permeabilidade capilar e capacidade de difusão, dentre outros fatores como depuração plasmática, afinidade e estabilidade *in vivo* <sup>40,41</sup>. Neste estudo, os tumores tratados com melatonina apresentaram volume tumoral inferior aos tumores do grupo controle, o que pode ter contribuído com um menor percentual de áreas necróticas e conseqüentemente, uma captação mais homogênea dos radiofármacos no grupo tratado.

As áreas de necrose tumoral apresentam um acúmulo diminuído de <sup>18</sup>F-FDG, isso geralmente é visto como a ausência de atividade metabólica, principalmente na região central de massas com extenso volume <sup>41</sup>. Estudos revelam que a técnica de PET/CT com <sup>18</sup>F-FDG constitui uma importante ferramenta que pode ser empregada para avaliar de forma confiável a presença de necrose em sarcomas <sup>14</sup>.

A ação da melatonina no controle da necrose tumoral ainda é pouco descrita na literatura. Em discordância com nossos resultados, Xu *et al.* (2013) relatou que a melatonina pode ser um agente pro-apoptótico e pró-necrótico em células de câncer de pâncreas por meio da modulação do equilíbrio Bcl-2 / Bax <sup>42</sup>.

Nossos resultados mostram que o tratamento com melatonina foi capaz de controlar o crescimento e necrose tumoral. Dessa forma, sugere-se que a melatonina, ao controlar o crescimento dos tumores, controla também a formação de áreas necróticas frequentemente relacionadas com o alto grau histológico, status negativo do receptor de estrogênio, alta densidade de microvasos, aumento da expressão de VEGF e sobrevida livre de doença mais pobre <sup>6,7,5,15</sup>.

Tomados em conjunto, nossos resultados sugerem que a melatonina pode controlar o crescimento tumoral e conseqüentemente a formação de áreas de necrose.

## REFERÊNCIAS

1. HARRIS AL Hypoxia--a key regulatory factor in tumour growth. *Nat Rev Cancer* 2002; **2**:38-47.
2. CARMELIET P , JAIN RK Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature* 2011; **473**:298-307.
3. KHRAMTSOV VV , GILLIES RJ Janus-faced tumor microenvironment and redox. *Antioxid Redox Signal* 2014; **21**:723-9.
4. KRAKHMAL NV, ZAVYALOVA MV, DENISOV EV, VTORUSHIN SV Cancer Invasion: Patterns and Mechanisms. *Acta Naturae* 2015;**7**:17-28.
5. EDWARDS JG, SWINSON DE, JONES JL, MULLER S, O'BYRNE KJ Tumor necrosis correlates with angiogenesis and is a predictor of poor prognosis in malignant mesothelioma. *Chest*. 2003;**124**:1916-23.
6. LEEK RD, LANDERS RJ, HARRIS AL, LEWIS CE Necrosis correlates with high vascular density and focal macrophage infiltration in invasive carcinoma of the breast. *Br J Cancer*. 1999;**79**:991-5.
7. LEWIS JS, LANDERS RJ, UNDERWOOD JC, et al. Expression of vascular endothelial growth factor by macrophages is upregulated in poorly vascularized areas of breast carcinomas. *J Pathol* 2000;**192**:150–158.
8. HAMMOUD MA, SAWAYA R, SHI W, LEEDS NE. Prognostic significance of preoperative MRI scans in glioblastoma multiforme. *J. Neuro-Oncol* 1996;**27**:65-73.
9. RAZA SM, FULLER GN, FHEE CH, HUANG S, SAWAYA R. Identification of necrosis-associated genes in glioblastoma by cDNA microarray analysis. *Clin Cancer Res* 2004;**10**:212-21.
10. RODRIGUES ACS. A importância de estudos dinâmicos em PET/CT para avaliação de doenças oncológicas [dissertation]. Coimbra: Instituto Politécnico de Coimbra.; 2015.
11. ZHAO S, KUGE Y, MOCHIZUKI T, TAKAHASHI T, NAKADA K , et al. Biologic correlates of intratumoral heterogeneity in 18F-FDG distribution with regional expression of glucose transporters and hexokinase-II in experimental tumor. *J Nucl Med* 2005;**46**:675-82.
12. SEINO H, ONO S, MIRURA H, MOROHASHI S, WU Y, TSUSHIMA F, et al. Hypoxia is important in F-18 FDG accumulation in thecoma-fibroma tumors on F-18 FDG PET/CT scans. *Mol Med Rep* 2016;**13**:3821-7.
13. JEONG YJ, JUNG JW, CHO YY, PARK SH, OH HK, KANG S. Correlation of hypoxia inducible transcription factor in breast cancer and SUVmax of F-18 FDG PET/CT. *Nucl Med Rev Cent East Eur* 2017;**20**:32-38.

14. FOLPE AL, LYLES RH, SPROUSE JT, CONRAD EU, EARY JF. (F-18) fluorodeoxyglucose positron emission tomography as a predictor of pathologic grade and other prognostic variables in bone and soft tissue sarcoma. *Clin Cancer Res* 2000;**6**:1279-87.
15. RAKHEJA R, MAKIS W, TULBAH R, SKAMENE S, HOLCROFT C, et al. Necrosis on FDG PET/CT correlates with prognosis and mortality in sarcomas. *AJR Am J Roentgenol* 2013;**201**:170-7.
16. STEVENS RG, BRAINARD GC, BLASK DE, LOCKLEY SW, MOTTA ME. Breast cancer and circadian disruption from electric lighting in the modern world. *CA Cancer J Clin* 2014;**64**:207-18.
17. LUCHETTI F, CANONICO B, BETTI M et al. Melatonin signaling and cell protection function. *FASEB J* 2010; **24**:3603-24.
18. CUTANDO A, LÓPEZ-VALVERDE A, ARIAS-SANTIAGO S et al. Role of melatonin in cancer treatment. *Anticancer Res* 2012; **32**:2747-53.
19. MEDIAVILLA MD, SANCHEZ-BARCELO EJ, TAN DX et al. Basic mechanisms involved in the anti-cancer effects of melatonin. *Curr Med Chem* 2010; **17**:4462-81.
20. DI BELLA G, MASCIA F, GUALANO L et al. Melatonin anticancer effects: review. *Int J Mol Sci* 2013; **14**:2410-30.
21. PROIETTI S, CUCINA A, REITER RJ et al. Molecular mechanisms of melatonin's inhibitory actions on breast cancers. *Cell Mol Life Sci* 2013; **70**:2139-57.
22. ORDOÑEZ R, CARBAJO-PESCADOR S, PRIETO-DOMINGUEZ N et al. Inhibition of matrix metalloproteinase-9 and nuclear factor kappa B contribute to melatonin prevention of motility and invasiveness in HepG2 liver cancer cells. *J Pineal Res* 2014; **56**:20-30.
23. MORI F, FERRAIUOLO M, SANTORO R et al. Multitargeting activity of miR-24 inhibits long-term melatonin anticancer effects. *Oncotarget* 2016.
24. NOOSHINFAR E, SAFAROGHLI-AZAR A, BASHASH D et al. Melatonin, an inhibitory agent in breast cancer. *Breast Cancer* 2017; **24**:42-51.
25. ALVAREZ-GARCÍA V, GONZÁLEZ A, ALONSO-GONZÁLEZ C et al. Antiangiogenic effects of melatonin in endothelial cell cultures. *Microvasc Res* 2013; **87**:25-33.
26. 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**:e85311.
27. BORIN TF, ARBAB AS, GELALETI GB et al. Melatonin decreases breast cancer metastasis by modulating Rho-associated kinase protein-1 expression. *J Pineal Res* 2016; **60**:3-15

28. COS S, FERNÁNDEZ R, GUÉZMES A, SÁNCHEZ-BARCELÓ EJ. Influence of melatonin on invasive and metastatic properties of MCF-7 human breast cancer cells. *Cancer Res* 1998;**58**:4383-90.
29. PARK SY, JANG WJ, YI EY et al. Melatonin suppresses tumor angiogenesis by inhibiting HIF-1 $\alpha$  stabilization under hypoxia. *J Pineal Res* 2010; **48**:178-84.
30. ZHANG Y, LIU Q, WANG F et al. Melatonin antagonizes hypoxia-mediated glioblastoma cell migration and invasion via inhibition of HIF-1 $\alpha$ . *J Pineal Res* 2013; **55**:121-30.
31. SOHN EJ, WON G, LEE J et al. Upregulation of miRNA3195 and miRNA374b Mediates the Anti-Angiogenic Properties of Melatonin in Hypoxic PC-3 Prostate Cancer Cells. *J Cancer* 2015; **6**:19-28.
32. MULERO F, DONATE LE, SERRANO M. Imaging Cancer in Mice by PET, CT, and Combined PET-CT. *Curr Protoc Mouse Biol* 2011;**1**:85-103.
33. BLASK DE, DAUCHY RT, DAUCHY EM et al. Light exposure at night disrupts host/cancer circadian regulatory dynamics: impact on the Warburg effect, lipid signaling and tumor growth prevention. *PLoS One* 2014; **9**:e102776.
34. HILL SM, FRASCH T, XIANG S, YUAN L, MAO L. Molecular mechanisms of melatonin anticancer effects. *Integr Cancer Ther.* 2009;**8**:337-46.
35. SHARMAN EH, SHARMAN KG , BONDY SC Extended exposure to dietary melatonin reduces tumor number and size in aged male mice. *Exp Gerontol* 2011; **46**:18-22.
36. HILL SM, CHENG C, YUAN L et al. Declining melatonin levels and MT1 receptor expression in aging rats is associated with enhanced mammary tumor growth and decreased sensitivity to melatonin. *Breast Cancer Res Treat* 2011; **127**:91-8.
37. BURATTINI S, BATTISTELLI M, CODENOTTI S et al. Melatonin action in tumor skeletal muscle cells: an ultrastructural study. *Acta Histochem* 2016; **118**:278-85.
38. REITER RJ, TAN DX, MAYO JC et al. Melatonin as an antioxidant: biochemical mechanisms and pathophysiological implications in humans. *Acta Biochim Pol* 2003; **50**:1129-46.
39. RODRIGUEZ C, MAYO JC, SAINZ RM et al. Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. *J Pineal Res* 2004; **36**:1-9.
40. DONG A, DONG H, JING W, ZUO C. FDG PET/CT in Sarcomatoid Carcinoma of the Gallbladder With Chondroid Differentiation. *Clin Nucl Med.* 2016;**41**:638-40.
41. THRALL, James H.; ZIESSMAN, Harvey A.; PENAS, Maria Expósito. *Medicina nuclear*. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.

**42.** XU C, WU A ZHU H, FANG H, XU L, SHEM J. Melatonin is involved in the apoptosis and necrosis of pancreatic cancer cell line SW-1990 via modulating of Bcl-2/Bax balance. *Biomed Pharmacother* 2013;**67**:133-9.

*Conclusão*

### 3. CONCLUSÃO

1. A melatonina é capaz de reduzir a viabilidade da linhagem tumoral triplo-receptor negativo (MDA-MB-231) e controlar o crescimento tumoral *in-vivo*.

2. A melatonina é capaz de controlar a hipóxia tumoral reduzindo os níveis gênicos e proteicos de HIF-1 $\alpha$ . Além disso, sugerimos que, através de sua ação sobre HIF-1 $\alpha$ , a melatonina pode controlar o metabolismo energético por meio da inibição dos transportadores de glicose (GLUT-1 e GLUT-3) e anidrases carbônicas (CA-IX e CA-XII) verificada neste estudo.

3. A melatonina controla o crescimento e necrose tumoral verificada por PET/CT com 18F-FDG em modelo experimental de câncer de mama.

Tomados em conjunto, nossos resultados sugerem que a melatonina consegue reverter as condições adversas proporcionadas pelo microambiente tumoral, controlando o metabolismo em resposta à hipóxia e o crescimento tumoral verificado pelo volume e necrose dos tumores.



## *Referências Bibliográficas*

#### 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. INCA. Tipos de câncer: mama. 2016; <http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/sintese-de-resultados-comentarios.asp>. Acesso em: 23 mar.2016.
2. Walker RA, Jones JL, Chappell S, Walsh T, Shaw JA. Molecular pathology of breast cancer and its application to clinical management. *Cancer Metastasis* 1997;16:5-27.
3. Ghoncheh M, Pournamdar Z, Salehiniya H. Incidence and Mortality and Epidemiology of Breast Cancer in the World. *Asian Pac J Cancer Prev* 2016;17:43-6.
4. Prat A, Perou CM. Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. *Mol Oncol* 2011;5:5-23.
5. Engelhardt EG, Garvelink MM, de Haes JH, van der Hoeven JJ, Smets EM, Pieterse AH, et al. *J Clin Oncol* 2014;32:238-50.
6. Perou CM, Sørli T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *nature* 2000;406:747-52.
7. FERREIRA, C.G.; ROCHA, J.C. *Oncologia molecular*. São Paulo: Atheneu; 2010.
8. Joyce JA, Pollard JW. Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat Rev Cancer* 2009;9:239-52.
9. Egeblad M, Nakasone ES, Werb Z. Tumors as organs: complex tissues that interface with the entire organism. *Dev Cell* 2010;18:884-901.
10. Chauhan A, Subba SH, Menezes RG, Shetty BS, Thakur V, Chabra S, Warriar R. Younger women are affected by breast cancer in South India - a hospital-based descriptive study. *Asian Pac J Cancer Prev* 2011;12:709-11.
11. Hale MD, Hayden JD, Grabsch HI. Tumour-microenvironment interactions: role of tumour stroma and proteins produced by cancer-associated fibroblasts in chemotherapy response. *Cellular Oncology* 2013;36:95-112.
12. Jacobetz MA, Chan DS, Nesses A, Bapiro TE, Cook N, Frese KK, et al. Hyaluronan impairs vascular function and drug delivery in a mouse model of pancreatic cancer. *Gut* 2013;62:112-20.
13. Naba A, Clauser KR, Lamar JM, Carr SA, Hynes RO. Extracellular matrix signatures of human mammary carcinoma identify novel metastasis promoters. *Elife* 2014; 3:e01308.
14. Sullivan R, Graham CH. Hypoxia prevents etoposide-induced DNA damage in cancer cells through a mechanism involving hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cancer Ther* 2009; 8:1702-13.
15. 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* 2010; 9:191.

16. El Guerrab A, Cayre A, Kwiatkowski F, Privat M, Rossignol JM, Rossignol F, et al. Quantification of hypoxia-related gene expression as a potential approach for clinical outcome prediction in breast cancer. *PLoS One* 2017;12:e0175960.
17. Carmeliet P, Jain RK. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature* 2011;473:298-307.
18. Harris AL. Hypoxia--a key regulatory factor in tumour growth. *Nat Rev Cancer* 2002; 2:38-47.
19. Milani M, Harris AL. Targeting tumour hypoxia in breast cancer. *Eur J Cancer* 2008; 44:2766-73.
20. Vordermark D. Hypoxia-specific targets in cancer therapy: role of splice variants. *BMC Med* 2010; 8:45.
21. Gilkes DM. Implications of Hypoxia in Breast Cancer Metastasis to Bone. *Int J Mol Sci* 2016; 17: e1669.
22. Wilson WR, Hay MP. Targeting hypoxia in cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2011;11:393-410.
23. Mroz EA, Tward AD, Pickering CR, Myers JN, Ferris RL, Rocco JW. High intratumor genetic heterogeneity is related to worse outcome in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer* 2013;119:3034-42.
24. Manoochehri Khoshinani H, Afshar S, Najafi R. Hypoxia: A Double-Edged Sword in Cancer Therapy. *Cancer Invest* 2016;34:536-545.
25. Takata M, Shirasaki F, Nakatani T, Takehara K. Hereditary non-polyposis colorectal cancer associated with disseminated superficial porokeratosis. Microsatellite instability in skin tumours. *Br J Dermatol* 2000;143:851-5.
26. Ruiz C, Lenkiewicz E, Evers L, Holley T, Robeson A, Kiefer J, et al. Advancing a clinically relevant perspective of the clonal nature of cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108:12054-9.
27. Snuderl M, Fazlollahi L, Le LP, Nitta M, Zhelyazkova BH, Davidson CJ, et al. Mosaic amplification of multiple receptor tyrosine kinase genes in glioblastoma. *Cancer Cell* 2011;20:810-7.
28. Ding M, Wang H, Chen J, Shen B, Xu Z. Identification and functional annotation of genome-wide ER-regulated genes in breast cancer based on ChIP-Seq data. *Comput Math Methods Med* 2012;2012:568950.
29. Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, Larkin J, Endesfelder D, Gronroos E. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N Engl J Med* 2012;366:883-92.

30. Xu Y, Xia X, Pan H. Active autophagy in the tumor microenvironment: A novel mechanism for cancer metastasis. *Oncol Lett* 2013;5:411-416.
31. Sadri N, Zhang PJ. Hypoxia-inducible factors: mediators of cancer progression; prognostic and therapeutic targets in soft tissue sarcomas. *Cancers (Basel)* 2013;5:320-33.
32. Khramtsov VV, Gillies RJ. Janus-faced tumor microenvironment and redox. *Antioxid Redox Signal* 2014;21:723-9.
33. Karakashev SV, Reginato MJ. Progress toward overcoming hypoxia-induced resistance to solid tumor therapy. *Cancer Manag Res* 2015;7:253-64.
34. Cameron D, Kunkler I, Dixon M, Jack W, Thomas J, Kerr G. Intraoperative radiotherapy for early breast cancer. *Lancet* 2010;376:1143-4.
35. Erlich F, Camisão C, Nogueira-Rodrigues A, Altino S, Ferreira CG, Mamede M. 18F-FDG-PET-based tumor delineation in cervical cancer: threshold contouring and lesion volumes. *Rev Esp Med Nucl Imagen Mol* 2013;32:162-3.
36. Hu Z, Sun R, Curtis C. A population genetics perspective on the determinants of intra-tumor heterogeneity. *Biochim Biophys Acta* 2017;1867:109-126.
37. Samanta D, Gilkes DM, Chaturvedi P, Xiang L, Semenza GL. Hypoxia-inducible factors are required for chemotherapy resistance of breast cancer stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111:E5429-38
38. Mekhail K, Gunaratnam L, Bonicalzi ME, Lee S. HIF activation by pH-dependent nucleolar sequestration of VHL. *Nat Cell Biol* 2004;6:642-7.
39. Swietach P, Vaughan-Jones RD, Harris AL. Regulation of tumor pH and the role of carbonic anhydrase 9. *Cancer Metastasis Rev* 2007;26:299-310.
40. Rundqvist H, Johnson RS. Tumour oxygenation: implications for breast cancer prognosis. *J Intern Med* 2013;274:205-12.
41. Semenza GL. HIF-1 and tumor progression: pathophysiology and therapeutics. *Trends Mol Med* 2002;8:S62-7.
42. Dai M, Cui P, Yu M, Han J, Li H, Xiu R. Melatonin modulates the expression of VEGF and HIF-1 alpha induced by CoCl<sub>2</sub> in cultured cancer cells. *J Pineal Res* 2008;44:121-6.
43. Park JW, Hwang MS, Suh SI, Baek WK. Melatonin down-regulates HIF-1 alpha expression through inhibition of protein translation in prostate cancer cells. *J Pineal Res* 2009;46:415-21.
44. Park SY, Jang WJ, Yi EY, Jang JY, Jung Y, Jeong JW, Kim YJ. Melatonin suppresses tumor angiogenesis by inhibiting HIF-1alpha stabilization under hypoxia. *J Pineal Res* 2010;48:178-84.

45. Vriend J, Reiter RJ. Melatonin and the von Hippel-Lindau/HIF-1 oxygen sensing mechanism: A review. *Biochim Biophys Acta* 2016;1865:176-83.
46. Dang CV, Semenza GL. Oncogenic alterations of metabolism. *Trends Biochem Sci* 1999;24:68-72.
47. Ke Q, Costa M. Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). *Mol Pharmacol* 2006;70:1469-80.
48. Uehara M, Sano K, Ikeda H, Nonaka M, Asahina I. Hypoxia-inducible factor 1 alpha in oral squamous cell carcinoma and its relation to prognosis. *Oral Oncol* 2009;45:241-6.
49. Varia MA, Calkins-Adams DP, Rinker LH, Kennedy AS, Novotny DB, Fowler WC Jr, Raleigh JA. Pimonidazole: a novel hypoxia marker for complementary study of tumor hypoxia and cell proliferation in cervical carcinoma. *Gynecol Oncol* 1998;71:270-7.
50. Busk M1, Jakobsen S, Horsman MR, Mortensen LS, Iversen AB, Overgaard J, et al. PET imaging of tumor hypoxia using 18F-labeled pimonidazole. *Acta Oncol* 2013;52:1300-7.
51. Mascini NE, Cheng M, Jiang L, Rizwan A, Podmore H, Bhandari DR. Mass Spectrometry Imaging of the Hypoxia Marker Pimonidazole in a Breast Tumor Model. *Anal Chem* 2016;88:3107-14.
52. Xu K, Mao X, Mehta M, Cui J, Zhang C, Mao F, Xu Y. Elucidation of how cancer cells avoid acidosis through comparative transcriptomic data analysis. *PLoS One* 2013;8:e71177.
53. Chen Z, Lu W, Garcia-Prieto C, Huang P. The Warburg effect and its cancer therapeutic implications. *J Bioenerg Biomembr* 2007;39:267-74.
54. Cairns RA, Harris IS, Mak TW. Regulation of cancer cell metabolism. *Nat Rev Cancer* 2011;11:85-95.
55. Waitzberg D, Nardi L, Ravacci G, Torrinhas R, Síndrome da anorexia e anorexia e caqueixa em câncer: Abordagem terapêutica. *Nutrição e câncer*. 1ed. 2006;56:334-352.
56. Kocdor MA, Kocdor H, Pereira JS, Vanegas JE, Russo IH, Russo J. Progressive increase of glucose transporter-3 (GLUT-3) expression in estrogen-induced breast carcinogenesis. *Clin Transl Oncol* 2013;15:55-64.
57. Krzeslak A, Wojcik-Krowiranda K, Forma E, Jozwiak P, Romanowicz H, Bienkiewicz A, Brys M. Expression of GLUT1 and GLUT3 glucose transporters in endometrial and breast cancers. *Pathol Oncol Res* 2012;18:721-8.
58. Pinheiro C, Sousa B, Albergaria A, Paredes J, Dufloth R, Vieira D, Schmitt F, Baltazar F. GLUT1 and CAIX expression profiles in breast cancer correlate with adverse prognostic factors and MCT1 overexpression. *Histol Histopathol* 2011;26:1279-86.

59. Chen CL, Chu JS, Su WC, Huang SC, Lee WY. Hypoxia and metabolic phenotypes during breast carcinogenesis: expression of HIF-1 $\alpha$ , GLUT1, and CAIX. *Virchows Arch* 2010;457:53-61.
60. Kim K, Park WY, Kim JY, Sol MY, Shin DH, Park DY, et al. Prognostic Relevance of the Expression of CA IX, GLUT-1, and VEGF in Ovarian Epithelial Cancers. *Korean J Pathol* 2012;46:532-40.
61. Barron CC, Bilan PJ, Tsakiridis T, Tsiani E. Facilitative glucose transporters: Implications for cancer detection, prognosis and treatment. *Metabolism* 2016;65:124-39.
62. Oh S, Kim H, Nam K, Shin I. Glut1 promotes cell proliferation, migration and invasion by regulating epidermal growth factor receptor and integrin signaling in triple-negative breast cancer cells. *BMB Rep* 2017;50:132-137.
63. Wu H, Ding Z, Hu D, Sun F, Dai C, Xie J, Hu X. Central role of lactic acidosis in cancer cell resistance to glucose deprivation-induced cell death. *J Pathol* 2012;227:189-99.
64. Park HJ, Lyons JC, Ohtsubo T, Song CW. Acidic environment causes apoptosis by increasing caspase activity. *Br J Cancer* 1999;80:1892-7.
65. Williams AC, Collard TJ, Paraskeva C. An acidic environment leads to p53 dependent induction of apoptosis in human adenoma and carcinoma cell lines: implications for clonal selection during colorectal carcinogenesis. *Oncogene* 1999;18:3199-204.
66. Gatenby RA, Gawlinski ET, Gmitro AF, Kaylor B, Gillies RJ. Acid-mediated tumor invasion: a multidisciplinary study. *Cancer Res* 2006;66:5216-23.
67. Gatenby RA, Gillies RJ. A microenvironmental model of carcinogenesis. *Nat Rev Cancer* 2008;8:56-61.
68. De Milito A, Canese R, Marino ML, Borghi M, Iero M, Villa A, et al. pH-dependent antitumor activity of proton pump inhibitors against human melanoma is mediated by inhibition of tumor acidity. *Int J Cancer* 2010;127:207-19.
69. Wykoff CC, Beasley N, Watson PH, Campo L, Chia SK, English R, et al. *Am J Pathol* 2001;158:1011-9.
70. Potter CP, Harris AL. Diagnostic, prognostic and therapeutic implications of carbonic anhydrases in cancer. *Br J Cancer* 2003;89:2-7.
71. Ivanov S, Liao SY, Ivanova A, Danilkovitch-Miagkova A, Tarasova N, Weirich G, et al. Expression of hypoxia-inducible cell-surface transmembrane carbonic anhydrases in human cancer. *Am J Pathol* 2001;158:905-19.
72. Watson PH, Chia SK, Wykoff CC, Han C, Leek RD, Sly WS, et al. Carbonic anhydrase XII is a marker of good prognosis in invasive breast carcinoma. *Br J Cancer* 2003;88:1065-70.

73. Chiche J1, Ilc K, Laferrière J, Trottier E, Dayan F, Mazure NM, et al. Hypoxia-inducible carbonic anhydrase IX and XII promote tumor cell growth by counteracting acidosis through the regulation of the intracellular pH. *Cancer Res* 2009;69:358-68.
74. Ward C, Meehan J, Mullen P, Supuran C, Dixon JM, Thomas JS, et al. Evaluation of carbonic anhydrase IX as a therapeutic target for inhibition of breast cancer invasion and metastasis using a series of in vitro breast cancer models. *Oncotarget* 2015;6:24856-70.
75. Webb BA, Chimenti M, Jacobson MP, Barber DL. Dysregulated pH: a perfect storm for cancer progression. *Nat Rev Cancer* 2011;22:671-7.
76. Gillies RJ, Raghunand N, Karczmar GS, Bhujwala ZM. MRI of the tumor microenvironment. *J Magn Reson Imaging* 2002;16:430-50.
77. Abboud MR, Cure J, Granger S, Gallagher D, Hsu L, Wang W, et al. Magnetic resonance angiography in children with sickle cell disease and abnormal transcranial Doppler ultrasonography findings enrolled in the STOP study. *Blood* 2004;103:2822-6.
78. Stüwe L1, Müller M, Fabian A, Waning J, Mally S, Noël J, Schwab A, Stock C. pH dependence of melanoma cell migration: protons extruded by NHE1 dominate protons of the bulk solution. *J Physiol* 2007;585:351-60.
79. Rosenberg V, Pastorekova S, Zatovicova M, Vidlickova I, Jelenska L, Slezak P. High serum carbonic anhydrase IX predicts shorter survival in head and neck cancer. *Bratisl Lek Listy* 2016;117:201-4.
80. Rodrigues ACS. A importância de estudos dinâmicos em PET/CT para avaliação de doenças oncológicas [dissertation]. Coimbra: Instituto Politécnico de Coimbra.; 2015.
81. Zhao S, Kuge Y, Mochizuki T, Takahashi T, Nakada K, Sato M, et al. Biologic correlates of intratumoral heterogeneity in 18F-FDG distribution with regional expression of glucose transporters and hexokinase-II in experimental tumor. *J Nucl Med* 2005;46:675-82.
82. Seino H, Ono S, Miura H, Morohashi S, Wu Y, Tsushima F, et al. Hypoxia is important in F-18 FDG accumulation in thecoma-fibroma tumors on F-18 FDG PET/CT scans. *Mol Med Rep* 2016;13:3821-7.
83. Jeong YJ, Jung JW, Cho YY, Park SH, Oh HK, Kang S. Correlation of hypoxia inducible transcription factor in breast cancer and SUVmax of F-18 FDG PET/CT. *Nucl Med Rev Cent East Eur* 2017;20:32-38.
84. Folpe AL, Lyles RH, Sprouse JT, Conrad EU 3rd, Eary JF. (F-18) fluorodeoxyglucose positron emission tomography as a predictor of pathologic grade and other prognostic variables in bone and soft tissue sarcoma. *Clin Cancer Res* 2000;6:1279-87.
85. Rakheja R, Makis W, Tulbah R, Skamene S, Holcroft C, Nahal A, et al. Necrosis on FDG PET/CT correlates with prognosis and mortality in sarcomas. *AJR Am J Roentgenol* 2013;201:170-7.

86. Stevens RG, Brainard GC, Blask DE, Lockley SW, Motta ME. Breast cancer and circadian disruption from electric lighting in the modern world. *CA Cancer J Clin* 2014;64:207-18.
87. Espino J, Pariente JA, Rodríguez AB. Oxidative stress and immunosenescence: therapeutic effects of melatonin. *Oxid Med Cell Longev* 2012; 670294.
88. Maganhin CC, Carbonel AA, Hatty JH, Fuchs LF, Oliveira-Júnior IS, et al. [Melatonin effects on the female genital system: a brief review]. *Rev Assoc Med Bras* 1992;54:267-71.
89. Luchetti F, Canonico B, Betti M, Arcangeletti M, Pilolli F, Piroddi M. et al. Melatonin signaling and cell protection function. *FASEB J* 2010;24:3603-24.
90. Cutando A, López-Valverde A, Arias-Santiago S, DE Vicente J, DE Diego RG. Role of melatonin in cancer treatment. *Anticancer Res* 2012;32:2747-53.
91. Sánchez-Barceló EJ, Cos S, Mediavilla D, Martínez-Campa C, González A, Alonso-González C. Melatonin-estrogen interactions in breast cancer. *J Pineal Res.* 2005;38:217-22.
92. Sousa-Neto JA, Scaldaferrri PM. Melatonina e câncer – revisão da literatura. *Revista Brasileira de Cancerologia.* v. 51, n. 1, p. 49-58, 2005.
93. Blask DE<sup>1</sup>, Hill SM, Dauchy RT, Xiang S, Yuan L, Duplessis T, et al. Circadian regulation of molecular, dietary, and metabolic signaling mechanisms of human breast cancer growth by the nocturnal melatonin signal and the consequences of its disruption by light at night. *J Pineal Res* 2011;51:259-69.
94. Mori F, Ferraiuolo M, Santoro R, Sacconi A, Goeman F, Pallocca M. Multitargeting activity of miR-24 inhibits long-term melatonin anticancer effects. *Oncotarget.* 2016;7:20532-48.
95. Mediavilla MD, Sanchez-Barcelo EJ, Tan DX, Manchester L, Reiter RJ. Basic mechanisms involved in the anti-cancer effects of melatonin. *Curr Med Chem* 2010;17:4462-81.
96. Di Bella G, Mascia F, Gualano L, Di Bella L. Melatonin anticancer effects: review. *Int J Mol Sci* 2013;14:2410-30.
97. Proietti S, Cucina A, Reiter RJ, Bizzarri M. Molecular mechanisms of melatonin's inhibitory actions on breast cancers. *Cell Mol Life Sci* 2013;70:2139-57.
98. Ordoñez R, Carbajo-Pescador S, Prieto-Dominguez N, García-Palomo A, González-Gallego J, Mauriz JL. Inhibition of matrix metalloproteinase-9 and nuclear factor kappa B contribute to melatonin prevention of motility and invasiveness in HepG2 liver cancer cells. *J Pineal Res* 2014;56:20-30.
99. Nooshinfar E, Safaroghli-Azar A, Bashash D, Akbari ME. Melatonin, an inhibitory agent in breast cancer. *Breast Cancer* 2017;24:42-51.



100. 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.
101. Jardim-Perassi BV, Arbab AS, Ferreira LC, Borin TF, Varma NR, de Campos Zuccari DA, et al. Effect of melatonin on tumor growth and angiogenesis in xenograft model of breast cancer. *PLoS One* 2014;9:e85311.
102. Borin TF, Arbab AS, Gelaleti GB, Ferreira LC, Moschetta MG, Jardim-Perassi BV. et al. Melatonin decreases breast cancer metastasis by modulating Rho-associated kinase protein-1 expression. *J Pineal Res* 2016;60:3-15.
103. Dubocovich ML, Markowska M. Functional MT1 and MT2 melatonin receptors in mammals. *Endocrine* 2005;27:101-10.
104. Hill SM, Frasch T, Xiang S, Yuan L, Duplessis T, Mao L. Molecular mechanisms of melatonin anticancer effects. *Integr Cancer Ther.* 2009;8:337-46.
105. Hill SM, Blask DE, Xiang S, Yuan L, Mao L, Dauchy RT. Melatonin and associated signaling pathways that control normal breast epithelium and breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 2011;16:235-45.
106. Hill SM1, 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; 64:249-56.
107. Cos S, Sánchez-Barceló EJ. Melatonin and mammary pathological growth. *Front Neuroendocrinol* 2000;21:133-70.
108. Mao L, Yuan L, Xiang S, Zeringue SB, Dauchy RT, Blask DE. Molecular deficiency (ies) in MT<sub>1</sub> melatonin signaling pathway underlies the melatonin-unresponsive phenotype in MDA-MB-231 human breast cancer cells. *J Pineal Res.* 2014;56:246-53.
109. Jablonska K, Pula B, Zemla A, Owczarek T, Wojnar A, Rys J. Expression of melatonin receptor MT1 in cells of human invasive ductal breast carcinoma. *J Pineal Res.* 2013;54:334-45.
110. Tahan G, Gramignoli R, Marongiu F, Aktolga S, Cetinkaya A, Tahan V, Dorko K. Melatonin expresses powerful anti-inflammatory and antioxidant activities resulting in complete improvement of acetic-acid-induced colitis in rats. *Dig Dis Sci.* 2011;56:715-20.
111. Reiter RJ, Tan DX, Manchester LC, Lopez-Burillo S, Sainz RM, Mayo JC. Melatonin: detoxification of oxygen and nitrogen-based toxic reactants. *Adv Exp Med Biol.* 2003;257:539-48.
112. Rodriguez C, Mayo JC, Sainz RM, Antolín I, Herrera F, Martín V, Reiter RJ. Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. *J Pineal Res.* 2004;36:1-9.

113. Sánchez-Barceló EJ, Cos S, Fernández R, Mediavilla MD. Melatonin and mammary cancer: a short review. *Endocr Relat Cancer* 2003;10:153-9.
114. Blask DE, Dauchy RT, Sauer LA. Putting cancer to sleep at night: the neuroendocrine/circadian melatonin signal. Blask DE1, Dauchy RT, Sauer LA. *Endocrine* 2005;27:179-88.
115. Blask DE. Melatonin, sleep disturbance and cancer risk. *Sleep Med Rev.* 2009;13:257-64.
116. Blask DE, Dauchy RT, Dauchy EM, Mao L, Hill SM, Greene MW. Light exposure at night disrupts host/cancer circadian regulatory dynamics: impact on the Warburg effect, lipid signaling and tumor growth prevention. *PLoS One* 2014;9:e102776.
117. Zhang Y, Liu Q, Wang F, Ling EA, Liu S, Wang L, et al. Melatonin antagonizes hypoxia-mediated glioblastoma cell migration and invasion via inhibition of HIF-1 $\alpha$ . *J Pineal Res* 2013;55:121-30.
118. 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;6:19-28.
119. Sanchez-Sanchez AM, Antolin I, Puente-Moncada N, Suarez S, Gomez-Lobo M. Melatonin Cytotoxicity Is Associated to Warburg Effect Inhibition in Ewing Sarcoma Cells. *PLoS One* 2015;10:e0135420.