



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

JÉSSICA GISLEINE DE OLIVEIRA

**AÇÃO ANTIMETASTÁTICA DA
MELATONINA PELA MODULAÇÃO DE
microRNAs CANDIDATOS EM LINHAGENS
DE CÂNCER DE MAMA**

São José do Rio Preto

2018

JÉSSICA GISLEINE DE OLIVEIRA

**AÇÃO ANTIMETASTÁTICA DA
MELATONINA PELA MODULAÇÃO DE
microRNAs CANDIDATOS EM LINHAGENS
DE CÂNCER DE MAMA**

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

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

São José do Rio Preto

2018

Oliveira, Jéssica Gisleine de

Ação antimetastática da melatonina pela modulação de microRNAs candidatos em linhagens de câncer de mama/ Jéssica Gisleine de Oliveira.

São José do Rio Preto, 2018.

113p.

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

Eixo Temático: Medicina e Ciências Correlatas

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

1. MicroRNAs. 2. Transição Epitelial-Mesenquimal. 3. Metástase Neoplásica. 4. Glândula Pineal.

JÉSSICA GISLEINE DE OLIVEIRA

AÇÃO ANTIMETASTÁTICA DA MELATONINA
PELA MODULAÇÃO DE microRNAs
CANDIDATOS EM LINHAGENS DE CÂNCER
DE MAMA

BANCA EXAMINADORA
DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU
DE MESTRE

Presidente e Orientadora: Profa. Dra. Debora

Aparecida Pires de Campos Zuccari

1º Examinador: _____

2º Examinador: _____

Suplentes: _____

São José do Rio Preto, __/__/____.

Sumário

Dedicatória.....	i
Agradecimentos	ii
Epígrafe.....	iv
Lista de Figuras.....	v
Lista de Tabelas e Quadros	vii
Lista de Abreviaturas e Símbolos	viii
Resumo	xiii
Abstract.....	xv
I. INTRODUÇÃO.....	1
1. Câncer de mama - Aspectos gerais	2
2. Metástase	5
3. Transição epitélio-mesenquimal.....	6
3.1. E-caderina	8
3.2. Claudinas.....	9
3.3. Vimentina.....	9
4. miRNAs	10
4.1. miRNAs no câncer	12
4.2. miRNAs associados à metástase	13
4.3. Família do miR-10/100	14
4.3.1. miRNA-10a	15
5. Melatonina	17
5.1 Síntese da melatonina.....	17
5.2. Mecanismos de ação	18
5.3. Melatonina e câncer	20
6. Melatonina e miRNAs	23
7. Objetivo	24
7.1. Objetivos Específicos.....	24
II. MATERIAL E MÉTODOS	25
Considerações Éticas	26
1. Cultivo celular	26
2. Desagregação enzimática e contagem das células em Câmara de <i>Neubauer</i>	26
3. Ensaio de viabilidade celular (MTT).....	27

4. Técnica de <i>PCR Array</i>	28
4.1. Grupos experimentais.....	28
4.2. Extração de RNA total	29
4.3. Síntese de cDNA	30
4.4. <i>Real-time PCR Array</i> para análise da expressão de miRNAs maduros	30
5. Seleção de miRNA candidato e possível gene alvo.....	32
6. Modificação transiente de células tumorais.....	33
7. Grupos experimentais após transfecção.....	34
8. Síntese de cDNA para PCR quantitativo em tempo real	34
9. PCR quantitativa em tempo real (q-PCR)	35
10. Ensaio de invasão e migração celular	36
11. Expressão proteica por <i>Western blotting</i>	37
12. Análise Estatística.....	39
III. RESULTADOS	40
1. Estabelecimento do cultivo celular	41
2. Ensaio de viabilidade celular	41
3. miRNAs diferencialmente expressos.....	42
4. Escolha do miRNA e possível gene alvo.....	43
5. PCR quantitativa em Tempo Real	44
5.1. miR-10a.....	44
5.2. miRNA-10b.....	45
5.3. Gene alvo <i>HOXD10</i>	47
6. Modificação transiente das células	48
7. Migração e invasão celular	48
8. Avaliação proteica por <i>Western blotting</i>	50
IV. DISCUSSÃO	55
V. CONCLUSÕES	62
VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64
VII. APÊNDICE	832
VIII. ANEXO	112

Dedicatória

*Dedico aos meus pais José Luis e Sônia, às
minhas irmãs, Bianca e Milena, que me dão
força e suporte todos os dias.*

Agradecimentos

À FAMERP e à pós-graduação em Ciências da Saúde, parte integrante do meu currículo e aprendizado. A CAPES pela bolsa de estudos da qual possibilitou minha presença todos os dias e o bom desenvolvimento do trabalho. Agradeço também à FAPESP pelo auxílio financeiro (Proc. nº 2015/04780-6).

À minha orientadora, Profa Dra Debora Zuccari, pela oportunidade dada à realização desse mestrado. Muito obrigada por todo apoio e confiança depositados em mim.

Aos membros da banca examinadora do meu exame geral de qualificação, Profa. Dra. Ana Claudia Polli Lopes e Profa. Dra. Heloisa Cristina Caldas pelas valiosas sugestões que foram importantes para minha dissertação.

Às Professoras Dras. Gilmara Ausech Antonucci e Érika Cristina Pavarino, por gentilmente aceitarem fazer parte da minha banca de defesa.

Aos amigos do Laboratório de Investigação Molecular no Câncer (LIMC): aos novos Francine, Camila, Vitor e aos antigos Rubens, Marina, Júlia, Fabrício, Paulo, Tialfi, André, Bruna. Em especial aqueles que me deram suporte desde o início: Jéssica Mora, Jéssica Zani, Beatriz, Nathália e Lívia. Esse trabalho tem uma parte de vocês!

Ao Prof. Dr. Wilson Araújo da Silva Junior do Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP) e ao querido Andrés pelo apoio no início desse trabalho e pela parceria construída.

À minha família, meus pais José Luis e Sônia, minhas irmãs Bianca e Milena, que sempre me apoiaram nessa realização pessoal e profissional. Vocês me incentivam a buscar sempre o melhor e a conquistar meus objetivos.

Ao meu namorado Carmine, que desde a graduação acompanha minha trajetória e nunca se ausentou ou recusou ajuda. Obrigada por escutar todos meus problemas de cada dia, por me ajudar a enxergar a luz no horizonte e por me fazer acreditar mais em mim mesma.

Aos meus velhos amigos, que estão presentes há tempo em minha vida e que independente da distância, sempre estão tão próximos. Angélica, Daiane, Jéssica Domingues, Jéssica Gouvêia, Roberta e Alan, essa conquista é compartilhada com vocês!

À minha prima Melina, que esteve comigo nesses dois anos, dividindo moradia, experiências, choros e alegrias. Agradeço imensamente por você e minha tia Shirley estarem tão presentes quando mais precisei.

Agradeço imensamente a cada pessoa que direta ou indiretamente passaram pela minha formação e contribuíram para que essa dissertação seja realizada.

Epígrafe

“Toda conquista começa com a decisão de tentar!”

(Gail Devers)

Lista de Figuras

Figura 1. Representação esquemática das etapas que envolvem a metástase.....	5
Figura 2. Etapas da transição epitélio-mesenquimal e biomarcadores envolvidos.....	6
Figura 3. Tipos de transição epitélio-mesenquimal	7
Figura 4. Biogênese dos microRNAs	12
Figura 5. Síntese de melatonina.....	18
Figura 6. Representação esquemática dos múltiplos mecanismos envolvidos na inibição da metástase pela melatonina.....	22
Figura 7. Esquema representativo da câmara de <i>Neubauer</i>	27
Figura 8. Composição da placa <i>RT Profiler PCR Array Human Breast Cancer</i>	32
Figura 9. Representação esquemática do ensaio de invasão/migração celular.....	37
Figura 10. Fotomicrografia de células de linhagens tumorais mamárias humanas	41
Figura 11. Ensaio de MTT para avaliação da viabilidade das células tumorais MDA-MB-468 após tratamento com melatonina.....	42
Figura 12. MiRNAs diferencialmente expressos em células MDA-MB-468 após tratamento com melatonina (1 mM)	43
Figura 13. Rede de interação do miR-10a com seus respectivos alvos	44
Figura 14. Expressão gênica do miR-10a PCR em tempo real nas linhagens de câncer de mama após tratamento com melatonina (1 mM)	45
Figura 15. Expressão gênica do miRNA-10b por PCR em tempo real nas linhagens de câncer de mama após tratamento com melatonina (1 mM)......	46
Figura 16. Expressão gênica de <i>HOXD10</i> por PCR em tempo real nas linhagens de câncer de mama tratadas com melatonina (1 mM).	47
Figura 17. Expressão gênica do miR-10a por PCR em tempo real nas linhagens de câncer de mama triplo-negativo após tratamentos com melatonina (1 mM) e transfecção transiente.....	48
Figura 18. Potencial invasivo das células da linhagem MDA MB-468 após tratamento com 1 mM de melatonina e transfectadas com Inibidor miR-10a.....	49

Figura 19. Potencial invasivo das células da linhagem MDA-MB-231 após tratamento com 1 mM de melatonina e transfectadas com Inibidor miR-10a.....	50
Figura 20. Expressão proteica de vimentina por <i>Western blotting</i> em células triplo-negativas.....	51
Figura 21. Expressão proteica de claudina 7 por <i>Western blotting</i> em células triplo-negativa.....	52
Figura 22. Expressão proteica de E-caderina por <i>Western blotting</i> em células triplo-negativas.....	53
Figura 23. Expressão proteica de PIK3CA por <i>Western blotting</i> em células triplo-negativas.....	54
Figura 24. Conclusões propostas de ações da melatonina conforme resultados.	63

Lista de Tabelas e Quadros

Quadro 1. Subtipos moleculares do câncer de mama	4
Quadro 2. Placa de <i>PCR Array</i> com 84 miRNAs relacionados ao câncer de mama. Esquema representativo da placa utilizada para análise de expressão gênica de miRNAs.	31
Quadro 3. Descrição do <i>primer</i> utilizado para transfecção transiente.	34
Quadro 4. <i>Primers</i> de miRNAs utilizados <i>TaqMan Assays</i>	36
Quadro 5. Anticorpos primários utilizados na técnica de <i>Western blotting</i> e suas respectivas diluições.	39

Lista de Abreviaturas e Símbolos

αSMA	Alfa-Actina do músculo liso
β-Actina	Actina tipo beta
β-Catenina	Catenina tipo beta
μg	Micrograma (10^{-6} grama)
μL	Microlitro
μm	Micrômetro
3'-UTR	Região 3 não traduzida
5HTP	Hidroxitriptofano
AA-NAT	Arilalquilamina N-acetiltransferase
Ago2	Proteína Argonauta 2
AKT	Proteína quinase B
Bcl-2	Do inglês <i>B-Cell lymphoma 2</i>
BRCA1	Do inglês <i>Breast Cancer susceptibility gene 1</i>
BRCA2	Do inglês <i>Breast Cancer susceptibility gene 2</i>
BSA	Albumina sérica bovina
cAMP	Do inglês <i>cyclic adenosine monophosphate</i>
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
cDNA	DNA complementar
CDH1	Gene codificador da caderina tipo 1 (E-caderina)
CK	Citoqueratina
CLDN7	Claudina 7
CO₂	Fórmula química do gás carbônico
Ct	Do inglês <i>Cycle threshold</i>

D.O.M	Densidade Óptica Média
DGCR8	Proteína do complexo microprocessador DGCR8 (Do inglês <i>Di George syndrome chromosomal region 8</i>)
DMEM	Do inglês <i>Dulbecco's Modified Eagles Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EGFR	Do inglês <i>Epidermal growth factor receptor</i>
EMT	Transição Epitélio-Mesenquimal, do inglês <i>epithelial-mesenchymal transition</i>
Erk	Do inglês <i>extracellular signal-regulated kinase</i>
ET-1	Endotelina 1
FAMERP	Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FMRP-USP	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
Fra-1	Antígeno relacionado a Fos 1
g	Força G
GLUT-1	Isoforma da proteína transportadora de glicose 1
GTP	Guanosina trifosfato
GSK3β	Quinase glicogênio sintase 3 beta
HER2	Do inglês <i>Human epidermal growth factor receptor-type 2</i>
HIF-1	Fator induzido por hipóxia 1
HIOMT	Hidroxi-indol-Ometiltransferase
HOXA1	<i>Homeobox A-1</i>
HOXD10	<i>Homeobox D-10</i>
IGF-1R	Receptor tipo 1 do fator de crescimento semelhante à insulina
INCA	Instituto Nacional do Câncer
Ki-67	Índice de proliferação celular
LIMC	Laboratório de Investigação Molecular no Câncer

LIN-14	Proteína fator de transcrição da espécie <i>Caenorhabditis elegans</i>
M1	Macrófago M1
M2	Macrófago M2
MAPK	Via das proteínas quinases ativadas por mitógenos
MCF-7	Linhagem celular de carcinoma de mama humano, receptor de estrógeno positivo
MDA-MB-231	Linhagem celular de câncer de mama humano triplo-negativo
MDA-MB-468	Linhagem celular de câncer de mama humano triplo-negativo
MET	Transição mesenquimal-epitelial
miRISC	miRNA ligado a RISC
miRNA/miR	microRNA
mL	Mililitro
MLCK	Do inglês <i>myosin light-chain kinase</i>
mm	Milímetro
mM	Milimol
MMP	Metaloproteinase
MT1	Receptor de melatonina tipo 1
MT2	Receptor de melatonina tipo 2
MTNR1A	Gene codificador do receptor de melatonina tipo 1
MTNR1B	Gene codificador do receptor de melatonina tipo 2
mTOR	Proteína alvo da rapamicina em mamíferos
MTT	3 {4,5- dimetiliazol-2-il} -2,5difeniltetrazolium bromídeo
MYC	Proto-oncogene
NAS	N-acetilserotonina
ncRNA	RNA não-codificante
NF-κB	Fator nuclear kappa B
ng	Nanograma (10 ⁻⁹ grama)
nm	Nanômetro

NP-40	Tergitol NP-40, que é nonil fenoxipolietoxietanol
°C	Graus Celsius
Oncomir	Fusão dos termos <i>oncology</i> e miRNA
PBS	Solução tampão fosfato
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PIK3CA	Unidade subcatalítica p110 α da PI3K
PI3K	Fosfatidilinositol-3 quinase
PKA	Proteína quinase A
PKC	Proteína quinase C
PMSF	fluoreto de fenilmetilsulfonil
Pré-miRNA	miRNA precursor
Pri-miRNA	miRNA primário
p-Akt	Proteína fosforilada quinase
p-mTOR	Proteína fosforilada alvo da rapamicina em mamíferos
p-p70S6K	Proteína fosforilada ribossômica S6 quinase beta-1
PVDF	Fluoreto de polivinilideno
qPCR	PCR quantitativa em tempo real
Ran-GTP	Do inglês <i>Ras-related Nuclear protein – Guanosine triphosphate</i>
RAS-V12	Proteína oncogênica
RE	Receptor de Estrógeno
RISC	Do inglês <i>RNA-induced silencing complex</i>
RNA	Ácido Ribonucléico
RNA_m	RNA mensageiro
RhoC	Proteína membro da família homóloga Ras C
ROS	Radicais livres
ROCK-1	Do inglês <i>Rho Associated Coiled-Coil Containing Protein Kinase 1</i>
RP	Receptor de Progesterona

rpm	Rotações por minuto
Rsk	Do inglês <i>Ser/Thr kinase ribosomal S6 kinase</i>
RUNX2	Fator de Transcrição Relacionado ao Runt 2
RZR/ROR	Receptor Z para retinóide/receptor órfão para retinóide
SDS	Dodecil sulfato de sódio
Snail	Fator de transcrição tipo <i>zinc-finger</i> 1
S.E.M.	Erro Padrão da Média
SFB	Soro Fetal Bovino
Slug	Fator de transcrição tipo <i>zinc-finger</i> 2
SMAD3	Do inglês <i>mothers against DPP homolog</i> 3
STAT3	Transdutor de sinal e ativador da transcrição 3
TBS	Solução salina tamponada com Tris
TGF-β1	Fator de transformação do crescimento beta 1
TNBC	Do inglês <i>Triple-negative breast cancer</i>
TP53INP1	Proteína nuclear 1 indutora da proteína tumoral p53
TPH1	Triptofano hidroxilase 1
Tris	Trisaminometano
TRH	Terapia de reposição hormonal
TRBP	Proteína de ligação ao RNA do HIV-1 TAR
Tween	Polisorbato 20
TWIST	Do inglês <i>Twist-related protein</i> 1
U6	Do inglês <i>U6 spliceosomal RNA</i>
V	Volts
VEGF	Fator de Crescimento Endotelial Vascular
WNT	Proteína transdutora de sinal
ZO-1	Proteína da zonula de oclusão 1
ZEB	Do inglês <i>zinc finger E-box binding homeobox</i>
$\Delta\Delta$Ct	Delta-Delta <i>Cycle threshold</i>

Resumo

Introdução: O câncer de mama apresenta elevadas taxas de incidência e mortalidade em todo o mundo. Um dos principais fatores responsáveis pelos altos índices de mortalidade desta neoplasia é a metástase. Os microRNAs (miRNAs) são pequenas moléculas de RNA não codificantes com cerca de 18-22 nucleotídeos, envolvidos com a regulação da expressão gênica. Estudos demonstram o papel dessas moléculas na progressão tumoral, em especial do câncer de mama. A melatonina, um hormônio secretado principalmente pela glândula pineal vem mostrando diversos efeitos na regulação do câncer, atuando na modulação de proteínas e miRNAs. **Objetivo:** O objetivo do presente estudo foi investigar a ação da melatonina na modulação do miRNA-10a-5p (mir-10a) em células de linhagem de câncer de mama triplo-negativo (TNBC), e associar com a progressão tumoral. **Material e Método:** O ensaio de MTT (*3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide*) foi realizado para verificar a viabilidade celular da linhagem MDA-MB-468 após o tratamento com melatonina em diferentes concentrações. A expressão diferencial de 84 miRNAs associados ao câncer de mama foi verificado por *PCR-Array*. O miR-10a foi selecionado por seu envolvimento com o processo tumoral e sua expressão gênica e de seu gene alvo *HOXD10* foram verificados por PCR em tempo real em linhagens de câncer de mama. Os seguintes grupos foram considerados: células tratadas ou não com melatonina; transfectadas com inibição do miR-10a e o controle negativo da reação. O ensaio de invasão e migração utilizando insertos de matrigel foi realizado e a expressão proteica de marcadores da transição epitélio-mesenquimal (EMT), E-caderina, claudina

7 e vimentina foi investigada, assim como do marcador de proliferação PIK3CA, por *Western blotting*. **Resultados:** Nossos resultados mostraram que 1 mM de melatonina diminuiu significativamente a viabilidade celular. Os resultados de *PCR Array* mostraram treze miRNAs modulados pela melatonina (seis superexpressos e sete inibidos). A expressão gênica mostrou diminuição da quantidade relativa do miR-10a e de seu gene alvo *HOXD10* após tratamento com melatonina. O ensaio matrigel mostrou que a melatonina e a inibição do miR-10a diminuíram a invasão e migração das células. De acordo com a análise proteica, a melatonina foi capaz de reduzir a expressão das proteínas vimentina e claudina 7 e aumentar a expressão da E-caderina. Por outro lado, a inibição do miR-10a reduziu a proteína vimentina e não modulou claudina 7 e E-caderina. **Conclusão:** Nesse trabalho verificou-se a habilidade da melatonina em modular a expressão de miRNAs, diminuindo o miR-10a, afetando a invasão e migração tumoral, além de proteínas envolvidas com a EMT, demonstrando seu potencial papel na regulação da metástase.

Palavras-chave: MicroRNAs, Transição Epitelial-Mesenquimal, Metástase Neoplásica, Glândula Pineal.

Abstract

Introduction: Breast cancer presents high incidence and death rates worldwide. Metastasis is one of the main causes of high mortality rates by this neoplasm. MicroRNAs (miRNAs) are small non-coding RNA molecules with nearly 18-22 nucleotides, involved in gene expression regulation. Studies demonstrate the role this molecules in tumor progression, including breast cancer. Melatonin, a hormone secreted mainly in pineal gland, has been presenting several effects in cancer regulation, acting on the modulation of proteins and miRNAs. **Aim:** The aim of the present study was to investigate the action of melatonin on miRNA-10a-5p modulation in triple-negative breast cancer cells (TNBC), and associating with tumor progression. **Materials and Methods:** The MTT (3- (4,5-Dimethylthiazol-2-yl) -2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) assay was performed to verify cell viability of MDA-MB-468 cells at different concentrations of melatonin for 24 hours. The differential expression of 84 miRNAs associated with breast cancer was verified by PCR-Array. The miR-10a was selected for its involvement with tumor process and its gene expression and its target *HOXD10* were verified by real-time PCR in breast cancer cell lines. The following groups were considered: cells treated or not with melatonin; transfected with inhibition of miR-10a or negative control of reaction. The invasion and migration assay using matrigel inserts was performed and protein expression of epithelial-mesenchymal transition (EMT), E-cadherin, claudin 7 and vimentin markers were investigated, as PIK3CA proliferation marker, by Western blotting. **Results:** Our results showed that 1 mM melatonin significantly decreased cell viability. The results of PCR Array showed thirteen

miRNAs modulated by melatonin (six overexpressed and seven inhibited). The gene expression showed a decrease in relative amount of miR-10a and its target *HOXD10* after melatonin treatment. The matrigel assays showed that melatonin and inhibition of miR-10a decreased the cell invasion and migration. According to the protein analysis, melatonin was able to reduce the expression of vimentin and claudin 7 proteins and increase E-cadherin expression. On the other hand, inhibition of miR-10a reduced the vimentin protein and did not modulate claudin 7 and E-cadherin. **Conclusion:** In this study was verified the ability of melatonin modulating miRNAs expression by decreasing miR-10a, affecting tumor invasion and migration, and proteins involved with EMT. In this way, we support the idea of the potential role of melatonin in the regulation of metastasis

Keywords: MicroRNAs, Epithelial-Mesenchymal Transition, Neoplasm Metastasis, Pineal Gland.

I. INTRODUÇÃO

I. INTRODUÇÃO

1. Câncer de mama - Aspectos gerais

O câncer representa um grande problema para a saúde pública mundial, apresentando altas taxas de incidência e mortalidade.⁽¹⁾ Essa doença é gerada por mutações que afetam as células e alteram suas funções. As alterações funcionais das células permitem sua divisão celular descontrolada e evasão da apoptose, levando a formação de tumores.⁽²⁾ De acordo com Hanahan e Weinberg (2011), as células tumorais adquirem certas capacidades, também chamadas de *hallmarks* do câncer, que se resumem em: proliferação acelerada com perda do controle do crescimento; migração e invasão dos tecidos subjacentes e consequente metástase; imortalidade replicativa; indução da angiogênese; alteração do metabolismo energético celular; falha do sistema imune; instabilidade genômica; modulação da resposta inflamatória e resistência à morte celular.⁽³⁾

O câncer de mama é a neoplasia mais comum diagnosticada em mulheres, sendo responsável por 1 a cada 10 novos diagnósticos de câncer no mundo todos os anos e representando altas taxas de mortalidade.⁽⁴⁾ No Brasil, segundo dados no Instituto Nacional do Câncer (INCA), são estimados 59.700 novos casos de câncer de mama para o ano de 2018, com risco estimado de 56,33 casos a cada 100 mil mulheres.⁽⁵⁾ Os altos índices de mortes pelo câncer de mama são devido principalmente, à complicações recorrentes de metástases.^(6,7)

Na etiologia do câncer de mama, múltiplos fatores estão envolvidos no acometimento da doença tais como: menarca precoce (antes dos 12 anos); menopausa após os 55 anos; mulheres que nunca engravidaram ou nunca tiveram filhos (nuliparidade); primeira gravidez após os 30 anos; uso de anticoncepcionais e terapia de reposição hormonal (TRH) na menopausa, especialmente se por tempo prolongado;

exposição à radiação ionizante; consumo de bebidas alcoólicas; dietas hipercalóricas; sedentarismo; e predisposição genética. As principais mutações ocasionadas por herança genética familiar são as dos genes *BRCA1* e *BRCA2*.^(5,8,9)

Os tumores mamários podem ser classificados de acordo com sua morfologia e separados em subtipos moleculares que foram definidos por técnicas moleculares e são confirmadas por imuno-histoquímica.⁽¹⁰⁾ Esse agrupamento permite a definição de estratégias terapêuticas específicas para cada subtipo,⁽¹¹⁾ baseando-se na presença e/ou ausência de receptores hormonais, tais como, receptor de estrógeno (RE), receptor de progesterona (RP), receptor-2 do fator de crescimento epidérmico humano (*Human epidermal growth factor receptor-type 2* - HER2), o marcador de proliferação celular Ki-67, as citoqueratinas 5 e 6 (CK5/6) e o receptor do fator de crescimento epidermal (*Epidermal growth factor receptor* - EGFR).

Dessa forma, as seguintes classificações foram estabelecidas: luminal A (RE positivo e/ou RP positivo, HER2 negativo e baixo Ki-67), luminal B (RE positivo e/ou RP positivo, HER2 negativo e alto Ki-67), luminal HER2 (RE positivo e/ou RP positivo e HER2 positivo), HER2 superexpresso (RE negativo, RP negativo e HER2 positivo) e triplo-negativo (RE negativo, RP negativo, HER2 negativo). Os tumores triplo-negativos possuem alta frequência de mutações e são sub-classificados em triplo-negativo basaloide (EGFR positivo ou CK5/6 positivo) e triplo-negativo não basaloide (EGFR negativo e CK5/6 negativo). Ainda, esse tipo tumoral pode apresentar a classificação *claudin-low*, onde há baixa expressão das claudinas 3, 4, 7 e E-caderina (Quadro 1).^(7,12,13)

Comparado aos outros subtipos moleculares, os tumores de câncer de mama triplo-negativos são altamente agressivos e de pior prognóstico.⁽¹⁴⁾ Correspondem a

cerca de 10-15 % dos casos de câncer de mama⁽¹³⁾ com baixa expectativa de vida, possibilidade de recidiva e maiores chances de metástases à distância.⁽¹⁴⁾ Esse tipo tumoral possui atualmente grande foco na pesquisa científica, em busca de terapias personalizadas que garantam melhora na sobrevida dos pacientes.⁽¹⁵⁾

Quadro 1. Subtipos moleculares do câncer de mama

Subtipos moleculares	Marcadores biológicos
Luminal A	RE+ e/ou RP+, HER2- e Ki-67 baixo
Luminal B	RE+ e/ou RP+, HER2- e Ki-67 alto
Luminal HER2	RE+ e/ou RP+, HER2+
Superexpressão HER2	RE-, RP-, HER2+
Triplo-negativo basaloide	RE-, RP-, HER2-, EGFR+ e CK5/6+
Triplo-negativo não basaloide	RE-, RP-, HER2-, EGFR- e CK5/6-
Triplo-negativo <i>Claudin-low</i>	RE-, RP-, HER2-, claudina 3,4,7- e E-caderina-

Fonte: Barros & Leite (2015); Chen et. al. (2018).^(7,13)

Para fins terapêuticos, tumores que expressam os receptores hormonais RE e RP são tratados com agentes que interferem na sua produção e ação, tais como tamoxifeno, anastrozol, fulvestranto entre outros.⁽¹⁶⁾ Tumores com superexpressão de HER2 podem ser tratados com anticorpos monoclonais específicos capazes de inibir a atividade do receptor, como o trastuzumab, pertuzumab e lapatinib, sendo usados sozinhos ou em combinação com a quimioterapia padrão.⁽¹¹⁾ A falta dos receptores hormonais nas células tumorais de câncer de mama triplo-negativo (TNBC) impede o uso de terapias direcionadas, dessa forma, quimioterápicos como as antraciclinas e sais de platina são usados e interferem na replicação celular à nível nuclear.⁽¹¹⁾ Todavia, as quimioterapias em tumores TNBC não demonstram boa eficiência, e em grande parte dos casos as pacientes desenvolvem recorrência precoce da doença.⁽¹¹⁾ Assim, terapias direcionadas à esse tipo tumoral são extremamente necessárias.

2. Metástase

A metástase é caracterizada como um processo complexo, capaz de permitir a colonização das células tumorais e formação de tumores em novos locais, distantes do tumor primário. Isso é possível por meio da disseminação das células em vasos sanguíneos ou linfáticos.⁽¹⁷⁾ Para entendimento do processo, a denominada cascata metastática é uma sequência de eventos biológicos que se iniciam com o tumor primário. Essa sucessão pode ser descrita da seguinte maneira: proliferação das células tumorais; crescimento de novos vasos sanguíneos; deslocamento de células tumorais do tumor e migração; invasão através da membrana basal e da matriz extracelular que envolve o tumor e invasão da membrana basal que apoia o endotélio dos vasos sanguíneos e linfáticos locais; penetração das células tumorais no sangue e/ou nos vasos linfáticos; adesão destas células metastáticas circulantes ao endotélio de capilares do órgão-alvo; extravasão ou saída dos vasos e finalmente, a fixação e o crescimento de tumores secundários no órgão-alvo (Figura 1).⁽¹⁸⁾

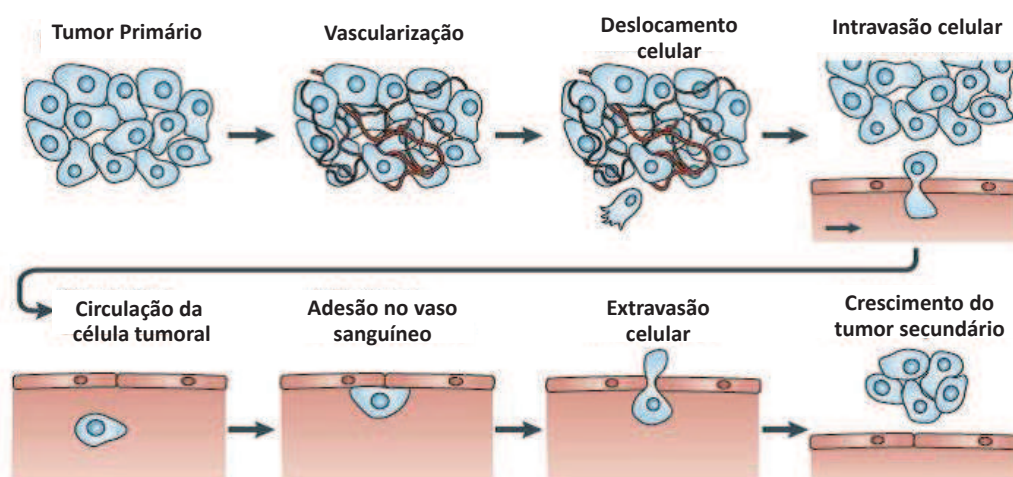


Figura 1. Representação esquemática das etapas que envolvem a metástase. Adaptado de Wirtz, Konstantopoulos & Searson (2011).⁽¹⁹⁾

3. Transição epitélio-mesenquimal

A transição epitélio-mesenquimal (do inglês *epithelial-mesenchymal transition* EMT), é um processo no qual ocorre a transição das células de fenótipo epitelial que adquirem o fenótipo mesenquimal e migratório.⁽²⁰⁾ As células epiteliais são compostas por diversas estruturas essenciais tais como junções oclusivas, junções aderentes, junções comunicantes, desmossomos e hemidesmossomos, que garantem a polarização celular, junção e a arquitetura do epitélio.⁽²¹⁾ O processo de EMT envolve inicialmente a dissociação de junções oclusivas e perda de microvilosidades.⁽²²⁾ Indutores da EMT, tais como fatores de crescimento e de transcrição, iniciam as mudanças na interação célula-célula.⁽²³⁾ As junções aderentes das células são dissociadas com consequente perda de polaridade baso-lateral apical. Posteriormente, há profunda remodelação do citoesqueleto com degradação da membrana basal, migração através da matriz extracelular e invasão dos tecidos adjacentes (Figura 2).^(22,24,25)

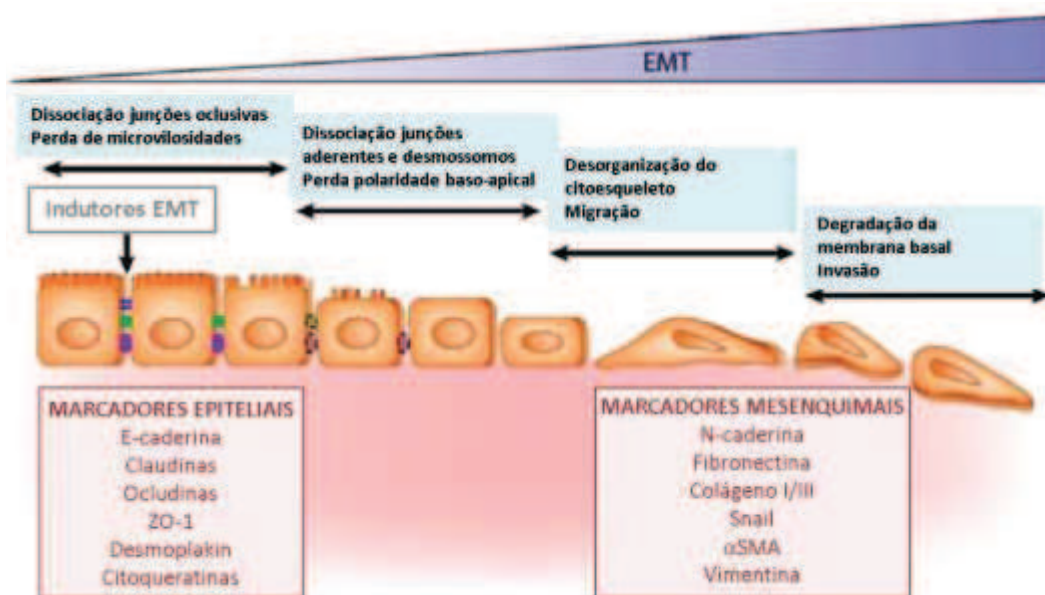


Figura 2. Etapas da transição epitélio-mesenquimal e biomarcadores envolvidos. Adaptado de Angadi & Kale (2015).⁽²²⁾

Três tipos de EMT são consideradas no contexto biológico (Figura 3). A EMT do tipo 1, está associada à embriogênese, atuando na produção de células mesenquimais durante a implantação e formação do embrião, desenvolvimento placentário, gastrulação (formação das três camadas germinativas) e durante o desenvolvimento de células da crista neural migratória. As células mesenquimais primárias atuam como progenitoras e dão origem aos epitélios secundários por meio da transição mesenquimal-epitelial (MET), ou seja, uma reversão da EMT. A EMT tipo 2 está ligada à cicatrização de feridas, reparo, regeneração e fibrose de órgãos. Permite a ligação de fibroblastos e outras células para a reconstrução do tecido por trauma e dano inflamatório. Já a EMT tipo 3 acontece com as células neoplásicas e está envolvida com genes relacionados à proliferação celular e formação de tumores, afetando supressores tumorais e oncogenes, capazes de permitir invasão da membrana basal e metástases. Sendo assim, as células migratórias (fenótipo mesenquimal) invadem novos órgãos, sofrem transição e voltam ao seu fenótipo epitelial (MET), dando origem a novos tumores.^(22,26)



Figura 3. Tipos de transição epitélio-mesenquimal. Adaptado de Angadi & Kale (2015).⁽²²⁾

Fatores de crescimento e indutores de EMT permitem o início da transformação celular.⁽²³⁾ Diversas moléculas estão envolvidas no processo e possuem relação com os componentes de adesão célula-célula e da matriz extracelular (Figura 2). As caderinas são marcadores clássicos do processo de EMT. A mudança no perfil de expressão da

proteína E-caderina é considerado o principal marcador, sua baixa expressão é relacionada com o aumento de proteínas como a N-caderina e vimentina.^(27,28) Outros marcadores são descritos e estão envolvidos com a característica fenotípica da célula. As proteínas expressas em células com fenótipo epitelial são consideradas marcadores epiteliais e compreendem além da E-caderina, as claudinas, ocludinas, proteína da zonula de oclusão 1 (ZO-1), desmoplaquinas e CKs. As proteínas que são marcadores mesenquimais estão presentes nas células que sofreram a EMT ou já possuem um fenótipo mesenquimal tais como a fibronectina, colágeno I/III, fator de transcrição tipo *zinc-finger* 1 (Snail) e actina do músculo liso alfa (α SMA), além das já citadas N-caderina e vimentina.⁽²²⁾

3.1. E-caderina

Codificada pelo gene caderina 1 (*CDH1*), a E-caderina é representante de uma superfamília de glicoproteínas de adesão dos tecidos epiteliais, as caderinas. Essa molécula está localizada em regiões de contato célula-célula conhecidas como junções aderentes. É expressa em uma variedade de tecidos e medeia a ligação de uma célula adjacente a outra. Desempenha importante papel na formação dos tecidos durante o desenvolvimento embrionário.⁽²⁹⁾ Nas células epiteliais a E-caderina é encontrada juntamente com anéis de catenina e actina, formando um complexo.⁽³⁰⁾ Sua desregulação está envolvida com alguns tipos de câncer, como o câncer gástrico, de próstata e mama,⁽³¹⁻³⁴⁾ e sua baixa expressão está associada com crescimento, diferenciação e metástase.⁽³⁵⁾ Os baixos níveis de E-caderina afetam diretamente a sinalização interna das células acarretando na liberação da molécula β -catenina e sua translocação para o núcleo celular. No núcleo, a β -catenina age como um fator de transcrição dirigindo a expressão de genes como *Snail* e o fator de transcrição tipo *zinc-*

finger 2 (Slug).⁽³⁶⁾ Ambas moléculas desencadeiam respostas que induzem a progressão tumoral como a diferenciação das células epiteliais, plasticidade e EMT.⁽³⁷⁾

3.2. Claudinas

As claudinas são proteínas constituintes das junções oclusivas e juntamente com as ocludinas estão presentes nas membranas apicolaterais de células epiteliais, com função de barreira, vedação e transdução de sinais.⁽³⁸⁾ Diferentes combinações de claudinas formam os cinturões intercelulares de junções oclusivas, composto de claudinas que variam de claudina 1 a claudina 24, diferenciando muito pouco na estrutura proteica. As claudinas regulam os poros entre uma célula e outra e atuam na seletividade de moléculas como o cálcio, o sódio e potássio, é considerada uma proteína que constitui barreira.⁽³⁹⁾ No câncer, as claudinas parecem influenciar o prognóstico tumoral atuando tanto na progressão quanto na supressão tumoral.⁽³⁹⁾ Baixos níveis de claudina 7 por exemplo, foram relacionados a um melhor prognóstico em pacientes com carcinoma oral de células escamosas, assim como no câncer de próstata.⁽⁴⁰⁾ Por outro lado, os tumores mamários classificados como basaloides e *claudin-low* são relacionados com pior prognóstico tumoral e preditores de recorrência da doença.⁽⁴¹⁾ Essa característica demonstra ainda que de 7-14 % dos tumores mamários possuem baixos níveis de claudina 3, 4, 7 e da proteína E-caderina, facilitando a EMT.⁽⁴²⁾

3.3. Vimentina

O citoesqueleto das células é uma estrutura semelhante a uma rede, formada por um conjunto de filamentos proteicos: filamentos de actina ou microfilamentos, filamentos intermediários e microtúbulos. Diversas proteínas interagem com esses filamentos e contribuem para a maioria das funções celulares.⁽⁴³⁾ A vimentina é uma proteína caracterizada por constituir os filamentos intermediários presentes nas células,

tendo um papel estrutural do citoesqueleto, favorecendo integridade celular e tecidual.^(44,45) Essa proteína é geralmente expressa em células mesenquimais, tais como fibroblastos, células endoteliais, células hematopoiéticas e células da glia.⁽⁴⁶⁾ No câncer, muitas vezes essa proteína é associada como um marcador de invasão de células tumorais por meio da sua alta expressão durante a ativação de processo de EMT.⁽⁴⁷⁾ Dessa forma, a presença dessa proteína na patologia do câncer pode indicar pior prognóstico de diversos tipos tumorais epiteliais, inclusive em tumores de mama metastáticos.^(45,48)

4. miRNAs

Os microRNAs são pequenas moléculas de RNA não-codificantes, constituídos de 18-24 nucleotídeos e desempenham papel fundamental na expressão gênica e proteica.⁽⁴⁹⁻⁵¹⁾ O primeiro miRNA foi identificado por Lee et al. (1993) e Wightman et al. (1993), os quais classificaram o transcrito do gene *lin-4* como um pequeno RNA não-codificante (ncRNA) capaz de intervir na regulação do RNAm codificador da proteína LIN-14. Essa proteína está relacionada com o desenvolvimento da espécie *Caenorhabditis elegans*, seus baixos níveis impedem o crescimento larval que é mediado pelo transcrito *lin-4*. Os autores observaram uma relação no padrão de expressão dessas moléculas e demonstraram que altas concentrações de *lin-4* acarretava na diminuição dos níveis de LIN-14 e retardamento do crescimento da espécie.^(52,53) Desde então, estes ncRNAs que possuíam papéis regulatórios na tradução de determinadas proteínas, foram reconhecidos como miRNAs.⁽⁵²⁾ Cerca de 60 % dos genes humanos são regulados por miRNAs, e estes se relacionam com processos biológicos tais como, controle do ciclo celular, apoptose, metabolismo,

desenvolvimento e diferenciação, além de envolvimento com doenças neurodegenerativas e metabólicas como o câncer.^(50,54)

Em mamíferos a biogênese dos miRNAs é considerada universal e se inicia com a produção de um transcrito primário de miRNA (pri-microRNA). Este pri-microRNA é sintetizado pela enzima RNA polimerase II ou III em uma dupla fita contendo um *stem-loop* (*hairpin*) de um lado e uma extremidade 5' e 3' do outro lado. Ainda no núcleo, o pri-microRNA é clivado pela enzima Drosha e seu cofator DGCR8 (*Di George syndrome chromosomal region 8*), liberando uma dupla fita intermediária composta por aproximadamente 60-70 nucleotídeos, conhecida como pré-microRNA. Este precursor é então exportado do núcleo celular para o citoplasma pela proteína Exportina-5 – Ran-GTP. Um complexo formado pela enzima Dicer e a proteína TRBP (Proteína de ligação ao RNA do HIV-1 TAR) cliva o *hairpin* do pré-microRNA a fim de formar uma estrutura de fita dupla, o microRNA duplex. Geralmente, uma fita é degradada e a outra forma um miRNA maduro funcional, que é carregado junto com a proteína Argonata (Ago2) para o complexo silenciador induzido por RNA (RISC). Uma vez incorporado ao complexo, o miRNA é guiado ao seu RNAm alvo e posicionado em cada região traduzida 3' ou 5' (UTR). Como resultado, pode ocorrer o silenciamento de expressão, clivagem do RNAm, repressão da tradução ou deadenilação (Figura 4).^(51,55,56)

Cada miRNA recebe uma nomenclatura numérica e sequencial, seguindo a ordem definida no banco de dados miRBase. Eles podem ser classificados em famílias, que compartilham a mesma sequência de nucleotídeos iniciais (sequência *seed*), e podem desempenhar funções semelhantes.^(57,58)

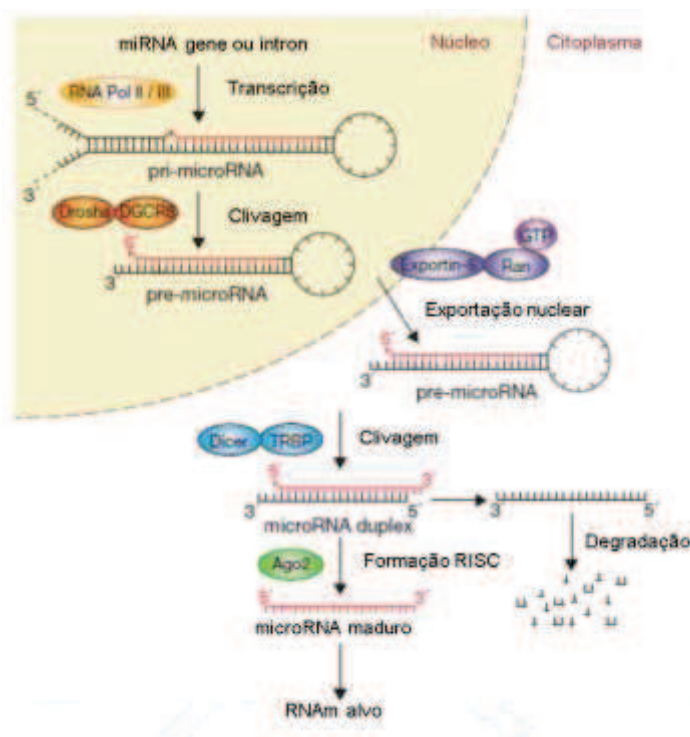


Figura 4. Biogênese dos microRNAs. Adaptado de Winter et. al. (2009).⁽⁵⁶⁾

4.1. miRNAs no câncer

Estudos vêm mostrando o papel dos miRNAs na desregulação do câncer, causando significantes consequências patológicas. Essas moléculas podem agir de duas maneiras: como oncomicroRNAs (oncomiRs), apresentam elevada expressão nos tumores e bloqueiam a ação de genes supressores tumorais; como miRNAs supressores, se encontram pouco expressos e acabam por não atuar na inibição de oncogenes, favorecendo o desenvolvimento tumoral.⁽⁵⁹⁻⁶²⁾

Um dos primeiros estudos que demonstraram evidências da ação dos miRNAs no câncer foi desenvolvido por Calin e colaboradores (2002).⁽⁶³⁾ Os autores verificaram uma deleção da sequência gênica codificadora dos miR-15a e miR16-1, que atuavam na inibição do oncogene *Bcl-2*, envolvido com ações anti-apoptóticas em células de leucemia linfocítica. Posteriormente, um estudo envolvendo câncer de pulmão

encontrou baixos níveis de expressão do miRNA let-7 nas células, o que intensificou a ação dos oncogenes *RAS* e *MYC*, que são reguladores e promotores de proliferação celular, agindo para o avanço da doença.⁽⁶⁴⁾

No câncer de mama, alguns miRNAs já foram descritos e tem importante papel no desenvolvimento da doença, facilitando EMT, invasão, metástase e contribuindo para a progressão tumoral.⁽⁶⁵⁾ O miR-19a é considerado um supressor no processo tumoral da mama, seus altos níveis diminuem o proto-oncogene *Fra-1* (antígeno relacionado à Fos 1), chave para a mudança do fenótipo de macrófagos associados à tumores. Esses macrófagos são abundantes no microambiente tumoral e a alteração do fenótipo dos macrófagos M1 para M2 estimula ações oncogênicas que permitem sobrevivência celular. Dessa forma, *Fra-1* bloqueado, impede a progressão tumoral.⁽⁶⁶⁾ De outro lado, o miR-155 demonstra ações contribuindo para progressão do ciclo celular e evitando apoptose por meio da inibição TP53INP1 (proteína nuclear 1 indutora da proteína tumoral p53). Essa inibição diminui a ação de caspases pró-apoptóticas e de p21 (inibidor de quinase dependente de ciclina 1), em consequência ocorre proliferação das células tumorais e inibição da apoptose.⁽⁶⁷⁾

4.2. miRNAs associados à metástase

Os miRNAs podem atuar regulando a expressão de genes relacionados ao processo metastático por ligação aos seus RNAm alvos, conduzindo dessa forma, a alterações na atividade das células.^(68,69) No câncer de mama, os primeiros oncomiRs encontrados desregulados e envolvidos com o processo metastático foram os miR-21, miR-155 e miR-125b. As alterações nas expressões de miRs oncogênicos podem promover o crescimento tumoral, proliferação e invasão celular.⁽⁶²⁾ Além dos citados, uma diversidade de miRNAs tem sido descritos como promotores (miR-182, miR-10b,

miR-27a, miR-9, miR-22 e miR-221/222, miR-373, miR-502) ou supressores (família let-7, miR-145, miR-335, miR-19a, miR-31, miR-146a/b, miR-126) de metástase.^(70,71)

A família do miR-200 (miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-141 and miR-429) e o miR-205 foram relatados por regular o processo de EMT. Baixos níveis desses miRNAs são encontrados em diversos tumores, e isso está associado com o aumento na expressão de fatores de transcrição da família ZEB (*zinc finger E-box binding homeobox*), que regulam genes e proteínas da EMT, como a E-caderina.⁽⁶⁸⁾ Outros miRNAs são relatados por modularem o processo metastático, principalmente a EMT, alterando fatores de transcrição chaves para a desregulação da transição epitelial. Os miR-34, miR-9 e miR-30 regulam a expressão de *Snail1*, enquanto os miR-124, miR-203 e miR-204/211 tem como alvo *Snail2*. Já os miR-214, miR-580 e let-7d regulam a proteína TWIST1 (*Twist-related protein 1*) e os miR-138, miR-215 e miR-708 suprimem ZEB2. Essas alterações no padrão de expressão das proteínas contribuem para a progressão tumoral e desenvolvimento de metástases.⁽⁶¹⁾

4.3. Família do miR-10/100

A família do miR-10/100 é amplamente conservada e seus membros possuem similaridade na localização genômica, principalmente em agrupamentos do gene regulador homeótico (*Homeobox – Hox*).⁽⁷²⁾ Em humanos, os miRNAs representados por essa família são os miR-10a, miR-10b, miR100, miR-99a, miR-99b e miR-125a.⁽⁷³⁾ A desregulação na expressão dos miRNAs da família miR-10/100 vem sido descrita e estudada por diversos autores. O miR-100 por exemplo é descrito como um supressor tumoral no câncer de mama.⁽⁵⁸⁾ Na maioria dos cânceres, o miR-99a é considerado um supressor, regulando a via mTOR (proteína alvo da rapamicina em mamíferos), suprimindo a viabilidade celular e aumentando apoptose.⁽⁷⁴⁻⁷⁶⁾ O miR-99b apresenta

papel supressor em câncer colorretal,⁽⁷⁷⁾ na mama a inibição deste miRNA foi capaz de diminuir atividade do fator transformador de crescimento- β (TGF- β), responsável em grande parte pela EMT.⁽⁷⁸⁾ Também como um supressor tumoral, o miR-125a suprime crescimento celular, invasão e metástase por meio da diminuição do oncogene *STAT3*.⁽⁷⁹⁾ O miR-10b por exemplo, é um membro de grande destaque, pois sua expressão desregulada está envolvida com glioblastoma,⁽⁸⁰⁾ câncer pancreático,⁽⁸¹⁾ câncer de esôfago,⁽⁸²⁾ e câncer de mama.⁽⁸³⁾ A alta expressão desse miRNA em células de câncer de mama metastático é induzida pelo fator de transcrição TWIST. O miR-10b induzido inibe a tradução da proteína HOXD10 (*Homeobox D10*), considerada supressora, o que aumenta a expressão da proteína membro da família homóloga Ras C (RhoC), pró-metastática. Dessa forma, a alta expressão deste miRNA está correlacionada com elevada capacidade de invasão, migração e metástases.⁽⁸³⁾

4.3.1. miRNA-10a

O miR-10a desempenha funções relevantes em uma variedade de processos fisiológicos e patológicos, assim como no câncer.⁽⁸⁴⁾ Níveis aumentados do miR-10a são descritos em câncer gástrico,⁽⁸⁵⁾ adenocarcinoma pancreático,⁽⁸⁶⁾ leucemia mielóide aguda,⁽⁸⁷⁾ e glioma⁽⁸⁸⁾ por exemplo. Alta expressão do miR-10a foi observada nos tumores de mama comparada ao tecido de mama normal.⁽⁸⁹⁾ No processo metastático, esse miRNA está associado com metástases linfonodais de câncer gástrico primário, por regulação da via de sinalização WNT, envolvida com a tumorigênese. Esse miR também modula moléculas de adesão localizadas na superfície das células, sugerindo sua relação com o desenvolvimento de metástases.⁽⁹⁰⁾

Estudos tem demonstrado papéis contraditórios do miR-10a no câncer de mama.^(84,89) Como supressor, a alta expressão desse miRNA foi relacionado com maior tempo

de sobrevida e recidiva da doença, após tratamento das pacientes com tamoxifeno.⁽⁹¹⁾ Khan et al. (2015) encontraram baixa expressão deste miRNA em pacientes de câncer de mama e relataram aumento na expressão deste miRNA pelo ácido retinóico.⁽⁸⁴⁾ Em uma análise de *microarray* realizada em tumores de pacientes com recidiva precoce e tardia, verificou-se que o miR-10a estava significativamente reduzido em pacientes com recidiva precoce.⁽⁹²⁾ Por outro lado, como oncomiR, este miRNA foi relatado por estar altamente expresso em células resistentes ao quimioterápico cisplatina, indicando pior evolução da doença.⁽⁹³⁾ Um fato interessante, é que esse miR-10a tem a capacidade de controlar a síntese global de proteínas atuando diretamente na tradução de proteínas ribossômicas, intensificando-as. A inibição desse miRNA diminui a síntese da proteína oncogênica RAS-V12, que tem capacidade de aumentar o potencial de transformação celular para fenótipo mesenquimal.⁽⁹⁴⁾ Ke e Lou (2017)⁽⁹⁵⁾ mostraram que a expressão do miR-10a é aumentada na linhagem celular de câncer de mama triplo-negativo MDA-MB-231 e na luminal A, MCF-7, quando comparadas com linhagem não tumoral. Apesar disso, nesse mesmo estudo, foi correlacionada a alta expressão do miR-10a com diminuição da habilidade migratória, promoção da apoptose e supressão da proliferação celular pelas proteínas fosforiladas p-Akt (proteína quinase), p-mTOR, p-p70S6K (proteína ribossômica S6 quinase beta-1) e PIK3CA. Em um estudo que buscou silenciar o transcrito do oncogene *RUNX2* (fator de transcrição relacionado ao Runt 2), relacionado à metástase óssea, foi verificada diminuição nos níveis dos miRNAs 10a e 10b, após o evento.⁽⁸⁹⁾ Esse resultado afetou os níveis de proteínas supressoras e alvos destes miRNAs, *HOXA1* (*Homeobox A1*) e *HOXD10*. Quando o *RUNX2* foi superexpresso, observou-se uma indução na transcrição dos miRs 10a e 10b, ocasionando invasão e migração celular.⁽⁸⁹⁾

5. Melatonina

5.1 Síntese da melatonina

A melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) é uma molécula presente na natureza tanto em plantas quanto em animais. Nos mamíferos essa molécula se apresenta como um hormônio sintetizado em diversas células, tecidos e órgãos do corpo, principalmente para utilização local. A glândula pineal é responsável por produzir e secretar esse hormônio na corrente sanguínea, mais especificamente, nas células encontradas nessa glândula, os pinealócitos.⁽⁹⁶⁾ As ações da melatonina são diversas e abrangem a regulação do ritmo circadiano, propriedades antioxidantes, antienvhecimento e imunomoduladoras.^(46,97,98) Sua síntese é realizada seguindo um padrão rítmico, com pico secretório no período noturno e quase nenhuma síntese no período diurno.⁽²⁷⁾ Resumidamente, a síntese da melatonina inicia-se a partir da conversão do aminoácido triptofano em 5-hidroxitriptofano (5-HTP) pela enzima triptofano hidroxilase 1 (TPH1). O 5-HTP é descarboxilado pela enzima L-Aminoácido aromático descarboxilase (AADC) em serotonina, a qual é acetilada em N-acetilserotonina (NAS) na reação catalisada pela enzima arilalquilamina N-acetiltransferase (AA-NAT). Por fim, a NAS é convertida em melatonina pela enzima hidroxil-indol-O-metil-transferase (HIOMT) (Figura 5).⁽⁹⁹⁻¹⁰¹⁾

A enzima AA-NAT apresenta um ritmo diário de ação, no entanto sua concentração está mais elevada no período noturno, especialmente na fase escura. Esta variação cíclica da AA-NAT faz com que a redução dos níveis de serotonina na fase escura seja acompanhada pelo aumento das concentrações de NAS e melatonina. A degradação da melatonina ocorre principalmente no fígado, envolvendo a hidroxilação

em 6-hidroxi-melatonina [6(OH)M], seguida dos processos de sulfatação ou glicuronidação, e posterior excreção na urina.^(102,103)

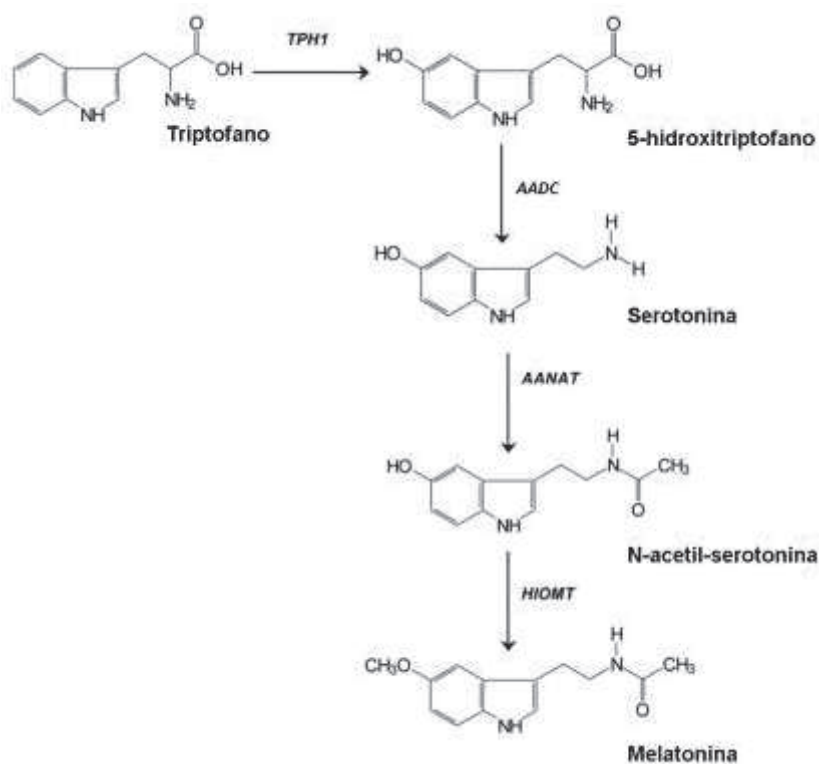


Figura 5. Síntese de melatonina. Envolve a transformação sequencial do triptofano em uma cascata de reações enzimáticas catalisadas pela enzima triptofano hidroxilase 1 (TPH1), L-Aminoácido aromático descarboxilase (AADC), arilalquilamina N-acetiltransferase (AANAT), e hidroxí-indol-O-metil-transferase (HIOMT). Modificado de Kleszczyński & Fischer, 2012.⁽¹⁰⁴⁾

5.2. Mecanismos de ação

A ação da melatonina nas células pode ocorrer por meio da sua ligação aos receptores clássicos de membrana (MT1 e MT2), ou de maneira independente dos receptores.⁽⁴⁶⁾ MT1 e MT2 são receptores de membrana acoplados à proteína G codificados respectivamente pelos genes *MTNR1A* e *MTNR1B*.⁽¹⁰⁵⁾ Células de diversos órgãos expressam esses dois receptores e a interação e ligação da molécula de

melatonina com MT1 e MT2 pode modular a atividade de diversas proteínas assim como perfil iônico das células.⁽²⁷⁾

A ativação do receptor MT1, ativa as proteínas G acopladas, tais como $G\alpha_{i2}$, $G\alpha_{i3}$, $G\alpha_{aq}$, and $G\alpha_{11}$. Essa ativação pode ocasionar uma cascata de ações, como por exemplo a modulação de proteínas quinases (PKC,PKA,MAPK), e a expressão de genes envolvidos com processos de proliferação e diferenciação celular de células tumorais mamárias.^(27,106) Hill e colaboradores (2009)⁽¹⁰⁷⁾ descreveram que as ações da melatonina no tecido mamário tumoral se deve principalmente à sua interação com o receptor MT1, desencadeando supressão do crescimento tumoral. Essa ação envolve a regulação de genes cronobiológicos como os genes relógio, genes relacionados ao metabolismo celular, fatores de crescimento, e fatores que bloqueiam a iniciação, promoção e progressão celular.⁽¹⁰⁷⁾ Há uma interação entre o receptor MT1 e os receptores de estrógeno, um marcador específico para tumores mamários classificados como RE positivos. A ativação de MT1 pela melatonina reprime receptores de estrógeno e conseqüentemente o desenvolvimento e o crescimento do câncer de mama.⁽²⁷⁾ A interação da melatonina com o receptor MT2 já foi descrita e embora ela não ter mediado as ações antiproliferativas em células tumorais MCF-7, ela atua na modulação da produção de moléculas transdutoras de sinais importantes, tais como cAMP (adenosina monofosfato cíclico) atuante no metabolismo celular.⁽²⁷⁾

Independente dos receptores, a natureza lipofílica da melatonina permite sua difusão pela membrana celular, nuclear e mitocondrial se ligando a proteínas locais e desencadeando uma variedade de efeitos.⁽²⁷⁾ No citoplasma esse hormônio pode interagir com a calmodulina e com receptores nucleares RZR/ROR (receptor Z para

retinoide/receptor órfão para retinoide) que ativam fatores de transcrição envolvidos na modulação da proliferação do câncer de mama.⁽¹⁰⁸⁻¹¹⁰⁾

A melatonina atua também em enzimas redutases a fim de reduzir o dano oxidativo causado por radicais livres (ROS) em diversos tecidos, assim como em células tumorais mamárias. Estudos tem demonstrado o efeito deste hormônio no aumento de enzimas antioxidantes que modulam o metabolismo celular e diminuem a proliferação.^(111,112)

5.3. Melatonina e câncer

Baixas concentrações de melatonina são relacionadas à frequência de exposição à luz durante a noite.⁽²⁷⁾ Esse fato é evidenciado como importante fator de risco para o desenvolvimento do câncer, principalmente de mama.⁽¹¹³⁾ Alguns autores buscam investigar quais as consequências da exposição à luz no período noturno e a sua relação com os baixos níveis da melatonina. Estudos com camundongos demonstram que a diminuição da melatonina pela exposição à luz intensificou a resistência à quimioterapia de tumores mamários.⁽¹¹⁴⁾ Em humanos, Blask e colaboradores (2011) demonstraram alta susceptibilidade ao desencadeamento de câncer de mama em trabalhadores noturnos, por disfunção do ritmo circadiano e desempenho metabólico corporal, controlado em partes pela melatonina.^(115,116)

A ação protetora da melatonina no câncer fica comprometida quando sua secreção é bloqueada. Muitos tumores são formados devido a danos no DNA pela ação de radicais livres. A melatonina tem a capacidade de neutralizar essas moléculas e proteger o DNA de danos oxidativos.^(117,118) Diversos estudos têm mostrado os efeitos oncostáticos da melatonina e sua habilidade em inibir a progressão tumoral.^(46,119,120) Esse hormônio age na instabilidade genômica, melhorando a capacidade de reparo do

DNA; diminui a ativação de vias sinalizadoras de proliferação; bloqueia a sinalização de crescimento celular, recupera a capacidade de apoptose; diminui a imortalidade replicativa; inibe genes envolvidos com a desregulação do metabolismo celular, diminuição da inflamação, inibição do processo de angiogênese, invasão e metástase.⁽¹²¹⁾

Considerando seu envolvimento na regulação de genes e proteínas relacionadas ao processo metastático, uma gama de ações antimetastáticas da melatonina pode ser descrita (Figura 6). Esse hormônio pode agir no bloqueio da vascularização tumoral, a angiogênese, promotora do crescimento tumoral e que é controlada por fatores como o VEGF e ET-1 (endotelina 1). Em modelos tumorais de câncer de mama e em pacientes com tumores avançados, a melatonina reduziu os níveis de VEGF.^(122,123) Em câncer de cólon, esse hormônio também é capaz de diminuir ET-1, proteína vasoconstritora envolvida com o processo de angiogênese.⁽¹²⁴⁾

Na transição epitélio-mesenquimal, a melatonina demonstra efeitos na regulação da interação célula-célula e célula-matriz extracelular, melhorando a produção de moléculas de adesão. Esse hormônio pode regular metaloproteinases (MMP), que são enzimas capazes de destruir a matriz extracelular e promover o desprendimento das células tumorais. A redução a atividade catalítica da MMP-9 pôde ser observada pelo estudo de Rudra e colaboradores (2013),⁽¹²⁵⁾ onde verificaram a ação da melatonina na interrupção da ação da protease. Ainda, esse hormônio pode inibir a ação da proteína *Rho Associated Coiled-Coil Containing Protein Kinase 1* (ROCK-1), reguladora de rearranjos do citoesqueleto celular, e capaz de promover a invasão tumoral.⁽¹²⁶⁾

Outras evidências apontam o papel desse hormônio na regulação do processo de EMT, principalmente interferindo a expressão de proteínas características.⁽¹²⁷⁾ A

melatonina interfere na sinalização do fator nuclear kappa B (NF- κ B), diminuindo sua expressão e conseqüentemente promovendo a expressão de E-caderina, importante proteína que mantém a aderência célula-célula.⁽¹²⁸⁾ Ainda, esse aumento provoca conseqüente declínio da proteína marcadora de fenótipo mesenquimal, vimentina.⁽²¹⁾ A ocludina, outra molécula relacionada às junções célula-célula, tem sido identificada aumentada pela melatonina e capaz de regular proteínas como PI3K que juntamente com outras moléculas podem intensificar a capacidade migratória das células.^(21,129)

Esse hormônio também atua na modulação da sinalização da via de ativação do receptor HER2/MAPK/*Extracellular signal-regulated kinase* (Erk), que reprime a EMT e metástase em câncer de mama avançado por modulação de Rsk (*Ser/Thr kinase ribosomal S6 kinase*), transdutores de sinais associados à malignidade celular.⁽¹³⁰⁾ Isso aponta os efeitos benéficos da melatonina em tumores mamários classificados como HER2.

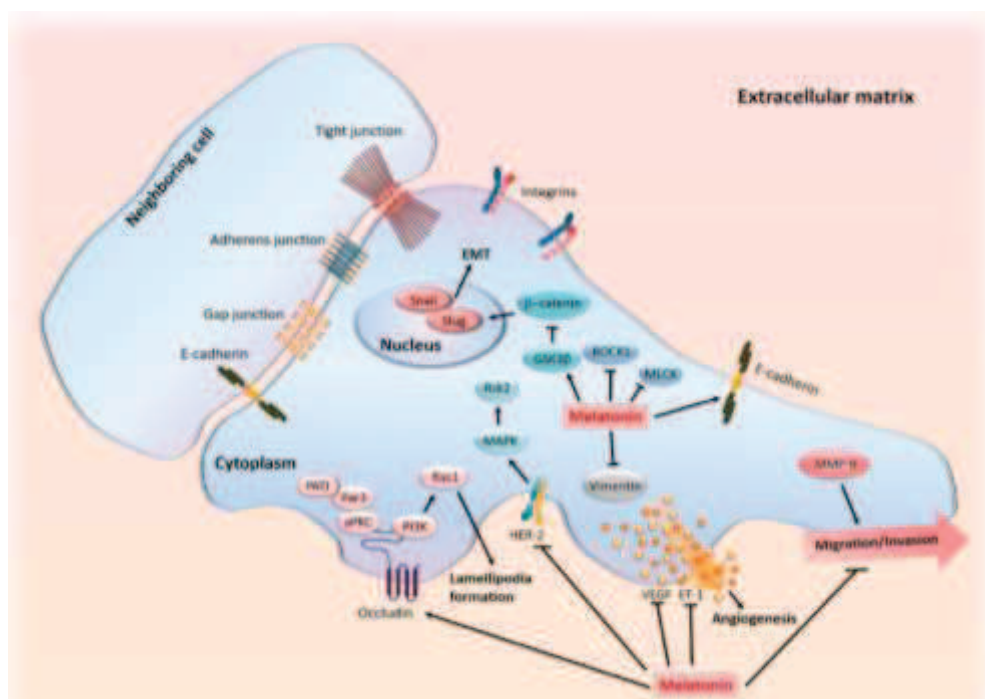


Figura 6. Representação esquemática dos múltiplos mecanismos envolvidos na inibição da metástase pela melatonina. EMT: transição epitélio-mesenquimal; ET1: endotelina-1,

GSK3 β : quinase glicogênio sintase 3 beta; HER2: receptor do fator de crescimento epidermal humano 2; MAPK: proteína quinase mitógeno ativada; MLCK: myosin light-chain kinase; MMP-9: metaloproteinase de matriz 9; ROCK-1: quinase associada a proteína Rho 1; VEGF: fator de crescimento endotelial vascular. Adaptado de Reiter et al. (2017).⁽⁴⁶⁾

6. Melatonina e miRNAs

A ação da melatonina tem sido demonstrada na modulação de determinados miRNAs que possuem envolvimento com o câncer.^(131,132) Ela aumenta a expressão dos miR-3195 e miR-374b, que desencadeiam ação anti-angiogênica e suprimem a expressão de fatores pró-angiogênicos no câncer de próstata.⁽¹³¹⁾ No câncer gástrico, essa indoleamina inibe o crescimento celular e induz a apoptose por mediar a ação do miR-16 e do fator de transcrição *mothers against DPP homolog 3* (SMAD3).⁽¹³³⁾ Lee et al. (2011)⁽¹³⁴⁾ e Mori et al. (2016)⁽¹³⁵⁾ estudaram o efeito da melatonina na modulação da expressão de miRNAs em células de câncer de mama não metastáticas. Os resultados demonstraram a capacidade da melatonina em alterar a expressão de miRNAs, promovendo inibição no crescimento das células tumorais mamárias. Ainda que estes estudos tenham mostrado a ação do hormônio na regulação de miRNAs, poucos são os estudos que investigam miRNAs modulados pela melatonina e envolvidos principalmente com a metástase do câncer de mama. Nesse contexto, a melatonina pode ser considerada importante alvo no controle da progressão tumoral, criando assim, um caminho promissor para sua utilização como agente terapêutico no câncer.

7. Objetivo

Avaliar a potencial ação da melatonina no processo metastático mediado por miRNAs no câncer de mama triplo-negativo.

7.1. Objetivos Específicos

- Verificar a viabilidade celular de células tumorais mamárias da linhagem MDA-MB-468, após tratamento com diferentes concentrações de melatonina a fim de estabelecer uma dose ideal.
- Identificar a expressão diferencial de miRNAs associados ao câncer de mama por *PCR-Array* na linhagem celular MDA-MB-468, tratada ou não com melatonina.
- Selecionar um miRNA candidato diferencialmente expresso e seu gene e proteínas alvo.
- Realizar o silenciamento de um miRNA (oncomiR) que se mostrar relevante nas análises de *PCR-Array*.
- Após os tratamentos, verificar a capacidade metastática das células tumorais por ensaio de invasão/migração celular e a expressão de proteínas alvo do miRNA.

II. MATERIAL E MÉTODOS

II. MATERIAL E MÉTODOS

Considerações Éticas

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

1. Cultivo celular

Células procedentes da linhagem tumoral de câncer de mama humano triplo-negativo MDA-MB-468, MDA-MB-231 e luminal A (RE positivo) MCF-7 permaneceram em dimetilsulfóxido (DMSO) (*Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA*) e soro fetal bovino (SFB) a -80 °C até o momento de uso. As células MDA-MB-468 foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Wilson Araújo da Silva Junior, do Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP). As células MDA-MB-231 e MCF-7 já constavam no banco de linhagens do LIMC (Laboratório de Investigação Molecular no Câncer).

Após o descongelamento, as células foram cultivadas em meio de cultura DMEM alta glicose (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium - High Glucose*), suplementadas com 10 % de soro fetal bovino (SFB) e 1 % de penicilina/estreptomicina (LGC Biotecnologia), mantidas em incubadora de CO₂ a 5 %, na temperatura de 37 °C. Os experimentos foram iniciados quando as células atingiram 80 % de confluência.

2. Desagregação enzimática e contagem das células em Câmara de Neubauer

Após lavagem com solução tampão fosfato (PBS), as células em cultivo foram desagregadas utilizando Tripsina 0,25 % (LGC Biotecnologia), centrifugadas e ressuspendidas em meio completo. Uma alíquota de 10 µL de células foi separada, corada com azul de tripan para exclusão das células mortas e disposta em câmara de

Neubauer para contagem dos quadrantes ao microscópio (Figura 7). Para obtenção do número de células foi feita a seguinte equação:

$$n^{\circ} \text{ de células/mL} = \frac{n^{\circ} \text{ total de células}}{n^{\circ} \text{ de quadrantes}} \times \text{fator de diluição} \times 10^4$$

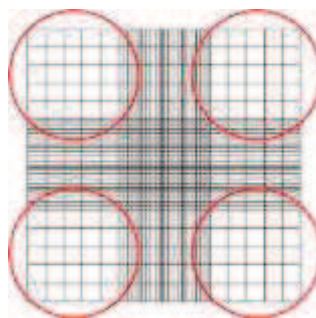


Figura 7. Esquema representativo da câmara de *Neubauer*. Os círculos indicam os quadrantes laterais que foram utilizados para a contagem.

3. Ensaio de viabilidade celular (MTT)

O ensaio MTT foi realizado para avaliar o efeito da melatonina na viabilidade celular da linhagem MDA-MB-468. Este procedimento consiste em um ensaio colorimétrico utilizado para avaliação da atividade metabólica celular.⁽¹³⁶⁾ Quando adicionado às células em atividade, o sal MTT é reduzido e metabolizado pela enzima desidrogenase succínica presente nas mitocôndrias e forma cristais de cor púrpura.⁽¹³⁷⁾

Uma quantidade de 5×10^4 células/mL foram diluídas em 100 μ L de meio de cultivo suplementado com 2 % de soro fetal bovino e dispostas em poços individuais (placa de 96 poços) com incubação de 24 horas em estufa de CO₂ a 5 % na temperatura de 37 °C. Após o período, seguiu-se o tratamento utilizando cinco concentrações distintas de melatonina (0,0001 mM, 0,001 mM, 0,01 mM, 0,1 mM e 1 mM) (*Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA*). As células do grupo controle receberam apenas a solução veículo, composta pela diluição da melatonina (1:1 de etanol absoluto e PBS). O

tratamento foi mantido por 24 horas, em seguida a solução de MTT (*Vibrant MTT Cell Proliferation Assay Kit - Invitrogen*) foi adicionada em cada poço e incubada por 1 hora. Posteriormente, para que houvesse a solubilização dos cristais formados a partir da metabolização do MTT, foi adicionado o composto dimetil-sulfóxido (DMSO) (*Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA*) às células e mantido por 10 minutos. A absorbância foi medida em comprimento de onda de 562 nm utilizando-se o leitor de placas *FLUOstar Omega Microplate Reader*. A viabilidade celular foi calculada para as diferentes concentrações de melatonina em relação ao grupo controle. Todos os tratamentos foram realizados em triplicatas biológicas.

4. Técnica de *PCR Array*

4.1. Grupos experimentais

As células das linhagens em estudo foram cultivadas em placas individuais de 6 poços em uma concentração de $0,5 \times 10^6$ células/poço conforme os grupos experimentais descritos abaixo:

- Grupo Controle: células tratadas com a solução veículo (1:1 etanol/PBS);
- Grupo Melatonina: células tratadas com 1 mM de melatonina (concentração escolhida após ensaio de MTT);

O tratamento com melatonina foi realizado utilizando melatonina em pó previamente diluída em etanol absoluto e PBS, obtendo assim, uma solução mãe na concentração de 100 mM. A partir desta, foi feita uma re-diluição em meio DMEM com 2 % soro fetal bovino, a fim de obter uma concentração final de 1 mM. Os tratamentos foram realizados em triplicata, com duração de 24 horas.

4.2. Extração de RNA total

As amostras de RNA total foram extraídas de todos os grupos utilizando o *Kit* de extração *miRNeasy Mini Kit* (Qiagen, Hilden, Alemanha). Inicialmente, as células foram lavadas com PBS, em seguida foi adicionado 500 μL do reagente *QIAzol*[®] (Qiagen, Hilden, Alemanha) gelado para lise celular, homogeneizando para desprendimento total das células. A solução foi transferida para um tubo e mantida em temperatura ambiente por 5 minutos. Na sequência foram adicionados 140 μL de clorofórmio para cada 700 μL de amostra, seguido de agitação por inversão de tubos e centrifugação em uma velocidade de 12.000g por 15 minutos a 4 °C para separação em três fases. A fase superior consiste no RNA total, a fase intermediária (branca) contém o DNA, e a fase inferior (rosa) é formada pelas proteínas e outros produtos celulares. A fase superior onde se encontra o RNA foi então retirada com cuidado, diluída em etanol absoluto gelado em quantidade variável por amostra (quantidade de amostra \times 1,5) homogeneizada e adicionada em um tubo com coluna integrada. O tubo contendo a amostra foi centrifugado por 1 minuto a 12.000g a 22 °C. O material ficou contido na coluna e o líquido abaixo da mesma foi descartado. 700 μL de *Buffer RWT* foram adicionados à coluna, centrifugado por 1 minuto a 12.000g a 22 °C. O filtrado foi descartado e 500 μL de *Buffer RPE* foram adicionados à coluna que foi centrifugada novamente por 1 minuto a 12.000g a 22 °C repetindo-se a operação por 2 minutos. Os *Buffers*, produtos do *kit*, foram utilizados para lavagem e purificação da amostra. Ao final, 30 μL de *RNase-free water* foi adicionado à coluna, centrifugada novamente por 2 minutos obtendo-se o RNA total eluído em um novo tubo que mantido em freezer -80 °C até o uso. A quantificação e a qualidade do RNA foram avaliadas utilizando-se o *NanoDrop 2000C Spectrophotometer* (*Thermo Fisher Scientific*, Waltham, EUA).

4.3. Síntese de cDNA

A reação de transcriptase reversa para produção da fita de cDNA (DNA complementar) foi feita por meio do *miScript II RT Kit* (Qiagen, Hilden, Alemanha) específicos para miRNAs. O *mix* da reação foi preparado com 4 μL de *Hispec Buffer*, 2 μL de *mix* de nucleotídeos, 2 μL de *mix* transcriptase reversa e *RNase-free water* na quantidade variável para cada amostra atingindo um volume do *mix* de 8 μL . As amostras foram pipetadas juntamente com o *mix* para atingir um volume final de 20 μL e concentração final de 250 ng. Em seguida, os tubos foram homogeneizados, centrifugados e incubados no termociclador *Mastercycler* (*Eppendorf*, Hamburgo, Alemanha), seguindo a programação de 37 °C por 60 minutos, 95 °C por 5 minutos e então mantidas a 4 °C.

4.4. Real-time PCR Array para análise da expressão de miRNAs maduros

O *PCR Array* foi desenvolvido a fim de verificar a expressão diferencial de microRNAs maduros em células tumorais de mama da linhagem MDA-MB-468, tratadas ou não com melatonina. Para tanto, foram utilizadas placas *miScript miRNA PCR Arrays (RT² Profiler Plate) – Human breast cancer MIHS-109ZC-2* (Qiagen, Hilden, Alemanha) compostas por 96 poços contendo 84 iniciadores diretos de miRNAs maduros (*primers*) e relacionados ao câncer de mama (Quadro 2 e Figura 8). O cDNA obtido das amostras foi diluído em *RNase-free water* para uma concentração de 25 ng/ μL . Em seguida, o *mix miScript SYBR Green PCR kit* (Qiagen, Hilden, Alemanha) foi preparado com 1375 μL de *Master Mix*, 275 μL *miScript Universal Primer*, 1000 μL *RNase-free water* e 100 μL da amostra de cDNA em um volume total de 2750 μL . O *mix* contém sondas específicas que emitem fluorescência e indicam a reação de amplificação do material através de um *software* acoplado ao equipamento de PCR em

tempo real. Após o preparo, 25 μ L do *mix* foram adicionados em cada poço das placas e inseridas no equipamento *StepOnePlus* (*Applied Biosystems*, Foster, EUA) à uma temperatura de 95 °C por 15 minutos, 40 ciclos de 94 °C por 15 segundos, 55 °C por 30 segundos, 70 °C por 30 segundos. O valor da expressão relativa dos miRNAs de interesse foi determinado pelo método de quantificação em relação à média dos genes normalizadores utilizados como controle endógeno ($2^{-\Delta\Delta C_t}$).⁽¹³⁸⁾

Quadro 2. Placa de PCR Array com 84 miRNAs relacionados ao câncer de mama. Esquema representativo da placa utilizada para análise de expressão gênica de miRNAs.

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

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

Figura 8. Composição da placa *RT Profiler PCR Array Human Breast Cancer*. A placa é composta por 84 *primers* de miRNAs maduros relacionados ao câncer de mama e dispostos entre os poços A1 a G12; H1 a H2 contém replicata do miR-39 da espécie *C. elegans*, um normalizador alternativo dos dados do *PCR Array*; H3 a H8 contém ensaios para diferentes RNAs de interferência snoRNA/snRNA usados também como controles internos da reação; H9 a H10 possuem replicata do *miRTC miScript Primer*, para controle da reação de transcriptase reversa; e os poços H11 a H12 possuem replicata do controle positivo da reação de PCR.

5. Seleção de miRNA candidato e possível gene alvo

Entre os miRNAs diferencialmente expressos, o miR-10a foi selecionado. Levando em consideração a regulação de genes e proteínas relacionadas à metástase, uma busca na base de dados mirDIP (<http://ophid.utoronto.ca/mirDIP>) foi realizada a fim de verificar possíveis alvos do miRNA. Essa base utiliza algoritmos disponibilizados pelas principais ferramentas de predição de RNAm-alvos de miRNAs e a sequência 3' UTR de transcritos humanos disponíveis nos bancos de dados de transcriptomas, utilizando diversos critérios como parâmetros para avaliar a possibilidade de interação como por exemplo, a estabilidade termodinâmica e validação experimental observado em literatura (*DIANA-microT*, *miRBase*, *microRNA.org* e *Target Scan*).

6. Modificação transiente de células tumorais

A modificação transiente das células tumorais foi realizada inicialmente na linhagem MDA-MB-468. Posteriormente, para complementar os resultados, também realizamos os experimentos na linhagem MDA-MB-231. O intuito desse ensaio foi inibir a ação do hsa-miRNA-10a-5p (miR-10a), para tanto, foi utilizado o reagente *MirVana miRNA Inhibitors* (Ambion, EUA) miR-10a-5p (Inibidor miR-10a) (Quadro 3), que são pequenas moléculas de RNA fita simples desenhados para se ligar e inibir a atividade de miRNAs endógenos quando introduzidos dentro das células. Dessa forma, possibilitam análises funcionais pela diminuição da função do mesmo. Além disso, foi utilizado um controle negativo da reação que contém uma sequência de nucleotídeos sem homologia com qualquer gene, descrita em mamíferos, e embaralhada (*Ambion*, EUA). O Inibidor miR-10a e o controle negativo foram diluídos separadamente em água *nuclease-free* para obter uma solução de trabalho na concentração de 10 μ M. Foram preparados dois tubos: um contendo 3 μ l de Inibidor/Controle negativo acrescido de 100 μ l de meio de cultivo DMEM sem SFB e 12 μ l de reagente *HiPerfect* (Qiagen, Hilden, Alemanha), ideal para a transfecção, pois permite o carregamento das sequências para o interior das células. A solução de transfecção foi incubada por 10 minutos e adicionada às células plaqueadas para a posterior realização dos experimentos.

Quadro 3. Descrição do *primer* utilizado para transfecção transiente.

<i>hsa-miR-10a-5p</i>	
Objetivo	Inibição
Sequência madura miRNA	UACCCUGUAGAUC CGAAUUUGUG
Stem Loop	GAUCUGUCUGUCUUCUGUAUAUACCCUGUAGAU CCGAAUUUGUGUAAGGAAUUUUGUGGGUCACAA AUUCGUAUCUAGGGGAAUAUGUAGUUGACAU AACACUCCGCUCU

Fonte: miRBase.(139)

7. Grupos experimentais após transfecção

As células das linhagens em estudo foram cultivadas e plaqueadas utilizando a mesma metodologia descrita no item 4.1 e divididas nos grupos experimentais abaixo:

- Grupo Controle: células tratadas com a solução veículo;
- Grupo Melatonina: células tratadas com 1 mM de melatonina;
- Grupo Controle Negativo: transfecção com uma sequência embaralhada (*scramble*);
- Grupo Inibidor miR-10a: transfecção com inibidor do miR-10a.

8. Síntese de cDNA para PCR quantitativo em tempo real

Após os tratamentos, as células foram extraídas conforme descrito no item 4.2 (Extração de RNA total). Para síntese do cDNA, foi utilizado o *kit Taqman microRNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems, Foster, EUA) específico para miRNAs. O *mix* foi preparado por reação, contendo a amostra de RNA extraído em uma concentração de 10 ng/μL, 0,15 μL de dNTPs, 1 μL de *MultiScribe Reverse Transcriptase*, 1,5 μL de *Reverse Transcription Buffer*, 0,19 μL de *RNase Inhibitor*,

4,16 μL de *Nuclease-free water* e 3 μL de sonda específica (*primer*) resultando no volume final de 15 μL . Para gene utilizou-se o *kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription* (*Applied Biosystems*, Foster, EUA) preparado com 2 μL de *RT Buffer*, 0,8 μL de *dNTP Mix*, 2 μL de *RT Random Primers*, 1 μL de *MultiScribe Reverse Transcriptase*, 4,2 μL de *Nuclease-free water*, resultando em um volume final de 10 μL por reação. Para síntese de cDNA dos miRNAs foi usado o termociclador *Mastercycler* (*Eppendorf*, Hamburgo, Alemanha) com ciclos de 16 °C por 30 minutos, 42 °C por 30 minutos, 85° por 5 minutos e então mantidos a 4 °C. Na síntese de cDNA para genes, os ciclos foram programados na temperatura de 25 °C por 10 minutos, 37 °C por 120 minutos e 85 °C por 5 minutos. Ao final da transcrição o cDNA foi estocado em freezer -20 °C para posterior uso.

9. PCR quantitativa em tempo real (q-PCR)

Como foco central do trabalho, avaliamos os níveis de expressão do miRNA-10a nas diferentes linhagens. Para complementar os resultados, avaliamos também o miRNA-10b, pertencente a mesma família do miR-10a e com destaque na literatura científica por apresentar relações como processo metastático.⁽¹⁴⁰⁾ Além disso, verificamos o gene alvo *HOXD10*. Os dados foram avaliados por meio do equipamento de PCR em tempo real *StepOnePlus* (*Applied Biosystems*, Foster, EUA). O *mix* foi preparado com 8 μL de *nuclease-free water*, 10 μL de *TaqMan Universal PCR Master Mix II* (2x), 1 μL do *primer TaqMan Assay* (*Applied Biosystems*, Foster, EUA) e 1 μL do cDNA, resultando em um volume final de 20 μL . As amostras foram distribuídas em placa de 96 poços em triplicata. A amplificação foi obtida nos seguintes ciclos: 50 °C por 2 minutos, 95 °C por 10 minutos e 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 1 minuto. Para normalizar a expressão do miRNA e do RNAm dos genes-alvo em estudo,

foram utilizados os controles endógenos U6 e β -Actina, respectivamente. O nome e os ensaios utilizados constam no Quadro 4. Os níveis de expressão relativa entre as amostras foram calculados pelo método de quantificação em relação à média dos genes normalizadores utilizados como controle endógeno ($2^{-\Delta\Delta C_t}$).⁽¹³⁸⁾

Quadro 4. *Primers* de miRNAs utilizados *TaqMan Assays*.

Nome	Ensaio
hsa-miR-10a-5p	000387
hsa-miR-10b-5p	002218
U6 snRNA	001973
HOXD10	Hs00157974_m1
β -Actina	Hs99999903_m1

10. Ensaio de invasão e migração celular

Para verificar a capacidade de invasão e migração das linhagens triplo-negativas MDA-MB-468 e MDA-MB-231 após tratamentos, foram utilizados insertos *BD Matrigel Invasion Chamber* (BD Biosciences, Bedford, EUA) com membranas de 8 μ m policarbonatas, dispostos em placa de 24 poços. Em cada poço foi adicionado 500 μ L de meio de cultivo completo (10 % de SFB), em seguida os insertos foram posicionados dentro de cada poço. As células foram então, adicionadas ao inserto em uma concentração de $0,8 \times 10^5$ células/inserto em 300 μ L de meio de cultivo incompleto (Figura 9). A placa foi incubada em estufa de CO₂ por 24 horas. Após esse período, os insertos foram retirados da placa, fixados com paraformaldeído 4 % e corados com cristal violeta por 15 minutos para detectar as células migratórias seguida de contagem

com o auxílio de microscópio óptico. O ensaio foi feito em triplicata de cada grupo experimental.

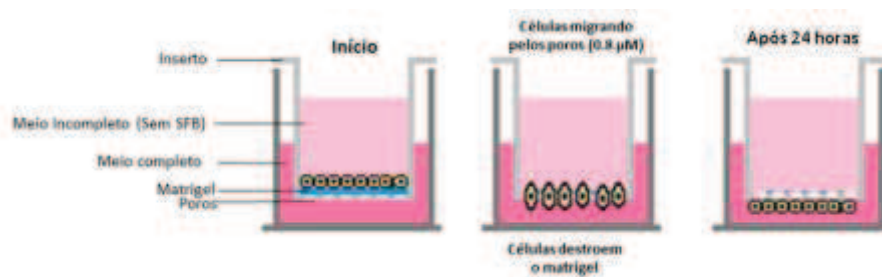


Figura 9. Representação esquemática do ensaio de invasão/migração celular. As células são inseridas na parte superior dos insertos ($0,8 \times 10^5$ células/poços) que contém meio incompleto (sem SFB). Durante o período de incubação, as células destroem o matrigel e migram para o compartimento inferior contendo meio completo (com SFB) através dos poros presentes nos insertos.

11. Expressão proteica por *Western blotting*

A extração proteica foi realizada com tampão de lise contendo 900 μL de NP40, 100 μL de protease e 3,32 μL de inibidor de protease PMSF para cada 1 mL de solução final (*Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA*). As células foram lavadas com PBS, submetidas à lise com 50 μL de tampão por poço, desagregadas e centrifugadas por 20 minutos a 15.000 rpm a 4 °C. O sobrenadante contendo as proteínas foi coletado, seguido da quantificação com o *Micro BCA Protein Assay Kit* (*Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA*) utilizando Albumina Sérica Bovina (BSA) como padrão.⁽¹⁴¹⁾ Para a realização do *Western blotting* foi utilizado 50 μg de proteína. As amostras foram preparadas em solução *sample buffer* contendo β -mercaptoetanol e Laemmil na proporção 1:20, incubadas a 95 °C por 5 minutos e mantidas em gelo para serem aplicadas no gel. O gel foi preparado com poliacrilamida (10 %) e as amostras aplicadas foram separadas por eletroforese com tampão de corrida (100 mL de 10 \times Tris/Glicina/0,1 % SDS e 900 mL

de água ultrapura) em corrente de 120 V por 2 horas. Após a corrida, a membrana PVDF (*BioRad, Hercules, EUA*) foi ativada em metanol por 5 minutos e, em seguida, acondicionada em tampão de transferência (100 mL tampão de corrida a 10× + 200 mL de metanol + 700 mL de água ultrapura) junto ao gel, papéis filtro e esponjas de umidificação. A transferência úmida do gel para a membrana PVDF foi realizada a 100 V por 2 horas com a cuba acondicionada em gelo. Ao término da transferência, as membranas foram lavadas em tampão TBS + 1 % *tween-20* (TBS-T) por 3 vezes de 5 minutos e, em seguida, foi realizado o bloqueio por 1 hora em TBS-T + 5 % BSA. Na sequência, foi feita a incubação com os anticorpos primários previamente selecionados (Quadro 5), diluídos em tampão de bloqueio das membranas e mantidas overnight a 4 °C. As membranas foram lavadas em tampão TBS-T por 3 vezes de 5 minutos e incubadas com anticorpo secundário específico por 1 hora sob agitação em temperatura ambiente. Após, foram lavadas novamente em tampão TBS-T por 4 vezes de 10 minutos e reveladas em substrato quimioluminescente *Clarity Western ECL* (Bio-Rad, Hercules, EUA), sendo visualizadas no aparelho *Fusion Capt Advance*. A expressão proteica foi normalizada pela expressão da proteína β -actina, utilizada como controle interno.

Quadro 5. Anticorpos primários utilizados na técnica de *Western blotting* e suas respectivas diluições.

<i>Anticorpo</i>	<i>Marca</i>	<i>Diluição</i>
β-actina	Sigma-Aldrich	1:5000
Claudina 7	Abcam	1:100
E-caderina	Cell Signaling	1:1000
PI3KCA	Abcam	1:500
Vimentina	Millipore	1:100

12. Análise Estatística

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

III. RESULTADOS

III. RESULTADOS

1. Estabelecimento do cultivo celular

O cultivo das linhagens de câncer de mama MDA-MB-468, MDA-MB-231 e MCF-7 (Figura 10) foi estabelecido apresentando 80-100 % de confluência em 3 a 5 dias de cultivo.

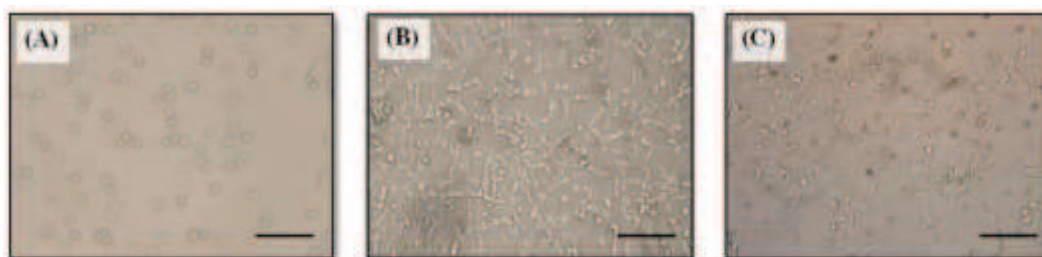


Figura 10. Fotomicrografia de células de linhagens tumorais mamárias humanas. (A) Linhagem MDA-MB-468 de origem epitelial glandular, possuem formato arredondado e formam colônias “cacho de uva”. (B) Linhagem MDA-MB-231 de origem epitelial glandular com formato fusiforme. (C) Linhagem MCF-7 de origem epitelial e forma poligonal. Barra: 100 μ m.

2. Ensaio de viabilidade celular

A viabilidade celular foi calculada para as diferentes concentrações de melatonina em relação ao grupo controle. Os resultados obtidos mostraram que após 24 horas, todas as concentrações reduziram significativamente a viabilidade das células. A concentração de 1 mM escolhida foi a que apresentou os melhores valores estatísticos ($p < 0,0001$) (Figura 11).

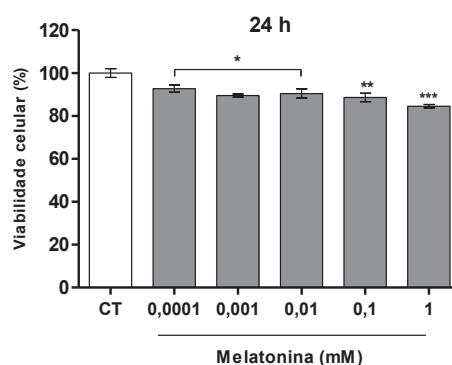


Figura 11. Ensaio de MTT para avaliação da viabilidade das células tumorais MDA-MB-468 após tratamento com melatonina. As células foram tratadas com melatonina em diferentes concentrações e em todas elas este hormônio diminuiu a viabilidade celular. Três experimentos independentes foram realizados em triplicata. Os valores expressam a média \pm o Erro Padrão da Média (S.E.M.). (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ versus Controle). Teste ANOVA *one-way* complementado pelo *post-hoc* de Bonferroni. CT: controle

3. miRNAs diferencialmente expressos

A análise dos miRNAs da linhagem tumoral de mama MDA-MB-468 por *PCR Array* resultou em 13 miRNAs modulados após o tratamento com melatonina (Figura 12). Dentre eles, seis miRNAs foram regulados positivamente (Figura 12-A) let-7c-5p, miR-152-3p, miR-182-5p, miR-202-3p, miR-29b-3p, miR-214-3p e sete miRNAs foram regulados negativamente (Figura 12-B), miR-107, miR-10a-5p, miR-145-5p, miR-15b-5p, miR-20a-5p, miR-429 e miR-7-5p.

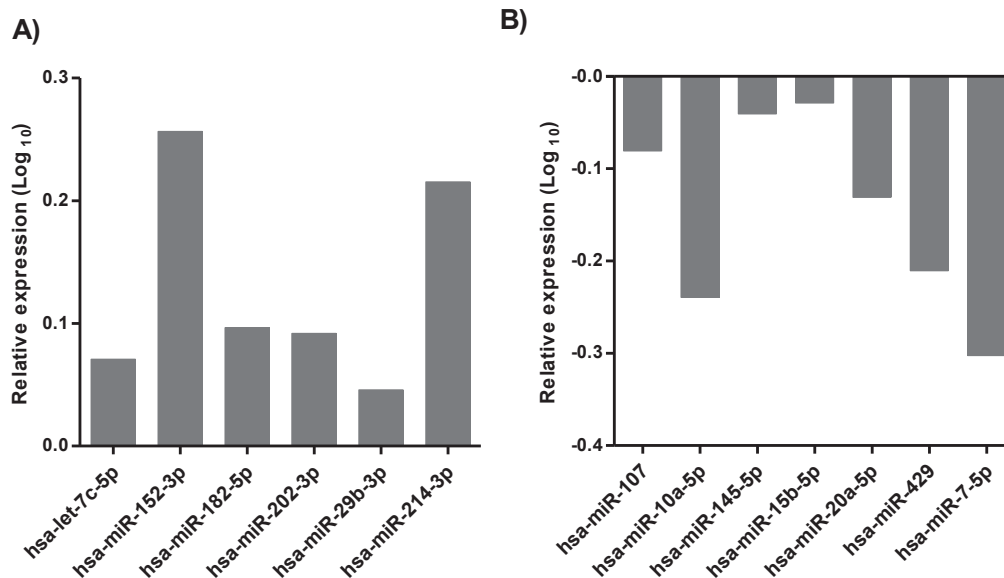


Figura 12. miRNAs diferencialmente expressos em células MDA-MB-468 após tratamento com melatonina (1 mM). O perfil de miRNAs, tratados ou não com melatonina, foi realizado utilizando a placa *RT² Profiler PCR Array Human Breast Cancer*. (A) miRNAs regulados positivamente. (B) miRNAs regulados negativamente. A expressão relativa dos miRNAs foi calculada usando o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Os valores são apresentados em Log_{10} do *fold change*. Os experimentos foram realizados em triplicata.

4. Escolha do miRNA e possível gene alvo

A análise dos resultados obtidos por *PCR array* revelou diminuição nos níveis do miR-10a. Após busca na literatura e em banco de dados, este miRNA foi selecionado para o estudo, considerando seu envolvimento com o processo oncogênico e sua relação com a metástase no câncer de mama.⁽¹⁴⁰⁾ Como já descrito na metodologia, foram utilizados algoritmos de predição para busca de RNAm alvos para o miR-10a. Inicialmente, a análise apontou 20.123 alvos. Alguns alvos foram selecionados pelos melhores *scores* tais como *BTRC*, *HOXD10*, *MAP3K7*, *CLDN7*, *HOXA1*, *CDH1*, *PIK3CA*, *USF2*. A partir desses, selecionamos 5 alvos principais com base na sua função biológica na progressão da tumorigênese, especificamente aqueles que

codificam proteínas importantes no processo de progressão tumoral e metástase, *HOXD10*, *CDH1* (E-caderina), *CLDN7* (claudina 7) e *PIK3CA* foram avaliados. Além disso, verificamos também a expressão de vimentina, uma proteína inversamente correlacionada com a expressão de E-caderina no processo de EMT.

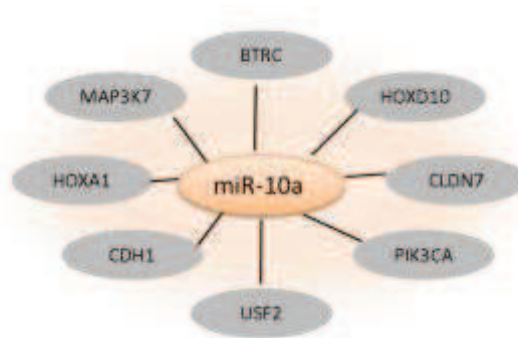


Figura 13. Rede de interação do miR-10a com seus respectivos alvos. Análise obtida por banco de dados de bioinformática utilizando algoritmos de predição de alvos.⁽¹⁴²⁾

5. PCR quantitativa em Tempo Real

5.1. miRNA-10a

Para validar os resultados encontrados no ensaio de *PCR Array*, avaliamos a expressão do miR-10a após 24 horas de tratamento com melatonina. Na linhagem MDA-MB-468 o miR-10a foi modulado negativamente após as células serem tratadas com 1 mM de melatonina (Figura 14-A). Para complementar estes resultados, analisamos a expressão do mesmo miRNA nas linhagens de câncer de mama MDA-MB-231 e MCF-7. Houve modulação dos níveis de expressão do miR-10a na linhagem triplo-negativa MDA-MB-231 (Figura 14-B), na qual o mesmo foi regulado negativamente. Já na linhagem RE positivo MCF-7, a diminuição não foi significativa (Figura 14-C).

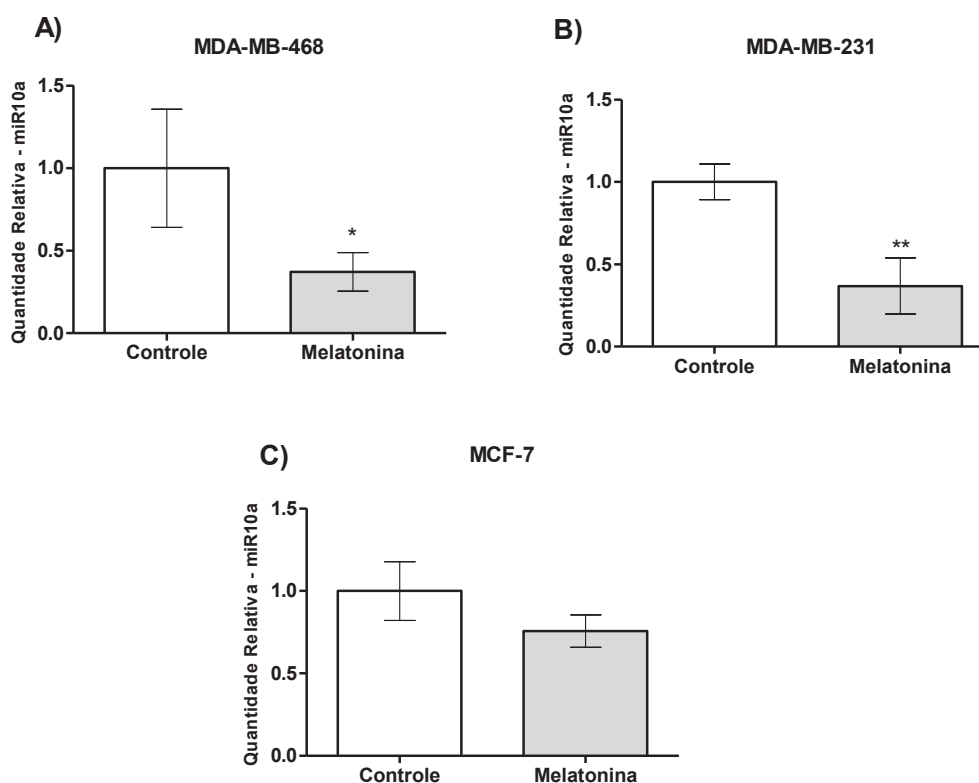


Figura 14. Expressão gênica do miR-10a por PCR em tempo real nas linhagens de câncer de mama após tratamento com melatonina (1 mM). A melatonina diminuiu a expressão do miR-10a nas linhagens triplo-negativas MDA-MB-468 (A) e MDA-MB-231 (B). Na linhagem RE positivo MCF-7, não houve modulação (C). A expressão relativa dos miRNAs foi calculada usando o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Os resultados demonstram a média \pm S.E.M. da triplicata. Os valores representam o *fold change*. (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ versus Controle). Teste t de Student.

5.2. miRNA-10b

Para ampliar nossa investigação em busca de resultados mais consistentes, além de avaliar o miR-10a, avaliamos a expressão relativa do miR-10b após tratamento com melatonina. O miR-10b desempenha significativa contribuição na invasão e capacidade metastática em células de câncer de mama. Seus níveis de expressão são positivamente relacionados com a classificação da doença, estadiamento clínico e desenvolvimento de

metástase.(143) Nas três linhagens MDA-MB-468 (Figura 15-A), MDA-MB-231 (Figura 15-B) e MCF-7 (Figura 15-C) houve modesta modulação nos níveis de expressão do miR-10b, resultado similar ao observado no *PCR Array* (dados não mostrados).

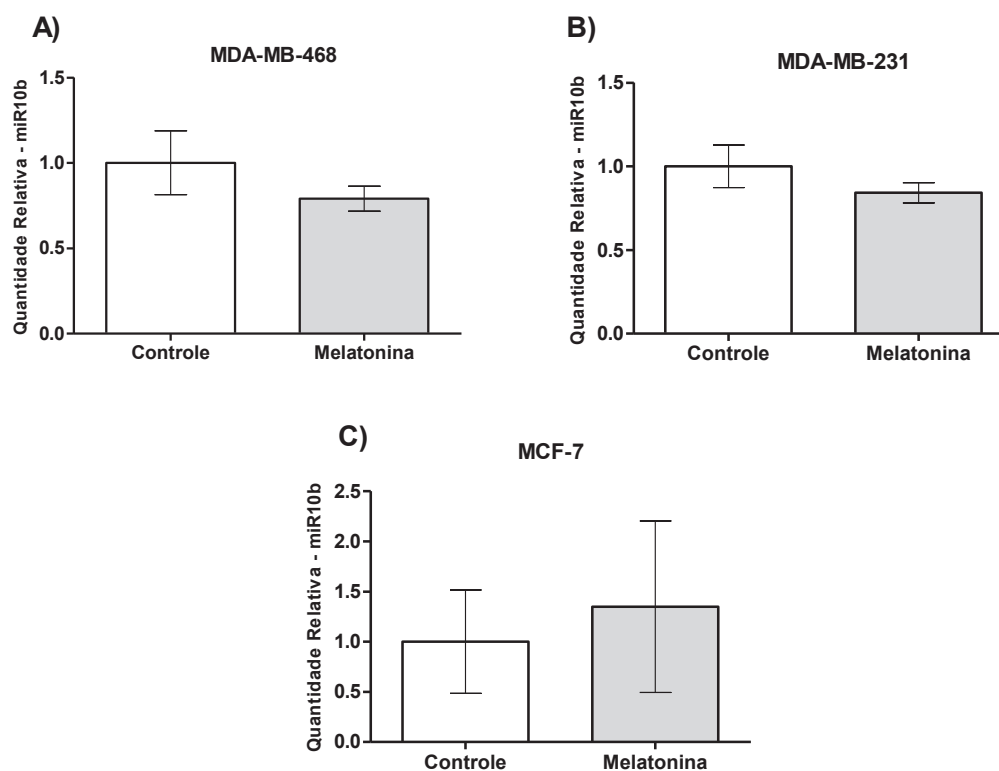


Figura 15. Expressão gênica do miRNA-10b por PCR em tempo real nas linhagens de câncer de mama após tratamento com melatonina (1 mM). (A) Linhagem MDA-MB-468; (B) MDA-MB-231 e (C) MCF-7. Houve modesta modulação do miR-10b pela melatonina nas linhagens. A expressão relativa dos miRNAs foi calculada usando o método $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Os resultados demonstram a média \pm S.E.M. da triplicata. Os valores representam o *fold change*. Teste t de *Student*.

5.3. Gene alvo *HOXD10*

Inicialmente avaliamos a expressão gênica de um gene alvo do miR-10a, o *HOXD10*, confirmado por *scores* no banco de dados *miRDIP*. Além disso, sabe-se que o gene selecionado possui forte relação com o miR-10b,^(83,144,145) assim procuramos avaliar sua expressão nas linhagens estudadas. Na linhagem MDA-MB-468, a expressão de *HOXD10* não foi identificada, pois não houve amplificação deste gene pela técnica de PCR em tempo real (dados não mostrados). Somente nas linhagens MDA-MB-231 e MCF-7 foi possível notar a presença do transcrito *HOXD10* e analisar a sua expressão após 24 horas de tratamento com a melatonina. Como resultado, uma diminuição nos níveis gênicos pôde ser notada em ambas as linhagens (Figura 16).

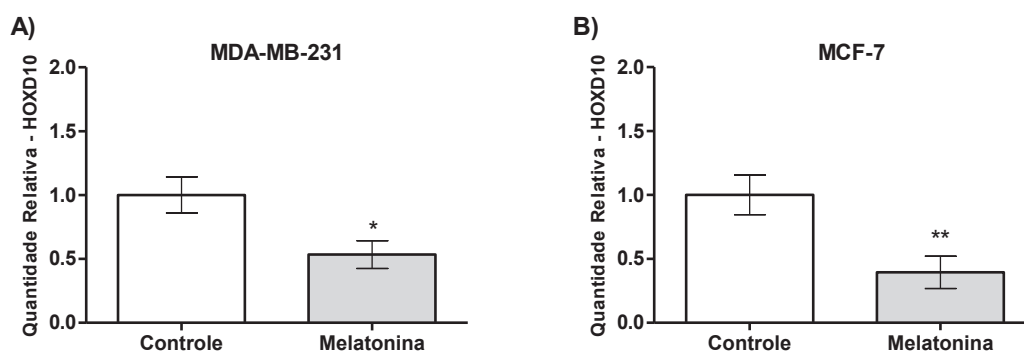


Figura 16. Expressão gênica de *HOXD10* por PCR em tempo real nas linhagens de câncer de mama tratadas com melatonina (1 mM). A melatonina diminuiu a expressão gênica de *HOXD10* após 24 horas de tratamento em ambas as linhagens MDA-MB-231 (A) e MCF-7 (B). A expressão relativa dos miRNAs foi calculada usando o método $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Os resultados demonstram a média \pm S.E.M. da triplicata. Os valores representam o *fold change*. (* $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ versus Controle). Teste t de Student.

6. Modificação transitente das células

Nas células das linhagens triplo-negativas MDA-MB-468 e MDA-MB-231 foi aplicada a técnica de modificação transitente visando inibir a ação do miR-10a. Os resultados iniciais mostraram que a técnica diminuiu consideravelmente os níveis de expressão do miR-10a em ambas linhagens, similar ao resultado encontrado com o tratamento com melatonina (Figura 17-A,B).

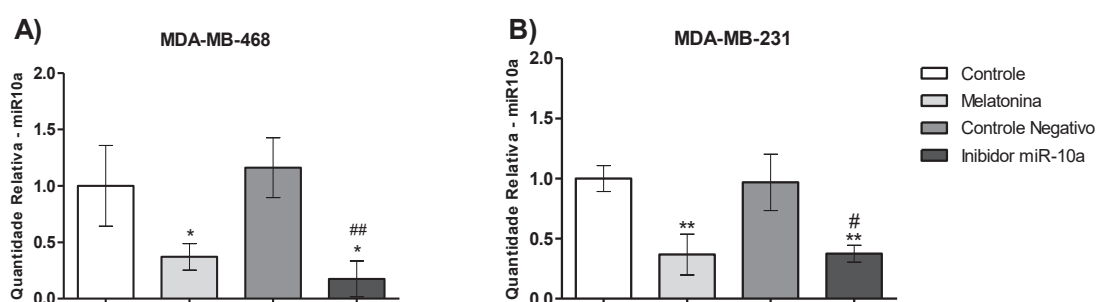


Figura 17. Expressão gênica do miR-10a por PCR em tempo real nas linhagens de câncer de mama triplo-negativo após tratamentos com melatonina (1 mM) e transfecção transitente. (A) Linhagem MDA-MB-468. (B) Linhagem MDA-MB-231. Em ambas as linhagens a melatonina diminuiu os níveis do miR-10a, assim como a inibição. A expressão relativa dos miRNAs foi calculada usando o método $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Os resultados demonstram a média \pm S.E.M. da triplicata. Os valores representam o *fold change*. (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ versus Controle). (# $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ versus Controle Negativo). Teste t de *Student*.

7. Migração e invasão celular

A análise da migração e invasão celular realizada por meio de inserto com matrigel foi realizada nas duas linhagens de câncer de mama triplo-negativo após tratamentos e transfecção. A linhagem MDA-MB-468 mostrou diferença de invasão/migração nos grupos melatonina ($p < 0,001$) e inibidor do miR-10a ($p < 0,05$). Em

ambos a quantidade de células foi inferior aos controles da reação (Figura 18). Na linhagem MDA-MB-231 os resultados revelaram diferença de invasividade nos grupos tratados com melatonina e transfectados com a inibição do miR-10a. Visualmente pôde-se notar que após tratamento com melatonina as células invadiram e migraram bem menos, quando comparadas com o grupo controle ($p < 0,001$). As células com inibição do miR-10a também tiveram uma menor taxa de invasão ($p < 0,05$) (Figura 19).

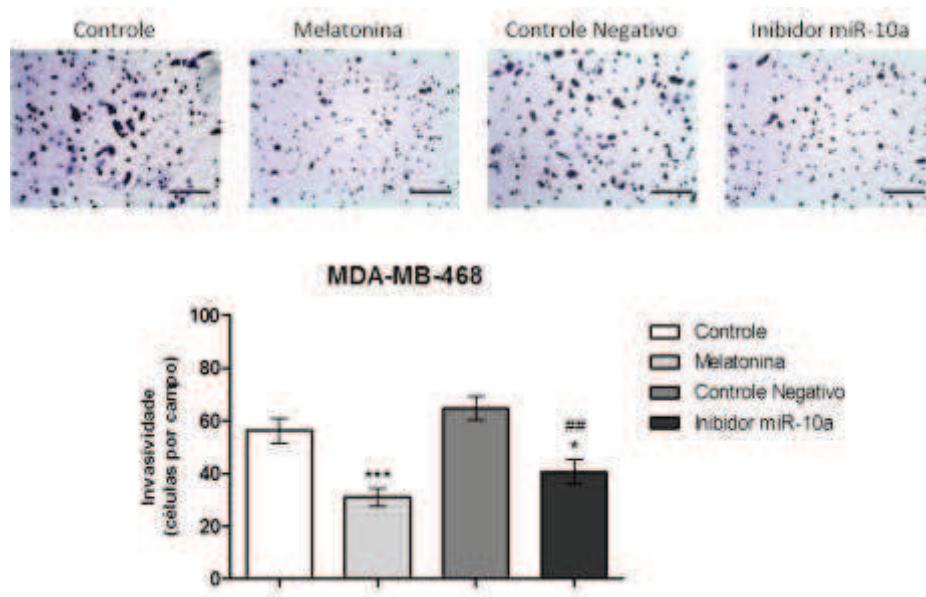


Figura 18. Potencial invasivo das células da linhagem MDA MB-468 após tratamento com 1 mM de melatonina e transfectadas com Inibidor miR-10a. Insetos de invasão com matrigel foram usados. A melatonina e a inibição do miR-10a diminuíram a capacidade de invasão/migração das células. (* $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ versus Controle; ## $p < 0,01$ versus Controle Negativo. Teste t de Student. Barra: 50 μ m.

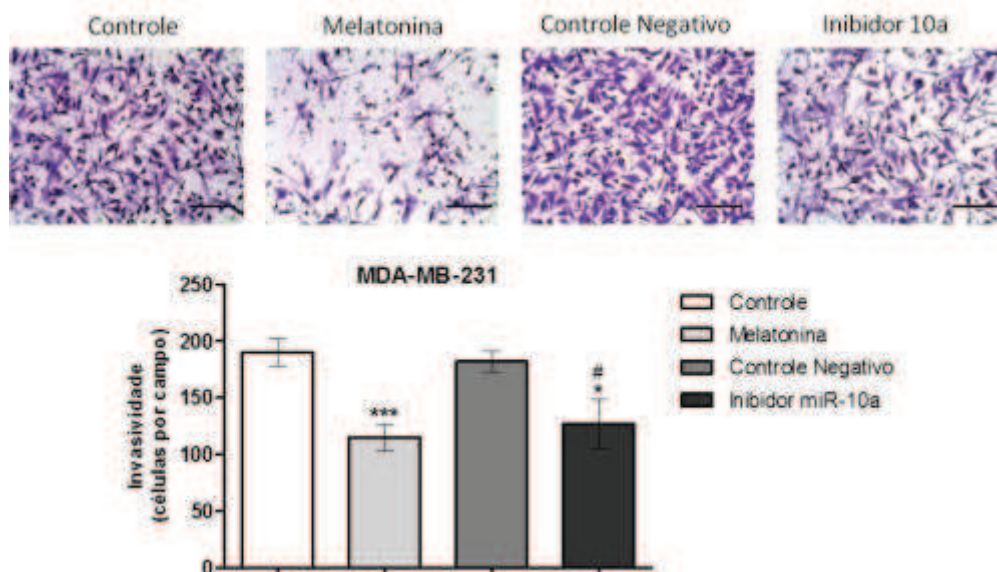


Figura 19. Potencial invasivo das células da linhagem MDA-MB-231 após tratamento com 1 mM de melatonina e transfectadas com Inibidor miR-10a. A melatonina e a inibição do miR-10a diminuíram a capacidade de invasão/migração das células. (* $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ versus Controle; # $p < 0,05$ versus Controle Negativo. Teste t de Student. Barra: 50 μ m.

8. Avaliação proteica por *Western blotting*

Para dar continuidade à investigação de possíveis proteínas envolvidas no processo tumoral e supostamente moduladas pela melatonina e pelo miR-10a, investigamos alvos relacionados ao processo metastático no câncer de mama, pela análise proteica. As linhagens triplo-negativas MDA-MB-468 e MDA-MB-231 foram avaliadas. Verificamos os níveis proteicos de vimentina, E-caderina e claudina 7 como marcadores relacionados ao processo metastático (EMT)⁽¹⁴⁶⁾ e PIK3CA, regulador de crescimento, sobrevivência e motilidade celular.⁽¹⁴³⁾ A quantificação relativa das proteínas mostraram uma diminuição nos níveis de vimentina (Figura 20-A) e claudina 7 (Figura 21-A) e um aumento de E-caderina (Figura 22-A) após o tratamento com melatonina na linhagem MDA-MB-468. A respeito das células com a inibição do miR-10a, foi

possível observar diminuição na expressão de vimentina (Figura 20-A), e nenhuma modulação na expressão de claudina 7 (Figura 21-A) e E-caderina (Figura 22-A) quando comparados aos grupos controles. Na linhagem celular MDA-MB-231 a melatonina e inibição do miR-10a também diminuíram a expressão de vimentina (Figura 20-B) e claudina 7 (Figura 21-B). Os níveis proteicos de E-caderina não puderam ser mensurados pela baixa expressão desta proteína nas células (Figura 22-B). A análise proteica de PIK3CA demonstrou uma diminuição não significativa na sua expressão em células MDA-MB-468 tratadas com melatonina (Figura 23-A). Em relação à linhagem celular MDA-MB-231, não foi possível verificar quantidades suficientes capazes de mensurar a expressão de PIK3CA (Figura 23-B).

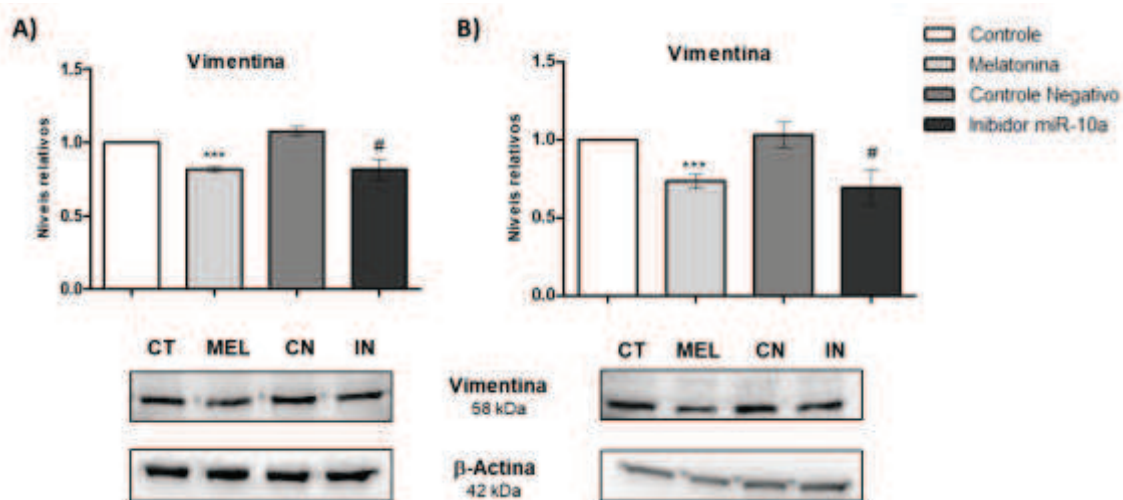


Figura 20. Expressão proteica de vimentina por *Western blotting* em células triplo-negativas. As células foram tratadas com 1 mM de melatonina e transfectadas com Inibidor miR-10a. A melatonina e inibição do miR-10a diminuíram a expressão proteica de vimentina nas linhagens MDA-MB-468 (A) e MDA-MB-231 (B). Dados representam a média \pm S.E.M de três experimentos. (***) $p < 0,001$ versus Controle; # $p < 0,05$ versus Controle Negativo). Teste *t* de *Student*. CT: Controle, MEL: Melatonina, CN: Controle Negativo, IN: Inibidor miR-10a.

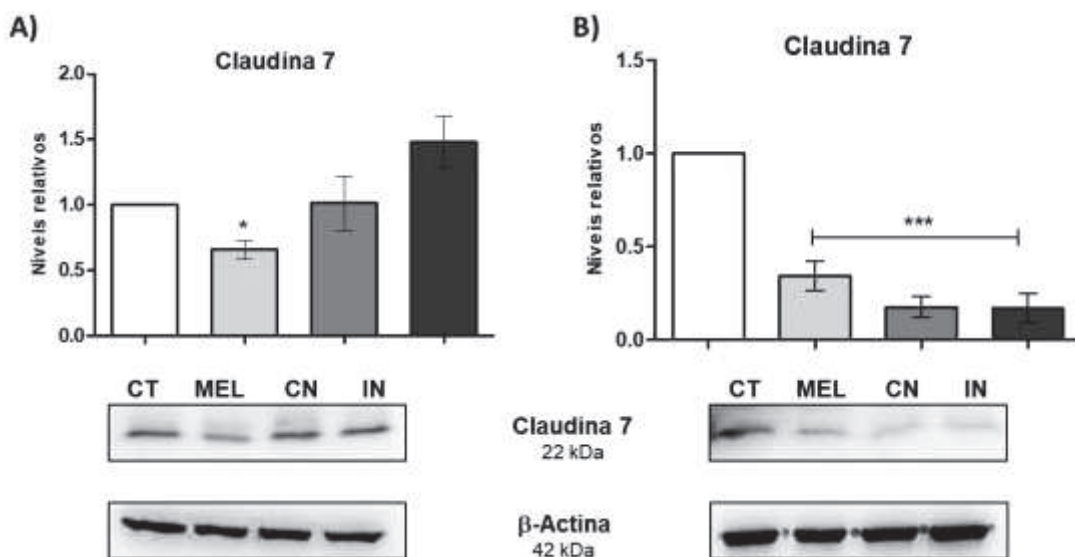


Figura 21. Expressão proteica de claudina 7 por *Western blotting* em células triplo-negativas. As células foram tratadas com 1 mM de melatonina e transfectadas com Inibidor miR-10a. (A) Na linhagem celular MDA-MB-468, a melatonina diminuiu a expressão de claudina 7, enquanto a inibição não alterou. (B) Na linhagem MDA-MB-231, os dados mostram diminuição da claudina pela melatonina e após inibição do miR-10a. Dados representam a média \pm S.E.M. de três experimentos. (***) $p < 0,001$ versus Controle; # $p < 0,05$ versus Controle Negativo). Teste *t* de *Student*. CT: Controle, MEL: Melatonina, CN: Controle Negativo, IN: Inibidor miR-10a.

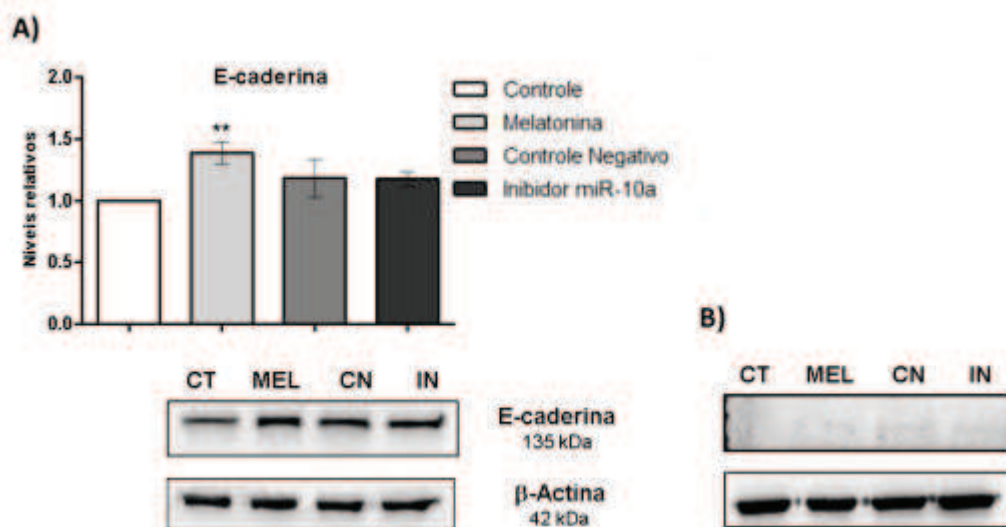


Figura 22. Expressão proteica de E-caderina por *Western blotting* em células triplo-negativas. As células foram tratadas com 1 mM de melatonina e transfectadas com Inibidor miR-10a. (A) Na linhagem MDA-MB-468 a melatonina aumentou os níveis de E-caderina, e a inibição não mostrou alteração na expressão proteica. (B) A linhagem MDA-MB-231 não demonstrou níveis considerados de E-caderina. (** $p < 0,01$ versus Controle). Teste t de *Student*. CT: Controle, MEL: Melatonina, CN: Controle Negativo, IN: Inibidor miR-10a.

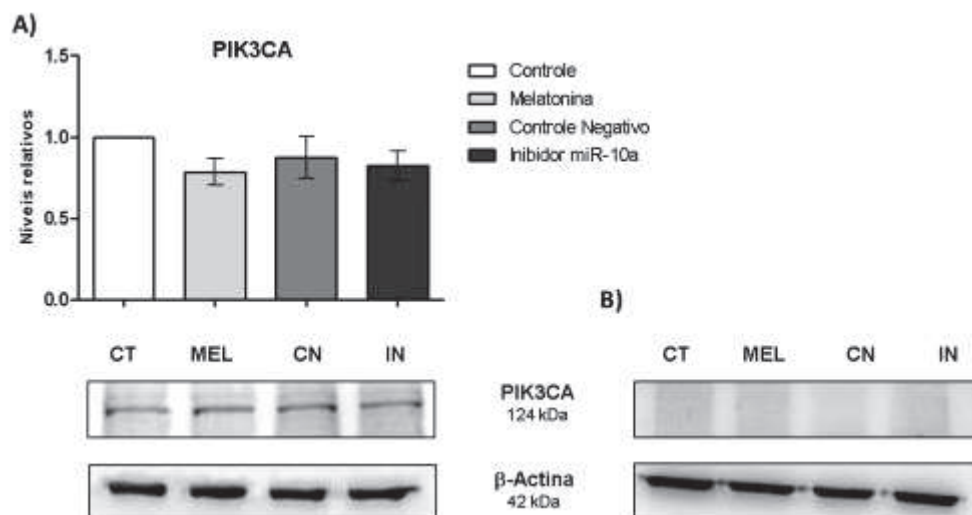


Figura 23. Expressão proteica de PIK3CA por *Western blotting* em células triplo-negativas. As células foram tratadas com 1 mM de melatonina e transfectadas com Inibidor miR-10a. (A) Os níveis de PIK3CA não foram modulados pelos tratamentos na linhagem MDA-MB-468. (B) Na linhagem MDA-MB-231 os níveis de PIK3CA foram insuficientes para quantificação. CT: Controle, MEL: Melatonina, CN: Controle Negativo, IN: Inibidor miR-10a.

IV. DISCUSSÃO

IV. DISCUSSÃO

Nossos resultados demonstram a habilidade terapêutica da melatonina em controlar o processo metastático, regulando a atividade do miR-10a, diminuindo invasão e migração celular e modulando proteínas relacionadas à EMT em linhagens de câncer de mama triplo-negativo. A melatonina regulou negativamente o miR-10a, o que pode estar envolvido com o processo de invasão tumoral. Além disso, de maneira independente do miRNA, foi observada a ação da melatonina na diminuição das proteínas vimentina e claudina 7, e aumento de E-caderina.

Linhagens tumorais triplo-negativas possuem baixa expressão dos receptores de membrana clássicos da melatonina (MT1),⁽¹⁴⁷⁾ demonstrando pouca atividade do hormônio neste tipo tumoral. Nosso grupo tem descrito papel inibitório da melatonina na progressão celular e tumoral.^(123,148,149) Suportados pela sua capacidade em agir nas células independente dos receptores de membrana,⁽¹⁵⁰⁾ evidenciamos que em concentrações farmacológicas (1 mM), a melatonina diminui a viabilidade das células tumorais MDA-MB-468 após 24 horas de tratamento. Similarmente, Marques et al. (2018)⁽¹²³⁾ mostraram a atividade do hormônio na viabilidade das mesmas células após 48 horas de tratamento. Além disso, na linhagem MDA-MB-231, a mesma concentração foi capaz de afetar a sobrevivência das células tumorais.⁽¹⁵¹⁾ A ação da melatonina na viabilidade celular pode estar envolvida com sua habilidade em promover a autofagia das células tumorais (autodestruição).⁽¹⁵²⁾

No presente estudo, demonstramos a ação da melatonina na regulação de treze miRNAs relacionados ao câncer de mama na linhagem MDA-MB-468. Essa indoleamina aumentou miRNAs considerados supressores tumorais como os let-7c, miR-152, miR-214 e miR-29b e diminuiu os considerados oncomiRs, miR-107, miR-

10a, miR-15b e miR-20a. Estes miRNAs estão envolvidos com genes promotores ou inibidores da proliferação celular, indutores de apoptose, angiogênese, migração celular e metástase.^(89,153-159) Esses dados foram recentemente publicados por nosso grupo de pesquisa⁽¹²³⁾ apontando ainda que o aumento do supressor miR-152 pela melatonina diminuiu a expressão de fatores angiogênicos tais como IGF-IR, HIF-1 α e VEGF. Em concordância com nossos achados, alguns estudos demonstraram a regulação de oncomiRs pela melatonina, atuando na inibição dos miR-155 e miR-24, resultando na supressão de invasão, migração e proliferação celular.^(135,160)

O *PCR array* apontou também para resultados inesperados. A expressão do miR-182 foi aumentada e este é considerado um oncomiR, promotor da progressão do câncer de mama.⁽¹⁶¹⁾ Esse hormônio também aumentou o miR-202, um biomarcador de prognóstico ruim no câncer de mama,⁽¹⁶²⁾ apesar deste ter sido descrito recentemente como um supressor em células tumorais mamárias.⁽¹⁶³⁾ Além disso, a melatonina diminuiu os miRNAs miR-145, miR-429 e o miR-7, considerados supressores tumorais.^(164,165) Em discordância com nossos resultados finais, a modulação de miRNAs pela melatonina, nem sempre é positiva, porém não podemos confirmar ações não-benéficas deste hormônio, mas sim propor novos estudos a fim de investigar processos mais avançados em que a melatonina possa estar atuando nos miRNAs e conseqüentemente genes e proteínas envolvidas.⁽²¹⁾ A complexidade dos miRNAs permite que estes possam regular inúmeros genes e vias de sinalização,⁽⁶⁵⁾ podendo também ser regulados por genes e outras moléculas.⁽¹⁶⁶⁾ Os mecanismos desencadeados pela melatonina ainda não são muito claros, os estudos ainda não apontaram fatos comuns de suas ações em tecidos tumorais, e portanto, as ações deste hormônio em miRNAs são consideradas um epifenômeno, devido às desregulações na formação dos

miRNAs envolvendo enzimas de sua biogênese. Dessa forma, a melatonina precisa ser amplamente investigada, desde sua atuação na especificidade dos miRNAs em diferentes tecidos, assim como reconhecer seu envolvimento com a regulação de genes e proteínas promotoras da tumorigênese.

Sabe-se que os miRNAs atuam na regulação gênica principalmente a nível pós-transcricional interferindo na tradução de determinado RNAm.⁽¹⁶⁷⁾ Dessa forma, a identificação de genes-alvo é essencial. Por essa razão, utilizamos métodos de bioinformática para predizer possíveis alvos do miR-10a, e então analisamos suas ações na tumorigênese do câncer de mama. Dentre os alvos preditivos que relacionamos com o desenvolvimento do câncer pelo banco de dados *miRDIP*,⁽¹⁴²⁾ selecionamos o gene *HOXD10* para investigação. Nas análises iniciais a expressão deste gene não foi identificada na linhagem MDA-MB-468, pois não houve amplificação pela técnica de RT-qPCR. Esses dados corroboram a literatura, pois já foi demonstrado que esse gene possui baixa expressão em tumores mamários, principalmente nos tipos mais agressivos.⁽¹⁴⁴⁾ Ao verificarmos *HOXD10* nas linhagens MDA-MB-231 e MCF-7, observamos diminuição da sua expressão em ambas as linhagens após tratamento com melatonina. Considerando os baixos níveis deste gene na linhagem MDA-MB-468, sua investigação foi interrompida, a fim de obtermos resultados mais consistentes.

A fim de verificar a funcionalidade dos alvos preditivos do miR-10a na tumorigênese, e considerando o papel pós-transcricional dos miRNAs na interferência do produto final da tradução, verificamos proteínas relacionadas à progressão tumoral, invasão e metástase. A melatonina pode atuar inibindo miRNAs e consequentemente modulando a expressão de proteínas.⁽¹³⁵⁾ Neste estudo, verificamos que a melatonina diminuiu a expressão do miR-10a nas linhagens MDA-MB-468 e MDA-MB-231 e isso

ocasionou supressão da atividade invasiva e migratória das células. A atuação deste miRNA no processo de metástase já foi sugerido por alguns autores^(90,168) e, apesar de ser considerado um supressor tumoral em um estudo com células de câncer de mama,⁽⁹⁵⁾ neste estudo demonstramos seu papel na promoção tumoral em células triplo-negativas. A alta expressão desse miRNA foi observada no estudo de Ke & Lou (2017)⁽⁹⁵⁾ comparadas com células não tumorais, indicando seu potencial oncogênico. Baixas concentrações desse miRNA em nosso estudo suprimiram o processo de migração e invasão celular, fato que corrobora o estudo de Chang e colaboradores (2014)⁽⁸⁹⁾ que observaram elevadas taxas de invasão e migração na superexpressão do miR-10a. Aliado à ações anti-invasivas da melatonina já descritas em estudos com células tumorais mamárias,^(126,169) é possível suportar a ideia do papel protetor deste hormônio no câncer de mama. Os resultados obtidos com a investigação do miR-10b não mostraram diferenças em sua modulação pela melatonina. Apesar de ser um miRNA de elevada importância no contexto tumoral^(83,87,144) investigamos mais a fundo o papel da melatonina na regulação do miR-10a e sua ação no câncer de mama, o que faz desse estudo inédito.

A modificação das células pela EMT permite elevada capacidade de invasão e migração.⁽²³⁾ Nos resultados deste estudo identificamos um papel supressor da melatonina no processo de EMT atuando em proteínas como a vimentina, claudina 7 e E-caderina. Já é sabido que a melatonina atua no processo metastático e diminui proliferação, afeta EMT, invasão e migração.⁽⁴⁶⁾ Um estudo pioneiro mostrou que a melatonina modulou a expressão de moléculas de aderência e oclusão celular, o que suprimiu a invasividade das células de câncer de mama (MCF-7).⁽¹⁷⁰⁾ Sua ação nesse contexto se deve em parte pela interferência com a cascata de sinalização de NF-kB,

que permite supressão do fenótipo epitelial das células e contribui para o aumento da proteína de citoesqueleto vimentina. Essa proteína mantém o perfil mesenquimal das células tumorais que sofreram transição.⁽¹⁷¹⁾ Aliado a isso, verificamos neste estudo que os baixos níveis do miR-10a e a ação da melatonina foram capazes de diminuir a expressão de vimentina nas linhagens estudadas MDA-MB-468 e MDA-MB-231. Similarmente, Yan e col. (2013) relataram uma diminuição na expressão proteica de vimentina quando o miR-10a foi bloqueado. Corroborando os nossos resultados, Gonçalves e col. (2016), identificaram diminuição nos níveis de vimentina em células tumorais tratadas com melatonina.^(149,172)

Verificamos a ação da melatonina na recuperação da expressão da proteína E-caderina. Esse resultado suporta a ideia do papel protetor que este hormônio exerce no processo metastático. A perda dessa proteína causa diversas alterações na junção celular, permitindo a transição do fenótipo celular que é o estágio inicial para a metástase. Apesar de verificarmos o aumento da E-caderina na linhagem MDA-MB-468, não foi observado o mesmo na MDA-MB-231, pois os níveis proteicos nessa linhagem metastática são baixos, fato notado no estudo de Wang e col. (2015).⁽³⁶⁾ A investigação do miR-10a nessas linhagens não mostrou diferença nos níveis de E-caderina após a inibição do miRNA.

Observamos também a capacidade da melatonina em diminuir os níveis de claudina 7 em ambas as linhagens TNBC. No câncer, as claudinas aparecem por influenciar o prognóstico tumoral, e classificam tumores de pior prognóstico.^(38,41) Apoiados pelos resultados encontrados nos eventos de migração e invasão sugerimos que a baixa expressão da claudina 7 estaria implicando em um melhor cenário. Um estudo recente associou a alta expressão dessa proteína com malignidade do câncer de

mama contribuindo com o avanço da doença.⁽⁴²⁾ Os resultados encontrados com a inibição do miR-10a nos níveis de expressão da proteína claudina 7 revelaram contradição nas duas linhagens estudadas. Enquanto na MDA-MB-468 não foi possível notar diferença estatística entre os grupos, na linhagem MDA-MB-231 a proteína em questão foi negativamente regulada após inibição do miR-10a. Neste contexto, sugerimos que a regulação da claudina 7 pela melatonina ocorra de maneira independente do miR-10a.

Além de investigarmos a ação da melatonina no processo de EMT, investigamos a possível modulação de PIK3CA, uma molécula componente de vias de sinalização que regulam sobrevivência e proliferação e está associada à diversas malignidades, agindo principalmente na promoção da tumorigênese.^(173,174) PIK3CA foi associado alvo do miR-10a no estudo de Ke & Lou (2017),⁽⁹⁵⁾ que identificaram uma diminuição desta molécula pelo miRNA, associado à uma atenuação da proliferação celular. A fim de compararmos os resultados e verificarmos se de fato este miRNA pode ter ações benéficas, analisamos a proteína PIK3CA, no entanto, como mostrado nos resultados, não houve modulação nos níveis desta proteína após tratamentos.

Os resultados observados neste estudo revelam a possível ação da melatonina na regulação do miR-10a e consequente redução da capacidade invasiva e migratória das células. Poucos estudos investigaram a regulação desse hormônio em miRNAs associados à metástase,⁽¹³⁴⁾ dessa forma, nosso trabalho traz algo inédito à literatura e ainda corrobora outros trabalhos que demonstram o potencial terapêutico e protetor da melatonina no cenário do câncer de mama.^(21,107,126,169,175,176)

V. CONCLUSÕES

V. CONCLUSÕES

O presente trabalho permite concluir que:

- A melatonina foi capaz de diminuir a viabilidade das células tumorais mamárias da linhagem MDA-MB-468 em concentrações farmacológicas;
- A melatonina aumenta a expressão de seis miRNAs e diminui a expressão de sete miRNAs relacionados ao câncer de mama na linhagem MDA-MB-468;
- A melatonina diminui a expressão do miR-10a em ambas as linhagens triplo-negativas MDA-MB-468 e MDA-MB-231;
- A melatonina diminuiu os níveis do gene alvo HOXD10 nas linhagens MDA-MB-231 e MCF-7, e não foi expresso na linhagem MDA-MB-468;
- A melatonina atenua o processo de invasão e migração celular em ambas as linhagens MDA-MB-468 e MDA-MB-231;
- A melatonina atua na regulação de proteínas envolvidas com a transição epitélio-mesenquimal, afetando vimentina, claudina 7 e recuperando E-caderina.

Dessa forma, sugerimos o papel deste hormônio na regulação de um miRNA associado à progressão tumoral. Essa diminuição indica possíveis ações envolvidas com o processo metastático por regulação da invasão e migração celular e de proteínas relacionadas à transição epitélio-mesenquimal. Sugerimos ainda que a melatonina possa controlar o processo metastático, via fundamental para a progressão do câncer de mama.

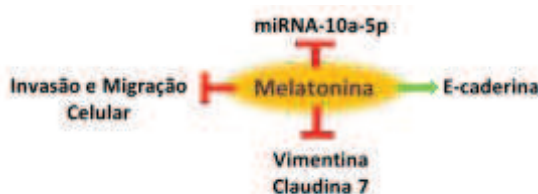


Figura 24. Conclusões propostas de ações da melatonina conforme resultados.

VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. World Health Organization. Cancer fact sheets [Internet]. 2018. Available from: <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>.
2. Wilkes GM. Targeted Therapy: Attacking Cancer with Molecular and Immunological Targeted Agents. *Asia-Pacific J Oncol Nurs* [Internet]. 2018 [cited 2018 Jul 13];5(2):137–55. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29607374>.
3. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* [Internet]. 2011 Mar 4 [cited 2018 Apr 10];144(5):646–74. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21376230>.
4. Alkabban FM, Ferguson T. Cancer, Breast [Internet]. StatPearls. StatPearls Publishing; 2018 [cited 2018 Jun 13]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29493913>.
5. INCA. Incidência de Câncer no Brasil - Estimativa 2018 [Internet]. 2018. Available from: http://www.icabdf.com.br/wp-content/uploads/2017/10/Estimativas_INCA.pdf.
6. Chaffer CL, Weinberg RA. A Perspective on Cancer Cell Metastasis. *Science (80-)* [Internet]. 2011 Mar 25 [cited 2018 Jun 13];331(6024):1559–64. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21436443>.
7. Chen W, Hoffmann AD, Liu H, Liu X. Organotropism: new insights into molecular mechanisms of breast cancer metastasis. *NPJ Precis Oncol* [Internet]. 2018 [cited 2018 Jun 20];2(1):4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29872722>.
8. American Cancer Society | Information and Resources about for Cancer: Breast, Colon, Lung, Prostate, Skin [Internet]. [cited 2018 Jul 13]. Available from: <https://www.cancer.org/>.
9. Stewart BW, Wild C, International Agency for Research on Cancer, World Health Organization. World cancer report 2014 [Internet]. [cited 2018 Jul 13]. 630 p. Available from: <http://publications.iarc.fr/Non-Series-Publications/World-Cancer-Reports/World-Cancer-Report-2014>.
10. Eliyatkin N, Yalçın E, Zengel B, Aktaş S, Vardar E. Molecular Classification of Breast Carcinoma: From Traditional, Old-Fashioned Way to A New Age, and A New Way. *J breast Heal* [Internet]. 2015 Apr [cited 2018 Nov 8];11(2):59–66. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28331693>.
11. Tong CWS, Wu M, Cho WCS, To KKW. Recent Advances in the Treatment of Breast Cancer. *Front Oncol* [Internet]. 2018 [cited 2018 Jul 26];8:227. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29963498>.
12. Voduc KD, Cheang MCU, Tyldesley S, Gelmon K, Nielsen TO, Kennecke H. Breast Cancer Subtypes and the Risk of Local and Regional Relapse. *J Clin Oncol* [Internet]. 2010 Apr 1 [cited 2018 Jul 25];28(10):1684–91. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20194857>.

13. Barros ACS, Leite KRM. Classificação molecular dos carcinomas de mama: uma visão contemporânea Molecular classification of breast cancer: a contemporary view. *Rev Bras Mastol* [Internet]. 2015 [cited 2018 Jul 26];25(4):146–55. Available from: http://www.rbmastologia.com.br/wp-content/uploads/2015/12/MAS-v25n4_146-155.pdf.
14. Srinivasaraghavan V, Strobl J, Agah M. Microelectrode bioimpedance analysis distinguishes basal and claudin-low subtypes of triple negative breast cancer cells. *Biomed Microdevices* [Internet]. 2015 Aug 29 [cited 2018 Jul 26];17(4):80. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26216474>.
15. Chin L, Andersen JN, Futreal PA. Cancer genomics: from discovery science to personalized medicine. *Nat Med* [Internet]. 2011 Mar 1 [cited 2018 Jul 26];17(3):297–303. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21383744>.
16. Reinert T, Barrios CH. Optimal management of hormone receptor positive metastatic breast cancer in 2016. *Ther Adv Med Oncol* [Internet]. 2015 Nov [cited 2018 Jul 26];7(6):304–20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26557899>.
17. Guan X. Cancer metastases: challenges and opportunities. *Acta Pharm Sin B* [Internet]. 2015 Sep [cited 2018 Jun 25];5(5):402–18. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26579471>.
18. Scully OJ, Bay B-H, Yip G, Yu Y. Breast cancer metastasis. *Cancer Genomics Proteomics* [Internet]. 2012 [cited 2018 Jun 25];9(5):311–20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22990110>.
19. Wirtz D, Konstantopoulos K, Searson PC. The physics of cancer: the role of physical interactions and mechanical forces in metastasis. *Nat Rev Cancer* [Internet]. 2011 Jul 1 [cited 2018 Jul 25];11(7):512–22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21701513>.
20. Wu Y, Sarkissyan M, Vadgama J V. Epithelial-Mesenchymal Transition and Breast Cancer. *J Clin Med* [Internet]. 2016 Jan 26 [cited 2018 Jun 23];5(2). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26821054>.
21. Su S-C, Hsieh M-J, Yang W-E, Chung W-H, Reiter RJ, Yang S-F. Cancer metastasis: Mechanisms of inhibition by melatonin. *J Pineal Res* [Internet]. 2017 Jan [cited 2018 Jul 4];62(1):e12370. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/jpi.12370>.
22. Angadi P, Kale A. Epithelial-mesenchymal transition - A fundamental mechanism in cancer progression: An overview. *Indian J Heal Sci* [Internet]. 2015 [cited 2018 Jun 21];8(2):77. Available from: <http://www.ijournalhs.org/text.asp?2015/8/2/77/174233>.
23. Banyard J, Bielenberg DR. The role of EMT and MET in cancer dissemination. *Connect Tissue Res* [Internet]. 2015 [cited 2018 Jul 12];56(5):403–13. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26291767>.
24. Acloque H, Adams MS, Fishwick K, Bronner-Fraser M, Nieto MA. Epithelial-

- mesenchymal transitions: the importance of changing cell state in development and disease. *J Clin Invest* [Internet]. 2009 Jun [cited 2018 Jun 21];119(6):1438–49. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19487820>.
25. Kao S-H, Wu K-J, Lee W-H. Hypoxia, Epithelial-Mesenchymal Transition, and TET-Mediated Epigenetic Changes. *J Clin Med* [Internet]. 2016 Feb 4 [cited 2018 Jul 30];5(2). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26861406>.
 26. Lee K, Nelson CM. New Insights into the Regulation of Epithelial–Mesenchymal Transition and Tissue Fibrosis. In: *International review of cell and molecular biology* [Internet]. 2012 [cited 2018 Jul 27]. p. 171–221. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22364874>.
 27. Hill SM, Belancio VP, Dauchy RT, Xiang S, Brimer S, Mao L, et al. Melatonin: An inhibitor of breast cancer. *Endocr Relat Cancer*. 2015;22(3):R183–204.
 28. Jin X, Mu P. Targeting Breast Cancer Metastasis. *Breast Cancer (Auckl)* [Internet]. 2015 [cited 2018 Jul 4];9(Suppl 1):23–34. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26380552>.
 29. Pećina-Slaus N. Tumor suppressor gene E-cadherin and its role in normal and malignant cells. *Cancer Cell Int* [Internet]. 2003 Oct 14 [cited 2018 Sep 14];3(1):17. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14613514>.
 30. Ma C, Li LX, Zhang Y, Xiang C, Ma T, Ma ZQ, et al. Protective and sensitive effects of melatonin combined with adriamycin on ER+ (estrogen receptor) breast cancer. *Eur J Gynaecol Oncol* [Internet]. 2015 [cited 2018 Jun 21];36(2):197–202. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26050360>.
 31. Lei H, Sjöberg-Margolin S, Salahshor S, Werelius B, Jandáková E, Hemminki K, et al. *CDH1* mutations are present in both ductal and lobular breast cancer, but promoter allelic variants show no detectable breast cancer risk. *Int J Cancer* [Internet]. 2002 Mar 10 [cited 2018 Jul 30];98(2):199–204. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/ijc.10176>.
 32. Lu P, Gu Y, Li L, Wang F, Qiu X. miR-544a Promotes Breast Cancer Cell Migration and Invasion Reducing Cadherin 1 Expression. *Oncol Res Featur Preclin Clin Cancer Ther* [Internet]. 2016 Mar 25 [cited 2018 Jul 30];23(4):165–70. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27053345>.
 33. Pharoah PD, Guilford P, Caldas C, International Gastric Cancer Linkage Consortium. Incidence of gastric cancer and breast cancer in *CDH1* (E-cadherin) mutation carriers from hereditary diffuse gastric cancer families. *Gastroenterology* [Internet]. 2001 Dec [cited 2018 Sep 14];121(6):1348–53. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11729114>.
 34. Wang M, Liu X, Jiang G, Chen H, Guo J, Weng X. Relationship between *LSD1* expression and E-cadherin expression in prostate cancer. *Int Urol Nephrol* [Internet]. 2015 Mar 28 [cited 2018 Sep 14];47(3):485–90. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25627913>.

35. Yang L, Wang X-W, Zhu L-P, Wang H-L, Wang B, Zhao Q, et al. Significance and prognosis of epithelial-cadherin expression in invasive breast carcinoma. *Oncol Lett* [Internet]. 2018 Aug [cited 2018 Jul 30];16(2):1659–65. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30008850>.
36. Wang L, Tang C, Cao H, Li K, Pang X, Zhong L, et al. Activation of IL-8 via PI3K/Akt-dependent pathway is involved in leptin-mediated epithelial-mesenchymal transition in human breast cancer cells. *Cancer Biol Ther* [Internet]. 2015 Aug 3 [cited 2018 Jun 21];16(8):1220–30. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/15384047.2015.1056409>.
37. Phillips S, Kuperwasser C. SLUG: Critical regulator of epithelial cell identity in breast development and cancer. *Cell Adh Migr* [Internet]. 2014 Nov 2 [cited 2018 Sep 14];8(6):578–87. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25482617>.
38. Jääskeläinen A, Soini Y, Jukkola-Vuorinen A, Auvinen P, Haapasaari K-M, Karihtala P. High-level cytoplasmic claudin 3 expression is an independent predictor of poor survival in triple-negative breast cancer. *BMC Cancer* [Internet]. 2018 Dec 27 [cited 2018 Jun 24];18(1):223. Available from: <https://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12885-018-4141-z>.
39. Tabariès S, Siegel PM. The role of claudins in cancer metastasis. *Oncogene* [Internet]. 2017 Mar 15 [cited 2018 Sep 14];36(9):1176–90. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27524421>.
40. Kominsky SL, Argani P, Korz D, Evron E, Raman V, Garrett E, et al. Loss of the tight junction protein claudin-7 correlates with histological grade in both ductal carcinoma in situ and invasive ductal carcinoma of the breast. *Oncogene* [Internet]. 2003 Apr 3 [cited 2018 Jun 24];22(13):2021–33. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12673207>.
41. Lu S, Singh K, Mangray S, Tavares R, Noble L, Resnick MB, et al. Claudin expression in high-grade invasive ductal carcinoma of the breast: correlation with the molecular subtype. *Mod Pathol* [Internet]. 2013 Apr 7 [cited 2018 Jun 24];26(4):485–95. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23222490>.
42. Constantinou C, Papadopoulos S, Karyda E, Alexopoulos A, Agnanti N, Batistatou A, et al. Expression and Clinical Significance of Claudin-7, PDL-1, PTEN, c-Kit, c-Met, c-Myc, ALK, CK5/6, CK17, p53, EGFR, Ki67, p63 in Triple-negative Breast Cancer-A Single Centre Prospective Observational Study. *In Vivo* [Internet]. 2018 Feb 27 [cited 2018 Jun 24];32(2):303–11. Available from: <http://iv.iijournals.org/content/32/2/303.abstract>.
43. Chung B-M, Rotty JD, Coulombe PA. Networking galore: intermediate filaments and cell migration. *Curr Opin Cell Biol* [Internet]. 2013 Oct [cited 2018 Jul 31];25(5):600–12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23886476>.
44. JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J.; ABRAHAMSOHN P. *Histologia básica: texto e atlas*. 13. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2017.

45. Liu C-Y, Lin H-H, Tang M-J, Wang Y-K. Vimentin contributes to epithelial-mesenchymal transition cancer cell mechanics by mediating cytoskeletal organization and focal adhesion maturation. *Oncotarget* [Internet]. 2015 Jun 30 [cited 2018 Jul 31];6(18):15966–83. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25965826>.
46. Reiter R, Rosales-Corral S, Tan D-X, Acuna-Castroviejo D, Qin L, Yang S-F, et al. Melatonin, a Full Service Anti-Cancer Agent: Inhibition of Initiation, Progression and Metastasis. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2017 Apr 17 [cited 2018 Jun 15];18(4):843. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28420185>.
47. Lindsay CR, Le Moulec S, Billiot F, Loriot Y, Ngo-Camus M, Vielh P, et al. Vimentin and Ki67 expression in circulating tumour cells derived from castrate-resistant prostate cancer. *BMC Cancer* [Internet]. 2016 Dec 29 [cited 2018 Dec 18];16(1):168. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26923772>.
48. Tanaka K, Tokunaga E, Inoue Y, Yamashita N, Saeki H, Okano S, et al. Impact of Expression of Vimentin and Axl in Breast Cancer. *Clin Breast Cancer* [Internet]. 2016 Dec [cited 2018 Sep 14];16(6):520–526.e2. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27506606>.
49. Pereira TC. *Introdução ao mundo dos microRNAs*. Ribeirão Preto (SP): Sociedade Brasileira de Genética; 2015. 342 p.
50. Kurisetty VV, Lakshmanaswamy R, Damodaran C. Pathogenic and therapeutic role of miRNAs in breast cancer. *Front Biosci* [Internet]. 2014 [cited 2018 Jul 31];19(1):1–11. Available from: <http://www.bioscience.org/2014/v19/af/4192/list.htm>.
51. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* [Internet]. 2004 Jan 23 [cited 2018 Jul 13];116(2):281–97. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14744438>.
52. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* [Internet]. 1993 Dec 3 [cited 2018 Jul 31];75(5):843–54. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/009286749390529Y>.
53. Wightman B, Ha I, Ruvkun G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell* [Internet]. 1993 Dec 3 [cited 2018 Jul 31];75(5):855–62. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0092867493905304>.
54. Acunzo M, Romano G, Wernicke D, Croce CM. MicroRNA and cancer - A brief overview. *Adv Biol Regul*. 2015;57.
55. Kutanzi KR, Yurchenko O V, Beland FA, Checkhun VF, Pogribny IP. MicroRNA-mediated drug resistance in breast cancer. *Clin Epigenetics* [Internet]. 2011 Aug [cited 2018 Jul 31];2(2):171–85. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21949547>.
56. Winter J, Jung S, Keller S, Gregory RI, Diederichs S. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nat Cell Biol* [Internet].

- 2009 Mar 1 [cited 2018 Jul 31];11(3):228–34. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19255566>.
57. Li C, Gao Y, Zhang K, Chen J, Han S, Feng B, et al. Multiple Roles of MicroRNA-100 in Human Cancer and its Therapeutic Potential. *Cell Physiol Biochem* [Internet]. 2015 [cited 2018 Jul 10];37(6):2143–59. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26606597>.
 58. Pakravan K, Babashah S, Sadeghizadeh M, Mowla SJ, Mossahebi-Mohammadi M, Ataei F, et al. MicroRNA-100 shuttled by mesenchymal stem cell-derived exosomes suppresses in vitro angiogenesis through modulating the mTOR/HIF-1 α /VEGF signaling axis in breast cancer cells. *Cell Oncol* [Internet]. 2017 Oct 24 [cited 2018 Jul 10];40(5):457–70. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28741069>.
 59. Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs — microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer* [Internet]. 2006 Apr 1 [cited 2018 Jul 31];6(4):259–69. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16557279>.
 60. Chen C-Z. MicroRNAs as Oncogenes and Tumor Suppressors. *N Engl J Med* [Internet]. 2005 Oct 27 [cited 2018 Jul 31];353(17):1768–71. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16251533>.
 61. Zhang Y, Yang P, Wang X-F. Microenvironmental regulation of cancer metastasis by miRNAs. *Trends Cell Biol* [Internet]. 2014 Mar [cited 2018 Jul 31];24(3):153–60. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24125906>.
 62. O’Bryan S, Dong S, Mathis JM, Alahari SK. The roles of oncogenic miRNAs and their therapeutic importance in breast cancer. *Eur J Cancer* [Internet]. 2017;72(December):1–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejca.2016.11.004>.
 63. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, et al. Nonlinear partial differential equations and applications: Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2002 Nov 26 [cited 2018 Jul 31];99(24):15524–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12434020>.
 64. He X, Chen J, Zhang Z, Li C, Peng Q, Peng H. The let-7a microRNA protects from growth of lung carcinoma by suppression of k-Ras and c-Myc in nude mice. *J Cancer Res Clin Oncol* [Internet]. 2010 Jul 22 [cited 2018 Jul 31];136(7):1023–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20033209>.
 65. Bertoli G, Cava C, Castiglioni I. MicroRNAs: New Biomarkers for Diagnosis, Prognosis, Therapy Prediction and Therapeutic Tools for Breast Cancer. *Theranostics* [Internet]. 2015 [cited 2018 Jul 13];5(10):1122–43. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26199650>.
 66. Yang J, Zhang Z, Chen C, Liu Y, Si Q, Chuang T-H, et al. MicroRNA-19a-3p inhibits breast cancer progression and metastasis by inducing macrophage

- polarization through downregulated expression of Fra-1 proto-oncogene. *Oncogene* [Internet]. 2014 Jun 8 [cited 2018 Jul 31];33(23):3014–23. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23831570>.
67. Zhang C-M, Zhao J, Deng H-Y. MiR-155 promotes proliferation of human breast cancer MCF-7 cells through targeting tumor protein 53-induced nuclear protein 1. *J Biomed Sci* [Internet]. 2013 Oct 24 [cited 2018 Jul 31];20(1):79. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24152184>.
 68. Korpál M, Lee ES, Hu G, Kang Y. The miR-200 Family Inhibits Epithelial-Mesenchymal Transition and Cancer Cell Migration by Direct Targeting of E-cadherin Transcriptional Repressors *ZEB1* and *ZEB2*. *J Biol Chem* [Internet]. 2008 May 30 [cited 2018 Jul 31];283(22):14910–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18411277>.
 69. Zhang H, Li Y, Lai M. The microRNA network and tumor metastasis. *Oncogene* [Internet]. 2010 Feb 23 [cited 2018 Jul 31];29(7):937–48. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19935707>.
 70. Corcoran C, Friel AM, Duffy MJ, Crown J, O’Driscoll L. Intracellular and Extracellular MicroRNAs in Breast Cancer. *Clin Chem* [Internet]. 2011 Jan 1 [cited 2018 Aug 1];57(1):18–32. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21059829>.
 71. Wang W, Luo Y. MicroRNAs in breast cancer: oncogene and tumor suppressors with clinical potential. *J Zhejiang Univ B* [Internet]. 2015 Jan 11 [cited 2018 Aug 1];16(1):18–31. Available from: <http://link.springer.com/10.1631/jzus.B1400184>.
 72. Wheeler BM, Heimberg AM, Moy VN, Sperling EA, Holstein TW, Heber S, et al. The deep evolution of metazoan microRNAs. *Evol Dev* [Internet]. 2009 Jan [cited 2018 Jul 7];11(1):50–68. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19196333>.
 73. Tehler D, Høyland-Kroghsbo NM, Lund AH. The miR-10 microRNA precursor family. *RNA Biol* [Internet]. 2011 Sep 5 [cited 2018 Jun 19];8(5):728–34. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21881411>.
 74. Hu Y, Zhu Q, Tang L. MiR-99a Antitumor Activity in Human Breast Cancer Cells through Targeting of mTOR Expression. Lebedeva I V., editor. *PLoS One* [Internet]. 2014 Mar 17 [cited 2018 Jul 10];9(3):e92099. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24637915>.
 75. Huang H-G, Luo X, Wu S, Jian B. MiR-99a Inhibits Cell Proliferation and Tumorigenesis through Targeting mTOR in Human Anaplastic Thyroid Cancer. *Asian Pac J Cancer Prev* [Internet]. 2015 [cited 2018 Jul 10];16(12):4937–44. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26163618>.
 76. Yin H, Ma J, Chen L, Piao S, Zhang Y, Zhang S, et al. MiR-99a Enhances the Radiation Sensitivity of Non-Small Cell Lung Cancer by Targeting mTOR. *Cell Physiol Biochem* [Internet]. 2018 [cited 2018 Jul 10];46(2):471–81. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29614485>.
 77. Li W, Chang J, Wang S, Liu X, Peng J, Huang D, et al. miRNA-99b-5p

- suppresses liver metastasis of colorectal cancer by down-regulating mTOR. *Oncotarget* [Internet]. 2015 Sep 15 [cited 2018 Jul 10];6(27):24448–62. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26259252>.
78. Turcatel G, Rubin N, El-Hashash A, Warburton D. MIR-99a and MIR-99b Modulate TGF- β Induced Epithelial to Mesenchymal Plasticity in Normal Murine Mammary Gland Cells. Rishi A, editor. *PLoS One* [Internet]. 2012 Jan 27 [cited 2018 Jul 10];7(1):e31032. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0031032>.
 79. Fan Z, Cui H, Xu X, Lin Z, Zhang X, Kang L, et al. MiR-125a suppresses tumor growth, invasion and metastasis in cervical cancer by targeting STAT3. *Oncotarget* [Internet]. 2015 Sep 22 [cited 2018 Jul 10];6(28):25266–80. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26389681>.
 80. Sasayama T, Nishihara M, Kondoh T, Hosoda K, Kohmura E. MicroRNA-10b is overexpressed in malignant glioma and associated with tumor invasive factors, uPAR and RhoC. *Int J Cancer* [Internet]. 2009 Sep 15 [cited 2018 Jun 22];125(6):1407–13. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/ijc.24522>.
 81. Bloomston M, Frankel WL, Petrocca F, Volinia S, Alder H, Hagan JP, et al. MicroRNA expression patterns to differentiate pancreatic adenocarcinoma from normal pancreas and chronic pancreatitis. *JAMA* [Internet]. 2007 May 2 [cited 2018 Jun 22];297(17):1901–8. Available from: <http://jama.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/jama.297.17.1901>.
 82. Tian Y, Luo A, Cai Y, Su Q, Ding F, Chen H, et al. MicroRNA-10b promotes migration and invasion through KLF4 in human esophageal cancer cell lines. *J Biol Chem* [Internet]. 2010 Mar 12 [cited 2018 Jun 22];285(11):7986–94. Available from: <http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M109.062877>.
 83. Ma L, Teruya-Feldstein J, Weinberg RA. Tumour invasion and metastasis initiated by microRNA-10b in breast cancer. *Nature*. 2007;449:682–8.
 84. Khan S, Wall D, Curran C, Newell J, Kerin MJ, Dwyer RM. MicroRNA-10a is reduced in breast cancer and regulated in part through retinoic acid. *BMC Cancer* [Internet]. 2015 May 2 [cited 2018 Jun 22];15(1):345. Available from: <http://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12885-015-1374-y>.
 85. Lu Y, Wei G, Liu L, Mo Y, Chen Q, Xu L, et al. Direct targeting of MAPK8IP1 by miR-10a-5p is a major mechanism for gastric cancer metastasis. *Oncol Lett* [Internet]. 2017 Mar [cited 2018 Aug 1];13(3):1131–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28454224>.
 86. Xiong G, Huang H, Feng M, Yang G, Zheng S, You L, et al. MiR-10a-5p targets TFAP2C to promote gemcitabine resistance in pancreatic ductal adenocarcinoma. *J Exp Clin Cancer Res* [Internet]. 2018 Apr 3 [cited 2018 Aug 1];37(1):76. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29615098>.
 87. Bi L, Sun L, Jin Z, Zhang S, Shen Z. MicroRNA-10a/b are regulators of myeloid differentiation and acute myeloid leukemia. *Oncol Lett* [Internet]. 2018 Feb 14 [cited 2018 Aug 1];15(4):5611–9. Available from:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29552198>.

88. Son JC, Jeong HO, Park D, No SG, Lee EK, Lee J, et al. miR-10a and miR-204 as a Potential Prognostic Indicator in Low-Grade Gliomas. *Cancer Inform* [Internet]. 2017 Jan 12 [cited 2018 Aug 1];16:117693511770287. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28469392>.
89. Chang C-H, Fan T-C, Yu J-C, Liao G-S, Lin Y-C, Shih AC-C, et al. The prognostic significance of RUNX2 and miR-10a/10b and their inter-relationship in breast cancer. *J Transl Med* [Internet]. 2014 Sep 30 [cited 2018 Jun 20];12(1):257. Available from: <http://translational-medicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12967-014-0257-3>.
90. CHEN W, TANG Z, SUN Y, ZHANG Y, WANG X, SHEN Z, et al. miRNA expression profile in primary gastric cancers and paired lymph node metastases indicates that miR-10a plays a role in metastasis from primary gastric cancer to lymph nodes. *Exp Ther Med* [Internet]. 2012 Feb [cited 2018 Jul 11];3(2):351–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22969895>.
91. Hoppe R, Achinger-Kawecka J, Winter S, Fritz P, Lo W-Y, Schroth W, et al. Increased expression of miR-126 and miR-10a predict prolonged relapse-free time of primary oestrogen receptor-positive breast cancer following tamoxifen treatment. *Eur J Cancer* [Internet]. 2013 Nov [cited 2018 Jul 7];49(17):3598–608. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23968733>.
92. Pérez-Rivas LG, Jerez JM, Carmona R, de Luque V, Vicioso L, Claros MG, et al. A microRNA Signature Associated with Early Recurrence in Breast Cancer. Rocha S, editor. *PLoS One* [Internet]. 2014 Mar 14 [cited 2018 Jul 7];9(3):e91884. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0091884>.
93. Pogribny IP, Filkowski JN, Tryndyak VP, Golubov A, Shpyleva SI, Kovalchuk O. Alterations of microRNAs and their targets are associated with acquired resistance of MCF-7 breast cancer cells to cisplatin. *Int J Cancer* [Internet]. 2010 Oct 15 [cited 2018 Jul 13];127(8):1785–94. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20099276>.
94. Ørom UA, Nielsen FC, Lund AH. MicroRNA-10a binds the 5'UTR of ribosomal protein mRNAs and enhances their translation. *Mol Cell* [Internet]. 2008 May 23 [cited 2018 Jun 21];30(4):460–71. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1097276508003286>.
95. Ke K, Lou T. MicroRNA-10a suppresses breast cancer progression via PI3K/Akt/mTOR pathway. *Oncol Lett* [Internet]. 2017 Nov 14 [cited 2018 Jun 24];14(5):5994–6000. Available from: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/ol.2017.6930>.
96. Cipolla-Neto J, Amaral FG, Afeche SC, Tan DX, Reiter RJ. Melatonin, energy metabolism, and obesity: a review. *J Pineal Res* [Internet]. 2014 May [cited 2018 Sep 16];56(4):371–81. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24654916>.

97. Nooshinfar E, Safaroghli-Azar A, Bashash D, Akbari ME. Melatonin, an inhibitory agent in breast cancer. *Breast Cancer* [Internet]. 2016;1–10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s12282-016-0690-7>.
98. Di Bella G, Mascia F, Gualano L, Di Bella L. Melatonin Anticancer Effects: Review. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2013 Jan 24 [cited 2018 Aug 2];14(2):2410–30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23348932>.
99. Espino J, Pariente JA, Rodríguez AB. Role of melatonin on diabetes-related metabolic disorders. *World J Diabetes* [Internet]. 2011 Jun 15 [cited 2018 Aug 2];2(6):82–91. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21860691>.
100. Ackermann K, Stehle JH. Melatonin Synthesis in the Human Pineal Gland: Advantages, Implications, and Difficulties. *Chronobiol Int* [Internet]. 2006 Jan 7 [cited 2018 Aug 2];23(1–2):369–79. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16687310>.
101. Borjigin J, Samantha Zhang L, Calinescu A-A. Circadian regulation of pineal gland rhythmicity. *Mol Cell Endocrinol* [Internet]. 2012 Feb 5 [cited 2019 Jan 2];349(1):13–9. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0303720711003856?via%3Di> hub.
102. Korf HW, von Gall C. Mice, melatonin and the circadian system. *Mol Cell Endocrinol* [Internet]. 2006 Jun 27 [cited 2018 Aug 2];252(1–2):57–68. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16644097>.
103. Bilu C, Kronfeld-Schor N. Effects of circadian phase and melatonin injection on anxiety-like behavior in nocturnal and diurnal rodents. *Chronobiol Int* [Internet]. 2013 Jul 10 [cited 2018 Aug 2];30(6):828–36. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23750894>.
104. Kleszczynski K, Fischer TW. Melatonin and human skin aging. *Dermatoendocrinol* [Internet]. 2012 Jul 1 [cited 2018 Dec 26];4(3):245–52. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23467217>.
105. Dubocovich ML, Delagrangé P, Krause DN, Sugden D, Cardinali DP, Olcese J. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXV. Nomenclature, classification, and pharmacology of G protein-coupled melatonin receptors. *Pharmacol Rev* [Internet]. 2010 Sep [cited 2018 Jun 20];62(3):343–80. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20605968>.
106. Lai L, Yuan L, Cheng Q, Dong C, Mao L, Hill SM. Alteration of the MT1 melatonin receptor gene and its expression in primary human breast tumors and breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res Treat*. 2009;118(2):293–305.
107. Hill SM, Frasnich T, Shulin Xiang S, Lin Yuan L, Duplessis T, Lulu Mao L. Molecular Mechanisms of Melatonin Anticancer Effects. *Integr Cancer Ther* [Internet]. 2009 Dec 29 [cited 2018 Jul 4];8(4):337–46. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20050373>.
108. del Río B, García Pedrero JM, Martínez-Campa C, Zuazua P, Lazo PS, Ramos S. Melatonin, an endogenous-specific inhibitor of estrogen receptor alpha via

- calmodulin. *J Biol Chem* [Internet]. 2004 Sep 10 [cited 2018 Jun 20];279(37):38294–302. Available from: <http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M403140200>.
109. Sanchez-Barcelo EJ, Mediavilla MD, Alonso-Gonzalez C, Rueda N. Breast cancer therapy based on melatonin. *Recent Pat Endocr Metab Immune Drug Discov* [Internet]. 2012 May [cited 2018 Jun 20];6(2):108–16. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22369716>.
 110. Pozo D, Reiter RJ, Calvo JR, Guerrero JM. Inhibition of cerebellar nitric oxide synthase and cyclic GMP production by melatonin via complex formation with calmodulin. *J Cell Biochem* [Internet]. 1997 Jun 1 [cited 2018 Jun 20];65(3):430–42. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9138098>.
 111. Reiter RJ, Tan D-X, Fuentes-Broto L. Melatonin: A Multitasking Molecule. In: *Progress in brain research* [Internet]. 2010 [cited 2018 Aug 2]. p. 127–51. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20478436>.
 112. Blask DE, Wilson ST, Zalatan F. Physiological melatonin inhibition of human breast cancer cell growth in vitro: evidence for a glutathione-mediated pathway. *Cancer Res* [Internet]. 1997 May 15 [cited 2018 Sep 16];57(10):1909–14. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9157984>.
 113. Keshet-Sitton A, Or-Chen K, Yitzhak S, Tzabary I, Haim A. Can Avoiding Light at Night Reduce the Risk of Breast Cancer? *Integr Cancer Ther* [Internet]. 2015; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26631258>.
 114. Dauchy RT, Xiang S, Mao L, Brimer S, Wren MA, Yuan L, et al. Circadian and melatonin disruption by exposure to light at night drives intrinsic resistance to tamoxifen therapy in breast cancer. *Cancer Res*. 2014;74(15):4099–110.
 115. Blask DE, 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* [Internet]. 2011 Oct [cited 2018 Aug 15];51(3):259–69. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21605163>.
 116. Hill SM, Blask DE, Xiang S, Yuan L, Mao L, Dauchy RT, et al. Melatonin and associated signaling pathways that control normal breast epithelium and breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2011;16(3):235–45.
 117. Cerutti P, Ghosh R, Oya Y, Amstad P. The role of the cellular antioxidant defense in oxidant carcinogenesis. *Environ Health Perspect* [Internet]. 1994 Dec [cited 2018 Aug 2];102 Suppl 10:123–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7705286>.
 118. Karbownik M, Reiter RJ. Antioxidative effects of melatonin in protection against cellular damage caused by ionizing radiation. *Proc Soc Exp Biol Med* [Internet]. 2000 Oct [cited 2018 Aug 2];225(1):9–22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10998194>.

119. Lissoni P, Barni S, Mandalà M, Ardizzioia A, Paolorossi F, Vaghi M, et al. Decreased toxicity and increased efficacy of cancer chemotherapy using the pineal hormone melatonin in metastatic solid tumour patients with poor clinical status. *Eur J Cancer* [Internet]. 1999 Nov [cited 2018 Jul 3];35(12):1688–92. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10674014>.
120. Hill SM, Blask DE. Effects of the pineal hormone melatonin on the proliferation and morphological characteristics of human breast cancer cells (MCF-7) in culture. *Cancer Res* [Internet]. 1988 Nov 1 [cited 2018 Jul 14];48(21):6121–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3167858>.
121. Talib WH. Melatonin and cancer hallmarks [Internet]. Vol. 23, *Molecules*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute; 2018 [cited 2018 Jun 15]. p. 518. Available from: <http://www.mdpi.com/1420-3049/23/3/518>.
122. Lissoni P, Rovelli F, Malugani F, Bucovec R, Conti A, Maestroni GJ. Anti-angiogenic activity of melatonin in advanced cancer patients. *Neuro Endocrinol Lett* [Internet]. 2001 [cited 2018 Aug 10];22(1):45–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11335879>.
123. Marques JHM, Mota AL, Oliveira JG, Lacerda JZ, Stefani JP, Ferreira LC, et al. Melatonin restrains angiogenic factors in triple-negative breast cancer by targeting miR-152-3p: In vivo and in vitro studies. *Life Sci* [Internet]. 2018 Jul 7 [cited 2018 Jul 10]; Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0024320518303898>.
124. León J, Casado J, Jiménez Ruiz SM, Zurita MS, González-Puga C, Rejón JD, et al. Melatonin reduces endothelin-1 expression and secretion in colon cancer cells through the inactivation of FoxO-1 and NF- κ B. *J Pineal Res* [Internet]. 2014 May [cited 2018 Sep 19];56(4):415–26. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24628039>.
125. Rudra DS, Pal U, Maiti NC, Reiter RJ, Swarnakar S. Melatonin inhibits matrix metalloproteinase-9 activity by binding to its active site. *J Pineal Res* [Internet]. 2013 May [cited 2018 Aug 10];54(4):398–405. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23330737>.
126. 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* [Internet]. 2016 Jan [cited 2018 Jun 23];60(1):3–15. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26292662>.
127. Shook D, Keller R. Mechanisms, mechanics and function of epithelial-mesenchymal transitions in early development. *Mech Dev* [Internet]. 2003 Nov [cited 2018 Aug 10];120(11):1351–83. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14623443>.
128. Wu S-M, Lin W-Y, Shen C-C, Pan H-C, Keh-Bin W, Chen Y-C, et al. Melatonin set out to ER stress signaling thwarts epithelial mesenchymal transition and peritoneal dissemination via calpain-mediated C/EBP β and NF κ B cleavage. *J Pineal Res* [Internet]. 2016 Mar [cited 2018 Jun 22];60(2):142–54. Available

from: <http://doi.wiley.com/10.1111/jpi.12295>.

129. Du D, Xu F, Yu L, Zhang C, Lu X, Yuan H, et al. The Tight Junction Protein, Occludin, Regulates the Directional Migration of Epithelial Cells. *Dev Cell* [Internet]. 2010 Jan 19 [cited 2018 Sep 19];18(1):52–63. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1534580709005255>.
130. Mao L, Summers W, Xiang S, Yuan L, Dauchy RT, Reynolds A, et al. Melatonin Represses Metastasis in Her2-Positive Human Breast Cancer Cells by Suppressing RSK2 Expression. *Mol Cancer Res* [Internet]. 2016 [cited 2018 Jun 15];14(11):1159–69. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27535706>.
131. Sohn EJ, Won G, Lee J, Lee S, Kim S. Upregulation of miRNA3195 and miRNA374b Mediates the Anti-Angiogenic Properties of Melatonin in Hypoxic PC-3 Prostate Cancer Cells. *J Cancer* [Internet]. 2015 [cited 2018 Jul 4];6(1):19–28. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25553085>.
132. Zhu C, Huang Q, Zhu H. Melatonin Inhibits the Proliferation of Gastric Cancer Cells Through Regulating the miR-16-5p-Smad3 Pathway. *DNA Cell Biol* [Internet]. 2018 Mar [cited 2018 Jul 15];37(3):244–52. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29359963>.
133. Zhu C, Huang Q, Zhu H. Melatonin Inhibits the Proliferation of Gastric Cancer Cells Through Regulating the miR-16-5p-Smad3 Pathway. *DNA Cell Biol* [Internet]. 2018 Mar [cited 2018 Jul 4];37(3):244–52. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29359963>.
134. Lee SE, Kim SJ, Youn J-P, Hwang SY, Park C-S, Park YS. MicroRNA and gene expression analysis of melatonin-exposed human breast cancer cell lines indicating involvement of the anticancer effect. *J Pineal Res* [Internet]. 2011 Oct [cited 2018 Jun 22];51(3):345–52. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1600-079X.2011.00896.x>.
135. Mori F, Ferraiuolo M, Santoro R, Sacconi A, Goeman F, Pallocca M, et al. Multitargeting activity of miR-24 inhibits long-term melatonin anticancer effects. *Oncotarget* [Internet]. 2016 Apr 12 [cited 2018 Jun 22];7(15). Available from: <http://www.oncotarget.com/fulltext/7978>.
136. Berridge M V., Herst PM, Tan AS. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction. *Biotechnol Annu Rev*. 2005;11:127–52.
137. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983;16(65):55–63.
138. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻($\Delta\Delta C_T$) Method. *Methods*. 2001;25(4):402–8.
139. The University of Manchester. Stem-loop sequence hsa-miR-10-5p [Internet]. [cited 2018 Oct 8]. Available from: <http://www.mirbase.org/cgi->

bin/mature.pl?mature_acc=MIMAT0000253.

140. Wang W, Luo Y. MicroRNAs in breast cancer: oncogene and tumor suppressors with clinical potential. *J Zhejiang Univ Sci B* [Internet]. 2015 Jan [cited 2018 Jul 10];16(1):18–31. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25559952>.
141. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* [Internet]. 1985 Oct [cited 2018 Jul 2];150(1):76–85. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3843705>.
142. Tokar T, Pastrello C, Rossos AEM, Abovsky M, Hauschild A-C, Tsay M, et al. mirDIP 4.1-integrative database of human microRNA target predictions. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2018 Jan 4 [cited 2018 Aug 5];46(D1):D360–70. Available from: <http://academic.oup.com/nar/article/46/D1/D360/4670951>.
143. Guerrero-Zotano A, Mayer IA, Arteaga CL. PI3K/AKT/mTOR: role in breast cancer progression, drug resistance, and treatment. *Cancer Metastasis Rev* [Internet]. 2016 Dec 28 [cited 2018 Mar 29];35(4):515–24. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27896521>.
144. Kim J, Siverly AN, Chen D, Wang M, Yuan Y, Wang Y, et al. Ablation of miR-10b suppresses oncogene-induced mammary tumorigenesis and metastasis and reactivates tumor-suppressive pathways. *Cancer Res*. 2016;76(21):6424–35.
145. Ma L, Reinhardt F, Pan E, Soutschek J, Bhat B, Marcusson EG, et al. Therapeutic silencing of miR-10b inhibits metastasis in a mouse mammary tumor model. *Nat Biotechnol*. 2010;
146. Hugo H, Ackland ML, Blick T, Lawrence MG, Clements JA, Williams ED, et al. Epithelial—mesenchymal and mesenchymal—epithelial transitions in carcinoma progression. *J Cell Physiol* [Internet]. 2007 Nov [cited 2018 Mar 29];213(2):374–83. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17680632>.
147. Mao L, Yuan L, Xiang S, Zeringue SB, Dauchy RT, Blask DE, et al. Molecular deficiency (ies) in MT1 melatonin signaling pathway underlies the melatonin-unresponsive phenotype in MDA- MB-231 human breast cancer cells. *J Pineal Res*. 2014;56(3):246–53.
148. Jardim-Perassi BV, Arbab AS, Ferreira LC, Borin TF, Varma NRS, Iskander ASM, et al. Effect of melatonin on tumor growth and angiogenesis in xenograft model of breast cancer. *PLoS One*. 2014;
149. Gonçalves N do N, Colombo J, Lopes JR, Gelaleti GB, Moschetta MG, Sonehara NM, et al. Effect of Melatonin in Epithelial Mesenchymal Transition Markers and Invasive Properties of Breast Cancer Stem Cells of Canine and Human Cell Lines. *PLoS One* [Internet]. 2016;11(3):e0150407. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0150407>.
150. Hevia D, González-Menéndez P, Quiros-González I, Miar A, Rodríguez-García A, Tan D-X, et al. Melatonin uptake through glucose transporters: a new target for melatonin inhibition of cancer. *J Pineal Res* [Internet]. 2015 Mar [cited 2018

- Jun 20];58(2):234–50. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/jpi.12210>.
151. Jardim-Perassi BV, Arbab AS, Ferreira LC, Borin TF, Varma NRS, Iskander ASM, et al. Effect of melatonin on tumor growth and angiogenesis in xenograft model of breast cancer. *PLoS One*. 2014;9(1):1–11.
 152. Ordoñez R, Fernández A, Prieto-Domínguez N, Martínez L, García-Ruiz C, Fernández-Checa JC, et al. Ceramide metabolism regulates autophagy and apoptotic cell death induced by melatonin in liver cancer cells. *J Pineal Res* [Internet]. 2015 Sep [cited 2018 Jun 22];59(2):178–89. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25975536>.
 153. Liu X, Li J, Qin F, Dai S. miR-152 as a tumor suppressor microRNA: Target recognition and regulation in cancer. *Oncol Lett* [Internet]. 2016 Jun [cited 2018 Aug 4];11(6):3911–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27313716>.
 154. Han H-B, Gu J, Zuo H-J, Chen Z-G, Zhao W, Li M, et al. Let-7c functions as a metastasis suppressor by targeting MMP11 and PBX3 in colorectal cancer. *J Pathol* [Internet]. 2012 Feb [cited 2018 Aug 4];226(3):544–55. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21984339>.
 155. Yi S-J, Li L-L, Tu W-B. MiR-214 negatively regulates proliferation and WNT/ β -catenin signaling in breast cancer. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* [Internet]. 2016 [cited 2018 Aug 4];20(24):5148–54. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28051254>.
 156. Li Y, Cai B, Shen L, Dong Y, Lu Q, Sun S, et al. MiRNA-29b suppresses tumor growth through simultaneously inhibiting angiogenesis and tumorigenesis by targeting Akt3. *Cancer Lett* [Internet]. 2017 Jul 1 [cited 2018 Aug 4];397:111–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28365400>.
 157. Zhang L, Ma P, Sun L, Han Y, Li B, Mi X, et al. MiR-107 down-regulates SIAH1 expression in human breast cancer cells and silencing of miR-107 inhibits tumor growth in a nude mouse model of triple-negative breast cancer. *Mol Carcinog* [Internet]. 2016 May [cited 2018 Aug 4];55(5):768–77. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25851994>.
 158. Kedmi M, Ben-Chetrit N, Körner C, Mancini M, Ben-Moshe NB, Lauriola M, et al. EGF induces microRNAs that target suppressors of cell migration: miR-15b targets *MTSSI* in breast cancer. *Sci Signal* [Internet]. 2015 Mar 17 [cited 2018 Aug 4];8(368):ra29-ra29. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25783158>.
 159. Liu L, He J, Wei X, Wan G, Lao Y, Xu W, et al. MicroRNA-20a-mediated loss of autophagy contributes to breast tumorigenesis by promoting genomic damage and instability. *Oncogene* [Internet]. 2017 Oct 19 [cited 2018 Aug 4];36(42):5874–84. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28628113>.
 160. Gu J, Lu Z, Ji C, Chen Y, Liu Y, Lei Z, et al. Melatonin inhibits proliferation and invasion via repression of miRNA-155 in glioma cells. *Biomed Pharmacother*

- [Internet]. 2017 Sep [cited 2018 Jul 15];93:969–75. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28724215>.
161. Chiang C-H, Chu P-Y, Hou M-F, Hung W-C. MiR-182 promotes proliferation and invasion and elevates the HIF-1 α -VEGF-A axis in breast cancer cells by targeting FBXW7. *Am J Cancer Res* [Internet]. 2016 [cited 2018 Aug 4];6(8):1785–98. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27648365>.
 162. Joosse SA, Müller V, Steinbach B, Pantel K, Schwarzenbach H. Circulating cell-free cancer-testis MAGE-A RNA, BORIS RNA, let-7b and miR-202 in the blood of patients with breast cancer and benign breast diseases. *Br J Cancer* [Internet]. 2014 Aug 1 [cited 2018 Aug 4];111(5):909–17. Available from: <http://www.nature.com/articles/bjc2014360>.
 163. Gao S, Cao C, Dai Q, Chen J, Tu J. miR-202 acts as a potential tumor suppressor in breast cancer. *Oncol Lett* [Internet]. 2018 Jul 16 [cited 2018 Aug 4];16(1):1155–62. Available from: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/ol.2018.8726>.
 164. Cui Y-X, Bradbury R, Flamini V, Wu B, Jordan N, Jiang WG. MicroRNA-7 suppresses the homing and migration potential of human endothelial cells to highly metastatic human breast cancer cells. *Br J Cancer* [Internet]. 2017 Jun 27 [cited 2018 Aug 4];117(1):89–101. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28571043>.
 165. Johannessen C, Moi L, Kiselev Y, Pedersen MI, Dalen SM, Braaten T, et al. Expression and function of the miR-143/145 cluster in vitro and in vivo in human breast cancer. Ahmad A, editor. *PLoS One* [Internet]. 2017 Oct 26 [cited 2018 Aug 4];12(10):e0186658. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0186658>.
 166. Shenouda SK, Alahari SK. MicroRNA function in cancer: oncogene or a tumor suppressor? *Cancer Metastasis Rev* [Internet]. 2009 Dec 14 [cited 2018 Aug 4];28(3–4):369–78. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20012925>.
 167. Obernosterer G, Leuschner PJF, Alenius M, Martinez J. Post-transcriptional regulation of microRNA expression. *RNA* [Internet]. 2006 Jul [cited 2018 Aug 4];12(7):1161–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16738409>.
 168. Weiss FU, Marques IJ, Woltering JM, Vlecken DH, Aghdassi A, Partecke LI, et al. Retinoic Acid Receptor Antagonists Inhibit miR-10a Expression and Block Metastatic Behavior of Pancreatic Cancer. *Gastroenterology* [Internet]. 2009 Dec [cited 2018 Jul 11];137(6):2136–2145.e7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19747919>.
 169. Mao L, Summers W, Xiang S, Yuan L, Dauchy RT, Reynolds A, et al. Melatonin Represses Metastasis in Her2-Positive Human Breast Cancer Cells by Suppressing RSK2 Expression. *Mol Cancer Res* [Internet]. 2016 [cited 2018 May 1];14(11):1159–69. Available from:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27535706>.

170. Cos S, Fernández R, Güézmés A, Sánchez-Barceló EJ. Influence of melatonin on invasive and metastatic properties of MCF-7 human breast cancer cells. *Cancer Res* [Internet]. 1998 Oct 1 [cited 2018 Jun 21];58(19):4383–90. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9766668>.
171. Su S-C, Reiter RJ, Hsiao H-Y, Chung W-H, Yang S-F. Functional Interaction between Melatonin Signaling and Noncoding RNAs. *Trends Endocrinol Metab* [Internet]. 2018 Jun [cited 2018 Jun 15];29(6):435–45. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1043276018300535>.
172. Yan Y, Luo Y-C, Wan H-Y, Wang J, Zhang P-P, Liu M, et al. MicroRNA-10a is involved in the metastatic process by regulating Eph tyrosine kinase receptor A4-mediated epithelial-mesenchymal transition and adhesion in hepatoma cells. *Hepatology* [Internet]. 2013 Feb [cited 2018 Jun 22];57(2):667–77. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/hep.26071>.
173. Renner O, Blanco-Aparicio C, Grassow M, Cañamero M, Leal JFM, Carnero A. Activation of phosphatidylinositol 3-kinase by membrane localization of p110alpha predisposes mammary glands to neoplastic transformation. *Cancer Res* [Internet]. 2008 Dec 1 [cited 2018 Jun 24];68(23):9643–53. Available from: <http://cancerres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/0008-5472.CAN-08-1539>.
174. Kamal A, Lakshma Nayak V, Nagesh N, Vishnuvardhan MVPS, Subba Reddy NV. Benzo[b]furan derivatives induces apoptosis by targeting the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in human breast cancer cells. *Bioorg Chem* [Internet]. 2016 Jun [cited 2018 Jun 24];66:124–31. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27149364>.
175. Kim T-H, Cho S-G. Melatonin-induced KiSS1 expression inhibits triple-negative breast cancer cell invasiveness. *Oncol Lett* [Internet]. 2017 Aug [cited 2018 Jun 15];14(2):2511–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28781689>.
176. Blask DE, Dauchy RT, Sauer LA, Krause JA. Melatonin uptake and growth prevention in rat hepatoma 7288CTC in response to dietary melatonin: melatonin receptor-mediated inhibition of tumor linoleic acid metabolism to the growth signaling molecule 13-hydroxyoctadecadienoic acid and the potential role of phytomelatonin. *Carcinogenesis* [Internet]. 2004 Feb 4 [cited 2018 Jun 20];25(6):951–60. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14754876>.

VII. APÊNDICE

VII. APÊNDICE

Apêndice A: Artigo submetido à publicação na revista *Life Sciences*.

Melatonin down-regulates microRNA-10a and decreases invasion and migration of triple-negative breast cancer cells

Jessica Gisleine de Oliveira^{1,2}; Jéssica Helena de Mora Marques²; Jéssica Zani Lacerda^{2,3}; Livia Carvalho Ferreira²; Debora Aparecida Pires de Campos Zuccari^{1,2,3}.

¹ Graduate Program in Health Science / Faculdade de Medicina de Sao Jose do Rio Preto – FAMERP, Sao Jose do Rio Preto (SP).

² Laboratory of Molecular Research in Cancer - LIMC / Faculdade de Medicina de Sao Jose do Rio Preto - FAMERP, Sao Jose do Rio Preto (SP).

³ Graduate Program in Biosciences / Sao Paulo State University (UNESP), Institute of Biosciences, Humanities and Exact Sciences (IBILCE), Sao Jose do Rio Preto (SP).

* Corresponding author

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

Word count: Abstract - 246, Introduction - 443, Material and Methods - 819, Results - 908, Discussion - 971, Conclusions - 64. **Figure count:** 5.

ABSTRACT:

Aims: Breast cancer metastasis is one of the main factors associated with high mortality rates among women. MicroRNAs (miRNAs) play an important role in gene expression regulation and are associated with the metastatic process in breast cancer. Melatonin, a hormone secreted mainly in the pineal gland, has several oncostatic effects. The aim of this study was to investigate the action of melatonin in the modulation of miRNA-10a-5p and its association with metastasis mechanisms. **Main methods:** We evaluated the effects of melatonin on cell viability in MDA-MB-468 cell line after 24 hours of treatment. MDA-MB-468 and MDA-MB-231 cells were either transfected with inhibition of miR-10a or received a scrambled miRNA sequence as a negative control and treated, or not, with melatonin. Gene expression of miR-10a was verified by real-time PCR. Invasion and migration assay using matrigel inserts were performed. The protein expression was analyzed by Western blotting to quantify the epithelial-mesenchymal transition (EMT) markers (E-cadherin, claudin 7 and vimentin) and proliferation marker (PIK3CA). **Key findings:** Our results showed that 1 mM of melatonin significantly decreased cell viability, and also affected miR-10a expression which suppressed cell invasion and migration. Melatonin reduced vimentin and claudin 7 protein expressions and increased E-cadherin. In contrast, inhibition of miR-10a reduced vimentin and did not modulate claudin 7 and E-cadherin. **Significance:** In general, we demonstrated the effectiveness of melatonin in decreasing miR-10a, affecting invasion and migration, and proteins involved with the EMT process, which supports its potential role in the regulation of metastasis.

Keywords: MicroRNAs, Epithelial-Mesenchymal Transition, Metastasis neoplasm, Pineal Gland, Breast neoplasms.

INTRODUCTION

Breast cancer is one of the major malignancies that affect women. About 1.7 million new cases are diagnosed annually [1]. High mortality rates of this disease are reported mainly due to complications of the metastasis [2,3]. Early diagnosis, the introduction of more effective treatments, and a better quality of life for patients can lead to the decline of cancer-related deaths [4].

Metastasis is a complex process capable of allowing the colonization of tumor cells and the formation of tumors in new sites, distant from the primary tumor [5]. The process involves a series of biological events, such as angiogenesis, cell migration, invasion of the basement membrane and extracellular matrix, penetration of cells into the bloodstream, and finally fixation and tumor growth in another organ [6]. One of the crucial processes for metastasis development is epithelial-mesenchymal transition (EMT), which consists in transition of cellular phenotype with dissociation of the tight-junction, adherents junction and desmosomes, as well as loss of the apical polarity decreasing the cell-cell contact [7,8].

In association with the tumorigenic process, microRNAs (miRNAs) can regulate the expression of genes related to metastasis [9,10]. MiRNAs are small non-coding RNA molecules, containing 18-24 nucleotides, which play an important role in the regulation of gene expression [11]. In breast cancer, oncomicroRNAs (oncomiRs) such as miR-21, miR-155 and miR-125b are deregulated and promote tumor progression [12–15]. Other important miRNAs such as miR-10a and miR-10b, have oncostatic activity and are related to the metastatic process [16,17]. Both miRNAs are encoded by

the *Hox* cluster genes and differ in only one nucleotide, however, their targets and mechanisms of action may be different [18,19].

A large number of studies have demonstrated the efficiency of melatonin in controlling growth and metastasis in lung cancer, glioma and breast cancer [20]. Melatonin (N-acetyl-5-methoxytryptamine) is an indoleamine secreted mainly by the pineal gland according to circadian rhythm. Physiologically, this molecule is involved in the modulation of neuroendocrine axis, lipids and carbohydrates metabolism, circadian rhythm, and oxidative status, among others [21]. In breast cancer, melatonin promotes apoptosis, decreases tumor growth *in vitro* and *in vivo*, attenuates cell proliferation, angiogenesis and, above all, controls metastasis [22–25]. In addition, recent studies have investigated the ability of melatonin to modulate microRNAs [26–32].

In this study, we investigated the role of melatonin in the modulation of miR-10a-5p in triple-negative breast cancer (TNBC) cell lines. In addition, we verified the relation with tumor progression through the analysis of cell proliferation-associated proteins and EMT proteins, which indicate the first steps in the development of metastasis in breast cancer. Our results suggest melatonin has the capacity to regulate the metastatic process by down-regulating miR-10a, invasion/migration and EMT-related proteins.

MATERIAL AND METHODS

Cell culture

This study was performed using TNBC cell lines MDA-MB-468 and MDA-MB-231 (ATCC, Manassas, VA, USA). In addition, MCF-7, luminal A breast cancer cells

were used (ATCC, Manassas, VA, USA). All cell lines were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) with high glucose (4.5 g/L), supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and 1% antibiotic/antimycotic solution containing penicillin and streptomycin (LGC Biotecnologia, Sao Paulo, SP, BR). Cells were maintained at 37°C and 5% CO₂.

MTT assay of cell viability

Cell viability was measured using the MTT assay 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (Vibrant MTT Cell Proliferation Assay Kit - Invitrogen Life Technologies – Eugene, OR, USA). Individual wells (96-well plate) were inoculated with 100 µL of culture medium containing 5×10^4 cells. Cells were incubated in medium supplemented at 2% FBS with different concentrations of melatonin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 0.0001 mM, 0.001 mM, 0.01 mM, 0.1 mM and 1 mM. The control group received only the vehicle solution (1:1 absolute ethanol and Phosphate-buffered saline - PBS). The treatment was maintained for 24 hours, and then 10 µL of MTT solution was added in each well followed by incubation for 1 hour. Subsequently, for solubilization of crystals formed from the metabolism of MTT, 100 µL of the dimethyl sulfoxide (DMSO) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was added and maintained for 10 minutes. The absorbance was measured at 570 nm by ThermoPlate TP-Reader. The percentage of cell viability (%) was calculated for all groups compared to the control sample. Experimental samples were performed in triplicate.

Transient modification of tumor cells

Transient modification was performed using the Ambion MirVana™ miRNA Inhibitor 10a-5p (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, EUA), consisting of small molecules of single-stranded RNA which are designed to bind and inhibit the activity of endogenous miRNA. The scrambled miRNA sequence was used as a negative control. Cells were plated (6-well) and transfected with HiPerfect Transfection Reagent (Qiagen, Hilden, GER).

RNA extraction, reverse transcription, and quantitative PCR real-time (RT-qPCR)

Quantitative real-time PCR was performed to evaluate the gene expression of miR-10a. The cells were plated (6-well) (10 cm² each) and considered 4 groups for each cell line: Control; Melatonin treatment; Negative control; Inhibitor miR-10a. The treatments were performed in triplicate and maintained for 24 hours.

Total RNA samples were extracted from all groups using miRNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, GER) following the manufacturer recommendations. Quantification and RNA quality were evaluated using NanoDrop 2000C Spectrophotometer (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA). For reverse transcription, TaqMan™ MicroRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster, USA) was used as recommended by the manufacturer. qPCR real-time was evaluated by StepOnePlus™ (Applied Biosystems, Foster, CA, USA). Reactions for expression analysis were done with TaqMan™ Universal PCR Master Mix, TaqMan Assay (Applied Biosystems, Foster, CA, USA) and 10 ng cDNA. To normalize miRNA expression, we used

endogenous U6 control. The levels of relative expression between samples were calculated using relative quantification method ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) [33].

Cell invasion and migration assay

To evaluate the invasion and migration capability of cells after treatments, inserts having pores approximately 8 μm in diameter with matrigel were used (BD Biosciences, Bedford, MA, USA). Cells were re-suspended in 300 μL containing 0.8×10^5 cells with incomplete culture medium and arranged in the compartment of each insert. In the lower compartment of plates (24-well), 500 μL of complete culture medium (10% FBS) was added followed by incubation for 24 hours. Then the inserts were fixed with paraformaldehyde 4% and stained with violet crystal. The migratory cells contained in the lower compartment of the insert were counted using Nikon Eclipse E200[®] microscope. The assays were performed in triplicate for each group.

Protein extraction and Western blotting

Protein extraction from tumor cells was performed with lysing buffer containing NP40, protease and PMSF (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and quantified with Micro BCA Protein Assay Kit (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA). Equal amounts of protein (50 μg) were electrophoretically separated on 10 % SDS-PAGE gel and transferred to PVDF membranes (BioRad, Hercules, CA, USA). Membranes were blocked for 1 hour in TBS-T + 5% BSA. Then, membrane was incubated with primary antibodies vimentin (1:100 - Millipore, MA, USA); PIK3CA (1:500 - Abcam, Cambridge, UK); claudin 7 (1:100 - Abcam, Cambridge, UK); E-cadherin (1:1000-Cell Signaling, Danvers, USA) and β -actin (1:5000 - Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

overnight at 4°C. Specific secondary antibody was added, incubated for 1 hour at room temperature and visualized by enhanced chemiluminescence Clarity Western ECL substrate (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) for visualization on Fusion Capt Advance apparatus. At the end, quantification was verified using IMAGE J® software.

Statistical analyses

The results have been previously submitted to descriptive analysis to determine normality. Comparison between groups was performed by Student's t-test or Analysis of Variance (ANOVA) followed by the Bonferroni test. Data express the mean \pm Standard Error of the Mean (SEM). Values of $p \leq 0.05$ were considered significant, and analyses were verified using GraphPad Prism 5 software (GraphPad Software, Inc., San Diego, USA).

RESULTS

Melatonin decreases cell viability

In order to determine the most effective melatonin concentration for MDA-MB-468 cells, the MTT colorimetric assay was performed. As shown in **Fig. 1**, all concentrations of melatonin were able to decrease cell viability. However, the pharmacological concentration of 1 mM showed the best statistical values compared to control cells.

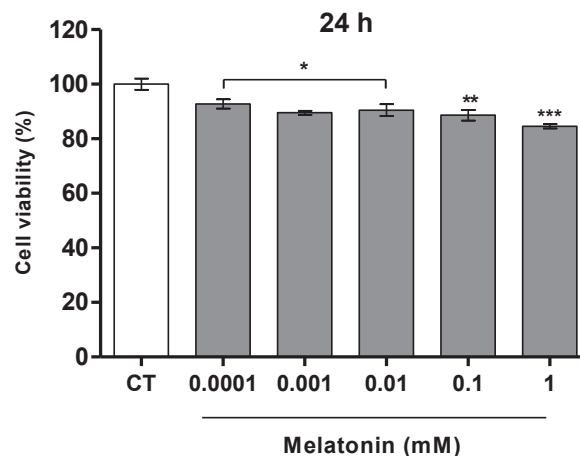


Figure 1. Melatonin affects MDA-MB-468 cell viability. The cells were treated for 24 hours with the different concentrations of melatonin or vehicle. MTT assay was performed and all concentrations decreased cell viability when compared to the control group. The 1 mM concentration presented the best statistical values. Data are shown as mean \pm SEM of triplicate (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$ versus CT: control group) (ANOVA oneway and *post hoc* Bonferroni). (Single column)

Melatonin down-regulates miR-10a in triple-negative breast cancer cell lines

To investigate the actions of melatonin on miR-10a in breast cancer tumor cells, we evaluated its expression by RT-qPCR. In both triple-negative cell lines MDA-MB-468 and MDA-MB-231, miR-10a was significantly down-regulated after melatonin treatment (**Fig. 2A,B**). In MCF-7 cells, it was possible to observe a modest decrease of miR-10a on the same concentration, but it was not significant statistically (**Fig. 2C**). In addition, one of the miR-10 family members, the miR-10b, was also analyzed in order to observe if melatonin could regulate its expression. The analysis showed no difference in miR-10b expression after melatonin treatment (**Fig. 2D**). According to results, only miR-10a was selected for further investigation. Then, both TNBC cells were transiently transfected with Inhibitor miR-10a, and all groups were used for comparisons.

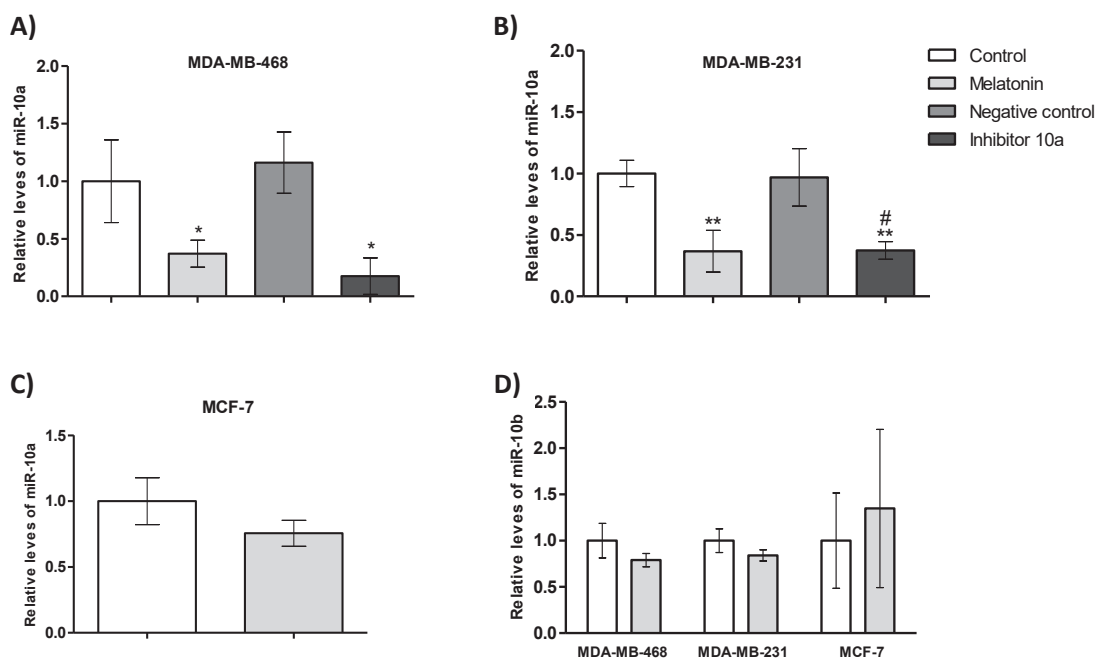


Figure 2. Melatonin decreases miR-10a in triple-negative cell lines. All breast cancer cell lines were treated with melatonin (1mM). TNBC cells were transfected with Inhibitor miR-10a or Negative control. Relative levels of miR-10a and miR-10b expression were verified by RT-qPCR. The treatment reveals that melatonin decreased miR-10a in TNBC cells (A) and (B). (C) A no significant statistically decrease of miR-10a was observed in MCF-7 cells. (D) No difference in miR-10b expression in breast cancer cell lines. The data were determined on a log₂ scale, since fold change varies with mean of Ct \pm SEM in triplicate (*p<0.05, **p<0.01 versus control group; #p<0.05 versus negative control) (Student's t-test). (1.5 column)

Melatonin and miR-10a suppression impairs invasion and migration

To investigate the potential role of melatonin and miR-10a on TNBC cell lines, invasion and migration assay was performed. The data showed that melatonin affected cell invasion and migration in both MDA-MB-468 and MDA-MB-231 cell lines. Besides that, as expected, low levels of miR-10a impaired invasion and migration of cells, when compared with the control group (Fig. 3A,B).

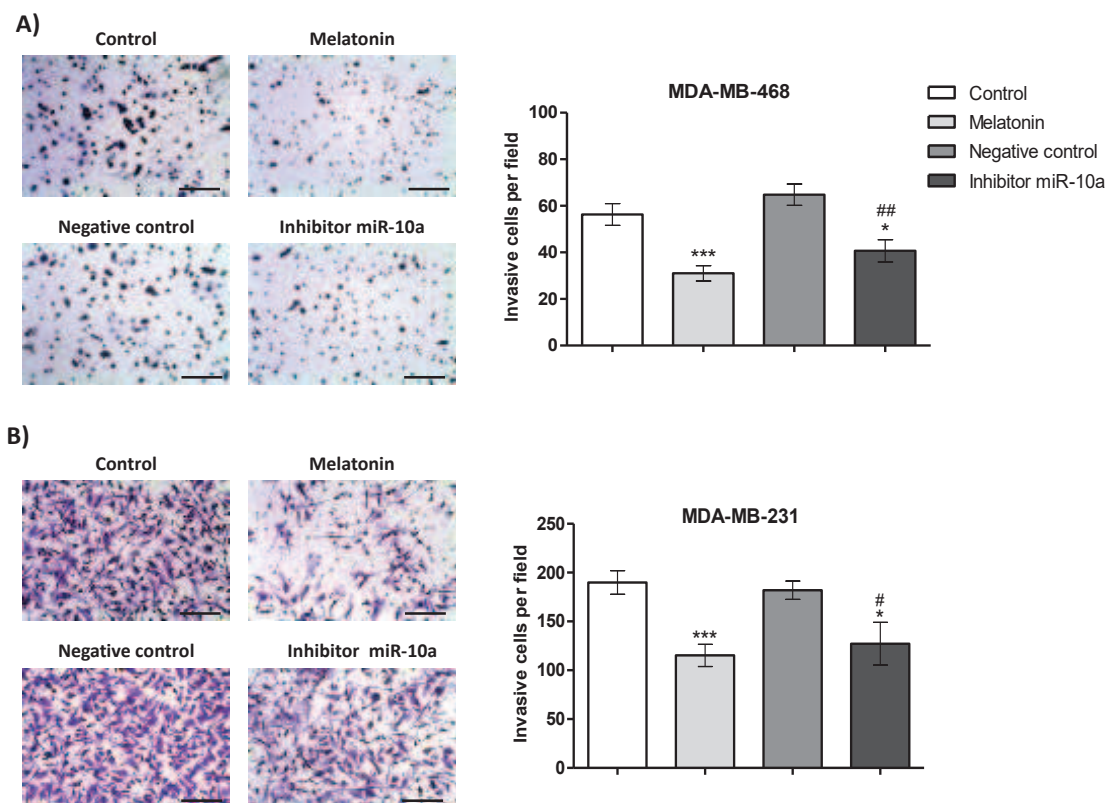


Figure 3. Melatonin and Inhibitor miR-10a reduces invasion and migration. MDA-MB-468 (A) and MDA-MB-231 (B) cells were treated with melatonin or transfected with Inhibitor miR-10 for 24 h and subjected to matrigel invasion assays. Histograms represent cell invasion/migration rate. Data are shown as mean \pm SEM in triplicate (* p <0.05, *** p <0.001 *versus* control; ## p <0.01 *versus* negative control) (Student's *t*-test). Scale bars: 50 μ m. (1.5 column)

Melatonin and Inhibitor miR-10a modulate EMT-related proteins

To investigate the influence of melatonin and miR-10a, we evaluated protein expression related to epithelial-mesenchymal transition by Western blotting. The protein levels of vimentin, E-cadherin and claudin 7 were verified in MDA-MB-468 and MDA-MB-231 cell lines. The relative quantification of proteins showed a decrease of vimentin, claudin 7 and an increase of E-cadherin after melatonin treatment in MDA-MB-468 cells. Regarding cells showing Inhibitor miR-10a, it was possible to observe a decrease of vimentin expression, but not modulation of claudin 7 and E-cadherin when

compared with control groups (Fig. 4A,C). In MDA-MB-231 cell line (Fig. 4B,D), the melatonin and Inhibitor miR-10a also decreased the protein vimentin and claudin 7. The protein levels of E-cadherin could not be measured because of the low expression of this protein in cells.

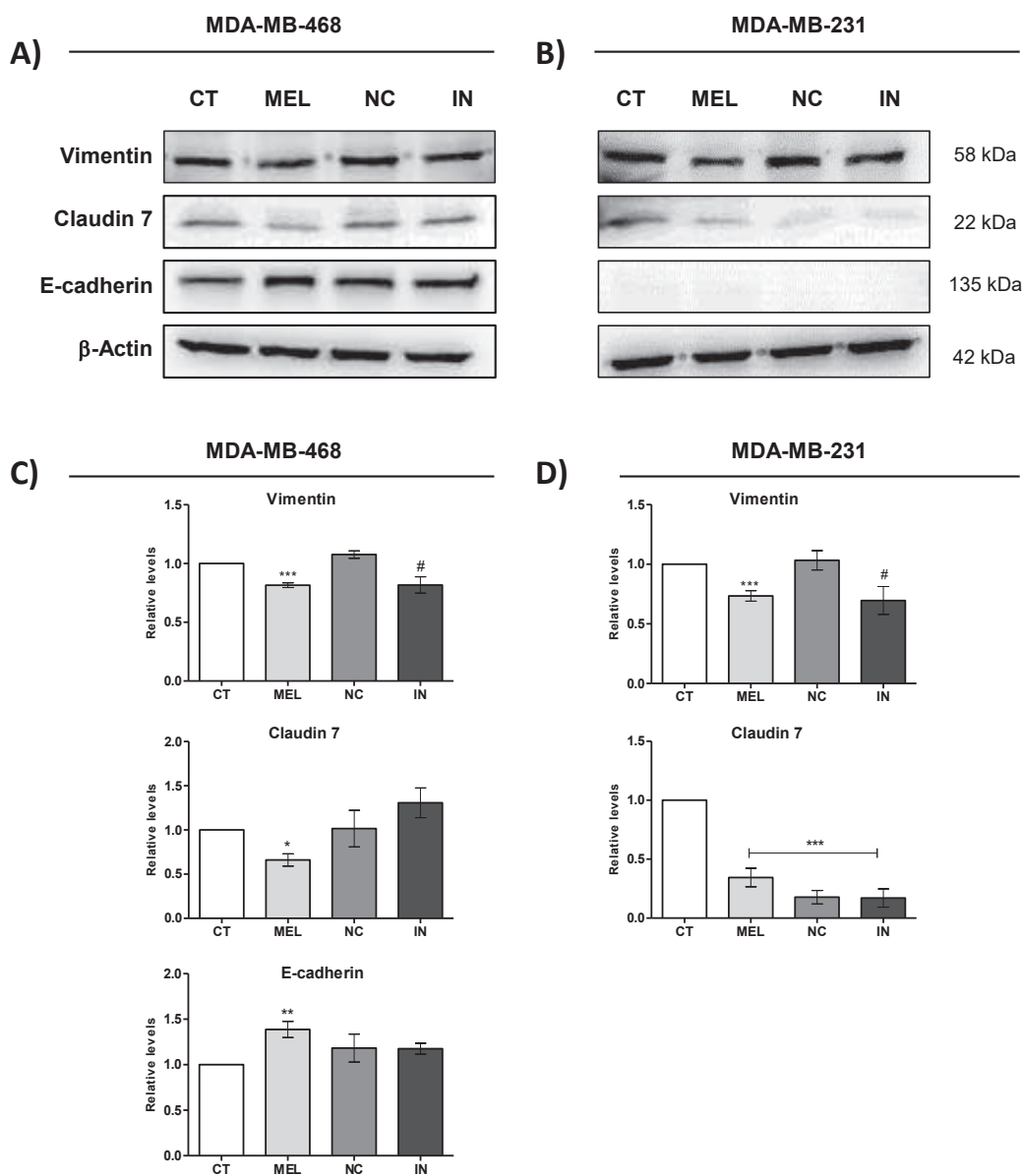


Figure 4. Melatonin and Inhibitor miR-10a modulate EMT-related proteins. MDA-MB-468 and MDA-MB-231 cells were treated with melatonin for 24 h or transfected with Inhibitor miR-10a, the extracted proteins were subjected to Western Blotting with the indicated antibodies. Protein expression was quantified by ImageJ program, calculated relative to controls and normalized with the endogenous β -Actin. Blots and bar graphs show protein expression of vimentin, claudin 7 and E-cadherin in MDA-MB-468 (A,B)

and MDA-MB-231 cells (C,D). Data represent the mean \pm SEM of three independent experiments (** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ versus control; # $p < 0.05$ versus negative control) (ANOVA oneway and *post hoc* Bonferroni). CT: Control, MEL: Melatonin, NC: Negative Control, IN: Inhibitor miR-10a. (1.5 column)

In additional, we evaluated protein expression of PIK3CA, considered a potential target of miR-10a and which correlates with survival and proliferation. The data demonstrated a tiny, but not significant, decrease of PIK3CA protein expression on MDA-MB-468 cells treated with melatonin (**Fig. 5A**). The same was observed on cells with Inhibitor miR-10a. Regarding MDA-MB-231 cells, it was not possible to verify the presence of PIK3CA expression (**Fig. 5B**).

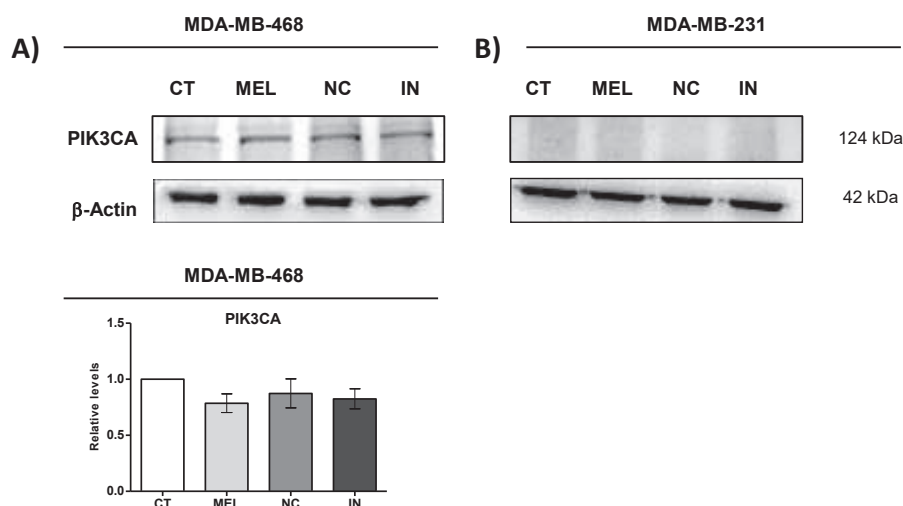


Figure 5. Melatonin demonstrated a tiny decrease in PIK3CA expression. MDA-MB-468 and MDA-MB-231 cells were treated with melatonin for 24 h or transfected with Inhibitor miR-10a, the extracted proteins were subjected to Western Blotting with the indicated antibody. Protein expression was quantified by ImageJ program, calculated relative to controls and normalized with the endogenous β -Actin. Blots and bar graphs show protein expression of PIK3CA in MDA-MB-468 (A) and MDA-MB-231 cells (B). Data represent the mean \pm SEM of three independent experiments. (ANOVA oneway and *post hoc* Bonferroni). CT: Control, MEL: Melatonin, NC: Negative Control, IN: Inhibitor miR-10a. (1.5 column)

DISCUSSION

The potential therapeutic use of melatonin as an antitumor agent has been demonstrated by several studies [24,34,35]. The actions of this hormone reveal regulation in controlling the growth of some human breast tumors [36]. Our results demonstrated the ability of melatonin to control the metastatic process regulating miR-10a activity, decreasing invasion and cell migration, and modulating EMT-related proteins in TNBC cell lines. Melatonin down-regulates miR-10a, which may be involved in the tumor invasion process. In addition, we observed the action of melatonin in decreasing vimentin and claudin 7 proteins, and increasing E-cadherin. According to the literature, this hormone regulates the proliferation of mammary tumor cells, angiogenesis-promoting proteins, and reduces breast cancer tumors in xenographic model [37–39]. Melatonin also acts in metastasis control [22] and decreases the ability of tumor cells to invade and migrate [40].

Melatonin acts in cancer cells mainly through their membrane receptors MT1 and MT2 [41]. Both ER-positive and ER-negative cells express these receptors; ER-positive cells are characterized by high levels of MT1 and are the subject of several scientific studies demonstrating melatonin action through the classical pathway of membrane receptors [34,36]. In ER-negative cells the action of melatonin has been associated with its lipophilic nature, which allows its passage through cell membrane and interaction with several cytoplasmic molecules and transcription factors present in the nucleus of cells [34,42].

Relevantly, we observed that a pharmacological concentration of melatonin (1mM) decreased the viability of ER-negative MDA-MB-468 cells in 24 hours of treatment. Corroborating our results, Mao and collaborators [43] studied the activity of

melatonin in ER-negative cell line SK-BR-3 and verified a reduction in cell viability. Our group has demonstrated that this indoleamine affects cell viability of ER-positive MCF-7 and triple negative MDA-MB-231 and MDA-MB-468 cells after 24 and 48 hours of treatment, respectively [28,37,44]. Similar studies have explained this action on the promotion of the cells autophagy, as a consequence, the apoptosis ability is recovered [45].

Recently, our group demonstrated thirteen melatonin-modulated miRNAs in breast cancer cell line MDA-MB-468 [28]. Among them, we observed a significant decrease of miR-10a after melatonin treatment. High expression of this miRNA is described in metastatic TNBC cell lines compared with non-tumoral cells [46]. Its action may be related to tumor progression, invasion and metastasis [47]. There are no studies demonstrating the action of melatonin on the regulation of miR-10a. Thus, in order to investigate its role in breast cancer, we suppressed miR-10a expression by transient transfection in triple-negative cell lines. Our results revealed that melatonin and inhibition of miR-10a decreased invasion and migration of tumor cells.

In other tumor types, it has already been observed that miR-10a may act on adhesion molecules located on the cell surface, directly impacting the invasiveness and metastatic behavior [48,49]. In breast cancer, contradictory functions of miR-10a are demonstrated [47,50]. As a suppressor, low levels of this miRNA have been reported in patients with breast cancer, and high levels were related to longer relapse-free survival [50–52]. On the other hand, as a oncomiR, this miRNA was found to be highly expressed in cells resistant to chemotherapy [53], and this may induce colony formation, and invasion and migration of the cells [47,54]. We also investigated the miR-10b, which is deregulated in some cancers, including metastatic breast cancer [55–

59]. However, our results showed no differences in melatonin modulation of miR-10b in breast cancer cells.

Besides observing that melatonin treatment reduced invasive and migratory capacity in both triple-negative cells MDA-MB-468 and MDA-MB-231, in this study we verified the same result when miR-10a was suppressed in cells, showing that its low levels may affect the cell dissemination process. Similarly, Mao et al. (2016) [60] and Borin et al. (2016) [22] showed melatonin activity in the inhibition of the invasion and migration process in MDA-MB-231, SK-BR-3 (HER2 positive) and MCF-7 (HER2-Modified) by decreasing protein kinases.

In addition to anti-invasive actions, a suppressive role of melatonin in EMT process was identified. A decrease in vimentin and claudin 7 protein expressions and an increased of E-cadherin in MDA-MB-468 line was observed after melatonin treatment, suggesting its protective role in EMT. This hormone inhibits the EMT process by interfering with NF- κ B signaling [61,62]. The increase of this molecule allows suppression of tumor cells epithelial phenotype, contributing to an increase in vimentin cytoskeleton protein, which permits transition to mesenchymal profile [61]. Moreover, it was observed that low levels of miR-10a also decreased expression of vimentin.

In this study we verified the action of melatonin to increase E-cadherin protein expression in MDA-MB-468 cells. The recovery of E-cadherin supports the protective role of melatonin in metastatic process. E-cadherin loss causes several changes in cellular junction, allowing cells transition for mesenchymal phenotype, the initial stage for metastasis [63]. Although the increase of E-cadherin in the MDA-MB-468 cells was observed, the same was not verified in MDA-MB-231. The E-cadherin protein expressions are low in this metastatic cell line, a fact noted by other authors [64].

Besides, miR-10a investigation showed no difference in E-cadherin levels after miRNA inhibition.

We observed decreasing levels of claudin 7 after melatonin treatment in both TNBC cell lines. In cancer, claudins appear to be linked to worse prognosis [65,66]. Supported by the results found in the migration and invasion events we suggest that the low expression of claudin 7 would imply a better scenario. A recent study associated the high expression of this protein with malignancy of breast cancer contributing to the disease progression [67].

PIK3CA is a component molecule of the signaling pathways that regulates survival and proliferation cells, and is also associated with several malignancies, acting mainly in promoting tumorigenesis [68,69]. The association between PIK3CA and miR-10a was studied by Ke & Lou (2017) [46], who observed down-regulation of PIK3CA by miR-10a, with resulting cell proliferation inhibition. However, our results did not show modulation in PIK3CA levels after the treatments.

CONCLUSIONS

In summary, we identified the action of melatonin on the modulation of miR-10a and EMT-related proteins, as well as suppression of invasion and cell migration. Our data supports the hypothesis that melatonin acts in the metastatic process by targeting some proteins involved in the EMT process. The relation between miR-10a and this process needs to be studied further in order to be better understood.

ACKNOWLEDGMENTS

To FAMERP for the infrastructure and professionals that made the study possible. To Coordenacao de Aperfeicoamento de Pessoal de Nivel Superior (CAPES), Conselho Nacional de Pesquisa e Tecnologia (CNPq) and Fundacao de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP – process number 2015/04780-6) for financial support. The funding body had no role in the study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Conflict of Interest Statement

The authors declare that there are no conflicts of interest.

REFERENCES

- [1] J. Ferlay, I. Soerjomataram, R. Dikshit, S. Eser, C. Mathers, M. Rebelo, D.M. Parkin, D. Forman, F. Bray, Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012, *Int. J. Cancer.* 136 (2015) E359–E386. doi:10.1002/ijc.29210.
- [2] C.L. Chaffer, R.A. Weinberg, A Perspective on Cancer Cell Metastasis, *Science* (80-.). 331 (2011) 1559–1564. doi:10.1126/science.1203543.
- [3] W. Chen, A.D. Hoffmann, H. Liu, X. Liu, Organotropism: new insights into molecular mechanisms of breast cancer metastasis., *NPJ Precis. Oncol.* 2 (2018) 4. doi:10.1038/s41698-018-0047-0.

- [4] R. Burton, R. Bell, The global challenge of reducing breast cancer mortality., *Oncologist*. 18 (2013) 1200–2. doi:10.1634/theoncologist.2013-0315.
- [5] X. Guan, Cancer metastases: challenges and opportunities, *Acta Pharm. Sin. B*. 5 (2015) 402–418. doi:10.1016/j.apsb.2015.07.005.
- [6] O.J. Scully, B.-H. Bay, G. Yip, Y. Yu, Breast cancer metastasis., *Cancer Genomics Proteomics*. 9 (2012) 311–20. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22990110> (accessed June 25, 2018).
- [7] Y. Wu, M. Sarkissyan, J. V Vadgama, Epithelial-Mesenchymal Transition and Breast Cancer., *J. Clin. Med*. 5 (2016). doi:10.3390/jcm5020013.
- [8] H. Hugo, M.L. Ackland, T. Blick, M.G. Lawrence, J.A. Clements, E.D. Williams, E.W. Thompson, Epithelial—mesenchymal and mesenchymal—epithelial transitions in carcinoma progression, *J. Cell. Physiol*. 213 (2007) 374–383. doi:10.1002/jcp.21223.
- [9] M. Korpala, E.S. Lee, G. Hu, Y. Kang, The miR-200 Family Inhibits Epithelial-Mesenchymal Transition and Cancer Cell Migration by Direct Targeting of E-cadherin Transcriptional Repressors *ZEB1* and *ZEB2*, *J. Biol. Chem*. 283 (2008) 14910–14914. doi:10.1074/jbc.C800074200.
- [10] H. Zhang, Y. Li, M. Lai, The microRNA network and tumor metastasis, *Oncogene*. 29 (2010) 937–948. doi:10.1038/onc.2009.406.
- [11] D.P. Bartel, MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function., *Cell*. 116 (2004) 281–97. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14744438> (accessed July 13, 2018).
- [12] M. V. Iorio, M. Ferracin, C.-G. Liu, A. Veronese, R. Spizzo, S. Sabbioni, E. Magri, M. Pedriali, M. Fabbri, M. Campiglio, S. Ménard, J.P. Palazzo, A.

- Rosenberg, P. Musiani, S. Volinia, I. Nenci, G.A. Calin, P. Querzoli, M. Negrini, C.M. Croce, MicroRNA Gene Expression Deregulation in Human Breast Cancer, *Cancer Res.* 65 (2005) 7065–7070. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-1783.
- [13] M. V. Iorio, C.M. Croce, MicroRNA dysregulation in cancer: diagnostics, monitoring and therapeutics. A comprehensive review, *EMBO Mol. Med.* 4 (2012) 143–159. doi:10.1002/emmm.201100209.
- [14] M. Hemmatzadeh, H. Mohammadi, F. Jadidi-Niaragh, F. Asghari, M. Yousefi, The role of oncomirs in the pathogenesis and treatment of breast cancer, *Biomed. Pharmacother.* 78 (2016) 129–139. doi:10.1016/j.biopha.2016.01.026.
- [15] M. Badr, H. Said, M.L. Louka, H.A. Elghazaly, A. Gaballah, M. Atef Abd El Mageed, MicroRNA-21 as a predictor and prognostic factor for trastuzumab therapy in human epidermal growth factor receptor 2-positive metastatic breast cancer, *J. Cell. Biochem.* (2018). doi:10.1002/jcb.27620.
- [16] W. Wang, Y. Luo, MicroRNAs in breast cancer: oncogene and tumor suppressors with clinical potential., *J. Zhejiang Univ. Sci. B.* 16 (2015) 18–31. doi:10.1631/jzus.B1400184.
- [17] L. Ma, F. Reinhardt, E. Pan, J. Soutschek, B. Bhat, E.G. Marcusson, J. Teruya-Feldstein, G.W. Bell, R.A. Weinberg, Therapeutic silencing of miR-10b inhibits metastasis in a mouse mammary tumor model, *Nat. Biotechnol.* (2010). doi:10.1038/nbt.1618.
- [18] D. Tehler, N.M. Høyland-Kroghsbo, A.H. Lund, The miR-10 microRNA precursor family, *RNA Biol.* 8 (2011) 728–734. doi:10.4161/rna.8.5.16324.
- [19] B.M. Wheeler, A.M. Heimberg, V.N. Moy, E.A. Sperling, T.W. Holstein, S. Heber, K.J. Peterson, The deep evolution of metazoan microRNAs, *Evol. Dev.*

- 11 (2009) 50–68. doi:10.1111/j.1525-142X.2008.00302.x.
- [20] W. Talib, W. H., Melatonin and Cancer Hallmarks, *Molecules*. 23 (2018) 518. doi:10.3390/molecules23030518.
- [21] A. González-González, M. Mediavilla, E. Sánchez-Barceló, Melatonin: A Molecule for Reducing Breast Cancer Risk, *Molecules*. 23 (2018) 336. doi:10.3390/molecules23020336.
- [22] T.F. Borin, A.S. Arbab, G.B. Gelaleti, L.C. Ferreira, M.G. Moschetta, B.V. Jardim-Perassi, A. Iskander, N.R.S. Varma, A. Shankar, V.B. Coimbra, V.A. Fabri, J.G. de Oliveira, D.A.P. de C. Zuccari, Melatonin decreases breast cancer metastasis by modulating Rho-associated kinase protein-1 expression, *J. Pineal Res.* 60 (2016) 3–15. doi:10.1111/jpi.12270.
- [23] L. Ortiz-López, S. Morales-Mulia, G. Ramírez-Rodríguez, G. Benítez-King, ROCK-regulated cytoskeletal dynamics participate in the inhibitory effect of melatonin on cancer cell migration, *J. Pineal Res.* 46 (2009) 15–21. doi:10.1111/j.1600-079X.2008.00600.x.
- [24] S.M. Hill, D.E. Blask, Effects of the pineal hormone melatonin on the proliferation and morphological characteristics of human breast cancer cells (MCF-7) in culture., *Cancer Res.* 48 (1988) 6121–6. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3167858> (accessed July 14, 2018).
- [25] E. Nooshinfar, D. Bashash, A. Safaroghli-Azar, S. Bayati, M. Rezaei-Tavirani, S.H. Ghaffari, M.E. Akbari, Melatonin promotes ATO-induced apoptosis in MCF-7 cells: Proposing novel therapeutic potential for breast cancer, *Biomed. Pharmacother.* 83 (2016) 456–465. doi:10.1016/j.biopha.2016.07.004.
- [26] S.E. Lee, S.J. Kim, J.-P. Youn, S.Y. Hwang, C.-S. Park, Y.S. Park, MicroRNA

- and gene expression analysis of melatonin-exposed human breast cancer cell lines indicating involvement of the anticancer effect., *J. Pineal Res.* 51 (2011) 345–52. doi:10.1111/j.1600-079X.2011.00896.x.
- [27] F. Mori, M. Ferraiuolo, R. Santoro, A. Sacconi, F. Goeman, M. Pallocca, C. Pulito, E. Korita, M. Fanciulli, P. Muti, G. Blandino, S. Strano, Multitargeting activity of miR-24 inhibits long-term melatonin anticancer effects, *Oncotarget.* 7 (2016). doi:10.18632/oncotarget.7978.
- [28] J.H.M. Marques, A.L. Mota, J.G. Oliveira, J.Z. Lacerda, J.P. Stefani, L.C. Ferreira, T.B. Castro, A.F. Aristizábal-Pachón, D.A.P.C. Zuccari, Melatonin restrains angiogenic factors in triple-negative breast cancer by targeting miR-152-3p: In vivo and in vitro studies, *Life Sci.* (2018). doi:10.1016/J.LFS.2018.07.012.
- [29] C. Zhu, Q. Huang, H. Zhu, Melatonin Inhibits the Proliferation of Gastric Cancer Cells Through Regulating the miR-16-5p-Smad3 Pathway, *DNA Cell Biol.* 37 (2018) 244–252. doi:10.1089/dna.2017.4040.
- [30] J. Gu, Z. Lu, C. Ji, Y. Chen, Y. Liu, Z. Lei, L. Wang, H.-T. Zhang, X. Li, Melatonin inhibits proliferation and invasion via repression of miRNA-155 in glioma cells, *Biomed. Pharmacother.* 93 (2017) 969–975. doi:10.1016/j.biopha.2017.07.010.
- [31] S.-J. Kim, H.S. Kang, J.-H. Lee, J.-H. Park, C.H. Jung, J.-H. Bae, B.-C. Oh, D.-K. Song, W.-K. Baek, S.-S. Im, Melatonin ameliorates ER stress-mediated hepatic steatosis through miR-23a in the liver, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 458 (2015) 462–469. doi:10.1016/j.bbrc.2015.01.117.
- [32] E.J. Sohn, G. Won, J. Lee, S. Lee, S. Kim, Upregulation of miRNA3195 and

- miRNA374b Mediates the Anti-Angiogenic Properties of Melatonin in Hypoxic PC-3 Prostate Cancer Cells, *J. Cancer*. 6 (2015) 19–28. doi:10.7150/jca.9591.
- [33] K.J. Livak, T.D. Schmittgen, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method., *Methods*. (2001). doi:10.1006/meth.2001.1262.
- [34] R. Reiter, S. Rosales-Corral, D.-X. Tan, D. Acuna-Castroviejo, L. Qin, S.-F. Yang, K. Xu, Melatonin, a Full Service Anti-Cancer Agent: Inhibition of Initiation, Progression and Metastasis, *Int. J. Mol. Sci.* 18 (2017) 843. doi:10.3390/ijms18040843.
- [35] P. Lissoni, S. Barni, M. Mandalà, A. Ardizzoia, F. Paolorossi, M. Vaghi, R. Longarini, F. Malugani, G. Tancini, Decreased toxicity and increased efficacy of cancer chemotherapy using the pineal hormone melatonin in metastatic solid tumour patients with poor clinical status., *Eur. J. Cancer*. 35 (1999) 1688–92. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10674014> (accessed July 3, 2018).
- [36] S.M. Hill, V.P. Belancio, R.T. Dauchy, S. Xiang, S. Brimer, L. Mao, A. Hauch, P.W. Lundberg, W. Summers, L. Yuan, T. Frasch, D.E. Blask, Melatonin: An inhibitor of breast cancer, *Endocr. Relat. Cancer*. 22 (2015) R183–R204. doi:10.1530/ERC-15-0030.
- [37] B.V. Jardim-Perassi, M.R. Lourenço, G.M. Doho, I.H. Grígolo, G.B. Gelaleti, L.C. Ferreira, T.F. Borin, M.G. Moschetta, D.A. Pires de Campos Zuccari, Melatonin Regulates Angiogenic Factors under Hypoxia in Breast Cancer Cell Lines., *Anticancer. Agents Med. Chem.* 16 (2016) 347–58. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25963143> (accessed April 3, 2018).
- [38] L.B. Maschio-Signorini, G.B. Gelaleti, M.G. Moschetta, T.F. Borin, B. V Jardim-

- Perassi, J.R. Lopes, J.Z. Lacerda, R.A. Roela, N.A. Bordin, L.A. Corrêa, J.P. Cardoso, D.A.P. de C. Zuccari, Melatonin Regulates Angiogenic and Inflammatory Proteins in MDA-MB-231 Cell Line and in Co-culture with Cancer-associated Fibroblasts., *Anticancer. Agents Med. Chem.* 16 (2016) 1474–1484. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27102277> (accessed July 4, 2018).
- [39] J.F. Colombo, B.V. Jardim-Perassi, J.P.S. Ferreira, C.Z. Braga, N.M. Sonehara, R. de Paula Júnior, M.G. Moschetta, A.P. Girol, D.A.P. De Campos Zuccari, Melatonin differentially modulates NF-KB expression in breast and liver cancer cells, *Anticancer. Agents Med. Chem.* 18 (2018). doi:10.2174/1871520618666180131112304.
- [40] N. do N. Gonçalves, J. Colombo, J.R. Lopes, G.B. Gelaleti, M.G. Moschetta, N.M. Sonehara, E. Hellmén, C. de F. Zanon, S.M. Oliani, D.A.P. de C. Zuccari, Effect of Melatonin in Epithelial Mesenchymal Transition Markers and Invasive Properties of Breast Cancer Stem Cells of Canine and Human Cell Lines, *PLoS One.* 11 (2016) e0150407. doi:10.1371/journal.pone.0150407.
- [41] D. Hevia, P. González-Menéndez, I. Quiros-González, A. Miar, A. Rodríguez-García, D.-X. Tan, R.J. Reiter, J.C. Mayo, R.M. Sainz, Melatonin uptake through glucose transporters: a new target for melatonin inhibition of cancer., *J. Pineal Res.* 58 (2015) 234–50. doi:10.1111/jpi.12210.
- [42] E.J. Sanchez-Barcelo, M.D. Mediavilla, C. Alonso-Gonzalez, N. Rueda, Breast cancer therapy based on melatonin., *Recent Pat. Endocr. Metab. Immune Drug Discov.* 6 (2012) 108–16. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22369716> (accessed June 20, 2018).
- [43] L. Mao, L. Yuan, S. Xiang, S.B. Zeringue, R.T. Dauchy, D.E. Blask, A. Hauch,

- S.M. Hill, C. Biology, T. Avenue, N. Orleans, T. Avenue, N. Orleans, L. Cancer, N. Orleans, Molecular deficiency (ies) in MT1 melatonin signaling pathway underlies the melatonin-unresponsive phenotype in MDA- MB-231 human breast cancer cells, *J. Pineal Res.* 56 (2014) 246–253. doi:10.1111/jpi.12117.Molecular.
- [44] B.V. Jardim-Perassi, A.S. Arbab, L.C. Ferreira, T.F. Borin, N.R.S. Varma, A.S.M. Iskander, A. Shankar, M.M. Ali, D.A.P. De Campos Zuccari, Effect of melatonin on tumor growth and angiogenesis in xenograft model of breast cancer, *PLoS One.* 9 (2014) 1–11. doi:10.1371/journal.pone.0085311.
- [45] R. Ordoñez, A. Fernández, N. Prieto-Domínguez, L. Martínez, C. García-Ruiz, J.C. Fernández-Checa, J.L. Mauriz, J. González-Gallego, Ceramide metabolism regulates autophagy and apoptotic cell death induced by melatonin in liver cancer cells, *J. Pineal Res.* 59 (2015) 178–189. doi:10.1111/jpi.12249.
- [46] K. Ke, T. Lou, MicroRNA-10a suppresses breast cancer progression via PI3K/Akt/mTOR pathway., *Oncol. Lett.* 14 (2017) 5994–6000. doi:10.3892/ol.2017.6930.
- [47] C.-H. Chang, T.-C. Fan, J.-C. Yu, G.-S. Liao, Y.-C. Lin, A.C.-C. Shih, W.-H. Li, A.L.-T. Yu, The prognostic significance of RUNX2 and miR-10a/10b and their inter-relationship in breast cancer., *J. Transl. Med.* 12 (2014) 257. doi:10.1186/s12967-014-0257-3.
- [48] W. CHEN, Z. TANG, Y. SUN, Y. ZHANG, X. WANG, Z. SHEN, F. LIU, X. QIN, miRNA expression profile in primary gastric cancers and paired lymph node metastases indicates that miR-10a plays a role in metastasis from primary gastric cancer to lymph nodes, *Exp. Ther. Med.* 3 (2012) 351–356. doi:10.3892/etm.2011.411.

- [49] F.U. Weiss, I.J. Marques, J.M. Woltering, D.H. Vlecken, A. Aghdassi, L.I. Partecke, C. Heidecke, M.M. Lerch, C.P. Bagowski, Retinoic Acid Receptor Antagonists Inhibit miR-10a Expression and Block Metastatic Behavior of Pancreatic Cancer, *Gastroenterology*. 137 (2009) 2136–2145.e7. doi:10.1053/j.gastro.2009.08.065.
- [50] S. Khan, D. Wall, C. Curran, J. Newell, M.J. Kerin, R.M. Dwyer, MicroRNA-10a is reduced in breast cancer and regulated in part through retinoic acid., *BMC Cancer*. 15 (2015) 345. doi:10.1186/s12885-015-1374-y.
- [51] R. Hoppe, J. Achinger-Kawecka, S. Winter, P. Fritz, W.-Y. Lo, W. Schroth, H. Brauch, Increased expression of miR-126 and miR-10a predict prolonged relapse-free time of primary oestrogen receptor-positive breast cancer following tamoxifen treatment, *Eur. J. Cancer*. 49 (2013) 3598–3608. doi:10.1016/j.ejca.2013.07.145.
- [52] L.G. Pérez-Rivas, J.M. Jerez, R. Carmona, V. de Luque, L. Vicioso, M.G. Claros, E. Viguera, B. Pajares, A. Sánchez, N. Ribelles, E. Alba, J. Lozano, A microRNA Signature Associated with Early Recurrence in Breast Cancer, *PLoS One*. 9 (2014) e91884. doi:10.1371/journal.pone.0091884.
- [53] I.P. Pogribny, J.N. Filkowski, V.P. Tryndyak, A. Golubov, S.I. Shpyleva, O. Kovalchuk, Alterations of microRNAs and their targets are associated with acquired resistance of MCF-7 breast cancer cells to cisplatin, *Int. J. Cancer*. 127 (2010) 1785–1794. doi:10.1002/ijc.25191.
- [54] U.A. Ørom, F.C. Nielsen, A.H. Lund, MicroRNA-10a binds the 5'UTR of ribosomal protein mRNAs and enhances their translation., *Mol. Cell*. 30 (2008) 460–71. doi:10.1016/j.molcel.2008.05.001.

- [55] T. Sasayama, M. Nishihara, T. Kondoh, K. Hosoda, E. Kohmura, MicroRNA-10b is overexpressed in malignant glioma and associated with tumor invasive factors, uPAR and RhoC, *Int. J. Cancer*. 125 (2009) 1407–1413. doi:10.1002/ijc.24522.
- [56] M. Bloomston, W.L. Frankel, F. Petrocca, S. Volinia, H. Alder, J.P. Hagan, C.-G. Liu, D. Bhatt, C. Taccioli, C.M. Croce, MicroRNA expression patterns to differentiate pancreatic adenocarcinoma from normal pancreas and chronic pancreatitis., *JAMA*. 297 (2007) 1901–8. doi:10.1001/jama.297.17.1901.
- [57] Y. Tian, A. Luo, Y. Cai, Q. Su, F. Ding, H. Chen, Z. Liu, MicroRNA-10b promotes migration and invasion through KLF4 in human esophageal cancer cell lines., *J. Biol. Chem*. 285 (2010) 7986–94. doi:10.1074/jbc.M109.062877.
- [58] L. Ma, J. Teruya-Feldstein, R.A. Weinberg, Tumour invasion and metastasis initiated by microRNA-10b in breast cancer, *Nature*. (2007). doi:10.1038/nature06174.
- [59] J. Harquail, S. Benzina, G.A. Robichaud, MicroRNAs and breast cancer malignancy: an overview of miRNA-regulated cancer processes leading to metastasis., *Cancer Biomark*. 11 (2012) 269–80. doi:10.3233/CBM-120291.
- [60] L. Mao, W. Summers, S. Xiang, L. Yuan, R.T. Dauchy, A. Reynolds, M.A. Wren-Dail, D. Pointer, T. Frasca, D.E. Blask, S.M. Hill, Melatonin Represses Metastasis in Her2-Positive Human Breast Cancer Cells by Suppressing RSK2 Expression., *Mol. Cancer Res*. 14 (2016) 1159–1169. doi:10.1158/1541-7786.MCR-16-0158.
- [61] S.-C. Su, M.-J. Hsieh, W.-E. Yang, W.-H. Chung, R.J. Reiter, S.-F. Yang, Cancer metastasis: Mechanisms of inhibition by melatonin., *J. Pineal Res*. 62 (2017)

- e12370. doi:10.1111/jpi.12370.
- [62] S.-M. Wu, W.-Y. Lin, C.-C. Shen, H.-C. Pan, W. Keh-Bin, Y.-C. Chen, Y.-J. Jan, D.-W. Lai, S.-C. Tang, H.-R. Tien, C.-S. Chiu, T.-C. Tsai, Y.-L. Lai, M.-L. Sheu, Melatonin set out to ER stress signaling thwarts epithelial mesenchymal transition and peritoneal dissemination via calpain-mediated C/EBP β and NF κ B cleavage, *J. Pineal Res.* 60 (2016) 142–154. doi:10.1111/jpi.12295.
- [63] P. Angadi, A. Kale, Epithelial-mesenchymal transition - A fundamental mechanism in cancer progression: An overview, *Indian J. Heal. Sci.* 8 (2015) 77. doi:10.4103/2349-5006.174233.
- [64] L. Wang, C. Tang, H. Cao, K. Li, X. Pang, L. Zhong, W. Dang, H. Tang, Y. Huang, L. Wei, M. Su, T. Chen, Activation of IL-8 via PI3K/Akt-dependent pathway is involved in leptin-mediated epithelial-mesenchymal transition in human breast cancer cells., *Cancer Biol. Ther.* 16 (2015) 1220–30. doi:10.1080/15384047.2015.1056409.
- [65] A. Jääskeläinen, Y. Soini, A. Jukkola-Vuorinen, P. Auvinen, K.-M. Haapasaari, P. Karihtala, High-level cytoplasmic claudin 3 expression is an independent predictor of poor survival in triple-negative breast cancer, *BMC Cancer.* 18 (2018) 223. doi:10.1186/s12885-018-4141-z.
- [66] S. Lu, K. Singh, S. Mangray, R. Tavares, L. Noble, M.B. Resnick, E. Yakirevich, Claudin expression in high-grade invasive ductal carcinoma of the breast: correlation with the molecular subtype, *Mod. Pathol.* 26 (2013) 485–495. doi:10.1038/modpathol.2012.187.
- [67] C. Constantinou, S. Papadopoulos, E. Karyda, A. Alexopoulos, N. Agnanti, A. Batistatou, H. Harisis, Expression and Clinical Significance of Claudin-7, PDL-1,

- PTEN, c-Kit, c-Met, c-Myc, ALK, CK5/6, CK17, p53, EGFR, Ki67, p63 in Triple-negative Breast Cancer-A Single Centre Prospective Observational Study., *In Vivo*. 32 (2018) 303–311. doi:10.21873/invivo.11238.
- [68] O. Renner, C. Blanco-Aparicio, M. Grassow, M. Cañamero, J.F.M. Leal, A. Carnero, Activation of phosphatidylinositol 3-kinase by membrane localization of p110alpha predisposes mammary glands to neoplastic transformation., *Cancer Res*. 68 (2008) 9643–53. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-1539.
- [69] A. Kamal, V. Lakshma Nayak, N. Nagesh, M.V.P.S. Vishnuvardhan, N.V. Subba Reddy, Benzo[b]furan derivatives induces apoptosis by targeting the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in human breast cancer cells, *Bioorg. Chem*. 66 (2016) 124–131. doi:10.1016/j.bioorg.2016.04.004.

VIII. ANEXO

VIII. ANEXO

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

Apoio financeiro na forma de bolsa de estudos fornecida pela CAPES no período 10/2016 a 09/2018 e recursos para o desenvolvimento do projeto na forma de Auxílio à Pesquisa FAPESP (2015/04780-6).