

## EFEITOS DA MELATONINA E EXPOSIÇÃO A DIFERENTES CICLOS DE CLARO/ESCURO EM UM MODELO ANIMAL DE CARCINOGENESE MAMÁRIA

Etianne Martini Sasso<sup>1,2</sup>, Diego Mendoça Uchoa<sup>3</sup>, Melissa Alves Braga de Oliveira<sup>2,4</sup>, Caroline Luísa Quiles<sup>2,4</sup>, Victor Hugo Fros Boni<sup>2</sup>, Maria Paz Loayza Hidalgo<sup>2,4</sup>#

1- Pós- graduação em Medicina: Ciências Médicas - UFRGS;

2- Laboratório de Cronobiologia e Sono – HCPA / UFRGS;

3- Departamento de Patologia – HCPA;

4- Pós- graduação em Psiquiatria e Ciências do Comportamento FAMED/UFRGS;

#Orientadora

### Resumo:

O câncer de mama é a principal causa de morte em mulheres entre 40-55 anos e as taxas globais são até cinco vezes maiores em países desenvolvidos. A industrialização leva ao aumento da exposição noturna à luz que suprime a melatonina, hormônio que exerce efeitos oncostáticos e antioxidantes no organismo. O objetivo do estudo foi avaliar o efeito da melatonina sobre carcinogênese mamária em ratas expostas ao modelo de dessincronização circadiana. A carcinogênese foi induzida por 7,12-dimetilbenz[a]antraceno (DMBA) em 39 ratas Sprague-Dawley (41-46 dias). Os animais foram distribuídos em quatro grupos: ciclo claro/escuro de 12/12h sem intervenção, 12/12h com melatonina, 11/11h sem intervenção e 11/11h com melatonina. Após 8 semanas, o desenvolvimento tumoral ocorreu em 32 animais. A melatonina teve efeito benéfico na multiplicidade tumoral, grau histológico, tamanho do tumor e peso corporal. O modelo de dessincronização dos ritmos circadianos não teve efeitos sobre a carcinogênese mamária.

**Autorização legal:** Os procedimentos do foram conduzidos de acordo com o Guia do NIH para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (nº 11-0353).

**Palavras-chave:** Melatonina; câncer de mama; ciclo circadiano.

**Apoio financeiro:** Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

### Introdução:

O câncer de mama é o tipo mais comum de malignidade em mulheres e a principal causa de morte em mulheres de 40 a

55 anos<sup>1</sup>. As taxas de incidência e mortalidade estão aumentando a nível mundial, embora existam variações substanciais entre os países; a frequência de câncer de mama é até cinco vezes maior em países desenvolvidos<sup>2</sup>.

Estudos epidemiológicos relataram aumento do risco de câncer de mama em trabalhadores de turno do sexo feminino<sup>3,4</sup>. Aproximadamente 15 a 20% da população trabalhadora das nações industrializadas está envolvida no trabalho noturno permanente ou no trabalho por turnos, atividades que interrompem o ciclo natural do sono-vigília, podendo ser um dos fatores subjacentes do aumento das taxas de câncer de mama no mundo, além de levar a mudanças nos padrões alimentares e nas rotinas sociais e familiares<sup>5</sup>. A Agência Internacional de Investigação sobre o Câncer (IARC) classificou recentemente que o trabalho de turnos, como provável indutor carcinogênico para os seres humanos<sup>6,7,8,9</sup>.

A exposição à luz noturna pode levar a perturbações do relógio biológico (cronodisrupção), como a dessincronização dos ritmos circadianos<sup>10,11</sup>. Este fenômeno é explicado pela supressão da melatonina endógena devido à exposição noturna à luz<sup>12</sup>.

A melatonina é o principal hormônio secretado pela glândula pineal, exerce efeitos oncostáticos e antioxidantes e está envolvida no controle do ciclo celular, da função imune e dos hormônios esteróides<sup>13</sup>. Sua produção varia de acordo com a intensidade e espectro da fonte luminosa, bem como com a duração da exposição<sup>14</sup>. Considerando estas variáveis, a síntese de melatonina pode ocorrer em um ritmo mais lento ou até mesmo ser totalmente inibida durante a noite<sup>14</sup>.

A supressão da melatonina noturna interfere no controle do ciclo celular, potencia a imunossupressão e influencia os hormônios esteróides, que estão diretamente envolvidos na carcinogênese mamária.

Diante desses mecanismos, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da melatonina sobre o desenvolvimento de tumores mamários em ratas fêmeas expostas ou não ao modelo de dessincronização circadiana.

### Metodologia:

**Animais:** A amostra do estudo compreendeu 39 ratas Sprague-Dawley (41-46 dias, peso  $147,85 \pm 13,39$  g). Todos os animais foram mantidos em ambiente climatizado (temperatura ambiente 22-24°C, umidade relativa 55-65%) e acesso à água e comida *ad lib*. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos: 12/12h sem melatonina (12/12-CL), 11/11h sem melatonina (11/11-CL), 12/12h com melatonina (12/12-MEL) e 11/11h com melatonina (11/11-MEL).

**Ciclo claro/escuro:** As experiências foram conduzidas durante um período de 61 dias. No dia 1, os animais foram expostos ao carcinógeno e iniciou-se o modelo de dessincronização nos grupos 11/11, submetidos a um ciclo claro / escuro de 11/11 horas, como descrito anteriormente Por Cambras et al<sup>15</sup>. Os animais nos grupos 12/12 foram mantidos num ciclo claro / escuro de 12/12 horas (fase clara de 07:00 a 19:00).

**Indução de câncer:** A carcinogênese foi induzida por meio de administração intragástrica de uma dose única de 20 mg de DMBA em 1 mL de óleo de soja<sup>16</sup>.

**Tratamento:** Os animais nos grupos tratados receberam 10 mg/Kg de melatonina em 1 mL de hidroxietilcelulose a 1% uma vez por dia, administrado por gavagem 3 horas antes do início da fase escura. Os animais não tratados receberam apenas 1% de hidroxietilcelulose uma vez por dia, no mesmo horário e através da mesma via.

**Avaliação da indução:** Para monitorar o desenvolvimento e crescimento do tumor, as glândulas mamárias foram palpadas uma vez por semana, por um investigador experiente cego para a distribuição do grupo. O peso corporal foi medido duas vezes por semana. No dia 61, todos as ratas foram submetidos à eutanásia numa câmara de CO<sub>2</sub>, dissecadas, e tiveram os tumores mamários ressecados. As dimensões do tumor (largura [W], comprimento [L] e espessura [T]) foram medidas com calibradores, e o tamanho do tumor foi calculado usando a fórmula  $W/2L/2\pi$ .

**Histologia:** Os espécimes dos tumores foram fixados em formaldeído a 10%, colocados em lâminas histológicas, corados com hematoxilina e eosina (H & E) e examinados em microscopia óptica. O sistema de nomenclatura de Annapolis foi utilizado para a classificação de tumores.

**Análise estatística:** Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão. O teste t de Student e o teste qui-quadrado ( $\chi^2$ ) foram utilizados para o cálculo das diferenças entre grupos. Valores  $p \leq 0,05$  foram considerados significativos. Todas as análises estatísticas foram realizadas em SPSS 18 para Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA).

### Resultados e Discussão:

O desenvolvimento tumoral ocorreu como esperado. Oito semanas após a administração do DMBA, 32 animais (82,05%) tinham pelo menos um tumor mamário palpável, para um total de 73 tumores (média  $1,87 \pm 1,79$  tumores por animal). O primeiro tumor foi detectado no dia 35. Nenhum animal apresentou qualquer evidência de metástase no exame *post-mortem*.

O peso corporal também foi avaliado neste estudo. Embora a única diferença significativa neste parâmetro tenha sido observada entre os grupos 12/12-CL e 11/11-CL, e mesmo assim, somente nas semanas 6 e 8 ( $t = -2,180$ ,  $p = 0,043$  e  $t = -2,121$ ,  $p = 0,048$  respectivamente), a partir da semana 3 em diante, o peso corporal no grupo 11/11-CL excedeu o de todos os outros grupos e permaneceu maior até o final do experimento. Cabe salientar que a maior alteração foi detectada em animais não tratados; ratas no grupo 11/11-CL tiveram um aumento de peso de 71,29% durante o período experimental, contra 56,93% no grupo 12/12-CL, 52,56% no grupo 12/12-MEL e 62,52% no grupo 11/11-MEL.

Houve diferenças significativas no número de tumores desenvolvidos entre o grupo 12/12-CL e os dois grupos de intervenção (12/12-MEL:  $t = 2,527$ ;  $p = 0,028$ ; 11/11-MEL:  $t = 2,603$ ,  $p = 0,019$ ).

O exame histológico revelou 58 neoplasias intraepiteliais mamárias (MIN) (79,45%) e 15 adenocarcinomas (20,55%). A metaplasia escamosa foi identificada em três casos (dois MIN e um adenocarcinoma). Dos 32 ratos (82,05%) que desenvolveram tumores, 11 (28,21%) tiveram pelo menos um adenocarcinoma. Houve diferenças significativas entre os grupos na distribuição de subtipos tumorais histológicos ( $p = 0,024$ ).

Quando os tumores foram estratificados por ordem de diagnóstico (com o primeiro tumor diagnosticado com o identificador "Tumor 1", o segundo tumor diagnosticado com o rótulo "Tumor 2", etc.), houve diferenças significativas no subtipo histológico entre Tumor 1 e Tumor 2 ( $p = 0,049$  e  $p = 0,043$ , respectivamente). O teste t de Student mostrou uma redução significativa no número

de adenocarcinomas como Tumor 2 no grupo 12/12-MEL em comparação com o grupo 12/12-CL ( $t = 2,869$ ,  $p = 0,010$ ).

Houve também diferenças significativas no tamanho do tumor 2, com tumores maiores no grupo 12/12-CL ( $127,45 \pm 154,03$ ) em comparação com o grupo 12/12-MEL ( $21,28 \pm 35,60$ ) e o grupo 11/11-MEL ( $19,14 \pm 29,88$ ),  $T = 2,124$ ,  $p = 0,048$  e  $t = 2,069$ ,  $p = 0,054$ , respectivamente).

### Conclusões:

Neste estudo, a terapia com melatonina produziu resultados benéficos. Os animais no grupo 12/12-MEL e 11/11-MEL desenvolveram significativamente menos tumores mamários do que os animais nos grupos sem melatonina, independentemente do fotoperíodo. O modelo de dessincronização circadiana utilizado não teve efeito sobre a multiplicidade tumoral, como demonstrado pelos resultados estatisticamente semelhantes entre os grupos 11/11-CL e 12/12-CL ( $t = 0,104$ ;  $p = 0,918$ ), isso sugere que talvez ele não tenha sido capaz de causar uma dessincronização (ou "cronodisrupção") robusta o bastante para algum efeito sobre a carcinogênese. Já o efeito protetor visto a partir da melatonina pode ser explicado por suas propriedades imunossupressoras e de remoção de radicais livres, bem como pela expressão aumentada do gene supressor de tumor p53<sup>17</sup>.

A melatonina retarda significativamente a progressão do tumor. No presente estudo, os tumores progrediram menos agressivamente em animais tratados com melatonina. Do ponto de vista histológico, houve diferenças significativas entre os grupos, com os desfechos mais favoráveis encontrados no grupo 11/11-MEL (maior número de animais sem tumores e maior redução nos tumores in situ). O grupo sem 12/12-CL obteve significativamente mais animais com tumores invasivos que todos os outros grupos, e todos os animais do grupo tinham pelo menos um tumor. Nesta amostra, a melatonina retardou a progressão histológica de tumores mamários.

A análise revelou que grande parte dos animais dos grupos tratados com melatonina não conseguiram desenvolver tumores, e que estes grupos também tinham as taxas mais baixas de adenocarcinoma. A análise do segundo tumor diagnosticado reforça a nossa hipótese em que os animais no grupo 12/12-CL tinham tumores significativamente maiores em comparação com os animais nos grupos de melatonina. A melatonina exerce efeitos sobre a divisão celular e pode inibir a mitose, retardando parcialmente o início da metáfase<sup>13</sup>.

Os efeitos oncostáticos da melatonina observados no presente estudo reforçam a validade dos ensaios clínicos da melatonina como terapia adjuvante em pacientes com câncer de mama, bem como a pesquisa de seus efeitos preventivos, tendo em vista o baixo custo e a facilidade de uso desse agente. O uso clínico de melatonina para fins preventivos ainda requer estudos para confirmar a sua segurança e eficácia, que, se determinado, faria a melatonina profilática uma intervenção fácil de usar para mulheres em risco de câncer de mama devido a exposições ocupacionais, como trabalho por turnos ou permanente trabalho noturno.

### Referências bibliográficas

1. Siegel, R. L., Miller, K. D., & Jemal, A. (2016). **Cancer statistics, 2016**. CA: a cancer journal for clinicians, 66(1), 7-30.
2. Blask DE, Brainard GC, Dauchy RT, Hanifin JP, Davidson LK, Krause JA et al (2005). **Melatonin-depleted blood from premenopausal women exposed to light at night stimulates growth of human breast cancer xenografts in nude rats**. Cancer Res 65: 11174-11184.
3. Stevens RG (2009). **Working against our endogenous circadian clock: Breast cancer and electric lighting in the modern world**. Mutat Res 680: 106-108.
4. Åkerstedt, T., Knutsson, A., Narusyte, J., Svedberg, P., Kecklund, G., & Alexanderson, K. (2015). **Night work and breast cancer in women: a Swedish cohort study**. BMJ open, 5:e008127.
5. Haus E, Smolensky M (2006). **Biological clocks and shift work: circadian dysregulation and potential long-term effects**. Cancer Causes Control 17: 489-500.
6. Touitou, Y., Reinberg, A., & Touitou, D. (2017). **Association between light at night, melatonin secretion, sleep deprivation, and the internal clock: Health impacts and mechanisms of circadian disruption**. Life Sciences 173: 94-106
7. Erren TC (2010). **Shift work, cancer and "white-box" epidemiology: Association and causation**. Epidemiol Perspect Innov 7: 11.

8. Hansen J, Stevens RG (2012). **Case-control study of shift-work and breast cancer risk in Danish nurses: Impact of shift systems.** Eur J Cancer 48: 1722-1729.
9. Stevens RG (2009). **Light-at-night, circadian disruption and breast cancer: assessment of existing evidence.** Int J Epidemiol 38: 963-970.
10. Greene MW (2012). **Circadian rhythms and tumor growth.** Cancer Lett 318: 115-123.
11. Reiter RJ, Tan DX, Erren TC, Fuentes-Broto L, Paredes SD (2009). **Light-mediated perturbations of circadian timing and cancer risk: a mechanistic analysis.** Integr Cancer Ther 8: 354-360.
12. Rana S, Mahmood S (2010). **Circadian rhythm and its role in malignancy.** J Circadian Rhythms 8: 1-13.
13. Vijayalaxmi, Thomas CR, Jr., Reiter RJ, Herman TS (2002). **Melatonin: from basic research to cancer treatment clinics.** J Clin Oncol 20: 2575-2601.
14. Figueiro MG, Bierman A, Plitnick B, Rea MS (2009). **Preliminary evidence that both blue and red light can induce alertness at night.** BMC Neurosci 10: 105.
15. Cambras T, Weller JR, Angles-Pujoras M, Lee ML, Christopher A, Diez-Noguera A et al (2007). **Circadian desynchronization of core body temperature and sleep stages in the rat.** Proc Natl Acad Sci U S A 104: 7634-7639.
16. Barros AC, Muranaka EN, Mori LJ, Pelizon CH, Iriya K, Giocondo G et al (2004). **Induction of experimental mammary carcinogenesis in rats with 7,12-dimethylbenz(a)anthracene.** Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo 59: 257-261.
17. Figueiro MG, Rea MS, Bullough JD (2006). **Does architectural lighting contribute to breast cancer?** J Carcinog 5:20.