

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA DESSINCRONIZAÇÃO CIRCADIANA SOBRE O
CÂNCER DE MAMA E UTILIZAÇÃO TERAPÊUTICA DE MELATONINA EM
RATAS SPRAGUE-DAWLEY**

ETIANNE MARTINI SASSO

PORTO ALEGRE

2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA DESSINCRONIZAÇÃO CIRCADIANA SOBRE O
CÂNCER DE MAMA E UTILIZAÇÃO TERAPÊUTICA DE MELATONINA EM
RATAS SPRAGUE-DAWLEY**

ETIANNE MARTINI SASSO

Orientador: Prof^a. Dr^a. Maria Paz Loayza Hidalgo
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Medicina: Ciências Médicas, UFRGS, como requisito
parcial para obtenção do título de Mestre.

Porto alegre

2013

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Porto Alegre

2013

Sasso, Etianne Martini
AVALIAÇÃO DO EFEITO DA DESSINCRONIZAÇÃO
CIRCADIANA SOBRE O CÂNCER DE MAMA E UTILIZAÇÃO
TERAPÊUTICA DE MELATONINA EM RATAS SPRAGUE-DAWLEY /
Etianne Martini Sasso. -- 2013.
71 f.

Orientadora: Maria Paz Loayza Hidalgo.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa
de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto
Alegre, BR-RS, 2013.

1. Câncer de Mama. 2. Cronobiologia. 3.
Dessincronização. 4. Melatonina. 5. Ritmo Biológico.
I. Hidalgo, Maria Paz Loayza, orient. II. Título.

*Dedico este trabalho aos meus queridos
pais, Jucimara e Paulo, pelo apoio e
dedicação incondicionais.*

AGRADECIMENTOS

À minha família, que mesmo longe sempre esteve ao meu lado, acreditando e confiando no meu esforço, além de compreender minha ausência em prol a execução deste desafio. Em especial aos meus amados pais, que sempre estiveram de mãos estendidas para me ajudar, saibam que a confiança de vocês me fortaleceu para seguir.

Ao meu namorado, Helder, quem esteve comigo em todas as etapas, desde a formulação das primeiras ideias até a redação das últimas linhas desta dissertação, me ajudando e me aguentando durante todas as crises. Obrigada pela tua paciência, sem dúvida foi a pessoa que mais ouviu meus desabafos quando algo não saia exatamente como o planejado. Assim como a toda a família Garay Martins que é meu Porto Seguro em Porto Alegre.

À Direção e aos colegas do IPB/LACEN, sem o apoio, compreensão, força, companheirismo e amizade de vocês eu não teria conseguido.

À minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Maria Paz Loayza Hidalgo que apoiou minhas ideias e me fez ver o caminho que eu quero seguir.

Aos pesquisadores do Laboratório de Cronobiologia do HCPA, com os quais mantive valorosa troca de conhecimento, agradeço o apoio especial dos colegas Letícia Ramalho, Bianca Hirschmann, Melissa Oliveira e Andreo Rysdyk.

Aos colaboradores Dr. Diego de Mendonça Uchoa e Dr. Antônio Fabiano Ferreira Filho, os quais estiveram sempre disponíveis à ajudar.

A toda a equipe da Unidade de Experimentação Animal do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, pela disponibilidade constate em executar da forma mais correta este estudo. Assim como ao Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre que investiu em nossa pesquisa.

Às minhas amigas Daniela Fraga, Juliana Vieira, Leda Boeira e Nathália Vargas, que de forma indireta, participaram desse projeto, ajudando a pesquisa médica a adquirir conhecimento científico.

*“No fim tudo dá certo, se não deu certo é
porque ainda não chegou ao fim.”*

Fernando Sabino

RESUMO

O câncer de mama é o tipo de câncer que mais acomete as mulheres e a principal causa de morte na faixa entre 40 e 55 anos. Apesar de apresentar variação internacional, suas taxas seguem aumentando mundialmente, sendo até cinco vezes mais frequente em países desenvolvidos. A industrialização gera aumento da exposição à luz durante a noite, o que causa supressão de melatonina. A melatonina é o principal hormônio secretado pela glândula pineal e possui atividade oncostática e antioxidante, interfere no controle do ciclo celular, função imunológica e nos hormônios esteróides. O objetivo desta dissertação é apresentar o racional e o desenvolvimento do estudo cujo objetivo foi avaliar o efeito da terapia com melatonina sobre o desenvolvimento de tumores mamários em ratas expostas ou não a dessincronização circadiana. A indução da carcinogênese mamária foi através de administração intragástrica de DMBA em 39 ratas Sprague-dawley entre 41 e 46 dias. Os animais foram randomizados em 04 grupos, Sincronizados sem tratamento, Dessincronizados sem tratamento, Sincronizados com melatonina e Dessincronizados com melatonina. Os grupos Sincronizados foram mantidos em ciclo claro/escuro de 12/12 horas e os dessincronizados a ciclo claro/escuro de 11/11 horas, durante 8 semanas. O desenvolvimento tumoral ocorreu em 32 animais (82,05%), totalizando 73 tumores. A melatonina apresentou efeitos benéficos quanto a multiplicidade tumoral, grau histológico, tamanho dos tumores e peso dos animais, enquanto que a dessincronização não interferiu de forma significativa na carcinogênese mamária.

PALAVRAS-CHAVE: Câncer de mama, cronobiologia, dessincronização, melatonina e ritmo circadiano.

ABSTRACT

Breast cancer is the type of cancer that most affects women and the leading cause of death in the age between 40 and 55 years. Despite presenting international variation, their rates continue to increase worldwide, with up to five times more common in developed countries. The industrialization generates increased exposure to light at night, which causes suppression of melatonin. Melatonin is the main hormone secreted by the pineal gland and has oncostatic and antioxidant activity, interferes with cell cycle control, immune function and steroid hormones. The aim of this dissertation and present the rationale and development of the study whose objective was to evaluate the effect of melatonin therapy on the development of mammary tumors in rats exposed or not the circadian desynchronization. Induction of mammary carcinogenesis was via intragastric administration of DMBA in 39 Sprague-Dawley rats between 41 and 46 days. The animals were randomized into 04 groups, Synchronized and untreated, desynchronized and untreated, synchronized and with melatonin, desynchronized and with melatonin. Synchronized Groups were kept in a light / dark cycle of 12/12 hours and the desynchronized in a light / dark cycle of 11/11 hours for 8 weeks. The tumor development occurred in 32 animals (82.05%), totaling 73 tumors. Melatonin showed beneficial effects on tumor multiplicity, histological grade, tumor size and weight of the animals, while desynchronization did not interfere significantly in breast carcinogenesis.

KEYWORDS: Breast cancer, chronobiology, desynchronization, melatonin and circadian rhythm.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - A terra durante a noite.....	16
Figura 2 – Processo de síntese da melatonina.....	18
Figura 3 – Marco conceitual.....	25

LISTA DE FIGURAS DO ARTIGO

Figure 1 – Randomisation and study interventions	35
Figure 2 – Progression of body weight, stratified by group and week, over the course of the experimental period.....	38
Figure 3 – Percentage of animals with detectable tumours over the course of the experimental period.....	38
Figure 4 – Number of tumours in each group over the course of the experimental period.....	39
Figure 5 – Comparison of mean number of tumours per animal according to study group. * $p \leq 0.05$	40
Figure 6 – Frequency of tumours by group and histological subtype.....	41
Figure 7 – Tumour histology.....	42

LISTA DE TABELAS DO ARTIGO

Table 1 – Sample profile and group randomisation.....	37
Table 2 – Frequency of tumours by group and histological subtype.....	41

LISTA DE ABREVIATURAS

SIGLA	Significado
C	Comprimento do tumor
CLOCK	<i>Circadian Locomotor Output Cycle Kaput</i>
CO ₂	Dióxido de Carbono
DMBA	7,12 dimetilbenzantraceno
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
E	Espessura do tumor
FIPE	Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos
GPPG	Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
HE	Coloração de hematoxilina-eosina
IARC	Agência Internacional para Pesquisa sobre Câncer
L	Largura do tumor
MCF-7	Michigan Cancer Foundation - 7
MIN	Neoplasia Mamária Intraepitelial
NSQ	Núcleo Supraquiasmático
PER	<i>Period</i>
PPGCM	Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas
SPSS	Statistical Program for Social Sciencies
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
X ²	Chi-quadrado

SUMÁRIO

1.	Introdução.....	14
2.	Revisão Bibliográfica.....	15
2.1.	Ritmo Circadiano.....	15
2.2.	Câncer de Mama.....	15
2.3.	Melatonina.....	17
2.4.	Utilização terapêutica de Melatonina.....	20
2.5.	Modelos de Câncer de Mama.....	21
2.6.	Alterações no Ritmo Circadiano e Câncer.....	22
3 -	Marco Conceitual.....	25
4 -	Justificativa.....	26
5 -	Objetivos.....	27
5.1	- Objetivo Geral.....	27
5.2	- Objetivos Específicos.....	27
6	-Referências Bibliográficas.....	28
	ARTIGO ORIGINAL.....	32
	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	49
	Apêndice A.....	50
	APÊNDICE B.....	60
	APÊNDICE C.....	71

1. Introdução

Nos últimos anos tem havido um crescente interesse em investigar o envolvimento de fatores ambientais no desenvolvimento de diferentes tipos de câncer. A luz é o estímulo primário para regulação do ritmo circadiano e ciclos sazonais, além de contribuir para respostas neuroendócrinas^{15, 47 8}. A produção e liberação dos hormônios são distribuídas em um ciclo de 24 horas, o qual pode sofrer interferências do estilo de vida ou exposição a diversos fatores³⁵. A sincronização adequada do ritmo circadiano hormonal é um aspecto importante para manutenção da saúde⁴⁹.

A exposição à luz durante a noite pode causar perturbações nos processos do relógio biológico, como ruptura circadiana e dessincronização do ritmo biológico⁴³. Um dos efeitos da dessincronização circadiana é a supressão da produção de melatonina²⁰, a qual sofre variações de acordo com alguns fatores, como a intensidade, espectro e duração da exposição a luz⁷. Dependendo dessas variáveis a síntese do hormônio pode ocorrer em um ritmo mais lento no início da noite e ter declínio mais rápido no fim da noite²¹.

Estudos epidemiológicos indicam maior risco de câncer de mama em mulheres trabalhadoras de turnos à noite⁵⁰, isso vem sendo explicado pela supressão de melatonina endógena, através da exposição à luz durante a noite⁴¹. A Agência Internacional para Pesquisa sobre Câncer (IARC) recentemente classificou que o trabalho em turnos está envolvido no rompimento circadiano, sendo este um provável cancerígeno para humanos (Grupo 2A), baseando-se em evidências limitadas em humanos e suficientes em experimentos animais para a carcinogenicidade associada à luz durante o período diário de escuro (noite biológica)^{18, 24, 51 22}. Portanto a luz durante a noite pode ser considerada uma exposição ocupacional potencialmente carcinogênica em cuja fisiopatogenia pode estar implicada a secreção alterada de melatonina.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Ritmo Circadiano

O mecanismo interno que organiza os processos biológicos circadianos está localizado no hipotálamo, mais precisamente no núcleo supraquiasmático (NSQ), que é o relógio circadiano mestre dos mamíferos^{37 6}. As informações de claro ou escuro são transmitidas da retina para o NSQ, através do trato retino-hipotalâmico²¹. A luz é seu principal regulador e pode gerar uma mudança de fase no oscilador endógeno do NSQ, sincronizando o indivíduo de acordo com o ciclo dia-noite do ambiente em que está⁶. Além do NSQ, existem osciladores periféricos, como nos intestinos, rins, fígado e coração^{50 41}.

O ciclo claro/escuro é o estímulo ambiental mais importante envolvido aos ajustes diários das fases do ritmo biológico. O tamanho do deslocamento de fase observado em resposta a um estímulo luminoso depende da potência do estímulo e tempo de administração. Pulsos de luz causam atraso de fase quando administrados no início da noite e avanço de fase quando a exposição é no final da noite⁵⁶. A luz é um sincronizador circadiano poderoso nos seres humanos e pode exercer um efeito intenso sobre a fase e a amplitude dos ritmos circadianos^{35, 49}. A mudança de fase circadiana exerce seus efeitos sobre a fisiologia celular, molecular e tecidual, ocorre durante um longo período no qual a sequência temporal dos ritmos biológicos é diferente da encontrada em indivíduos adaptados ao dia e a noite²⁵.

Nos últimos 100 anos, mudamos radicalmente nossos hábitos, passamos a utilizar cada vez mais luzes artificiais, a comer e dormir mais tarde¹. O ser humano passou de um ambiente terrestre de dias claros e noites escuras para um espaço construído, onde passa grande parte do tempo, as noites tornaram-se iluminadas e a exposição à luz solar está cada vez menor⁴⁹. O fotoperíodo ambiental tem sofrido mudanças tão rápidas que não conseguimos nos adaptar fisiologicamente⁴³.

2.2. Câncer de Mama

O câncer de mama é o mais frequente entre as mulheres e principal causa de morte em mulheres entre 40 e 55 anos^{23 39}. É o câncer com as maiores taxas de

mortalidade entre as mulheres do mundo industrializado, sua incidência segue aumentando, no entanto há uma grande variação internacional na sua incidência e mortalidade. As taxas são baixas na África e Ásia, intermediárias no sul da Europa e América Latina, e altas no norte europeu e América do Norte. Nos países industrializados certos tipos de câncer, principalmente de mama e próstata, são mais frequentes do que em países em desenvolvimento ⁴³.



Figura 1 - A terra durante a noite, países desenvolvidos com maior intensidade de iluminação artificial.

A industrialização pode ser um fator determinante no aumento de câncer de mama, mas é preciso investigar quais os aspectos da industrialização influenciam ⁴⁸. O câncer de mama é até cinco vezes mais frequente em países industrializados se comparado aos subdesenvolvidos ⁷. Cerca de 15–20% da população trabalhadora dos países industrializados estão envolvidos em algum tipo de trabalho permanente noturno, trabalhos em revezamento de turno ou em voos intercontinentais com diversos fusos horários. Essas atividades perturbam o ciclo sono/vigília natural,

podem resultar em mudanças no padrão alimentar e alterar a rotina social e familiar²⁵.

Alguns fatores de risco para câncer de mama são conhecidos há anos, como por exemplo, o padrão reprodutivo, idade, radiação ionizante, dieta, história familiar de câncer de mama, ciclo menstrual, e recentemente o álcool^{39 33 54}. Porém, apenas uma parcela dos casos pode ser explicada por esses fatores. A biologia desse câncer é complexa, incluindo vários fatores influentes no desenvolvimento e progressão²³, o relógio circadiano pode desempenhar um importante papel no controle endógeno da progressão do tumor⁴¹. Mesmo quando ainda está no útero materno, o indivíduo está exposto a variações do ambiente, a exposição noturna a luz durante a gestação pode aumentar o risco de câncer de mama nas filhas, isso pode ocorrer de duas formas, através da supressão de melatonina materna e consequente alteração no desenvolvimento do tecido mamário no útero (análogo ao efeito da exposição a baixos níveis de etanol) ou por alterações da programação epigenética dos genes do relógio⁵⁰.

2.3. Melatonina

A melatonina é o principal hormônio secretado pela glândula pineal, capaz de influenciar na secreção de várias glândulas endócrinas, modular o funcionamento do sistema imunológico, contribuindo para defesa do organismo contra patógenos e ferimentos, além de possuir propriedades antioxidantes e oncostáticas^{14, 19, 53}. O principal componente celular da glândula pineal dos mamíferos são os pineócitos, que tem a função de síntese de melatonina, em ratos essas células chegam a 90% da glândula, sendo o restante composto por células gliais e fibras nervosas¹⁴. Também há produção periférica de melatonina, através de tecidos como a retina, timo, trato gastrointestinal e respiratório, pele e medula óssea^{22 27 10 37}, no entanto essa produção não contribui significativamente com os níveis séricos, podendo ter apenas uma ação significativa local de proteção dos tecidos^{2 14}. Sua síntese tem como produto inicial o aminoácido triptofano, os pinealócitos absorvem o triptofano e a enzima triptofano hidroxilase é ativada e o converte em 5-hidroxitriptofano, o próximo passo é a descarboxilase de L-aminoácidos aromáticos que o catalisa a serotonina, que será transformada em N-acetilserotonina pela N-acetiltransferase,

para finalizar o processo a hidroxindol-O-metiltransferase transforma a N-acetilserotonina em melatonina^{53 37}.

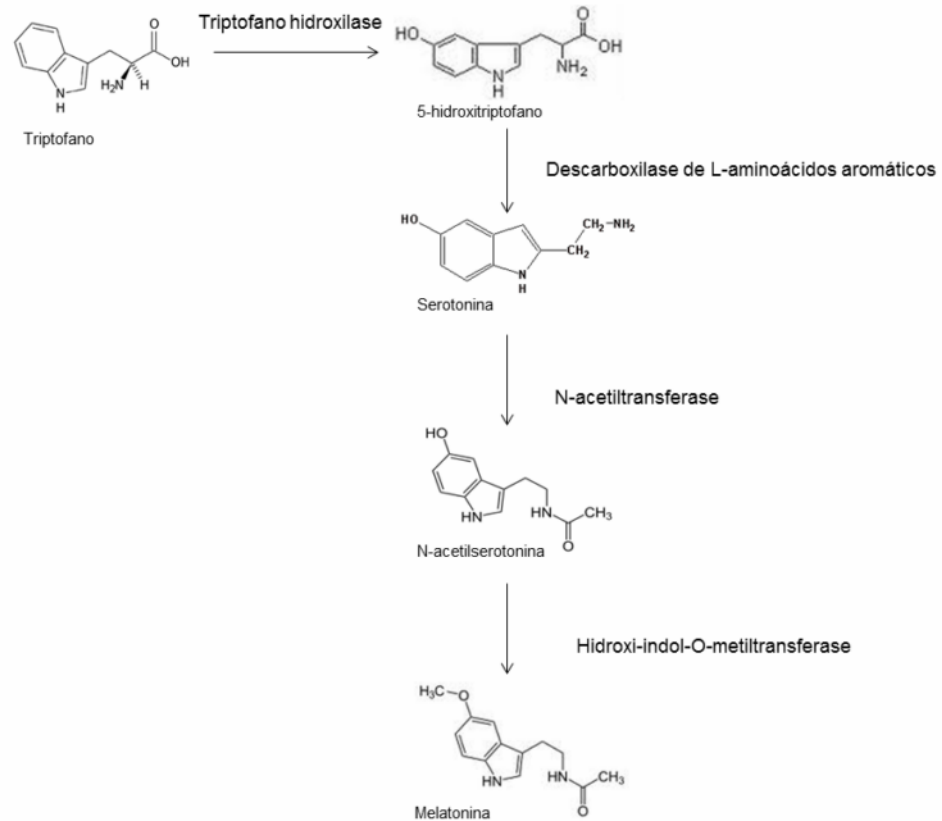


Figura 2 – Processo de síntese da melatonina.

A supressão da função pineal já foi descrita como implicação etiológica a diversos tipos de câncer, incluindo câncer de próstata, mama, ovário e melanoma⁴⁸. Mesmo com diversos estudos sobre a importância da supressão de melatonina noturna e a associação com o aumento do risco de desenvolver câncer, ainda é difícil responder se há uma ligação direta com a diminuição de melatonina e o aumento de câncer de mama³⁵.

A melatonina, por sua característica de alta lipofilicidade, pode facilmente atravessar a membrana citoplasmática e nuclear das células, atingindo os receptores nucleares, alterando o ciclo celular³⁴. No interior das células os níveis de melatonina podem estar maiores do que no sangue, pode ser localizada no núcleo, citoplasma, mitocôndrias e nas membranas. Essa distribuição em nível intracelular

contribui para redução do dano oxidativo nessas regiões, protege os lipídeos das membranas, proteínas do citoplasma e Ácido Desoxirribonucleico (DNA) do núcleo⁵³. Uma de suas funções é na divisão celular, a melatonina é capaz de inibir a mitose, ocasionando um atraso parcial na metáfase⁵³. Aumenta mais de três horas o ciclo celular e diminui a síntese de DNA em culturas de células Michigan Cancer Foundation - 7 (MCF-7). Há hipótese em estudo de que a melatonina possa induzir a célula MCF-7 a entrar em apoptose³⁴.

A produção diária de melatonina demonstra uma impressionante organização, com picos a cada noite e níveis muito baixos durante o dia⁸. Em condições normais, os níveis de melatonina atingem seu pico entre as 2 e as 4 horas e seu declínio no dia é das 7 às 9 horas²¹, os picos são maiores nas noites de inverno do que em noites de verão⁴⁹. Essa organização é regulada por fatores biológicos como o ritmo circadiano e idade, além de fatores ambientais, como a exposição à luz e sazonalidade^{57 36}. A liberação de melatonina é controlada por variações sazonais, influenciadas por mudanças no fotoperíodo, controla os ritmos circadianos e o ciclo de reprodução em animais reprodutores sazonais¹.

Em indivíduos que secretam pequenas quantidades de melatonina, o pico de secreção durante a noite fica entre 18 – 40 pg/mL e nos de secreção elevada os níveis podem variar de 54 – 75 pg/mL. A população normal tem baixos níveis durante o dia, podendo variar de 0 – 20 pg/mL. Na bile e no líquor os níveis de melatonina estão mais elevados que no sangue, 90% da melatonina sofre efeito de primeira passagem pelo fígado. O ritmo de secreção da melatonina é estabelecido aos seis meses de idade, tendem a diminuir com a idade, chegando a ser em idosos a metade dos níveis encontrados em jovens¹⁰. Em indivíduos saudáveis a secreção não é diferente entre homens e mulheres. Várias doenças alteram os níveis de melatonina no soro e seus metabólitos na urina, gerando valores inferiores aos esperados⁵³. O aumento de melatonina noturna é um dos mecanismos capaz de inibir a migração dos leucócitos para os tecidos¹⁴.

A melatonina exerce uma ação sobre glândulas e outros hormônios, como é o caso do estrogênio que estimula a proliferação de tecido mamário.⁴⁸ e tem seus níveis plasmáticos aumentados quando a melatonina está suprimida⁴⁹. Estudos observacionais e experimentais confirmam o papel interno e externo do estrogênio

na etiologia do câncer de mama ²³. É importante lembrarmos que no decorrer da vida as mulheres estão expostas a hormônios sexuais naturais e sintéticos, como durante o uso de contraceptivo oral e reposição hormonal. Os esteróides são essenciais para o crescimento e desenvolvimento mamários, entretanto estão associados à proliferação anormal de células ⁴.

Há no mínimo três possíveis mecanismos para explicar os níveis reduzidos de melatonina e o surgimento de tumores, por meio do aumento da proliferação das células-tronco em risco, por estimular a proliferação de células alteradas ou por ocasionar prejuízo à função imunológica ⁴⁸. O efeito protetor da melatonina também pode ser explicado por reforçar o sistema imune, remover radicais livres e pela expressão do gene supressor de tumor *p53*. Reduções nas concentrações de melatonina podem perturbar o sistema imunológico, aumentando estradiol, assim como a atividade da 5-lipoxigenase, redução de interleucina-2, diminuição de células natural killer, suprimindo os efeitos da melatonina sobre os glicocorticóides e imunossupressores ¹.

2.4. Utilização terapêutica de Melatonina

A terapia com melatonina foi testada para tratamento de transtornos de sono, envelhecimento, Jet lag, esclerose tuberosa e Alzheimer ⁵³. Em estudos experimentais a melatonina desempenha um papel fundamental na regulação da reprodução sazonal ³², atividades do ritmo circadiano, fisiologia da retina, efeitos cardiovasculares, função do sistema imunológico e câncer ⁷.

As concentrações farmacológicas de melatonina têm ação oncostática *in vivo* e *in vitro* ¹⁵. A melatonina tem sido frequentemente utilizada em indivíduos sem apresentar graves efeitos colaterais, ao contrário, pacientes em estágio terminal do câncer apresentam uma melhora na qualidade de vida ⁵³. *In vitro*, o efeito inibitório da melatonina depende de inúmeros fatores, tais como a concentração de melatonina no meio de cultura, ritmicidade da exposição à melatonina, condições de cultivo, status do receptor de estrogênio nas células, presença de fatores hormonais, taxa de proliferação celular, dentre outros ¹⁵. Hill et al. realizou cultivo de células

MCF7, suplementando melatonina ao meio de cultura, em concentrações inferiores, normais e superiores aos valores de secreção endógena, as concentrações fisiológicas foram as que apresentaram os melhores resultados de inibição de crescimento celular, não houve variação significativa entre os outros grupos ²⁶. *In vivo* e *in vitro* a melatonina protege células saudáveis da radiação e quimioterapia ⁵³.

Lenoir et. al. comprovou que a melatonina pode inibir a formação de danos ao DNA por sua ação antioxidante, em seu estudo houve administração de melatonina 15 dias antes da indução tumoral e após 60 dias. Nas ratas que receberam tratamento pré-indução o efeito protetor da melatonina persistiu por sete meses, enquanto nas de tratamento pós-indução foi de até dez meses, não houve diferença estatística entre o tratamento preventivo ou curativo ³².

2.5. Modelos de Câncer de Mama

Os modelos carcinogênicos em animais são bem definidos em fatores genéticos e ambientais. A rata é um modelo largamente utilizado para estudar risco de câncer de mama e mecanismos de carcinogênese, porque a glândula mamária humana e das ratas tem estrutura e funções semelhantes ^{9 44}, portanto o câncer de mama em ratas é comparável, em muitos aspectos, ao câncer de mama humano, ambos tem alta frequência à dependência hormonal e patologicamente progressão da hiperplasia ductal e carcinoma ductal *in situ* ²⁸. Estudos com câncer de mama espontâneo não são viáveis, tendo em vista o alto custo e elevado tempo de experimento⁴⁴, em um estudo foi observado que apenas 30% das ratas desenvolveram tumores mamários em um período de até 18 meses ³⁸.

Um modelo de câncer de mama amplamente utilizado é o de indução por 7,12 dimetilbenzantraceno (DMBA) ^{3-5, 13, 31, 32, 45, 46}. O DMBA é um hidrocarboneto aromático policíclico, considerado agente cancerígeno incompleto porque requer ativação metabólica pelo citocromo P450 para exercer sua ação neoplásica ⁴⁰. Durante a ativação metabólica o DMBA é transformado em 3,4-dihydro-diol-1,2-epoxide ³², isso gera uma cascata de metabólicos, com produção de radicais livres,

provocando danos oxidativos à estrutura e as funções do DNA, proteínas e lipídeos⁴⁰.

Modelos de carcinogênese mamária induzida quimicamente em roedores, têm geralmente, o início do desenvolvimento do tumor no 7º dia após a administração do agente carcinogênico⁵². O DMBA não induz carcinogênese mamária em ratas ovariectomizadas, indicando a dependência de secreções ovarianas³².

Barros e colaboradores desenvolveram um modelo experimental de carcinogênese mamária com DMBA. Houve altas taxas de desenvolvimento tumoral, na 5ª semana de experimento foi observado o primeiro tumor mamário, sendo que na 8ª semana 80% dos animais apresentavam tumores e na 13ª semana todas as ratas tinham ao menos um tumor mamário. O tamanho dos tumores ficou entre 0,5 e 5 cm (média de 1,8 cm). As neoplasias foram classificadas como adenocarcinomas, o tipo mais recorrente foi carcinoma adenóide cístico, não houve metástases³.

As ratas Sprague-Dawley tem uma maior sensibilidade a carcinogênese quimicamente induzida do que outras linhagens³¹. A idade indicada para administração do DMBA é entre o 40º e 46º dias de vida dos animais, esse período corresponde ao momento no qual a glândula mamária apresenta maior densidade de proliferação e diferenciação. A administração no final da tarde apresenta maior incidência de tumores, quando comparou-se diferentes horários de administração³¹.

2.6. Alterações no Ritmo Circadiano e Câncer

Doenças neoplásicas são caracterizadas por alterações na secreção hormonal, essas mudanças podem ser qualitativas, quando há perda da ritmicidade circadiana ou quantitativas, havendo diminuição ou aumento dos níveis séricos. A mudança de fase circadiana exerce seus efeitos sobre a fisiologia celular, molecular e tecidual, ocorre durante um longo período no qual a sequência temporal dos ritmos biológicos é diferente da encontrada em indivíduos adaptados ao dia e a noite²⁵.

O trabalho noturno é menos prejudicial a biologia circadiana do que em turnos rotativos, isso se deve a possibilidade dos trabalhadores noturnos se adaptarem a essa situação. No entanto, o ajuste completo é raro, porque durante os dias de folga o indivíduo volta ao seu ritmo biológico natural²⁴. Em avaliações dos níveis de melatonina em trabalhadores noturnos não foi identificado um ritmo, o que demonstra a falta de adaptação do indivíduo⁴⁷. Provavelmente haja componentes genéticos que interferem na capacidade do indivíduo adaptar-se a ruptura do ritmo circadiano. Sendo assim, através do genótipo seria possível definir grupos com maior susceptibilidade ao trabalho em turnos, incluindo o efeito sobre a melatonina¹⁶.

As células tumorais expressam os mesmo genes do relógio encontrados no NSQ, muitos elementos moleculares são compartilhados entre o relógio circadiano e o ciclo celular⁷. Até o momento, aproximadamente dez genes circadianos foram identificados em mamíferos, incluindo *Per1/2/3*, *Cry 1/2*, *Bmal1*, *Clock*, and *casein kinase 1 delta/epsilon* (CK1 δ/ϵ)^{11, 12, 17}. Os genes circadianos podem funcionar como supressores tumorais, tendo ligação com a proliferação celular, apoptose, controle do ciclo celular e resposta a danos ao DNA. Alterações nos genes circadianos podem resultar em instabilidade genômica e acelerar a proliferação celular, favorecendo a carcinogênese⁴². Evidências sugerem que os genes circadianos podem afetar as funções do tecidos, interferindo na regulação do ciclo celular e tumorigênese^{29, 55}.

Os genes *Period* (*Per1*, *Per2* e *Per3*) tem papel importante no controle da proliferação celular e apoptose, processos essenciais para supressão tumoral³⁰. Uma mutação no relógio circadiano, como no gene *Per2* resulta no aumento da tumorigênese espontânea em camundongos, enquanto um risco elevado de câncer de mama antes da menopausa tem sido associado ao polimorfismo no gene *Per3*⁴². As células tumorais do câncer de mama têm 95% mais distúrbios nos três genes *Per* que as células normais próximas⁴². A inativação de genes *Per* nas células do câncer de mama resulta na desregulação do ciclo celular, beneficiando a sobrevivência celular e proliferação do tumor. O gene *Per2* é expresso endogenamente nas células epiteliais mamárias humanas, mas seus níveis são reduzidos ou inexistentes nas linhagens tumorais, sua expressão nas células cancerígenas ocasiona inibição do

crescimento celular e indução da apoptose ³⁹. Alterações na expressão dos genes *Per* têm sido relatadas em outros tipos de tumores, como de próstata, carcinoma endometrial, ovário e leucemias ^{11, 42}.

3 - Marco Conceitual

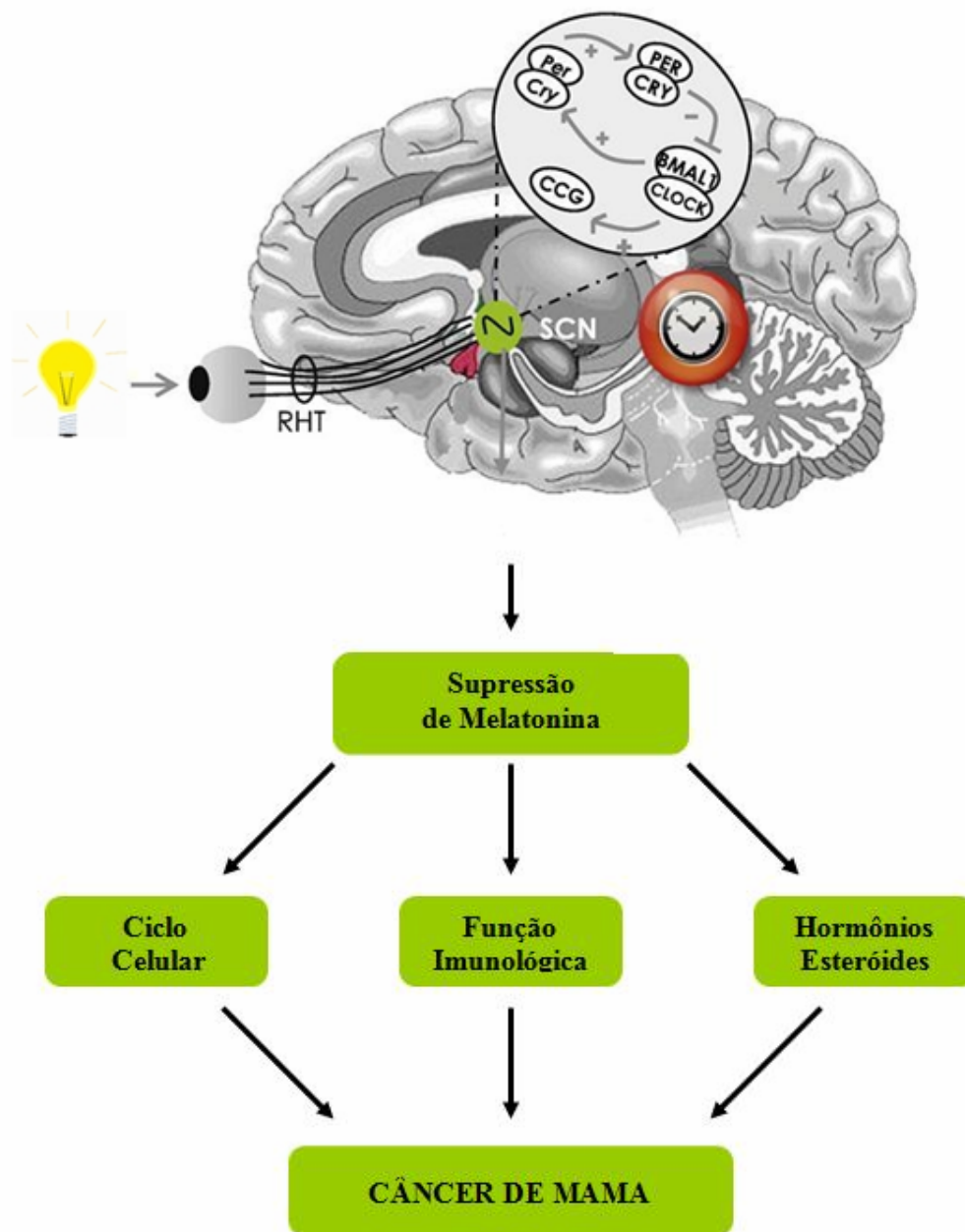


Figura 3 - A dessincronização do ritmo circadiano desencadeada pela exposição à luz durante a noite ou a predisposição ocasionada por alterações nos genes do relógio circadiano interferem na secreção de diversos hormônios, dentre eles a melatonina. A supressão de melatonina afeta o controle do ciclo celular, potencializa a depressão da função imunológica e influencia os hormônios esteróides, os quais estão diretamente envolvidos na carcinogênese mamária.

4 - Justificativa

O câncer de mama tem sido o principal causador de morte por câncer em mulheres no mundo industrializado e suas taxas de incidências seguem aumentando, no entanto, pouco se conhece a respeito dos efeitos causados pela dessincronização circadiana sobre o desenvolvimento tumoral.

Alguns fatores de risco para câncer de mama são conhecidos há anos, como por exemplo, o padrão reprodutivo, idade, radiação ionizante, história familiar de câncer de mama, ciclo menstrual, e recentemente o álcool. Porém, apenas uma parcela dos casos pode ser explicada por esses fatores. A biologia desse câncer é complexa e necessita maiores investigações a respeito de possíveis agentes agravantes dos tumores.

Considerando a hipótese de a dessincronização afetar significativamente o desenvolvimento do câncer, julgou-se pertinente investigar o papel da melatonina como agente terapêutico. Estudos comprovam que a melatonina tem ação protetora sobre diferentes tumores, incluindo o câncer de mama, porém os estudos não consideraram a dessincronização circadiana.

5 - Objetivos

5.1 - Objetivo Geral

Avaliar o efeito da dessincronização circadiana sobre o câncer de mama e a utilização terapêutica de melatonina em ratas Sprague-Dawley.

5.2 - Objetivos Específicos

- Observar se o descarrilhamento do ritmo circadiano das ratas afeta o desenvolvimento dos tumores.
- Analisar a multiplicidade de tumores em ratas dessincronizadas.
- Comparar o desenvolvimento tumoral dos grupos tratados e não tratados com melatonina.
- Avaliar se o tratamento com melatonina é capaz de minimizar os efeitos da dessincronização circadiana.

6 -Referências Bibliográficas

- 1 Baldwin WS, Barrett JC (1998). Melatonin: receptor-mediated events that may affect breast and other steroid hormone-dependent cancers. *Mol Carcinog* 21: 149-155.
- 2 Barrenetxe J, Delagrange P, Martinez JA (2004). Physiological and metabolic functions of melatonin. *Journal of physiology and biochemistry* 60: 61-72.
- 3 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.
- 4 Benakanakere I, Besch-Williford C, Schnell J, Brandt S, Ellersieck MR, Molinolo A *et al* (2006). Natural and synthetic progestins accelerate 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-initiated mammary tumors and increase angiogenesis in Sprague-Dawley rats. *Clin Cancer Res* 12: 4062-4071.
- 5 Benakanakere I, Besch-Williford C, Ellersieck MR, Hyder SM (2009). Regression of progestin-accelerated 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced mammary tumors in Sprague-Dawley rats by p53 reactivation and induction of massive apoptosis: a pilot study. *Endocr Relat Cancer* 16: 85-98.
- 6 Berson DM, Dunn FA, Takao M (2002). Phototransduction by retinal ganglion cells that set the circadian clock. *Science* 295: 1070-1073.
- 7 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.
- 8 Brainard GC, Hanifin JP, Greeson JM, Byrne B, Glickman G, Gerner E *et al* (2001). Action spectrum for melatonin regulation in humans: evidence for a novel circadian photoreceptor. *J Neurosci* 21: 6405-6412.
- 9 Cardiff RD, Wellings SR (1999). The comparative pathology of human and mouse mammary glands. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 4: 105-122.
- 10 Carpentieri A, Diaz de Barboza G, Areco V, Peralta Lopez M, Tolosa de Talamoni N (2012). New perspectives in melatonin uses. *Pharmacol Res* 65: 437-444.
- 11 Chen ST, Choo KB, Hou MF, Yeh KT, Kuo SJ, Chang JG (2005). Deregulated expression of the PER1, PER2 and PER3 genes in breast cancers. *Carcinogenesis* 26: 1241-1246.
- 12 Chung SA, Wolf TK, Shapiro CM (2009). Sleep and health consequences of shift work in women. *J Womens Health (Larchmt)* 18: 965-977.
- 13 Costa I, Solanas M, Escrich E (2002). Histopathologic characterization of mammary neoplastic lesions induced with 7,12 dimethylbenz(alpha)anthracene in the rat: a comparative analysis with human breast tumors. *Arch Pathol Lab Med* 126: 915-927.

- 14 da Silveira Cruz-Machado S, Pinato L, Tamura EK, Carvalho-Sousa CE, Markus RP (2012). Glia-pinealocyte network: the paracrine modulation of melatonin synthesis by tumor necrosis factor (TNF). *PLoS One* 7: e40142.
- 15 Dauchy RT, Blask DE, Sauer LA, Brainard GC, Krause JA (1999). Dim light during darkness stimulates tumor progression by enhancing tumor fatty acid uptake and metabolism. *Cancer Lett* 144: 131-136.
- 16 Davis S, Mirick DK (2006). Circadian disruption, shift work and the risk of cancer: a summary of the evidence and studies in Seattle. *Cancer Causes Control* 17: 539-545.
- 17 Ebisawa T (2007). Circadian rhythms in the CNS and peripheral clock disorders: human sleep disorders and clock genes. *J Pharmacol Sci* 103: 150-154.
- 18 Erren TC (2010). Shift work, cancer and "white-box" epidemiology: Association and causation. *Epidemiol Perspect Innov* 7: 11.
- 19 Fernandes PA, Bothorel B, Clesse D, Monteiro AW, Calgari C, Raison S *et al* (2009). Local corticosterone infusion enhances nocturnal pineal melatonin production in vivo. *J Neuroendocrinol* 21: 90-97.
- 20 Figueiro MG, Rea MS, Bullough JD (10 August 2006). Does architectural lighting contribute to breast cancer? *J Carcinog* 5: doi:10.1186/1477-3163-1185-1120.
- 21 Figueiro MG, Bierman A, Plitnick B, Rea MS (27 August 2009). Preliminary evidence that both blue and red light can induce alertness at night. *BMC Neurosci* 10: doi:10.1186/1471-2202-1110-1105.
- 22 Greene MW (2012). Circadian rhythms and tumor growth. *Cancer Lett* 318: 115-123.
- 23 Hansen J (2006). Risk of breast cancer after night- and shift work: current evidence and ongoing studies in Denmark. *Cancer Causes Control* 17: 531-537.
- 24 Hansen J, Stevens RG (2011). Case-control study of shift-work and breast cancer risk in Danish nurses: Impact of shift systems. *Eur J Cancer*.
- 25 Haus E, Smolensky M (2006). Biological clocks and shift work: circadian dysregulation and potential long-term effects. *Cancer Causes Control* 17: 489-500.
- 26 Hill SM, Blask DE (1988). Effects of the pineal hormone melatonin on the proliferation and morphological characteristics of human breast cancer cells (MCF-7) in culture. *Cancer Res* 48: 6121-6126.
- 27 Hill SM, Frasch T, Xiang S, Yuan L, Duplessis T, Mao L (2009). Molecular mechanisms of melatonin anticancer effects. *Integr Cancer Ther* 8: 337-346.
- 28 Imaoka T, Nishimura M, Iizuka D, Daino K, Takabatake T, Okamoto M *et al* (2009). Radiation-induced mammary carcinogenesis in rodent models: what's different from chemical carcinogenesis? *J Radiat Res (Tokyo)* 50: 281-293.
- 29 James FO, Cermakian N, Boivin DB (2007). Circadian rhythms of melatonin, cortisol, and clock gene expression during simulated night shift work. *Sleep* 30: 1427-1436.

- 30 Jung B, Ahmad N (2006). Melatonin in cancer management: progress and promise. *Cancer Res* 66: 9789-9793.
- 31 Kubatka P, Ahlersova E, Ahlers I, Bojkova B, Kalicka K, Adamekova E *et al* (2002). Variability of mammary carcinogenesis induction in female Sprague-Dawley and Wistar:Han rats: the effect of season and age. *Physiol Res* 51: 633-640.
- 32 Lenoir V, de Jonage-Canonico MB, Perrin MH, Martin A, Scholler R, Kerdelhue B (2005). Preventive and curative effect of melatonin on mammary carcinogenesis induced by dimethylbenz[a]anthracene in the female Sprague-Dawley rat. *Breast Cancer Res* 7: R470-476.
- 33 Llaverias G, Danilo C, Mercier I, Daumer K, Capozza F, Williams TM *et al* (2011). Role of cholesterol in the development and progression of breast cancer. *Am J Pathol* 178: 402-412.
- 34 Mediavilla MD, Cos S, Sanchez-Barcelo EJ (1999). Melatonin increases p53 and p21WAF1 expression in MCF-7 human breast cancer cells in vitro. *Life Sci* 65: 415-420.
- 35 Mirick DK, Davis S (2008). Melatonin as a biomarker of circadian dysregulation. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 17: 3306-3313.
- 36 Nathan PJ, Wyndham EL, Burrows GD, Norman TR (2000). The effect of gender on the melatonin suppression by light: a dose response relationship. *J Neural Transm* 107: 271-279.
- 37 Pevet P, Challet E (2011). Melatonin: both master clock output and internal time-giver in the circadian clocks network. *Journal of physiology, Paris* 105: 170-182.
- 38 Prejean JD, Peckham JC, Casey AE, Griswold DP, Weisburger EK, Weisburger JH (1973). Spontaneous tumors in Sprague-Dawley rats and Swiss mice. *Cancer Res* 33: 2768-2773.
- 39 Proietti S, Cucina A, Reiter RJ, Bizzarri M (2012). Molecular mechanisms of melatonin's inhibitory actions on breast cancers. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*.
- 40 Pugalendhi P, Manoharan S, Panjamurthy K, Balakrishnan S, Nirmal MR (2009). Antigenotoxic effect of genistein against 7,12-dimethylbenz[a]anthracene induced genotoxicity in bone marrow cells of female Wistar rats. *Pharmacol Rep* 61: 296-303.
- 41 Rana S, Mahmood S (2010). Circadian rhythm and its role in malignancy. *J Circadian Rhythms* 8: 1-13.
- 42 Rana S, Mahmood S (2010). Circadian rhythm and its role in malignancy. *J Circadian Rhythms* 8: 3.
- 43 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.
- 44 Rezende LFdC, Eunice Cristina da Silva; Schenka, Natália Guimarães de Moraes; Schenka, André de Almeida; Untura, Lindsay Pâmela; Uemura, Gilberto. (2010). Induction

of experimental mammary carcinogenesis in rats with 7,12-dimethylbenz(a)anthracene. *Revista Brasileira de Mastologia* 20: 76-79.

45 Russo J, Russo IH (2000). Atlas and histologic classification of tumors of the rat mammary gland. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 5: 187-200.

46 Samy RP, Gopalakrishnakone P, Ignacimuthu S (2006). Anti-tumor promoting potential of luteolin against 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced mammary tumors in rats. *Chem Biol Interact* 164: 1-14.

47 Schernhammer ES, Laden F, Speizer FE, Willett WC, Hunter DJ, Kawachi I *et al* (2001). Rotating night shifts and risk of breast cancer in women participating in the nurses' health study. *J Natl Cancer Inst* 93: 1563-1568.

48 Stevens RG, Davis S, Thomas DB, Anderson LE, Wilson BW (1992). Electric power, pineal function, and the risk of breast cancer. *FASEB J* 6: 853-860.

49 Stevens RG, Rea MS (2001). Light in the built environment: potential role of circadian disruption in endocrine disruption and breast cancer. *Cancer Causes Control* 12: 279-287.

50 Stevens RG (2009). Working against our endogenous circadian clock: Breast cancer and electric lighting in the modern world. *Mutat Res* 680: 106-108.

51 Stevens RG (2009). Light-at-night, circadian disruption and breast cancer: assessment of existing evidence. *Int J Epidemiol* 38: 963-970.

52 Thompson HJ (1994). Effect of exercise intensity and duration on the induction of mammary carcinogenesis. *Cancer Res* 54: 1960s-1963s.

53 Vijayalaxmi, Thomas CR, Jr., Reiter RJ, Herman TS (2002). Melatonin: from basic research to cancer treatment clinics. *J Clin Oncol* 20: 2575-2601.

54 Viswanathan AN, Schernhammer ES (2009). Circulating melatonin and the risk of breast and endometrial cancer in women. *Cancer Lett* 281: 1-7.

55 Wang XS, Armstrong ME, Cairns BJ, Key TJ, Travis RC (2011). Shift work and chronic disease: the epidemiological evidence. *Occup Med (Lond)* 61: 78-89.

56 Warman VL, Dijk DJ, Warman GR, Arendt J, Skene DJ (2003). Phase advancing human circadian rhythms with short wavelength light. *Neurosci Lett* 342: 37-40.

57 Zhang R, Hrushesky WJ, Wood PA, Lee SH, Hunt RC, Jahng WJ (2010). Melatonin reprogrammes proteomic profile in light-exposed retina in vivo. *Int J Biol Macromol* 47: 255-256.

ARTIGO ORIGINAL

EFFECTS OF MELATONIN AND EXPOSURE TO DIFFERENT LIGHT/DARK CYCLES IN AN ANIMAL MODEL OF MAMMARY CARCINOGENESIS

Etianne Martini Sasso^{1 2}, Diego Mendonça Uchoa³, Maria Paz Hidalgo^{2 4}.

1- Postgraduate Program in Medicine: Medical Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

2- Chronobiology Laboratory, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA)

3- Department of Pathology, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

4- Postgraduate Program in Medicine: Medical Sciences, UFRGS School of Medicine

Financial support was provided by the HCPA Research and Event Incentive Fund (FIPE).

ABSTRACT

Breast cancer is the most common type of cancer in women and the leading cause of death in women aged 40–55. Despite variation between countries, overall rates of breast cancer are increasing worldwide, and are up to fivefold greater in developed nations. Industrialisation leads to increased night-time exposure to light, which suppresses melatonin. Melatonin, the main hormone secreted by the pineal gland, exerts oncostatic and antioxidant effects and is involved in control of the cell cycle, immune function, and steroid hormones. The purpose of this study was to assess the effect of melatonin therapy on mammary carcinogenesis in rats exposed or not exposed to desynchronization of circadian rhythms. Mammary carcinogenesis was induced by intra-gastric administration of DMBA in 39 female Sprague-Dawley rats (age 41–46 days). Animals were randomly allocated into four groups: synchronised no intervention, desynchronised no intervention, synchronised with melatonin, and desynchronised with melatonin. The synchronized groups were kept on a 12/12-hour light/dark cycle, and the desynchronized groups on a 11/11-hour cycle, for 8 weeks. Tumour development occurred in 32 animals (82.05%) for a total of 73 tumours. Melatonin was found to have beneficial effects on tumour multiplicity,

histological grade, tumour size, and body weight. Desynchronization of circadian rhythms had no significant effects on mammary carcinogenesis.

INTRODUCTION

Breast cancer is the most common type of malignancy in women and the leading cause of death in women aged 40 to 55 years^{13 22}. In Brazil, breast cancer was responsible for 12.852 deaths (147 men, 12 705 women) in 2010 alone, and 52.680 new cases were expected to occur in 2012¹⁷. Incidence and mortality rates are increasing worldwide, although there is substantial variation across countries; the frequency of breast cancer is up to fivefold higher in developed nations⁴. Industrialization may be a determinant of the rise in breast cancer cases²⁶. Approximately 15–20% of the working population of industrialized nations is involved in permanent night working or shift work, activities that disrupt the natural sleep–wake cycle and lead to changes in dietary patterns and social and family routines; this is thought to be one of the underlying factors of increasing breast cancer rates in the developed world¹⁵.

Epidemiological studies have reported increased risk of breast cancer in female shift workers²⁷. This phenomenon has been explained by suppression of endogenous melatonin due to night-time exposure to light²³. The International Agency for Research on Cancer (IARC) recently classified shift work that involves circadian disruption as probably carcinogenic to humans (Group 2A), based on limited evidence of carcinogenicity in humans and sufficient evidence of carcinogenicity in experimental animals due to light exposure during biological night^{8, 14, 28 11}. Therefore, exposure to light at night may be regarded as a potentially carcinogenic occupational exposure.

Night-time light exposure may lead to biological clock disturbances (chronodisruption), such as desynchronization of circadian rhythms²⁴. Suppression of melatonin production is one of the effects of this phenomenon⁹, and varies according to the intensity, spectrum, and duration of exposure⁴. Depending on these variables, melatonin synthesis may occur at a slower pace in the evening and decline more sharply late at night¹⁰.

Melatonin is the main hormone secreted by the pineal gland. It can influence secretion by various endocrine glands, modulate immune function, and possesses antioxidant and oncostatic action²⁹. Melatonin is also released peripherally from such tissues as the retina, thymus, gastrointestinal and respiratory tract, skin, and bone marrow^{11 16 6 21}, but the action of peripherally secreted melatonin has only local significance². Central melatonin synthesis is controlled by noradrenaline release at the sympathetic nerves. Pinealocytes absorb the amino acid tryptophan, which is converted to 5-hydroxytryptophan in a reaction catalysed by the enzyme tryptophan hydroxylase. 5-hydroxytryptophan is then metabolised by 5-hydroxytryptophan decarboxylase (aromatic L-amino acid decarboxylase) into 5-hydroxytryptamine (serotonin), which will then undergo acetylation to *N*-acetylserotonin (normelatonin) by serotonin *N*-acetyltransferase. Finally, acetylserotonin *O*-methyltransferase converts *N*-acetylserotonin into melatonin^{29 6 2}.

Melatonin therapy has been tested as a potential treatment option in sleep disorders, ageing, jetlag, tuberous sclerosis, and Alzheimer's disease²⁹. In experimental studies, melatonin has been shown to play an essential role in the regulation of seasonal reproduction¹⁸, circadian rhythm-mediated activities, retinal physiology, cardiovascular physiology, immune function, and cancer⁴.

Suppression of melatonin interferes with cell cycle control, potentiates immunosuppression, and influences steroid hormones, which are directly involved in mammary carcinogenesis. In view of these mechanisms, the purpose of this study was to assess the effect of melatonin on the development of mammary tumours in female rats exposed or not to desynchronization of circadian rhythms.

METHODS

Animals: The study sample comprised 39 female Sprague-Dawley rats (age 41–46 days, weight 147.85 ± 13.39 g). All were kept in a climate-controlled environment (room temperature 22–24°C, relative humidity 55–65%) and given access to water and chow ad lib. The animals were randomly allocated into four groups: synchronised without melatonin, desynchronised without melatonin, synchronised with melatonin, and desynchronised with melatonin. All study procedures were conducted in

accordance with the NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and approved by the Hospital de Clínicas de Porto Alegre Research Ethics Committee (no. 11-0353). Experiments were conducted over a period of 61 days. On day 1, animals were exposed to the carcinogen and desynchronization was begun. A flowchart of randomisation procedures and study interventions is shown in Figure 1.

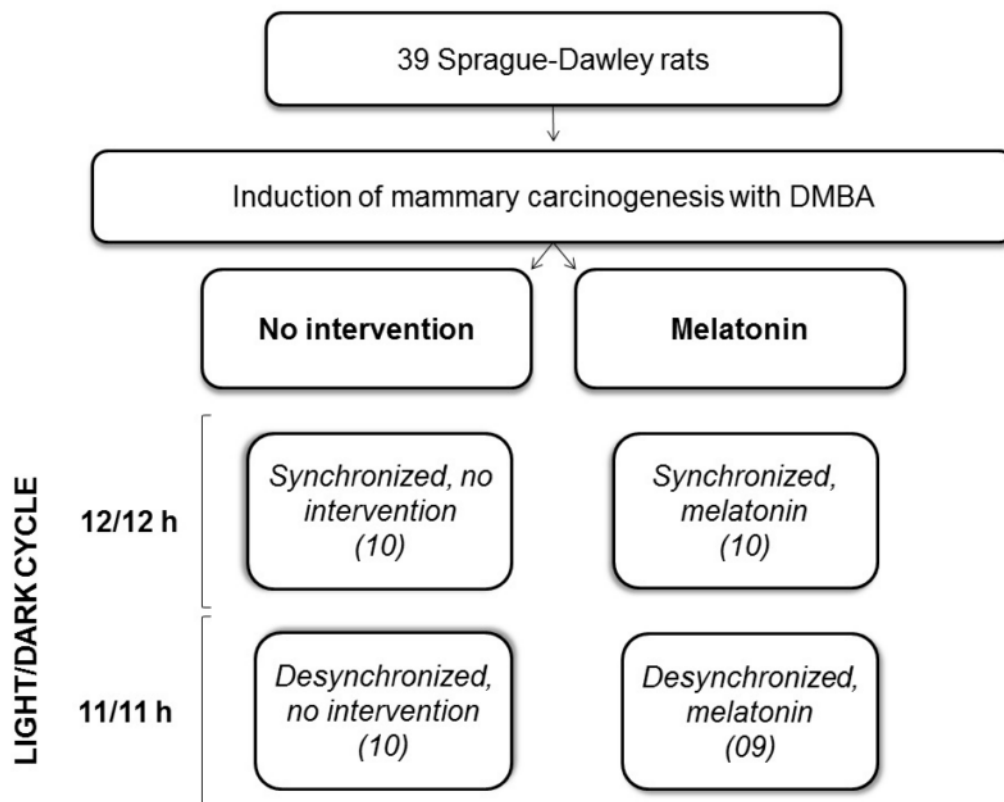


Figure 1 – Randomisation and study interventions.

Light/dark cycle: Animals in the Synchronised groups were kept on a 12/12-hour light/dark cycle (light phase from 0700 to 1900), whereas those in the Desynchronised groups were subjected to an 11/11-hour light/dark cycle, as described previously by Cambras et al⁵.

Induction of cancer: Carcinogenesis was induced by means of intra-gastric administration of a single 20-mg dose of 7,12-dimethylbenz[*a*]anthracene (DMBA) in 1 mL soybean oil³.

Treatment: Animals in the intervention groups received 10 mg/Kg melatonin in 1 mL 1% hydroxyethyl cellulose once daily, administered by gavage within 3 hours before the onset of the dark phase. Untreated animals received only 1% hydroxyethyl cellulose once daily via the same route and at the same time as melatonin was administered to the intervention groups.

Evaluating the induction: To monitor tumour development and growth mammary glands were palpated once weekly, by an experienced investigator blinded to group allocation.. Body weight was measured twice weekly. On day 61, all rats were killed in a CO₂ chamber, dissected, and mammary tumours resected. Tumour dimensions (width [W], length [L], and thickness [T]) were measured with callipers, and tumour size calculated using the formula $W / 2L / 2\pi$.

Histology: Tumours specimens were fixated in 10% formaldehyde, placed onto histological slides, stained with haematoxylin and eosin (H&E), and examined under light microscopy. The Annapolis nomenclature system was used for tumour classification.

Statistical Analysis: Results were expressed as mean \pm standard deviation. Student's *t*-test and the chi-square test (χ^2) were used for calculation of between-group differences. P-values \leq 0.05 were considered significant. All statistic al analyses were carried out in SPSS for Windows 17 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

RESULTS

Tumour development occurred as expected. Eight weeks after DMBA administration, 32 animals (82.05%) had at least one palpable mammary tumour, for a total of 73 tumours (mean, 1.87 ± 1.79 tumours per animal). The first tumour was detected on day 35 of the experiment. No animals had any evidence of metastasis on post-mortem examination. Key study findings are summarised in Table 1.

Table 1 – Sample profile and group randomisation

	Synchronised, no intervention	Desynchronised, no intervention	Synchronised, melatonin	Desynchronised, melatonin	All groups
No of animals	10	10	10	9	39
Weight at group randomisation (mean \pm SD) - g	148.08 \pm 16.83	143.39 \pm 14.79	152.46 \pm 9.87	147.44 \pm 11.24	147.85 \pm 13.39
No. of tumours	27	26	12	8	73
No. tumours per animal (mean \pm SD)	2.7 \pm 1.77	2.6 \pm 2.46	1.2 \pm 0.63	0.8889 \pm 1.17	1.87 \pm 1.79
Tumour weight (mean \pm SD) - g	0.740 \pm 1.091	0.950 \pm 1.538	1.847 \pm 3.925	1.510 \pm 2.425	1.082 \pm 2.085
Tumour size (mean \pm SD)	131.68 \pm 120.46	139.31 \pm 151.38	197.04 \pm 218.36	169.24 \pm 193.43	149.26 \pm 157.15
MIN or <i>in situ</i> (%)	22 (81.48%)	21 (80.77%)	10 (83.33%)	5 (62.50%)	58 (79.45%)
Adenocarcinoma (%)	5 (18.52%)	5 (19.23%)	2 (16.67%)	3 (37.50%)	15 (20.55%)

Body weight was also assessed in this study. Although the only significant difference in this parameter was observed between the Synchronised no intervention and Desynchronised no intervention groups, and even so, only on weeks 6 and 8 ($t = -2.180$, $p = 0.043$ and $t = -2.121$, $p = 0.048$ respectively), from week 3 onwards, body weight in the Desynchronised no intervention group exceeded that of all other groups and remained greater until the end of the experiment. It bears stressing that the greatest change was detected in untreated animals; rats in the Desynchronised no intervention group experienced a 71.29% increase in weight during the experiment period, versus 56.93% in the Synchronised no intervention group, 52.56% in the Synchronised with melatonin group, and 62.52% in the Desynchronised with melatonin group. Mean body weight in each group, stratified by week of the experiment, is shown in Figure 2.

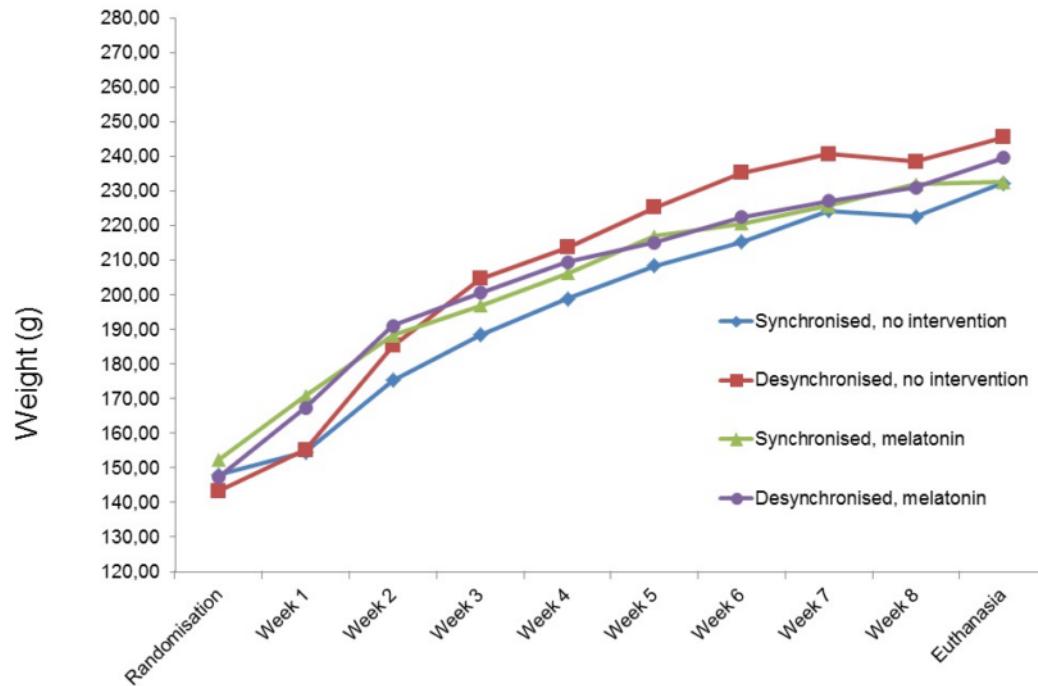


Figure 2 – Progression of body weight, stratified by group and week, over the course of the experimental period.

The percentage of animals developing tumours and the number of tumours per group over the course of the experiment are shown in Figures 3 and 4 respectively.

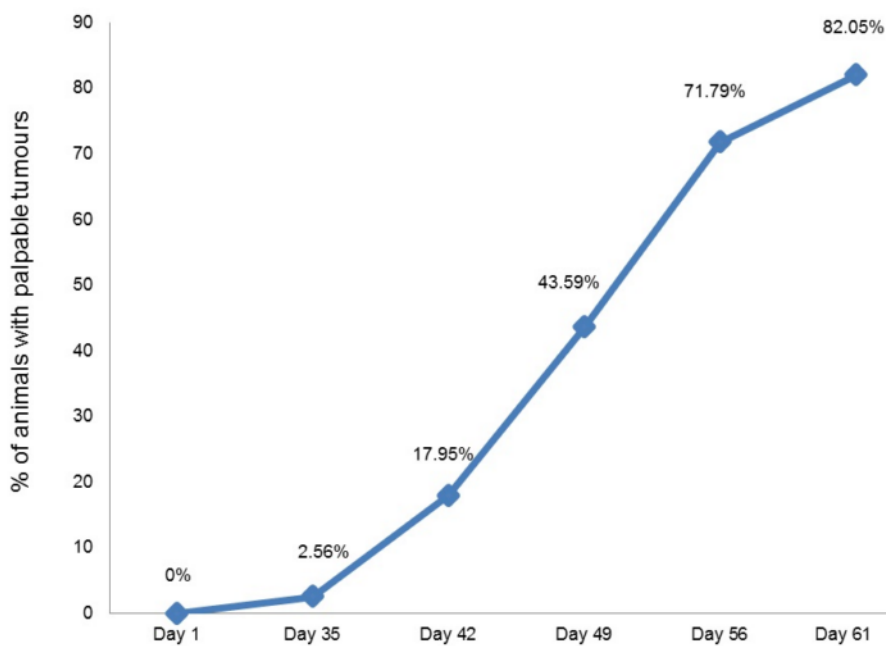


Figure 3 – Percentage of animals with detectable tumours over the course of the experimental period.

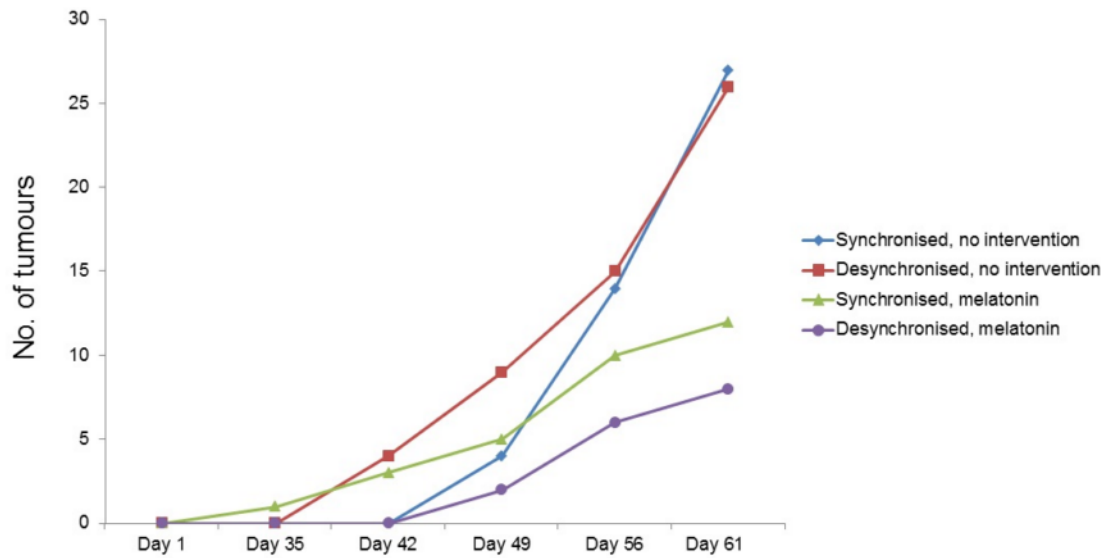


Figure 4 – Number of tumours in each group over the course of the experimental period.

There were significant differences in the number of tumours developed between the Synchronised no intervention group and the two intervention groups (Synchronised with melatonin: $t= 2.527$, $p= 0.028$; Desynchronised with melatonin: $t= 2.603$, $p= 0.019$). The mean number of tumours in each animal is shown in Figure 5.

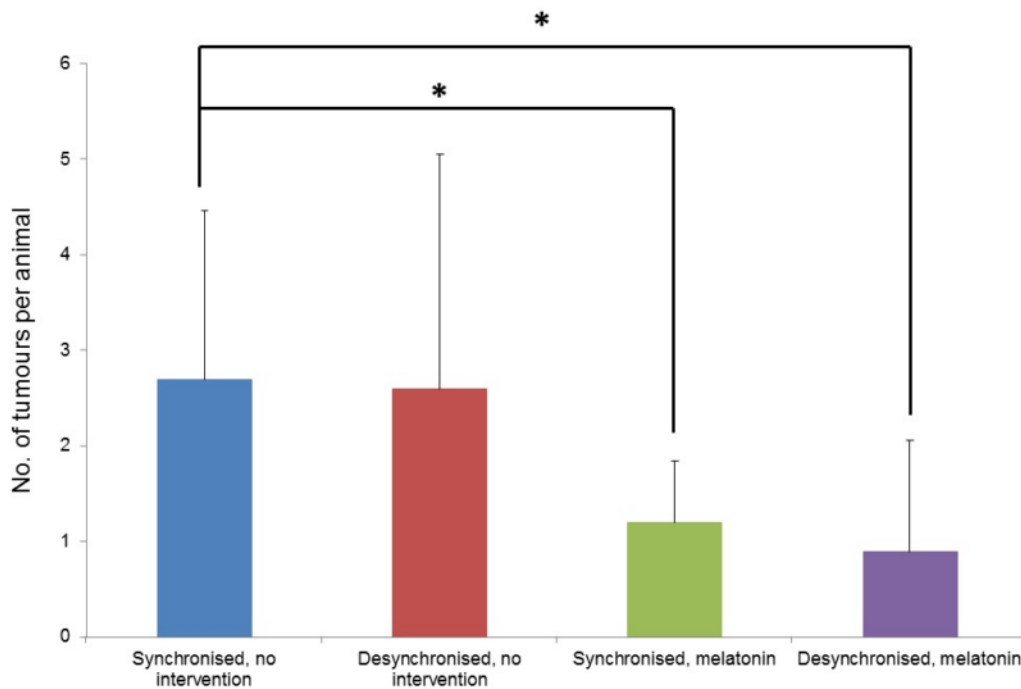


Figure 5 – Comparison of mean number of tumours per animal according to study group. * $p \leq 0.05$

Histological examination revealed 58 mammary intraepithelial neoplasms (MIN) (79.45%) and 15 adenocarcinomas (20.55%). Squamous metaplasia was identified in three cases (two MINs and one glandular adenocarcinoma). Of the 32 rats (82.05%) that developed tumours, 11 (28.21%) had at least one adenocarcinoma. There were significant between-group differences in the distribution of histological tumour subtypes ($p=0.024$). These data are shown in Figure 6 and Table 2. A summary of histological analysis is shown in Figure 7.

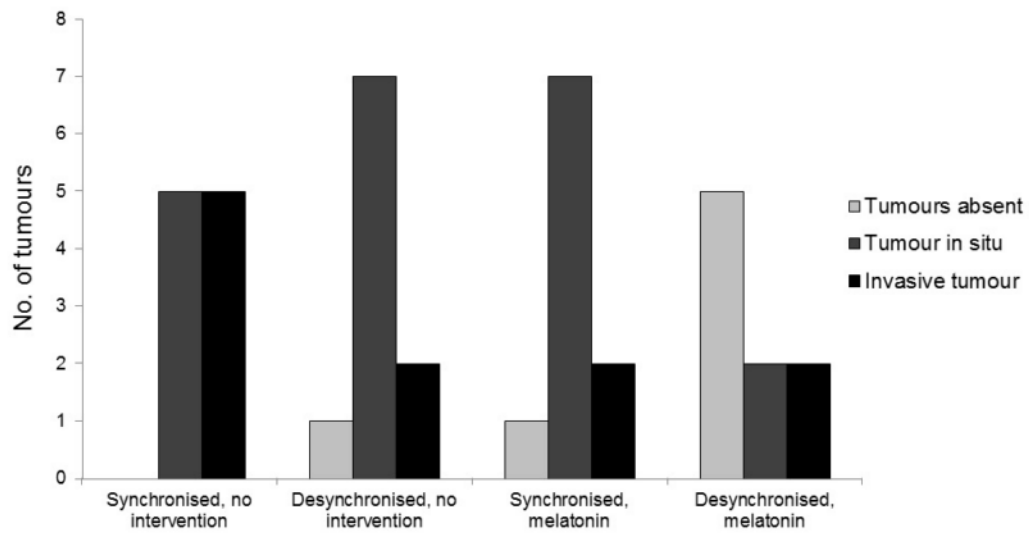


Figure 6 – Frequency of tumours by group and histological subtype.

Table 2 – Frequency of tumours by group and histological subtype.

Group	Tumours absent	Tumour in situ	Invasive tumour	n
Synchronised, no intervention	0	05 (50%)	05 (50%)	10
Desynchronised, no intervention	01 (10%)	07 (70%)	02 (20%)	10
Synchronised, melatonin	01 (10%)	07 (70%)	02 (20%)	10
Desynchronised, melatonin	05 (55.6%)	02 (22.2%)	02 (22.2%)	09
Total	7 (17.9%)	21 (53.8%)	11 (28.2%)	39

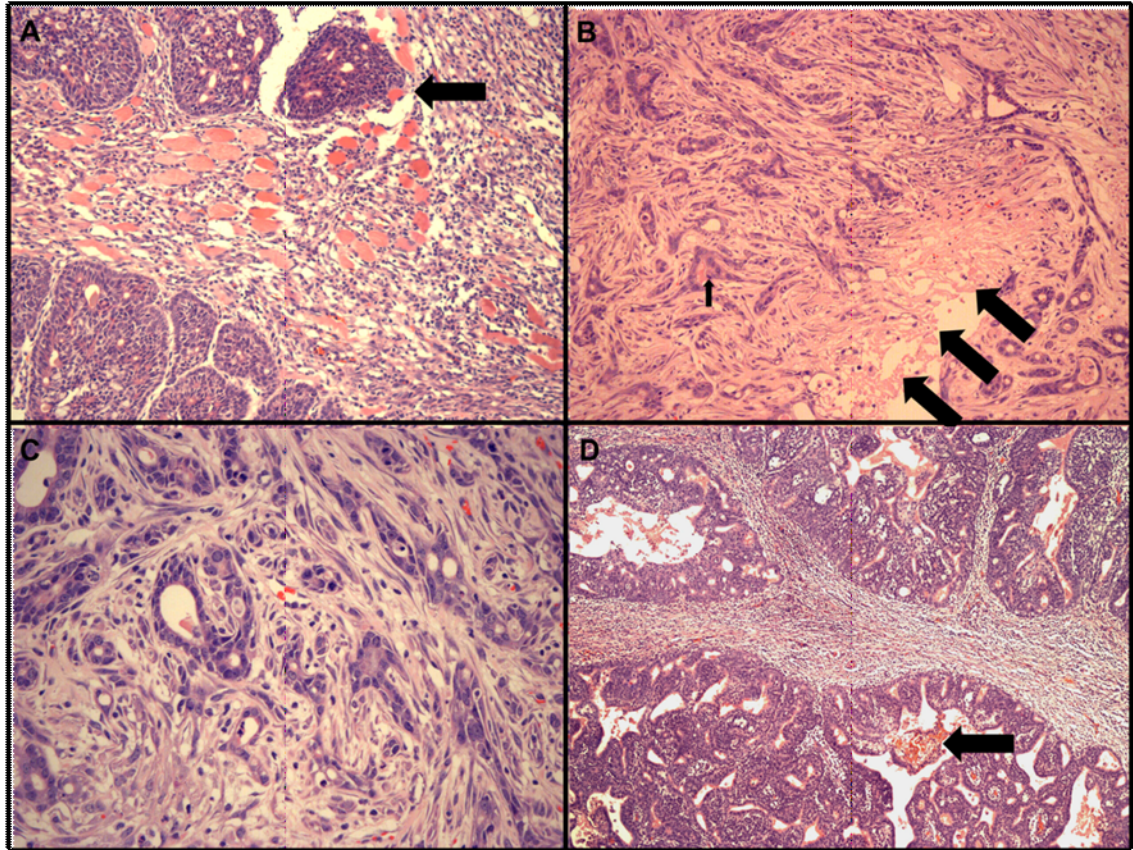


Figure 7 – Tumour histology. A – Cribriform adenocarcinoma. Neoplastic tissue composed of infiltrating blocks of atypical epithelial cells with scant, small central ducts invading skeletal muscle tissue. Arrow points to an area of muscle fibre being engulfed by tumour tissue (H&E stain, 200x magnification). B – Glandular adenocarcinoma. Neoplastic tissue composed of atypical cells forming small, clearly infiltrative glands, surrounded by desmoplastic stroma. Small arrow shows active mitosis. Large arrows point to a necrotic area (H&E stain, 200x magnification). C – Glandular adenocarcinoma. Neoplastic tissue composed of atypical cells forming small, clearly infiltrative glands, surrounded by desmoplastic stroma (H&E stain, 400x magnification). D – Mammary intraepithelial neoplasia. Clear proliferation of mammary parenchyma composed of atypical epithelial cells. Acinar architecture is still preserved, with no infiltration of the basement membrane. Arrow points to a small focus of intraepithelial necrosis (H&E stain, 100x magnification).

There were no significant differences in tumour grade between the Synchronised with melatonin and Desynchronised with melatonin groups ($p=0.292$).

When tumours were stratified by order of diagnosis (with the first tumour diagnosed given the identifier “Tumour 1”, the second tumour diagnosed assigned the label “Tumour 2”, etc.), there were significant differences in histological subtype between Tumour 1 and Tumour 2 ($p= 0.049$ and $p= 0.043$ respectively). Student’s *t*-

test showed a significant reduction in the number of adenocarcinomas as Tumour 2 in the Synchronised with melatonin group as compared with the Synchronised no intervention group ($t= 2.869$, $p= 0.010$).

There were also significant differences in Tumour 2 size, with larger tumours in the Synchronised no intervention group (127.45 ± 154.03) as compared with the Synchronised with melatonin group (21.28 ± 35.60) and the Desynchronised with melatonin group (19.14 ± 29.88), ($t= 2.124$, $p= 0.048$ and $t= 2.069$, $p= 0.054$ respectively).

DISCUSSION

Our data corroborate the appropriateness of the DMBA-induced mammary carcinogenesis model as an experimental model for *in vivo* study of breast cancer, at least under the conditions used herein (dose, route of administration, duration of induction). The percentage of animals developing tumours was satisfactory: 82.05% over 8 weeks, versus 80% over the same period in Barros et al. and 85% over 12 weeks in Rezende et al.^{3 25}

In this study, melatonin therapy produced beneficial results. Animals in the Synchronised with melatonin and Desynchronised with melatonin groups developed significantly fewer mammary tumours than animals in the no-melatonin groups, regardless of light/dark cycle exposure. Desynchronisation of circadian rhythms had no effect on tumour multiplicity, as shown by the statistically similar results between the Desynchronised no intervention and the Synchronised no intervention groups ($t= 0.104$; $p= 0.918$). Isolated cases of extreme tumour multiplicity were observed in the no-melatonin groups; one rat in the Synchronised no intervention group developed seven tumours, and one animal in the Desynchronised no intervention group developed nine tumours. In contrast, the maximum number of tumours detected in a single animal was much lower in the melatonin groups: two tumours in the Synchronised with melatonin group and three tumours in the Desynchronised with melatonin group. The protective effect of melatonin may be explained by its immune-boosting and free radical-scavenging properties, as well as by increased expression of the *p53* tumour suppressor gene¹. Lenoir et. al. proved that melatonin has

preventive and curative effects on DMBA-induced mammary tumours. The protective effect of melatonin persisted for 6 months when it was given as pre-induction treatment, whereas in post-induction treatment, the effect lasted up to 10 months. There were no significant differences between preventive and curative treatment¹⁸.

Melatonin significantly slows tumour progression. In the present study, tumours progressed less aggressively in melatonin-treated animals. From a histological standpoint, there were significant between-group differences, with the most favourable outcomes found in the Desynchronised with melatonin group (greatest number of animals with no tumours whatsoever and greatest reduction in tumours in situ). The Synchronised no intervention group had significantly more animals with invasive tumours than all other groups, and all animals in the group had at least one tumour. In this sample, melatonin slowed down the histological progression of mammary tumours, as shown by statistical comparison of histological grade in first-diagnosed and second-diagnosed tumours. This analysis revealed that more animals in the melatonin-treated groups failed to develop tumours, and that these groups also had the lowest rates of adenocarcinoma. Analysis of second-diagnosed tumour size reinforces our hypothesis in that animals in the Synchronised no intervention group had significantly larger tumours as compared with animals in the melatonin groups. Melatonin exerts effects over cell division and can inhibit mitosis, partially delaying the onset of metaphase²⁹. *In vitro*, melatonin has been shown to prolong the cell cycle by >3 hours and decrease DNA synthesis²⁰.

Exposure of melatonin-treated animals to desynchronization of circadian rhythms after tumour onset had no effect on histological grade, as shown by the absence of significant differences in tumour grade between the Synchronised with melatonin and Desynchronised with melatonin groups. Furthermore, circadian desynchronization was not associated with an increase in cancer rates. Nevertheless, it must be noted that this finding is only applicable to the desynchronisation model used herein. Few studies have investigated the role of melatonin in tumour growth in animals subjected to desynchronization of circadian rhythms.

Although there were no significant between-group differences in body weight, we did observe abrupt weight gain in the Desynchronised no intervention group,

which suggests that circadian desynchronization has the potential to produce weight gain. Overweight is a known risk factor for tumours^{12 19 30}; however, melatonin therapy was able to mitigate this effect of desynchronization, as shown by the absence of any significant differences in body weight between animals in the Desynchronised with melatonin group and animals in the synchronised groups. Evidence suggests that melatonin can have an impact on weight gain reduction due to its effects on energy balance^{30 2}.

Some findings of this study were limited by the small sample size. Future studies may use larger animal samples so as to mitigate the effects of individual variability.

Melatonin significantly limits the proliferation of mammary carcinoma cells *in vivo*. Therapeutic doses of melatonin have been widely used in humans with no serious side effects; indeed, patients with terminal cancer have reported improvement in quality of life with melatonin therapy^{7 29}. The oncostatic effects of melatonin observed in the present study reinforce the validity of clinical trials of melatonin as an adjunctive therapy in patients with breast cancer, as well as research into its preventive effects, in view of the low cost and ease of use of this agent. Clinical use of melatonin for preventive purposes still requires studies to confirm its safety and effectiveness, which, if determined, would make prophylactic melatonin an easy-to-use intervention for women at risk of breast cancer due to occupational exposures such as shift work or permanent night work.

Acknowledgements

Our gratitude to the oncologist Dr. Anthony Fabiano Ferreira Filho and our colleagues at the Chronobiology Laboratory Rosa Maria Levandovski, Leticia Ramalho, Bianca Hirschmann, Melissa Oliveira and Andreo Rysdyk. To the nurse Martha Justina Giotti Cioato and veterinary medic Fabiola Schons Meyer of the Animal Experimentation Unit at the Hospital de Clinicas de Porto Alegre (HCPA).

- 1 Baldwin WS, Barrett JC (1998). Melatonin: receptor-mediated events that may affect breast and other steroid hormone-dependent cancers. *Mol Carcinog* **21**: 149-155.
- 2 Barrenetxe J, Delagrang P, Martinez JA (2004). Physiological and metabolic functions of melatonin. *Journal of physiology and biochemistry* **60**: 61-72.
- 3 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.
- 4 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.
- 5 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.
- 6 Carpentieri A, Diaz de Barboza G, Areco V, Peralta Lopez M, Tolosa de Talamoni N (2012). New perspectives in melatonin uses. *Pharmacol Res* **65**: 437-444.
- 7 Dauchy RT, Blask DE, Sauer LA, Brainard GC, Krause JA (1999). Dim light during darkness stimulates tumor progression by enhancing tumor fatty acid uptake and metabolism. *Cancer Lett* **144**: 131-136.
- 8 Erren TC (2010). Shift work, cancer and "white-box" epidemiology: Association and causation. *Epidemiol Perspect Innov* **7**: 11.
- 9 Figueiro MG, Rea MS, Bullough JD (10 August 2006). Does architectural lighting contribute to breast cancer? *J Carcinog* **5**: doi:10.1186/1477-3163-1185-1120.
- 10 Figueiro MG, Bierman A, Plitnick B, Rea MS (27 August 2009). Preliminary evidence that both blue and red light can induce alertness at night. *BMC Neurosci* **10**: doi:10.1186/1471-2202-1110-1105.
- 11 Greene MW (2012). Circadian rhythms and tumor growth. *Cancer Lett* **318**: 115-123.
- 12 Hakkak R, Holley AW, Macleod SL, Simpson PM, Fuchs GJ, Jo CH *et al* (2005). Obesity promotes 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced mammary tumor development in female zucker rats. *Breast Cancer Res* **7**: R627-633.

- 13 Hansen J (2006). Risk of breast cancer after night- and shift work: current evidence and ongoing studies in Denmark. *Cancer Causes Control* **17**: 531-537.
- 14 Hansen J, Stevens RG (2011). Case-control study of shift-work and breast cancer risk in Danish nurses: Impact of shift systems. *Eur J Cancer*.
- 15 Haus E, Smolensky M (2006). Biological clocks and shift work: circadian dysregulation and potential long-term effects. *Cancer Causes Control* **17**: 489-500.
- 16 Hill SM, Frasch T, Xiang S, Yuan L, Duplessis T, Mao L (2009). Molecular mechanisms of melatonin anticancer effects. *Integr Cancer Ther* **8**: 337-346.
- 17 Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA) MdS (2011). *Estimativa 2012, Incidência de Câncer no Brasil*.
- 18 Lenoir V, de Jonage-Canonico MB, Perrin MH, Martin A, Scholler R, Kerdelhue B (2005). Preventive and curative effect of melatonin on mammary carcinogenesis induced by dimethylbenz[a]anthracene in the female Sprague-Dawley rat. *Breast Cancer Res* **7**: R470-476.
- 19 Llaverias G, Danilo C, Mercier I, Daumer K, Capozza F, Williams TM *et al* (2011). Role of cholesterol in the development and progression of breast cancer. *Am J Pathol* **178**: 402-412.
- 20 Mediavilla MD, Cos S, Sanchez-Barcelo EJ (1999). Melatonin increases p53 and p21WAF1 expression in MCF-7 human breast cancer cells in vitro. *Life Sci* **65**: 415-420.
- 21 Pevet P, Challet E (2011). Melatonin: both master clock output and internal time-giver in the circadian clocks network. *Journal of physiology, Paris* **105**: 170-182.
- 22 Proietti S, Cucina A, Reiter RJ, Bizzarri M (2012). Molecular mechanisms of melatonin's inhibitory actions on breast cancers. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*.
- 23 Rana S, Mahmood S (2010). Circadian rhythm and its role in malignancy. *J Circadian Rhythms* **8**: 1-13.
- 24 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.
- 25 Rezende LFdC, Eunice Cristina da Silva; Schenka, Natália Guimarães de Moraes; Schenka, André de Almeida; Untura, Lindsay Pâmela; Uemura, Gilberto. (2010).

- Induction of experimental mammary carcinogenesis in rats with 7,12-dimethylbenz(a)anthracene. *Revista Brasileira de Mastologia* **20**: 76-79.
- 26 Stevens RG, Davis S, Thomas DB, Anderson LE, Wilson BW (1992). Electric power, pineal function, and the risk of breast cancer. *FASEB J* **6**: 853-860.
- 27 Stevens RG (2009). Working against our endogenous circadian clock: Breast cancer and electric lighting in the modern world. *Mutat Res* **680**: 106-108.
- 28 Stevens RG (2009). Light-at-night, circadian disruption and breast cancer: assessment of existing evidence. *Int J Epidemiol* **38**: 963-970.
- 29 Vijayalaxmi, Thomas CR, Jr., Reiter RJ, Herman TS (2002). Melatonin: from basic research to cancer treatment clinics. *J Clin Oncol* **20**: 2575-2601.
- 30 Viswanathan AN, Schernhammer ES (2009). Circulating melatonin and the risk of breast and endometrial cancer in women. *Cancer Lett* **281**: 1-7.
- |

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar de fortes evidências em animais de laboratório, até o momento não foi estabelecido uma clara e definitiva associação epidemiológica entre o regime de trabalho em turnos e o câncer de mama em humanos. Os dados obtidos nesse estudo experimental fortalece a necessidade de estudos clínico que avaliem o uso terapêutico de melatonina para minimizar os efeitos do câncer de mama.

A partir de agora precisamos continuar expandido os conhecimentos quanto a aplicação da melatonina em experimentação animal, além de estudar as metodologias mais eficientes para o tratamento preventivo ou curativo com este hormônio.

Apesar deste estudo não sustentar a hipótese de que o NSQ esteja envolvido na oncogênese isto ainda não remove a possibilidade de que os genes relógios não esteja envolvidos na patogenia do câncer. Portanto é importante investigarmos, é o papel dos genes circadianos no processo de carcinogênese e metastização. Apenas nos últimos anos foram iniciadas pesquisas sobre a expressão desses genes em tecidos neoplásicos.

Apêndice A

Artigo publicado na revista *Prática Hospitalar*, Ano XIV • Nº 84 • Nov-Dez/2012

CRONOBIOLOGIA E CÂNCER DE MAMA

Etianne Martini Sasso¹, Dra. Maria Paz Loayza Hidalgo², Dr. Antonio Fabiano Ferreira Filho³

1 - Pós-Graduada em Medicina: Ciências Médicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). CRBM 14.381.

2 - Médica do Departamento de Psiquiatria e Medicina Legal da Faculdade de Medicina da UFRGS. Laboratório de Cronobiologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). CRM-RS 18.900.

3 - Oncologista Clínico da Oncosinos e Hospital Regina de Novo Hamburgo. CRM-RS 18.163.

AUTOR CORRESPONDENTE

Dr. Antonio Fabiano Ferreira Filho

Laboratório de Cronobiologia do HCPA

Rua Ramiro Barcelos, 2400, 1º andar – 90035-003 – Porto Alegre, RS, Brasil

e-mail: oncosinos@gmail.com

INTRODUÇÃO

Nos últimos anos tem havido um crescente interesse no estudo de fatores ambientais no desenvolvimento do câncer. A exposição à luz artificial durante a noite é um exemplo de fator ambiental com potencial carcinogênico ⁽¹⁾. A luz é o estímulo primário para regulação do ritmo circadiano e ciclos sazonais, além de contribuir para respostas neuroendócrinas ⁽²⁾. A exposição à luz noturna é o fator de dessincronização mais importante do sistema circadiano ^(1,3). Neste sentido, o trabalho em turnos é um exemplo na vida real. Estudos demonstram associação entre dessincronização do ritmo circadiano e doenças cardiovasculares, depressão, transtornos de ansiedade, diabetes tipo II e neoplasias, entre elas o câncer de mama ⁽⁴⁻⁷⁾.

A homeostase corporal é mantida por uma perfeita integração do sistema endócrino, imunológico e nervoso ⁽⁸⁾. A maioria dos processos fisiológicos e metabólicos, como o ciclo claro/escuro, humor⁽⁸⁾, secreções neuroendócrinas, sono/vigília⁽⁹⁾, alimentação ⁽¹⁾, temperatura corporal⁽⁵⁾ e ciclo celular ⁽⁶⁾ seguem um padrão circadiano. O mecanismo interno que organiza os processos biológicos circadianos está localizado no hipotálamo, mais precisamente no núcleo supraquiasmático do hipotálamo ⁽¹⁰⁾, o regulador principal do relógio circadiano nos mamíferos ⁽¹¹⁾. O núcleo supraquiasmático é uma rede neural que funciona como uma central de processamento de informação fótica⁽¹²⁾. As informações relacionadas aos padrões claro/escuro são transmitidas da retina para o núcleo supraquiasmático, através do trato retino-hipotalâmico⁽¹³⁾. É um núcleo heterogêneo, com grandes diferenças sub-regionais no fenótipo neuroquímico, conectividade e expressão gênica ⁽¹²⁾. Estes sistemas são dessincronizados em situações como o *Jet lag* (descompensação horária), distúrbios do sono e trabalho em turnos, todos eventos envolvidos com a ruptura circadiana e exposição à luz artificial durante a noite ⁽¹⁰⁾.

Estudos epidemiológicos sugerem maior risco de câncer de mama em mulheres que trabalham em turnos⁽¹⁴⁾. A Agência Internacional para Pesquisa sobre Câncer (IARC) classifica o trabalho em turnos que envolve rompimento do padrão circadiano normal como provável cancerígeno para humanos (Grupo 2A).⁽¹⁵⁻¹⁷⁾

Este artigo analisa as possíveis relações entre a dessincronização do ritmo circadiano e o desenvolvimento de câncer de mama. Para essa finalidade, realizamos uma revisão sistemática na base de dados do PubMed como estratégia para localizar estudos pertinentes. Foram utilizadas as seguintes palavras-chave: 'Breast Cancer and Melatonin', 'Melatonin Suppression and Light', 'Breast Cancer and Circadian Rhythm', 'Cancer and Chronobiology', 'Shift Work and Breast Cancer'.

Mecanismos Moleculares Relacionados a Desregulação Circadiana e Neoplasias

Os componentes genéticos necessários para sincronização do padrão de ritmo circadiano normal são encontrados em todos os organismos eucarióticos (organismos formados por células que possuem núcleo), e também em alguns procariotos (organismos formados por células e sem um núcleo definido), como as cianobactérias^(14,17). Até o momento, aproximadamente dez genes circadianos foram identificados em mamíferos, incluindo *Per1/2/3*, *Cry 1/2*, *Bmal1*, *Clock*, and *casein kinase 1 delta/epsilon* (*CK1δ/ε*)⁽¹⁸⁻²¹⁾. Os genes circadianos podem funcionar como genes supressores tumorais, tendo relação com a proliferação celular, apoptose, controle do ciclo celular e resposta a danos ao DNA. Alterações nos genes circadianos podem resultar em instabilidade genômica e acelerar a proliferação celular, favorecendo o processo de carcinogênese⁽⁶⁾.

As células neoplásicas expressam os mesmo genes circadianos encontrados no núcleo supraquiasmático, existindo compartilhamento de elementos e vias moleculares entre o relógio circadiano e o ciclo celular⁽⁵⁾. Evidências sugerem que os genes circadianos podem afetar as funções de órgãos e tecidos corporais, com influência na regulação do ciclo celular e no processo de tumorigênese^(4,22). Os genes *Period* (*Per1*, *Per2* e *Per3*) possuem um papel importante no controle da proliferação celular e apoptose, processos envolvidos na supressão tumoral⁽²³⁾. Uma mutação em genes do relógio circadiano, tal como o gene *Per2*, resulta em aumento da tumorigênese espontânea em camundongos, enquanto enquanto que um risco aumentado de câncer de mama antes da menopausa tem sido associado a polimorfismo do gene *Per3*⁽⁶⁾. Também existem evidências que existe desregulação da expressão de genes circadianos no tecido da neoplasia mamária quando comparado ao tecido adjacente normal⁽¹⁴⁾.

As células tumorais do câncer de mama possuem 95% mais alterações nos três genes *Per* que as células normais adjacentes ao tecido tumoral. Essas alterações decorrem principalmente de um processo de mutação epigenética de metilação da porção promotora dos genes *Per*⁽⁶⁾. O gene *Per2* é expresso endogenamente nas células epiteliais mamárias humanas, mas seus níveis são reduzidos ou inexistentes nas linhagens tumorais. A expressão do *Per2* nas células cancerígenas ocasiona inibição do crescimento celular e indução da apoptose. A inativação de genes *Period* nas células do câncer de mama resulta na desregulação

do ciclo celular, beneficiando a sobrevivência celular e proliferação do tumor. Alterações na expressão dos genes *Per* têm também sido relatadas em outros tipos de tumores, tais como carcinomas de próstata, endometrial, ovário e leucemias^(6,19).

Recentemente foi descoberto polimorfismos no gene *Clock*, localizado no cromossomo 4 em humanos. O gene *Clock* é necessário para definição do ritmo circadiano intrínseco. Recentemente foi demonstrado que a hipermetilação da porção promotora do gene *CLOCK* e níveis mais baixos de expressão gênica foram encontrados em tecido mamário normal de controles em comparação a tecido normal ou tumoral de pacientes com diagnóstico de câncer de mama. Esse efeito foi tanto maior quando a comparação foi realizada em pacientes com tumores com receptores de estrógeno e progesterona negativos, uma forma mais agressiva do câncer de mama.^(15, 20)

Mecanismos Ambientais Relacionados a Desregulação Circadiana e Neoplasias

O desenvolvimento do câncer de mama está associado ao estilo de vida dos ocidentais e sua incidência está aumentando globalmente⁽²⁶⁾. Alguns fatores de risco para o desenvolvimento do câncer de mama são bem conhecidos, como por exemplo, padrão reprodutivo, idade, história familiar de câncer de mama, menarca precoce, álcool e radiação ionizante. No entanto, outros fatores também podem estar envolvidos⁽²⁶⁻²⁸⁾.

Com o progresso tecnológico contínuo os seres humanos alteraram de forma radical os seus hábitos noturnos. A sociedade moderna passou a utilizar luz artificial durante a noite e a dormir progressivamente mais tarde⁽²⁴⁾. Em conjunto, essas alterações aumentaram de forma significativa os níveis de exposição à luz durante o período de escuridão natural. Cerca de 15–20% da população ativa dos países industrializados estão envolvidos em algum tipo de trabalho permanente noturno ou em revezamento de turno, como em vôos intercontinentais com diferenças de diversos fusos horários. Essas atividades alteram o ciclo sono/vigília natural,

suprimindo a produção noturna fisiológica de melatonina pela glândula pineal, fato que se relaciona com o aumento da liberação de estrogênio pelos ovários^(4,10,25).

A industrialização acompanhada do trabalho em turnos pode ser um dos fatores relacionados com o desenvolvimento do câncer de mama⁽²⁹⁾. Uma série de estudos tem relatado correlação inversa entre a duração do sono e a surgimento de neoplasias⁽³⁰⁾. O relógio circadiano parece desempenhar um importante papel no controle endógeno da progressão de neoplasias⁽⁶⁾.

Além disso, mesmo no útero materno, o ser humano é exposto a variações ambientais e as suas consequências. Especula-se que a exposição do feto à luz durante o período noturno poderia aumentar o risco de desenvolvimento subsequente de câncer de mama. Em teoria, isso ocorreria de duas maneiras: a) através da supressão de melatonina materna e b) alteração no desenvolvimento normal do tecido mamário no útero (semelhante ao efeito da exposição a baixos níveis de etanol) ou por alterações da programação epigenética dos genes do relógio biológico⁽¹⁴⁾.

Alterações Hormonais Relacionadas a Desregulação Circadiana

A produção e a liberação sistêmica dos hormônios sexuais estão distribuídas de forma ordenada em um ciclo de 24 horas. Esse padrão normal é interrompido por alterações tais como a exposição à luz durante o período noturno^(3,7). A supressão da liberação normal de melatonina pela glândula pineal já foi descrita como implicação etiológica para diversos tipos de câncer hormônio dependentes, incluindo câncer de próstata, mama e ovário⁽²⁹⁾.

A melatonina é um hormônio secretado pela glândula pineal⁽³⁾ e sua produção diária demonstra um claro padrão circadiano, com níveis plasmáticos alcançando seu pico durante a fase noturna e níveis muito baixos durante o dia^(2,18). A melatonina está no controle do sono, da temperatura corporal, e do ciclo celular em células normais e neoplásicas⁽³¹⁾.

A melatonina também atua no processo regulatório de outras glândulas e hormônios, como é o caso do estrogênio que tem seus níveis aumentados quando

há supressão da melatonina ^(15,29,32). Desta forma, a melatonina pode atuar como regulador da proliferação do epitélio mamário normal por suprimir a produção de estrogênio e também aumentar a expressão do gene supressor tumoral *p53* ^(3,18,31,32,33,34). Em animais, a pinealectomia aumenta a incidência de câncer de mama quimicamente induzido, um efeito supostamente causado pela supressão da produção de melatonina. Nesses animais, a carcinogênese de tumores quimicamente induzidos pode ser inibida pela administração de melatonina ⁽²⁴⁾.

Interessantemente, estudo observacional com trabalhadoras de laboratórios fotográficos que passam o dia no escuro, demonstrou níveis mais elevados de melatonina, assim como uma predisposição menor ao câncer de mama, quando comparadas a outras profissões ⁽²⁷⁾.

Evidências epidemiológicas do Câncer de Mama e Desregulação Circadiana

Existem evidências de que os trabalhadores em turnos tem uma variedade de sintomas físicos e efeitos adversos, principalmente os associados à disfunção gastrointestinal, morbidade cardiovascular e do aparelho reprodutivo tais como diminuição do nível de fecundidade ^(3,4). Nesses trabalhadores há aumento do risco de complicações durante a gestação, tais como parto prematuro, baixo peso ao nascer e aborto espontâneo ⁽³⁵⁾.

O trabalho noturno exclusivo parece ser menos prejudicial a biologia circadiana do que o trabalho em turnos rotativos, isso se deve a maior possibilidade dos trabalhadores noturnos se adaptarem mesmo que parcialmente a essa situação. No entanto, o ajuste completo é raro, porque durante os dias de folga (finais-de-semana), o indivíduo geralmente retorna ao seu ritmo biológico natural⁽¹⁷⁾. Em avaliações dos níveis de melatonina em trabalhadores noturnos não foi identificado um ritmo, o que demonstra a falta de adaptação individual⁽³⁾. Provavelmente existem componentes genéticos que interferem na capacidade do indivíduo adaptar-se a ruptura do ritmo circadiano. Sendo assim, através de análise do genótipo individual seria possível definir grupos com maior susceptibilidade ao trabalho em turnos, incluindo-se o efeito sobre a produção de melatonina ⁽³⁵⁾. Os resultados dos diversos estudos populacionais que avaliam a incidência de câncer de mama em mulheres

que possuem trabalho permanente noturno ou em revezamento de turno não são sempre concordantes entre si.

Alguns autores encontram apenas variações discretas na incidência de câncer de mama entre mulheres que trabalharam em turnos e as que nunca foram expostas a esse tipo de regime laboral^(25,27). No estudo recente estudo populacional francês de Villeneuve et. al, investigou-se a influência de fatores ambientais e ocupacionais no câncer de mama de mulheres de diversas profissões. Os pesquisadores observaram aumentos marginais da incidência de câncer de mama em mulheres que trabalhavam na indústria (possibilidade de exposição a carcinógenos), e entre enfermeiras com mais de 10 anos de profissão (possibilidade de trabalho por turnos por longos períodos). Em contrapartida, as mulheres que trabalhavam na agricultura tiveram incidência reduzida, provavelmente pelo estilo de vida e da permanência no escuro durante a noite⁽²⁷⁾.

Em uma coorte realizada com uma população de mulheres orientais (China) observou-se que mulheres que nunca trabalharam em regime de turnos apresentavam risco reduzido de desenvolver câncer de mama. No entanto, as mulheres que trabalhavam em turnos por 20 ou 30 anos não demonstraram aumento do risco. Devemos lembrar que essa é uma população de hábitos saudáveis onde a incidência de câncer de mama é reduzida⁽²⁵⁾.

O estudo de Schwartzbaum et al. avaliou a população sueca ativa para identificar ocupações onde os níveis de melatonina são afetados pelo horário de trabalho. Não foi encontraram nenhuma associação entre o trabalho em turnos e a incidência de câncer em diferentes sítios, a única exceção sendo a do câncer de tireoide⁽³⁶⁾. Outro estudo que não demonstrou nenhuma associação foi o de O'Leary et al. Que avaliou residentes de Long Island (Nova York)⁽³⁷⁾.

Em contrapartida o grupo de Davis et al. constatou que o trabalho noturno está associado ao aumento do risco de câncer de mama. As mulheres que trabalharam a noite por pelo menos 10 anos tinham um risco 60% maior de desenvolver câncer de mama. Essa tendência foi observada conforme o aumento de anos ou da carga horária trabalhada⁽³⁸⁾. Esses dados são consistentes com os do estudo caso-controle de uma coorte de enfermeiras norueguesas que observou que

as mulheres que trabalharam por períodos ≥ 30 anos em shift work tiveram maiores riscos de desenvolvimento do câncer de mama⁽²⁸⁾. Resultados semelhantes também foram encontrados no estudo de Scheernhammer et al. Que avaliou o grupo do Nurse's Health Study. Neste estudo, as enfermeiras que trabalharam em turnos rotativos por ≥ 30 anos tinham risco 36% maior de desenvolver câncer de mama quando comparadas a enfermeiras que nunca trabalharam em períodos de turnos⁽³⁾. Hansen et. al. Também investigam essa associação na população dinamarquesa. Em 2001, relataram risco aumentado de câncer de mama nos profissionais de turnos⁽³⁹⁾. Em outro estudo realizado recentemente por esse grupo foi observada uma maior probabilidade de câncer de mama em mulheres que trabalham após a meia noite, havendo tendência proporcional a duração e ao acúmulo de turnos no período noturno noite⁽¹⁷⁾.

CONCLUSÃO

Estamos começando a estudar e a entender o efeito modulatório ou mesmo causal dos genes circadianos no processo de carcinogênese e metastização. Apenas nos últimos anos foram iniciadas pesquisas sobre a expressão desses genes em tecidos neoplásicos.

Em nível experimental, a remoção cirúrgica da glândula pineal e a exposição constante a luz estimula a tumorigênese mamária em roedores⁽⁵⁾. A diminuição de melatonina, ocasionada pela exposição à luz durante a noite, pode estar relacionada ao aumento do desenvolvimento de câncer de mama.

Apesar de fortes evidências em animais de laboratório, até o momento não foi estabelecido uma clara e definitiva associação epidemiológica entre o regime de trabalho em turnos e o câncer de mama em humanos. As evidências ainda são limitadas, tendo em vista que os diversos estudos existentes divergem entre si. No entanto, apesar das limitações e divergências de resultados dos diversos estudos populacionais, a Agência Internacional para Pesquisa sobre Câncer (IARC) classifica o trabalho em turnos que envolve rompimento do padrão circadiano normal como provável cancerígeno para humanos (Grupo 2A).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Dauchy RT, Blask DE, Sauer LA, Brainard GC, Krause JA. Dim light during darkness stimulates tumor progression by enhancing tumor fatty acid uptake and metabolism. *Cancer Lett* 1999; 144, 131-6.
2. Brainard GC, Hanifin JP, Greeson JMet al. Action spectrum for melatonin regulation in humans: evidence for a novel circadian photoreceptor. *J Neurosci* 2001; 21, 6405-12.
3. Schernhammer ES, Laden F, Speizer FEet al. Rotating night shifts and risk of breast cancer in women participating in the nurses' health study. *J Natl Cancer Inst* 2001; 93, 1563-8.
4. Wang XS, Armstrong ME, Cairns BJ, Key TJ, Travis RC. Shift work and chronic disease: the epidemiological evidence. *Occup Med (Lond)* 2011; 61, 78-89.
5. Blask DE, Brainard GC, Dauchy RTet al. Melatonin-depleted blood from premenopausal women exposed to light at night stimulates growth of human breast cancer xenografts in nude rats. *Cancer Res* 2005; 65, 11174-84.
6. Rana S, Mahmood S. Circadian rhythm and its role in malignancy. *J Circadian Rhythms* 2010; 8, 3.
7. Mirick DK, Davis S. Melatonin as a biomarker of circadian dysregulation. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008; 17, 3306-13.
8. Mazzoccoli G, Vendemiale G, De Cata A, Carughi S, Tarquini R. Altered time structure of neuro-endocrine-immune system function in lung cancer patients. *BMC Cancer* 2009; 10, 314.
9. Rahman SA, Kollara A, Brown TJ, Casper RF. Selectively filtering short wavelengths attenuates the disruptive effects of nocturnal light on endocrine and molecular circadian phase markers in rats. *Endocrinology* 2008; 149, 6125-35.
10. Haus E, Smolensky M. Biological clocks and shift work: circadian dysregulation and potential long-term effects. *Cancer Causes Control* 2006; 17, 489-500.
11. Berson DM, Dunn FA, Takao M. Phototransduction by retinal ganglion cells that set the circadian clock. *Science* 2002; 295, 1070-3.
12. Schwartz MD, Wotus C, Liu Tet al. Dissociation of circadian and light inhibition of melatonin release through forced desynchronization in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106, 17540-5.
13. Figueiro MG, Bierman A, Plitnick B, Rea MS. Preliminary evidence that both blue and red light can induce alertness at night. *BMC Neurosci* 2009; 10, 105.
14. Stevens RG. Working against our endogenous circadian clock: Breast cancer and electric lighting in the modern world. *Mutat Res* 2009; 680, 106-8.
15. Stevens RG. Light-at-night, circadian disruption and breast cancer: assessment of existing evidence. *Int J Epidemiol* 2009; 38, 963-70.
16. Erren TC. Shift work, cancer and "white-box" epidemiology: Association and causation. *Epidemiol Perspect Innov* 2010; 7, 11.
17. Hansen J, Stevens RG. Case-control study of shift-work and breast cancer risk in Danish nurses: Impact of shift systems. *Eur J Cancer* 2011;
18. Chung SA, Wolf TK, Shapiro CM. Sleep and health consequences of shift work in women. *J Womens Health (Larchmt)* 2009; 18, 965-77.

19. Chen ST, Choo KB, Hou MF et al. Deregulated expression of the PER1, PER2 and PER3 genes in breast cancers. *Carcinogenesis* 2005; 26, 1241-6.
20. Hoffman AE, Yi C-H, Zheng T et al. CLOCK in Breast Tumorigenesis: Genetic, Epigenetic, and Transcriptional Profiling Analyses. *Cancer Res* February 15, 2010 70; 1459
21. Ebisawa T. Circadian rhythms in the CNS and peripheral clock disorders: human sleep disorders and clock genes. *J Pharmacol Sci* 2007; 103, 150-4.
22. James FO, Cermakian N, Boivin DB. Circadian rhythms of melatonin, cortisol, and clock gene expression during simulated night shift work. *Sleep* 2007; 30, 1427-36.
23. Jung B, Ahmad N. Melatonin in cancer management: progress and promise. *Cancer Res* 2006; 66, 9789-93.
24. Baldwin WS, Barrett JC. Melatonin: receptor-mediated events that may affect breast and other steroid hormone-dependent cancers. *Mol Carcinog* 1998; 21, 149-55.
25. Pronk A, Ji BT, Shu XO et al. Night-shift work and breast cancer risk in a cohort of Chinese women. *Am J Epidemiol* 2010; 171, 953-9.
26. Hansen J. Risk of breast cancer after night- and shift work: current evidence and ongoing studies in Denmark. *Cancer Causes Control* 2006; 17, 531-7.
27. Villeneuve S, Fevotte J, Anger A et al. Breast cancer risk by occupation and industry: analysis of the CECILE study, a population-based case-control study in France. *Am J Ind Med* 2011; 54, 499-509.
28. Lie JA, Roessink J, Kjaerheim K. Breast cancer and night work among Norwegian nurses. *Cancer Causes Control* 2006; 17, 39-44.
29. Stevens RG, Davis S, Thomas DB, Anderson LE, Wilson BW. Electric power, pineal function, and the risk of breast cancer. *FASEB J* 1992; 6, 853-60.
30. Reiter RJ, Tan DX, Erren TC, Fuentes-Broto L, Paredes SD. Light-mediated perturbations of circadian timing and cancer risk: a mechanistic analysis. *Integr Cancer Ther* 2009; 8, 354-60.
31. Yasukouchi A, Hazama T, Kozaki T. Variations in the light-induced suppression of nocturnal melatonin with special reference to variations in the pupillary light reflex in humans. *J Physiol Anthropol* 2007; 26, 113-21.
32. Megdal SP, Kroenke CH, Laden F, Pukkala E, Schernhammer ES. Night work and breast cancer risk: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Cancer* 2005; 41, 2023-32.
33. Vijayalaxmi, Thomas CR, Jr., Reiter RJ, Herman TS. Melatonin: from basic research to cancer treatment clinics. *J Clin Oncol* 2002; 20, 2575-601.
34. Mediavilla MD, Cos S, Sanchez-Barcelo EJ. Melatonin increases p53 and p21WAF1 expression in MCF-7 human breast cancer cells in vitro. *Life Sci* 1999; 65, 415-20.
35. Davis S, Mirick DK. Circadian disruption, shift work and the risk of cancer: a summary of the evidence and studies in Seattle. *Cancer Causes Control* 2006; 17, 539-45.
36. Schwartzbaum J, Ahlbom A, Feychting M. Cohort study of cancer risk among male and female shift workers. *Scand J Work Environ Health* 2007; 33, 336-43.
37. O'Leary ES, Schoenfeld ER, Stevens R et al. Shift work, light at night, and breast cancer on Long Island, New York. *Am J Epidemiol* 2006; 164, 358-66.
38. Davis S, Mirick DK, Stevens RG. Night shift work, light at night, and risk of breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2001; 93, 1557-62.
39. Hansen J. Increased breast cancer risk among women who work predominantly at night. *Epidemiology* 2001; 12, 74-7.

APÊNDICE B

Artigo publicado no *Journal of Neuroscience Methods*, 2012 Oct 15;211(1):84-7

IMPACT OF THE TIME IN AN ANIMAL MODEL OF MOOD DISORDER

Etianne Martini Sasso^{a,d}, Juliana Luiza Vieira^a, Giovana Dantas^{a,c}, Camila Morelatto de Souza^{a,c}, Rosa Maria Levandovski^{a,c}, Maria Paz Loayza Hidalgo^{a,b,c}

^aLaboratório de Cronobiologia do HCPA/UFRGS, Brazil

^bDepartamento de Psiquiatria e Medicina Legal da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil

^cPrograma de pós-graduação em Ciências Médicas: Psiquiatria – UFRGS, Brazil

^dPrograma de pós-graduação em Medicina: Ciências Médicas – UFRGS, Brazil

Abstract

The objective of the study is to evaluate whether intervening and testing in different rest-activity periods of the day would produce different measurements in animal behavior studies. Methodology: Thirty-five, 60-day-old male Wistar rats were submitted to a stress model Inescapable Foot Shock (IFS) and behavioral tests (Light-Dark Box test). The animals received intervention and were tested in both light and dark phases, resulting in the following groups : Control L (tested in the light), Control D (tested in the dark), LL (IFS and tested in the light), LD (IFS in the light and tested in the dark), DL (IFS in the dark and tested in the light), and DD (IFS and tested in the dark). Results: The Light-Dark Box test showed that Control L was not significantly different from other groups in any of the parameters. However, when comparing Control D with the intervention groups, we observed a difference in the mean length of time spent in the light compartment ($t=2.56$; $p=0.045$). A significant difference in the number of crossings into the light compartment was only observed between the Control D and the LL and LD groups ($t=-2.608$; $p=0.028$; $t=-2.571$; $p=0.030$, respectively). The latency time for the Control D group was significantly lower than that of the DD group ($t=-2.556$; $p=0.043$). Conclusions: These results show that

behavior testing during the animal's period of highest activity (dark period) revealed differences caused by the intervention, whereas no differences were apparent when the control group was observed during the day.

Keywords: depression; rhythm; behavior; chronobiology; circadian; mood.

Abbreviations

Control L = Control Light; **Control D** = Control Dark; **LL** = inescapable foot shock in the light and tested in the light; **LD** = inescapable foot shock in the light and tested in the dark; **DL** = inescapable foot shock in the dark and tested in the light; and **DD** = inescapable foot shock in the dark and tested in the dark.

1 INTRODUCTION

Rhythms are present in all biological systems, from micro-organisms to more complex multicellular organisms. Biological rhythms, such as feeding, mood, and body temperature, affect several other physiological and metabolic processes. Thus, rhythms must be precisely maintained to ensure that the organism expends less energy to facilitate adaptability. One of the most recognised systems is regulated by the pineal gland, which adjusts physiological functions according to the onset of dark and light periods (Bourin et al., 2003). This creates the circadian rhythm, which is adjusted by external synchronizers (light, feeding, and social rhythm) and internal molecular mechanisms (Couto-Moraes et al., 2009).

One example of a behavioural manifestation of desynchronization is the affective disorders associated with seasonal variations in light periods (Couto-Moraes et al., 2009). A decrease in the amplitude of activity rhythms has also been described among depressed patients (Lader, 2007; Barden, 2004). Moreover, the desynchronization of circadian rhythms may manifest as behavioral symptoms, such as a decrease in activity, anhedonia, and sleep complaints (Vogel et al., 1973). These observations indicate the importance of the light/dark rhythm on the behavioral manifestation of depression.

Despite several efforts to understand the pathophysiology of depression, many questions remain unanswered, which reflects the limits of the currently developed animal models used in many studies. Previously, few models have considered circadian rhythm to be an important variable in the development or persistence of depression. Most of the current experiments are performed in the morning (Nestler et al., 2002; Piato et al., 2008; Thomson et al., 2008; Murray et al., 1996) despite known differences in the activity rhythms throughout a 24-hour day. For example, one of the most important species used in experimental studies are rodents, which demonstrate the opposite activity rhythm of humans (Simon, 2003). There are no previous studies that consider the effect of the time of day on the intervention and evaluation of animal models. Therefore, the objective of the present study is to evaluate whether intervening and testing at different periods of the day would produce different results in animal behavior studies.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Animals

Thirty-five, 60-day-old male Wistar rats were habituated to the equipment used in this study. The animals had free access to food and water and were maintained on a 12-hour light-dark cycle (lights on at 7 a.m.) under controlled temperature and humidity conditions (22°C to 24°C and 55 to 65%, respectively). All procedures were approved by the Ethics Committee of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre and followed Brazilian law for animal use in teaching and research activities (Federal law N° 11.794 from 8 October 2008) as well as the guidelines of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (ILAR, 1996, USA). The randomization, intervention, and outcome measures are shown in Figure 1.

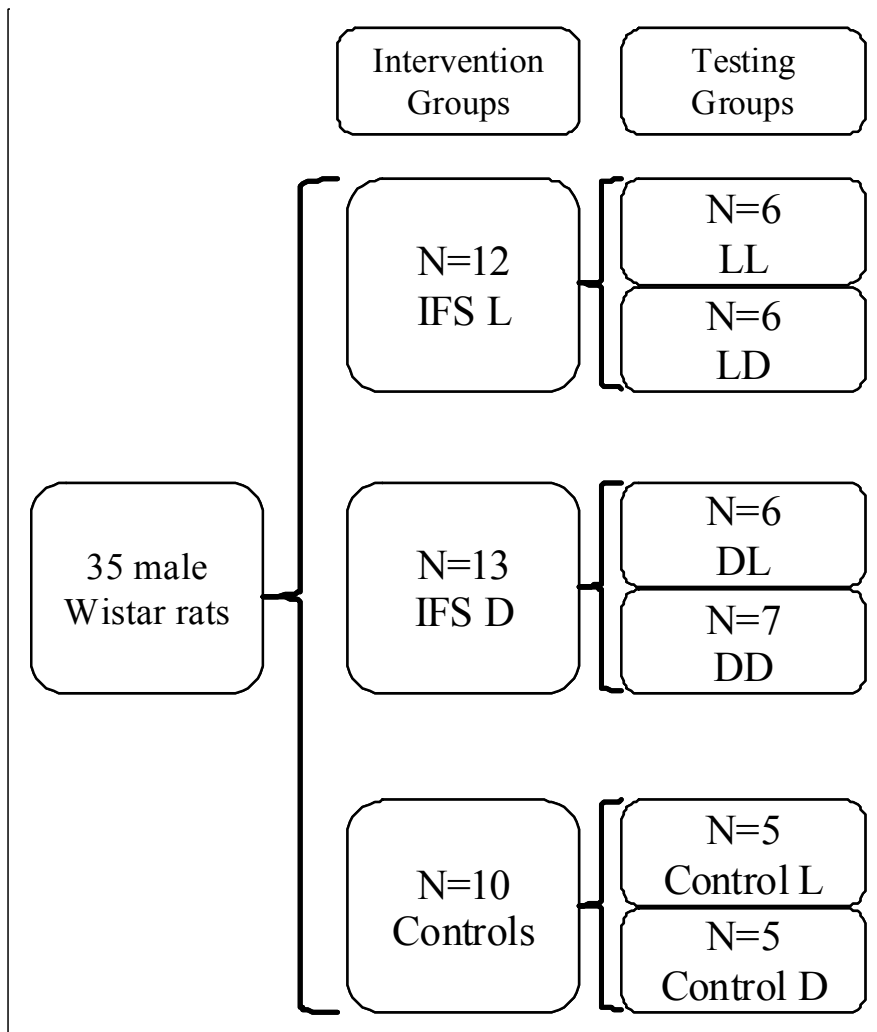


Figure 1 The intervention and testing groups. IFS=inescapable foot shock, L=light phase, and D=dark phase.

2.2 Intervention

The stress model used was the Inescapable Foot Shock (IFS), which consists of placing the animals in an avoidance testing chamber without an escape platform and exposing them to a 5×10^{-4} ampere shock for 100 ms every 30 seconds. This test was performed daily for 15 minutes over 7 days. The diurnal group was exposed to the intervention before 12 p.m., whereas the nocturnal group was exposed after 7 p.m.

We evaluated the animals using, as parameter, their coat state to show that this stress model was efficacious as an indirect measure of depression. A fur analysis

was conducted one day after the intervention. The fur on the head and neck; the dorsal, ventral, and genital regions; the hind- and forelegs; and the tail were analysed. The fur was scored as follows: 0 for fur in good condition and 1 for dirty fur. The total score was obtained as a sum of all the areas analysed and ranged from 0-8 (Thomson et al., 2008; Cryan et al., 2002).

2.3 Behavioral tests

The animals were divided and tested according to Figure 1. One-half of the animals were tested at the time they received the shock, and the remaining animals were tested at the same time during the opposite light phase, thus creating four experimental groups: LL (both the Inescapable Foot Shock and testing in the light phase); LD (Inescapable Foot Shock in the light phase and testing in the dark phase); DL (Inescapable Foot Shock in the dark phase and testing in the light phase); and DD (both the Inescapable Foot Shock and testing in the dark phase). Also, there were two controls groups: Control L (Animals observed in the Light phase) and Control D (Animals observed in the Dark phase).

2.4 Light/Dark Box (Crossing over and latency)

This test is based on rodents' behavior to avoid illuminated areas and spontaneously explore new environments (Simon, 2003; Fava et al., 2000). The apparatus consisted of a 60 cm x 30 cm x 25 cm plastic box with a transparent lid that was divided into two compartments: a larger and illuminated compartment (850 lux) with a white floor and black stripes that divided it into 9 quadrants and a smaller, dark compartment with a black floor and white stripes that divided it into 9 quadrants. The rat was able to freely access each of the compartments by crossing through a central 12 cm x 12 cm opening in the dividing wall. Each animal was released into the upper-right corner of the light area and was allowed to spontaneously explore for 5 minutes. The entire experiment was videotaped, and the number of crossings, the length of time spent on each side of the box, and the latency to move from the initial quadrant were counted. A rat was considered to have entered a compartment when

the head and both forelegs were inside the compartment. White fluorescent lamps of 32 watts and 4.100 kelvin lit the intervention and testing rooms.

2.5 Statistical analysis

The results were expressed as group means \pm SEM, and the differences between the groups were calculated using Student's t-test and an ANOVA with a Bonferroni *post-hoc* test. Values of $p \leq 0.05$ were considered statistically significant. Statistical analysis was performed using SPSS for Windows (version 17; SPSS Inc, Chicago, IL, USA).

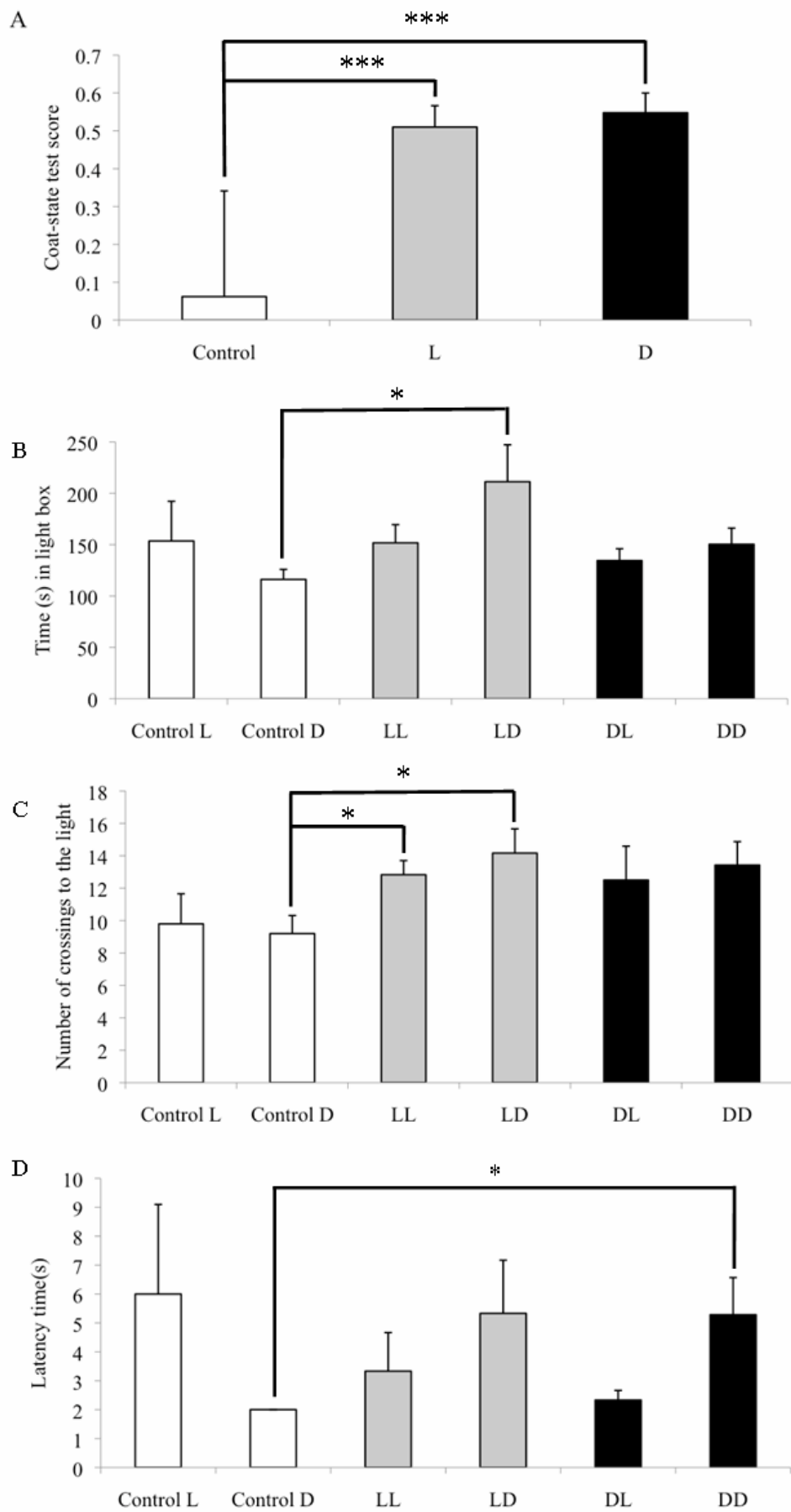


Figure 2 – The comparison of means for the coat-state (A) and light-dark box (B-D) tests. * $P \leq 0.05$, *** $P \leq 0.001$.

3 RESULTS

The control group showed a significantly lower score for coat state than the L ($t = -7.111$; $p < 0.001$) and D ($t = -7.531$; $p < 0.001$) groups (Figure 2A). This result shows that the Inescapable Foot Shock was an efficient model of depression.

Only the Control D and LD groups differed in relation to their time spent in the light compartment ($t = -2.56$; $p = 0.045$) (Figure 2B). A significant difference in the number of crossings into the light compartment was only observed between the Control D and the LL and LD groups ($t = -2.608$; $p = 0.028$; $t = -2.571$; $p = 0.030$, respectively) (Figure 2C). The latency time for the Control D group was significantly lower than that of the DD group ($t = -2.556$; $p = 0.043$; Figure 2D). The Control L group did not significantly differ in the amount of time spent in the light compartment, in the number of crossings into the light compartment, or in the latency times when compared to the other groups (Figure 2 B-D).

Although there were no significant differences related to the time in which the intervention was implemented, we observed that the shocks administered to the groups in the light phase tended to have a greater affect on behavior than in the groups that received the shocks during the dark phase (Figure 2B-D). When the light/dark box parameters were observed, we realized that the light phase group exhibited a tendency to be less disrupted by the shock than the group tested in the dark phase.

4 DISCUSSION

Based on our results, the ideal condition to observed differences is interfere during an animals' resting period and test behavioral responses during their peak activity period. In most of our results, significant differences were observed between the control D and the intervention groups stressed during the day and evaluated in the dark. These results demonstrate that behavioral testing during an animal's period

of highest activity reveals differences in the responses to behavioral interventions, whereas no differences in behavior were observed in comparisons with the Control L group.

Studies have demonstrated that behavior changes are affected by variations in the plasma levels of corticosterone and that the highest sensitivity is observed during the dark cycle (Simon, 2003; Detanico et al., 2009). To avoid evaluating the animals during the test phase, measures can be implemented so the animals can invert their cycles and adapt to new schedules for a minimum of 2 to 3 weeks prior to intervention (Romeas et al., 2009; Surget et al., 2008). This cycle inversion is essential for the analysis of exploratory behaviors (Simon, 2003).

The results from the light/dark box test revealed the importance of the time of day when the animals were tested. Our result demonstrating that significant differences were only observed between Control D and the other groups supports this hypothesis. No differences were observed for those animals evaluated during their rest period. A line-crossing analysis revealed significant differences between the LD and LL groups, which indicate the “aggressiveness” of stressing the animals during their resting period.

With respect to the time spent in the light compartment, the LD group was only significantly different from the Control D group. These data suggest that this group was considerably more anxious because the animals were exposed to the stress model during their resting period (light phase). Furthermore, the animals were tested during their activity period (dark phase); thus, their performance was not impaired. Because the night period is the phase when the animal is typically active, it is considered to be an appropriate time to conduct tests in nocturnal rodents. Further supporting this hypothesis, the treated group (LD), in comparison to the Control D group, showed significant differences across nearly all of the variables (except for latency).

The mean latency to enter the light compartment was significantly different between the Control D and DD groups. The results from the LD group were also different in this parameter, which indicates that the groups tested at night might actually be tested during their peak biological time of activity, therefore enhancing the

validity of the results. By contrast, the DL group was not significantly different across any of the parameters analyzed. It must be noted that these animals were stressed during their activity period; however, at the time of the test, they were in their light phase when they are expected to remain “still” and in their resting period. These data indicate the importance of testing the animals during their active period to prevent biased results because the animal is “lethargic or tired.”

5 CONCLUSIONS

In conclusion, for experiments in which an animal is tested during one period of the day, it is important that the testing is conducted during the animal's period of highest activity to ensure accurate results. Researchers are aware of the activity period of rats; however, they do not report the time during which their experiments are conducted, which indicates that researchers often do not place significant importance on the time during which behavioral tests are performed. Most experiments are conducted during the rest phase of the circadian phase of the animal, which may bias the results. Consequently, most of the negative results described in the literature might be because of omission by or negligence from the researchers to properly control for the time during which the animals were tested.

REFERENCES

- Barden N. Implication of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the hysopathology of depression. *J Psychiatry Neurosci*, 2004; 29: 185-93.
- Bourin M, Hascoet M. The mouse light/dark box test. *Eur J Pharmacol*, 2003; 463: 55-65.
- Couto-Moraes R, Palermo-Neto J, Markus RP. The immune-pineal axis: stress as a modulator of pineal gland function. *Ann N Y Acad Sci*, 2009; 1153: 193-202.
- Cryan JF, Markou A, Lucki I. Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. *Trends Pharmacol Sci*, 2002; 23: 238-45.
- Detanico BC, Piato AL, Freitas JJ, Lhullier FL, Hidalgo MP, Caumo W, Elisabetsky E. Antidepressant-like effects of melatonin in the mouse chronic mild stress model. *Eur J Pharmacol*, 2009; 607: 121-5.
- Fava M, Kendler KS. Major depressive disorder. *Neuron*, 2000; 28: 335-41.

Lader M. Limitations of current medical treatments for depression: disturbed circadian rhythms as a possible therapeutic target. *Eur Neuropsychopharmacol*, 2007; 17: 743-55.

Murray CJ, Lopez AD. Evidence-based health policy--lessons from the Global Burden of Disease Study. *Science*, 1996; 274: 740-3.

Nestler EJ, Barrot M, DiLeone RJ, Eisch AJ, Gold SJ, Monteggia LM. Neurobiology of depression. *Neuron*, 2002; 34: 13-25.

Piato AL, Detanico BC, Jesus JF, Lhullier FL, Nunes DS, Elisabetsky E. Effects of Marapuama in the chronic mild stress model: further indication of antidepressant properties. *J Ethnopharmacol*, 2008; 118: 300-4.

Romeas T, Morissette MC, Mnie-Filali O, Pineyro G, Boye SM. Simultaneous anhedonia and exaggerated locomotor activation in an animal model of depression. *Psychopharmacology (Berl)*, 2009; 205: 293-303.

Simon GE. Social and economic burden of mood disorders. *Biol Psychiatry*, 2003; 54: 208-15.

Surget A, Saxe M, Leman S, Ibarguen-Vargas Y, Chalou S, Griebel G, Hen R, Belzung C. Drug-dependent requirement of hippocampal neurogenesis in a model of depression and of antidepressant reversal. *Biol Psychiatry*, 2008; 64: 293-301.

Thomson F, Craighead M. Innovative approaches for the treatment of depression: targeting the HPA axis. *Neurochem Res*, 2008; 33: 691-707.

Vogel GW, Thompson FC, Jr., Thurmond A, Rivers B. The effect of REM deprivation on depression. *Psychosomatics*, 1973; 14: 104-7.

APÊNDICE C

Artigo aceito para publicação no periódico Trends in Psychiatry and Psychotherapy

"Chronotype: A review of the advances, limits and applicability of the main instruments used in the literature to assess the human phenotype",

Rosa Levandovski¹, Etianne Martini Sasso¹, Maria Paz Loayza Hidalgo²

¹Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Faculdade de Medicina, Programa de Pós Graduação em Medicina: Ciências Médicas; Laboratório de Cronobiologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, Brazil.

²Professora do Departamento de Psiquiatria e Medicina Legal da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Coordenadora do Laboratório de Cronobiologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Brazil.