

Thaís Salviana Ribeiro

EFEITOS DO CITRATO DE CLOMIFENO E DO LETROZOL NO
COMPORTAMENTO DA LINHAGEM CELULAR
DE MELANOMA HUMANO A375

Universidade Federal de Minas Gerais
Programa de Pós-graduação em Patologia
Belo Horizonte – MG

2021

Thaís Salviana Ribeiro

EFEITOS DO CITRATO DE CLOMIFENO E DO LETROZOL NO
COMPORTAMENTO DA LINHAGEM CELULAR DE
MELANOMA HUMANO A375

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação
em Patologia da Universidade Federal de Minas Gerais,
como requisito parcial para obtenção do título de Mestre
em Patologia.

Área de concentração: Patologia investigativa

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Helen Lima Del Puerto

Coorientador: Prof. Dr. Enio Ferreira

Belo Horizonte – MG

2021

Ribeiro, Thais Salviana.
R484e Efeitos do Citrato de Clomifeno e do Letrozol no comportamento da linhagem celular de Melanoma Humano A375 [manuscrito]. / Thais Salviana Ribeiro. - - Belo Horizonte: 2021.

56f.: il.

Orientador (a): Helen Lima Del Puerto.

Coorientador (a): Enio Ferreira.

Área de concentração: Patologia Investigativa.

Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Melanoma. 2. Neoplasias. 3. Clomifeno. 4. Letrozol. 5. Carcinogênese. 6. Dissertação Acadêmica. I. Puerto, Helen Lima Del. II. Ferreira, Enio. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título.

NLM: QZ 360

Bibliotecário responsável: Fabian Rodrigo dos Santos CRB-6/2697

ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO N° 433 DE THAÍS SALVIANA RIBEIRO

Realizou-se, no dia 31 de maio de 2021, às 16 horas, no formato on-line, a defesa de Dissertação, intitulada “**Efeitos do Citrato de Clomifeno e do Letrozol no Comportamento da Linhagem Celular de Melanoma Humano A375**”, apresentada pela mestranda **Thaís Salviana Ribeiro**, número de registro 2019695973, graduada no curso de Biomedicina, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em PATOLOGIA, à seguinte Comissão Examinadora: **Prof^ª. Helen Lima Del Puerto, ICB/UFMG – ORIENTADORA; Prof. Enio Ferreira, ICB/UFMG – COORIENTADOR; Prof^ª. Istéfani Luciene Dayse, UFOB e Prof^ª. Marcella Nunes de Melo Braga, ICB/UFMG.**

A Comissão considerou a Dissertação:

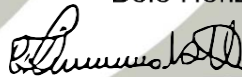
Aprovada

Reprovada

Finalizados os trabalhos, lavrei a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada por mim e pelos membros da Comissão.

Belo Horizonte, 31 de maio de 2021.

Prof^ª. Helen Lima Del Puerto



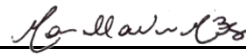
Prof. Enio Ferreira



Prof^ª. Istéfani Luciene Dayse



Prof^ª. Marcella Nunes de Melo Braga



* De acordo com as Normas Gerais de Pós-Graduação da UFMG o grau de Mestre só será concedido ao aluno que entregar ao Colegiado do Curso, no prazo máximo de 60 dias, a versão final da Dissertação, em conformidade com as indicações da Comissão Examinadora. Após a entrega da versão final com a documentação exigida para emissão de Diploma, a secretaria emitirá Certificado de Conclusão do Mestrado.

AGRADECIMENTOS

A Deus, acima de tudo, sou imensamente grata por esta vida e pela trajetória que tracei, sob Sua graça, até aqui.

A minha família, cujo amor e suporte imensuráveis permitiram a realização deste sonho.

Ao meu namorado, por seu apoio incondicional e pela parceria sólida e constante.

Aos meus amigos, e aos meus companheiros de laboratório (em especial aos amadinhos Felipe, Emerson, Bárbara, Camila e Bruna), por me acolherem e dividirem comigo essa caminhada.

A UFMG e a Biomedicina, por me propiciarem alguns dos anos mais especiais da minha vida e carreira.

A todos os meus professores, por seu incrível papel na construção da minha vida acadêmica e profissional.

Ao Laboratório do Comportamento Celular (LCC), pela cessão do necessário à realização desse trabalho e por ser uma casa tão querida durante todo o meu mestrado.

A Helen e ao Enio, por confiarem em meu potencial como orientanda, pela sua contribuição e inspiração diárias, e por serem referência profissional e pessoal para todos os seus filhos acadêmicos.

E a todos que fizeram parte da minha formação, a minha gratidão.

"Todo contato deixa uma marca"
(Edmond Locard)

*“A felicidade pode ser encontrada
mesmo nas horas mais difíceis, se
você lembrar-se de acender a luz.”*

(Alvo Dumbledore)

Este trabalho foi realizado no Laboratório do Comportamento Celular do Departamento de Patologia Geral do ICB / UFMG, com apoio financeiro do CNPq, CAPES e FAPEMIG.

RESUMO

O melanoma é o câncer proveniente da transformação maligna dos melanócitos, células produtoras de melanina que podem ser encontradas na pele, bem como, em outros sítios anatômicos. Apesar de sua baixa incidência, o melanoma possui alta letalidade devido ao seu comportamento celular mais agressivo. Sua ocorrência depende da interação de múltiplos fatores, já sendo sugerida na literatura a associação entre o uso de fármacos indutores de ovulação, e o desenvolvimento do melanoma e de outras neoplasias. O citrato de clomifeno (CC) e o letrozol (LET) são amplamente usados para o tratamento da infertilidade em pacientes anovulatórias e para a preservação da fertilidade de pacientes oncológicas, por exemplo. Tais drogas são utilizadas durante a etapa de estimulação ovariana controlada (EOC), cujo intuito é a indução da ovulação. A correlação entre o uso de CC para a EOC e o desenvolvimento do melanoma é sugerida na literatura por vários estudos, mas seu caráter observacional limita a interpretação dos seus resultados. Com relação ao LET, é indicado na literatura seu caráter protetor no tratamento contra o câncer de mama receptor de estrogênio positivo, quando usado em associação com o tamoxifeno. Entretanto, até o momento não há trabalhos que investigaram seu efeito no desenvolvimento ou tratamento de outros tipos de câncer. Assim, o presente trabalho objetivou investigar os efeitos do CC e do LET no comportamento da linhagem de melanoma humano A375, examinando aspectos associados a agressividade celular como a viabilidade, ciclo celular, perfil migratório, e a expressão de mRNA de genes associados a transição epitélio-mesenquimal (*NCAD* e *ECAD*), estresse oxidativo mitocondrial (*SOD2*) e morte celular (*BAX*). Para isso, as células foram tratadas com CC (200 a 2000 ng/mL) e LET (400 a 4000 ng/mL) por 24 e 48 horas. Foi observada uma redução de 80% na viabilidade celular após 48 horas do tratamento com CC 2000 ng/mL; com a indução da parada do ciclo celular na fase G1 24h após o tratamento, e na sub-G1 após 48h de tratamento. O LET, por sua vez, induziu apenas alterações leves e moderadas na viabilidade e ciclo celular. Após 48h de tratamento com o CC (2000 ng/mL) as células A375 apresentaram menor capacidade de migração no ensaio de cicatrização de feridas. Os resultados da expressão gênica indicaram diferenças estatisticamente significativas na expressão de *BAX* e *SOD2* nas concentrações de 2000 ng/mL de CC, bem como, 400 e 4000 ng/mL de LET. Após 24h e 48h de incubação com 2000 ng/mL de CC, houve uma redução na expressão de *BAX* (0,044 e 0,485 *fold change*, respectivamente), com aumento na expressão de *SOD2* 48h após o tratamento (1,399 *fold change*). No entanto, 48h após o tratamento com LET ocorreu um aumento na expressão de *BAX* e *SOD2* com 400 ng/mL da droga (1,836 e 2,321 *fold change*, respectivamente), e com 4000 ng/mL (5,193 e 8,587 *fold change*, respectivamente). Além disso, o LET regulou negativamente a expressão de *NCAD*, após 24 e 48h de incubação nas concentrações de 400 ng/mL (0,261 e 0,319 *fold change*, respectivamente) e 4000 ng/mL (0,272 e 0,462 *fold change*, respectivamente). Em conclusão, os resultados do presente estudo indicam que as drogas CC e LET reduzem a viabilidade das células A375, induzem uma parada no ciclo celular na fase G1, reduzem sua capacidade de migração, e aumentam o estresse oxidativo dessas células; indicado por um aumento na expressão gênica de *SOD2* e *BAX*. Portanto, no presente estudo, tais indutores de ovulação não favoreceram a agressividade das células A375 de melanoma humano.

PALAVRAS-CHAVES: melanoma, neoplasias, clomifeno, letrozol, carcinogênese, dissertação acadêmica.

ABSTRACT

Melanoma is a cancer type originated from the malignant transformation of melanocytes, melanin-producing cells that can be found in the skin, as well as in other anatomic sites. Despite its low incidence, melanoma has high lethality rates due to its notably aggressive cell profile. Its occurrence depends on the interaction of multiple factors, and the association between the use of fertility drugs and the development of melanoma, amongst other cancer types, has already been suggested in the literature. Clomiphene citrate (CC) and letrozole (LET) are widely used for the treatment of infertility in anovulatory patients, and for preserving cancer patients' fertility, for instance. These drugs are used for controlled ovarian stimulation (COS), which aims to induce ovulation. The correlation between CC use for COS and the development of melanoma is indicated by several studies, but their observational character limits the interpretation of their results. Regarding LET, the literature has already mentioned its protective role against estrogen-receptor positive breast cancer, when LET was used in association with tamoxifen. However, up to date there are no studies that investigated its effects in the development nor treatment of other cancer types. Thus, the present work aimed to investigate the effects of CC and LET in the A375 human melanoma cell line, by evaluating aspects such as cell viability, cell cycle, migratory profile, and mRNA expression of genes associated with epithelial-mesenchymal transition (*NCAD* and *ECAD*), mitochondrial oxidative stress (*SOD2*) and cell death (*BAX*). The cells were treated with CC (200 to 2000 ng/mL) and LET (400 to 4000 ng/mL) for 24 and 48 hours. An 80% reduction in cell viability was observed 48 hours after treatment with 2000 ng/mL CC; with induction of cell cycle arrest in G1 phase 24h after treatment, and in sub-G1 phase 48h following treatment. LET induced only mild changes in cell viability and cell cycle. After 48 hours of CC treatment (2000 ng/mL), A375 cells' migration ability in the wound healing assay decreased. Additionally, gene expression results indicated statistically significant differences in the expression of *BAX* and *SOD2* after cell treatment with 2000 ng/mL of CC, as well as 400 and 4000 ng/mL of LET. After 24h and 48h of incubation with 2000 ng/mL of CC, there was a reduction in the expression of *BAX* (0.044 and 0.485 fold change, respectively), with an increase in the expression of *SOD2* 48h after the treatment (1.399 fold change). However, 48h after treatment with LET there was an increase in the expression of *BAX* and *SOD2* at 400 ng/mL (1.836 and 2.321 fold change, respectively), and at 4000 ng/mL of the drug (5.193 and 8.587 fold change, respectively). Furthermore, LET down-regulated *NCAD* expression after 24 and 48 h of incubation at concentrations of 400 ng/mL (0.261 and 0.319 fold change, respectively) and 4000 ng/mL (0.272 and 0.462 fold change, respectively). In conclusion, the results of the present study indicate that CC and LET reduce A375 cells' viability, induce cell cycle arrest in the G1 phase, reduce cells' migration ability, and increase oxidative stress; indicated by the up-regulation of *SOD2* and *BAX*. Therefore, these ovulation-inducing drugs did not favor the aggressiveness of A375 melanoma cell line.

KEYWORDS: melanoma, neoplasms, clomiphene, letrozole, carcinogenesis, academic dissertation.

SUMÁRIO

1. CONSIDERAÇÕES INICIAIS	11
1.1.INTRODUÇÃO.....	11
1.2.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
1.2.1. CÂNCER.....	13
1.2.2. MARCOS DO CÂNCER E DESENVOLVIMENTO NEOPLÁSICO	14
1.2.3. MELANOMA	19
1.2.4. CITRATO DE CLOMIFENO E LETROZOL NA ESTIMULAÇÃO OVARIANA CONTROLADA.....	22
2. ARTIGO	26
3. CONSIDERAÇÕES FINAIS	48
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51

1. CONSIDERAÇÕES INICIAIS

1.1. INTRODUÇÃO

O melanoma deriva da proliferação autônoma e desordenada dos melanócitos, células produtoras de melanina que podem ser encontradas na epiderme, olhos, meninges, esôfago e membranas mucosas (ALI; YOUSAF; LARKIN, 2013). Essa neoplasia possui alta letalidade, sendo responsável por cerca de 43% das mortes por câncer de pele no Brasil, em contraste com sua baixa incidência, representando apenas 3% dos casos de câncer de pele no país no ano de 2019 (INCA, 2021a). Entretanto, nos últimos 50 anos, a incidência do melanoma vem crescendo mundialmente, contribuindo para sua classificação na 19ª posição no *ranking* de neoplasias mais diagnosticadas no mundo; com cerca de 300 mil novos casos reportados por ano, de acordo com estatísticas da Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC) da Organização Mundial de Saúde (OMS) (BRAY *et al.*, 2018)

Assim como em todas as neoplasias malignas, a ocorrência do melanoma resulta de uma interação complexa entre múltiplos fatores ambientais e genéticos, sendo a exposição aos raios ultravioleta do sol o fator mais importante para o aumento do risco de desenvolvimento desse tipo de câncer (RASTRELLI *et al.*, 2014). Tal interação pode levar a alterações celulares que são consideradas as bases para a iniciação, promoção e progressão tumorais; por afetarem diretamente características metabólicas, proliferativas, fenotípicas e de evasão a importantes mecanismos de controle celular, como o reparo do material genético e a morte celular (HANAHAN; WEINBERG, 2000).

É sabido que vários medicamentos podem influenciar o desenvolvimento neoplásico (BELITSKIY *et al.*, 2020), exibindo potencial carcinogênico quando contribuem para a evolução da neoplasia, ou potencial antitumoral quando desfavorecem seu desenvolvimento, desacelerando-o ou induzindo a morte celular (HANAHAN; WEINBERG, 2011). No âmbito deste trabalho, foi destacado o citrato de clomifeno (CC) e o letrozol (LET), fármacos utilizados como indutores de ovulação em pacientes anovulatórias, ou para a preservação da fertilidade de pacientes oncológicas, por exemplo. Tais drogas são utilizadas durante a etapa de estimulação ovariana controlada (EOC), para o desenvolvimento e maturação folicular (MITWALLY; CASPER, 2001). Sua influência direta na produção e liberação hormonal pode

ter um papel importante no desenvolvimento de neoplasias, e essa associação já foi sugerida na literatura entre o CC e diversos tipos de câncer, incluindo o melanoma, em estudos predominantemente observacionais, realizados a partir de coortes de mulheres em propedêutica de infertilidade, que fizeram o uso desse medicamento (DOR *et al.*, 2002; KESSOUS *et al.*, 2016; KRISTIANSOON; BJÖR; WRAMSBY, 2007; POTASHNIK *et al.*, 1999; REIGSTAD *et al.*, 2017; ROSSING *et al.*, 1995; YOUNG *et al.*, 2001).

O LET, por outro lado, é um fármaco que tem sido utilizado no tratamento do câncer de mama receptor de estrogênio positivo, que constitui cerca de dois terços de todos os cânceres de mama diagnosticados (KIM; TURAN; OKTAY, 2016; MOURIDSEN, 2007; THÜRLIMANN *et al.*, 2005; VOHORA *et al.*, 2017). Porém, até o momento, não há estudos que associem o LET ao tratamento ou desenvolvimento de outras neoplasias, incluindo o melanoma.

Atrelado a isso, a profundidade da discussão acerca do papel pró ou antitumoral do CC é limitada pela natureza observacional dos estudos epidemiológicos publicados até o momento, uma vez que a interpretação dos seus resultados pode sofrer a influência de vários vieses como: as condições em que as análises foram realizadas e o método de avaliação empregado; o histórico médico das pacientes; e outros potenciais carcinógenos aos quais elas foram expostas entre o término do protocolo de EOC com o CC, e o diagnóstico oncológico (ASMR, 2016).

Dessa maneira, evidencia-se a necessidade de estudos experimentais que investiguem, em condições controladas e replicáveis, a correlação entre o uso desses indutores de ovulação e sua ação no comportamento de células neoplásicas malignas. Isso pode auxiliar no entendimento da segurança desses compostos a longo prazo na saúde da mulher, e da sua segurança de uso em pacientes oncológicas, para as quais a EOC é indicada com o intuito de preservação da fertilidade (CAKMAK; ROSEN, 2013).

Portanto, o presente trabalho propôs-se a investigar como o CC e o LET podem atuar *in vitro* no comportamento das células de melanoma humano (A375), um tumor de sítio primário, avaliando o efeito dessas drogas em fatores associados à agressividade celular como metabolismo e viabilidade, ciclo celular, potencial migratório e invasivo, e na expressão de genes relacionados ao estresse oxidativo mitocondrial e à morte celular por apoptose.

1.2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.2.1. CÂNCER

O termo “câncer” é utilizado para denominar um conjunto de doenças, que têm como ponto de partida a proliferação anormal, descontrolada e autônoma de células neoplásicas malignas (INCA, 2020). Tal perfil proliferativo resulta da combinação de vários fatores genéticos e ambientais, que eventualmente podem culminar na invasão de tecidos adjacentes, ou até mesmo na disseminação e implantação das células neoplásicas em sítios distantes, processo este conhecido como metastização (FILHO, 2013).

Estimativas feitas para o ano de 2020 pela Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC - *International Agency for Research on Cancer*) da Organização Mundial de Saúde (OMS) indicam a ocorrência de cerca de 19,2 milhões de novos casos de câncer no mundo, em paralelo com quase 10 milhões de mortes decorrentes dessa doença no mesmo ano (IARC, 2020). Para o Brasil, dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA), indicam a incidência de cerca de 626 mil novos casos no ano de 2020, com quase 232 mil mortes contabilizadas no país no ano de 2019 (INCA, 2021b). Tais dados refletem como o câncer tem se tornado cada vez mais incidente, e como seus efeitos no organismo podem ser extremamente debilitantes e, muitas das vezes, letais; o que faz dessa doença um notório desafio social e de saúde pública em todo o mundo (ASSOCIAÇÃO DA INDÚSTRIA FARMACÊUTICA DE PESQUISA (INTERFARMA), 2019; KANAVOS, 2006; MORRELL; YOUNG; RODER, 2019).

Dentre os fatores que podem levar ao desenvolvimento do câncer, os extrínsecos sobressaem-se aos intrínsecos, estando aqueles associados a cerca de 80-90% dos casos. Dos fatores extrínsecos, destacam-se: o ambiental, como exposição à radiação ultravioleta do sol e a produtos químicos; o social, como tabagismo, alimentação e estilo de vida; e o aumento da expectativa de vida da população, com conseqüente prolongamento da exposição a carcinógenos, cujos efeitos, ainda que tardios, podem manifestar-se em idades mais elevadas. Já para os fatores intrínsecos, cujo impacto no desenvolvimento do câncer é menor, podem ser citados: a hereditariedade, que se relaciona diretamente com alterações genéticas herdadas dos pais; além de aspectos étnicos e individuais (BREIVIK, 2005; INCA, 2018).

O processo de carcinogênese decorre de várias mutações e alterações celulares, que propiciam a iniciação, promoção e progressão tumoral. A soma de mutações genéticas pode levar a perda da função de genes supressores de tumor, e a ativação de proto-oncogenes em oncogenes, o que compromete o controle celular de funções-chave como os mecanismos de reparo do DNA, a proliferação, morte e metabolismo celular (CAMARDA; WILLIAMS; GOGA, 2017; HANAHAN; WEINBERG, 2000).

Na literatura foram inicialmente citadas seis principais alterações celulares comuns à maioria dos cânceres, sendo elas: a autossuficiência e independência de fatores de crescimento; insensibilidade aos fatores inibitórios do crescimento; evasão à apoptose; potencial ilimitado para a replicação; angiogênese sustentada; e a invasão tecidual com eventual metástase (HANAHAN; WEINBERG, 2000). Posteriormente, outras características foram adicionadas a esse grupo de alterações das células neoplásicas, tais como: a reprogramação metabólica; evasão ao sistema imune, instabilidade genômica e mutação, e a inflamação mediada pelo tumor (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

É possível inferir que a carcinogênese ocorre e progride de maneira facilitada e mais efetiva nos tipos mais incidentes e letais de câncer, dentre os quais podemos destacar os cânceres de mama, próstata, colorretal, traqueia, brônquio e pulmão, cervical e pele (IARC, 2020; INCA, 2021b). No Brasil, o câncer de pele corresponde a cerca de 30% de todos os tipos de câncer registrados, sendo o melanoma considerado o tipo mais grave, devido ao significativo contraste entre sua alta letalidade e baixa incidência (INCA, 2021a).

1.2.2. MARCOS DO CÂNCER E DESENVOLVIMENTO NEOPLÁSICO

Durante o processo de carcinogênese, as células neoplásicas adquirem características específicas que as diferem das células normais do tecido, e que são fundamentais para a sua sobrevivência e replicação, contribuindo diretamente para o estabelecimento e desenvolvimento do câncer. Tais características já foram descritas na literatura como os “marcos do câncer”, podendo ser observadas (em maior ou menor proporção) em todas as neoplasias, incluindo o melanoma (FILHO, 2013; HANAHAN; WEINBERG, 2000).

Dentre os marcos do câncer, originalmente descritos em 2000 e posteriormente revisitados e atualizados, podemos destacar: crescimento celular seletivo e vantagem proliferativa; alteração

do metabolismo celular e da resposta ao estresse oxidativo, favorecendo a sobrevivência; angiogênese sustentada; microambiente favorável; modulação do sistema imune; e capacidade de invasão e metastização (FOUAD; AANEI, 2017; HANAHAN; WEINBERG, 2000).

Todos esses marcos correlacionam-se com o comportamento da célula tumoral, o qual pode ser mais ou menos agressivo de acordo com o tipo de câncer, além de poder ser modulado por fatores externos como, por exemplo, tratamentos que objetivem enfraquecer e exterminar as populações de células neoplásicas visando a cura do paciente (SAMIR AL-BEDEARY; AL-SHARAFI, 2020).

A característica celular mais notória nas neoplasias é a vantagem proliferativa, que está associada a um crescimento celular seletivo. É bem estabelecido que as células neoplásicas têm alterações em vias de sinalização responsáveis por controlar a proliferação e a homeostase celular, fatores que em condições fisiológicas garantem o fenótipo celular normal e saudável (FOUAD; AANEI, 2017; VOGELSTEIN *et al.*, 2013).

A regulação fina do ciclo celular é responsável pelo controle da proliferação celular, de forma que a proliferação desordenada característica do câncer, ocorre devido à desregulação desse importante mecanismo. A perda de controle do ciclo celular pode estar associada, especialmente, à redução ou inibição da expressão de genes supressores de tumor, em paralelo com a ativação de proto-oncogenes em oncogenes (CAMARDA; WILLIAMS; GOGA, 2017; HANAHAN; WEINBERG, 2000).

Proto-oncogenes são genes que, em condições normais, induzem o crescimento celular. A mutação desses genes pode torná-los oncogenes, cuja alta expressão favorece a proliferação desordenada típica das neoplasias. Dentre os oncogenes expressos pela maioria dos cânceres estão o *MYC*, *BCL-2*, *RAS*, *HER2*, entre outros. Os genes supressores de tumor, por sua vez, atuam na inibição da divisão celular codificando proteínas que desempenham papéis cruciais nos pontos de checagem do ciclo celular. *TP53*, *BRCA1*, *BRCA2*, *NF1* e *NF2* são exemplos de importantes supressores tumorais, comumente inativados ou mutados no câncer (CAMARDA; WILLIAMS; GOGA, 2017; WEINBERG, 2013).

Através de alterações no controle do ciclo celular, a proliferação celular é favorecida, bem como a progressão tumoral. O ciclo celular é composto por duas etapas principais: a intérfase, que

resulta na duplicação do DNA e dos componentes celulares; e a mitose (M), marcada pela citocinese (Figura 1) (MATSON; COOK, 2017; WEINBERG, 2013).

A intérfase é a etapa mais longa do ciclo, e é dividida nas fases G1, S e G2, durante as quais ocorrem o crescimento celular em volume e em número de organelas, a duplicação do DNA, e a síntese de proteínas e de componentes da membrana citoplasmática, respectivamente. Há também a fase G0, na qual as células reduzem seu metabolismo celular e entram em estado de quiescência ou senescência, não havendo duplicação (Figura 1). Caso recebam estímulos externos favoráveis, as células quiescentes podem retornar para a fase G1 e reiniciar seu ciclo de replicação e divisão celular, o que não é possível para as células senescentes. (LIM; KALDIS, 2013; MATSON; COOK, 2017; WEINBERG, 2013).

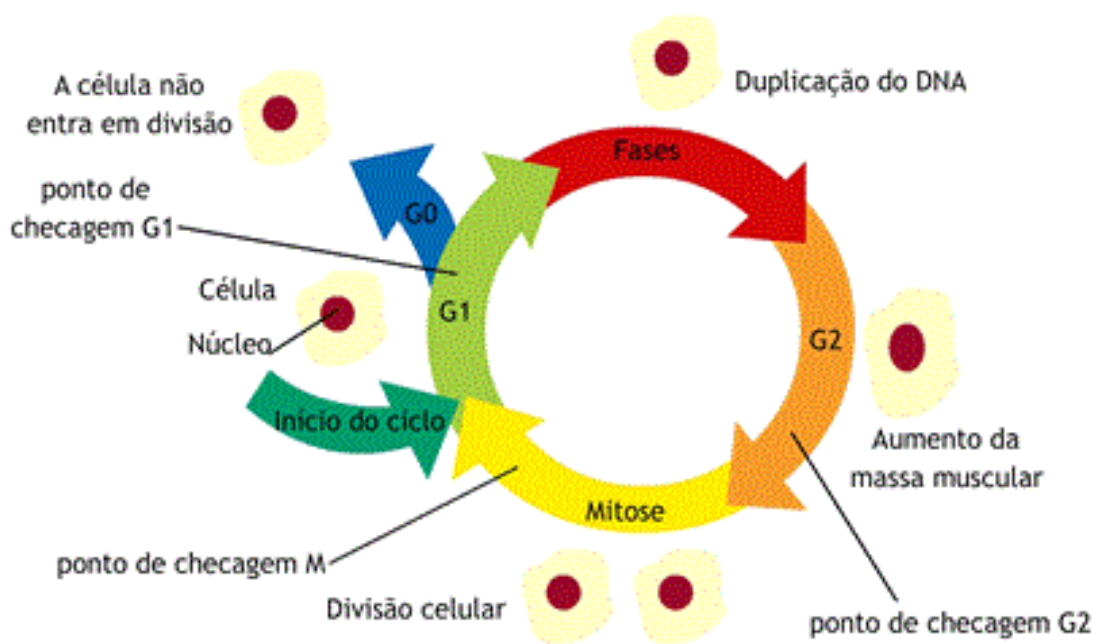


Figura 1 – Representação das fases do ciclo celular e de seus pontos de checagem. Disponível em: www.sobiologia.com.br.

A iniciação e progressão das células dentro do ciclo celular são reguladas principalmente pela ativação de proteínas quinases dependentes de ciclinas (CDKs). As CDKs atuam especialmente nos pontos de checagem do ciclo celular, juntamente com outras proteínas efetoras como a p53, que são extremamente necessárias para a garantia de uma proliferação normal (LIM; KALDIS, 2013). Os pontos de checagem do ciclo celular são posicionados em G1/S, G2/M e M, e neles é feito um rastreamento do conteúdo celular recém-produzido (Figura 1). Caso haja a detecção

de danos neste material, as proteínas efetoras induzem uma parada no ciclo para que ocorra o processo de reparo que, se for bem sucedido, permite o retorno da célula ao ciclo, na fase subsequente de replicação ou divisão. Em caso de falhas no reparo, ocorre a indução da morte celular por apoptose (HUMPAL; ROBINSON; KREBS, 2009). As falhas nos processos de checagem e reparo do ciclo celular, frequentes no câncer, contribuem para a origem e proliferação de células com mutações gênicas e com potencial maligno (MOLINARI, 2000).

A alta taxa proliferativa das células neoplásicas demanda grande produção energética, o que faz com que sejam necessários ajustes metabólicos que confirmam vantagens seletivas durante a iniciação e progressão tumorais (CAIRNS; MAK, 2016; DEBERARDINIS; CHANDEL, 2016). As células neoplásicas podem apresentar (de maneira total ou parcial) seis principais alterações metabólicas: desregulação na captação de glicose e aminoácidos; aquisição nutricional oportunista; utilização da glicólise e de intermediários do ciclo de Krebs para obtenção de energia; aumento da demanda de nitrogênio; alterações na regulação gênica por metabólitos celulares; e interações metabólicas com o microambiente tumoral (PAVLOVA; THOMPSON, 2016).

Essa modulação metabólica é essencial no microambiente tumoral, que se torna gradualmente escasso à medida que o câncer progride, devido ao aumento da competição por oxigênio, nutrientes e outros fatores essenciais para a sobrevivência celular. Em paralelo com a adaptação metabólica, podemos destacar a resposta celular ao estresse oxidativo como sendo de extrema importância para a sobrevivência das células. A produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) pode advir da própria adaptação metabólica, como resultado da saturação do ciclo de Krebs, por exemplo (DEBERARDINIS; CHANDEL, 2016).

A produção moderada de ROS pode ser útil para a progressão tumoral, uma vez que ela contribui para a ocorrência de mutações genéticas por provocar danos ao DNA. O acúmulo de mutações é uma das características intimamente associadas ao caráter celular maligno, devido ao seu potencial de gerar células mais resistentes e com comportamento mais agressivo. Entretanto, quando uma quantidade excessiva de ROS é gerada, danos graves e irreversíveis podem ser causados, culminando na ativação de vias de morte celular; motivo pelo qual o controle intrínseco da produção e da degradação de ROS é essencial (FOUAD; AANEI, 2017; SABHARWAL; SCHUMACKER, 2014).

Sendo assim, estudos sugerem que as células neoplásicas aumentam sua capacidade antioxidante à medida que o tumor se desenvolve, pois o desenvolvimento tumoral está associado a crescente produção e acúmulo de ROS. Nesse contexto, as mitocôndrias protagonizam importante ação protetora da integridade celular, abrigando enzimas com atividade antioxidante que agem inativando as ROS e prevenindo a morte celular (VYAS; ZAGANJOR; HAIGIS, 2016).

Todas essas alterações e adaptações contribuem para o crescimento da população celular, prolongamento do intervalo de vida das células neoplásicas e evasão à apoptose, permitindo com que elas evoluam e ganhem características cada vez mais malignas. Dois dos eventos-chave da progressão tumoral são a invasão e a metastização, que propiciam a disseminação do câncer para tecidos adjacentes e, em última instância, para sítios distantes (FILHO, 2013).

A invasão se dá pela mudança do fenótipo celular com aquisição de traços como plasticidade e motilidade, processo conhecido como transição epitélio-mesenquimal (TEM). Para isso, há inicialmente a perda das características celulares epiteliais, com ativação de fatores de transcrição como β -catenina e SNAIL, que promovem a mudança da expressão de integrinas, reduzem a adesão à matriz extracelular (MEC), e inibem a expressão de E-caderina, molécula importante para a adesão intercelular. Aliado a isso, há o ganho de características celulares mesenquimais, pela expressão de moléculas como R-caderina e N-caderina, SMA- α e vimentina. Essas alterações permitem o destacamento progressivo das células de seus sítios naturais, e conferem a elas a motilidade necessária para que consigam se locomover em direção ao tecido subjacente (FILHO, 2013).

Além disso, o aumento da capacidade proteolítica das células é essencial para que o processo de invasão tecidual seja possível. O rompimento da membrana basal e degradação da MEC por enzimas como as metaloproteases por exemplo, que digerem o colágeno tecidual, abre espaço para a locomoção das células neoplásicas pelo estroma, promovendo a invasão e o crescimento tumoral, e até mesmo a angiogênese local (EGEBLAD; WERB, 2002; STERNLICHT; WERB, 2001). Após o destacamento celular do tumor primário, rompimento da membrana basal do tecido, invasão e locomoção pelo estroma subjacente, os próximos passos para a metastização são: a invasão dos vasos linfáticos e/ou sanguíneos peritumorais pelas células neoplásicas e, finalmente, o extravasamento dessas células nos sítios secundários (linfonodos ou outros órgãos), que podem vir a se tornar os sítios metastáticos do câncer (FILHO, 2013).

Finalmente, a essencialidade de todos esses fatores para o câncer torna imperativo o aprimoramento da compreensão a respeito de como eles agem no ambiente tumoral, o que é extremamente importante para o entendimento do funcionamento do câncer como um todo e, principalmente, para o entendimento de seus tipos e subtipos. Portanto, a partir do aprofundamento desse saber, terapias cada vez mais assertivas podem ser desenvolvidas, e teorias mais robustas sobre a influência de fármacos ou outros fatores (intrínsecos ou extrínsecos) no câncer, podem ser construídas e testadas.

1.2.3. MELANOMA

O melanoma é uma neoplasia maligna derivada da transformação dos melanócitos, células produtoras do pigmento melanina, que podem ser encontradas na epiderme, olhos, meninges, esôfago e membranas mucosas. A localização variada dos melanócitos propicia o desenvolvimento do melanoma em diversos sítios anatômicos, de modo que ele pode ser subdividido em: melanoma cutâneo, sua forma mais comum; melanoma de mucosas; e melanoma uveal. Cada subtipo é derivado da transformação maligna dos melanócitos da epiderme, das membranas mucosas e do estroma ocular, respectivamente (ALI; YOUSAF; LARKIN, 2013). A proliferação autônoma e desordenada dos melanócitos transformados, gera um desbalanço na homeostase tecidual local, comprometendo a comunicação e adesão intercelular, e favorecendo o desenvolvimento do tumor (HAASS; SMALLEY; HERLYN, 2004).

Historicamente, o melanoma já foi considerado uma neoplasia rara, porém, nas últimas décadas sua incidência vem aumentando de maneira superior a quase todos os outros tipos de câncer, com estimativas de crescimento sustentado para os próximos anos (GUY *et al.*, 2015). Com cerca de 300 mil novos casos reportados em 2018, o melanoma é considerado o 19º tipo de câncer mais frequente em todo o mundo, com maior número de diagnósticos reportados na Austrália, seguida da Nova Zelândia, Noruega, Dinamarca e Holanda (BRAY *et al.*, 2018).

A incidência do melanoma na população mundial é bastante variável, uma vez que é condicionada por diversos fatores como: etnia, grau de pigmentação da pele, olhos e cabelos; sensibilidade à queimaduras solares; presença de sardas; condição do sistema imunológico;

predisposição genética; e frequência de exposição aos raios ultravioleta do sol, sendo este o principal determinante ambiental para o aumento do risco de desenvolvimento dessa neoplasia (RASTRELLI *et al.*, 2014; TITUS-ERNSTOFF *et al.*, 2005). No Brasil, o melanoma representa cerca de 3% dos cânceres de pele, tendo sido estimados 8450 novos casos em território nacional no ano de 2020, sendo 4200 diagnosticados em homens, e 4250 em mulheres (INCA, 2021a).

Ao contrário do que ocorre para outros tipos de tumores sólidos, cujo diagnóstico é majoritariamente feito após os 65 anos, o melanoma acomete uma faixa etária mais jovem, com idade média de 57 anos. A incidência aumenta de maneira constante na população entre os 30 e os 90 anos de vida, sendo que, entre indivíduos mais jovens (de 20 a 24 anos) há uma predominância de casos femininos de melanoma; ocorrendo uma inversão desse perfil a partir dos 55 anos, quando os casos predominam em indivíduos do sexo masculino (ALI; YOUSAF; LARKIN, 2013).

Com relação à ocorrência de mortes por esse tipo de câncer, dados globais coletados pela IARC para o ano de 2020, indicam que 0,6% de todas as mortes por câncer tiveram o melanoma como responsável (57.043 mortes), com os maiores percentuais de mortalidade sendo observados na Europa (46,2%), seguida da Ásia (21%) e América do Norte (14,7%) (IARC, 2020). Para o Brasil, 0,84% das mortes por câncer entre 2015 e 2019 foram causadas pelo melanoma cutâneo, sendo 1.978 óbitos reportados em 2019. Isso evidencia que, embora a incidência do melanoma seja relativamente seja baixa, sua letalidade é alta, sendo ele responsável por cerca de 43% das mortes por câncer de pele no país (INCA, 2021a).

A sobrevida por melanoma no Brasil é baixa, quando comparada a população mundial, principalmente devido ao diagnóstico tardio, relacionado à dificuldade de acesso da população ao sistema de saúde (VAZQUEZ *et al.*, 2015). Além disso, a letalidade do melanoma também deriva de características de agressividade inerentes a esse tipo de neoplasia, cujo perfil molecular diverso e complexo, reflete seu caráter heterogêneo e clinicamente desafiador (SEKULIC *et al.*, 2008), com células de potencial altamente proliferativo, plástico, invasor e metastático (GREENBERG *et al.*, 2011).

O surgimento da lesão benigna, que eventualmente pode originar o melanoma, ocorre por meio da proliferação restrita de melanócitos normais, com o desenvolvimento de nevo benigno. Partindo desse estágio inicial, os melanócitos podem acumular mutações e desenvolver atipias

que os permitam proliferar-se de maneira autônoma, levando primeiramente a um crescimento radial e localizado do tumor (melanoma *in situ*), o qual pode progredir com um desenvolvimento vertical até invadir a derme e alcançar a circulação linfática e sanguínea, gerando metástases (SCHADENDORF *et al.*, 2015).

A lacuna entre a lesão benigna e maligna é preenchida por mutações condutoras importantes, que podem levar ao desenvolvimento do melanoma por três caminhos. O primeiro é quando a lesão benigna já possui a mutação V600E do proto-oncogene *BRAF* (*v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1*) e a mutação na região promotora do *TERT* (*telomerase reverse transcriptase*) é a responsável pela transição da lesão intermediária para o melanoma *in situ*. O segundo e terceiro caminhos baseiam-se na existência de uma lesão intermediária entre a lesão benigna e o melanoma *in situ*, que surge por mutações no proto-oncogene *NRAS* (*neuroblastoma RAS viral oncogene homolog*) e *TERT*; ou *BRAF* (V600E) e *TERT*, respectivamente (SHAIN *et al.*, 2015).

É bem estabelecido, entretanto, que a transição do melanoma *in situ* para invasivo, ocorre por alterações no gene *CDKN2A* (*cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*), responsável pela síntese de proteínas como a p16 e p14. Estas têm importante papel supressor tumoral por estarem envolvidas no controle da proteína p53, que direciona o reparo do DNA durante o ciclo celular, induzindo a morte por apoptose em casos de falha nesse processo (SEKULIC *et al.*, 2008). No melanoma a frequência de mutações no gene *TP53* que codifica a p53 é cerca de 9% (BENNETT, 2008).

Por outro lado, cerca de 90% dos melanomas possuem a hiperfosforilação da proteína MAPK (*mitogen-activated protein kinase*). A MAPK é responsável por estimular a proliferação celular e proteger a célula contra a morte por apoptose, de modo que sua superexpressão pode ser um evento facilitador do desenvolvimento tumoral. A causa da hiperfosforilação desta proteína está ligada a mutações no gene *BRAF*, que induzem sua atuação como oncogene (WOODMAN *et al.*, 2012). A metastização do tumor, por sua vez, provavelmente se estabelece por perda de função do gene *PTEN* (*phosphatase and tensin homolog*) supressor de tumor, em conjunto com alterações na função da p53 (SHAIN *et al.*, 2015).

Finalmente, todas essas alterações fazem parte do processo de carcinogênese e são extremamente importantes para a iniciação, promoção e progressão tumoral. Como

anteriormente mencionado, esses processos podem sofrer a influência de muitos fatores, dentre os quais estão o uso de medicamentos (INCA, 2018), de modo que muitos fármacos já tiveram seu potencial carcinogênico descrito na literatura (BELITSKIY et al., 2020).

No âmbito deste trabalho, destacam-se dois medicamentos utilizados nos protocolos de estimulação ovariana controlada (EOC). O primeiro deles é o citrato de clomifeno (CC), cuja associação a diversos tipos de câncer, incluindo o melanoma, já foi sugerida na literatura por estudos majoritariamente epidemiológicos (CALDERON-MARGALIT *et al.*, 2009; KESSOUS *et al.*, 2016; POTASHNIK *et al.*, 1999; SIRISTATIDIS *et al.*, 2013; YLI-KUHA *et al.*, 2012). O segundo, por fim, é o letrozol (LET), cujo potencial terapêutico já foi descrito na literatura para o câncer de mama receptor de estrogênio positivo, em associação ao tamoxifeno (KIM; TURAN; OKTAY, 2016; MOURIDSEN, 2007; THÜRLIMANN *et al.*, 2005; VOHORA *et al.*, 2017). Entretanto, seu papel no tratamento ou progressão de outros tipos de câncer ainda não foi investigado.

1.2.4. CITRATO DE CLOMIFENO E LETROZOL NA ESTIMULAÇÃO OVARIANA CONTROLADA

A infertilidade é uma condição que acomete milhões de casais no mundo, e é definida como a incapacidade de iniciar e levar a termo uma gestação, após 12 meses de relações sexuais sem contracepção (OMS, 2018). Uma das técnicas recomendadas para o tratamento da infertilidade após o insucesso de outros tratamentos, é a fertilização *in vitro* (FIV) (NICE, 2013).

A primeira etapa do protocolo de FIV é a EOC, que consiste na indução da ovulação através do uso de fármacos que estimulem o desenvolvimento dos folículos ovarianos; a fim de garantir a recuperação de oócitos maduros para as etapas subsequentes de fertilização e implantação intrauterina dos embriões (ALPER; FAUSER, 2017; GALLOS *et al.*, 2017). A EOC também é largamente utilizada para preservação da fertilidade em condições diversas, sendo recomendada especialmente para pacientes oncológicas, cujos tecidos reprodutivos podem ser significativamente afetados pelas terapias contra o câncer (CAKMAK; ROSEN, 2013). Assim, apesar do recorrente uso desses protocolos ao longo dos anos, sua segurança vem sendo questionada especialmente para as pacientes oncológicas, devido às alterações condicionadas por meio de sua atuação direta na liberação hormonal endógena (AKEL *et al.*, 2020;

LAMBERTINI; ANSERINI; DEL MASTRO, 2016; MARKLUND *et al.*, 2020). Dois dos principais fármacos utilizados para a EOC são o CC e o LET.

O CC é um composto não esteroide, cuja atividade indutora de ovulação em pacientes anovulatórias foi inicialmente descrita na década de 1960, a partir de quando passou a integrar os protocolos de FIV como primeiro fármaco de escolha para a EOC (GREENBLATT *et al.*, 1961; KAMATH; GEORGE, 2011). A analogia estrutural entre o CC e o estrogênio é crucial para o seu mecanismo de ação, que se baseia no bloqueio dos receptores de estrogênio hipotalâmicos por essa droga. Isso inibe o *feedback* negativo do estrogênio no hipotálamo, sinalizando a necessidade de produção e liberação hipotalâmica do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH). O GnRH atua no eixo hipotálamo-hipófise-ovário induzindo a liberação hipofisária do hormônio folículo-estimulante (FSH) e do hormônio luteinizante (LH), que atuam estimulando o crescimento e maturação dos folículos ovarianos propiciando, por consequência, a ovulação (Figura 2) (KERIN *et al.*, 1985; KETTEL *et al.*, 1993). A dosagem do CC para a EOC varia dependendo da resposta individual da paciente, havendo, inclusive, casos de persistência da anovulação mesmo após o tratamento com doses mais elevadas do composto (HOMBURG, 2005).

Frente a casos de resistência ao tratamento com o CC, o LET surgiu em meados dos anos 2000 como uma alternativa para o tratamento da infertilidade (MITWALLY; CASPER, 2001), tendo aceitação e indicação crescentes desde então, por levar a resultados de maturação folicular mais precisos e gerando menos efeitos adversos (HOLZER; CASPER; TULANDI, 2006). O LET é um inibidor seletivo da enzima aromatase, e age impedindo a conversão de hormônios andrógenos (como a testosterona) em estrogênio, reduzindo seus níveis na circulação. Dessa forma, o *feedback* negativo exercido pelo estrogênio no eixo hipotálamo-hipófise é perdido, havendo a sinalização para liberação hipotalâmica de GnRH, seguida da de FSH pela hipófise, resultando na indução da ovulação (HOLZER; CASPER; TULANDI, 2006; KAMATH; GEORGE, 2011).

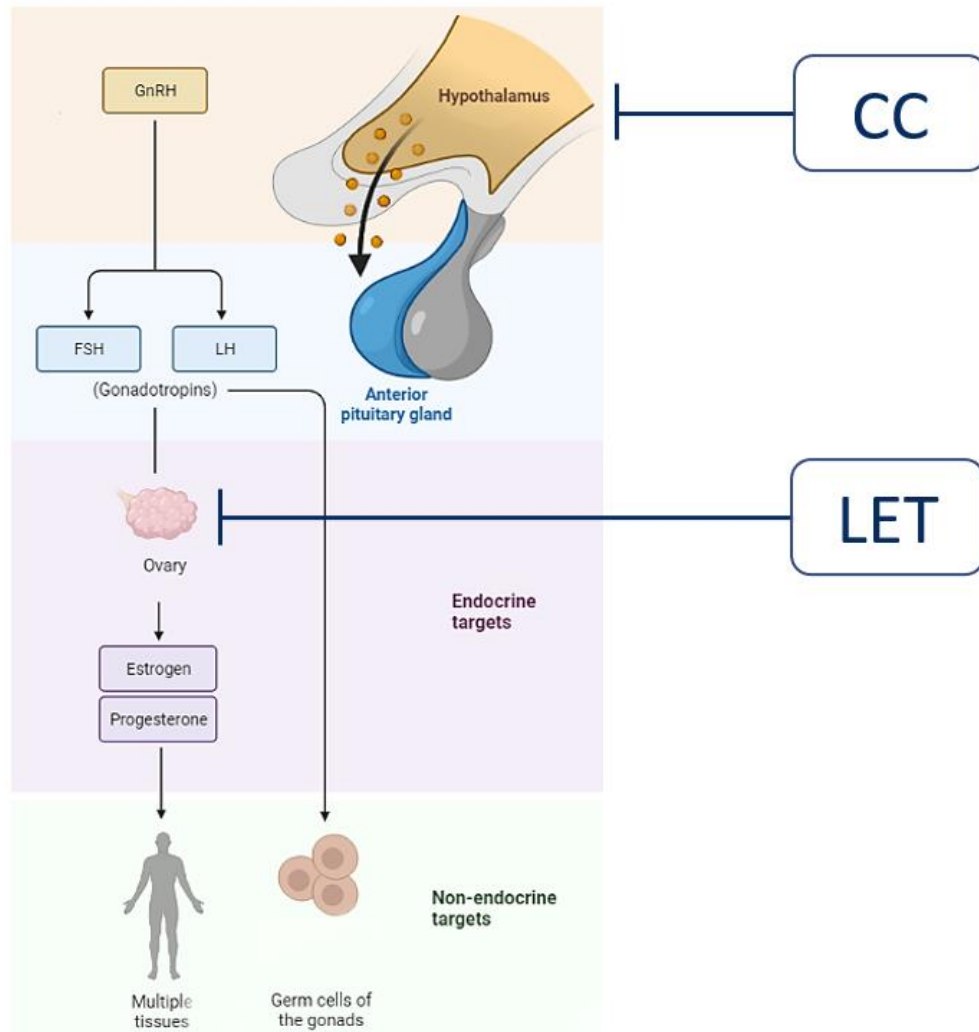


Figura 2 – Representação do eixo hipotálamo-hipófise-ovário e dos hormônios envolvidos em sua regulação, com indicação dos principais pontos de atuação do CC e do LET [Adaptado de www.biorender.com].

A correlação entre o tratamento com ambas as drogas para a EOC, e diversos tipos de câncer já foi estabelecida na literatura, majoritariamente por meio de estudos epidemiológicos. Para o CC, há estudos que investigam sua associação ao risco de desenvolvimento de câncer de mama, ovário, endométrio, útero, tireoide, colo de útero, entre outros (ALTHUIS *et al.*, 2005a; DOR *et al.*, 2002; POTASHNIK *et al.*, 1999; REIGSTAD *et al.*, 2017; YILMAZ *et al.*, 2018). Vários trabalhos também abordam o risco de desenvolvimento do melanoma em pacientes que passaram por EOC com CC, havendo tanto uma associação positiva, com indícios de risco aumentado para essa neoplasia (BRINTON *et al.*, 2015; CALDERON-MARGALIT *et al.*, 2009); quanto uma associação negativa, indicando que o risco para desenvolvimento do

melanoma não é afetado pelo uso dessa droga (ALTHUIS *et al.*, 2005b; HANNIBAL *et al.*, 2008; ROSSING *et al.*, 1995; YOUNG *et al.*, 2001).

Entretanto, o caráter observacional de todos esses trabalhos reflete, diretamente, no modo como seus resultados são interpretados. As associações até então levantadas na literatura entre o CC e o câncer, com destaque para o melanoma, devem ser avaliadas com cautela, permanecendo a incerteza acerca da natureza dessa relação.

O LET, por outro lado, é abordado na literatura como fármaco com potencial para o tratamento do câncer de mama (KIM; TURAN; OKTAY, 2016; MOURIDSEN, 2007; THÜRLIMANN *et al.*, 2005; VOHORA *et al.*, 2017), não havendo estudos que o associem ao tratamento ou desenvolvimento de outras neoplasias, incluindo o melanoma.

Assim, a maneira mais confiável para esclarecer a relação entre essas drogas e a carcinogênese do melanoma, é através da condução de estudos experimentais *in vitro*, que possibilitem investigar de maneira controlada e reprodutível, os efeitos dessas drogas nas células de melanoma, mais especificamente, em alguns pontos-chave considerados como os marcos do câncer.

2. ARTIGO

Os dados deste trabalho serão apresentados no formato de artigo científico, redigido de acordo com as normas do periódico internacional ao qual será submetido. O periódico de escolha, denominado *Oncology Letters*, possui classificação Qualis CAPES B3 na área de avaliação Medicina II para o quadriênio de 2013-2016; e fator de impacto de 2.311 para o período de referência de 2019-2020.

Title: Clomiphene Citrate and Letrozole effects on human melanoma cell line A375: does controlled ovarian stimulation drugs increase the risk for an aggressive cell behavior?

Authors: Thaís Salviana RIBEIRO¹, Pedro Gianonni BAETA¹, Felipe Henrique SILVA¹, Pedro Henrique Dias Moura PRAZERES¹, Isabella da Terra BORGES¹, Márcia Cristina Ferreira², Enio FERREIRA¹, Helen Lima DEL PUERTO¹

¹Department of General Pathology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte 31270-901, Minas Gerais, Brazil

²Department of Obstetrics and Gynecology, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

Running title: RIBEIRO *et al.*: FERTILITY DRUGS EFFECTS ON MELANOMA CELLS *IN VITRO*

Corresponding author:

Helen L. Del Puerto, PhD

Department of General Pathology, Institute of Biological Sciences

Federal University of Minas Gerais

Antônio Carlos Av, 6627, Pampulha

31270-901, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

Phone number: +55 31 3409-2599

e-mail: helendelpuerto@ufmg.com

Abstract

Clomiphene citrate (CC) and letrozole (LET) are used as fertility drugs to induce controlled ovarian stimulation (COS) during infertility treatment, or for preservation of fertility in cancer patients. CC has been associated with the incidence of many types of cancers in IVF patients throughout the years, including malignant melanoma. Meanwhile, LET's therapeutical role has been indicated for treatment of estrogen receptor-positive breast cancer, but there are no information on LET's effects in other cancer types. This study aimed to investigate the effect of CC and LET in the A375 melanoma cell line, evaluating cell viability and metabolism, cell cycle, cell migration profile and mRNA expression of genes involved in cancer aggressiveness. The cells were treated with CC (200 and 2000 ng/mL) and LET (400 and 4000 ng/mL) for 24 and 48 hours. Results indicated mild effects in cell viability and cell cycle induced by LET treatment; while CC at 2000 ng/mL decreases A375 cell viability in 80% after 48 hours of treatment, as well as impairs cell migration ability, and induces early cell cycle arrest at G1 phase, with a later change to sub-G1 phase. Significant differences were found in *BAX* and *SOD2* mRNA expression after CC and LET treatment. CC at 2000 ng/mL, induced a decrease in *BAX* expression after 24h and 48h of treatment (0.044 and 0.485 fold change, respectively), with late increase of *SOD2* expression (1.399 fold change after 48h). 48-hour LET treatment demonstrated concomitant *BAX* and *SOD2* up-regulation at 400 n/mL (1.836 and 2.321 fold change, respectively) and at 4000 ng/mL (5.193 and 8.587 fold change, respectively). Furthermore, LET down-regulated *NCAD* expression after 24h and 48h of incubation at 400 ng/mL (0.261 and 0.319 fold change, respectively) and 4000 ng/mL (0.272 and 0.462 fold change, respectively). Otherwise, *ECAD* expression had no significant changes induced by any of the treatments. These findings suggest that both CC and LET did not contribute to A375 melanoma cells' aggressive behavior, indicating the absence of a pro-tumoral effect associated to these drugs.

Keywords: malignant melanoma, IVF, fertility drugs, cell cycle, *NCAD*, *ECAD*, *BAX*, *SOD2*

Introduction

Melanoma is the most lethal type of skin cancer, despite its rarer occurrence in comparison to other skin malignancies (1). Data gathered by the Surveillance, Epidemiology and End Results Program from the National Cancer Institute show that 4% of all cancer deaths in the United States are from melanoma patients, representing six out of seven skin cancer-related deaths (2). Furthermore, melanoma incidence has been notably rising during the past 50 years (3), contributing for its ranking as the nineteenth most commonly occurring cancer in men and women worldwide, with nearly 300,000 new reported cases in 2018 (4).

As a multifactorial condition, cancer is a result of a delicate interaction between genetic and environmental factors, which at some point end up leading to changes in cell metabolism, proliferation, motility and apoptosis regulation, amongst others. These events are some of the key points to cancer initiation, promotion and progression (5). In this context, many drugs and treatment protocols are known to influence cancer occurrence, including melanoma's, to which fertility drugs used to induce controlled ovarian stimulation (COS), have already been associated (6-8).

Cancer patients, patients suffering from fertility issues or difficulties to conceive can undergo COS cycles for recovery of oocytes for cryopreservation, or as part of the IVF treatment (9-11). COS protocols consist in the use of drugs such as Clomiphene citrate (CC) and Letrozole (LET) to induce ovarian follicle maturation and oocyte recovery, through production and release of the luteinizing hormone (LH) and follicle-stimulating hormone (FSH) by CC (12,13); and FSH by LET (14).

Since these drugs lead to hormonal swings and potential endogenous hormonal imbalances, their long-term security is questionable, and CC connection to the development of endometrium, brain, breast, ovary, thyroid, colon, cervix and skin cancer has already been made in the literature (6, 7, 15-19). However, most of these associations were through cohort and epidemiological studies, run in different populations and under the influence of many biases, so data interpretation can be considered somehow subjective (8).

Due to that, the gap for experimental studies on this subject remain open for many of these cancer types. Regarding melanoma incidence and CC treatment, there are epidemiological evidences pointing towards a positive association between them (20, 21) as well as a negative association (22-26). To this point, no evidence was found on melanoma incidence and LET treatment, but a protective effect for this drug on breast cancer therapy has been described (27).

In this context, the present study aimed to examine the effects of CC and LET in the human melanoma cell line A375 (ATCC® CRL-1619). The investigation was focused on aspects that pointed out to changes in: cell metabolism and viability; cell cycle; migration ability; and gene expression for targets involved in epithelial-mesenchymal transition (EMT), apoptosis and mitochondrial oxidative stress. The study design was to determine how these drugs affect cancer cells *in vitro*, and to establish a more solid association between melanoma progression and these COS agents; that could help to support the development of safer COS protocols.

Material and methods

Cell culture

The human melanoma cell line, A375 (ATCC® CRL-1619; immortalized from a 54 year-old female patient's primary melanoma), was cultivated and expanded in 100 mm² sterile cell culture dishes (Sarstedt Ag & Co, Nümbrecht, Germany) using Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with 10% of fetal bovine serum (FBS) and 1% of penicillin-streptomycin (all previously described reagents from Sigma Aldrich Co., St. Louis, U.S.A). Cells were incubated at 37°C in a humid atmosphere with 5% CO₂, until reaching a monolayer confluence of 70-80%. They were then detached by trypsinization (Sigma Aldrich Co., St. Louis, U.S.A) or by mechanical scraping (for gene expression evaluation, only), collected in sterile conical tubes (Sarstedt Ag & Co, Nümbrecht, Germany), centrifuged and counted under inverted microscope using a Neubauer chamber. Cells were finally plated at optimal densities for each subsequent assay, using DMEM 5% FBS and 0.5% penicillin-streptomycin, which was also used for the drugs' serial dilutions.

MTT assay for assessment of cell viability

A375 cells were seeded in 96-well cell culture plates (Sarstedt Ag & Co, Nümbrecht, Germany) at a density of 7500 cells per well and incubated for 24 hours to allow proper adhesion and monolayer formation. They were then treated with four different concentrations of either CC (2, 20, 200 and 2000 ng/mL) or LET (4, 40, 400 and 4000 ng/mL) (Sigma Aldrich Co., St. Louis, U.S.A), diluted in DMEM prior to the assay, and then incubated for 24 or 48

hours. Drug concentrations were selected from previous studies from the group, in human granulosa cells (data not published).

Cell viability was estimated by measuring the rate of mitochondrial reduction of MTT yellow tetrazolium salt (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) to insoluble purple formazan crystals (28). After incubation with CC and LET for 24 or 48 hours, culture media was removed, 100 μ L of MTT solution (5 mg/mL) was added to each well, and the cells were incubated for four hours. Afterward, the supernatant was removed and 100 μ L of dimethylsulfoxide (DMSO) (Sigma Aldrich Co., St. Louis, U.S.A) were added to each well, for solubilizing the formazan crystals. The optical densities (OD) were measured with a spectrophotometer at 570 nm (VersaMax Microplate Reader – Molecular Devices, San Jose, U.S.A). All samples (groups) were run in triplicate, in at least three different experiments.

Analysis of cell cycle by propidium iodide (PI) DNA staining flow cytometry

Cell cycle status and quantification of DNA fragmentation (hypodiploid DNA-content) were performed by propidium iodide (PI) staining according to Nicoletti *et al.*, 1991 (29). A375 cells were seeded in 12-well culture plates (Sarstedt Ag & Co, Nümbrecht, Germany) at a density of 70000 cells per well, treated with CC (CC1: 200 ng/mL; CC2: 2000 ng/mL) or LET (LET1: 400 ng/mL; LET2: 4000 ng/mL) and incubated in a 5% CO₂ humidified atmosphere at 37 °C for 24 h and 48 hours. As control, it was used A375 cells incubated with DMEM only. Afterward, supernatant was collected and cells were centrifuged and resuspended in a hypotonic fluorochrome solution — HFS (50 μ g/mL PI in 0.1% sodium citrate plus 0.1% Triton X-100). Adhered cells were collected in a pool for each treatment condition, by trypsinization (Sigma Aldrich Co., St. Louis, U.S.A), and then centrifuged, washed with sterile phosphate-buffered saline (PBS) solution, and resuspended with 300 μ L of HFS. Cells were incubated at 4 °C for one hour in the dark. The PI fluorescence of 10000 individual nuclei was measured using a FACScan flow cytometer (BD Biosciences, USA), through FACSDiva software (BD Biosciences, USA). Data were analyzed using FlowJo software 7.5.5 (TreeStar Inc, CA). All samples (groups) were run in triplicates in at least three different experiments.

Wound healing assay (Scratch assay) for evaluation of cell migration

The cells were seeded in a 24-well culture plate (Sarstedt Ag & Co, Nümbrecht, Germany) at a density of 170000 cells per well, in order to reach a 90% confluence after 24-hour incubation. Following that, the monolayers were scratched once, using sterile 200 µl micropipette tips, creating a cell-free gap at the bottom of each well (wound area) (30). Cell media was aspirated, and the wells were washed with sterile PBS solution until all detached cells were removed. They were then treated with CC (CC1: 200 ng/mL; CC2: 2000 ng/mL) or LET (LET1: 400 ng/mL; LET2: 4000 ng/mL) solutions, diluted in DMEM (5% FBS) prior to the assay. Control cells received only DMEM. Following the treatment, the wounds were photographed at four different times (0, 2, 24 and 48 hours), under inverted microscope (Wilovert Standard HF 20 – Hund Wetzlar, Wetzlar, Germany), using a 4X objective and a 16 Megapixel smartphone camera (ASUS Zenfone 3 Max). Finally, the width of the gaps was measured in each image at two different spots by ImageJ software (National Institute of Health, U.S.A), for calculation of the mean percentage of wound opening.

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

A375 cells were seeded in 12-well culture plates (Sarstedt Ag & Co, Nümbrecht, Germany) at a density of 70.000 cells per well, and incubated for 24 hours prior treatment. They were then treated with CC (CC1: 200 ng/mL; CC2: 2000 ng/mL) or LET (LET1: 400 ng/mL; LET2: 4000 ng/mL) compounds diluted in DMEM prior to the test, and incubated for further 24 and 48 hours. Control cells received only DMEM.

After treatment, supernatants were transferred to microtubes and centrifuged in order to recover any floating cells. The adhered cells were incubated for three minutes with 500 µl of Trizol (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, USA) and the wells' content was transferred to microtubes for subsequent RNA extraction, which was carried out according manufacturer's guidelines, followed by RNA quantification (NanoDrop Lite - Thermo Fisher Scientific, Wilmington, USA).

For complementary DNA (cDNA) acquisition it was used 1000 ng of RNA, the M-MLV Reverse Transcriptase kit (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, USA) and the reverse primers (Table 1) for the target human genes *S26* (housekeeping gene), *NCAD*, *ECAD*, *BAX* and *SOD2*. qPCR was carried out from 50 ng cDNA samples, in QuantStudio 3 Real-time PCR

System (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, USA) using the Power Sybr®Green Master Mix Kit (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, USA).

qPCR amplification was based on the following experimental design: Stage 1: 50°C for 2 min; Stage 2: 95°C for 10 min; Stage 3: 40 cycles at 95°C for 15s and 58°C for 30s; Stage 4 (melt curve): 95°C for 15 s and 60°C for 1 min. The experiment was carried once, in triplicates for each condition. The primers used for both reverse transcription (RT) and qPCR reactions are described in Table 1.

Table 1. Primers sequences for RT and qPCR

Primers	Foward primer (5'-3')	Reverse Primer (5'-3')	Amplicon size	GenBank access n°
<i>S26</i>	TGTGCTTCCCAAGCTGTATGTGAAG	CGATTCCTGACTACTTTGCTGTGAA	75 bp	NM_001029.3
<i>NCAD</i>	GGACCGAGAATCACCAAATG	CGTTCCTGTTCCACTCATAG	94 bp	NM_001308176.1
<i>ECAD</i>	CCCTTACAGCAGAACTAAC	CACCTCTAAGGCCATCTTTG	108 bp	NM_001317185.1
<i>BAX</i>	TCTACTTTGCCAGCAAACCTGGTGC	TGTCCAGCCCATGATGGTTCTGAT	80 bp	NM_138765.3
<i>SOD2</i>	CCTACGTGAACAACCTGAAC	GAAGAGCTATCTGGGCTGTA	84 bp	NM_000636.4

qPCR data analysis

Gene expression was accessed by comparative CT method (CT mean for the target gene – CT mean for the endogenous control), as the endogenous control (housekeeping gene *S26*) was used to normalize gene expression and generate the Δ CT. The $\Delta\Delta$ CT (Δ CT sample - Δ CT of the calibrator) was calculated and the $2^{-\Delta\Delta$ CT} formula was applied to obtain relative expression levels of each target gene (31).

Statistical analysis

All statistical data was obtained using GraphPad Prism software, version 5.0 (GraphPad software, La Jolla, USA). The results were analyzed by One-Way ANOVA and Student's T-test. Differences were considered significant for a p-value inferior to 0.05 ($p < 0.05$).

Results

A375 cell viability evaluation after treatment with CC and LET

Both CC and LET caused no cytotoxicity or significant effects on cell viability and MTT metabolism, for the incubation period of 24 hours (Fig. 1). However, 48 hours after CC treatment, it was noticed a significant increase ($p < 0.01$) and decrease ($p < 0.0001$) in cell viability for the A375 cells treated with 200 ng/mL, and 2000 ng/mL of CC, respectively; compared to control cells (Fig. 1). Cells treated with LET seemed to maintain a stable MTT metabolism and viability from 24 to 48 hours of incubation with this drug, for all four concentrations.

Effects of the CC and LET treatments on the A375 cell cycle

For cell cycle assessment (Fig. 2) as well as for the remaining tests, the two highest concentrations of each drug were chosen according to MTT results. After 24 hours of incubation, all treatments induced a significant increase ($p < 0.0001$) of the percentage of cells on the G1 cell cycle phase, in comparison to control cells (Fig. 2A). At the same time, the percentage of cells in S and G2 phases decreased (Fig. 2A). After 48 hours of treatment, the cells incubated with LET continued to pause at the G1 phase, contributing for a significant increase of the percentage of cells in this phase (Fig. 2B). This rise was for both LET1 (400 ng/mL) and LET2 (4000 ng/mL) treatments, but it was superior for LET2 ($p < 0.001$) than it was for LET1 ($p < 0.05$) treated cells, compared to control. Also, for LET2, there was a significant reduction of cell percentage in both S ($p = 0.0039$) and G2 ($p < 0.0001$) phases. As for CC treated cells, for both concentrations there was a significant decrease in the percentage of G1 cells, and an increase of cells in sub-G1 phase. These effects were greater after treatment with CC2 ($p < 0.001$) than it was for CC1 ($p < 0.05$), in comparison to control cells (Fig. 2B).

Evaluation of A375 cell line migratory potential after CC and LET treatment

A375 cells' wound healing efficiency after CC and LET treatment was demonstrated in Fig. 3. For CC1, LET1 and LET2 treated cells, the wound opening reduced from 0 to 24h at a higher pace than for control cells. However, for CC1 and LET2 the gap remained wider after 48 hours of treatment, compared to control. As for CC2, the wound opening began to decrease

following 24 hours of treatment, but after 48 hours it became wider than it was right after the monolayer scratch.

Modulation of gene expression by CC and LET on the A375 cell line

As demonstrated in Fig. 4, following the CC and LET treatment, mRNA expression was assessed in A375 cell line for genes involved in epithelial-mesenchymal transition (EMT) such as *ECAD* and *NCAD*, as well as in apoptosis (*BAX*) and mitochondrial oxidative stress (*SOD2*). The gene expression was not significantly altered for *ECAD* by any of the treatment conditions (Fig. 4A and E), alongside with *NCAD* expression after CC treatment, that remained similar to control results (Fig. 4B). On the other hand, after treatment with LET there was a significant decrease in *NCAD* mRNA expression ($p < 0.05$), noticeable for both 24 and 48 hours of incubation with the drug (Fig. 4F).

BAX expression was reduced ($p < 0.05$) 24 hours after treatment with both CC concentrations (Fig. 4C) and LET1 (Fig. 4G). This decrease persisted after 48h of treatment with CC ($p < 0.05$), but a great increase in *BAX* mRNA expression was found in cells treated with LET2 for 48 hours ($p < 0.001$).

Lastly, *SOD2* expression decreased in the first 24 hours following CC2 treatment, but increased as an effect of a longer exposure to the drug (Fig. 4D) ($p < 0.01$). For LET treatment, a rising expression of *SOD2* occurred from 24 to 48 hours following incubation with the drug in its highest concentration (Fig. 4H) ($p < 0.001$).

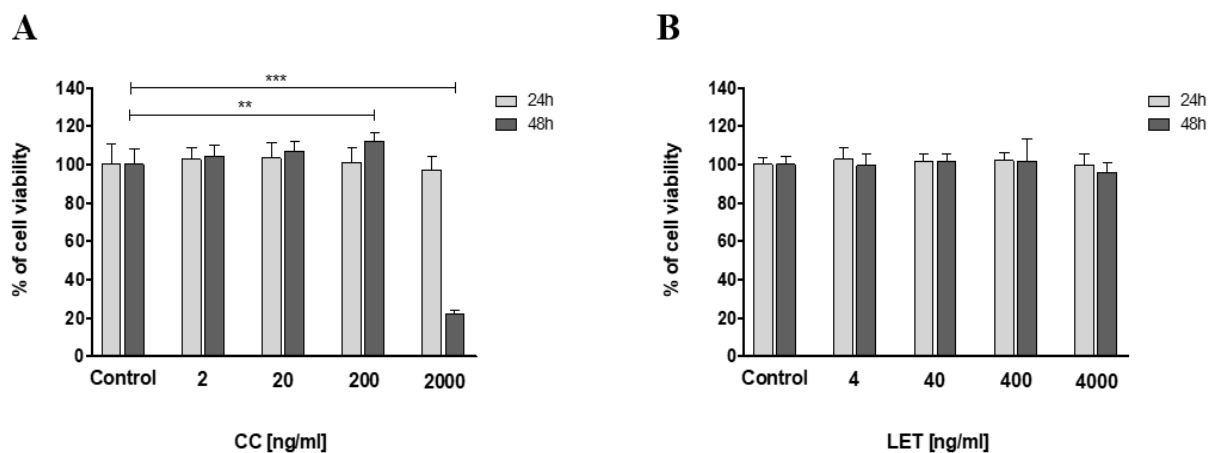


Figure 1. A375 melanoma cells viability following 24 and 48-hour treatments with four concentrations of CC (A) and LET (B) solutions, assessed by MTT assay. Control cells received

only culture media. LET treatment caused slight but not significant variations in cell viability, for both incubation times. As for CC treatment, differences were found after 48 hours of incubation with two of the highest drug concentrations, as demonstrated in (A) (** $p < 0.01$; *** $p < 0.0001$). Values represent means of three experiments (each run in triplicates), with bars representing standard deviation. Statistical significance was calculated by Student's T-test.

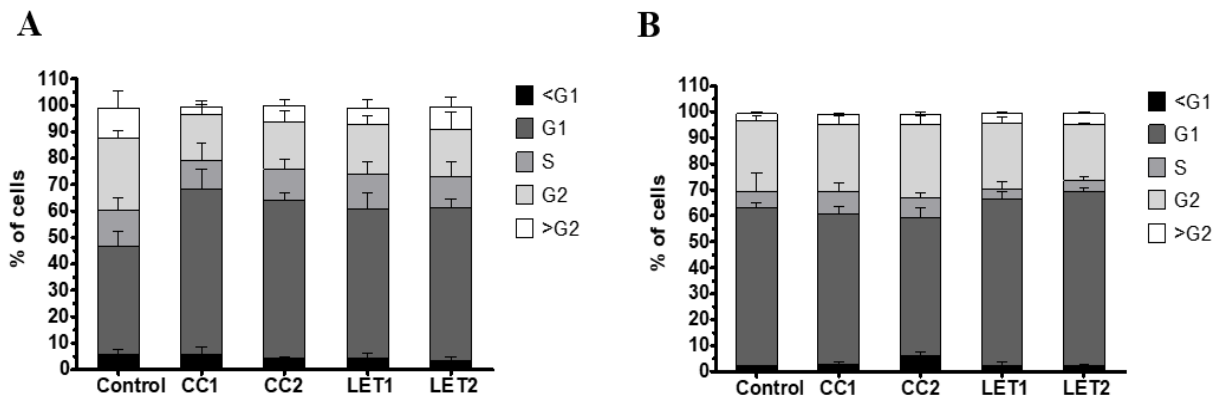


Figure 2. Effects of CC and LET treatment on A375 cell cycle following 24 hours (A) and 48 hours (B) of incubation (CC1: 200 ng/mL; CC2: 2000 ng/mL; LET1: 400 ng/mL; LET2: 4000 ng/mL), assessed by PI-flow cytometry. Control cells received only culture media. Values represent means of three experiments (each run in triplicates), with bars representing standard deviation.

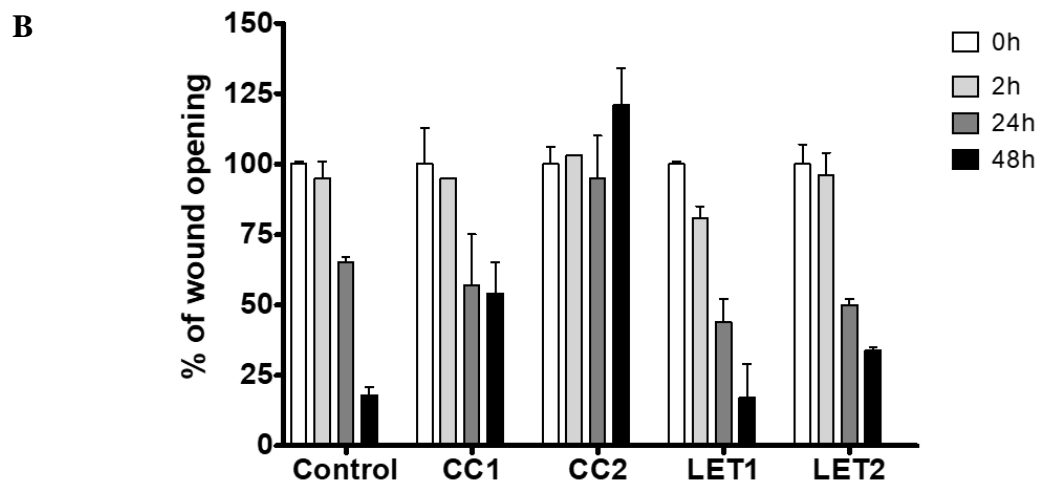
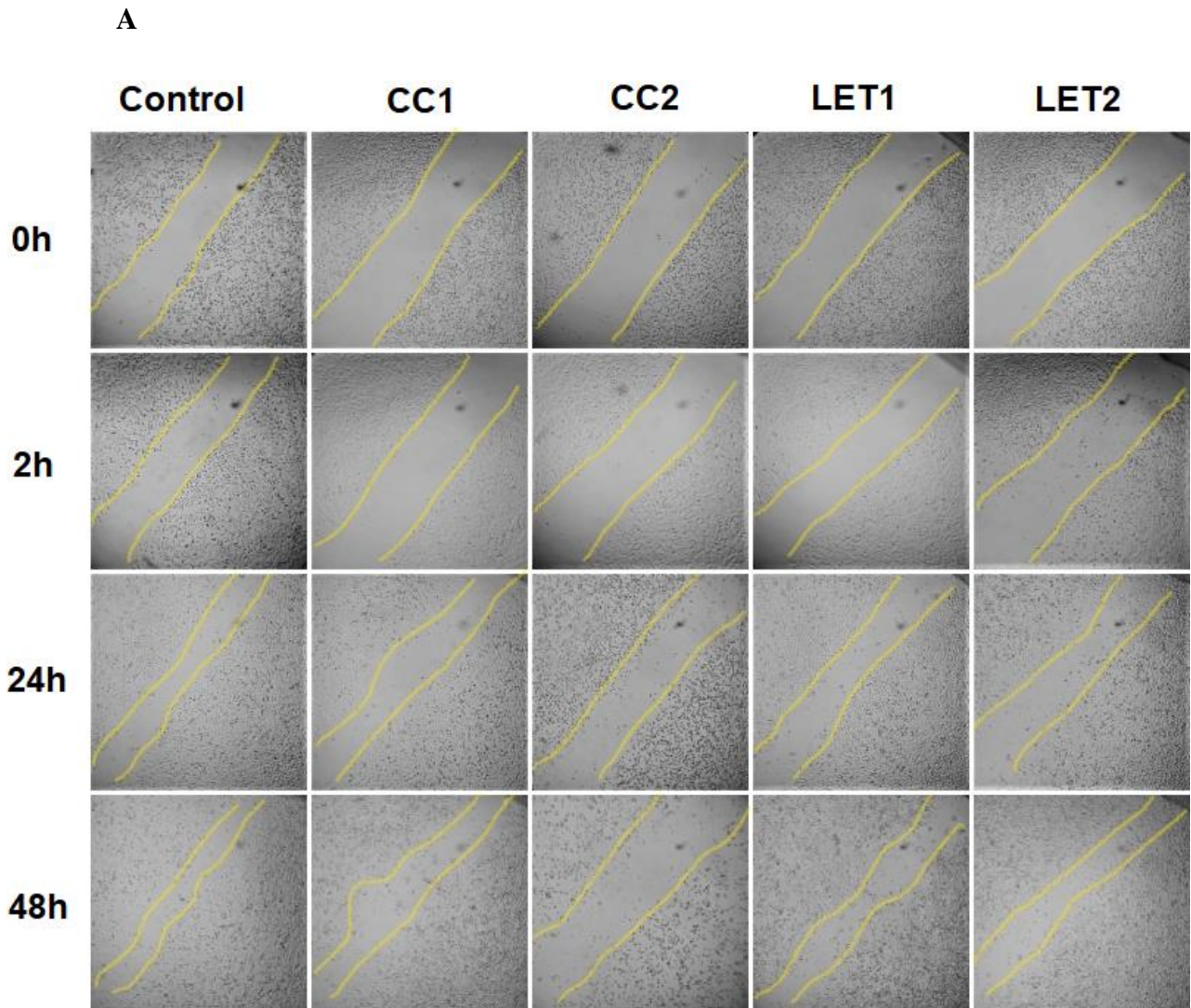


Figure 3. Wound healing assay for evaluation of CC e LET effects on A375 cells migratory potential over time (CC1: 200 ng/mL; CC2: 2000 ng/mL; LET1: 400 ng/mL; LET2: 4000

ng/mL). Control cells received only culture media. The wound gap closure was assessed under inverted microscope over time, and photographed at 4X magnification. The yellow lines highlight the edges of the gap (A). Values represent gap's width mean percentage (wound opening), with bars representing standard deviation (B). The experiment was carried out once (statistical analysis was not possible).

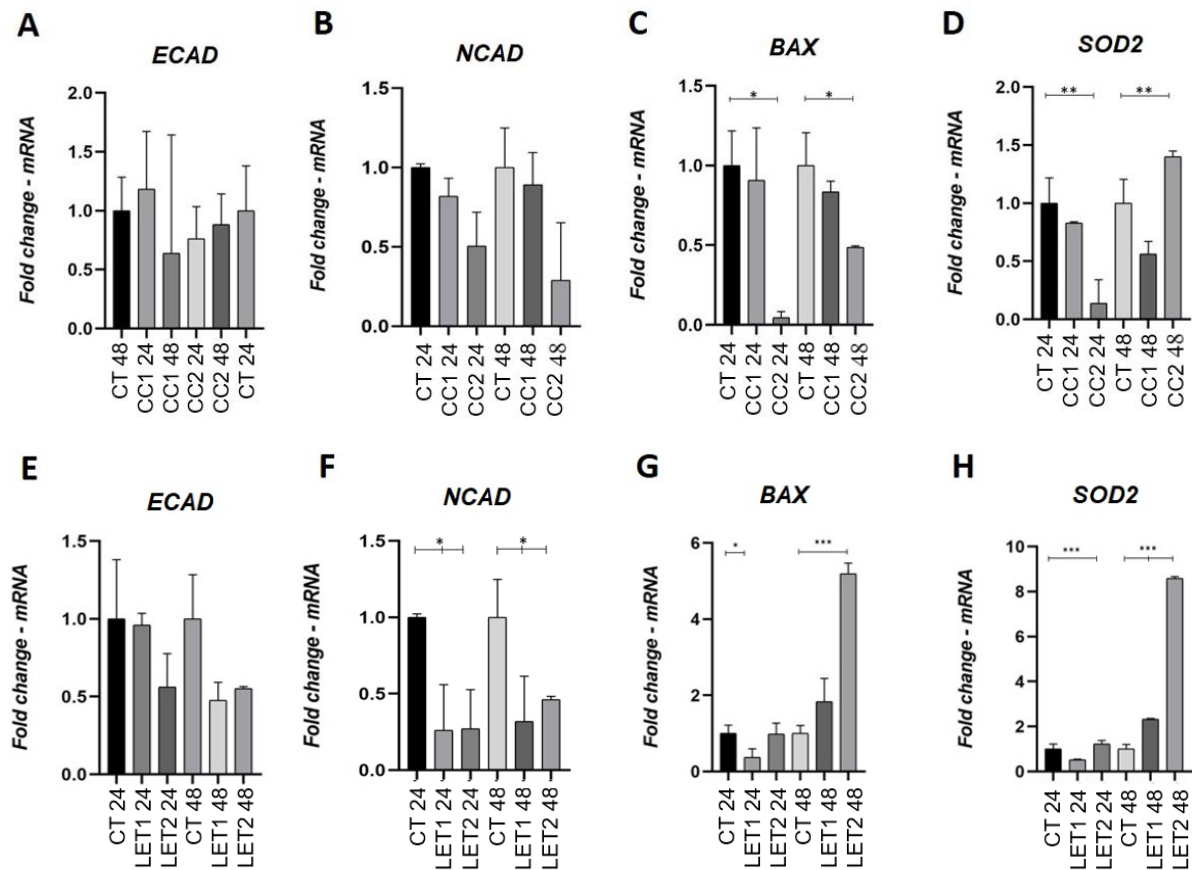


Figure 4. Expression of mRNA for the target genes *ECAD*, *NCAD*, *BAX* and *SOD2* in A375 cells following 24 and 48-hour treatment with CC (A to D) and LET (E to H) (CC1: 200 ng/mL; CC2: 2000 ng/mL; LET1: 400 ng/mL; LET2: 4000 ng/mL). Control cells (CT) received only culture media. Values represent means of one experiment run in triplicates, with bars representing standard deviation. Statistical significance was calculated by One-way ANOVA test. (*p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001)

Discussion

Several studies have evaluated the relationship between fertility drugs and cancer, including malignant melanoma (32-40). Nevertheless, the role of fertility drugs to induce COS, in the pathogenesis of malignant melanoma in women, remains controversial. Moreover, epidemiological studies are typically utilized with methodological limitations, and women who undergo COS are part of a heterogeneous group with different causes of infertility, and characteristics known to be independently associated with increased cancer risk, such as age, family history, sun exposure habits, amongst others (41).

At this time, considering melanoma's high lethality and rising incidence (1, 3), this study is a pioneering work focusing on the *in vitro* effects of fertility drugs in human melanoma cell line A375. After 24 and 48 hours of A375 cells treatment with CC and LET, it was investigated the resulting impacts on: cell viability and metabolism; cell cycle profile; cell migration; and mRNA expression of EMT markers, as well as targets of apoptosis related to oxidative stress.

According to cell viability results, a lower concentration of CC (200 ng/mL) increased A375 cells' MTT metabolism, observed only with 48 hours. Conversely, a higher concentration of CC (2000 ng/mL) decreased 80% of A375 cells' viability 48 hours after treatment (Fig. 1A). No changes in cells viability and MTT metabolism were observed at 24 hours. Such data evidence that the effects triggered by CC compound in A375 cell viability and MTT metabolism varies according to time of exposure and drug concentration. Since MTT reduction directly depends on mitochondrial dehydrogenases activity (28), it is possible to infer that CC induces dehydrogenase activity at a lower concentration, and contributes to this enzyme's depletion and to cytotoxicity at higher concentrations. Whereas LET treatment had no significant impacts on A375 cells viability and metabolism in any of its tested concentrations, this suggests a superior cell tolerance to this drug in comparison to CC.

Cell cycle changes are one of the mechanisms through which melanoma cells self-control their proliferation rate, and it is intimately related to cancer progression. The cell cycle is composed of two main steps: interphase and mitosis (M). Interphase is the longest of them both, and it primarily divides into G1, S, and G2 phases, which are responsible for cell growth, DNA replication, and protein/cell membrane synthesis, respectively. Through interphase, cells duplicate their content and become prepared for division during mitosis (42-44).

Cell cycle control must be very accurate to guarantee correct proliferation, and this occurs at checkpoints placed between the G1/S, G2/M, and M phases. Deregulation of the cell

cycle's refined control compromises proliferation restraint. The failure of proper cell content checking can contribute to the origin of mutated and potentially malignant cells (5, 42).

In this work, CC and LET effects on cell cycle led, primarily, to a cycle stop at the G1 phase, probably at the first checkpoint previously described. This was observed after early incubation (24 hours) with CC1 and CC2 (Fig. 2A) and from 24 to 48 hours of LET incubation (Fig. 2A and B), indicating that cells paused their proliferation at an early interphase stage for dealing with the impacts of these treatments. Following 48 hours of CC treatment, the cells moved from G1 to sub-G1 phase, suggesting that the effect on cell proliferation by this drug increased over time, compromising the effectiveness of cell repair mechanisms. DNA staining at sub-G1 phase can indicate the fragmentation of this molecule, which is known to be correlated to cell death after ionizing radiation therapy (45). This shows that CC treatment can be cytotoxic for A375 cells after longer drug exposures (up to 48 hours), corroborating with the MTT findings of reduced cell viability 48 hours after CC2 treatment. Additionally, the increase in cell MTT metabolism after CC1 treatment might have been an indicator of higher metabolic activity due to cell cycle repair.

The impacts on cell migration demonstrated in this study seemed to be somehow harmful to all test concentrations after a more prolonged drug exposure, except for LET1, which induced cell migration and consistently contributed to wound healing over time (Fig. 3). On the other hand, 24-hour treatments with CC1 and LET2 have induced cell migration, noticed as more efficient wound closure than control; but this was reversed after 48 hours of exposure since the wound gaps started to shorten at a slower pace. As for CC2 treated cells, their migration ability was compromised from the start leading to inefficient gap closure and wound widening after 48 hours of incubation with the drug (Fig. 3).

By correlating these to cell cycle and viability findings, it can be suggested that LET treatment led to a steadier cell metabolism and migration profile since its impacts on the cell cycle were lighter and kept cells paused at the G1 phase. For CC, the effects on cell cycle, viability, and migration started to get worse after longer exposures to this compound, and drug concentration was also a key feature to the extent of the observed impacts.

Gene expression results helped to comprehend further some of the impacts of these drugs on essential aspects of cancer cell aggressiveness: EMT, apoptosis, and mitochondrial oxidative stress. EMT is a process that marks the transformation from cancer cells' epithelial phenotype to a mesenchymal one, allowing their detachment from each other and the extracellular matrix (ECM) and their free motion throughout the tissue and its surroundings (46). Changes in cell phenotype can be indicated by altered gene expression of specific adhesion

molecules such as cadherins. Up-regulation of *ECAD* results in a better cell-ECM adhesion, and thus, a less aggressive behavior; and higher *NCAD* expression gives to the cells a mesenchymal phenotype known for its greater motility and ability to navigate easily throughout the tissue, leading to a higher risk of metastasis (47).

For the incubation time investigated in this study, it was possible to detect a decrease in *NCAD* expression after LET treatment for both drug concentrations (Fig. 4F). Considering the known metastatic potential for the A375 cell line, this could indicate a protective effect of LET in A375 human melanoma cell line, by reducing the cell's potential of moving throughout the stroma and causing new metastasis.

Apoptosis evasion is one of the hallmarks of cancer (5), and extracellular or intracellular stimuli can induce this type of cell death. Mitochondrial stress and loss of homeostasis are responsible for a mitochondrial pathway that can lead to apoptosis by an intricate interaction between oxidative stress and the BCL-2 protein family (48). In this work, we investigated the expression of *BAX*, which encodes a pro-apoptotic protein from the BCL-2 family (48) as well as *SOD2*, which plays an essential role against oxidative stress by encoding the mitochondrial enzyme superoxide dismutase (MnSOD) (49) that inactivates reactive oxygen species (ROS) (50).

We found out that CC treatment reduced *SOD2* expression in the majority of investigated scenarios, except for the condition that proved to be the most cytotoxic one: CC2 incubation for 48 hours (Fig. 4D), resulting in *SOD2* up-regulation. Regarding *BAX* expression after CC treatment, it was significantly reduced by CC2 from 24 to 48 hours of incubation. The decrease in *SOD2* expression impairs cell protection against oxidative stress, suggesting that CC treated cells could have become more susceptible to it. On the other hand, an interesting result was observed for CC2 treated cells, which had a *SOD2* up-regulation (Fig. 4D) concomitantly with *BAX* down-regulation (Fig. 4C). This indicates an attempt of cell resistance to the mitochondrial oxidative stress caused by the treatment that could have worked by preventing cells from proceed to apoptosis through the intrinsic pathway in which *BAX* participates.

Following LET treatment, *SOD2* expression mostly increased (Fig. 4H), indicating that this treatment might have caused mitochondrial oxidative stress in the cells. Its effects could have protected them through MnSOD activity. This must-have especially occurred 48 hours after LET1 and LET2 incubation since they led to *BAX* up-regulation. Considering that there were no indicative results of significant cell cytotoxicity by this treatment in the previous assays

(MTT, mainly), it is possible to infer that the A375 cells treated with LET resisted this drug's effects by successfully managing the cellular stress caused by it.

Lastly, shreds of evidence demonstrate that MnSOD overexpression suppresses tumorigenicity of human melanoma cells (51), which combined with the overall results of the present study, can support the suggestion that both CC and LET treatments, in the conditions carried out in this work, did not increase the malignant potential of A375 human melanoma cell line *in vitro*; contributing, in fact, for decreasing some of their malignant features. This is a positive outcome for IVF patients. Still, it is essential to highlight that further studies must have been conducted including other melanoma cell lines and new targets of cancer cell aggressiveness, as well as distinct tests for evaluation of cell migration and reactive oxygen species production, for instance.

As future perspectives for this work, we plan on: investigate gene expression of the *CASP3* and *CASP9* apoptotic genes, along with EMT involved gene *ZEB1*, for deepening the comprehension of these processes after CC and LET treatment; performing the wound healing assay in the presence of an anti-mitotic compound; and evaluating invasive cell potential by transwell migration assay.

In conclusion, the results of the present study demonstrated a positive *in vitro* effect of both CC e LET against aspects involved in melanoma cell aggressiveness. Since these drugs are commonly used for COS, these findings enhance our current understanding on the IVF-melanoma association and can be used to support a safer decision making regarding treatment protocols for IVF patients.

Funding

This study was supported by research funds from the Brazilian agencies CNPQ, CAPES and FAPEMIG.

Competing interests

The authors disclaim no competing interests.

References

1. Riker AI, Zea N and Trinh T: The epidemiology, prevention, and detection of melanoma. *Ochsner J* 10: 56-65, 2010.
2. Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER): Program Cancer Statistics Review, 1975–2013, National Cancer Institute [Internet] Nov, 2015. SEER data submission [cited posted to the SEER website, 2016 Apr]. Available from: http://seer.cancer.gov/csr/1975_2013/
3. Guy GP Jr, Thomas CC, Thompson T, Watson M, Massetti GM and Richardson LC: Vital signs: Melanoma incidence and mortality trends and projections – United States, 1982–2030. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 64: 591-596, 2015.
4. World Cancer Research Fund, American Institute for Cancer Research: Continuous Update Project. Skin cancer statistics [Internet]. Available from: <https://www.wcrf.org/dietandcancer/cancer-trends/skin-cancer-statistics>
5. Hanahan, D and Weinberg, RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 100: 57-70, 2000.
6. Kristiansson P, Björ O and Wramsby H: Tumour incidence in Swedish women who gave birth following IVF treatment. *Hum Reprod* 22: 421-426, 2007.
7. Kessous R, Davidson E, Meirovitz M, Sergienko R and Sheiner E: The risk of female malignancies after fertility treatments: A cohort study with 25-year follow-up. *J Cancer Res Clin Oncol* 142: 287-293, 2016.
8. Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine: Fertility drugs and cancer: A guideline. *Fertil Steril* 106: 1617-1626, 2016.
9. Mantikou E, Youssef MA, van Wely M, van der Veen F, Al-Inany HG, Repping S and Mastenbroek S: Embryo culture media and IVF/ICSI success rates: A systematic review. *Hum Reprod Update* 19: 210-220, 2013.
10. Alper MM and Fauser BC: Ovarian stimulation protocols for IVF: Is more better than less? *Reprod Biomed Online* 34: 345-353, 2017.
11. O'Neill CL, Chow S, Rosenwaks Z and Palermo GD: Development of ICSI. *Reproduction* 156: F51-F58, 2018.

12. Rebar R, Judd HL, Yen SS, Rakoff J, Vandenberg G and Naftolin F: Characterization of the inappropriate gonadotropin secretion in polycystic ovary syndrome. *J Clin Invest* 57: 1320-1329, 1976.
13. Mikkelsen TJ, Kroboth PD, Cameron WJ, Dittert LW, Chungi V and Manberg PJ: Single-dose pharmacokinetics of clomiphene citrate in normal volunteers. *Fertil Steril* 46: 392-396, 1986.
14. Badawy A, Abdel Aal I and Abulatta M: Clomiphene citrate or letrozole for ovulation induction in women with polycystic ovarian syndrome: A prospective randomized trial. *Fertil Steril* 92: 849-852, 2009.
15. Potashnik G, Lerner-Geva L, Genkin L, Chetrit A, Lunenfeld E and Porath A: Fertility drugs and the risk of breast and ovarian cancers: Results of a long-term follow-up study. *Fertil Steril* 71: 853-859, 1999.
16. Dor J, Lerner-Geva L, Rabinovici J, Chetrit A, Levran D, Lunenfeld B, Mashiach S and Modan B: Cancer incidence in a cohort of infertile women who underwent in vitro fertilization. *Fertil Steril* 77: 324-327, 2002.
17. Yli-Kuha AN, Gissler M, Klemetti R, Luoto R and Hemminki E: Cancer morbidity in a cohort of 9175 Finnish women treated for infertility. *Hum Reprod* 27: 1149-1155, 2012.
18. Siristatidis C, Sergentanis TN, Kanavidis P, Trivella M, Sotiraki M, Mavromatis I, Psaltopoulou T, Skalkidou A and Petridou ET: Controlled ovarian hyperstimulation for IVF: Impact on ovarian, endometrial and cervical cancer--a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update* 19: 105-123, 2013.
19. Reigstad MM, Larsen IK, Myklebust TA, Robsahm TE, Oldereid NB, Omland AK, Vangen S, Brinton LA and Storeng R: Risk of breast cancer following fertility treatment--a registry based cohort study of parous women in Norway. *Int J Cancer* 136: 1140-1148, 2015.
20. Calderon-Margalit R, Friedlander Y, Yanetz R, Kleinhaus K, Perrin MC, Manor O, Harlap S and Paltiel O: Cancer risk after exposure to treatments for ovulation induction. *Am J Epidemiol* 169: 365-375, 2009.
21. Brinton LA, Moghissi KS, Scoccia B, Lamb EJ, Trabert B, Niwa S, Ruggieri D and Westhoff CL: Effects of fertility drugs on cancers other than breast and gynecologic malignancies. *Fertil Steril* 104: 980-988, 2015.

22. Rossing MA, Daling JR, Weiss NS, Moore DE and Self SG: Risk of cutaneous melanoma in a cohort of infertile women. *Melanoma Res* 5: 123-127, 1995.
23. Young P, Purdie D, Jackman L, Molloy D and Green A: A study of infertility treatment and melanoma. *Melanoma Res* 11: 535-541, 2001.
24. Althuis MD, Scoccia B, Lamb EJ, Moghissi KS, Westhoff CL, Mabie JE and Brinton LA: Melanoma, thyroid, cervical, and colon cancer risk after use of fertility drugs. *Am J Obstet Gynecol* 193: 668-674, 2005.
25. Hannibal CG, Jensen A, Sharif H and Kjaer SK: Malignant melanoma risk after exposure to fertility drugs: Results from a large Danish cohort study. *Cancer Causes Control CCC*. 19: 759-765, 2008.
26. Tomao F, Papa A, Lo Russo G, Zuber S, Spinelli GP, Rossi L, Caruso D, Prinzi N, Stati V, Panici PB, *et al*: Correlation between fertility drugs use and malignant melanoma incidence: The state of the art. *Tumour Biol* 35: 8415-8424, 2014.
27. Vohora D, Kalam A, Leekha A, Talegaonkar S and Verma AK: Combined Raloxifene and Letrozole for Breast Cancer Patients. *Arch Med Res* 48: 561-565, 2017.
28. Mosmann T: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65: 55-63, 1983.
29. Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci MC, Grignani F and Riccardi C: A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J Immunol Methods* 139: 271-279, 1991.
30. Liang CC, Park A and Guan JL: In vitro scratch assay: A convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nat Protoc* 2: 329-333, 2007.
31. Livak KJ and Schmittgen TD: Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)). *Methods* 25: 402-408, 2001.
32. Luke B, Brown MB, Spector LG, Missmer SA, Leach RE, Williams M, *et al*: Cancer in women after assisted reproductive technology. *Fertil Steril* 104: 1218-1226, 2015.
33. Ron E, Lunenfeld B, Menczer J, Blumstein T, Katz L, Oelsner G and Serr D: Cancer incidence in a cohort of infertile women. *Am J Epidemiol* 125: 780-790, 1987.

34. Althuis MD, Scoccia B, Lamb EJ, Moghissi KS, Westhoff CL, Mabie JE, Brinton LA: Melanoma, thyroid, cervical, and colon cancer risk after use of fertility drugs. *Am J Obstet Gynecol* 193: 668-674, 2005.
35. Brinton LA, Moghissi KS, Scoccia B, Lamb EJ, Trabert B, Niwa S, Ruggieri D and Westhoff CL: Effects of fertility drugs on cancers other than breast and gynecologic malignancies. *Fertil Steril* 104: 980-988, 2015.
36. Hannibal CG, Jensen A, Sharif H and Kjaer SK: Malignant melanoma risk after exposure to fertility drugs: Results from a large Danish cohort study. *Cancer Causes Control* 19: 759-765, 2008.
37. Holly EA, Cress RD and Ahn DK: Cutaneous melanoma in women. III. Reproductive factors and oral contraceptive use. *Am J Epidemiol* 141: 943-950, 1995.
38. Rossing MA, Daling JR, Weiss NS, Moore DE and Self SG: Risk of cutaneous melanoma in a cohort of infertile women. *Melanoma Res* 5: 123-127, 1995.
39. Spaan M, van den Belt-Dusebout AW, Schaapveld M, Mooij TM, Burger CW and van Leeuwen FE: Melanoma risk after ovarian stimulation for in vitro fertilization. *Hum Reprod* 30: 1216-1228, 2015.
40. Tomao F, Papa A, Lo Russo G, Zuber S, Spinelli GP, Rossi L, Caruso D, Prinzi N, Stati V, *et al.*: Correlation between fertility drugs use and malignant melanoma incidence: The state of the art. *Tumour Biol* 35: 8415-8424, 2014.
41. Trabert B, Lamb EJ, Scoccia B, Moghissi KS, Westhoff CL, Niwa S and Brinton LA: Ovulation-inducing drugs and ovarian cancer risk: Results from an extended follow-up of a large United States infertility cohort. *Fertil Steril* 100: 1660-1666, 2013.
42. Weinberg R., A. cancer biology. Publisher. Art Med, 2008.
43. Lim K, Kaldis, P. Cdks, cyclins and CKIs: Roles beyond cell cycle regulation. *Development* 140: 3079-3093, 2013.
44. Matson JP, Cook JG. Cell cycle proliferation decisions: The impact of single cell analyses. *FEBS J* 284: 362-375, 2016.

45. Kim BM, Hong Y, Lee S, Liu P, Lim JH, Lee YH, Lee TH, Chang KT and Hong Y. Therapeutic implications for overcoming radiation resistance in cancer therapy. *Int J Mol Sci* 16: 26880-26913, 2015.
46. De Craene B and Berx G: Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression. *Nat Rev Cancer* 13: 97-110, 2013.
47. Filho, GB: *Bogliolo Pathology*. Guanabara Koogan, 2016.
48. Susnow N, Zeng L, Margineantu D and Hockenbery DM: Bcl-2 family proteins as regulators of oxidative stress. *Semin Cancer Biol* 19: 42-49, 2009.
49. Church SL, Grant JW, Meese EU and Trent JM. *Genomics* 14: 823-825, 1992.
50. Drane P, Bravard A, Bouvard V, *et al*: Reciprocal down-regulation of p53 and SOD2 gene expression—implication in p53 mediated apoptosis. *Oncogene* 20: 430-439, 2001.
51. Church SL, Grant JW, Ridnour LA, Oberley LW, Swanson PE, Meltzer PS and Trent JM: Increased manganese superoxide dismutase expression suppresses the malignant phenotype of human melanoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 3113-3117, 1993.

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A associação entre o protocolo de EOC e o desenvolvimento de neoplasias vem sendo levantada e descrita na literatura já há algum tempo, majoritariamente por meio de estudos epidemiológicos de caráter observacional. Para o melanoma, há evidências demonstrando que a EOC pode contribuir para o aumento do risco de desenvolvimento desta neoplasia, mas também há trabalhos que indicam que esta associação é inexistente. Entretanto, a lacuna para estudos experimentais acerca da influência da EOC no desenvolvimento neoplásico, continua aberta para a grande maioria das neoplasias, incluindo o melanoma. A importância desses estudos neste contexto, está atrelada ao fato de que os resultados gerados por eles podem ter grande impacto na compreensão de como essa relação ocorre e se existe, de fato, alguma associação entre tais eventos.

Dessa forma, este trabalho mostrou-se pioneiro na investigação dos efeitos *in vitro* no melanoma humano de dois dos fármacos que são frequentemente utilizados na indução de ovulação e tratamento da infertilidade: o citrato de clomifeno (CC) e o letrozol (LET). A influência do tratamento com esses compostos foi avaliada na linhagem celular A375 de melanoma humano, imortalizada a partir do tumor primário de uma paciente de 54 anos de idade, e do sexo feminino. Aspectos como viabilidade e metabolismo celular foram inicialmente avaliados por meio da incubação das células com quatro concentrações crescentes das drogas e, posteriormente, os efeitos das duas maiores concentrações de cada composto foram avaliados sobre o ciclo celular, o perfil migratório e a expressão gênica de alvos associados a uma maior agressividade celular.

Foram observados efeitos celulares mais pronunciados decorrentes do tratamento com o CC, o qual levou a uma redução de 80% na viabilidade celular 48 horas após o tratamento com a concentração de 2000 ng/mL. Além disso, demonstramos que o composto induziu uma parada inicial na fase G1 do ciclo celular 24h após o tratamento; o que evoluiu para uma parada em sub-G1 após um tempo de incubação superior (48h) com este composto. Esses dados indicaram uma citotoxicidade inerente ao CC sobre a linhagem celular estudada, a qual teve sua viabilidade reduzida e potenciais danos ao processo de replicação celular evidenciados pelo ensaio do MTT e pela avaliação do ciclo celular, respectivamente. Houve também um indicativo de que o tratamento mais prolongado com o CC em sua maior concentração,

comprometeu a capacidade migratória das células no ensaio de cicatrização de feridas, tendo sido observado, nestas condições, um evidente alargamento da ferida, que se tornou maior do que no tempo 0h.

Ademais, após 48h de incubação com 2000 ng/mL de CC, houve uma redução na expressão de *BAX* com aumento na expressão de *SOD2*, indicando potencial resistência celular à apoptose por meio da ação anti-oxidante da enzima superóxido dismutase, codificada por este gene. Com relação a expressão das caderinas (*NCAD* e *ECAD*), não foram observadas diferenças significativas induzidas pelo tratamento com o CC, o que pode sugerir que essa droga não atua ou favorece a transição epitélio-mesenquimal através da modulação da expressão desses genes alvos, importantes para este processo.

Com relação ao tratamento com o LET, demonstramos que ele não induziu alterações significativas na viabilidade celular, além de promover uma parada duradoura (até 48h) do ciclo celular na fase G1; o que indicou uma tolerância celular maior a esse composto. Seu impacto na migração celular não foi muito notório nas primeiras 24 horas, uma vez que, as células apresentaram um perfil migratório similar ao controle após esse tempo de tratamento. Porém, após 48 horas de incubação, foi observado uma tendência ao atraso na migração, evidenciado pela presença de uma ferida ligeiramente mais larga no poço tratado, em relação ao controle.

Por outro lado, o LET regulou negativamente a expressão de *NCAD* após 24h e 48h de incubação com ambas as concentrações testadas. Além disso, essa droga induziu um aumento na expressão de *BAX* após 48h de tratamento com a maior concentração; e de *SOD2* tanto 24h quanto 48h após o tratamento, sendo esse aumento significativo para a menor concentração testada apenas para o período de 48h. A redução na expressão da *NCAD* pode estar associada a perda do fenótipo celular mesenquimal, uma vez que essa caderina é expressa por células desta natureza. A perda de expressão da *ECAD* e ganho de expressão da *NCAD* é um dos fatores associados a transição epitélio-mesenquimal, durante a qual as células ganham a habilidade de deslocar-se do seu sítio primário e migrar pelo estroma subjacente, o que contribui para a invasão e metastização do melanoma. Dessa forma, uma redução na expressão da *NCAD* pode ser interpretada como um indicativo de abrandamento do perfil invasor das células A375 e, por consequência, como um potencial enfraquecimento de sua agressividade.

O aumento na expressão de *BAX* e *SOD2* demonstrou que o tratamento com o LET possivelmente desencadeou estresse oxidativo nas células A375. Sabe-se que o estresse oxidativo mediado por ROS é um importante ativadores da proteína p53, fator de transcrição que regula a expressão positiva de *BAX* como agente pró-apoptótico nas vias mitocondriais da apoptose. No entanto, o aumento da expressão de *SOD2*, indica uma resposta celular ao estresse oxidativo mitocondrial, como uma tentativa de proteger as células da morte celular por apoptose (YE *et al.*, 2010). Isso corrobora com os achados de viabilidade e ciclo celular, os quais não demonstraram indícios de citotoxicidade significativa causada por esse composto.

Sendo assim, os resultados deste trabalho sugerem que ambos os tratamentos com CC e LET, nas condições testadas, não demonstraram um efeito pró-tumoral na linhagem A375 de melanoma humano; contribuindo, na verdade, para a redução de algumas de suas características de malignidade, sendo o efeito do CC mais pronunciado do que o do LET. Esses dados podem ser bastante positivos para as pacientes que passam por protocolos de EOC, entretanto, devem ser avaliados com a devida cautela e considerando as limitações do estudo.

Os testes foram realizados em uma única linhagem celular, proveniente de uma única paciente. Isso, atrelado ao fato de o melanoma ser uma neoplasia extremamente heterogênea, limita a extrapolação e generalização dos efeitos do CC e do LET, observados neste trabalho, para todas as outras linhagens de melanoma ou para o melanoma *in vivo*. Para tanto, mais testes devem ser realizados para avaliar o impacto do CC e do LET em outras linhagens celulares de melanoma, em células controle não neoplásicas, assim como no melanoma *in vivo*; o que embasaria a construção de conclusões mais sólidas sobre a relação dessas drogas com esse tipo de câncer.

Como perspectivas futuras para este trabalho, estão a investigação (na linhagem A375) da expressão gênica de outros alvos associados a apoptose, como *CASP3* e *CASP9*; além da avaliação da expressão de *ZEB1*, para melhor compreensão do papel dessas drogas na transição epitélio-mesenquimal. Outrossim, planejamos investigar a capacidade invasiva dessas células através do ensaio de invasão *transwell*, e confirmar os impactos desses compostos no potencial celular migratório por meio do ensaio de cicatrização de feridas na presença de um composto inibidor de proliferação.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKEL, R. A. et al. Ovarian Stimulation Is Safe and Effective for Patients with Gynecologic Cancer. **Journal of Adolescent and Young Adult Oncology**, v. 9, n. 3, p. 367–374, 10 jan. 2020.
- ALI, Z.; YOUSAF, N.; LARKIN, J. Melanoma epidemiology, biology and prognosis. **European Journal of Cancer, Supplement**, v. 11, n. 2, p. 81–91, 2013.
- ALPER, M. M.; FAUSER, B. C. Ovarian stimulation protocols for IVF: is more better than less? **Reproductive biomedicine online**, v. 34, n. 4, p. 345–353, abr. 2017.
- ALTHUIS, M. D. et al. Uterine Cancer after Use of Clomiphene Citrate to Induce Ovulation. **American Journal of Epidemiology**, v. 161, n. 7, p. 607–615, 1 abr. 2005a.
- ALTHUIS, M. D. et al. Melanoma, thyroid, cervical, and colon cancer risk after use of fertility drugs. **American Journal of Obstetrics & Gynecology**, v. 193, n. 3, p. 668–674, 1 set. 2005b.
- ASMR, A. S. FOR R. M. Fertility drugs and cancer: a guideline. **Fertility and sterility**, v. 106, n. 7, p. 1617–1626, 2016.
- ASSOCIAÇÃO DA INDÚSTRIA FARMACÊUTICA DE PESQUISA (INTERFARMA). Cancer in Brazil: the patient's journey in the healthcare system and its social and financial impacts. p. 88, 2019.
- BELITSKIY, G. A. et al. Drug-Related Carcinogenesis: Risk Factors and Approaches for Its Prevention. **Biochemistry. Biokhimiia**, v. 85, n. Suppl 1, p. S79–S107, jan. 2020.
- BENNETT, D. C. How to make a melanoma: what do we know of the primary clonal events? **Pigment cell & melanoma research**, v. 21, n. 1, p. 27–38, fev. 2008.
- BRAY, F. et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 68, n. 6, p. 394–424, nov. 2018.
- BREIVIK, J. The evolutionary origin of genetic instability in cancer development. **Seminars in Cancer Biology**, v. 15, n. 1, p. 51–60, 2005.
- BRINTON, L. A. et al. Effects of fertility drugs on cancers other than breast and gynecologic malignancies. **Fertility and Sterility**, v. 104, n. 4, p. 980–988, 1 out. 2015.
- CAIRNS, R. A.; MAK, T. W. The current state of cancer metabolism. **Nature Reviews Cancer**, v. 16, n. 10, p. 613–614, 2016.
- CAKMAK, H.; ROSEN, M. P. Ovarian stimulation in cancer patients. **Fertility and sterility**, v. 99, n. 6, p. 1476–1484, maio 2013.

CALDERON-MARGALIT, R. et al. Cancer risk after exposure to treatments for ovulation induction. **American journal of epidemiology**, v. 169, n. 3, p. 365–375, 1 fev. 2009.

CAMARDA, R.; WILLIAMS, J.; GOGA, A. In vivo Reprogramming of Cancer Metabolism by MYC. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 5, n. April, p. 1–13, 2017.

DEBERARDINIS, R. J.; CHANDEL, N. S. Fundamentals of cancer metabolism. **Science Advances**, v. 2, n. 5, p. e1600200, 1 maio 2016.

DOR, J. et al. Cancer incidence in a cohort of infertile women who underwent in vitro fertilization. **Fertility and Sterility**, v. 77, n. 2, p. 324–327, 1 fev. 2002.

EGEBLAD, M.; WERB, Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. **Nature reviews. Cancer**, v. 2, n. 3, p. 161–174, mar. 2002.

FILHO, G. B. **Bogliolo Patologia**. 9 ed. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2013. v. 53

FOUAD, Y. A.; AANEI, C. Revisiting the hallmarks of cancer. **American journal of cancer research**, v. 7, n. 5, p. 1016–1036, 1 maio 2017.

GALLOS, I. D. et al. Controlled ovarian stimulation protocols for assisted reproduction: a network meta-analysis. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, n. 3, 2017.

GREENBERG, E. et al. Regulation of Cancer Aggressive Features in Melanoma Cells by MicroRNAs. **PLOS ONE**, v. 6, n. 4, p. e18936, 25 abr. 2011.

GREENBLATT, R. B. et al. Induction of Ovulation with MRL/41: Preliminary Report. **JAMA**, v. 178, n. 2, p. 101–104, 14 out. 1961.

GUY, G. P. et al. Vital signs: melanoma incidence and mortality trends and projections - United States, 1982-2030. **MMWR. Morbidity and mortality weekly report**, v. 64, n. 21, p. 591–6, 2015.

HAASS, N. K.; SMALLEY, K. S. M.; HERLYN, M. The role of altered cell-cell communication in melanoma progression. **Journal of Molecular Histology**, v. 35, n. 3, p. 309–318, 2004.

HANAHAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57–70, 2000.

HANAHAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, 4 mar. 2011.

HANNIBAL, C. G. et al. Malignant melanoma risk after exposure to fertility drugs: results from a large Danish cohort study. **Cancer causes & control : CCC**, v. 19, n. 7, p. 759–765, 2008.

HOLZER, H.; CASPER, R.; TULANDI, T. A new era in ovulation induction. **Fertility and sterility**, v. 85, n. 2, p. 277–284, fev. 2006.

HOMBURG, R. Clomiphene citrate—end of an era? a mini-review. **Human Reproduction**, v. 20, n. 8, p. 2043–2051, 1 ago. 2005.

HUMPAL, S. E.; ROBINSON, D. A.; KREBS, J. E. Marks to stop the clock: histone modifications and checkpoint regulation in the DNA damage response. **Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire**, v. 87, n. 1, p. 243–253, fev. 2009.

IARC. **Global Cancer Observatory: Cancer Today**. Disponível em: <<https://gco.iarc.fr/today>>. Acesso em: 23 mar. 2020.

INCA. **O que causa o câncer?** Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/causas-e-prevencao/o-que-causa-cancer>>. Acesso em: 23 mar. 2021.

INCA. **O que é câncer?** Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/o-que-e-cancer>>. Acesso em: 23 mar. 2021.

INCA. **Câncer de pele melanoma**. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-pele-melanoma>>. Acesso em: 23 mar. 2021a.

INCA. **Estatísticas de Câncer**. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/numeros-de-cancer>>. Acesso em: 23 mar. 2021b.

KAMATH, M. S.; GEORGE, K. Letrozole or clomiphene citrate as first line for anovulatory infertility: A debate. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 9, n. 1, p. 86, 2011.

KANAVOS, P. The rising burden of cancer in the developing world. **Annals of Oncology**, v. 17, p. viii15–viii23, 2006.

KERIN, J. F. et al. Evidence for a hypothalamic site of action of clomiphene citrate in women. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 61, n. 2, p. 265–268, ago. 1985.

KESSOUS, R. et al. The risk of female malignancies after fertility treatments: a cohort study with 25-year follow-up. **Journal of cancer research and clinical oncology**, v. 142, n. 1, p. 287–293, jan. 2016.

KETTEL, L. M. et al. Hypothalamic-pituitary-ovarian response to clomiphene citrate in women with polycystic ovary syndrome. **Fertility and sterility**, v. 59, n. 3, p. 532–538, mar. 1993.

KIM, J.; TURAN, V.; OKTAY, K. Long-Term Safety of Letrozole and Gonadotropin Stimulation for Fertility Preservation in Women With Breast Cancer. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 101, n. 4, p. 1364–1371, abr. 2016.

KRISTIANSSON, P.; BJÖR, O.; WRAMSBY, H. Tumour incidence in Swedish women who gave birth following IVF treatment. **Human reproduction (Oxford, England)**, v. 22, n. 2, p. 421–426, fev. 2007.

LAMBERTINI, M.; ANSERINI, P.; DEL MASTRO, L. **Is it safe to perform a controlled ovarian stimulation for assisted reproduction in young breast cancer**

survivors? **European journal of cancer (Oxford, England : 1990)** England, fev. 2016.

LIM, S.; KALDIS, P. Cdks, cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation. **Development (Cambridge, England)**, v. 140, n. 15, p. 3079–3093, ago. 2013.

MARKLUND, A. et al. Efficacy and safety of controlled ovarian stimulation using GnRH antagonist protocols for emergency fertility preservation in young women with breast cancer—a prospective nationwide Swedish multicenter study. **Human Reproduction**, v. 35, n. 4, p. 929–938, 28 abr. 2020.

MATSON, J. P.; COOK, J. G. Cell cycle proliferation decisions: the impact of single cell analyses. **The FEBS journal**, v. 284, n. 3, p. 362–375, fev. 2017.

MITWALLY, M. F.; CASPER, R. F. Use of an aromatase inhibitor for induction of ovulation in patients with an inadequate response to clomiphene citrate. **Fertility and sterility**, v. 75, n. 2, p. 305–309, fev. 2001.

MOLINARI, M. Cell cycle checkpoints and their inactivation in human cancer. **Cell proliferation**, v. 33, n. 5, p. 261–274, out. 2000.

MORRELL, S.; YOUNG, J.; RODER, D. The burden of cancer on primary and secondary health care services before and after cancer diagnosis in New South Wales, Australia. **BMC Health Services Research**, v. 19, n. 1, p. 431, 2019.

MOURIDSEN, H. T. Letrozole in advanced breast cancer: the PO25 trial. **Breast cancer research and treatment**, v. 105 Suppl, n. Suppl 1, p. 19–29, 2007.

NICE. Fertility problems: assessment and treatment. **National Institute for Health and Care Excellence Guideline**, n. February 2013, p. 1–52, 2013.

OMS. International Classification of Diseases. n. 11^a revisão, 2018.

PAVLOVA, N. N.; THOMPSON, C. B. The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism. **Cell metabolism**, v. 23, n. 1, p. 27–47, 12 jan. 2016.

POTASHNIK, G. et al. Fertility drugs and the risk of breast and ovarian cancers: results of a long-term follow-up study. **Fertility and sterility**, v. 71, n. 5, p. 853–859, maio 1999.

RASTRELLI, M. et al. Melanoma: epidemiology, risk factors, pathogenesis, diagnosis and classification. **In vivo (Athens, Greece)**, v. 28, n. 6, p. 1005–1011, 2014.

REIGSTAD, M. M. et al. Cancer Risk in Women Treated with Fertility Drugs According to Parity Status—A Registry-based Cohort Study. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, v. 26, n. 6, p. 953 LP – 962, 1 jun. 2017.

ROSSING, M. A. et al. Risk of cutaneous melanoma in a cohort of infertile women. **Melanoma Research**, v. 5, n. 2, 1995.

SABHARWAL, S. S.; SCHUMACKER, P. T. Mitochondrial ROS in cancer: initiators, amplifiers or an Achilles' heel? **Nature reviews. Cancer**, v. 14, n. 11, p. 709–721, nov. 2014.

- SAMIR AL-BEDEARY, H. A. G.; AL-SHARAFI, D. The hallmarks of cancer and their therapeutic targeting in current use and clinical trials. **Iraqi Journal of Hematology**, v. 9, p. 1–10, 2020.
- SCHADENDORF, D. et al. Melanoma. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 1, n. 1, p. 15003, 2015.
- SEKULIC, A. et al. Malignant melanoma in the 21st century: the emerging molecular landscape. **Mayo Clinic proceedings**, v. 83, n. 7, p. 825–846, jul. 2008.
- SHAIN, A. H. et al. The Genetic Evolution of Melanoma from Precursor Lesions. **New England Journal of Medicine**, v. 373, n. 20, p. 1926–1936, 11 nov. 2015.
- SIRISTATIDIS, C. et al. Controlled ovarian hyperstimulation for IVF: impact on ovarian, endometrial and cervical cancer--a systematic review and meta-analysis. **Human reproduction update**, v. 19, n. 2, p. 105–123, 2013.
- STERNLICHT, M. D.; WERB, Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. **Annual review of cell and developmental biology**, v. 17, p. 463–516, 2001.
- THÜRLIMANN, B. et al. A comparison of letrozole and tamoxifen in postmenopausal women with early breast cancer. **The New England journal of medicine**, v. 353, n. 26, p. 2747–2757, dez. 2005.
- TITUS-ERNSTOFF, L. et al. Pigmentary characteristics and moles in relation to melanoma risk. **International Journal of Cancer**, v. 116, n. 1, p. 144–149, 10 ago. 2005.
- VAZQUEZ, V. DE L. et al. Melanoma characteristics in Brazil: demographics, treatment, and survival analysis. **BMC research notes**, v. 8, p. 4, jan. 2015.
- VOGELSTEIN, B. et al. Cancer genome landscapes. **Science (New York, N.Y.)**, v. 339, n. 6127, p. 1546–1558, mar. 2013.
- VOHORA, D. et al. Combined Raloxifene and Letrozole for Breast Cancer Patients. **Archives of medical research**, v. 48, n. 6, p. 561–565, 2017.
- VYAS, S.; ZAGANJOR, E.; HAIGIS, M. C. Mitochondria and Cancer. **Cell**, v. 166, n. 3, p. 555–566, 28 jul. 2016.
- WEINBERG, R. A. **The biology of cancer**. [s.l.] Garland science, 2013.
- WOODMAN, S. E. et al. New strategies in melanoma: molecular testing in advanced disease. **Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research**, v. 18, n. 5, p. 1195–1200, mar. 2012.
- YE, Y. et al. Nano-SiO₂ induces apoptosis via activation of p53 and Bax mediated by oxidative stress in human hepatic cell line. **Toxicology in Vitro**, v. 24, n. 3, p. 751–758, 2010.

YILMAZ, S. et al. Safety of clomiphene citrate: a literature review. **Cytotechnology**, v. 70, n. 2, p. 489–495, abr. 2018.

YLI-KUHA, A.-N. et al. Cancer morbidity in a cohort of 9175 Finnish women treated for infertility. **Human Reproduction**, v. 27, n. 4, p. 1149–1155, 1 abr. 2012.

YOUNG, P. et al. A study of infertility treatment and melanoma. **Melanoma research**, v. 11, n. 5, p. 535–541, 2001.