



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus de São José do Rio Preto

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA

---

Juliana Ramos Lopes

**Avaliação *in vitro* da melatonina como agente terapêutico em tumores mamários estrógeno-dependentes ou não**

**Dissertação apresentada para  
obtenção do Título de Mestre  
em Genética.**

---

São José do Rio Preto

2013

**Juliana Ramos Lopes**

**Avaliação *in vitro* da melatonina como agente terapêutico em tumores  
mamários estrógeno-dependentes ou não**

Dissertação apresentada ao Instituto  
de Biociências, Letras e Ciências  
Exatas (IBILCE/UNESP) – São  
José do Rio Preto para obtenção do  
Título de Mestre em Genética.

**Orientadora:** Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Debora Aparecida Pires de Campos Zuccari

São José do Rio Preto – SP  
2013

**JULIANA RAMOS LOPES**

**Avaliação *in vitro* da melatonina como agente terapêutico em tumores  
mamários estrógeno-dependentes ou não**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Genética junto ao Programa de Pós-Graduação em Genética do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

**BANCA EXAMINADORA**

Profa. Dra. Debora Ap. Pires de Campos Zuccari  
Professora Adjunta  
FAMERP – São José do Rio Preto  
Orientador

Prof. Dr. Bruno Cogliati  
Professor Adjunto  
USP – São Paulo

Profa. Dra. Claudia Regina Bonini Domingos  
Professora Adjunta  
UNESP – São José do Rio Preto

São José do Rio Preto, 22 de fevereiro de 2013

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Investigação Molecular do Câncer (LIMC) e na Unidade de Pesquisa em Genética e Biologia Molecular (UPGEM) ambos da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP. Apoio financeiro na forma de bolsa de estudos fornecida pelo CNPq e recursos para o desenvolvimento do projeto na forma de Auxílio à Pesquisa da FAPESP.

*Com amor e carinho, dedico esse trabalho aos meus pais, Sonia e Luiz, pelo incentivo e apoio em todas as minhas escolhas e decisões, me encorajando nas horas difíceis e me aplaudindo nos momentos de glória. Obrigada pelo amor incondicional!*

*“É preciso força pra sonhar e perceber que a estrada vai além do que se vê”*

*Los Hermanos*

## **Agradecimentos**

*Aos meus pais, Sonia A. Ramos Lopes e Luiz Lopes Garcia, por quem tenho todo o amor, agradeço pelo apoio, pelo sacrifício de suas vidas para me dar a oportunidade de alcançar os meus sonhos, pelo carinho e amor.*

*Aos meus irmãos Victor Luiz Ramos Lopes e João Henrique Ramos Lopes, pelo simples fato de serem irmãos, de compartilharem a mesma origem e de saber das delícias e das durezas do nosso crescer.*

*Ao meu namorado Rafael Azeredo de Oliveira, agradeço pelo apoio, companheirismo e, sobretudo, pela força que me dá para superar obstáculos. Agradeço também a seus pais, pelo carinho e preocupação. Em especial a minha sogra, Maria Tercília Vilela de Azeredo Oliveira, pois foi ela quem me apresentou a minha orientadora e foi graças a ela que se iniciou esse estágio na minha vida.*

*A minha querida orientadora, Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Debora Zuccari, pelo exemplo de professora e orientadora, pela amizade e confiança. Agradeço também por ter acreditado na minha capacidade e por todo apoio e ensinamento transmitido ao longo desses anos.*

*A minha amiga de infância Nathália Nascimento, por me acompanhar em toda a trajetória da minha vida, onde com ela pude desabafar cada momento difícil e compartilhar os momentos de alegria.*

*A todos do Laboratório de Investigação Molecular do Câncer (LIMC), em especial aos meus amigos Lívia, Naiane, Bruna, Camila, Gabriela, Marina, Larissa e Gustavo pela amizade, companheirismo e pelos momentos de alegrias e tristezas compartilhados. Vocês foram fundamentais durante essa fase da minha vida.*

*Aos membros da banca examinadora do meu exame geral de qualificação, Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Dorotéia Rossi da Silva Souza e Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Maria Tercília Vilela de Azeredo Oliveira, pelas valiosas sugestões que com certeza foram importantes para a minha dissertação.*

*Aos Professores Dr. Bruno Cogliati e Dr<sup>a</sup> Claudia Regina Domingos Bonini, por gentilmente aceitarem fazer parte da minha banca de defesa.*

*Aos médicos veterinários de São José do Rio Preto e Região pela parceria durante o projeto, e por permitir o contato com os proprietários, a ajuda de vocês foi fundamental e de grande aprendizado. E em especial, a todos os proprietários que prontamente permitiram o contato com seus “animaizinhos” tornando possível a pesquisa.*

*Aos amigos da Unidade de Pesquisa em Genética e Biologia Molecular (UPGEM) da Famerp que compartilharam comigo tantos momentos bons e em especial a Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Eny M. Goloni-Bertollo e a Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Erika C. Pavarino.*

*Aos alunos da Pós-Graduação em Genética, pelos momentos maravilhosos compartilhados nas disciplinas, na organização do Simpósio de Genética e tantos outros momentos que pude conhecer cada um de vocês. Em especial aos amigos Nathália Sonehara e Rubens de Paula Junior que me proporcionaram momentos muito divertidos.*

*Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudos que me acompanhou durante o mestrado.*

*A FAPESP pelo auxílio financeiro concedido para a compra de materiais e equipamentos de Laboratório.*

*Ao IBILCE e a FAMERP pela infra-estrutura e profissionais que possibilitaram a realização de mais essa etapa da minha vida.*

*Enfim, agradeço à todos que passaram pela minha vida e de alguma forma contribuíram para minha formação.*



## RESUMO

O câncer de mama representa a mais comum das neoplasias no sexo feminino, respondendo por 22% dos novos casos de câncer a cada ano. As neoplasias mamárias são ainda mais freqüentes na espécie canina, representando aproximadamente 52% de todas as neoplasias nas cadelas. A identificação de agentes terapêuticos que possam ser utilizados no tratamento alternativo para este tipo tumoral têm se revelado extremamente útil. A melatonina, um hormônio natural, parece exercer efeito oncostático em diferentes tipos de neoplasias. Considera-se como provável mecanismo de ação, sua interação com receptores estrogênicos e com os receptores MT1 e MT2 das células epiteliais, inibindo a proliferação das células neoplásicas. Dessa forma, o objetivo deste estudo foi avaliar o potencial valor terapêutico da melatonina em linhagens de câncer de mama e em tumores mamários caninos estrógeno-positivo e estrógeno-negativo, além de relacionar sua ação com a expressão dos receptores MT1 e MT2. A identificação de tumores mamários estrógeno-positivo e negativo foi realizada por meio de imunohistoquímica e a expressão dos genes MT1 e MT2 nas amostras foi analisada por PCR em tempo real. As células cultivadas, provenientes dos tumores e das linhagens MCF-7 e MDA-MB-231 foram tratadas com melatonina e a viabilidade celular foi analisada pelo ensaio MTT. Observou-se 40% de redução na viabilidade celular nos tumores RE+ e RE- quando tratados, respectivamente, com 1mM e 10mM de melatonina ( $p < 0,05$ ). Além disso, os tumores RE+ apresentaram alta expressão dos receptores de melatonina MT1 e MT2 quando comparados aos tumores RE-. Com relação às linhagens, a linhagem MCF-7 (RE+) reduziu em 63% a viabilidade celular quando tratada com 10mM de melatonina ( $p < 0,05$ ) e para a linhagem MDA-MB-23 (RE-), esta mesma concentração reduziu 50% ( $p < 0,05$ ). Os resultados permitem concluir que a melatonina reduziu a viabilidade das células neoplásicas, sendo mais eficaz para tumores RE+, definindo seu potencial uso terapêutico no tratamento do câncer.

Palavras-chave: Melatonina. Imuno-histoquímica. Cultura celular. PCR em tempo real.

## **ABSTRACT**

*Breast cancer is the most common cancer in women, accounting for 22% of new cancer cases each year. The mammary neoplasias are also common in canine species, representing about 52% of all cancers in female dogs. The identification of therapeutic agents that can be used as an alternative treatment for this tumor type has proven to be extremely useful. Melatonin, a natural hormone, can exercise oncostatic effects in several types of neoplasias. It is considered as a probable mechanism of action, their interaction with estrogenic receptors and with MT1 and MT2 receptors of the epithelial cells by inhibiting the proliferation of neoplastic cells. In this context, the objective of this study was to evaluate the potential therapeutic value of melatonin in breast cancer cell lines and canine mammary tumors estrogen-positive and estrogen-negative, also establishing relationship of its action to the MT1 and MT2 receptor. Identification of canine mammary tumors ER+ and negative was performed by immunohistochemistry and gene expression MT1 and MT2 in the samples was analyzed by real-time PCR. Cells cultured from the tumors and cell lines MCF-7 and MDA-MB-231 were treated with melatonin and cell viability was analyzed by MTT assay. We observed 40% reduction in cell viability in ER+ tumors and ER- when treated, respectively, with 1mM and 10mM melatonin ( $p < 0.05$ ). Furthermore, the ER+ tumors showed high expression of melatonin receptors MT1 and MT2 when compared to ER- tumors. Regarding cell lines, the cell line MCF-7 (ER+) showed 63% reduction in cell viability when treated with 10mM of melatonin ( $p < 0.05$ ) for the cell line MDA-MB-23 (ER-), this same concentration reduced 50% cell viability ( $p < 0.05$ ). The results suggest that melatonin decreases the viability of neoplastic cells, being more effective for RE-positive tumors, defining its therapeutic potential use in cancer treatment.*

*Keywords: Melatonin. Immunohistochemistry. Cell culture. Real-time PCR.*

## Lista de abreviaturas e símbolos

<b>µg</b>	Micrograma
<b>µl</b>	Microlitro
<b>µm</b>	Micrômetro
<b>AFIP</b>	do inglês Armed Forces Institute of Pathology
<b>cDNA</b>	DNA complementar
<b>CEUA</b>	Comissão de Ética no Uso de Animais
<b>CO<sub>2</sub></b>	Fórmula química do gás carbônico
<b>Ct</b>	do inglês Threshold
<b>DAB</b>	Fórmula química do gás carbônico
<b>DEPC</b>	Dietilpirocarbonato
<b>DMEM</b>	do inglês Dulbecco's Modified Eagles Medium
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>EGF</b>	Fator de Crescimento Epidermal
<b>FAMERP</b>	Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
<b>HE</b>	Hematoxilina-eosina
<b>HER-2/neu</b>	do inglês Human Epidermal growth factor Receptor 2
<b>HPRT</b>	do inglês Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase
<b>INCA</b>	Instituto Nacional do Câncer
<b>M.O.D</b>	do inglês Mean Optical Density
<b>MCF-7</b>	Linhagem Celular de Adenocarcinoma de Mama Humano
<b>MDA-MB-231</b>	Linhagem Celular de Carcinoma de Mama Humano
<b>mg</b>	Miligrama
<b>mL</b>	Mililitro
<b>mM</b>	Milimol
<b>MT1</b>	do inglês Melatonin Receptor
<b>MT2</b>	do inglês Melatonin Receptor
<b>MTT</b>	3{4,5- dimetiliazol-2-il}-2,5difeniltetrazolium bromídeo
<b>ng</b>	Nanograma
<b>nm</b>	Nanometro
<b>nM</b>	Nanomol
<b>°C</b>	Graus Celsius

<b>OMS</b>	Organização Mundial da Saúde
<b>PBS</b>	do inglês Phosphate Buffer Solution
<b>PCR</b>	do inglês polimerase chain reaction
<b>pH</b>	Potencial Hidrogeniônico
<b>q-PCR</b>	PCR quantitativa
<b>RE</b>	Receptor de Estrógeno
<b>RNA</b>	Ácido Ribonucléico
<b>RP</b>	Receptor de Progesterona
<b>RPL8</b>	do inglês Ribosomal Protein, L8
<b>RPS19</b>	do inglês Ribosomal Protein S19
<b>RPS5</b>	do inglês Ribosomal Protein S5
<b>RQ</b>	Relative Quantitation
<b>RT-PCR</b>	do inglês Reverse Transcriptase – Polymerase Chain Reaction
<b>S.E.M</b>	Desvio Padrão
<b>SFB</b>	Soro Fetal Bovino
<b>TNM</b>	Sistema de estadiamento clínico, T= tumor, N=linfonodo (do inglês node), M= metástase
<b>u.a.</b>	unidades arbitrárias
<b>UFMG</b>	Universidade Federal de Minas Gerais

## Sumário

<b>I. INTRODUÇÃO</b> .....	1
1. Melatonina.....	4
1.1. Melatonina e Câncer.....	5
1.2. Receptores de melatonina.....	7
<b>II. OBJETIVOS</b> .....	10
<b>III. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	12
1. Considerações éticas .....	12
2. Caracterização das amostras.....	12
2.1. Parâmetros Clínicos.....	12
2.2. Parâmetros histopatológicos.....	13
3. Processamento das amostras .....	15
4. Estudo imuno-histoquímico .....	15
4.1. Preparação dos fragmentos tumorais e confecção das lâminas .....	15
4.2. Procedimento imuno-histoquímico .....	15
4.3. Quantificação da marcação Imuno-histoquímica .....	16
4.4. Correlação entre a expressão dos marcadores prognósticos com as características clínicas e patológicas das cadelas.....	17
5. Cultivo celular .....	20
5.1. Cultura primária de neoplasias mamárias de cadelas .....	20
5.2. Linhagem celular de câncer de mama .....	20
5.3. Manutenção das células <i>in vitro</i> .....	21
5.4. Tripsinização .....	21
5.5. Imunocitoquímica da cultura celular .....	21
5.6. Contagem e plaqueamento das células .....	22
5.7. Grupos e tratamentos.....	23
5.8. Ensaio MTT.....	23
6. Procedimento de biologia molecular .....	24
6.1. Extração do RNA total das amostras.....	24
6.2. Obtenção do cDNA .....	24
6.3. Técnica de PCR quantitativo (q-PCR): análise da expressão gênica .....	25
7. Análise Estatística .....	27
<b>IV. RESULTADOS</b> .....	29
1. Cultivo celular .....	29
1.2. Ensaio MTT.....	30

2. PCR em Tempo Real (qPCR).....	31
2.1. MT1.....	31
2.2. MT2.....	32
<b>V. DISCUSSÃO</b> .....	34
<b>VI. CONCLUSÕES</b> .....	39
<b>VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	41
<b>VIII. APÊNDICE</b> .....	53
<b>IX. ANEXOS</b> .....	55

## I. INTRODUÇÃO

O câncer de mama representa a mais comum das neoplasias no sexo feminino, respondendo por 22% dos novos casos de câncer a cada ano (INCA, 2012). A Organização Mundial da Saúde estima que, por ano, ocorram mais de 1.050.000 casos novos de câncer de mama em todo o mundo.

As taxas de mortalidade por câncer de mama continuam elevadas, pois a doença ainda é diagnosticada em estádios avançados. No Brasil, o câncer de mama é o que mais causa mortes entre as mulheres desde 1979 e dados mostram que isso tem agravado (INCA, 2010). Na população mundial, a sobrevida média após cinco anos de acompanhamento é de 61% e, apesar do progresso nos últimos 30 anos no diagnóstico e tratamento, essa doença ainda é responsável por quase meio milhão de mortes por ano no mundo (SNOUSSI et al., 2010).

As neoplasias mamárias são também freqüentes na espécie canina, representando aproximadamente 52% de todas as neoplasias no cão, sendo a principal causa de mortalidade e morbidade nestas espécies (MacEWEN, 1990; SORENMO, 1998; ZUCCARI, 2001; QUEIROGA & LOPES, 2002; ZUCCARI et al., 2008; MANUALI, 2012). A espécie canina, de fato, é a que apresenta espontaneamente, a maior incidência de neoplasias mamárias dentre todos os mamíferos e, quando comparada à mulher, apresenta três vezes mais tumores mamários (BRODEY et al., 1983).

Devido às muitas semelhanças compartilhadas por humanos e cães, os tumores mamários em cadelas prestam-se como modelos apropriados ao estudo da biologia do câncer (SCHNEIDER et al., 1970; MOTTOLESE et al., 1994; PHILLIPS et al., 2010), assim como para testes de agentes terapêuticos, já que estes animais têm tumores com características epidemiológicas e clínicas, bem como o comportamento biológico semelhantes aos carcinomas de mama em mulheres (MacEWEN, 1990; PELETEIRO, 1994; ANDRADE et al., 2010). Além disso, os tumores de mama em cadelas constituem um desafio para clínicos e, principalmente, para patologistas, uma vez que a nomenclatura e classificação desses tumores têm se revelado muito difíceis e controversas, impossibilitando há muito tempo, estudos comparativos entre os resultados de investigação reportados por diferentes pesquisadores (BRODEY et al., 1983; QUEIROGA & LOPES, 2002). Seres humanos e cães também compartilham

uma resposta semelhante à cirurgia e a esquemas de quimioterapia (PHILLIPS et al., 2010).

As condutas preventivas para tratamento destas neoplasias em mulheres não são efetivas devido à variabilidade dos fatores de risco e às características genéticas herdadas relacionadas à sua etiologia (SNOUSSI et al., 2006). Além disso, alguns aspectos já estão bem estabelecidos no desenvolvimento da neoplasia mamária em cães: cães de raça têm duas vezes mais chances de desenvolverem tumores mamários, a ausência de receptores de estrogênio e progesterona e o uso de contraceptivos, além de dieta imprópria e idade avançada que aumentam as chances de desenvolver a neoplasia. Por outro lado, sabe-se que a castração antes do primeiro cio reduz o risco em até 90%, no entanto, o problema maior é a negligência dos proprietários, que só levam o animal ao especialista quando o nódulo já tem grande diâmetro, diminuindo as chances de tratamento e cura (QUEIROGA & LOPES, 2002).

Pesquisas recentes demonstram crescente variedade de marcadores moleculares que podem ser utilizados em conjunto com os marcadores morfológicos e histopatológicos presentes nos tumores. Isso reflete em avaliação mais precisa do prognóstico, além de ampliar as estratégias futuras no tratamento do carcinoma mamário (GONZALEZ-ÂNGULO et al., 2007; HICKS & KULKARNI, 2008; GRALOW et al., 2008; DUFFY et al., 2010).

Atualmente, o estudo da expressão imuno-histoquímica de marcadores prognósticos e preditivos do câncer de mama tem se revelado importante ferramenta de trabalho na rotina diagnóstica e de pesquisa. Neste campo, a disponibilidade de anticorpos monoclonais que reagem com antígenos associados aos tumores de mama está se expandindo progressivamente e, dessa forma, vem permitindo que se conheça melhor a biologia da referida neoplasia, oferecendo, com isso uma avaliação mais precisa do prognóstico, diagnóstico e tratamento dessa classe tumoral (BODEY, 2002; HUANG et al., 2009).

Muitos marcadores imuno-histoquímicos foram propostos e hoje já está estabelecido um perfil imuno-histoquímico para utilização na rotina clínica de pacientes com câncer de mama. Este painel compreende os receptores hormonais de estrogênio e progesterona, o oncogene HER-2/neu, o marcador de proliferação celular Ki-67 e o supressor tumoral p53 (ZUCCARI et al., 2008).



Os marcadores mais utilizados são o receptor de estrógeno (RE) e receptor de progesterona (RP). Tanto o RE e como o RP são fatores de transcrição ligantes ativos que pertencem à família de receptores hormonais nucleares (DUFFY et al., 2005).

O status dos receptores hormonais, receptor de estrogênio (RE) e receptor de progesterona (RP) e do receptor do fator de crescimento epidermal 2 (HER-2/neu) são fatores prognósticos e preditivos incorporados à rotina clínica e permitem que se estabeleça um tratamento individualizado na paciente com câncer de mama (HSIAO et al., 2010). O alvo da terapia adjuvante para o câncer de mama é guiado em grande parte, pelo status dos RE, RP e HER-2/neu.

A positividade para o RE em tumores mamários correlaciona-se com melhor prognóstico e maior capacidade de resposta à terapia (YUAN et al., 2002).

Chekhun e colaboradores (2009) afirmam que os tumores RE, RP negativos caracterizam um pior curso da doença, devido à relação positiva com metástase e com a menor sobrevida das pacientes. Carcinomas luminais [(RE+) (RP+) (HER-2/neu-)] estão associados com melhor prognóstico e respondem à terapêutica com antiestrogênicos, e carcinomas que superexpressam o HER-2/neu, apresentam boas respostas a drogas que bloqueiam a atividade dessa proteína, como é o caso do anticorpo monoclonal trastuzumab (BASU et al., 2008).

O oncogene HER-2/neu tem sido mundialmente estudado dentro do contexto das neoplasias mamárias, já que a sua amplificação ocorre principalmente nessa classe tumoral (VAN DE VIJVER et al., 2000). Expresso em cerca de 10 a 20% dos casos de carcinomas de mama, o HER-2/neu tem correlação com menor sobrevida, especialmente em pacientes com metástases axilares. De um modo geral, assume-se que pacientes com expressão de HER-2/neu, especialmente no grupo com metástases em linfonodos, têm um prognóstico pior (ZUCCARI et al., 2008).

A proteína Ki-67, desde a sua descoberta no início de 1980, vem sendo muito utilizada como marcador de proliferação do câncer particularmente linfomas, câncer de mama, endócrino e no cérebro. Esta proteína pode ser detectada durante todas as fases ativas do ciclo celular, mas está ausente nas células em repouso (LUPORSI et al., 2012).

O supressor tumoral p53 age como um fator de transcrição de diferentes vias de sinalização induzidas por estresse. Esta proteína pode ser distinguida em dois grupos principais. Aqueles que mediam a iniciação e a manutenção dos “checkpoints” do ciclo celular, e os que conduzem a apoptose (HÖPKER & REINHARDT, 2013).

Esses dados mostram a importância da expressão de um ou mais imunomarcadores como uma informação útil, e muitas vezes conclusiva, na prática clínica (THOMAS & BERNER, 2000), permitindo que estratégias de tratamento sejam definidas de maneira mais eficaz e com menor toxicidade (GONZALEZ-ÂNGULO et al., 2007; HICKS & KULKARNI, 2008; DUFFY et al., 2010).

Neste sentido, a identificação de agentes terapêuticos que possam interagir com marcadores específicos e inibir a progressão do tumor têm se revelado potencialmente útil. A melatonina, um hormônio natural, parece exercer um papel importante na inibição do crescimento tumoral (MAGANHIN et al., 2008; LUCHETTI et al., 2010).

## **1. Melatonina**

A melatonina (*N*-acetil-5-metoxitriptamina) é um neurohormônio pertencente ao grupo das indolaminas, é uma molécula altamente conservada ao longo da cadeia evolutiva, apresentando funções decorrentes de sua produção noturna em todos os grupos de seres vivos, desde organismos unicelulares até o homem (TAMURA, 2009).

Este hormônio é produzido na glândula pineal e secretado na corrente sanguínea (WANG et al., 2012). A glândula pineal é considerada o principal órgão produtor de melatonina, mas diversos outros tecidos ou células, incluindo os macrófagos e monócitos, possuem a capacidade de produzi-la (WANG et al., 2012).

A melatonina encontra-se presente em todos os vertebrados e também em tecidos vegetais (CAPITELLI, 2007). Conforme Claustrat e colaboradores (2005) os níveis desta substância nas folhas, sementes e frutos são baixos, entretanto consistem em uma importante fonte de suplemento de melatonina.

A melatonina é sintetizada a partir do aminoácido triptofano que é capturado da circulação e transformado em 5-hidroxitriptofano (5-HTP) através da ação da enzima triptofano hidroxilase 1 (TPH1), cuja atividade está aumentada em duas vezes na fase escuro. O 5-HTP, descarboxilado pela enzima 5-HTP descarboxilase, gera a serotonina, que é metabolizada durante a fase de escuro à *N*-acetilserotonina (NAS) pela ação da enzima arilalquilamina *N*-acetiltransferase (AA-NAT). Posteriormente a NAS é utilizada como substrato para a enzima hidroxí-indol-O-metiltransferase (HIOMT) dando como produto final a melatonina (TAMURA, 2009).

Devido ao seu pequeno tamanho e natureza anfifílica, a melatonina não é estocada nos pinealócitos. Imediatamente após a sua síntese, atravessa os capilares dos

pinealócitos e atinge facilmente todos os compartimentos celulares e subcelulares (KORF et al., 1998; PARADIES et al., 2010).

A síntese de melatonina é passível de controle pela luz, sendo exclusivamente durante a noite e quase nenhuma síntese no período diurno (DANIELCZYK & DZIEGIEL, 2009; HISSA et al., 2008; MUHLBAUER et al., 2012).

A produção aumentada de melatonina durante a noite se deve a indução da enzima arilalquilamina N-acetiltransferase (AA-NAT). Esta enzima não é induzida quando a luz está presente sobre a retina, portanto, a luz durante a noite (LAN) atenua a produção de melatonina (KACZOR, 2010). A sua síntese é iniciada por sinais neurais que informam a falta de iluminação sobre a retina. Um pico de luz leva à degradação da AA-NAT pelo proteossoma e inibe a transcrição do gene *aa-nat* (TAMURA, 2009).

Além disso, as concentrações séricas da melatonina variam consideravelmente de acordo com a idade. Ela é máxima nos primeiros anos de vida, caindo imediatamente na puberdade e tornando-se mínima com a idade avançada. Dessa forma, a melatonina tem um importante papel na determinação das modificações fisiológicas associadas ao ciclo de vida (crescimento, amadurecimento e envelhecimento) (HISSA et al., 2008).

Esse hormônio influencia o ritmo de vários processos fisiológicos durante a noite: a digestão torna-se mais lenta, a temperatura corporal cai, o ritmo cardíaco e a pressão sanguínea diminuem e o sistema imunológico é estimulado (MAGANHIN et al., 2008).

### **1.1. Melatonina e Câncer**

As primeiras correlações entre a pineal e o combate ao câncer datam do final do século XIX, quando alguns médicos já ofereciam extratos de pineal a seus pacientes oncológicos (NETO & SCALDAFERRI et al., 2005). A partir de 1981, surgiram os primeiros indícios de que a melatonina poderia ser útil no tratamento oncológico através de estudos com o câncer de mama (NETO & SCALDAFERRI et al., 2005).

Mais recentemente, descobriu-se que o hormônio possui propriedades modulatórias do citoesqueleto e oncostáticas capazes de inibir a invasividade de células cancerosas (ORTIZ-LOPEZ et al., 2009) e o crescimento tumoral *in vitro* e *in vivo* (LUCHETTI et al., 2010). Um mecanismo proposto foi a capacidade da melatonina em inibir os hormônios precursores da produção ovariana de estradiol, reduzindo assim, a resposta mitogênica das células em tumores de mama estrógeno dependentes (NETO &

SCALDAFERRI, 2004). Posteriormente, outros estudos utilizando células neoplásicas de mama da linhagem MCF-7 (receptor de estrógeno positiva), confirmaram a propriedade antiestrogênica da melatonina (SANCHEZ-BARCELO et al. 2005; RAVINDRA et al. 2006). Devido à regulação da expressão dos receptores de estrógeno, da modulação de enzimas envolvidas na síntese local de estrogênios e da virtual ausência de contra-indicações, a melatonina pode ser um excelente coadjuvante às drogas comumente usadas para a prevenção do câncer de mama (antiestrogênios e antiaromatases) (SANCHEZ-BARCELO et al., 2012).

A partir dessa constatação, diversos mecanismos de ação dos efeitos oncostáticos e oncoprotetores da melatonina têm sido propostos não só no câncer de mama como também no câncer de próstata, de pele, de fígado, de rim, entre outros (JUNG & AHMAD, 2006; MARTIN et al., 2006; OPREA-ILIES et al., 2013; VIJAYALAXMI et al., 2002).

Sugere-se que a melatonina pode exercer efeito inibitório na atividade da enzima aromatase no tecido mamário neoplásico (SANCHEZ-BARCELO et al. 2005) além de inibir a atividade da enzima telomerase (NETO & SCALDAFERRI, 2004), aumentar a imunidade local (LUCETTI et al. 2010) e a expressão de genes supressores tumorais (ROTH et al. 1997; MEDIAVILLA et al. 1999).

Este hormônio é considerado também um detoxificador de uma variedade de radicais livres e espécies reativas de oxigênio, bem como um antioxidante de largo espectro, estimulando várias enzimas antioxidantes (RAVINDRA et al., 2006). A melatonina protege células de danos oxidativos, melhorando a capacidade de reparo ao DNA (LIU et al., 2013). Ainda, tem influência na produção de fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), atuando sobre o microambiente tumoral reduzindo a angiogênese (ALVAREZ-GARCÍA et al., 2012) e atua também sobre a COX-2 modulando a inflamação e inibindo a proliferação celular (WANG et al., 2012).

Além disso, sugere-se que a melatonina interage com receptores estrogênicos nas células epiteliais, aumentando a imunidade local, controlando a ativação de células T, B, NK e a liberação de citocinas (HARDELAND et al., 2006; NETO & SCALDAFERRI, 2005). Ainda, tem sido descrito seu efeito neuroprotetor em estudos com animais e proposta sua utilização na diminuição das reações adversas da quimioterapia, que inclui a neuropatia (NAHLEH et al., 2010).

## 1.2. Receptores de melatonina

Além dos mecanismos citados acima, a melatonina exerce alguns dos seus efeitos fisiológicos através de receptores de membrana. Estes receptores são encontrados associados à proteína G, e são classificados de acordo com suas características farmacológicas, em Mel1A, Mel1B e Mel1C. Os subtipos Mel1A e Mel1B, agora denominados MT1 e MT2, respectivamente, foram identificados em humanos. O subtipo MT3 parece estar relacionado a enzima quinona redutase, embora sua função permaneça desconhecida (GARCÍA-NAVARRO et al., 2007).

Nos mamíferos, os receptores de melatonina podem ser encontrados nas células do cérebro e de alguns órgãos periféricos, no entanto, há uma variação considerável na densidade e localização da expressão dos receptores de melatonina entre as espécies (MORGAN et al., 1994).

O subtipo MT1 pode ser encontrado na glândula pituitária e no núcleo supraquiasmático do hipotálamo, e está envolvido na modulação do ritmo circadiano e constrição de vasos cardíacos (CAPITELLI, 2007). Além disso, o MT1 é formado por 350 aminoácidos e se liga à diversas proteínas G, incluindo  $G_{i\alpha 2}$ ,  $G_{i\alpha 3}$ ,  $G_{aq}$ ,  $G_{as}$ ,  $G_{\alpha 16}$  que mediam a ativação de fosfolipase C $\beta$  (PLC- $\beta$ ) e inibição da enzima adenilato ciclase, resultando em resposta inibitória sobre a cascata de sinalização mediada pelo AMPc, diminuindo a atividade da proteína quinase A (PKA) e a fosforilação de CREB (elemento de ligação responsivo ao AMPc) (CAPITELLI, 2007).

O subtipo MT2 está presente principalmente na retina, mas também pode ser encontrado no cerebelo, rim, ovário, vasos cardíacos e células cancerosas e encontra-se envolvido na fisiologia da retina, modulação do ritmo circadiano, dilatação de vasos cardíacos e resposta inflamatória na microcirculação. Além disso, este receptor está relacionado à inibição da enzima adenilato ciclase e guanilato ciclase, inibindo a formação de AMPc e GMPc, respectivamente (CAPITELLI, 2007; SUGDEN et al., 2004).

Receptores de melatonina também estão presentes em neutrófilos, monócitos e linfócitos e vários estudos relatam a ação desse hormônio nas atividades imunomoduladoras autócrinas e parácrinas (CARRILLO-VICO et al., 2004), com ação sobre a linfoproliferação, ativação, migração e produção de citocinas por linfócitos humanos (PEDROSA et al., 2010). Essa vasta distribuição destes receptores pode ser

um fator que contribua para a diversidade de respostas geradas pela melatonina (CAPITELLI, 2007).

A melatonina exerce sua ação oncostática ao se ligar aos receptores MT1 e MT2, inibindo a proliferação de células cancerígenas (BLASK et al., 2011).

Um estudo *in vitro* com células de câncer de cólon HCT116 e com células de câncer de mama MCF-7, confirmam que as atividade anti-câncer da melatonina, incluindo a resposta a danos causados ao DNA e inibição da proliferação celular, são mediadas pela ativação dos receptores de melatonina MT1 e MT2 (SANTORO et al., 2013).

Além disso, há evidências da existência de receptores nucleares, tais como as variantes de splicing a, b e d dos ROR $\alpha$  e ROR $\beta$  (receptores órfãos de ácido retinóico), com os quais a melatonina poderia interagir e modificar a atividade de enzimas citoplasmáticas (HARDELAND et al., 2012; MAGANHIN et al., 2008).

É evidente que muito do efeito inibitório da melatonina sobre a proliferação das células do câncer de mama ocorre pela sua ligação aos receptores MT1 e MT2 (LAI et al., 2009). Assim, a melatonina e seus receptores podem conduzir a um caminho promissor para estabelecer novas práticas terapêuticas no câncer de mama e na literatura não há relatos que relacionem tumores mamários caninos com receptores de melatonina (DANIELCZYK & DZIEGIEL, 2009).

## II. OBJETIVOS

Este estudo teve por objetivo verificar a eficácia do tratamento com melatonina nas linhagens de câncer de mama MCF-7 e MDA-MB-231 conhecidas por serem estrógeno-positiva e estrógeno-negativa respectivamente. Além disso, foi avaliada em cultivo primário de neoplasias mamárias de cadelas estrógeno-positivo e estrógeno-negativo, a ação terapêutica da melatonina e sua relação com os receptores MT1 e MT2.

Especificamente:

- Verificar por imuno-histoquímica, a expressão do receptor de estrógeno em tumores de mama de cadelas, a fim de compará-los com a resposta celular à melatonina;
- Avaliar por PCR em tempo real, a expressão dos genes *MT1* e *MT2* em neoplasias mamárias caninas, a fim de comparar a expressão desses receptores com a resposta celular à melatonina;
- Avaliar por MTT, a viabilidade celular das linhagens celulares de câncer de mama e do cultivo celular primário de diferentes neoplasias de mama de cadela, tratadas ou não com melatonina.

### **III. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **1. Considerações éticas**

O presente estudo não acarretou riscos físicos às cadelas selecionadas, uma vez que foram utilizados fragmentos tumorais de descarte do exame histopatológico. Os proprietários foram informados dos objetivos da pesquisa (Anexo A). O médico veterinário responsável preencheu a ficha clínica do animal (Anexo B) e os dados foram plotados em tabela para posterior correlação. O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto - FAMERP (Protocolo nº 001-005222/2010).

#### **2. Caracterização das amostras**

##### **2.1. Parâmetros clínicos**

Foram coletados fragmentos tumorais de 30 cadelas atendidas nas clínicas veterinárias de São José do Rio Preto e região durante os anos de 2011 e 2012, destes fragmentos, apenas 10 foram viáveis para o estudo.

Os fragmentos tumorais foram coletados para realização da técnica de imunohistoquímica, cultivo celular, PCR em tempo real e diagnóstico histopatológico, e estes foram classificados de acordo com Misdorp et al. (1999) pela AFIP (*Armed Forces Institute of Pathology*). Os parâmetros usados para estadiamento clínico estão de acordo com o sistema TNM (tamanho, envolvimento linfonodal, metástase) estabelecido pela Organização Mundial de Saúde (OMS) para tumores mamários caninos (CASSALI et al., 2010, modificado).

As cadelas foram avaliadas de acordo com as características físicas (idade e raça), patológicas (tempo de evolução tumoral – período relacionado ao aparecimento tumoral até a excisão cirúrgica, número de nódulos, tamanho tumoral, grau histológico, envolvimento linfonodal, estadiamento clínico, ulceração e vascularização) e com a evolução clínica (ocorrência de metástase, recidiva e óbito). Com relação ao estadiamento clínico (TNM) (OWEN, 1980) foi estabelecido o tamanho tumoral (T) - T1: < 3cm - T2: entre 3 e 5cm - T3: > 5cm; o envolvimento linfonodal (N) - N0: sem envolvimento aparente - N1: envolvimento unilateral - N2: envolvimento bilateral e presença de metástase à distância (M) - M0: sem metástases evidentes - M1: metástase à



distância incluindo linfonodos não regionais, sendo classificados como I, II, III ou IV de acordo com a extensão tumoral e estabelecimento do prognóstico.

A existência de recorrência tumoral e metástases, no momento da cirurgia, foram descritas e o acompanhamento permitiu a determinação do tempo de sobrevivência e o tempo livre da doença (tempo para a detecção de metástases e/ou recorrência).

## **2.2. Parâmetros histopatológicos**

Das 10 cadelas com idade variando de sete a 13 anos, cinco (50%) tinham mais que dez anos de idade. Houve prevalência de tumores malignos, representados por: dois (20%) carcinomas em tumor misto, quatro (40%) carcinomas túbulo-papilares, um carcinosarcoma (10%) e um carcinoma *in situ* (10%). As alterações benignas foram representadas por um (10%) tumor misto benigno e uma (10%) displasia de alto grau. Com relação ao tamanho tumoral, dois (20%) apresentaram classificação T1, um (10%) T2 e sete cadelas (70%) com classificação T3. Em relação ao envolvimento linfonodal, oito (80%) cadelas não apresentaram envolvimento e dois (20%) apresentaram linfonodo regional comprometido. Nove cadelas (90%) não apresentaram metástase no momento da cirurgia, enquanto uma (10%) apresentou metástase pulmonar. Três (30%) cadelas tiveram tempo de evolução de até seis meses e sete (70%) maior que seis meses. Duas (20%) cadelas incluídas no grupo já haviam sido operadas anteriormente e, portanto, o tumor retirado era recidiva. Quanto ao aspecto tumoral: nove (90%) tumores não apresentavam ulceração, enquanto um (10%) apresentou ulceração. A característica de vascularização tumoral foi observada em todos os tumores, sendo que três (30%) apresentaram vascularização abundante e sete (70%) vascularização moderada. Nesse estudo, dois (20%) tumores foram classificados com estadiamento clínico I, um (10%) com estadiamento clínico II, seis (60%) tumores com estadiamento clínico III e um (10%) com estadiamento clínico IV. Dentre as 10 cadelas do estudo, uma (10%) veio a óbito (Tabela 1).

Idade (anos)	Tempo de Evolução	Histopatológico	Receptor de Estrógeno (RE)				Número de nódulos	TNM	Estadiamento	Ulceração	Vascularização	Censura
			Metástase	Recidiva	Metástase	Recidiva						
<b>C1</b>	Até 6 meses	Carcinossarcoma	Positivo	Não	Sim	Único	T3N0M0	III	Não	Moderada	Viva	
<b>C2</b>	Mais de 6 meses	Carcinoma túbulo-papilar	Positivo	Não	Não	Múltiplos	T3N0M0	III	Não	Moderada	Viva	
<b>C3</b>	Mais de 6 meses	Displasia de alto grau	Positivo	Não	Não	Único	T3N0M0	III	Sim	Moderada	Viva	
<b>C4</b>	Mais de 6 meses	Carcinoma túbulo-papilar	Positivo	Não	Sim	Múltiplos	T2N0M0	II	Não	Abundante	Viva	
<b>C5</b>	Mais de 6 meses	Carcinoma túbulo-papilar	Negativo	Não	Não	Múltiplos	T3N2M0	IV	Não	Moderada	Viva	
<b>C6</b>	Até 6 meses	Carcinoma túbulo-papilar	Negativo	Não	Não	Múltiplos	T3N0M0	III	Não	Abundante	Viva	
<b>C7</b>	1 mês	Carcinoma mamário em tumor misto grau I	Negativo	Não	Não	Único	T1N0M0	I	Não	Moderada	Viva	
<b>C8</b>	Mais de 6 meses	Carcinoma in situ	Negativo	Não	Não	Múltiplos	T3N1Mx	III	Não	Abundante	Viva	
<b>C9</b>	Mais de 6 meses	Tumor misto benigno	Positivo	Não	Não	Único	T1N0M0	I	Não	Moderada	Viva	
<b>C10</b>	Mais de 6 meses	Carcinoma em tumor misto grau II	Negativo	Sim	Não	Múltiplos	T3N0M1	III	Não	Moderada	Viva	

### **3. Processamento das amostras**

No momento da cirurgia foram coletados fragmentos tumorais, que foram armazenados em tubos estéreis tipo Falcon, contendo: (1) formol 10% para posterior preparação histopatológica e avaliação imuno-histoquímica, (2) solução estabilizadora de RNA – RNAlater, para realização do PCR em tempo real e (3) meio de transporte, para cultivo celular.

### **4. Estudo imuno-histoquímico**

#### **4.1. Preparação dos fragmentos tumorais e confecção das lâminas**

Após a retirada do tumor, o preparo das lâminas envolveu as etapas de: Fixação: formol 10% seguido de álcool 70%; inclusão: pela desidratação em etanol com aumento progressivo da concentração, diafanização: xilol por 1 hora cada e impregnação: parafina.

Os fragmentos tumorais incluídos em parafina foram cortados para obter cortes histológicos de 3 µm de espessura.

As lâminas passaram pelo processo de desparafinização em xilol, seguida por hidratação em álcool absoluto I, II e III finalizando com seis mergulhos em água corrente. Para a coloração de núcleo as lâminas foram mergulhadas em Hematoxilina por 4 a 6 minutos e foram lavadas em água corrente (seis mergulhos). Em seguida as lâminas foram mergulhadas rapidamente em álcool 70%, lavadas com água corrente por 10 minutos e submetidas a seis mergulhos em álcool 80%. Para a coloração de citoplasma as lâminas permaneceram 30 segundos no corante Eosina. Em seguida o tecido foi desidratado em álcool 95% (seis mergulhos) e álcool absoluto I e II (seis mergulhos em cada) e clarificados em Xilol I, II e III (seis mergulhos em cada) finalizando com a montagem das lâminas.

#### **4.2. Procedimento imuno-histoquímico**

Os cortes do tecido emblocado foram preparados em lâminas previamente silanizadas e em seguida desparafinizados em xilol, reidratados em álcool em grau decrescente e incubadas com 3% de peróxido de hidrogênio por 30 minutos para o bloqueio da peroxidase endógena.

A recuperação antigênica foi realizada na panela a vapor com Tampão Citrato pH6<sup>1</sup> para cada anticorpo por 35 minutos, em seguida as lâminas foram encobertas por soro fetal bovino (SFB)<sup>2</sup> e incubadas com o anticorpo primário (Tabela 2).

Após o período de incubação, as lâminas foram lavadas com solução estéril (PBS)<sup>3</sup> por 15 minutos e incubadas com anticorpo secundário por 20 minutos e terciário por 10 minutos (Kit STARR TREK Universal HRP Detection – Medical Biocare®), seguido de lavagem com PBS por 15 minutos. A revelação foi feita com substrato cromógeno DAB (Medical Biocare®) de 2 a 5 minutos e a contra-coloração com hematoxilina de Harrys por 40 segundos. Montagem em meio Erv-mont (Erviagas). Os controles negativos da reação foram obtidos com omissão do anticorpo primário e os tecidos de rim humano e tumor de mama humano foram utilizados como controle positivo da reação de acordo com a bula dos anticorpos primários.

**Tabela 2.** Especificações dos anticorpos primários utilizados no procedimento imuno-histoquímico.

<b>Anticorpo</b>	<b>Especificidade</b>	<b>Clone</b>	<b>Diluição</b>	<b>Marca</b>
RE	Monoclonal (mouse)	1D5	1:150	Santa Cruz
RP	Monoclonal (rabbit)	SP42	1:400	Abcam
Her2/neu	Policlonal (rabbit)	C-18	1:800	Santa Cruz
Ki-67	Monoclonal (rabbit)	SP6	1:200	Biocare Medical
P53	Monoclonal (mouse)	FPS392	1:100	Santa Cruz

### 4.3. Quantificação da marcação Imuno-histoquímica

As lâminas foram fotografadas e as enzimas quantificadas pelo *software* ImageJ no aumento de 40X do microscópio Nikon Eclipse E200. Para cada amostra, foram selecionadas três regiões do tecido tumoral e 20 pontos das células tumorais foram marcados em cada região. Assim foram analisados 60 pontos diferentes de cada amostra, obtendo a média da intensidade relativa de imunorreatividade. Os valores foram obtidos em unidades arbitrárias (u.a.) e a densidade óptica média (M.O.D. *Mean*

<sup>1, 2, 3</sup> Os protocolos de preparo das soluções estão descritos no Apêndice A.

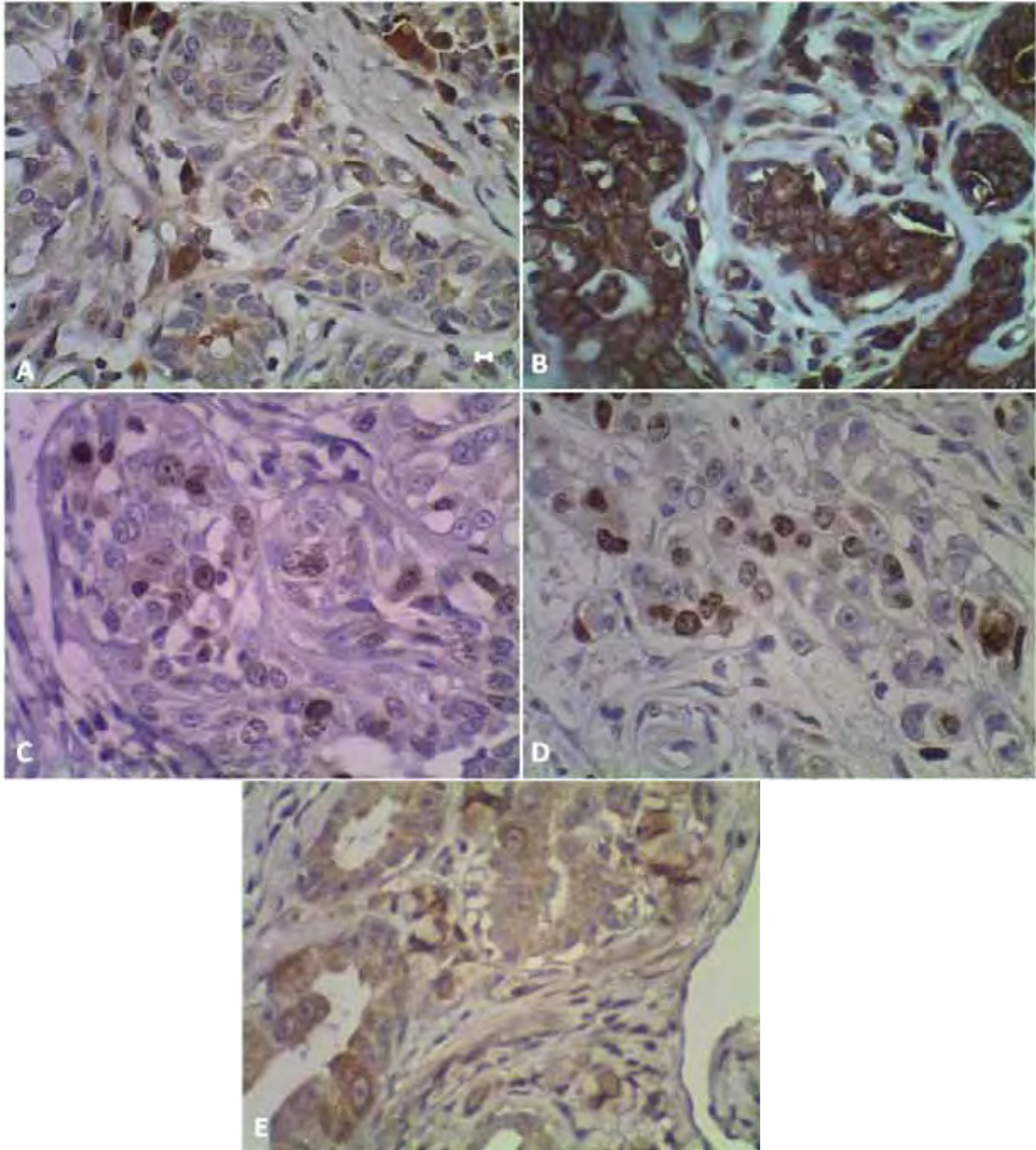
*Optical Density*) mostrou a intensidade da imunocoloração especificamente nas áreas imunorreativas.

Para o receptor de estrógeno (RE), os casos foram considerados positivos quando mais de 10% das células tumorais apresentaram marcação nuclear e citoplasmática (LI et al. 2010).

#### **4.4. Correlação entre a expressão dos marcadores prognósticos com as características clínicas e patológicas das cadelas**

O painel de marcadores prognósticos clássicos, analisado pela expressão imunohistoquímica do receptor de estrógeno (RE), receptor de progesterona (RP), HER-2 neu, p53 e o marcador de proliferação celular, Ki-67, foi previamente realizado para todas as cadelas (Figura 1).

Cinco dos 10 (50%) tumores avaliados foram positivos para o RE, com imunomarcação evidente no citoplasma das células neoplásicas (Figura 1). A imunomarcação do RP foi citoplasmática, e do Ki-67 e p53 foi evidente no núcleo das células neoplásicas enquanto o Her2/neu apresentou marcação de membrana nas células neoplásicas (Figura 1).



**Figura 1:** Fotomicrografia de procedimento imuno-histoquímico demonstrando a marcação dos anticorpos em tumor mamário de cadela. Nikon Eclipse E200, 40X. **A.** Imuno-coloração do RE (Displasia de alto grau). **B.** Imuno-coloração do Her2/neu (Carcinoma *in situ*). **C.** Imuno-coloração do p53 (Carcinoma *in situ*). **D.** Imuno-coloração do Ki-67 (Carcinossarcoma). **E.** Imuno-coloração do RP (Carcinoma túbulo-papilar).

Esses marcadores foram comparados com as características clínicas e patológicas e com a evolução clínica das cadelas, no entanto, não houve correlação

clínica entre a expressão do Receptor de Estrógeno (RE), Receptor de progesterona (RP), Her2/neu, Ki-67 e P53 com as características clínicas e patológicas das cadelas como idade, tempo de evolução, ulceração, vascularização, localização tumoral, censura, metástase, tamanho tumoral e comprometimento de linfonodos ( $p > 0,05$ ). Todos os fatores clínicos e patológicos estão descritos na Tabela 3.

**Tabela 3:** Distribuição das cadelas de acordo com as características clinico-patológicas e comparação da média da densitometria óptica referente à expressão protéica de RE, RP, Ki-67, p53 e Her2/neu.

Fatores Clínicos e Patológicos	Número de cadelas	Receptor de estrógeno (RE)	Receptor de progesterona (RP)	Ki-67	P53	Her2/neu
<b>Idade</b>						
≥ 10 anos	5 (50%)	160.9 ± 8.033	145.5 ± 4.925	139.3 ± 10.22	150.3 ± 4.821	172.9 ± 13.41
< 10 anos	5 (50%)	143.6 ± 10.99	152.5 ± 8.585	149.8 ± 9.514	163.4 ± 9.276	153.3 ± 16.36
p		<b>0,2394</b>	<b>0,5022</b>	<b>0,4749</b>	<b>0,2456</b>	<b>0,3823</b>
<b>Tempo de Evolução</b>						
Até 6 meses	3 (30%)	153.2 ± 16.73	149.7 ± 5.772	154.1 ± 5.850	154.5 ± 10.49	157.3 ± 30.12
Mais que 6 meses	7 (70%)	151.8 ± 8.121	148.7 ± 6.687	140.5 ± 9.228	157.8 ± 6.779	165.6 ± 10.14
p		<b>0,9333</b>	<b>0,9308</b>	<b>0,3895</b>	<b>0,7927</b>	<b>0,7405</b>
<b>Estadiamento Clínico</b>						
I e II	3 (30%)	155.0 ± 11.71	150.0 ± 9.801	145.6 ± 9.474	156.8 ± 11.97	186.1 ± 18.53
III e IV	7 (70%)	151.0 ± 9.254	148.5 ± 5.974	144.1 ± 9.296	156.8 ± 6.464	153.3 ± 11.53
p		<b>0,8099</b>	<b>0,8967</b>	<b>0,9246</b>	<b>0,9999</b>	<b>0,1627</b>
<b>Localização tumoral</b>						
Múltiplos	6 (60%)	150.5 ± 9.426	143.5 ± 7.169	138.3 ± 10.70	155.7 ± 7.431	159.2 ± 10.69
Únicos	4 (40%)	154.8 ± 12.05	157.3 ± 2.559	154.0 ± 3.443	158.5 ± 8.844	169.0 ± 22.80
p		<b>0,7816</b>	<b>0,1704</b>	<b>0,2827</b>	<b>0,8134</b>	<b>0,6712</b>
<b>Vascularização</b>						
Abundante	3 (30%)	158.7 ± 12.99	140.8 ± 6.279	148.0 ± 11.18	157.3 ± 8.680	165.5 ± 15.46
Moderada	7 (70%)	149.4 ± 8.811	152.5 ± 6.087	143.1 ± 8.959	156.6 ± 7.174	162.1 ± 14.18
p		<b>0,5766</b>	<b>0,2904</b>	<b>0,76</b>	<b>0,9583</b>	<b>0,89</b>

Valores apresentados em unidade arbitrária (u.a.) referentes à densidade óptica média (D.O.M.).

## **5. Cultivo celular**

### **5.1. Cultura primária de neoplasias mamárias de cadelas**

Inicialmente, todas as soluções foram retiradas da geladeira e colocadas em banho-maria até atingirem a temperatura de 37°C. Para toda a rotina foram seguidos criteriosamente os procedimentos de antissepsia da capela e das pipetas com álcool 70% e luz ultravioleta.

Em placa de petri, os fragmentos tumorais foram lavados em PBS contendo 1% de Penicilina/Estreptomicina, três vezes por 10 minutos cada. Em seguida, os tumores foram cortados com lâminas de bisturi, obtendo-se fragmentos menores denominados explantes. Estes explantes foram colocados em garrafas de poliestireno com filtro, com o auxílio de seringas de 1 mL. Sobre cada explante adicionou-se uma gota de meio de cultura e em seguida a garrafa foi acondicionada de forma invertida por 24 horas em estufa a 37°C. Após esse período as garrafas foram colocadas na posição normal e nos dias seguintes acrescentou-se meio de cultura, aumentando o volume inicial até que o meio fosse suficiente para cobrir totalmente os explantes (BOTELHO, C. F., 2009). As células tumorais mamárias de cadelas foram cultivadas em estufa a 37°C na presença de 5% de CO<sub>2</sub>, em meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagles Medium) suplementado com 20% de Soro Fetal Bovino, 1% de Penicilina/Estreptomicina/Fungizona, 200µl de hidrocortisona e 10µl EGF (Fator de Crescimento Epidermal). Quando as células atingiram 80-100% de confluência, foram submetidas à imunocitoquímica para confirmação da origem epitelial e após esta etapa, as células foram transferidas para a placa de 96 poços, para avaliação da viabilidade celular através do ensaio MTT após os tratamentos com melatonina.

### **5.2. Linhagem celular de câncer de mama**

As células procedentes das linhagens tumorais de câncer de mama humano, MCF-7 (receptor de estrógeno positivo) e MDA-MB-231 (receptor de estrógeno negativo) foram cultivadas em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, em meio de cultura DMEM (E) e DMEM com alta concentração de glicose, respectivamente, suplementados com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de Penicilina/Estreptomicina. Quando as células apresentaram 80-100% de confluência, foram transferidas para a placa de 96 poços para



a realização do tratamento com melatonina e posterior avaliação da viabilidade celular pelo ensaio MTT.

### **5.3. Manutenção das células in vitro**

O meio de cultura foi substituído a cada três dias para estimular o crescimento das células, oferecendo meio nutritivo e evitando o crescimento de contaminantes.

### **5.4. Tripsinização**

A tripsinização é uma etapa necessária para a passagem das células para as placas de 96 poços e para outras garrafas para a realização dos procedimentos posteriores.

O meio de cultura das garrafas foi descartado e o tapete celular lavado com 5 mL de PBS. Em seguida as células foram encobertas com 2 mL de tripsina e mantidas em estufa a 37° C não excedendo o tempo limite de 10 minutos. Durante esse período, as monocamadas foram monitoradas ao microscópio óptico invertido para verificar o desprendimento das células. Posteriormente, foram adicionados 2 mL de meio de cultura em cada garrafa e após homogeneização, a suspensão foi transferida para outros frascos de cultivo específicos e estas retornaram para estufa a 37°C.

### **5.5. Imunocitoquímica da cultura celular**

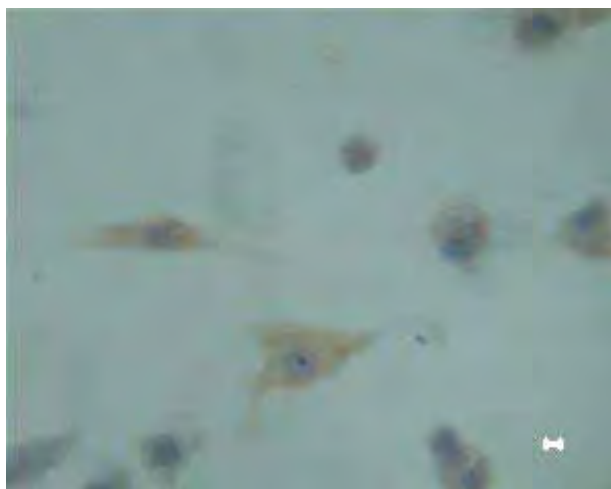
As células da cultura primária foram submetidas à imunocitoquímica para confirmação da origem epitelial, com o anticorpo anti-citoqueratina. Inicialmente as células em cultivo foram transferidas para uma lâmina com garrafa acoplada, onde foi adicionado o meio de cultura e incubadas em estufa a 37° C durante 24 horas.

As células foram lavadas com 1 mL de PBS e incubadas com 1mL de fixador formaldeído a 4% por 20 minutos. Em seguida a lâmina foi desacoplada da garrafa, lavada com 1 mL de PBS e colocada na posição vertical para secagem.

A recuperação antigênica foi realizada na panela a vapor a 95°C com tampão citrato por 35min. Em seguida, as células foram encobertas com soro fetal bovino (SFB) por 30 min e incubadas a 4°C por 24 horas com o anticorpo primário monoclonal anti-citoqueratina (Diluição 1:150, Dako) para marcação de células epiteliais. Após essa

etapa seguiram-se as mesmas etapas descritas anteriormente no procedimento imunohistoquímico (Página 16).

A imunocitoquímica demonstrou que as células epiteliais estavam presentes (positivo para citoqueratina) (Figura 2).



**Figura 2:** Fotomicrografia de cultivo celular de neoplasia mamária de cadelas demonstrando imunomarcagem positiva para citoqueratina.

### 5.6. Contagem e plaqueamento das células

Antes de iniciar o tratamento com melatonina, realizou-se a contagem das células e essas foram transferidas para placa de 96 poços. Para a transferência das células, todo o meio foi retirado da garrafa de cultura T-75 e adicionou-se 2 mL de tripsina por 3 minutos. Em seguida, a tripsina foi inativada com 4 mL de meio de cultura e o conteúdo transferido para um tubo de 15 mL e centrifugado a 3000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspendido em 10 mL de meio de cultura. Dessa solução, retirou-se 10  $\mu$ L, aos quais foram adicionados 80  $\mu$ L de meio de cultura e 10  $\mu$ L do corante Azul de Tripán para realizar a contagem das células na câmara de Neubauer. A contagem foi realizada nos quatro quadrantes laterais externos, e o resultado colocado na fórmula abaixo:

$$X = \frac{\text{n}^{\circ} \text{ de células contadas em cada quadrante} \times 10^4 \times \text{Fator de diluição}}{\text{Total de quadrantes contados}}$$

Em seguida, calculou-se, a quantidade de células a ser colocada na placa de 96 poços com 0,3 cm<sup>2</sup> por poço. O tratamento das células foi iniciado 24 horas após o plaqueamento.

### **5.7. Grupos e tratamentos**

Para o ensaio MTT, foram plaqueadas 1X10<sup>6</sup> células/poço e estas foram tratadas com diferentes concentrações de melatonina (Sigma®) (0,5mM, 1mM, 2mM, 5mM, 10mM). A melatonina foi diluída em etanol a 0,05% com uma concentração inicial de 50mM, e então diluída nas cinco concentrações. As células foram divididas em dois grupos: Um grupo foi utilizado como controle contendo apenas as células e o meio de cultura (Grupo I) e o outro grupo tratado com diferentes concentrações de melatonina (Grupo II). Os tratamentos foram realizados em triplicatas, com duração de 24 horas.

### **5.8. Ensaio MTT**

A viabilidade celular foi analisada por meio do ensaio colorimétrico MTT (3{4,5- dimetiliazol-2-il}-2,5difeniltetrazolium bromídeo) para avaliar as diferentes concentrações de melatonina.

Inicialmente, as soluções utilizadas para os tratamentos das células foram descartadas e adicionou-se 100 µL de meio de cultura em cada poço. Posteriormente, foram adicionados a cada poço 10 µL de solução MTT 12 nM do Vibrant MTT Cell Proliferation Assay Kit (Invitrogen Life Technologies) e a placa foi incubada por 4 horas a 37°C. Em seguida, foram removidos 50 µL do sobrenadante de cada poço e os cristais de formazan dissolvidos em 50 µL de dimetilsulfóxido 100% (DMSO). A placa foi então incubada novamente a 37°C por 10 minutos e as amostras misturadas antes da realização da leitura da absorbância determinada pelo leitor ELISA (Thermo Plate) sob comprimento de onda 540 nm.

A viabilidade celular relativa (%) de cada amostra foi calculada a partir da média dos valores de absorbância das triplicatas. Para o valor obtido no grupo controle (sem tratamento) foi atribuído 100% de viabilidade celular. Nos outros grupos o resultado foi calculado a partir da diferença em relação ao grupo controle.

## **6. Procedimento de biologia molecular**

### **6.1. Extração do RNA total das amostras**

O fragmento tumoral armazenado em tubo de polipropileno de 15 ml contendo solução estabilizadora de RNA - RNAlater foi cortado manualmente com uma navalha no tamanho de 100 mg e inserido em um tubo de polipropileno de 50 ml já contendo 1ml do reagente Trizol. O fragmento foi triturado com macerador (Politron®), em seguida, mais 1 ml de Trizol foi adicionado ao tubo, o resultado final de 2 ml do reagente Trizol com o fragmento tumoral triturado foi dividido em dois tubos eppendorfs (1 ml em cada tubo). Posteriormente, adicionou-se 0,2 ml de clorofórmio para cada 1 ml de Trizol, homogeneizando por inversão e mantendo a temperatura ambiente por 3 minutos; após centrifugação a 12.000g por 15 minutos a 4°C, a fase aquosa foi transferida para um tubo novo contendo 0,4 ml de álcool isopropílico. Após 15 minutos a temperatura ambiente, a amostra foi submetida a centrifugação por 15 minutos a 12.000g a 4°C. Descartou-se o sobrenadante e adicionou-se 1 ml de etanol 75%, centrifugando por 5 minutos a 7.500g a 4°C e descartando novamente o sobrenadante. Os tubos foram deixados sobre papel para escorrer até secar o *pellet*. Após esta etapa, adicionou-se 30µl de água DEPC (Amersham®) para diluir o pellet de RNA. A integridade e qualidade do RNA extraído foram analisadas através da concentração de absorbância no Nanodrop 2000C (Thermo Scientific®) a 260nm e 280nm.

### **6.2. Obtenção do cDNA**

A obtenção do cDNA (DNA complementar), foi realizada pela técnica de RT-PCR (*Reverse Transcriptase – Polymerase Chain Reaction*). Utilizou-se o Kit High Capacity cDNA (Applied Biosystems), calculando-se a quantidade dos reagentes conforme o número de amostras, sempre incluindo o volume referente às perdas que podem ocorrer durante a transferência dos reagentes.

Para cada amostra foram adicionados 10 µL de RNA na concentração de 1µg/µL e 10 µL de Mix, obtendo-se uma solução com volume final de 20 µL e concentração final de 100 ng de RNA. Estas foram colocadas no termociclador a 25°C por 10 minutos; 37°C por 120 minutos e 4°C.

### 6.3. Técnica de PCR quantitativo (q-PCR): análise da expressão gênica

A técnica de PCR quantitativa (qPCR) foi realizada de acordo com Bustin et al. 2009.

A reação de qPCR foi realizada em triplicata usando o método StepOne Plus Real Time PCR (Applied Biosystems) e TaqMan Universal Master Mix (Applied Biosystems), utilizando-se os iniciadores específicos para os genes responsáveis pela síntese do MT1 e MT2. Os genes normalizadores RPS19 e RPL8 foram utilizados como controles endógenos da reação, pois mostraram menor variação de amplificação entre amostras de tecido mamário neoplásico e normal, no qual foram testados também os genes HPRT1 e RPS5.

A tabela 4 mostra as sequências dos oligonucleotídeos iniciadores.

**Tabela 4:** Sequência dos oligonucleotídeos utilizados na técnica de PCR quantitativo para avaliar a expressão gênica relativa.

Gene	Sequência
<b>MT1</b>	Sense 5' - GGACTTGCACGACTAA - 3' Antisense - 3' CCGTACGTCAATTGAC - 5' Sonda Probe 5' - TTCGAACTGATCAT - 3'
<b>MT2</b>	Sense 5' - GGACTTGCACGACTAA - 3' Antisense 5' - CCGTACGTCAATTGAC - 3' Sonda Probe 5' - TTCGAACTGATCAT - 3'
<b>RPS19</b>	Sense 5' - CCT TCC TCA AAA AGT CTG GG - 3' Antisense 5' - GTT CTC ATC GTA GGG AGC AAG - 3' Sonda Probe 5' - CCC TGA ATG GGT GGA C - 3'
<b>RPL8</b>	Sense 5' - CCA TGA ATC CTG TGG AGC - 3' Antisense 5' - GTA GAG GGT TTG CCG ATG - 3'

Um fator importante a ser considerado em experimentos de PCR quantitativo é a eficiência de amplificação do gene de interesse e dos genes normalizadores, em função da concentração de RNA utilizado. Dessa forma, é possível extrair a expressão relativa do gene de interesse a partir dos resultados obtidos. Para esta verificação, foram realizadas diluições seriadas do *pool* de cDNA, sendo testadas as concentrações 100

pmols/ $\mu$ g, 10 pmols/ $\mu$ g, 1 pmols/ $\mu$ g, 0,1 pmols/ $\mu$ g e 0,01 pmols/ $\mu$ g, sendo estabelecida a concentração de 100 pmol/ $\mu$ L.

As amostras de cDNA nas concentrações citadas foram submetidas à amplificação por PCR quantitativo, sendo o teste realizado para cada gene.

O resultado da validação da eficiência é dado por um valor chamado *slope*, que corresponde à inclinação da reta obtida quando se analisa a variação do  $C_t$  (*Cycle threshold*) dos genes de interesse e dos genes normalizadores em função do Log de diferentes quantidades de cDNA. O  $C_t$  é o momento no qual o sistema de amplificação começa a detectar um aumento no sinal associado ao aumento exponencial do produto de PCR na fase linear da reação. As comparações de quantidades são feitas a partir dos valores dos  $C_t$ .

Os valores do *slope* foram padronizados refletindo uma eficiência de amplificação entre 95% e 105%. A eficiência de amplificação dos iniciadores específicos para os genes de interesse e normalizadores foram calculadas de acordo com a equação:  $E=10^{(-1/slope)}$ .

Após a etapa de padronização, foram realizadas as análises para verificar a expressão diferencial dos genes MT1 e MT2. O valor da expressão relativa dos genes de interesse foi determinado pelo método de quantificação em relação à média dos genes normalizadores (RPS19 e RPL8) utilizados como controle endógeno. As amostras foram testadas em triplicatas e, em todos os experimentos foram utilizados tecidos normais para calibração da reação.

As reações foram realizadas no equipamento Real-Time PCR System Step One Plus (Applied Biosystems) e compreenderam uma etapa inicial de 2 minutos a 50° C, seguida por desnaturação inicial de 10 minutos a 95° C. Em seguida, o programa continuou com 40 ciclos de 15 segundos a 95° C, 1 minuto a 60° C para anelamento dos iniciadores e extensão das cadeias, seguidos de 35 segundos a 65° C para coleta do sinal.

Dessa forma, a partir dos valores do  $C_t$  de cada amostra, foram calculadas as médias das triplicatas. Posteriormente, foi calculado o  $\Delta C_t$  a partir da subtração da média obtida para a sequência de interesse por aquela do controle endógeno. Para o cálculo do  $\Delta\Delta C_t$ , foi utilizado tecido normal (controle) como calibrador, sendo atribuído ao mesmo o valor de zero como resultado da subtração com seu próprio  $\Delta C_t$ .

Nas amostras tumorais, o resultado do  $\Delta\Delta C_t$  foi calculado a partir das diferenças dos valores de  $\Delta C_t$  de cada um deles em relação ao calibrador. Em seguida, foi calculado o  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ , ou seja, o  $(\Delta-\Delta C_t)^2$ . O valor da expressão relativa dos genes de interesse foi determinado com auxílio do software DataAssist 3.0 (Applied Biosystem).

Os genes foram classificados como subexpresso (amostras com Log10 abaixo de 0) e superexpresso (amostras com Log10 maior que 0).

## **7. Análise Estatística**

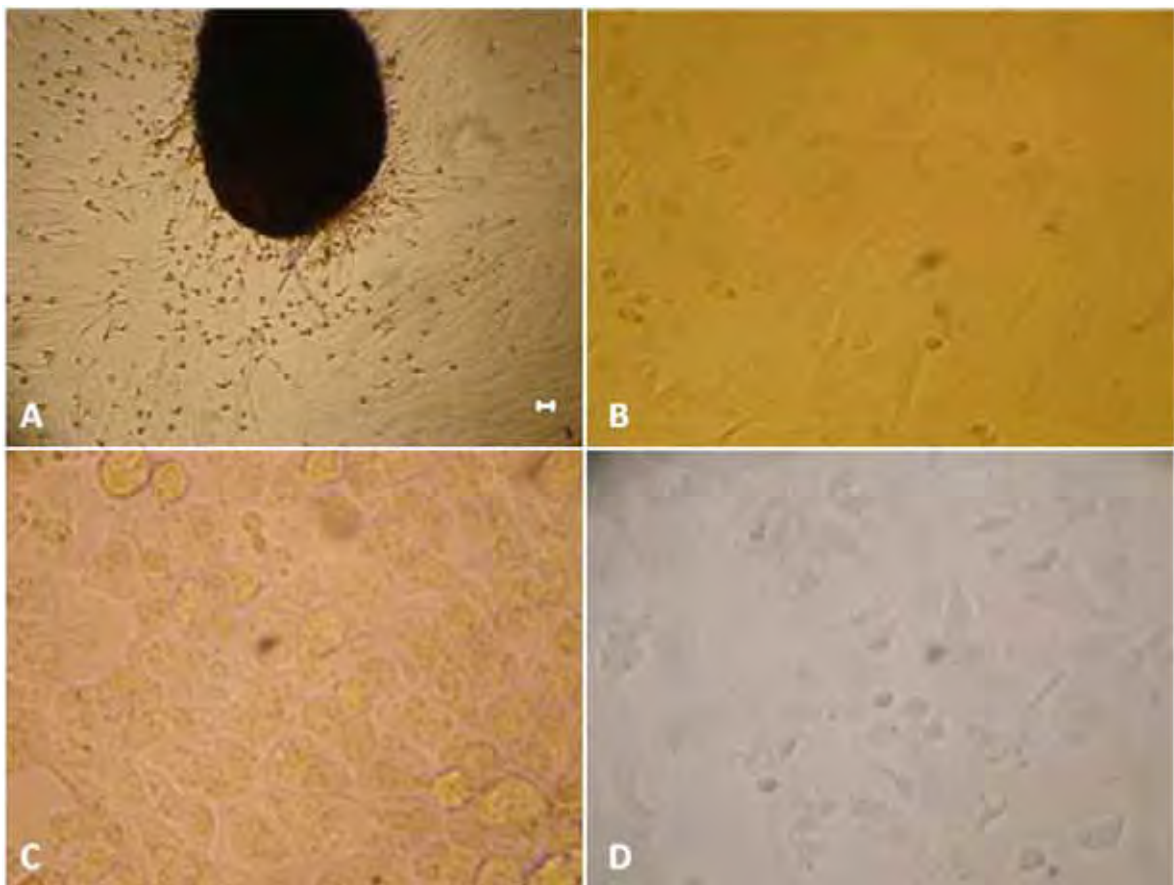
Os resultados foram submetidos previamente à análise descritiva para determinação da normalidade. Para amostras com distribuição normal foi utilizada a Análise de Variância (ANOVA), seguida de teste de Bonferroni. Foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis para amostras com distribuição não normal. Para todos os testes,  $p < 0.05$  foi considerado significativo. Foram utilizados o software GraphPad Prism4 e DataAssist 3.0 (Applied Biosystem).

## IV. RESULTADOS

### 1. Cultivo celular

As células da cultura primária de tumor de mama de cadelas demoraram de 5 a 10 dias para se soltarem do fragmento tumoral fixado na garrafa e apresentaram 80-100% de confluência em 15 dias (Figura 3).

Já as células da linhagem MDA-MB-231 atingiram 80-100% de confluência em 3 a 5 dias (Figura 3) e as células da linhagem MCF-7 apresentaram 80% de confluência em 5-6 dias (Figura 3).



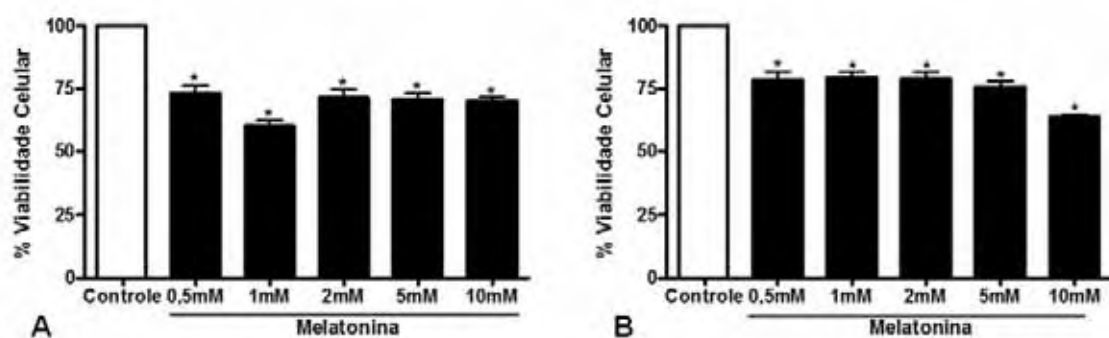
**Figura 3:** Fotomicrografia de cultivo primário de células tumorais de mama de cadela e de cultivo celular das linhagens de câncer de mama MCF-7 e MDA-MB-23. **(A)** Cultivo celular primário demonstrando as células se soltando do fragmento tumoral fixado na garrafa. **(B)** Células primárias aderidas na garrafa T-75 demonstrando 80-100% de confluência (400X). **(C)** Células MDA-MB-231 aderidas na garrafa T-75 demonstrando 80 - 100% de confluência (400x). **(D)** Células MCF-7 aderidas na garrafa T-75 demonstrando 80 - 100% de confluência (400x).



## 1.1. Ensaio MTT

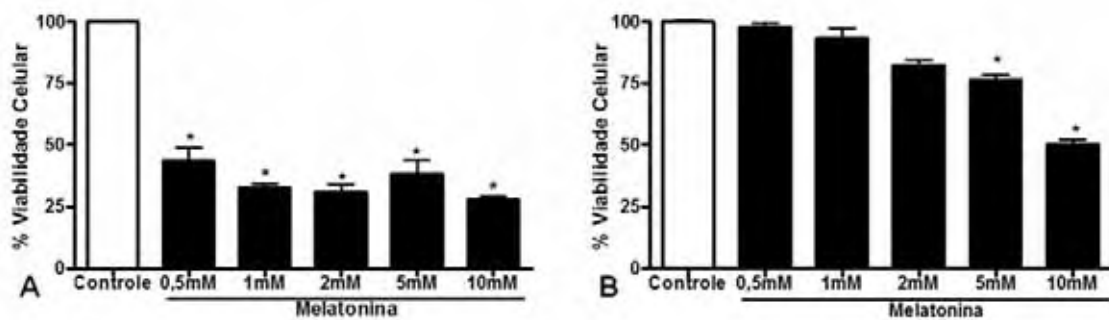
Os resultados para a cultura primária de neoplasias mamárias de cadelas estão na figura 4. E os resultados para as linhagens MDA-MB-231 e MCF-7 estão na figura 5.

Para as células neoplásicas da cultura primária de cadelas, observou-se que ambos os tumores RE+ e RE- apresentaram redução da viabilidade celular nas cinco concentrações de melatonina testadas, em relação ao controle ( $p < 0.05$ ). Nos tumores RE+, houve redução de 40% na viabilidade celular após o tratamento com 1mM de melatonina e o mesmo ocorreu com a concentração maior de melatonina (10mM) nos tumores RE- (Figura 4).



**Figura 4.** Avaliação da viabilidade das células da cultura primária de neoplasias mamárias de cadelas, tratadas com cinco concentrações diferentes de melatonina por 24 horas. A coluna branca representa o controle, sem tratamento. As colunas pretas correspondem às células tratadas com a concentração de melatonina indicada. Cada coluna corresponde à média  $\pm$  erro padrão das triplicatas. **A.** Cadelas RE+. **B.** Cadelas RE-. (\*) Valor significativo no teste ANOVA seguido de Bonferroni.

Para as linhagens celulares de câncer de mama, observou-se que as células da linhagem MCF-7 (receptor de estrogênio positivo) diminuí significativamente a viabilidade celular após o tratamento com melatonina nas cinco concentrações avaliadas em relação ao controle (sem tratamento) ( $p < 0,05$ ; Figura 5), sendo que 10mM de melatonina reduziu em 63% a viabilidade celular. Nas células da linhagem MDA-MB-231 (receptor de estrogênio negativo) os resultados mostraram redução significativa da viabilidade celular dos grupos tratados com 5mM e 10mM de melatonina em relação ao controle, a concentração de 10 mM de melatonina foi capaz de reduzir em 50% a viabilidade celular ( $p < 0,05$ ; Figura 5).



**Figura 5.** Avaliação da viabilidade das células das linhagens MCF -7 e MDA-MB-231 tratadas com cinco concentrações diferentes de melatonina por 24 horas. A coluna branca representa nenhum tratamento. As colunas pretas correspondem às células tratadas com a concentração de melatonina indicada. Cada coluna corresponde à média  $\pm$  erro padrão das triplicatas. **A.** Linhagem celular MCF-7. **B.** Linhagem celular MDA-MB-231. (\*) Valor significativo no teste ANOVA seguido de Bonferroni.

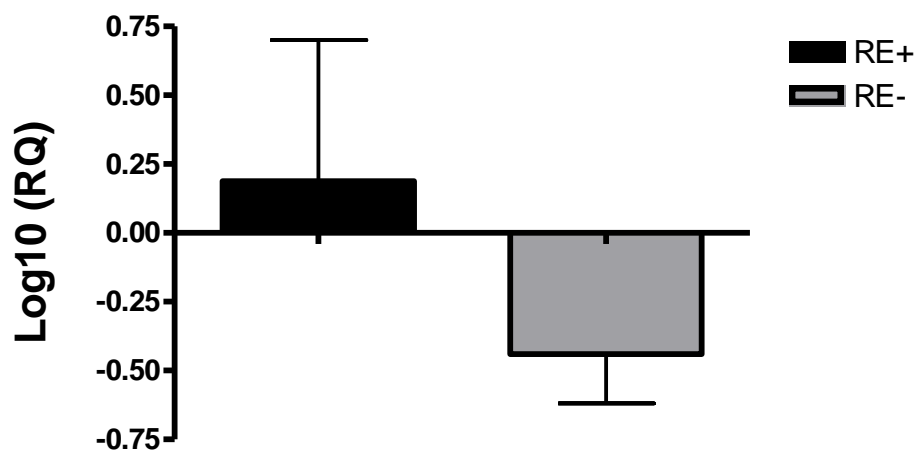
## 2. PCR em Tempo Real (qPCR)

O valor de RQ (*relative quantitation*) para o grupo controle (utilizado como calibrador) foi estabelecido como 1.0 e demonstrado em escala de log10 como zero.

Os resultados de expressão gênica mostraram diferenças nas expressões para cada gene estudado conforme descrição individual que se segue:

### 2.1. MT1

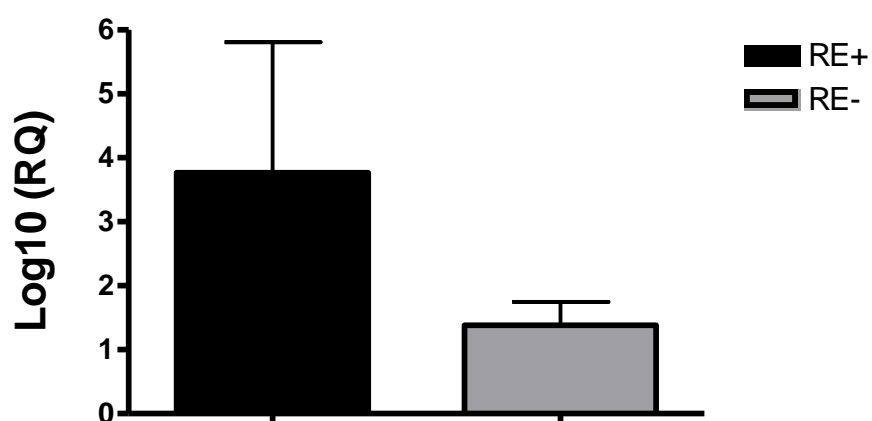
O MT1 apresentou-se superexpresso nos tumores RE+ das cadelas e subexpresso nos tumores RE-. No entanto, essa diferença não foi estatisticamente significativa ( $p > 0,05$ ; Figura 6).



**Figura 6:** Expressão do gene MT1 nos tumores de mama de cadelas RE+ e RE- em relação ao tecido normal (representada como zero). Valor da expressão gênica em log10.

## 2.2. MT2

O MT2 apresentou-se superexpresso nos tumores RE+ e para os tumores RE- não houve diferença entre a expressão do MT2, quando comparado com o tecido normal. Da mesma forma, a diferença não foi estatisticamente significativa ( $p > 0,05$ ; Figura 7).



**Figura 7.** Expressão do gene MT2 nos tumores de mama de cadelas RE+ e RE- em relação ao tecido normal (representada como zero). Valor da expressão gênica em log10.

## V. DISCUSSÃO

Muitos estudos buscam individualizar o comportamento dos carcinomas de mama através de características próprias do tumor, tentando assim prever se a neoplasia responderá ou não ao tratamento proposto (HAMILTON & HORTOBAGYI, 2005; WINER et al., 2008). O status dos receptores hormonais, receptor de estrogênio (RE) e receptor de progesterona (RP), permitem que se estabeleça um tratamento mais individualizado na paciente com câncer de mama (HSIAO et al., 2010).

No entanto, devido ao alto índice de mortalidade do câncer de mama, é extremamente importante a identificação de agentes terapêuticos que possam ser utilizados no tratamento alternativo para esta classe tumoral. A melatonina, um hormônio natural produzido pela glândula pineal, parece exercer um papel importante na inibição do crescimento tumoral (MAGANHIN et al., 2008; LUCHETTI et al., 2010). Devido às muitas semelhanças compartilhadas por humanos e cães, tumores mamários caninos são um excelente modelo experimental (SCHNEIDER et al., 1970; MOTTOLESE et al., 1994; PHILLIPS et al., 2010).

Dessa forma, o presente trabalho avaliou a expressão do receptor de estrogênio em cadelas com neoplasia mamária em um estudo imuno-histoquímico, correlacionando com a resposta celular à melatonina. Nossos resultados demonstraram que o tratamento com melatonina reduziu significativamente a viabilidade celular em ambos os tumores mamários de cadelas (RE+ e RE-), apresentando maior eficácia em tumores RE+. Com relação às linhagens, a melatonina foi capaz de reduzir a viabilidade celular em todas as concentrações analisadas. No entanto, o tratamento com melatonina foi mais efetivo para a linhagem MCF-7 (RE+) em comparação com a linhagem MDA-MB-231 (RE-).

A ação antitumoral da melatonina tem sido relatada, tanto em estudos com linhagem celulares de câncer de mama, como em ratos com câncer de mama induzido quimicamente (ECK et al. 1998; COS et al. 2002; YUAN et al. 2002; MAO et al. 2010; MIRUNALINI et al. 2010; PROIETTI et al. 2012). Sugere-se que a melatonina exerça suas propriedades antitumorais principalmente pela ativação da apoptose, inibição da proliferação e diferenciação celular (PROIETTI et al. 2012). Um mecanismo proposto foi a capacidade da melatonina em inibir os hormônios percussores da produção ovariana de estradiol, reduzindo assim, a resposta mitogênica das células em tumores de mama estrogênio dependentes (NETO & SCALDAFERRI, 2004).

Sabe-se que as ações antiproliferativas da melatonina são em parte, mediadas pela supressão da transcrição do gene RE em células MCF-7 (MOLIS et al. 1994). Rato et al. (1999) observaram que células MCF-7 estimuladas com estradiol apresentaram uma alta atividade de ligação ao RE, a qual foi prevenida pelo tratamento com melatonina, supondo sua atuação na inibição da via de sinalização do estrógeno.

De acordo com nossos resultados, outros autores também demonstraram que a melatonina inibe a proliferação de células de câncer de mama RE+ (MCF-7) (ECK et al., 1998; COS et al., 2002; YUAN et al., 2002; MAO et al., 2010), mas o mesmo não ocorre nas células RE- (MDA-MB-231) (ECK et al., 1998; YUAN et al., 2002). Similarmente, Hill et al. (2011) utilizando linhagens de câncer de mama humano demonstraram que o tratamento foi capaz de inibir a proliferação nas células RE+ (MCF-7, T47D, ZR-75-1), mas não nas células RE- (MDA-MB-231, MDA-MB-330 e BT-20), com exceção da linhagem RE- MDA-MB-468. Além disso, Eck et al. (1998) demonstraram que o tratamento conjunto de melatonina e ácido *all-trans-retinóico in vitro*, inibiu o crescimento das células MCF-7 e não apresentou efeito satisfatório para as células MDA-MB-231, sugerindo a utilização desse tratamento apenas para os tumores mamários dependentes de estrógeno.

Dessa forma, a resposta celular a melatonina encontrada neste estudo, teve relação com tumores RE+ e está de acordo com a literatura, pois a melatonina atua na regulação da expressão dos receptores de estrógeno e na modulação de enzimas envolvidas na síntese local de estrogênios (SANCHEZ-BARCELO et al., 2012).

Além disso, outras vias de ação da melatonina foram descritas. Cos et al. (2002) demonstraram que o tratamento com melatonina, aumentou a expressão das proteínas p53 e p21, sugerindo que esse tratamento inibe a proliferação celular através do controle do ciclo celular. Outros autores também demonstraram que o tratamento com melatonina induziu a apoptose em células MCF-7, levando a diminuição da expressão do RE e da proteína anti-apoptótica Bcl-2 e ao aumento da expressão da proteína pró-apoptótica Bax (ECK et al., 1998; MAO et al., 2010). Ao contrário, COS et al. (2002) demonstraram que o tratamento com melatonina não alterou a os níveis de RNAm do Bax e do Bcl-2, e portanto não atua significativamente na apoptose celular nas células MCF-7.

Sugere-se também que as ações oncostáticas e anti-invasivas da melatonina são mediadas através do receptor de melatonina MT1, a melatonina se liga aos receptores de alta afinidade ligados à proteína G, MT1 e MT2, reduzindo a proliferação celular e

induzindo a diferenciação (GRANT et al., 2009; OPREA-ILIES et al., 2013). Além disso, a expressão do receptor MT1 está correlacionada positivamente com a expressão do receptor de estrógeno (LAI et al., 2009). Por meio da ativação do seu receptor MT1, a melatonina pode suprimir o desenvolvimento de câncer através de um largo espectro de mecanismos com e sem o envolvimento de RE (OPREA-ILIES et al., 2013).

Dessa forma, no presente estudo, a expressão dos receptores MT1 e MT2 nos tumores mamários de cadelas foi avaliada por PCR em tempo real. Além disso, a expressão destes receptores foi comparada com a expressão do RE e com a resposta celular à melatonina. Nossos resultados mostraram que tumores RE+ apresentaram alta expressão dos receptores MT1 e MT2, e estes quando tratados com melatonina, apresentaram uma maior redução da viabilidade celular. Diversos autores também demonstraram que a superexpressão do receptor de melatonina MT1 em linhagens de câncer de mama humano pode aumentar significativamente a resposta inibitória das células tumorais estrógeno-dependentes após o tratamento com melatonina (COLLINS et al., 2003; YUAN et al., 2002; HILL et al., 2011; GONZÁLES et al., 2007). Da mesma forma, Jablonska et al. (2012) utilizando células de carcinoma mamário humano ductal invasivo, verificaram uma alta expressão do receptor MT1 nos tumores RE+ e uma baixa expressão nos tumores RE-. Neste mesmo estudo, os autores também verificaram uma alta expressão do receptor de melatonina MT1 em linhagem de câncer de mama humano MCF-7 (RE+) e uma baixa expressão deste receptor em linhagem de câncer de mama humano MDA-MB-231 (RE-). Similarmente, Lai et al. (2009) encontraram alta expressão do receptor MT1 em linhagem celular de câncer de mama RE+ (MCF-7) e baixa expressão desse receptor em linhagem RE- (MDA-MB-231); no entanto, ambas as linhagens não expressaram o receptor MT2. Além disso, Ram et al. (1998) demonstraram uma correlação positiva entre o receptor MT1 e a expressão do RE- $\alpha$  em mulheres com câncer de mama. Ao contrário, Yuan et al. (2002) demonstraram que tanto a linhagem MCF-7 como a MDA-MB-231 apresentaram alta expressão do receptor MT1.

O câncer de mama representa uma das neoplasias com maior índice de mortalidade, dessa forma, novas abordagens terapêuticas são necessárias para tornar o tratamento mais efetivo. Por meio do presente trabalho foi possível verificar a ação da melatonina tanto em cultura primária de células de câncer de mama canino, como em linhagens de câncer de mama humano. Dessa forma, verificou-se que os resultados encontrados nos tumores de mama de cadelas foram similares aos observados nas

linhagens humanas, corroborando os dados da literatura que os tumores mamários caninos são um excelente modelo experimento em câncer de mama.

Nossos resultados também demonstram que a melatonina é capaz de reduzir a viabilidade das células mamárias tumorais, sendo essa redução mais notória em células RE+ e com expressão dos receptores MT1 e MT2. Dessa forma, tumores RE+ com alta expressão dos receptores MT1 e MT2 respondem melhor ao tratamento com melatonina, ou seja, o tratamento com melatonina em tumores com esse perfil teria eficiente efeito oncostático. Assim, novos estudos que avaliem a ação da melatonina em células de câncer de mama se tornam de grande interesse, a fim de confirmar o seu potencial uso como agente terapêutico no tratamento do câncer.

## VI. CONCLUSÕES

O presente trabalho permitiu estabelecer as seguintes conclusões:

- Os tumores de mama de cadelas positivos para o receptor de estrógeno (RE+) apresentaram uma maior redução da viabilidade quando tratados com melatonina em comparação com os tumores RE-.
- Através da técnica de q-PCR, verificou-se uma alta expressão dos receptores de melatonina MT1 e MT2 em tumores mamários de cadelas RE+. Além disso, o tratamento com melatonina nestes tumores apresentou eficiente efeito oncostático, inibindo a viabilidade celular.
- O tratamento com melatonina diminuiu a viabilidade das células neoplásicas mamárias de cadelas, tratadas em cultivo primário, sendo mais eficaz em tumores RE+. A melatonina também diminuiu a viabilidade das células das linhagens de câncer de mama humano, MCF-7 (RE+) e MDA-MB-231 (RE-), no entanto, o tratamento foi mais eficaz para a linhagem RE+.



## VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVAREZ-GARCÍA, V.; GONZÁLEZ, A.; ALONSO-GONZÁLEZ, C.; MARTÍNEZ-CAMPA, C.; COS, S. Regulation of vascular endothelial growth factor by melatonin in human breast cancer cells. **Journal of Pineal Research.**, doi: 10.1111/jpi.12007, 2012.

ANDRADE, F. H.; FIGUEIROA, F. C.; BERSANO, P. R.; BISSACOT, D. Z.; ROCHA, N. S. Malignant mammary tumor in female dogs: environmental contaminants. **Diagn Pathol.**, v. 5, p. 45, 2010.

BASU, S. et al. Comparison of triple-negative and estrogen receptor-positive/progesterone receptor-positive/HER2-negative breast carcinoma using quantitative fluorine-18 fluorodeoxyglucose/positron emission tomography imaging parameters: a potentially useful method for disease characterization. **Cancer**, v. 112, n. 5, p. 995-1000, 2008.

BLASK, D. E.; HILL, S. M.; ROBERT T. DAUCHY, R. T.; XIANG, S.; YUAN, L.; DUPLESSIS, T.; MAO, L.; DAUCHY, E.; SAUER, L. A. Circadian regulation of molecular, dietary, and metabolic signaling mechanisms of human breast cancer growth by the nocturnal melatonin signal and the consequences of its disruption by light at night. **Journal of Pineal Research.**, v. 51, p. 259-269.

BODEY, B. The significance of immunohistochemistry in the diagnosis and therapy of neoplasms. **Expert Opin Biol Ther.**, v. 2, n. 4, p. 371-93, 2002.

BOTELHO, C. F. Estudo histológico, imuno-histoquímico e de cultura de células de tecidos normais e cancerosas da mama humana e canina. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2009. Dissertação (Mestrado), Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, Viçosa, Minas Gerais, 2009.

BRODEY, R. S.; GOLDSCHMIDT, M. H.; ROSZEL, J. R. Canine Mammary Gland Neoplasms. **Journal of Am An Hosp Ass.**, v. 19, p. 61-89, 1983.

CAPITELLI, C. S. Efeito da melatonina em modelo animal de Parkinsonismo induzido pelo MPTP. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 2007. Dissertação (Mestrado), Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Curitiba, Paraná, 2007.

CARRILLO-VICO, A.J.R.; CALVO, P.; ABREU, P.J.; LARDONE, S.; GARCÍA-MAURINˆO, R.J.; GUERRERO, J.M. Evidence of melatonin synthesis by human lymphocytes and its physiological significance: possible role as intracrine, autocrine, and/or paracrine substance. **FASEB J.**, v.18, p.537–539, 2004.

CHEKHUN, V. F. et al. Expression of drug resistance proteins in triple-receptor-negative tumors as the basis of individualized therapy of the breast cancer patients. **Esp. Oncol.**, v. 31, n. 2, p. 123-4, 2009.

CLAUSTRAT, B.; BRUN, J.; CHAZOT, G. The basic physiology and pathophysiology of melatonin. **Sleep Med Rev.**, v. 9, p. 11-24, 2005.

COLLINS, A.; YUAN, L.; KIEFER, T. L.; CHENG, Q.; LAI, L.; HILL, S. M. Overexpression of the MT1 melatonin receptor in MCF-7 human breast cancer cells inhibits mammary tumor formation in nude mice. **Cancer Lett.**, v. 189, n. 1, p. 49-57, 2003.

COS, S.; MEDIAVILLA, M. D.; FERNÁNDEZ, R.; GONZÁLEZ-LAMUÑO, D.; SÁNCHEZ-BARCELÓ, E. J. Does melatonin induce apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells in vitro? **J Pineal Res.**, v. 32 n. 2, p. 90-6, 2002.

DANIELCZYK, K.; DZIEGIEL, P. MT1 melatonin receptors and their role in the oncostatic action of melatonin. **Postepy Hig Med Dosw (Online)**, v. 63, p. 425-34, 2009.

DE LAS MULAS, J. M.; MILLÁN, Y.; DIOS, R. A prospective analysis of immunohistochemically determined estrogen receptor alpha and progesterone receptor expression and host and tumor factors as predictors of disease-free period in mammary tumors of the dog. **Vet Pathol.**, v.42, n.2, 2005.

DUFFY, M. J.; O'DONOVAN, N.; CROWN, J. Use of molecular markers for predicting therapy response in cancer patients. **Cancer Treat Rev.**, v. 37, n. 2, p. 151-59, 2010.

DUFFY, M.J. Predictive Markers in Breast and Other Cancers: A Review. **Clinical Chemistry**, v.51, n.3, p.494-503, 2005.

ECK, K. M.; YUAN, L.; DUFFY, L.; RAM, P. T.; AYETTEY, S.; CHEN, I.; COHN, C. S.; REED, J. C.; HILL, S. M. A sequential treatment regimen with melatonin and all-trans retinoic acid induces apoptosis in MCF-7 tumour cells. **Br J Cancer.**, v. 77, n. 12, p. 2129-37, 1998.

FERNANDES, R.C. et al. Coordinated expression of ER, PR and HER2 define different prognostic subtypes among poorly differentiated breast carcinomas. **Histopathology**, v. 55, n. 3, p. 346-52, 2009.

GARCÍA-NAVARRO, A.; GONZÁLEZ-PUGA, C.; ESCAMES, G.; LÓPEZ, L. C.; LÓPEZ, A.; LÓPEZ- CANTARERO, M.; CAMACHO, E.; ESPINOSA, A.; GALLO, M. A.; ACUÑA-CASTROVIEJO, D. Cellular mechanisms involved in the melatonin inhibition of HT-29 human colon cancer cell proliferation in culture. n. 43, p. 195-205, 2007.

GONZALEZ-ÂNGULO, A. M.; MORAES-VASQUEZ, F.; HORTOBAGYL, G. N. Overview of resistance to systemic therapy in patients with breast cancer. **Adv Exp Med Biol.**, v. 608, p. 1-22, 2007.

GRALOW, J. et al. Clinical cancer advances 2007: major research advances in cancer treatment, prevention, and screening. A report from the American Society of Clinical Oncology. **J Clin Oncol.**, v. 26, n. 2, p. 313-325, 2008.

GRANT, S. G.; MELAN, M. A.; LATIMER, J. J.; WITT-ENDERBY, P. A. Melatonin and breast cancer: cellular mechanisms, clinical studies and future perspectives. **Expert Rev Mol Med.**, v. 5, n. 11, 2009.

HAMILTON, A., HORTOBAGYI, G. Chemotherapy: what progress in the last 5 years? **Journal of Clinical Oncology.**, v. 23, p. 1760-75, 2005.

HARDELAND, R. Neurobiology, Pathophysiology, and Treatment of Melatonin Deficiency and Dysfunction. **The ScientificWorld Journal.**, 2012.

HARDELAND, R.; PANDI-PERUMAL, S. R.; CARDINALI, D. P. Melatonin. **Int. J. Biochem.**, v. 38, p. 313-316, 2006.

HICKS, D. G.; KULKARNI, S. Trastuzumab as adjuvant therapy for early breast cancer. **Arch Pathol Lab Med.**, v. 132, p. 1008-1015, 2008.

HILL, S. M.; BLASK, D. E.; XIANG, S.; YUAN, L.; MAO, L.; DAUCHY, R. T.; DAUCHY, E. M., FRASCH, T.; DUPLESIS, T. Melatonin and associated signaling pathways that control normal breast epithelium and breast cancer. **J Mammary Gland Biol Neoplasia.**, v. 16, n. 3, p. 235-45, 2011.

HISSA1, M. N.; LIMA, G. G.; SIMÕES, J. C.; NUNES, R. T. L. Melatonina e a glândula pineal. **Revista eletrônica Pesquisa médica.**, v. 2, n. 4, p. 1-10, 2008.

HÖPKER, K.; REINHARDT, H. C. [p53-regulating pathways as targets for personalized cancer therapy]. **Dtsch Med Wochenschr.**, v. 138, n. 3, p. 82-86, 2013.

HSIAO, Y. H., CHOU, M. C., FOWLER, C., MASON, J. T., MAN, Y. G. Breast cancer heterogeneity: mechanisms, proofs, and implications. **Journal of Cancer.**, v. 1, p. 6-13, 2010.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). Estimativas da incidência e mortalidade por câncer no Brasil. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde, 2012.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). Estimativas da incidência e mortalidade por câncer no Brasil. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde, 2010.

JABLONSKA, K.; PULA, B.; ZEMLA, A.; OWCZAREK, T.; WOJNAR, A.; RYS, J.; AMBICKA, A.; PODHORSKA-OKOLOW, M.; UGORSKI, M.; DZIEGIEL, P. Expression of melatonin receptor MT1 in cells of human invasive ductal breast carcinoma. **J Pineal Res.**, 2012. doi: 10.1111/jpi.12032.

JUNG B, AHMAD N. Melatonin in cancer management: progress and promise. **Cancer Res.**, v. 66, p. 9789–93, 2006.

KACZOR, T. An Overview of Melatonin and Breast Cancer. **Natural Medicine Journal.**, v. 2, n. 2, 2010.

KORF, H. W.; SCHOMERUS, C. The pineal organ, its hormone melatonin, and the photoneuroendocrine system. **Adv Anat Embryol Cell Biol.**, v. 146, p. 1-100, 1998.

LAI, L.; YUAN, L.; CHENG, Q.; DONG, C.; MAO, L.; HILL, S. M. Alteration of the MT1 melatonin receptor gene and its expression in primary human breast tumors and breast cancer cell lines. **Breast Cancer Res Treat.**, v. 118, p. 293–305, 2009.

LIU, R.; FU, A.; AARON E HOFFMAN; ZHENG, T., ZHU, Y. Melatonin enhances DNA repair capacity possibly by affecting genes involved in DNA damage responsive pathways. **BMC Cell Biology.**, v.14, n.1, 2013.

LUCHETTI, F.; CANONICO, B.; BETTI, M.; ARCANGELETTI, M.; PILOLLI, F.; PIRODDI, M.; CANESI, L.; PAPA, S.; GALLI, F. Melatonin signaling and cell protection function. **The Faseb Journal.**, v. 24, p. 3603 – 24, 2010.

LUPORSI, E.; ANDRÉ, F.; SPYRATOS, F.; MARTIN, P. M.; JACQUEMIER, J.; PENAULT-LLORCA, F.; TUBIANA-MATHIEU, N.; SIGAL-ZAFRANI, B.; ARNOULD, L.; GOMPEL, A.; EGELE, C.; POULET, B.; CLOUGH, K. B.; CROUET, H.; FOURQUET, A.; LEFRANC, J. P.; MATHELIN, C.; ROUYER, N.; SERIN, D.; SPIELMANN, M.; HAUGH, M.; CHENARD, M. P.; BRAIN, E.; DE CREMOUX, P.; BELLOCQ, J. P. Ki-67: level of evidence and methodological considerations for its role in the clinical management of breast cancer: analytical and critical review. **Breast Cancer Res Treat.**, v. 132, n. 3, p. 895-915, 2012.

MacEWEN, E.G. Spontaneous tumors in dogs and cats: Models for the study of cancer biology and treatment. **Cancer and Metastases Review.**, v. 9, n. 1, p. 125-136, 1990.

MAGANHIN, C. C.; CARBONEL, A. A. F.; HATTY, J. H.; FUCHS, L. F. P.; OLIVEIRA-JÚNIOR, I. S.; SIMÕES, M. J.; SIMÕES, R. S.; BARACAT, E. C.; SOARES-JR, J. M. Efeitos da melatonina no sistema genital feminino: breve revisão. **Revista da Associação Médica Brasileira.**, v. 54, n. 3, p. 267-71, 2008.

MANUALI, E.; DE GIUSEPPE, A.; FELIZIANI, F.; FORTI, K.; CASCIARI, C.; MARCHESI, M. C.; PACIFICO, E.; PAWŁOWSKI, K. M.; MAJCHRZAK, K.; KRÓL, M. CA 15-3 cell lines and tissue expression in canine mammary cancer and the correlation between serum levels and tumour histological grade. **BMC Veterinary Research.**, v. 86, 2012.

MARTIN, V.; HERRERA, F.; CARRERA-GONZALEZ, P. Intracellular signaling pathways involved in the cell growth inhibition of glioma cells by melatonin. **Cancer Res.**, v. 66, p. 1081–8, 2006.

MAO, L.; CHENG, Q.; GUARDIOLA-LEMAÎTRE, B.; SCHUSTER-KLEIN, C.; DONG, C.; LAI, L.; HILL, S.M. In vitro and in vivo antitumor activity of melatonin receptor agonists. **J Pineal Res.**, v. 49, n. 3, p. 210-21, 2010.

MEDIAVILLA, M. D., COS, S., SÁNCHEZ-BARCELÓ, E. J. Melatonin increases p53 and p21WAF1 expression in MCF-7 human breast cancer cells *in vitro*. **Life Sciences.**, v. 65, n. 4, p. 415-420, 1999.

MIRUNALINI, S.; KARTHISHWARAN K.; DHAMODHARAN G.; SHALINI, M. Studies on the Chemopreventive Potential of Melatonin on 7,12-dimethylbenz(a)anthracene Induced Mammary Carcinogenesis in Rats. **Journal of Applied Sciences Research.**, v. 6, n. 3, p. 254-253, 2010.

MOLIS, T. M.; SPRIGGS, L. L.; HILL, S. M. Modulation of estrogen receptor mRNA expression by melatonin in MCF-7 human breast cancer cells. **Molecular Endocrinology.**, v. 8, n. 12, p. 1681–1690, 1994.

MORGAN, P. J.; BARRETT, P.; HOWELL, H. E.; HELLIWELL, R. Melatonin receptors: localization, molecular pharmacology and physiological significance. **Neurochem. Int.**, v. 24, n. 2, p. 101–46, 1994.

MOTTOLLESE, M.; MORELLI, L.; AGRIMI, U.; BENEVOLO, M.; SCIARRETTA, F.; ANTONUCCI, G.; NATALI, G.N. Spontaneous Canine Mammary Tumors – A Model for Monoclonal Antibody Diagnosis and Treatment of Human Breast Cancer. **Laboratory Investigation.**, v. 71, n. 2, p. 182, 1994.

MUHLBAUER, E.; ALBRECHT, E.; BAZWINSKY-WUTSCHKE, I.; PESCHKE, E. Melatonin influences insulin secretion primarily via MT1 receptors in rat insulinoma cells (INS-1) and mouse pancreatic islets. **Journal of Pineal Research.**, v. 52, p. 446-459, 2012.

NAHLEH, Z.; PRUEMER, J.; LAFOLLETTE, J.; SWEANY, S. Melatonin, a promising role in taxane-related neuropathy. **Clin Med Insights Oncol.**, v. 4, p. 35-41, 2010.

NETO, J. A. S.; SCALDAFERRI, P. M. Melatonina e câncer – revisão da literatura. **Revista Brasileira de Cancerologia.**, v. 51, n. 1, p. 49-58, 2005.

NIETO, A.; PEÑA, L.; PÉREZ-ALENZA, M. D.; SÁNCHEZ, M. A.; FLORES, J. M.; CASTAÑO, M. Immunohistologic detection of estrogen receptor alpha in canine mammary tumors: clinical and pathologic associations and prognostic significance. **Vet Pathol.**, v.37, n.3, 2000.

OPREA-ILIES, G.; HAUS, E.; SACKETT-LUNDEEN, L.; LIU, Y.; MCLENDON, L.; BUSCH, R.; ADAMS, A.; COHEN, C. Expression of melatonin receptors in triple negative breast cancer (TNBC) in African American and Caucasian women: relation to survival. **Breast Cancer Res Treat.**, v. 3, n. 137, p. 677-87, 2013.

ORTÍZ-LÓPEZ, L.; MORALES-MULIA, S.; RAMÍREZ-RODRÍGUEZ, G.; BENÍTEZ-KING, G. ROCK-regulated cytoskeletal dynamics participate in the inhibitory effect of melatonin on cancer cell migration. **J Pineal Res.**, v. 46, p. 15-21, 2009.

PARADIES, G.; PETROSILLO, G.; PARADIES, V.; REITER, R. J.; RUGGIERO, F. M. Melatonin, cardiolipin and mitochondrial bioenergetics in health and disease. **Journal of Pineal Research.**, v. 48, p. 297-310, 2010.

PEDROSA, A.M.C.; WEINLICH, R.; MONGNOL, G.P.; ROBBS, B.K.; VIOLA, J.P.B.; CAMPA, A.; AMARANTE-MENDES, G.P. Melatonin Protects CD4+ T Cells from Activation-Induced Cell Death by Blocking NFAT-Mediated CD95 Ligand Upregulation. **J. Immunol.**, v.184, p.3487-3494, 2010.

PELETEIRO, M. C. Tumores mamários na cadela e na gata. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias.**, v. LXXXIX, n. 509, p.10 – 29, 1994.

PHILLIPS, J. C.; LEMBCKE, L.; CHAMBERLIN, T. A novel locus for canine osteosarcoma (OSA1) maps to CFA34, the canine orthologue of human 3q26. **Genomics.**, 2010.

PROIETTI, S.; CUCINA, A.; REITER, R.J.; BIZZARRI, M. Molecular mechanisms of melatonin's inhibitory actions on breast cancers. **Cell Mol Life Sci.**, 2012. No prelo.

QUEIROGA, F.; LOPES, C. Tumores mamários caninos, pesquisa de novos fatores de prognóstico. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias.**, v. 97, n. 543, p. 119-127, 2002.

RAM, P. T.; KIEFER, T.; SILVERMAN, M. Estrogen receptor transactivation in MCF-7 breast cancer cells by melatonin and growth factors. **Molecular and Cellular Endocrinology.**, v. 141, p. 53–64, 1998



RATO, A.; PEDRERO, J. M. G.; MARTÍNEZ, M. A.; DEL RIO, B.; LAZO, P. S.; RAMOS, S. Melatonin blocks the activation of estrogen receptor for DNA binding. **FASEB Journal.**, v. 13, p. 857–868, 1999.

RAVINDRA, T.; LAKSHMI, N. K.; AHUJA, Y. R. Melatonin in pathogenesis and therapy of cancer. **Indian J Med Sci.**, v. 60, n. 12, p. 523-35, 2006.

REED, W.; HANNISDAL, E.; BOEHLER, P. J.; GUNDERSEN, S.; HOST, H.; MARTIN, J. The prognostic value of p53 and C-erb B-2immunostaining is overrated for patients with lymph node-negative breast carcinoma: a multivariate analysis of prognostic factors in 613 patients with a follow-up of 14-30 years. **Cancer.**, v. 88, n. 4, p. 804-13, 2000.

ROTH, J.; RABIN, R.; AGNELLO, K. Melatonin suppression of PC12 cell growth and death. **Brain Research.**, v.768, p. 63-70, 1997.

SANCHEZ-BARCELO, E.; COS, S.; MEDIAVILLA, D.; MARTINEZ-CAMPA, C.; GONZALEZ, A.; ALONSO-GONZALEZ, C. Melatonin–estrogen interactions in breast cancer. **J. Pineal Res.**, v. 38, p. 217-22, 2005.

SANCHEZ-BARCELO, E.J.; MEDIAVILLA, M.D.; ALONSO-GONZALEZ, C.; REITER, R.J. Melatonin uses in oncology: breast cancer prevention and reduction of the side effects of chemotherapy and radiation. **Expert Opin Investig Drugs.**, v.21, p.819-831, 2012.

SANTORO, R.; MORI, F.; MARANI, M.; GRASSO, G.; CAMBRIA, A.; BLANDINO, G.; MUTI, P.; STRANO, S. Blockage of melatonin receptors impairs p53-mediated prevention of DNA damage accumulation. **Carcinogenesis.**, 2013.

SCHNEIDER, R. Comparison of age, sex and incidence rates in human and canine breast cancer. **Cancer.**, v. 26, n. 2, p. 419-426, 1970.

SNOUSSI, K. et al. Combined effects of *IL-8* and *CXCR2* gene polymorphisms on breast cancer susceptibility and Aggressiveness. **BMC Cancer.**, v. 10, n. 283, 2010.

SORENMO, K. An Update on canine mammary gland tumors. **Proceedings of the 16<sup>th</sup> Acvim Forum.**, p. 387-8, 1998.

SUGDEN, D.; DAVIDSON, K.; HOUGH, K.A.; THE, M.T. Melatonin, melatonin receptors and melanophores: a moving story. **Pigment Cell Res.**, v. 17, n. 5, p. 454–60, 2004.

TAMURA, E. K. Efeito da melatonina sobre a produção endotelial de óxido nítrico *in vitro* e *in vivo*. São Paulo: Universidade de São Paulo, 2009. Tese (Doutorado), Programa de Pós-graduação em Ciências – Área de Fisiologia Geral, São Paulo, São Paulo, 2009.

THOMAS, E.; BERNER, G. Prognostic and Predictive Implications of HER2 Status for Breast Cancer Patients. **European Journal of Oncology Nursing.**, v. 4, p. 10-17, 2000.

VIJAYALAXMI THOMAS CR Jr, REITER RJ, HERMAN TS. Melatonin: from basic research to cancer treatment clinics. **J Clin Oncol.**, v. 20, p. 2575–601, 2002.

VAN DE VIJVER, M.J. Genetic alterations in breast cancer. **Current Diagnostic Pathology**, v.6, n.4, p.271-281, 2000.

YUAN, L.; COLLINS, A. R.; DAI, J.; DUBOCOVICH, M. L.; HILL, S. M. MT(1) melatonin receptor overexpression enhances the growth suppressive effect of melatonin in human breast cancer cells. **Molecular and Cell Endocrinology.**, v. 192, p. 147-56, 2002.

WANG, J.; XIAO, X.; ZHANG, Y.; SHI, D.; CHEN, W.; FU, L.; LIU, L.; XIE, F.; KANG, T.; HUANG, W.; DENG, W. Simultaneous modulation of COX-2, p300, Akt, and Apaf-1 signaling by melatonin to inhibit proliferation and induce apoptosis in breast cancer cells. **Journal of Pineal Research.**, v. 53, p. 77-90, 2012.

ZUCCARI, D. A. P. C.; SANTANA, A. E.; ROCHA, N. S. Correlação entre a citologia aspirativa por agulha fina e a histologia no diagnóstico de tumores mamários de cadelas. **Braz. J. vet. Res. anim. Sci.**, v. 38, n. 1, p. 38-41, 2001.

ZUCCARI, D. A. P. C.; BERTON, C. R.; TERZIAN, A. C. B.; RUIZ, C. M. Fatores prognósticos e preditivos nas neoplasias mamárias –importância dos marcadores imunohistoquímicos nas espécies humana e canina – estudo comparativo. **Arq Ciênc Saúde.**, v.15, n.4, p. 189-98, 2008.

## VIII. APÊNDICE

### Apêndice A: Protocolos de preparo das soluções.

<sup>1</sup>SFB PBS----- 12 mL

SFB----- 0,5 g

<sup>2</sup> PBS Cloreto de Sódio ----- 16,36 g

Fosfato de Sódio Dibásico ----- 2,1 g

Fosfato de Sódio Monobásico di-hidratado --- 0,6 g

Água Destilada ----- 2000 mL

<sup>3</sup> Tampão citrato (pH 6,0) Ácido Cítrico ----- 2,1g

Água Destilada ---- 1000mL

Solução de hidróxido de sódio (NaOH) para regulação do pH do ácido cítrico

NaOH ----- 1,6g

Água Destilada --- 20 ml

## IX. ANEXOS

### ANEXO A - Modelo do Termo de Consentimento livre e esclarecido

#### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(De acordo com os princípios éticos estabelecidos na Lei nº 11.794/2008 e na resolução nº 714/2002)

#### Título da Pesquisa: “**Detecção de potenciais marcadores prognósticos e preditivos em neoplasia mamária de cadelas**”

→ “Avaliação de novos marcadores prognósticos e preditivos em neoplasia mamária de cadelas: Avaliação sérica e molecular do VEGF e do HIF-1”

→ “Avaliação de novos marcadores prognósticos e preditivos em neoplasia mamária de cadelas: Expressão dos receptores MT1 e MT2 e ação da melatonina em cultura primária”

**Pesquisadores Responsáveis:** Prof<sup>a</sup>. Dra. Debora A. P. C. Zuccari – Coordenadora / Marina Gobbe Moschetta – Mestranda / Juliana Ramos Lopes – Mestranda.

Para obter maior conhecimento dos mecanismos envolvidos no câncer de mama em cadelas, os pesquisadores estão desenvolvendo uma pesquisa científica que poderá melhorar o nosso conhecimento sobre esse tumor e, portanto oferecer novas possibilidades de tratamento e de melhora na qualidade de vida dos nossos animais de estimação.

- A. O estudo tem como objetivo avaliar o papel do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e do fator induzido por hipóxia (HIF-1) em cadelas em diferentes momentos, além de avaliar a ação da melatonina em cultivo celular; a fim de verificar a relação entre os valores e utilizá-los como marcadores de crescimento tumoral e no surgimento de metástases.
- B. Será coletada uma amostra sanguínea do animal (3 mL) no momento da cirurgia e posteriores coletas serão feitas: um mês após a cirurgia, seis meses após a cirurgia e 12 meses após a cirurgia.
- C. Após a cirurgia para retirada do tumor será cortado parte deste material, um pedacinho que será enviado ao laboratório para diagnóstico histopatológico. Não haverá mudança na técnica cirúrgica para esta coleta.

Declaro que, após ter sido convenientemente esclarecido pelo pesquisador sobre a utilização para estudo de amostra sanguínea e um fragmento da lesão tumoral (pedacinho de 1 cm do tumor) a ser retirado durante o procedimento cirúrgico, já estipulado no tratamento, consinto em participar livre e espontaneamente deste estudo e me comprometo a manter contato com o grupo para as 3 coletas subseqüentes em 1 mês, 6 meses e 12 meses após a cirurgia.

Assim, consinto em participar do projeto de pesquisa em questão. E comprometo-me a conceder a coleta de amostras sanguíneas da minha cadela durante os quatro períodos da

pesquisa e ainda, comprometo-me a manter o pesquisador informado no caso de mudança de endereço ou telefone.

Nome do(a) proprietário(a):

Nome da cadela:

**Endereço residencial:** n°

**Bairro:** **Telefone residencial:** **Celular:**

**Data:...../...../...../ Assinatura:.....**

Declaração de responsabilidade: Expliquei a natureza, objetivos, riscos e benefícios deste estudo. Coloquei-me a disposição para perguntas e respondi a todas. Obtive o consentimento de maneira livre e me coloquei à disposição para esclarecimento de qualquer dúvida sobre o estudo pelos endereços abaixo indicados.

Nome do(a) pesquisador:

Data:...../...../...../ Assinatura:.....

Inscrição no Conselho Regional: .....

Profa. Dra. Debora A.P.C. Zuccari – Laboratório de Investigação Molecular no Câncer – LIMC.  
Av. Brigadeiro Faria Lima, nº 5416 FAMERP - Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto

São José do Rio Preto, SP - CEP 15090-000

Fone: (17) 3201-5885

e-mail: [debora.zuccari@famerp.br](mailto:debora.zuccari@famerp.br)

## ANEXO B - Modelo da Ficha Clínica do animal

### FICHA CLÍNICA

**Nome da cadela:** \_\_\_\_\_

**Idade:** \_\_\_\_\_

**História Clínica:**

( ) Recidiva

( ) Metástase

**Tempo de evolução:** 1 mês ( ) até 6 meses ( ) mais de 6 meses ( )

**Número de nódulos:** Único ( ) Múltiplos ( )

**Dimensões do tumor (T):** \_\_\_\_x\_\_\_\_x\_\_\_\_(cm)

T0: ausência do tumor primário evidente ou ausência de recidiva

T1: < 3 cm

T2: entre 3 e 5 cm

T3: > 5 cm

**Envolvimento de linfonodos regionais:** \_\_\_\_\_

N0: sem envolvimento evidente

N1: envolvimento unilateral

N1a: móveis

N1b: fixos

N2: envolvimento bilateral

N2a: móveis

N2b: fixos

Quanto à confirmação histológica de envolvimento de linfonodos: (-) ou (+)

**Metástase à distância:** \_\_\_\_\_

M0: sem metástases evidentes

M1: metástases à distância incluindo linfonodos não regionais

Mx: impossível avaliar existência de metástases

**Características do tumor:**

Ulceração: sim ( ) não ( )

Vascularização: moderada ( ) abundante ( )