



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

Larissa Bazela Maschio

Interação de fibroblastos associados ao câncer em co-cultura  
com linhagens tumorais mamárias e a resposta terapêutica  
com o uso da melatonina

São José do Rio Preto  
2015

Larissa Bazela Maschio

Interação de fibroblastos associados ao câncer em co-cultura  
com linhagens tumorais mamárias e a resposta terapêutica  
com o uso da melatonina

Dissertação apresentada como parte dos requisitos 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.

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

São José do Rio Preto (SP)  
2015

Maschio, Larissa Bazela

Interação tumorigênica de fibroblastos em co-cultura com linhagens tumorais mamárias e a resposta terapêutica com o uso da melatonina/ Larissa Bazela Maschio - São José do Rio Preto: [s.n.], 2009.

124 f. : 05 il. ; 30 cm.

Orientador: Debora Aparecida Pires de Campos Zuccari  
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Câncer de mama. 2. Fibroblastos. 3. Melatonina. I. Zuccari, Debora Aparecida Pires de Campos. III. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. IV. Título.

CDU -

Larissa Bazela Maschio

Interação de fibroblastos associados ao câncer em co-cultura  
com linhagens tumorais mamárias e a resposta terapêutica  
com o uso da melatonina

Dissertação apresentada como parte dos requisitos 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.

Comissão Examinadora

Profa. Dra. Debora Aparecida Pires de Campos Zuccari  
UNESP – São José do Rio Preto  
Orientadora

Profa. Dra. Paula Rahal  
UNESP – São José do Rio Preto

Profa. Dra. Alessandra Vidotto  
FAMERP – São José do Rio Preto

São José do Rio Preto (SP)  
02 de Fevereiro de 2015

Esse trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Investigação Molecular do Câncer (LIMC) na Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP), SP, Brasil, sob orientação da Profa. Dra. Debora Ap. Pires de Campos Zuccari. Os recursos para o desenvolvimento do projeto foram obtidos na forma de Auxílio à Pesquisa e bolsa de estudos da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

*Dedicatória*

---

*Dedico esse trabalho a minha família, que esteve presente desde o início, e com muito esforço e apoio me deu a oportunidade de estudar.*

*Dedico também ao meu noivo Gustavo, que suportou todos os desafios e dividiu com muito apoio e carinho essa fase da minha vida.*

*Agradecimientos*

---

*Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida, pelo seu amor infinito, por todo esse tempo ter me concedido a paz, sabedoria e tranqüilidade nos momentos em que estava abatida, por tudo que me concedeu nesses anos de estudos e por colocar pessoas maravilhosas em meu caminho.*

*Primeiramente gostaria de agradecer a minha orientadora Profa. Dra. Debora Zuccari pela oportunidade de iniciar minha carreira científica. Agradeço a confiança e todo apoio durante a realização desse trabalho e especialmente pela confiança e incentivo que me fizeram vencer cada conquista e superar as dificuldades no caminho.*

*Aos meus pais, Giovana e Edison, por terem me dado educação, valores, me ensinado a andar, a oportunidade do estudo e por tudo que fizeram e fazem para que eu possa realizar meus sonhos. Essa conquista é de vocês!*

*A minha irmã Thais, por fazer parte da minha vida e sempre estar ao meu lado nos momentos difíceis.*

*A minha avó Geni, por estar presente em todos os momentos da minha vida e por todos os ensinamentos, amor e carinho, e a meu avô Antônio que mesmo em memória, sempre me deu forças para seguir, também devo à vocês tudo que sou hoje.*

*Ao meu noivo, Gustavo, por estar sempre ao meu lado me incentivando nessa caminhada como todo seu amor, companheirismo, carinho e paciência.*

*Aos meus tios, tias, primos e primas. Obrigada por estarem sempre presentes na minha vida e desejarem o meu sucesso.*

*Aos meus amigos Marcela, Leandro, Bruna, Fábio, Carolina e Gustavo, pela amizade sincera e por todos os momentos que passamos juntos, sempre me apoiando e me ajudando nessa jornada.*

*Aos meus sogros Reginaldo e Sandra que me acolheram como uma filha e que estão sempre torcendo por mim.*

*Aos meus eternos amigos do LIMC, Marina, Juliana, Gustavo, Thaiz, Naiane, Nathália, Rubens, Giovanna, Bruna, Lívia, Tialfi, Camila e Jucimara, por todos os dias que passamos juntos, pela amizade, companheirismo e por estar sempre do meu lado em momentos bons e ruins. Esse trabalho tem a contribuição de cada um de vocês, e sem essa ajuda eu não teria realizado sozinha. Agradeço especialmente a Gabriela por toda a amizade e paciência, ensinamentos, por me confortar nos momentos de angústia e por tudo que enfrentamos juntas.*

*Ao Dr. Newton Antonio Bordin Júnior e toda sua equipe pela parceria durante o projeto, atenção e ajuda na coleta do material humano, que foi fundamental e de muitos aprendizados.*

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

*À banca examinadora da minha qualificação Profa. Dra. Ana Elizabete Silva e Prof. Dr. Newton Antonio Bordin Júnior pelas considerações que contribuíram com esse trabalho.*

*À banca examinadora da minha dissertação, Profa. Dra. Paula Rahal e Profa. Dra. Alessandra Vidotto pelo aceite em participar da análise e enriquecimento deste trabalho.*

*Ao Prof. Dr. Luiz Carlos de Mattos, por ter me aceitado no estágio de docência que complementou minha formação.*

*A Dra. Rosimeire Aparecida Roela que me auxiliou na técnica de cultivo de fibroblastos extraídos de tecido tumoral, o que complementou meu aprendizado.*

*Ao Sr. Domingos Zanchetta Netto e ao Zanclair pelo auxílio com a histotecnologia.*

*A Profa. Dra. Eloiza Tajara e ao Msc. Tiago Henrique, pelo auxílio nas análises de bioinformática.*

*A todos os professores e funcionários da Pós-Graduação em Genética do IBILCE que contribuíram com meu aprendizado.*

*A FAMERP pela infra-estrutura e profissionais que possibilitaram a realização desse projeto.*

*A FAPESP e ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos e auxílio financeiro, indispensáveis para a realização desse projeto.*

*Muito obrigada a todos que estiveram ao meu lado nessa caminhada...*

*Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades  
lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram  
conquistadas do que parecia impossível.*

*Charles Chaplin*

## *Sumário*

---

## SUMÁRIO

<b>RESUMO .....</b>	<b>17</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>20</b>
<b>I. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>23</b>
1. CÂNCER DE MAMA .....	23
2. MICROAMBIENTE TUMORAL .....	24
3. PROCESSOS PRESENTES NA TUMORIGÊNESE .....	28
4. MELATONINA.....	32
<b>II. OBJETIVOS .....</b>	<b>34</b>
<b>III. CAPÍTULOS .....</b>	<b>36</b>
CAPITULO I - Interação de fibroblastos associados ao câncer com a linhagem tumoral triplo-negativa MDA-MB-231 em resposta ao tratamento com melatonina.....	38
CAPITULO II - Interação de fibroblastos associados ao câncer (CAFs) com linhagem metastática canina (CF-41) em resposta ao tratamento com melatonina.....	73
<b>IV. CONCLUSÕES .....</b>	<b>102</b>
<b>V. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>104</b>
<b>VI. ANEXOS .....</b>	<b>114</b>



# *Lista de abreviaturas e símbolos*

---

## **Lista de abreviaturas e símbolos**

<b>CAF</b>	do inglês <i>Cancer Associated Fibroblasts</i>
<b>COX-2</b>	Ciclooxigenase-2
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>EGF</b>	do inglês <i>Epidermal Growth Factor</i>
<b>ENA-78</b>	do inglês <i>Epithelial Neutrophil-Activating Protein-78</i>
<b>HPS27</b>	do inglês <i>Heat Shock Protein-27</i>
<b>HTRA</b>	do inglês <i>High Temperature Requirement factor A</i>
<b>I-309</b>	do inglês <i>Cytokine ligand protein-1</i>
<b>IGF-1R</b>	do inglês <i>Insulin-like Growth Factor I Receptor</i>
<b>IGF-I</b>	do inglês <i>Insulin-like Growth Factor I</i>
<b>ILs</b>	Interleucinas
<b>INCA</b>	Instituto Nacional do Câncer
<b>Jak-STAT</b>	do inglês <i>Janus Kinase/Signal Transducers and Activators of Transcription</i>
<b>MCP-1</b>	do inglês <i>Monocyte Chemoattractant Protein-1</i>
<b>MCP-3</b>	do inglês <i>Monocyte Chemoattractant Protein-3</i>
<b>MEC</b>	Matriz extracelular
<b>mM</b>	Milimolar
<b>MMPs</b>	Matriz Metaloproteinases
<b>MTT</b>	do inglês <i>3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide</i>
<b>NAF</b>	do inglês <i>Normal Associated Fibroblasts</i>
<b>NF-k(B)</b>	do inglês <i>Nuclear Factor Kappa-B</i>
<b>OMS</b>	Organização Mundial de Saúde
<b>PDGF</b>	do inglês <i>Platelet-derived Growth Factor</i>
<b>SCF</b>	do inglês <i>Stem Cell Factor</i>
<b>SDF-1</b>	do inglês <i>Stromal-Cell-Derived Factor-1</i>
<b>SMAC</b>	do inglês <i>Second Mitochondria derived Activator of Caspases</i>
<b>TGF-β</b>	do inglês <i>Transforming Growth Factor beta</i>

<b>Tie-1</b>	Receptor de Tirosina-quinase 1
<b>Tie-2</b>	Receptor de Tirosina-quinase 2
<b>TIMP-1</b>	do inglês <i>Inhibitor of the Matrix Metalloproteinases-1</i>
<b>TIMP-2</b>	do inglês <i>Inhibitor of the Matrix Metalloproteinases-1</i>
<b>TNF-RII</b>	do inglês <i>Tumor Necrosis Factor Receptor II</i>
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	do inglês <i>Tumor Necrosis Factor Alpha</i>
<b>TNF-<math>\beta</math></b>	do inglês <i>Tumor Necrosis Factor Beta</i>
<b>TRAIL</b>	do inglês <i>TNF Related Apoptosis Inducing Ligand</i>
<b>VEGF</b>	do inglês <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
<b><math>\alpha</math>-SMA</b>	do inglês <i>Alpha Smooth Muscle Actin</i>



## *Resumo*

---

## RESUMO

As neoplasias mamárias são os tumores mais comuns nas mulheres e fêmeas caninas. Fibroblastos associados ao câncer (CAFs) são células abundantes no microambiente tumoral, capazes de intermediar respostas inflamatórias atuando na diferenciação e progressão tumoral. A melatonina está associada a mecanismos de ação com efeitos oncostáticos e oncoprotetores, e atua na redução da formação de fibroblastos circundantes no câncer de mama. Os objetivos desse estudo foram verificar a ação da melatonina nas linhagens tumorais mamárias metastáticas humana e canina (MDA-MB-231 e CF-41) bem como em co-cultivo com CAFs primários na viabilidade celular e na expressão de proteínas envolvidas nos processos de angiogênese, inflamação e apoptose, buscando o entendimento da interação destas proteínas nas principais vias de sinalização atuantes no processo tumorigênico. A viabilidade celular foi verificada pelo ensaio MTT e a expressão proteica pelo *Membrane Antibody Array* após o tratamento com melatonina. Verificou-se que 1 mM de melatonina reduziu a viabilidade celular em ambas as linhagens, CAFs humanos e caninos e em seus co-cultivos ( $p \leq 0,05$ ). A análise proteica semiquantitativa, após tratamento com melatonina, mostrou redução da expressão de sete proteínas pró-angiogênicas e aumento das proteínas TIMP-1 e IL-6 nas células MDA-MB-231 e redução de IL-6 e MCP-1 e aumento da leptina, TGF- $\beta$ , trombopoietina e VEGF na co-cultura ( $p \leq 0,05$ ). Houve redução de dezenove proteínas pró-inflamatórias e aumento da citocina I-309 nas células MDA-MB-231 ( $p \leq 0,05$ ). No co-cultivo, seis proteínas pró-inflamatórias apresentaram-se menos expressas e as proteínas IL-4, MCP-3 e SCF aumentaram sua expressão ( $p \leq 0,05$ ). Das proteínas pró-apoptóticas, doze aumentaram a expressão e houve redução da caspase-3 nas células MDA-MB-231 ( $p \leq 0,05$ ). Na co-cultura, houve aumento das proteínas BIM, HPS27 e IGF-1R e redução de TNF-RII ( $p \leq 0,05$ ). Na análise por bioinformática das proteínas diferencialmente expressas, verificou-se que 21 proteínas participam da via *cytokine-cytokine receptor interaction*, nove da via *janus kinase/signal transducers and activators of transcription (Jak-STAT)* e 10 da via do câncer nas células MDA-MB-231 ( $p \leq 0,05$ ). Na co-cultura, nove das proteínas estudadas participam da via de sinalização *cytokine-cytokine receptor interaction*, cinco da via *Jak-STAT* e seis da via do câncer ( $p \leq 0,05$ ). Para as células caninas, o tratamento com melatonina aumentou a expressão das proteínas pró-angiogênicas IL-6, IL-8, MCP-1 e TIMP-2 na linhagem CF-41 ( $p \leq 0,05$ ). Na co-cultura, houve redução de TIMP-1 e aumento da angiogenina ( $p \leq 0,05$ ). Das proteínas pró-inflamatórias, nove se mostraram menos expressas e a IL-15, MCP-2 e SCF aumentaram sua expressão nas células CF-41, oito proteínas pró-inflamatórias diminuíram sua expressão na co-cultura e as citocinas IL-1 $\alpha$ , IL-12p70 e IL-15 estavam superexpressas ( $p \leq$

0,05). Houve aumento de BCL-2 e redução de BAD e TNF-RII nas células CF-41 e aumento da caspase-8, HTRA e SMAC e redução de FAS ligante, livina e TNF- $\alpha$  no co-cultivo ( $p \leq 0,05$ ). A análise por bioinformática mostrou 12 proteínas presentes na via *cytokine-cytokine receptor interaction*, sete na via *Jak-STAT* e cinco na via do câncer nas células CF-41 ( $p < 0,05$ ), enquanto na co-cultura, oito proteínas participavam da via *cytokine-cytokine receptor interaction*, quatro da via *Jak-STAT* e quatro da via do câncer ( $p < 0,05$ ). Conclui-se que, além da melatonina ser eficaz na redução da viabilidade celular, atua na inibição de proteínas angiogênicas e inflamatórias e na indução da expressão de proteínas apoptóticas nas células das espécies humana e canina. Ainda, mostrou ação na interação das células tumorais com CAFs, confirmando influência no microambiente tumoral e potencial valor terapêutico no câncer de mama.

**Palavras-chave:** *câncer de mama, fibroblastos, microambiente tumoral, angiogênese, inflamação, apoptose, melatonina.*

*Abstract*

---

## ABSTRACT

*Mammary tumors are the most common tumors among women and female dogs. Fibroblasts associated with cancer (CAFS) are the most abundant cells in the tumor microenvironment, able to mediate inflammatory responses acting in the differentiation and tumor progression. Melatonin is associated with mechanisms of action with oncostatics effects and oncoprotectors, and works to reduce the formation of surrounding fibroblasts in breast cancer. The objectives of this study were to assess the action of melatonin on mammary tumor cell lines human and canine metastatic (MDA-MB-231 and CF-41) and in co-culture with primary CAFS on cell viability and expression of proteins involved in the processes of angiogenesis, inflammation and apoptosis searching for the understanding of proteins interaction in the main signaling pathways active in the tumorigenic process. Cell viability was assessed by MTT assay and the semi-quantitative protein analysis by Membrane Antibody Array after treatment with melatonin. It was found that 1 mM of Melatonin reduced cell viability in both cell lines, human and canine CAFS and their co-culture ( $p \leq 0.05$ ). The semi-quantitative protein analysis after melatonin treatment showed a reduction of the expression of seven pro-angiogenic proteins and increased TIMP-1 and IL-6 protein in MDA-MB-231 cells and reduced IL-6 and MCP-1 and increased leptin, TGF- $\beta$ , VEGF and thrombopoietin in the co-culture ( $p \leq 0.05$ ). Nineteen pro-inflammatory cytokine protein were reduced and I-309 increased in MDA-MB-231 cells ( $p < 0.05$ ). In the co-culture, six pro-inflammatory proteins were underexpressed and the IL-4, MCP-3 and SCF proteins were increased the expression ( $p \leq 0.05$ ). Twelve pro-apoptotic proteins increased and decreased expression of caspase-3 in MDA-MB-231 cells ( $p \leq 0.05$ ). In the co-culture, an increase of BIM, HPS27 and IGF-1R proteins and TNF-RII reduction was observed ( $p \leq 0.05$ ). In bioinformatics analysis of differentially expressed proteins, was verified that 21 proteins participate of cytokine-cytokine receptor interaction pathway, nine of janus kinase pathway/signal transducers and activators of transcription (jak/STAT) and 10 of cancer pathway in MDA-MB-231 cells ( $p \leq 0.05$ ). In the co-culture, nine proteins participate of cytokine-cytokine receptor interaction pathway, five of Jak/STAT pathway and six of cancer pathway ( $p \leq 0.05$ ). For the canine cells, melatonin treatment increased the expression of pro-angiogenic proteins IL-6, IL-8, MCP-1 and TIMP-2 in CF-41 cells ( $p \leq 0.05$ ). In the co-culture, was reduction of TIMP-1 and increasing of angiogenin ( $p \leq 0.05$ ). Nine pro-inflammatory proteins showed underexpressed and IL-15, MCP-2 and SCF increased the expression in CF-41 cells, eight pro-inflammatory proteins reduced the expression in the co-culture and the cytokines IL-1 $\alpha$ , IL-12p70 and IL-15 were overexpressed ( $p \leq 0.05$ ). An*

*increase of BCL-2 and reduction of BAD and TNF-RII in CF-41 cells and increase of caspase-8, HTRA and SMAC and reduction of FAS ligand, livin and TNF- $\alpha$  in co-culture ( $p \leq 0.05$ ). The bioinformatic analysis showed 12 proteins of cytokine-cytokine receptor interaction pathways and seven of Jak/STAT pathway and five of cancer pathway in CF-41 cells ( $p \leq 0.05$ ), while in the co-culture, eight proteins participate of cytokine-cytokine receptor interaction pathway, four of Jak/STAT pathway and four of cancer pathway ( $p \leq 0.05$ ). In conclusion, besides melatonin is effective in reducing cell viability, is active in inhibition of angiogenic and inflammatory proteins and induction of the expression of apoptotic proteins in the human and canine species. Besides that, show interaction with CAFs, representing an important influence on tumor microenvironment, and potential therapeutic value in breast cancer.*

**Keywords:** *Breast cancer, fibroblasts, microenvironment tumor, angiogenesis, inflammation, apoptosis, melatonin.*

*Introdução*

---

## I. INTRODUÇÃO

### 1. CÂNCER DE MAMA

O câncer de mama representa um problema de saúde mundial, sendo a neoplasia mais comum entre as mulheres (INCA, 2014). A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que, por ano, ocorram mais de 1.050.000 novos casos de câncer de mama em todo o mundo (INCA, 2003). No Brasil, o Instituto Nacional do Câncer (INCA) estimou a ocorrência de 57.120 novos casos para o ano de 2014 (INCA, 2014).

As taxas de mortalidade por câncer de mama continuam elevadas, sendo a capacidade de invasão das células tumorais e consequente desenvolvimento de metástases, as principais causas de mortalidade em mulheres com neoplasias mamárias (SANTOS *et al.*, 2011). Na população mundial, a sobrevida média após cinco anos de acompanhamento é de 61% e apesar do progresso no diagnóstico e tratamento nos últimos 30 anos, essa doença é ainda responsável por quase meio milhão de mortes por ano no mundo (SNOUSSI *et al.*, 2010).

Dentre todos os mamíferos, a espécie canina apresenta a maior incidência de neoplasias mamárias (BRODEY, GOLDSCHMIDT e ROSZEL, 1983; SLEECKX *et al.*, 2013), e quando comparada à mulher, possui três vezes mais chances de desenvolver essa neoplasia (KROL *et al.*, 2009; GELALETI *et al.*, 2012; MICHEL *et al.*, 2012; PAWŁOWSKI *et al.*, 2013). O câncer de mama representa aproximadamente 52% de todos os cânceres que acometem cães, sendo 41 a 53% desses tumores de caráter maligno (QUEIROGA E LOPES, 2002; ZUCCARI *et al.*, 2008; ANDRADE *et al.*, 2010; CHU *et al.*, 2011; AZUMA *et al.*, 2012).

Devido às muitas semelhanças compartilhadas por seres humanos e cães, os tumores mamários em cadelas prestam-se como modelos apropriados e válidos ao estudo da biologia do câncer (ANDRADE *et al.*, 2010; PHILLIPS, LEMBCKE E CHAMBERLIN, 2010; RASOTTO *et al.*, 2014; RISMANCHI *et al.*, 2014), assim como para testes de agentes terapêuticos, já que animais de estimação têm tumores com apresentação histopatológica similares àqueles que acometem os seres humanos, e compartilham uma resposta semelhante à cirurgia e a esquemas de quimioterapia (MACEWEN, 1990; PHILLIPS, LEMBCKE e CHAMBERLIN, 2010; RISMANCHI *et al.*, 2014).

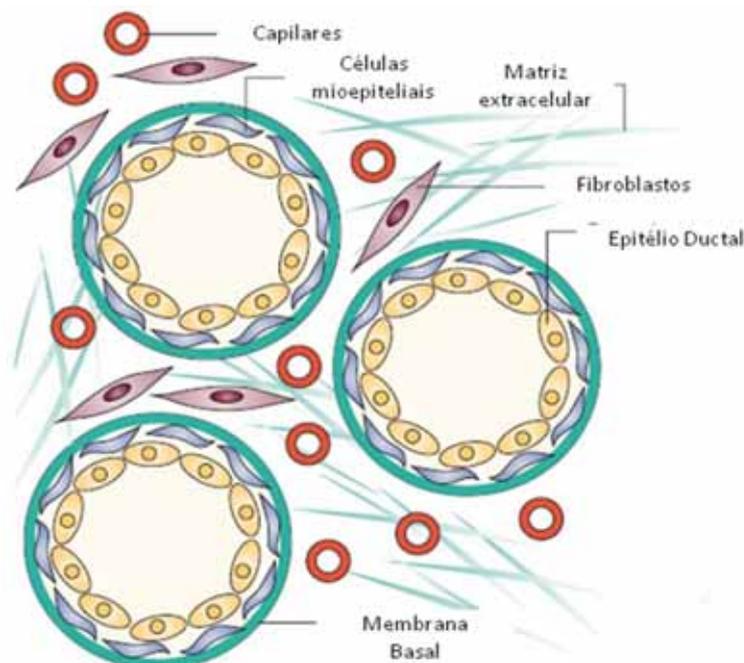
Existem estudos que têm identificado uma crescente variedade de marcadores moleculares que podem ser utilizados em conjunto com os marcadores morfológicos e histopatológicos presentes nos tumores, permitindo o desenvolvimento de tratamentos mais efetivos (GONZALEZ-ANGULO, MORALES-VASQUEZ e HORTOBAGYI, 2007; GRALOW *et al.*, 2008; HICKS E KULKARNI, 2008; DUFFY, O'DONOVAN E CROWN,

2011). A terapia baseada em uma avaliação através de marcadores moleculares prognósticos possibilita a aplicação das diferentes modalidades terapêuticas utilizadas no tratamento do câncer com a intensidade e a efetividade adequadas para cada paciente (ABREU e KOIFMAN, 2002).

Nesse sentido, um importante foco das pesquisas no câncer de mama tem sido melhorar o entendimento da relação dos componentes moleculares com a doença a fim de identificar possíveis marcadores preditivos e prognósticos e desenvolver novas estratégias terapêuticas (ALI *et al.*, 2010; LEVASHOVA *et al.*, 2010; PARK *et al.*, 2010). Por muitos anos o foco do tratamento tem sido as células tumorais propriamente ditas, buscando a inibição da progressão tumoral (ALI *et al.*, 2010; LEVASHOVA *et al.*, 2010; PARK *et al.*, 2010), entretanto, estudos tem demonstrado que terapias que tenham ação no microambiente tumoral podem ser mais eficientes e fundamentais para controle do crescimento tumoral.

## 2. MICROAMBIENTE TUMORAL

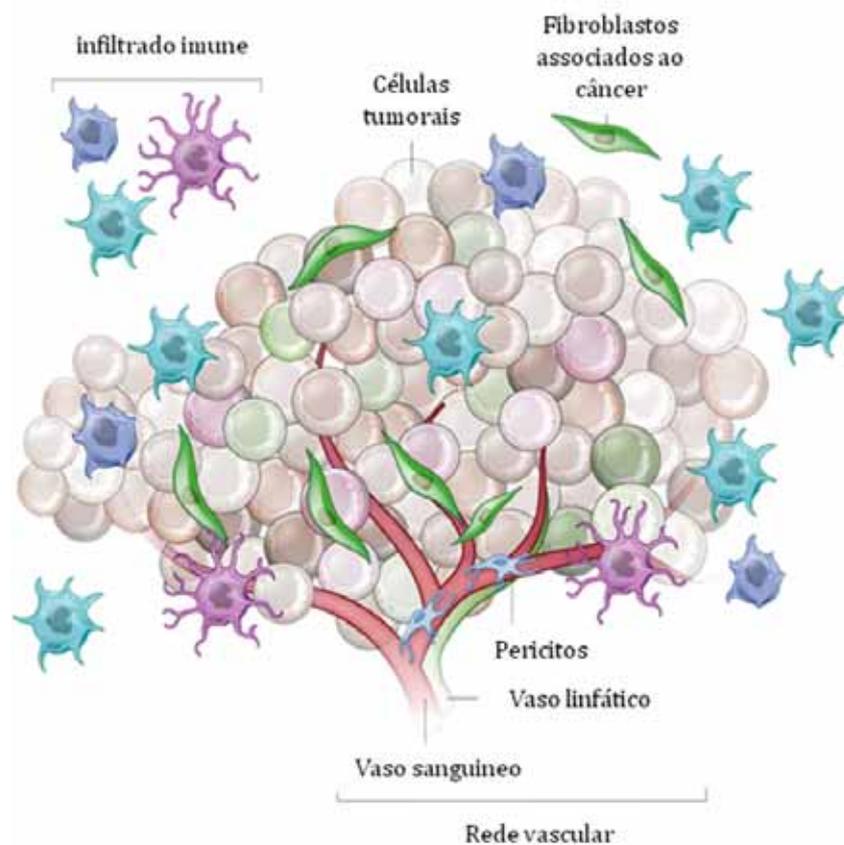
A glândula mamária não-alterada é formada pelo epitélio ramificado e o microambiente circundante, composto por diversos tipos celulares que participam da complexa rede funcional, incluindo células inflamatórias, endoteliais e fibroblastos (**Figura 1**) (FRANCO *et al.*, 2010; LÜHR *et al.*, 2012). As interações entre essas células desempenham importante papel no desenvolvimento da glândula mamária normal bem como nos processos de tumorigênese (LÜHR *et al.*, 2012).



**Figura 1.** Representação da glândula mamária não-alterada e os diversos tipos celulares existentes. Adaptado de KALLURI & ZEISBERG, 2006.

O câncer é um processo complexo que se desenvolve em várias etapas determinadas por perturbações genéticas, como a ativação de oncogenes ou silenciamento de genes supressores tumorais além de eventos epigenéticos que podem ocorrer no interior das células (PIERCE *et al.*, 2009). Além disso, a perda de mecanismos reguladores que controlam o comportamento normal das células tem importante ação no microambiente tumoral através da atuação de diversos fatores (HAHN e WEINBERG, 2002; BAYLIN, 2005; BARTELS e TSONGALIS, 2009).

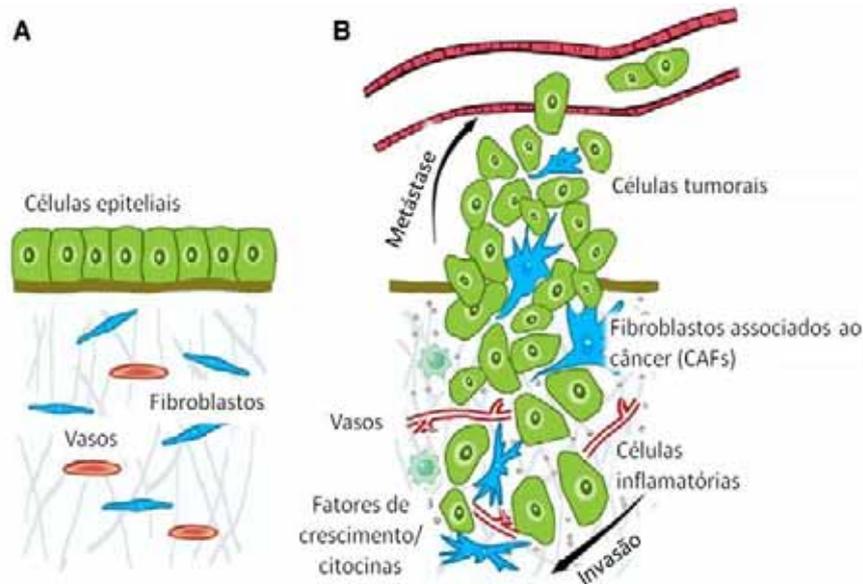
A complexidade do câncer tem sido associada à heterogeneidade do microambiente tumoral que se caracteriza pela interação de diversos tipos celulares que desempenham importante papel em todas as etapas da carcinogênese, da iniciação à progressão do câncer (**Figura 02**) (MIKI *et al.*, 2012; MAO *et al.*, 2013; MARSH, PIETRAS e MCALLISTER, 2013; ZHANG e LIU, 2013). Dentre estas células destacam-se as células endoteliais e suas precursoras, pericitos, células de músculo liso, fibroblastos, miofibroblastos, adipócitos e as células do sistema imune representadas pelos neutrófilos, eosinófilos, basófilos, mastócitos, linfócitos T e B, células *natural killer*, e as células apresentadoras de antígenos, tais como macrófagos e células dendríticas (FEDELE, TOTHILL e MCARTHUR, 2014; ISHIKAWA *et al.*, 2014). Os fibroblastos são as células mais abundantes do estroma mamário (APOSTOLOPOULOU e LIGON, 2012) e são considerados os principais fatores atuantes no desenvolvimento do tumor (FRANCO *et al.*, 2010; PORRETTI *et al.*, 2014), capazes de intermediar respostas inflamatórias, (BHOWMICK, NEILSON e MOSES, 2004; SANTOS *et al.*, 2011; SIMPKINS *et al.*, 2012) e atuando na promoção dos processos de proliferação, angiogênese e metástase tumorais devido aos seus efeitos parácrinos sobre as células neoplásicas (BHOWMICK, NEILSON e MOSES, 2004; SANTOS *et al.*, 2011; APOSTOLOPOULOU e LIGON, 2012; SIMPKINS *et al.*, 2012).



**Figura 2.** Representação da interação de diversos tipos celulares no microambiente tumoral. Adaptado de JUNTILA & SAUVAGE, 2013.

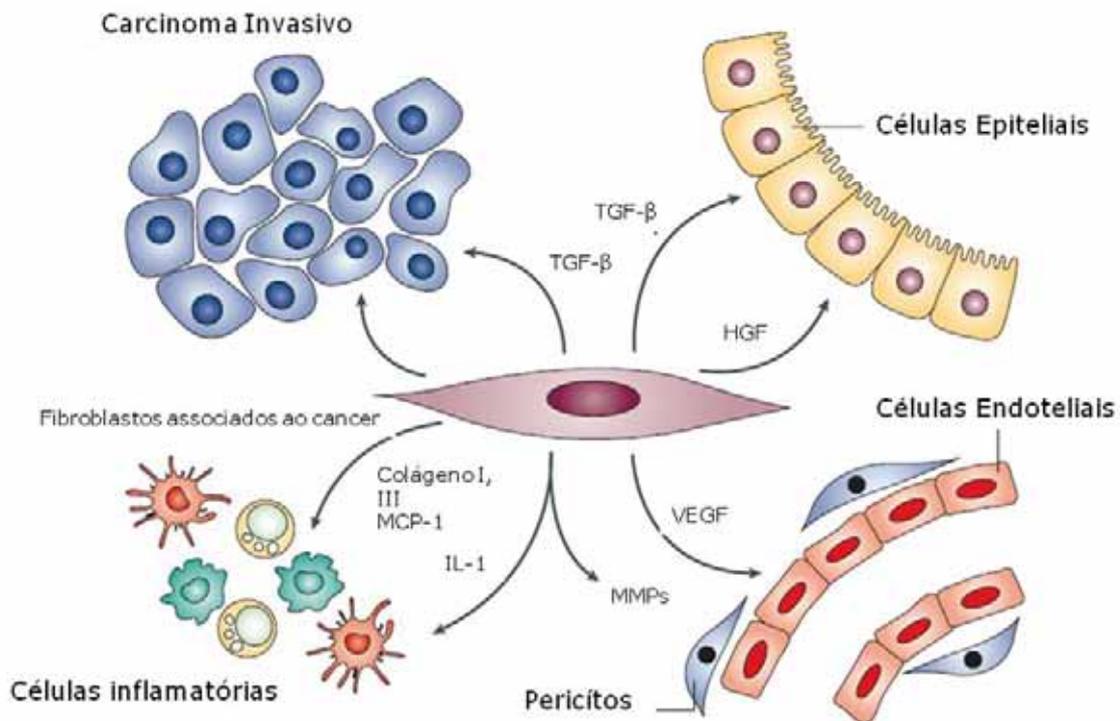
Fibroblastos associados ao epitélio normal são conhecidos como NAFs e apresentam efeito contrário em células tumorais, dependendo do estágio que se encontra a doença. No início da tumorigênese, atuam contra a progressão maligna, mas com o avanço do processo, são subvertidos para promoção do crescimento tumoral convertidos em fibroblastos associados ao câncer (CAFs) cuja atuação diferencial na progressão tumoral se dá através da sinalização de citocinas específicas (MIKI *et al.*, 2012; MAO *et al.*, 2013; MARSH, PIETRAS e MCALLISTER, 2013). Além disso, apresentam maior proliferação e comportamento migratório (BHOWMICK, NEILSON e MOSES, 2004).

No câncer de mama invasivo, as células mioepiteliais e a membrana basal são invadidas, deixando as células tumorais em contato direto com o estroma intersticial remodelado, que compreende fibroblastos e miofibroblastos, células vasculares tumorais e um número considerável de células imunes infiltradas, como linfócitos, macrófagos e mastócitos (**Figura 2**) (INMAN e BISSELL, 2010).



**Figura 3.** Representação do estroma não-alterado e o microambiente tumoral modificado. **A)** Tecido composto por células epiteliais dispostas ordenadamente e células do estroma contendo fibroblastos e vasos sanguíneos; **B)** Tecido tumoral maligno, em contato com o estroma remodelado, composto por CAFs, células inflamatórias, fatores de crescimento, citocinas e vasos sanguíneos. Adaptado de ZHANG e LIU, 2013.

CAFs são uma subpopulação de fibroblastos ativados (EREZ *et al.*, 2013) capazes de alterar o microambiente tumoral e o destino das células neoplásicas (ÖHLUND, ELYADA e TUVESON, 2014). Esses fibroblastos secretam fatores atuantes na promoção da angiogênese e proliferação celular como as proteínas da matriz extracelular, metaloproteinases (MMPs) (MMP-1, MMP-2, MMP-3 e MMP-9), fatores de crescimento, como o fator de crescimento semelhante a insulina -1 (IGF-1), epitelial (EGF), derivado de plaquetas (PDGF), transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) e o endotelial vascular (VEGF) além de citocinas, como as interleucinas (ILs)-1 e 6, a proteína quimioatraente de monócitos -1 (MCP-1) e o fator derivado de células do estroma -1 (SDF-1) (**Figura 4**) (KALLURI e ZEISBERG, 2006; LEBRET *et al.*, 2007; SANSONE e BROMBERG, 2011; EREZ *et al.*, 2013; ZHANG e LIU, 2013; AL-ANSARI e ABOUSSEKHRA, 2014; DRAKE e MACLEOD, 2014).



**Figura 4.** Representação da liberação de fatores de crescimento e quimiocinas pelos fibroblastos associados ao câncer, capazes de se comunicar com as células neoplásicas, epiteliais, endoteliais, inflamatórias e pericitos. Adaptado de KALLURI e ZEINSBERG, 2006.

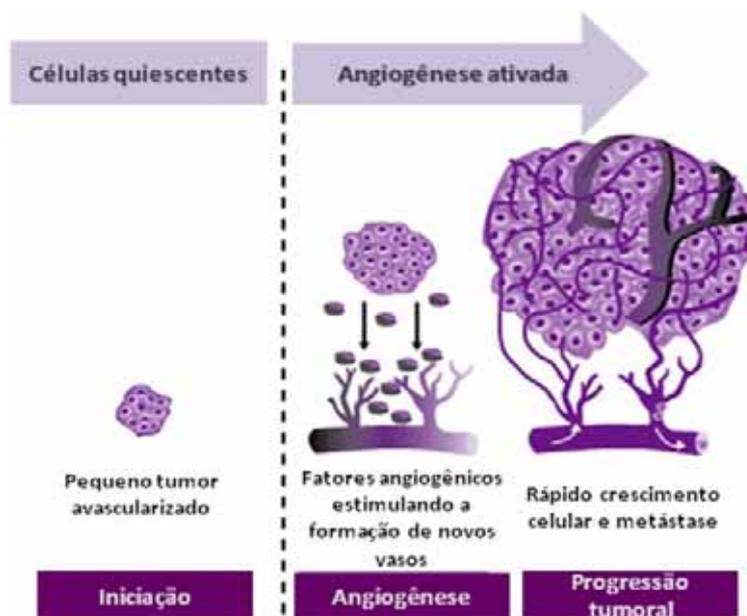
Nesse contexto, sabe-se que CAFs são capazes de remodelar a matriz extracelular (MEC) através da alteração na expressão de microRNAs, afetando genes alvos e causando mudanças como hipometilação do DNA (ÖHLUND, ELYADA e TUVESON, 2014). Além disso, essas células podem causar resistência a muitas terapias contra o câncer (ÖHLUND, ELYADA e TUVESON, 2014). Um estudo de (RONG *et al.*, 2013) demonstrou que células de câncer de mama triplo negativas co-cultivadas com CAFs e tratadas com o quimioterápico taxotere® apresentam aumento da adesão, invasão e proliferação celular.

### 3. PROCESSOS PRESENTES NA TUMORIGÊNESE

A angiogênese é um processo de formação de novos vasos sanguíneos, a partir de um endotélio vascular preexistente (CAO *et al.*, 2005; AL-DISSI *et al.*, 2010; FINLEY, DHAR e POPEL, 2013), que visa o fornecimento de nutrientes e oxigênio permitindo a proliferação das células e conseqüente crescimento e progressão do tumor (TAKAHASHI e SHIBUYA, 2005; GAVALAS *et al.*, 2013).

Nesse contexto, o crescimento tumoral se inicia lentamente e, a medida que a disponibilidade de oxigênio e nutrientes diminui, ocorre a ativação do “interruptor angiogênico” (*angiogenic switch*), caracterizada pelo aumento dos fatores pró-angiogênicos e

diminuição dos anti-angiogênicos, garantindo o crescimento exponencial do tumor. Assim, as células endoteliais quiescentes passam a responder a estímulos de proliferação e migração para formação de novos vasos (**Figura 5**) (BERGERS e BENJAMIN, 2003)

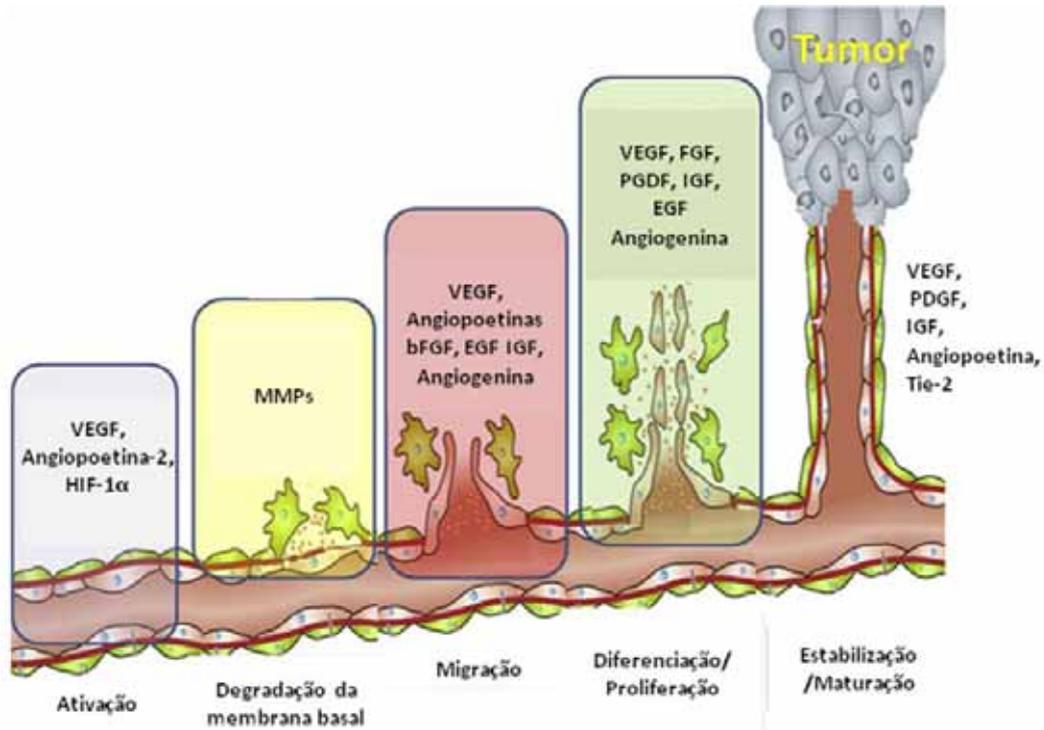


**Figura 5.** Representação da ativação da angiogênese a partir de células quiescentes. (JARDIM-PERASSI, 2014).

A formação de novos vasos sanguíneos pela angiogênese envolve um número sequencial de passos e se inicia a partir de capilares pré-existentes no tumor, além disso, inúmeros fatores participam, como as Angiopoitinas 1 e 2 e seus receptores Tie-1 e Tie-2, Angiogenina, MMPs, PDGF, fator de crescimento de fibroblastos básico (bFGF), EGF, IGF-1, citocinas pró-inflamatórias, entre outros (ARBAB, 2012).

Inicialmente, ocorre a ativação de células endoteliais quiescentes por fatores liberados pelas células tumorais em resposta a condições adversas como privação de nutrientes e oxigênio. Posteriormente, fatores de crescimento pró-angiogênicos produzidos e liberados pelas células tumorais, como VEGF e Angiopoitina-2 atuam na desestabilização inicial dos vasos pré-existentes e aumento da permeabilidade vascular, levando a degradação da membrana basal e da matriz extracelular, pela sua capacidade de induzir a síntese de enzimas proteolíticas tais como as matriz metaloproteinases (MMPs) permitindo a remodelação do citoesqueleto, e eventual liberação de fatores pró-angiogênicos ligados a matriz. Em seguida, ocorre a proliferação e migração das células endoteliais, bem como a formação do tubo, recrutamento e diferenciação de células de suporte perivascular (pericitos). Nessa etapa inúmeros fatores estão envolvidos como VEGF, Angiogenina, PDGF, bFGF, EGF, entre

outros. Ao final, ocorre a maturação e estabilização dos novos vasos formados, com a participação de fatores como a angiopoitina-1 e seu receptor Tie-2 (**Figura 6**) (BERGERS e BENJAMIN, 2003; PRADEEP, SUNILA e KUTTAN, 2005; MILKIEWICZ *et al.*, 2006; CLAPP *et al.*, 2009; COULON *et al.*, 2011; WEIS e CHERESH, 2011).



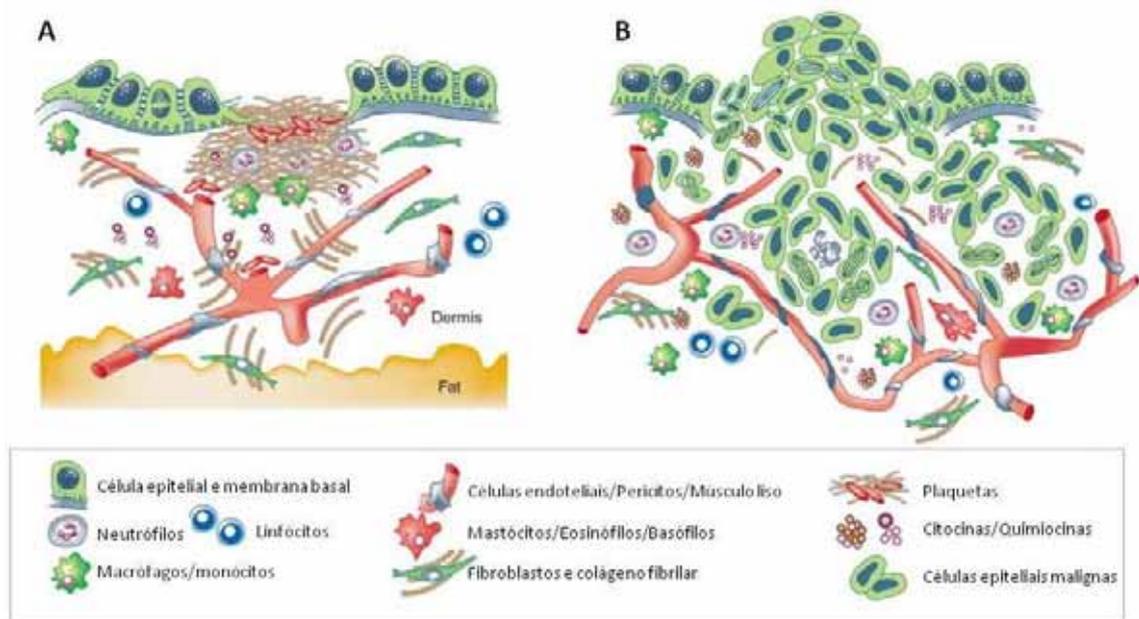
**Figura 6.** Representação das etapas do processo de angiogênese com a participação de inúmeros fatores pró-angiogênicos (JARDIM-PERASSI, 2014).

Sabe-se que o crescimento e progressão de tumores dependem da angiogênese (PARK *et al.*, 2010; RYKALA *et al.*, 2011) e os CAFs são importantes promotores desse processo (KALLURI e ZEISBERG, 2006), uma vez que secretam diversos fatores pró-angiogênicos, tais como o VEGF, TGF- $\beta$ , IL-8 e Leptina (KALLURI e ZEISBERG, 2006; GREENBERG e RUGO, 2010; ROMON *et al.*, 2010; TANEJA *et al.*, 2010).

O processo inflamatório contribui para a carcinogênese (SANSONE e BROMBERG, 2011) promovendo uma resposta fisiológica à proliferação e remodelação tecidual, facilitando assim a progressão neoplásica (BALKWILL e MANTOVANI, 2001; SERVAIS e EREZ, 2013). Características inflamatórias como a infiltração de leucócitos no microambiente, ativação da angiogênese, além de níveis elevados de quimiocinas e citocinas são observados em todos os tumores sólidos (MANTOVANI *et al.*, 2008; SERVAIS e EREZ, 2013).

O microambiente é um sistema dinâmico, e portanto, formado em grande parte por células inflamatórias que liberam suas citocinas. A interação desses fatores pode estimular a

proliferação e sobrevivência de células com danos no DNA, e o acúmulo dessas e outras alterações genéticas permitem a evolução para a malignidade (**Figura 7**) (CONDEELIS e POLLARD, 2006). Algumas células que regulam a expressão de citocinas e quimiocinas para ajudar no recrutamento de células inflamatórias e agir contra as células tumorais atuam de maneira contrária no microambiente tumoral, utilizando esses fatores para promover o crescimento e a progressão tumoral (RICHMOND e THOMAS, 1986). Além disso, as células tumorais são capazes de evadir os principais mecanismos de ação do sistema imunológico, se beneficiando com a inflamação no microambiente tumoral (COUSSENS e WERB, 2002).



**Figura 7.** Representação do tecido não-alterado e do tumor invasivo. **A.** Tecido não-alterado com sua arquitetura organizada. **B.** Carcinoma invasivo com arquitetura desorganizada, presença excessiva de vasos sanguíneos e linfáticos e matriz extracelular remodelada que interagem com outros tipos celulares. Adaptado de COUSSENS e WERB, 2002.

CAFs tem capacidade de orquestrar a inflamação relacionada ao tumor. Um dos mecanismos pelos quais os CAFs regulam a inflamação no tumor é através da secreção de citocinas e quimiocinas que recrutam e modulam a função de células imunológicas do sistema inato e adaptativo no microambiente tumoral.

As citocinas pertencem a uma diversificada família de pequenas proteínas solúveis, expressas por vários tipos de células e tecidos (WILCZYŃSKI, 2006) e têm sido associadas ao câncer, desempenhando papel chave no recrutamento e posicionamento de leucócitos na carcinogênese (NICOLINI, CARPI e ROSSI, 2006), afetando significativamente o crescimento de tumores *in vivo*. Por outro lado, além de serem liberadas pelas células inflamatórias, também podem ser produzidas por células tumorais, representando uma rede

variável de moléculas estrutural e funcionalmente diferentes que podem atuar como fatores de crescimento ou inibição tumoral (ABBAS, LICHTMAN e POBER, 1994).

Nesse contexto, os fibroblastos ativados e células inflamatórias secretam enzimas proteolíticas e citocinas que são mitogênicos para células neoplásicas. Esses fatores potencializam o crescimento do tumor, estimulando a angiogênese, induzindo a migração e maturação de fibroblastos, permitindo assim a propagação metastática (COUSSENS e WERB, 2002).

Apoptose é um processo de morte celular complexo que envolve a expressão de fatores pró-apoptóticos e a inibição de fatores anti-apoptóticos. As alterações celulares observadas são consequência de uma cascata de eventos moleculares e bioquímicos específicos e geneticamente regulados (LOWE e LIN, 2000; GRIVICICH *et al.*, 2007). Defeitos no mecanismo de regulação desse processo contribuem para o crescimento de células anormais representando um importante fator no desenvolvimento e progressão do câncer (LUANPITPONG *et al.*, 2013).

A apoptose pode ocorrer por estímulos externos através da interação de receptores e ligantes da família do fator de necrose tumoral (TNF, Fas ligand, TRAIL). Sua ativação induz o recrutamento da caspase-8 que irá ativar a caspase-3 (BHATTACHARJEE *et al.*, 2012; ULUKAYA *et al.*, 2014). Essa caspase desempenha importante papel na execução da apoptose por meio da produção excessiva de espécies reativas de oxigênio que esgotam as defesas antioxidantes da célula, gerando uma condição de estresse oxidativo, e consequente danos no DNA e morte celular (EL-AZIZ *et al.*, 2005).

O processo de apoptose também pode ser iniciado por estímulos internos como privação de fatores de crescimento, danos no DNA, hipóxia ou ativação de oncogenes (GRIVICICH *et al.*, 2007). O citocromo c representa um papel crucial nesse processo. Quando estimulado, o citocromo c é liberado no citosol onde se liga a Apaf-1 e a pró-caspase-9 para a formação do apoptossomo (HÜTTEMANN *et al.*, 2011; CHEN *et al.*, 2014). Pró-caspases executoras são ativadas pelo apoptossomo, ocorrendo a liberação da caspase-3 (YUAN *et al.*, 2011).

#### **4. MELATONINA**

A melatonina é um hormônio conhecido como N-acetil-5-metoxitriptamina, produzido e secretado principalmente pela glândula pineal (ZAMFIR CHIRU, POPESCU e GHEORGHE, 2014), que possui diversas funções fisiológicas, dentre as quais se destaca a cronobiológica

(SOUSA-NETO, 2005; MAGANHIN *et al.*, 2008). Além disso, a melatonina atua sobre o sistema reprodutor, cardiovascular, sistema imunológico, no crescimento e envelhecimento (MAGANHIN *et al.*, 2008; PANDI-PERUMAL *et al.*, 2013), além de possuir importante papel em processos patológicos, incluindo o câncer (LUCHETTI *et al.*, 2010).

LUCHETTI *et al.*, 2010 mostraram que a melatonina é eficaz na inibição do crescimento tumoral *in vitro* e *in vivo*, sendo que essa capacidade em neutralizar o crescimento tumoral faz parte de um amplo espectro de mecanismos envolvidos (MEDIAVILLA *et al.*, 2010).

Diversos mecanismos de ação da melatonina têm sido propostos, sugerindo-se aumentar a imunidade local (LUCHETTI *et al.*, 2010; ALVAREZ-GARCÍA *et al.*, 2012), a capacidade antioxidante celular (MIRUNALINI S, DHAMODHARAN G., 2010), expressão de genes supressores tumorais (MEDIAVILLA *et al.*, 2010) além da indução da apoptose (Proietti *et al.*, 2011). Alguns estudos demonstram que a melatonina minimiza a inflamação, bloqueando fatores de transcrição, como o fator nuclear NF-kB inibindo a expressão de citocinas e interleucinas pró-inflamatórias, em especial da ciclooxigenase 2 (COX-2), de espécies reativas de oxigênio (iNOS), MMPs e do VEGF (LI *ET AL.*, 2005; KORKMAZ, ROSALES-CORRAL e REITER, 2012).

SASAKI *et al.*, 2002 observaram ainda que a melatonina é capaz de reduzir significativamente os níveis de TNF- $\alpha$  em tumores mamários humanos. Além disso, ALVAREZ-GARCÍA *et al.*, 2012 propõem que a melatonina regula citocinas que influenciam no microambiente tumoral. Assim, a melatonina pode ser considerada importante alvo no controle da progressão tumoral, criando assim, um caminho promissor para sua utilização como agente terapêutico no câncer.

*Objetivos*

---

## II. OBJETIVOS

### Objetivo geral

- O presente trabalho teve como objetivo avaliar a interação dos CAFs em co-cultivo com linhagens de câncer de mama metastáticas humana e canina sob a ação da melatonina, verificando a expressão de proteínas relacionadas à angiogênese, apoptose e ao perfil diferencial de citocinas.

### Objetivos específicos

- Determinar a eficácia da melatonina na viabilidade celular das linhagens MDA-MB-231 e CF-41;
- Avaliar a expressão proteica dos fatores envolvidos nos processos de angiogênese, apoptose e inflamação antes e após o tratamento com melatonina nas linhagens MDA-MB-231 e CF-41 e em co-cultivo com CAFs;
- Identificar as vias de sinalização celular das proteínas diferencialmente expressas após o tratamento com melatonina por ferramentas de bioinformática

*Capítulos*

---

### III. CAPÍTULOS

Os resultados referentes aos objetivos desta dissertação serão apresentados a seguir na forma de dois artigos científicos, conforme as normas de publicações específicas de cada periódico:

#### Artigo I

**Título:** Interação de fibroblastos associados ao câncer com a linhagem tumoral triplo-negativa MDA-MB-231 em resposta ao tratamento com melatonina

**Autores:** Larissa Bazela Maschio; Gabriela Bottaro Gelaleti; Marina Gobbe Moschetta; Thaiz Ferraz Borin; Bruna Victorasso Jardim-Perassi; Newton Antonio Bordin Júnior; Rosimeire Aparecida Roela; Juliana Ramos Lopes; Lizandra Akina Corrêa; Jéssica Picinin Cardoso; Debora Aparecida Pires de Campos Zuccari.

**Periódico:** *BMC Câncer* (a ser submetido)

#### Artigo II

**Título:** Interação de fibroblastos associados ao câncer (CAFs) com linhagem metastática canina (CF-41) em resposta ao tratamento com melatonina

**Autores:** Larissa Bazela Maschio; Gabriela Bottaro Gelaleti; Giovanna Rossi Varallo; Marina Gobbe Moschetta; Thaiz Ferraz Borin; Bruna Victorasso Jardim-Perassi; Juliana Ramos Lopes; Debora Aparecida Pires de Campos Zuccari.

**Periódico:** *Anti-Câncer Agents in Medicinal Chemistry* (a ser submetido)

*Artigo I*

---

CAPITULO I - Interação de fibroblastos associados ao câncer com a linhagem tumoral triplo-negativa MDA-MB-231 em resposta ao tratamento com melatonina

**Interação de fibroblastos associados ao câncer com a linhagem tumoral triplo-negativa MDA-MB-231 em resposta ao tratamento com melatonina**

Larissa Bazela Maschio<sup>1,2</sup> - larissa\_maschio@hotmail.com

Gabriela Bottaro Gelaleti<sup>1,2</sup> - gabi\_b\_g@yahoo.com.br

Marina Gobbe Moschetta<sup>2,3</sup> - marinagobbe@hotmail.com

Thaiz Ferraz Borin<sup>2</sup> - thaiz80@yahoo.com.br

Bruna Victorasso Jardim-Perassi<sup>2</sup> - brunavj@hotmail.com

Newton Antonio Bordin Júnior<sup>2</sup> – bordinjunior@gmail.com

Rosimeire Aparecida Roela<sup>4</sup> - rose@lim24.fm.usp.br

Juliana Ramos Lopes<sup>1,2</sup> - jurlp@hotmail.com

Lizandra Akina Corrêa<sup>2</sup> - lillyaki@hotmail.com

Jessica Picinin Cardoso<sup>2</sup> - jessica.picinin@gmail.com

Debora Aparecida Pires de Campos Zuccari<sup>1,2,3</sup> - debora.zuccari@famerp.br\*

<sup>1</sup>Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP/IBILCE), Programa de Pós-Graduação em Genética. Rua: Cristovão Colombo, 2265, CEP: 15054-000 – Cidade: São José do Rio Preto, SP, Brasil.

<sup>2</sup>Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP). Laboratório de Investigação Molecular do Câncer (LIMC). Avenida: Brigadeiro Faria Lima, 5416, CEP: 15090-000 – Cidade: São José do Rio Preto, SP, Brasil.

<sup>3</sup>Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP), Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. Avenida: Brigadeiro Faria Lima, 5416, CEP: 15090-000 – Cidade: São José do Rio Preto, SP, Brasil.

<sup>4</sup>Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), Laboratório de Oncologia Experimental, departamento de Radiologia e Oncologia. Avenida: Doutor. Arnaldo, 455, CEP: 01246-903 – Cidade: São Paulo, SP, Brasil.

**\*Autor de correspondência:** Profa. Dra. Debora Ap. Pires de Campos Zuccari, Laboratório de Investigação Molecular do Câncer (LIMC), Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP), Avenida Brigadeiro Faria Lima, 5416, Vila São Pedro, São José do Rio Preto (SP) 15090-000, Brasil. Tel.: 55 (17) 32015885. e-mail: debora.zuccari@famerp.br

## RESUMO

**Introdução:** Fibroblastos associados ao câncer (CAFs) são as células mais abundantes no microambiente tumoral, capazes de secretar fatores de crescimento e atuar na progressão tumoral. O hormônio melatonina tem sido associado a diversos mecanismos de ação com efeitos oncostáticos e oncoprotetores, além de participar da redução da síntese de fibroblastos circundantes e células endoteliais no câncer de mama. Os objetivos deste estudo foram determinar a eficácia da melatonina na viabilidade celular e na expressão de proteínas envolvidas nos processos de angiogênese, inflamação e apoptose na linhagem tumoral mamária triplo negativa (MDA-MB-231) e no co-cultivo com CAFs, a fim de traçar as principais vias de sinalização das proteínas atuantes no processo tumorigênico moduladas pela melatonina. **Materiais e Métodos:** A viabilidade celular foi mensurada pelo teste de MTT e a expressão proteica pelo *Membrane Antibody Array* no extrato e sobrenadante celulares das culturas após o tratamento com melatonina. **Resultados:** O tratamento com 1 mM de melatonina por 48 horas reduziu a viabilidade celular em MDA-MB-231, CAFs e no co-cultivo ( $p \leq 0,05$ ). A análise proteica semiquantitativa após tratamento com melatonina mostrou redução da expressão das proteínas EGF, ENA-78 bFGF, IL-8, Leptina, MCP-1, PDGF-bb, IL-6 e aumento da TIMP-1, IL-6, VEGF, TGF- $\beta$  e trombopoietina, envolvidas na angiogênese. Redução da Angiopietina-2, MMP-1, MMP-9, PECAM-1, TIE-2, TNF- $\alpha$ , uPAR, GM-CSF, IL-10, IL-12p40, IL-12p70, IL-13, IL-15, MCP-2, MDC, MIP-1 delta, SDF-1, TARC, Oncostatin M e aumento da I-309, SCF, IL-4 e MCP-3, atuantes na inflamação e, aumento das proteínas apoptóticas citocromo C, DR6, IGFBP-3, IGFBP-5, IGFBP-6, livina, p21, p53, TNF-RII, XIAP, hTRA, HPS27, IGF-1R e BIM comparadas ao grupo controle veículo ( $p \leq 0,05$ ). A análise por bioinformática indicou que as proteínas diferencialmente expressas estão inseridas nas vias de sinalização *cytokine-cytokine receptor interaction*, jak-STAT e na via do câncer ( $p < 0,05$ ). **Conclusões:** A melatonina mostrou-se eficaz na redução da viabilidade celular, na inibição de proteínas angiogênicas e inflamatórias e indução da expressão de proteínas apoptóticas nas células MDA-MB-231 e na interação com CAFs, o que determina sua influência do microambiente tumoral e potencial valor terapêutico no câncer de mama.

**Palavras-chave:** câncer de mama, fibroblastos, microambiente tumoral, angiogênese, inflamação, apoptose, melatonina.

## INTRODUÇÃO

O câncer de mama representa um problema de saúde mundial, sendo a neoplasia mais comum e com maior taxa de mortalidade entre as mulheres [1, 2] em países desenvolvidos. A alta taxa de mortalidade se deve a progressão tumoral e surgimento de metástases, que é requerida neovascularização [3]. Além disso, a presença de múltiplas subpopulações de células genotípica e/ou fenotipicamente distintas em um único tumor modulam o comportamento das células tumorais [4-6], que atuam favoravelmente fatores pró-inflamatórios e anti-apoptóticos [7].

A heterogeneidade do microambiente tumoral se caracteriza pela presença de células neoplásicas associadas a fibroblastos, miofibroblastos, pericitos, células endoteliais e uma variedade de células inflamatórias [8, 9]. Os fibroblastos são as células mais abundantes no estroma do tecido mamário [10], sendo considerado um dos principais componentes celulares que contribuem para o desenvolvimento do tumor [6, 11]. No início da tumorigênese, os fibroblastos atuam contra a progressão tumoral, no entanto, com o avanço do processo, são subvertidos para promoção do crescimento tumoral, sendo denominados fibroblastos associados ao câncer (CAFs) [12-16].

CAFs são uma subpopulação de fibroblastos ativados [17] que secretam proteínas da matriz extracelular e metaloproteinases (MMPs) (MMP-1, MMP-2, MMP-3 e MMP-9), fatores de crescimento, como o fator de crescimento semelhante à insulina -1 (IGF-1), epitelial (EGF), derivado de plaquetas (PDGF), transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) e o endotelial vascular (VEGF) além de citocinas, como as interleucinas (ILs)-1 e 6, a proteína quimioatraente de monócitos -1 (MCP-1) e o fator derivado de células do estroma -1 (SDF-1), importantes na promoção da angiogênese e proliferação celular [7, 12, 15, 17-21].

Tem sido proposto ainda, importante papel destas células no estabelecimento do prognóstico do câncer de mama, tornando-as importantes alvos nas terapias anti-tumorais por meio da supressão de seus efeitos parácrinos [15]

Um novo foco das pesquisas em câncer de mama é o entendimento da relação das moléculas liberadas no ambiente tumoral com a doença propriamente dita, com o objetivo de identificar possíveis marcadores preditivos e prognósticos e desenvolver novas estratégias terapêuticas [22-24]. A maioria das pesquisas atuais focam em bloquear apenas as células tumorais, entretanto, torna-se importante a descoberta de novas terapias que possam atuar no microambiente tumoral [22-24].

A melatonina, hormônio naturalmente produzido e secretado na glândula pineal, tem comprovada eficácia na inibição do crescimento tumoral em estudos *in vitro* e *in vivo* [3, 16,

25]. Atua modulando o sistema imune, agindo na resposta inata, humoral e celular [26], no bloqueio de fatores de transcrição como o fator nuclear kappa B (NF-kB), na inibição da expressão de citocinas pró-inflamatórias [27, 28] e na indução da apoptose, pela parada do ciclo celular [29]. Além disso, Alvarez-García *et al.* [30] propõem que a melatonina reduz a produção de fibroblastos circundantes e células endoteliais no câncer de mama.

Os objetivos desse estudo foram determinar a eficácia da melatonina na viabilidade celular e na expressão de proteínas envolvidas nos processos de angiogênese, inflamação e apoptose na linhagem tumoral mamária triplo negativa (MDA-MB-231) e no co-cultivo com CAFs a fim de traçar as principais vias de sinalização das proteínas atuantes no processo tumorigênico moduladas pela melatonina.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### ***Considerações éticas***

Esse estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (Parecer no. 354.970).

### ***Cultivo celular***

As células da linhagem tumoral mamária triplo negativa (MDA-MB-231) (ATCC, Manassas, VA, USA) foram cultivadas em frascos de cultura 75 cm<sup>2</sup> (Sarstedt, Nümbrecht, Alemanha) com meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) alta glicose (Cultilab, Campinas, SP, Brasil) suplementado com 10 % de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab, Campinas, SP, Brasil), penicilina (10.000 unid/mL), estreptomicina (500 µg/mL) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e L-glutamina (2 mM) (Cultilab, Campinas, SP, Brasil) em estufa a 37 °C e 5 % de CO<sub>2</sub>, até atingirem 80–90 % de confluência celular.

Para o estabelecimento de cultura primária de CAFs, foram coletados fragmentos tumorais de 0,5 cm<sup>2</sup> da mama de mulheres (n=7) atendidas no ambulatório de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital de Base da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP) submetidas ao procedimento cirúrgico para a retirada do tumor, com diagnóstico histopatológico de carcinoma ductal invasivo e sem terapia neoadjuvante com idade de 37 a 70 anos (média 56 anos). Os fibroblastos foram obtidos a partir da técnica de explante, de acordo com Santos *et al.* [31], a qual consiste em lavar o tumor em solução salina 1X, microfragmentar e incubar em meio de cultura DMEM baixa glicose e nutriente HAM-F12 na proporção de 1:1 (Cultilab, Campinas, SP, Brasil) suplementado com 20 % de SFB, penicilina (10.000 unid/mL), estreptomicina (500 µg/mL) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA),

anfotericina B (250 ug/mL) (*Sigma-Aldrich*, St. Louis, MO, EUA) e L-glutamina (2 mM) (Cultilab, Campinas, SP, Brasil) em estufa a 37 °C e 5 % de CO<sub>2</sub>, até que as células atinjam 80–90 % de confluência.

Após três passagens as culturas primárias foram caracterizadas por imunocitoquímica semiquantitativa como CAFs pela alta expressão de anti-vimentina, diluição 1:100 (Dako), anti- $\alpha$  actina do músculo liso ( $\alpha$ -SMA), diluição 1:500 (*Abcam*) e anti-TGF $\beta$ , diluição 1:500 (*Abcam*) e expressão negativa de anti-citoqueratina, diluição 1:500 (*Abcam*), utilizando o kit *STARR TREK Universal HRP Detection* (*Medical Biocare*, Concord, CA, USA), seguindo as instruções do fabricante.

Após a caracterização, para a realização das próximas etapas, foram selecionadas as células de uma paciente de 67 anos de idade, com diagnóstico histopatológico de carcinoma ductal invasivo e painel de marcadores imuno-histoquímicos: receptor de estrógeno positivo (RE+), receptor de progesterona negativo (RP-), HER-2/Neu positivo, índice de proliferação celular positivo (Ki-67+) e gene supressor tumoral p53 negativo.

#### ***Ensaio de viabilidade celular por MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)***

As células MDA-MB-231 e os CAFs foram semeados em placas de 0,31 cm<sup>2</sup> (*Sarstedt*, Nümbrecht, Alemanha), com 100 uL de meio contendo 0,05 x 10<sup>6</sup> MDA-MB-231/poço e 0,03 x 10<sup>6</sup> CAFs/poço, bem como em co-cultivo, onde foram plaqueadas, 0,04 x 10<sup>6</sup> MDA-MB-231/poço em adição a 0,01 x 10<sup>6</sup> CAFs/poço. As células foram incubadas com meio contendo diferentes concentrações de melatonina (*Sigma-Aldrich*, St. Louis, MO, EUA) (0,001 mM; 0,01 mM; 0,1 mM and 1 mM) e adicionado um grupo veículo (sem tratamento) contendo a concentração máxima de agente diluente (etanol 0,05 %). Após 48 horas, 10 uL de solução MTT (*Invitrogen Life Technologies*, Carlsbad, CA, EUA) foi adicionada para cada poço e as placas foram incubadas a 37 °C durante 4 horas. Para solubilizar os cristais de formazan MTT, as células foram incubadas com dimetilsulfóxido (DMSO) (*Sigma-Aldrich*, St. Louis, MO, EUA) durante 10 minutos a 37 °C. A absorbância foi medida em leitor de ELISA (*Thermo Fisher*, Waltham, MA, EUA) a 540 nm. A viabilidade celular (%) foi calculada para todos os grupos, em comparação com ao grupo veículo. Todas as amostras foram realizadas em triplicatas.

### ***Co-cultivo celular e extração proteica***

O ensaio de co-cultura foi realizado em placas de seis poços com área de 4,7 cm<sup>2</sup> por poço (Corning Life Sciences, Tewksbury, MA, USA) onde foram plaqueadas 0,5 x 10<sup>6</sup> células epiteliais sobre a superfície de cada poço, com meio de cultura já descrito. Após 24 horas, foram inseridos os insertos com membrana de 4,2 cm<sup>2</sup> e 0,4 µm de poro (Corning Life Sciences, Tewksbury, MA, USA) e sob os insertos foram plaqueados 0,15 x 10<sup>6</sup> CAFs, em meio de cultura já descrito, mimetizando a proporção entre células epiteliais e células do estroma, observada na glândula mamária (70:30), de acordo com Rozenchan et al. [32]. Após 24 horas em co-cultivo, o meio de cultura foi substituído para meio específico de tratamento, e realizado o tratamento com 1 mM de melatonina por 48 horas para posterior quantificação proteica.

Para mensuração dos níveis proteicos, foram extraídos o lisado celular e o sobrenadante a partir das células MDA-MB-231 e do co-cultivo com CAFs após o tratamento com 1 mM de melatonina e no grupo veículo. Após o período de 48 horas, as células foram lavadas com PBS 1X e em seguida foi realizada a lise celular com o tampão 1X MILLIPLEX® MAP Lysis Buffer, contendo 1 mM do inibidor de fosfatase (Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>) e 1:10 do inibidor de protease (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). A solução foi centrifugada a 5000 G por 10 minutos a 4 °C para precipitação dos “debris” celulares e coleta do sobrenadante, sendo posteriormente mantidos a -80 °C. Posteriormente foi coletado o meio sobrenadante e utilizado o dispositivo de ultrafiltração (Amicon®, Merck Millipore, Billerica, MA, EUA) para concentrar as proteínas presentes no meio. O sobrenadante foi incluído na coluna contendo filtro no tamanho de três kDa, e centrifugado a 4000 G por 60 minutos, proteínas com tamanho maior que três kDa foram retidas pelo filtro, e posteriormente quantificadas.

A concentração de proteína total para todos os grupos foi quantificada utilizando o método de bicinchoninic acid (BCA), pelo kit Micro BCA Protein Assay (*Thermo Fisher Scientific*, Waltham, MA, USA) de acordo com as instruções do fabricante.

### ***Quantificação da expressão protéica***

Para quantificação proteica, foram utilizados os kits *Human Angiogenesis Array C1*, *Custom C-series Human Cytokine Antibody Array* e *Human Apoptosis Array C1* (*RayBiotech*, Norcross, GA, EUA) (**Tabelas 1, 2 e 3**). Todas as amostras foram incluídas em duplicata, contendo controles positivos e negativos.

As membranas foram incubadas em placas de quatro cavidades com 2 mL de solução de bloqueio tampão 1X (*RayBiotech*, Norcross, GA, EUA) por 30 minutos. Foram adicionados nas membranas 600 ug de proteína de cada grupo e incubadas a 4 °C “overnight”, sendo 300 ug de proteínas proveniente do lisado celular e 300 ug do sobrenadante. A solução foi descartada e as membranas lavadas três vezes com tampão de lavagem 1 X (*RayBio I*, *RayBiotech*, Norcross, GA, EUA), e duas vezes com tampão de lavagem 1 X (*RayBio II*, *RayBiotech*, Norcross, GA, EUA) por 5 minutos cada. A solução de biotina conjugada anti-citocinas (*RayBiotech*, Norcross, GA, EUA) foi adicionada e as amostras foram incubadas a 4 °C “overnight”. As membranas foram novamente lavadas com tampão de lavagem I e II e incubadas com a solução *horseradish peroxidase* (HRP) estreptavidina 1000X (*RayBiotech*, Norcross, GA, EUA) a 4 °C “overnight”. Posteriormente, as membranas foram novamente lavadas e incubadas por 2 minutos em solução de detecção (*RayBiotech*, Norcross, GA, EUA) e foram expostas ao sistema *ChemiDoc* (*BioRad*, Hercules, CA, EUA) e quantificadas espectrofotometricamente.

A densidade óptica referente à expressão de cada proteína foi normalizada com o controle positivo, estabelecido para cada membrana, e quantificada utilizando o software *ImageJ* (*NIH*, Bethesda, MD, EUA).

**Tabela 1.** Disposição das proteínas nas membranas do *Kit Human Angiogenesis Array C1*, composto por 20 diferentes citocinas/fatores.

	A	B	C	D	E	F	G	H
1	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Angiogenina ( <i>ANG</i> )	EGF ( <i>EGF</i> )	ENA-78 ( <i>CXCL5</i> )	bFGF ( <i>FGF2</i> )
2	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Angiogenina ( <i>ANG</i> )	EGF ( <i>EGF</i> )	ENA-78 ( <i>CXCL5</i> )	bFGF ( <i>FGF2</i> )
3	GRO ( <i>CXCL1</i> )	IFN gama ( <i>IFNG</i> )	IGF-1 ( <i>IGF1</i> )	IL-6 ( <i>IL6</i> )	IL-8 ( <i>CXCL8</i> )	Leptina ( <i>LEP</i> )	MCP-1 ( <i>CCL2</i> )	PDGF-BB ( <i>PDGFB</i> )
4	GRO ( <i>CXCL1</i> )	IFN gama ( <i>IFNG</i> )	IGF-1 ( <i>IGF1</i> )	IL-6 ( <i>IL6</i> )	IL-8 ( <i>CXCL8</i> )	Leptina ( <i>LEP</i> )	MCP-1 ( <i>CCL2</i> )	PDGF-BB ( <i>PDGFB</i> )
5	PLGF ( <i>PGF</i> )	RANTES ( <i>CCL5</i> )	TGF-β1 ( <i>TGFB1</i> )	TIMP-1 ( <i>TIMP1</i> )	TIMP-2 ( <i>TIMP2</i> )	Trombopoietina ( <i>THPO</i> )	VEGF-A ( <i>VEGFA</i> )	VEGF-D ( <i>FIGF</i> )
6	PLGF ( <i>PGF</i> )	RANTES ( <i>CCL5</i> )	TGF-β1 ( <i>TGFB1</i> )	TIMP-1 ( <i>TIMP1</i> )	TIMP-2 ( <i>TIMP2</i> )	Trombopoietina ( <i>THPO</i> )	VEGF-A ( <i>VEGFA</i> )	VEGF-D ( <i>FIGF</i> )
7	Branco	Branco	Branco	Branco	Branco	Branco	Negativo	Positivo
8	Branco	Branco	Branco	Branco	Branco	Branco	Negativo	Positivo

Angiogenina; EGF = fator de crescimento epidermal; ENA-78 = Proteína epitelial ativadora de neutrófilos -78; bFGF = Fator de crescimento de fibroblastos básico; GRO = Oncogene relacionado ao crescimento; IFN gama = interferon gama; IGF-1= fator de crescimento semelhante a insulina-1; IL-6 = Interleucina-6; IL-8 = Interleucina-8; Leptina; MCP-1 = Proteína quimioatraente de monócitos-1; PDGF-BB = Fator de crescimento derivado de plaquetas-BB; PLGF= Fator de crescimento placentário; RANTES; TGF-β1 = Fator de crescimento transformante beta 1; TIMP-1 = proteína inibidora de metaloproteinase tecidual 1; TIMP-2 =

proteína inibidora de metaloproteinase tecidual 2; Trombopoietina; VEGF = Vascular Fator de crescimento vascular endotelial; VEGF-D = Fator de crescimento vascular endotelial D.

**Tabela 2.** Disposição das proteínas nas membranas do *Kit Custom Cytokine Antibody Array*, composto por 39 diferentes citocinas/fatores.

	A	B	C	D	E	F
1	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Angiopietina-1 ( <i>ANGPT1</i> )	Angiopietina-2 ( <i>ANGPT2</i> )
2	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Angiopietina-1 ( <i>ANGPT1</i> )	Angiopietina-2 ( <i>ANGPT2</i> )
3	IL-4 ( <i>IL4</i> )	I-TAC ( <i>CXCL11</i> )	MCP-3 ( <i>CCL7</i> )	MCP-4 ( <i>CCL13</i> )	MMP-1 ( <i>MMP1</i> )	MMP-9 ( <i>MMP9</i> )
4	IL-4 ( <i>IL4</i> )	I-TAC ( <i>CXCL11</i> )	MCP-3 ( <i>CCL7</i> )	MCP-4 ( <i>CCL13</i> )	MMP-1 ( <i>MMP1</i> )	MMP-9 ( <i>MMP9</i> )
5	GM-CSF ( <i>CSF2</i> )	GRO $\alpha$ ( <i>CXCL1</i> )	IL-3 ( <i>IL3</i> )	IL-5 ( <i>IL5</i> )	IL-7 ( <i>IL7</i> )	IL-10 ( <i>IL10</i> )
6	GM-CSF ( <i>CSF2</i> )	GRO $\alpha$ ( <i>CXCL1</i> )	IL-3 ( <i>IL3</i> )	IL-5 ( <i>IL3</i> )	IL-7 ( <i>IL7</i> )	IL-10 ( <i>IL10</i> )
7	MDC ( <i>CCL22</i> )	MIG ( <i>CXCL9</i> )	MIP-1delta ( <i>CCL15</i> )	SCF ( <i>KITLG</i> )	SDF-1 ( <i>CXCL12</i> )	TARC ( <i>CCL17</i> )
8	MDC ( <i>CCL22</i> )	MIG ( <i>CXCL9</i> )	MIP-1delta ( <i>CCL15</i> )	SCF ( <i>KITLG</i> )	SDF-1 ( <i>CXCL12</i> )	TARC ( <i>CCL17</i> )
	G	H	I	J	K	L
1	Angiostatina ( <i>PLG</i> )	G-CSF ( <i>CSF3</i> )	I-309 ( <i>CCL1</i> )	IL-1 $\alpha$ ( <i>IL1A</i> )	IL-1 $\beta$ ( <i>IL1B</i> )	IL-2 ( <i>IL2</i> )
2	Angiostatina ( <i>PLG</i> )	G-CSF ( <i>CSF3</i> )	I-309 ( <i>CCL1</i> )	IL-1 $\alpha$ ( <i>IL1A</i> )	IL-1 $\beta$ ( <i>IL1B</i> )	IL-2 ( <i>IL2</i> )
3	PECAM-1 ( <i>PECAM1</i> )	TIE-2 ( <i>TEK</i> )	TNF- $\alpha$ ( <i>TNF</i> )	uPAR ( <i>PLAUR</i> )	VEGF-R2 ( <i>KDR</i> )	VEGF-R3 ( <i>FLT4</i> )
4	PECAM-1 ( <i>PECAM1</i> )	TIE-2 ( <i>TEK</i> )	TNF- $\alpha$ ( <i>TNF</i> )	uPAR ( <i>PLAUR</i> )	VEGF-R2 ( <i>KDR</i> )	VEGF-R3 ( <i>FLT4</i> )
5	IL-12p40 ( <i>IL12B</i> )	IL-12p70 ( <i>IL12A</i> )	IL-13 ( <i>IL13</i> )	IL-15 ( <i>IL15</i> )	MCP-2 ( <i>CCL8</i> )	M-CSF ( <i>CSF1</i> )
6	IL-12p40 ( <i>IL12B</i> )	IL-12p70 ( <i>IL12A</i> )	IL-13 ( <i>IL13</i> )	IL-15 ( <i>IL15</i> )	MCP-2 ( <i>CCL8</i> )	M-CSF ( <i>CSF1</i> )
7	Oncostatina M	Branco	Branco	Branco	Branco	Branco
8	Oncostatina M	Branco	Branco	Branco	Branco	Branco

Angiopietina-1; Angiopietina-2; Angiostatina; G-CSF = Fator estimulador de colônias de granulócitos; I-309/CCL1 = Citocina ligante 1; IL-1 $\alpha$  = Interleucina-1 alfa; IL-1 $\beta$  = Interleucina-1 beta; IL-2 = Interleucina-2; IL-4 = Interleucina-4; I-TAC = citocina alfa de células T induzida por interferon; MCP-3 = Proteína quimioatraente de monócitos-3; MCP-4 = Proteína quimioatraente de monócitos-4; MMP-1 = Metaloproteinase-1; MMP-9 = Metaloproteinase-9; PECAM-1 = Molécula de adesão celular endotelial de plaquetas; TIE-2 = Receptor de proteína tirosina quinase-2 ; TNF- $\alpha$  = Fator de necrose tumoral alfa; uPAR = Receptor de uroquinase; VEGFR-2 = Fator de crescimento vascular endotelial receptor-2; VEGFR-3 = Fator de crescimento vascular endotelial receptor-3; GM-CSF = Fator estimulador de colônias de granulócitos e monócitos; GRO- $\alpha$  = Oncogene relacionado ao crescimento alfa; IL-3 = Interleucina-3; IL-5 = Interleucina -5; IL-7 = Interleucina-7; IL-10 = Interleucina-10; IL-12p40 = Interleucina-12p40; IL12p70 = Interleucina-12p70; IL-13 = Interleucina-13; IL-15 = Interleucina-15; MCP-2 = Proteína quimioatraente de monócitos-2; M-CSF = Fator estimulador de colônias de macrófagos; MDC = Quimiocina derivada de macrófagos; MIG = Monocina induzida pelo interferon gama; MIP-1-delta = Proteína inflamatória de macrófagos-1 delta; SCF = Fator de célula-tronco; SDF-1= Fator derivado de células estromais-1; TARC = Quimiocina do timo regulada por ativação; Oncostatina-M.

**Tabela 3.** Disposição das proteínas nas membranas do *Kit Human Apoptosis Array C1*, composto por 43 diferentes fatores.

	A	B	C	D	E	F	G
1	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Branco	Branco	BAD ( <i>bad</i> )
2	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Branco	Branco	BAD ( <i>bad</i> )
3	CD40 ( <i>CD40</i> )	CD40 LIGAND ( <i>CD40LG</i> )	cIAP-2 ( <i>BIRC3</i> )	cytoC ( <i>CYCS</i> )	DR6 ( <i>TNFRSF21</i> )	Fas ( <i>FAS</i> )	Fas ligand ( <i>FASLG</i> )
4	CD40 ( <i>CD40</i> )	CD40 LIGAND ( <i>CD40LG</i> )	cIAP-3 ( <i>BIRC3</i> )	cytoC ( <i>CYCS</i> )	DR6 ( <i>TNFRSF21</i> )	Fas ( <i>FAS</i> )	Fas ligand ( <i>FASLG</i> )
5	IGFBP-1 ( <i>IGFBP1</i> )	IGFBP-2 ( <i>IGFBP2</i> )	IGFBP-3 ( <i>IGFBP3</i> )	IGFBP-4 ( <i>IGFBP4</i> )	IGFBP-5 ( <i>IGFBP5</i> )	IGFBP-6 ( <i>IGFBP6</i> )	IGF-1R ( <i>IGF1R</i> )
6	IGFBP-1 ( <i>IGFBP1</i> )	IGFBP-2 ( <i>IGFBP2</i> )	IGFBP-3 ( <i>IGFBP3</i> )	IGFBP-4 ( <i>IGFBP4</i> )	IGFBP-5 ( <i>IGFBP5</i> )	IGFBP-6 ( <i>IGFBP6</i> )	IGF-1R ( <i>IGF1R</i> )
7	TNF-RII ( <i>TNFRSF1B</i> )	TNF- $\alpha$ ( <i>TNF</i> )	TNF- $\beta$ ( <i>LTA</i> )	TRAIL R1 ( <i>TNFRSF10A</i> )	TRAIL R2 ( <i>TNFRSF10B</i> )	TRAIL R3 ( <i>TNFRSF10C</i> )	TRAIL R4 ( <i>TNFRSF10D</i> )
8	TNF-RII ( <i>TNFRSF1B</i> )	TNF- $\alpha$ ( <i>TNF</i> )	TNF- $\beta$ ( <i>LTA</i> )	TRAIL R1 ( <i>TNFRSF10A</i> )	TRAIL R2 ( <i>TNFRSF10B</i> )	TRAIL R3 ( <i>TNFRSF10C</i> )	TRAIL R4 ( <i>TNFRSF10D</i> )
	H	I	J	K	L	M	N
1	BAX ( <i>BAX</i> )	BCL-2 ( <i>BCL2</i> )	BCL-W ( <i>BCL2L2</i> )	BID ( <i>BID</i> )	BIM ( <i>BCL2L11</i> )	Caspase-3 ( <i>CASP3</i> )	Caspase-8 ( <i>CASP8</i> )
2	BAX ( <i>BAX</i> )	BCL-2 ( <i>BCL2</i> )	BCL-W ( <i>BCL2L2</i> )	BID ( <i>BID</i> )	BIM ( <i>BCL2L11</i> )	Caspase-3 ( <i>CASP3</i> )	Caspase-8 ( <i>CASP8</i> )
3	Branco	HSP27 ( <i>HPSB1</i> )	HSP60 ( <i>HPSA14</i> )	HSP70 ( <i>HPSA4</i> )	hTRA ( <i>HTRA1</i> )	IGF-1 ( <i>IGF1</i> )	IGF-2 ( <i>IGF2</i> )
4	Branco	HSP27 ( <i>HPSB1</i> )	HSP60 ( <i>HPSA14</i> )	HSP70 ( <i>HPSA4</i> )	hTRA ( <i>HTRA1</i> )	IGF-1 ( <i>IGF1</i> )	IGF-2 ( <i>IGF1</i> )
5	Livin ( <i>BIRC7</i> )	p21 ( <i>CDKN1A</i> )	p27 ( <i>SSSCA1</i> )	p53 ( <i>TP53</i> )	SMAC ( <i>DIABLO</i> )	Survivina ( <i>BIRC5</i> )	TNF-RI ( <i>TNFSRIA</i> )
6	Livin ( <i>BIRC7</i> )	p21 ( <i>CDKN1A</i> )	p27 ( <i>SSSCA1</i> )	p53 ( <i>TP53</i> )	SMAC ( <i>DIABLO</i> )	Survivina ( <i>BIRC5</i> )	TNF-RI ( <i>TNFSRIA</i> )
7	xIAP ( <i>XIAP</i> )	Branco	Branco	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo
8	xIAP ( <i>XIAP</i> )	Branco	Branco	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo

BAD = Agonista de morte celular associado a BCL2; BAX = Proteína X associada a BCL-2; BCL-2 = Linfoma de células B-2; BID = BID = Agonista de morte que interage com o domínio BH3; caspase-3; caspase-8; CD40; CD40 ligand = Ligante CD40; cIAP-2 = inibidor de apoptose celular-2; cytoC = Citocromo C; DR6 = Receptor de morte 6; Fas = Primeiro sinal de apoptose; Fas ligand = Ligante do primeiro sinal de apoptose (Superfamília do TNF, membro 6); HSP27 = Proteína de choque térmico 27; HSP60 = Proteína de choque térmico 60; HSP70 = Proteína de choque térmico 70; hTRA = alta temperatura requerida fator A; BCL-3 = Linfoma de células B-3; IGF-1 = fator de crescimento semelhante a insulina-1; IGF-2 = fator de crescimento semelhante a insulina-2; IGFBP1 = fator de crescimento semelhante a insulina proteína de ligação-1; IGFBP2 = fator de crescimento semelhante a insulina proteína de ligação-2; IGFBP3 = fator de crescimento semelhante a insulina proteína de ligação-3; IGFBP4 = fator de crescimento semelhante a insulina proteína de ligação-4; IGFBP5 = fator de crescimento semelhante a insulina proteína de ligação-5; IGFBP6 = fator de crescimento semelhante a insulina proteína de ligação-6; IGF-1sR = fator de crescimento semelhante a insulina receptor-1; Livin; p21; p27; p53; SMAC = segundo ativador derivado de mitocôndrias de caspases; Survivina; TNF- $\alpha$  = Fator de necrose tumoral alfa; TNF- $\beta$  = Fator de necrose tumoral beta; TNF-RI = Fator de necrose tumoral receptor-I; TNF-RII = Fator de necrose tumoral receptor-II; TRAIL R1 = Receptor-1 do ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF; TRAIL R2 = Receptor-2 do ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF ; TRAIL R3 = Receptor-3 do ligante

indutor de apoptose relacionado ao TNF; TRAIL R4 = Receptor-4 do ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF; xIAP = Proteína inibidora de apoptose ligada ao X.

### ***Análise estatística***

Todos os dados foram expressos em média  $\pm$  erro padrão da média como comparação entre o tratamento com melatonina e o grupo veículo utilizando-se o teste *t* de *Student* e análise de Variância (ANOVA), seguida de teste de Bonferroni com o software *GraphPad Prism 5.0* (*GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA*). Valores de  $p \leq 0,05$  foram considerados significantes.

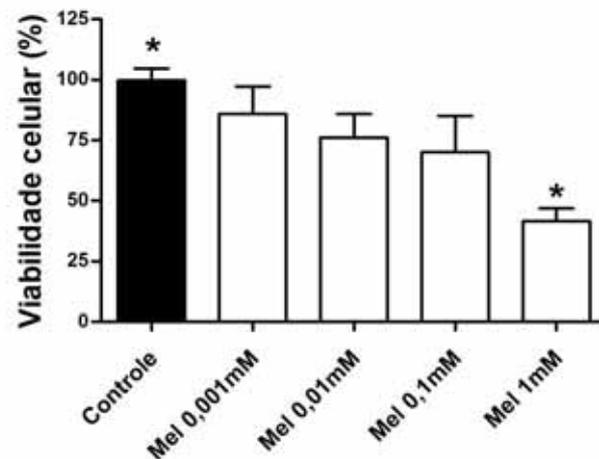
### ***Bioinformática***

Após a análise proteica semiquantitativa, as proteínas diferencialmente expressas foram submetidas à análise de bioinformática, através do software *String 9.1 database* (<http://string-db.org/>) e concomitantemente dispostas no software KEGG (<http://www.kegg.jp/>), sendo reproduzidas as vias de sinalização as quais estavam inseridas. Esse procedimento foi realizado para os grupos controle e tratado com 1 mM de melatonina em ambos os cultivos celulares.

## **RESULTADOS**

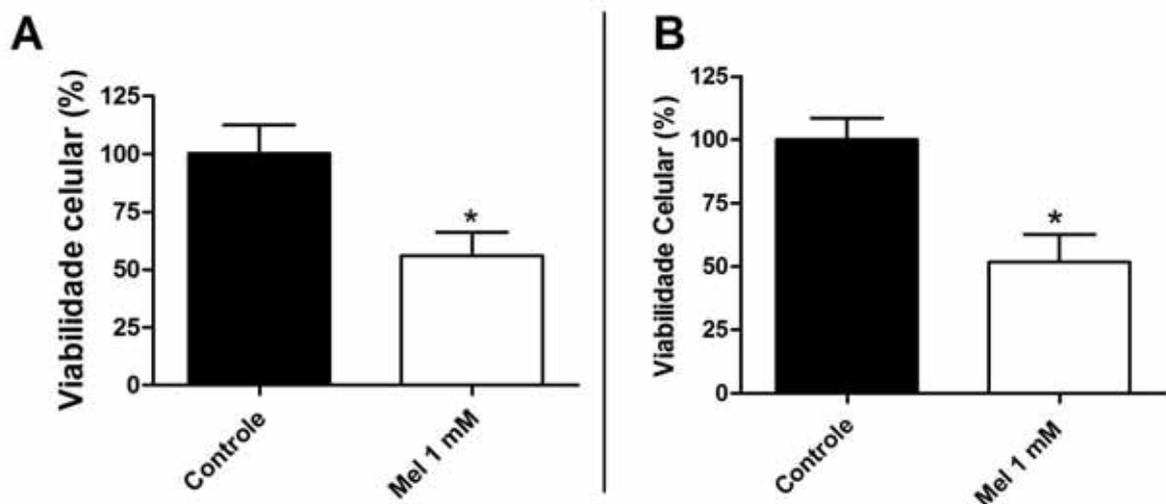
### ***Redução da viabilidade celular das células MDA-MB-231, CAFs e co-cultivo ao tratamento com 1 mM de melatonina***

Para avaliar a atividade antitumoral da melatonina, foi realizado o teste de viabilidade celular nas células da linhagem MDA-MB-231, nos CAFs e na co-cultura após o tratamento com o hormônio. A melatonina foi capaz de reduzir a viabilidade celular da linhagem MDA-MB-231 em todas as concentrações testadas, sendo a concentração farmacológica de 1 mM capaz de reduzir a viabilidade celular em 58 % após 48 horas ( $p \leq 0,05$ ) (**Figura 1**).



**Figura 1 – Redução da viabilidade celular da linhagem MDA-MB-231.** Efeito inibitório da melatonina sobre a viabilidade das células MDA-MB-231. As células foram tratadas nas concentrações de 0,001 mM, 0,01 mM, 0,1 mM e 1 mM de melatonina e a viabilidade celular mensurada pelo ensaio de MTT. O tratamento foi realizado por 48 horas, com redução de 58 % da viabilidade celular em relação ao veículo. A coluna preta representa o grupo veículo, sem tratamento. As colunas brancas correspondem às células tratadas com diferentes concentrações de melatonina. Os dados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (\*) ANOVA valor significativo seguido de Bonferroni.

A concentração de 1 mM de melatonina foi eficaz na redução da viabilidade celular dos CAFs isolados e em co-cultivo com a linhagem MDA-MB-231, reduzindo 44 % e 48 % respectivamente, após tratamento por 48 horas em relação ao grupo veículo ( $p < 0,05$ ; **Figura 2**).



**Figura 2 – Redução da viabilidade celular dos CAFs e da co-cultura.** **A:** Efeito inibitório da melatonina sobre a viabilidade dos CAFs, com redução de 44 % da viabilidade celular em relação ao veículo. **B:** Efeito inibitório da melatonina sobre a viabilidade das células em co-cultura, com redução de 48 % da viabilidade celular em relação ao veículo. As células foram tratadas na concentração de 1 mM de melatonina e a viabilidade celular mensurada pelo

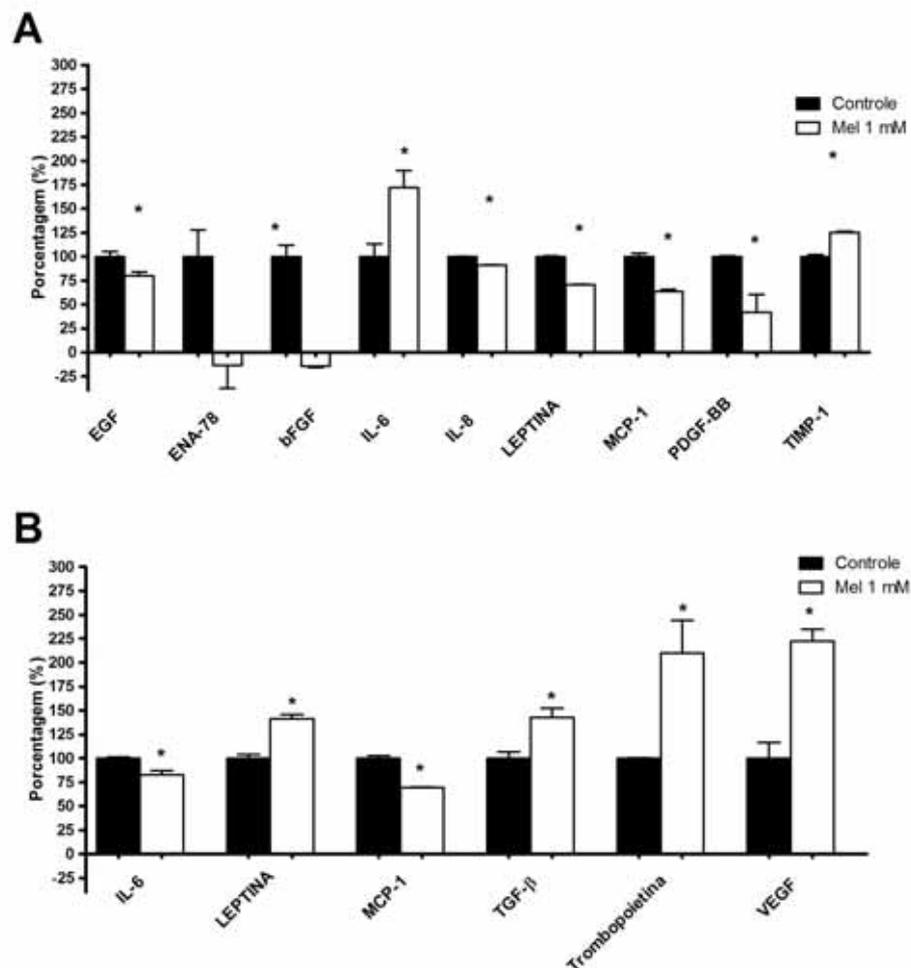
ensaio de MTT. O tratamento foi realizado por 48 horas. A coluna preta representa o grupo veículo, sem tratamento. A coluna branca corresponde às células tratadas com 1 mM de melatonina. Os dados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (\*) Teste T de student.

## Proteínas diferencialmente expressas após tratamento com 1 mM de melatonina

### Proteínas angiogênicas

Nas células MDA-MB-231, após tratamento com 1 mM de melatonina houve redução estatisticamente significativa de sete proteínas envolvidas no processo de angiogênese tumoral, conforme apresentado na **Figura 3A**. Além disso, foi observado aumento da proteína inibidora de metaloproteinase tecidual 1 (TIMP-1) ( $p = 0,005$ ) e IL-6 ( $p = 0,04$ ) (**Figura 3A**).

Na co-cultura, houve redução significativa da expressão da proteína MCP-1/CCL2 ( $p=0,006$ ), IL-6 ( $p=0,03$ ) e aumento da expressão das proteínas: leptina ( $p=0,009$ ), VEGF ( $p=0,01$ ), TGF- $\beta$  ( $p=0,03$ ) e trombopoietina (THPO) ( $p=0,04$ ) nas células tratadas com 1 mM de melatonina por 48 horas em relação às células controle (**Figura 3B**).



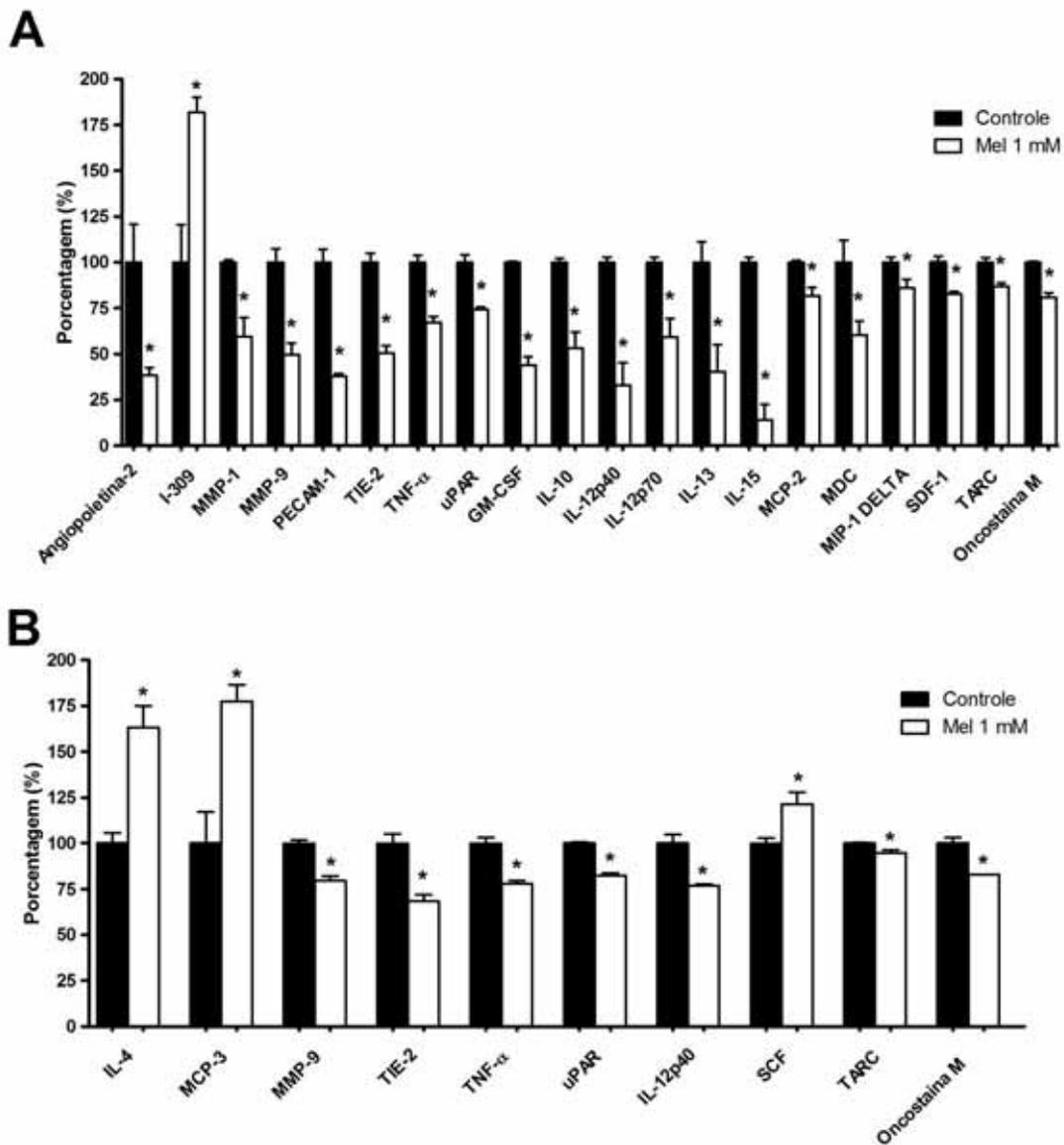
**Figura 3 – Proteínas angiogênicas diferencialmente expressas nas células MDA-MB-231 e no co-cultivo com CAFs mensuradas no *Kit Human Angiogenesis Array*. A. Linhagem**

tumoral mamária MDA-MB-231, **B.** Co-cultura de MDA-MB-231 e CAFs. As colunas pretas representam os grupos tratados com veículo (controle). As colunas brancas correspondem às células tratadas com 1 mM de melatonina por 48 horas. Os dados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (\*) Teste T de *student*.

### ***Proteínas inflamatórias***

A análise semi-quantitativa das proteínas pró e antiinflamatórias mostrou redução estatisticamente significativa de 19 proteínas pró-inflamatórias nas células MDA-MB-231 após tratamento com 1 mM de melatonina em relação ao grupo controle ( $p \leq 0,05$ ), conforme apresentado na **Figura 4A**. Além disso, houve aumento a proteína I-309 (CCL1) ( $p=0,03$ ) (**Figura 4A**).

Na co-cultura, sete proteínas pró-inflamatórias tiveram sua expressão estatisticamente reduzida ( $p \leq 0,05$ ) quando as células foram tratadas com 1 mM de melatonina por 48 horas e as proteínas IL-4 ( $p = 0,02$ ), MCP-3 (CCL7) ( $p = 0,02$ ) e fator de células tronco (SCF) ( $p = 0,04$ ) apresentaram maior expressão ( $p \leq 0,05$ ), conforme apresentado na **Figura 4B**.

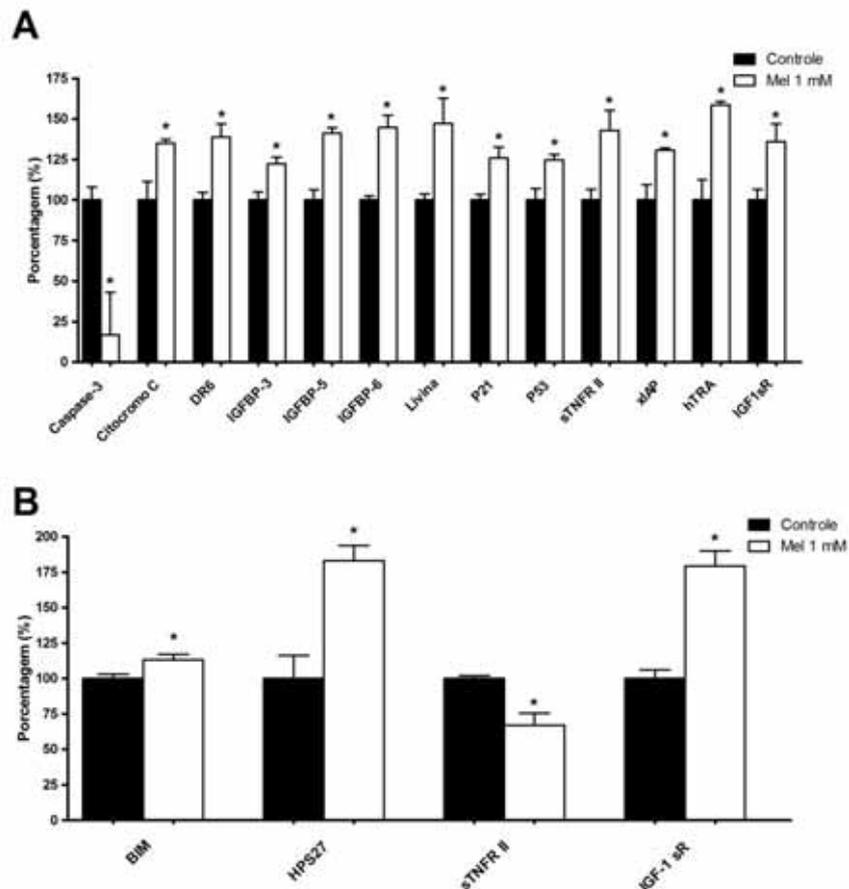


**Figura 4 – Proteínas inflamatórias diferencialmente expressas nas células MDA-MB-231 e no co-cultivo com CAFs mensuradas no *Kit Custom Cytokine Antibody Array*. A.** Linhagem tumoral mamária MDA-MB-231, **B.** Co-cultura de MDA-MB-231 e CAFs. As colunas pretas representam os grupos tratados com veículo (controle). As colunas brancas correspondem às células tratadas com 1 mM de melatonina por 48 horas. Os dados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (\*) Teste T de *student*.

### ***Proteínas apoptóticas***

Nas células MDA-MB-231 houve aumento estatisticamente significante de 12 proteínas envolvidas na via pró-apoptótica ( $p \leq 0,05$ ) e redução da proteína caspase-3 ( $p = 0,04$ ) após tratamento com 1 mM de melatonina com relação ao grupo controle conforme apresentado na **Figura 5A**.

Na co-cultura, houve aumento da expressão das proteínas de choque térmico 27 (HSP27) ( $p = 0,04$ ), BIM ( $p = 0,05$ ) e IGF-1R ( $p = 0,02$ ) e redução da expressão do receptor II do fator de necrose tumoral (TNF-RII) ( $p = 0,03$ ) após o tratamento com 1 mM de melatonina por 48 horas (**Figura 5B**).

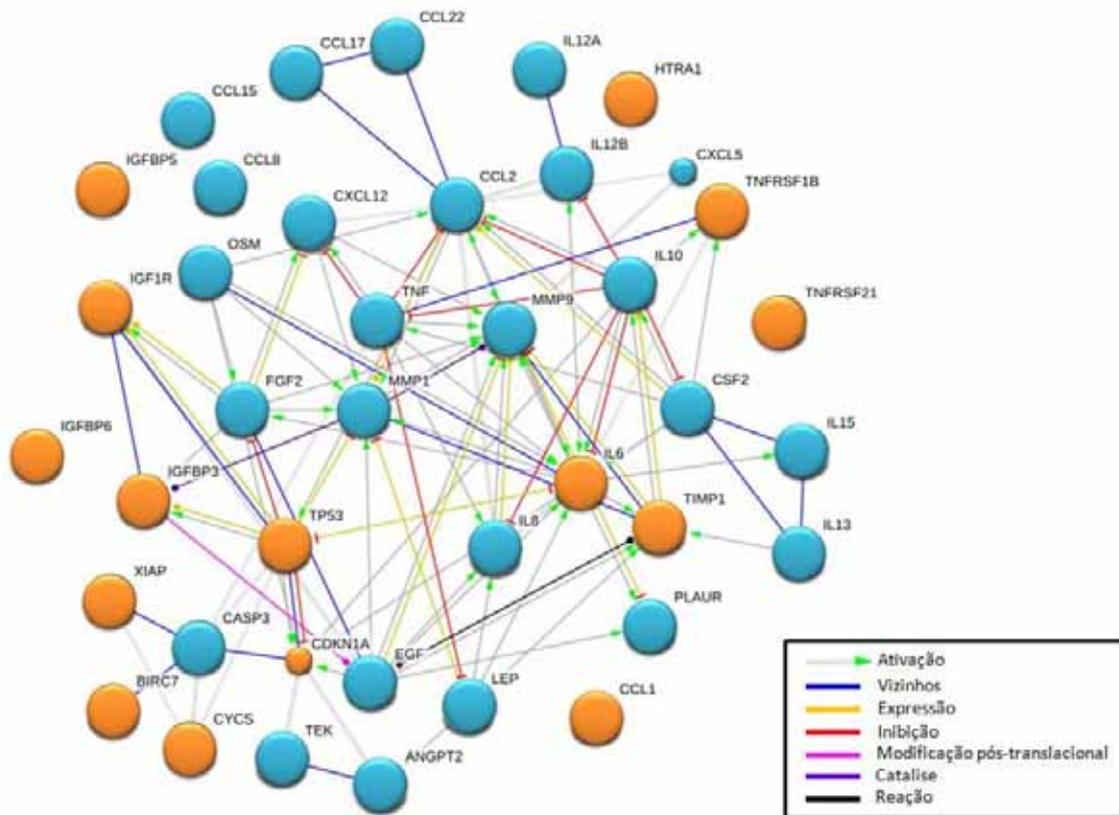


**Figura 5. Proteínas apoptóticas diferencialmente expressas nas células MDA-MB-231 e no co-cultivo com CAFs mensuradas no *Kit Human Apoptosis Array C1*. A.** Linhagem tumoral mamária MDA-MB-231, **B.** Co-cultura de MDA-MB-231 e CAFs. As colunas pretas representam os grupos veículos, sem tratamento. As colunas brancas correspondem às células tratadas com 1 mM de melatonina por 48 horas. Os dados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (\*) Teste T de *student*.

#### *Análise das vias de sinalização após tratamento com 1 mM de melatonina nas células MDA-MB-231 e em co-cultivo com CAFs*

A análise de bioinformática mostrou as vias de sinalização na qual as proteínas diferencialmente expressas após o tratamento com melatonina estão inseridas. Das 42 proteínas diferencialmente expressas nas células MDA-MB-231, 29 estão presentes em três vias de sinalização relacionadas ao processo tumoral e na via do câncer propriamente dita. As citocinas EGF, ENA-78/CXCL5, MCP-1/CCL2, PDGF-BB, I-309/CCL1, MCP-2/CCL8,

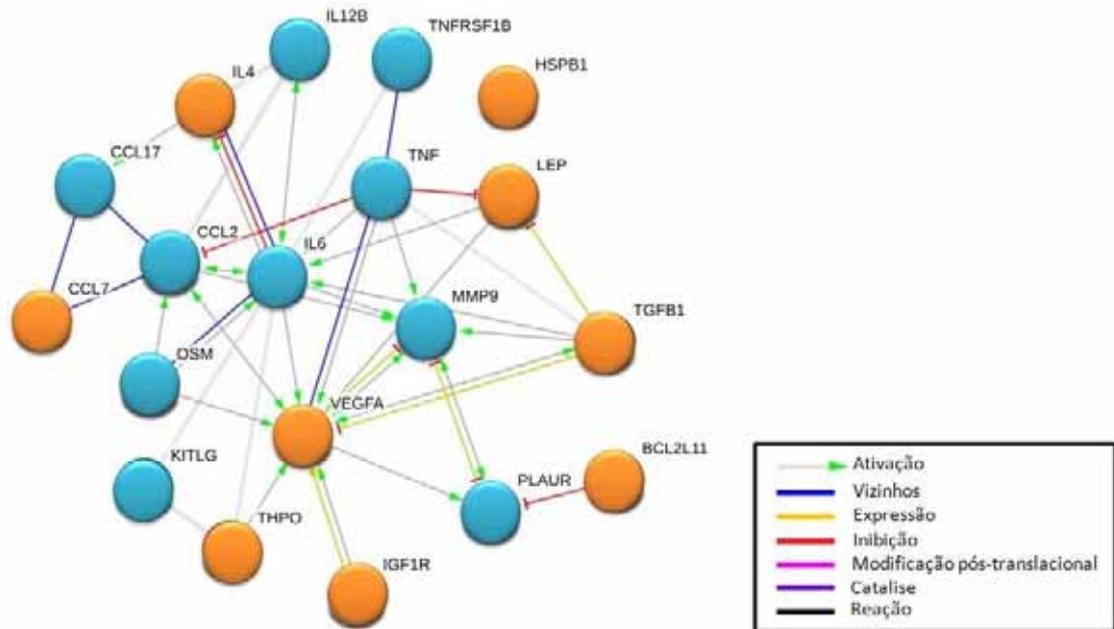
MDC/CCL22, MIP-1 delta/CCL15, SDF-1/CXCL12, TARC/CCL17, DR6 e TNF-RII participam da via *cytokine-cytokine receptor interaction* ( $p < 0,05$ ), enquanto as proteínas IL-6, leptina, GM-CSF, IL-10, IL-12p40, IL-12p70, IL-13, IL-15 e OSM participam das vias *cytokine-cytokine receptor interaction* e/ou *janus kinase/signal transducers and activators of transcription* (Jak-STAT) ( $p < 0,05$ ). Além disso, as proteínas EGF, bFGF, PDGF-BB MMP-1, MMP-9, caspase-3, p21, p53, XIAP, e IGF-1sR atuam na via do câncer ( $p < 0,05$ ) (**Figura 6**).



**Figura 6.** Figura esquematizada pelo Software String representando a rede de interação entre as proteínas diferencialmente expressas nas células MDA-MB-231 após tratamento com 1 mM de melatonina. Círculos em cor azul representam as proteínas com menor expressão após o tratamento com melatonina ( $p < 0,05$ ) e círculos em cor laranja representam as proteínas altamente expressas após o tratamento com melatonina ( $p < 0,05$ ). As setas indicam a interação dessas proteínas conforme ilustrado na legenda.

O co-cultivo das células MDA-MB-231 com CAFs apresentou 20 proteínas diferencialmente expressas após o tratamento com 1 mM de melatonina, sendo que 14 proteínas estão presentes em três vias de sinalização distintas. As citocinas MCP-1, MCP-3, TARC e TNF-RII atuam na via de sinalização *cytokine-cytokine receptor interaction* ( $p < 0,05$ ), as proteínas IL-6, leptina, IL-4, IL-12p40, e Oncostatina M nas vias *cytokine-cytokine*

receptor interaction e/ou *jak-STAT* ( $p < 0,05$ ) e as proteínas IL-6, TGF- $\beta$ , VEGF, MMP-9, SCF e IGF-1sR estão inseridas na via do câncer ( $p < 0,05$ ) (**Figura 7**).



**Figura 7.** Figura esquematizada pelo Software String representando a rede de interação entre as proteínas diferencialmente expressas nas células MDA-MB-231 em co-cultivo com CAFs após tratamento com 1 mM de melatonina. Círculos em cor azul representam as proteínas com menor expressão após o tratamento com melatonina ( $p < 0,05$ ) e círculos em cor laranja representam as proteínas altamente expressas após o tratamento com melatonina ( $p < 0,05$ ). As setas indicam a interação dessas proteínas conforme ilustrado na legenda.

## DISCUSSÃO

Diversos estudos com enfoque no câncer de mama abordam apenas as características das células tumorais epiteliais, no entanto sabe-se que o crescimento do tumor é determinado também pelas células presentes no estroma, sendo essa interconexão moduladora do comportamento das células tumorais [5, 6, 12, 15, 18, 31].

O efeito inibitório da melatonina na viabilidade celular da linhagem triplo negativa observado nesse estudo também é evidenciado por Leman *et al.* [33] e Jardim-Perassi *et al.* [3]. Sabe-se que grande parte do efeito inibitório da melatonina na proliferação celular do câncer de mama ocorre pela ligação aos receptores de membrana MT1 [34], conectados à proteína G, os quais atuam na redução da proliferação e angiogênese e induzem a diferenciação celular [35-37]. Atualmente não existem protocolos de tratamento eficazes para tumores mamários triplo negativos [38], no entanto, a resposta positiva dessas células à melatonina é devido em parte pela presença do receptor MT1 [37, 38], além de outros mecanismos [39].

Quando em co-cultivo, CAFs modulam o microambiente celular, liberando fatores de crescimento que estimulam a proliferação de células epiteliais, tornando-as mais resistentes à atuação de fatores/agentes externos [9]. No entanto, a melatonina também mostrou-se eficaz na inibição da proliferação das células MDA-MB-231 em co-cultivo com CAFs. Estudo de Knowler *et al.* [40] mostrou que fibroblastos primários, provenientes de pacientes com carcinoma ductal invasivo, expressam o gene receptor 1 da melatonina (MTNR1A), o que comprova a ação anti-proliferativa da melatonina no co-cultivo.

As células tumorais apresentam angiogênese sustentada, resistência ao processo de apoptose e adquirem potencial replicativo ilimitado, para isso existem inúmeras vias atuando dentro de um complexo de redes, conhecido como via do câncer [41]. A análise realizada no Software String mostrou que as proteínas diferencialmente expressas após o tratamento com melatonina em ambos os cultivos celulares atuam em três principais vias: via do câncer, *cytokine-cytokine receptor interaction e Jak/STAT*, sendo essas duas inseridas na via do câncer.

O tratamento com melatonina foi capaz de induzir a redução das proteínas pró-angiogênicas nas células MDA-MB-231 e na co-cultura. Dentre elas, a MMP-1 e MMP-9 envolvidas no desenvolvimento tumoral [42-44], sendo capazes de degradar a matriz extracelular, permitindo a migração, invasão e metastatização [45]. Diversos estudos têm confirmado a presença de MMP-1 e MMP-9 em tumores malignos e de pior prognóstico no câncer [44, 46, 47]. Mao *et al.* [48] mostraram que a melatonina reduz a expressão de MMP-9 em linhagem de câncer de mama RE positiva, em adição, nosso estudo comprovou a ação desse hormônio também em células tumorais mamárias RE negativas, o que sugere a participação da melatonina na inibição da invasão tumoral.

Em contrapartida, foi possível observar níveis elevados da proteína TIMP-1, inibidor de metaloproteinases teciduais, quando as células foram tratadas com melatonina. Corroborando ao nosso achado, Ordoñez *et al.* [49] mostraram que a melatonina é capaz de aumentar os níveis proteicos de TIMP-1 no microambiente tumoral de linhagem de carcinoma hepatocelular.

Nosso estudo mostrou redução das proteínas bFGF, proteína com propriedades pró-angiogênicas envolvida nos processos de proliferação e diferenciação celular de tecidos malignos [50-52] e SCF, proteína envolvida no processo de progressão tumoral [53] após o tratamento com melatonina nas células MDA-MB-231. Assim, a melatonina se mostrou eficaz na redução da proliferação celular e na inibição da angiogênese.

A redução da expressão de angiopoietina-2 nas células MDA-MB-231 e redução de TIE-2 nas células MDA-MB-231 e em co-cultivo com CAFs confirma mais uma vez o efeito anti-angiogênico da melatonina [3,50,51] no câncer de mama. As angiopoietinas 1 e 2 possuem alta afinidade de ligação ao receptor TIE-2, sendo que essa ligação ativa sinais de sobrevivência para as células endoteliais, permitindo a maturação e manutenção da integridade vascular [54, 55].

O IGF-1 é um importante modulador do crescimento celular, diferenciação e invasão [56, 57] e altos níveis dessa proteína estão relacionados à elevada proliferação celular e suscetibilidade ao desenvolvimento do câncer de mama [18, 57]. Seu receptor IGF-1R desempenha importante papel no estabelecimento e manutenção do fenótipo tumoral e tem forte atividade anti-apoptótica [58]. Nosso estudo mostrou aumento na expressão do receptor após o tratamento com melatonina em ambos os cultivos celulares.

Sabe-se que a via de sinalização jak-STAT, é uma via com diversas cascatas pleiotrópicas utilizadas para traduzir diversos sinais de desenvolvimento e homeostase. Em mamíferos essa via inicia seus mecanismos de sinalização através da ligação com citocinas e fatores de crescimento [59]. A ligação da citocina ao seu receptor conduz a dimerização do receptor, e a subsequente ativação da *janus kinase* (JAK). Resíduos de tirosina específicos sobre receptores são fosforilados por Jak, e estes então servem como locais de ancoragem para a família de *transdutores de sinal e ativação de transcrição* (STAT), e assim translocam-se para o núcleo celular modulando a expressão de genes alvo [60].

Existem quatro JAKs (JAK1, JAK2, JAK3 e tirosina-kinase-2 (TYK2)) e todas se associam com os domínios citoplasmáticos de vários receptores de citocinas, sendo a família das STATs formada por sete membros (STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5A, STAT5b, e STAT6) [59].

A via Jak-STAT têm um papel central na mediação da resposta inflamatória [60] e isso ocorre devido a todas as citocinas utilizarem essa via como mecanismo de transdução de sinal [59]. As moléculas de STATs podem ser ativadas por uma variedade de citocinas, no entanto, possuem alta especificidade, por exemplo, a STAT6 é ativada pelas interleucinas 4 e 13 [60], além disso, essa via é ainda capaz de modular as vias de sinalização MAPK e PI3k-Akt [61], que regulam o equilíbrio entre sobrevivência e morte celular com efeitos diretos sobre o desenvolvimento de vários tipos de câncer [62].

As citocinas são associadas ao câncer e desempenham papel chave no recrutamento e posicionamento de diversas células inflamatórias na carcinogênese [63, 64]. Nosso estudo mostrou redução de diversas citocinas ativas nos processos de proliferação, formação de

novos vasos e invasão das células tumorais, como GM-CSF, SDF-1/CXCL12, MCP-1/CCL2, PECAM-1 e ENA-78/CXCL5 após o tratamento com melatonina, o que pode ser corroborado com diversos estudos [65-74].

As proteínas MDC/CCL22, TARC/CCL17 e MCP-2 são secretadas por células inflamatórias, enquanto a IL-15 e a IL-12 induz a diferenciação e proliferação de células T, células B e células natural killers (NK) estimulando neutrófilos, macrófagos e células dendríticas [64, 75] e a proteína MIP-1 delta/CCL15, a qual tem papel central na mediação tráfego de leucócitos e é essencial para as respostas inflamatórias [76].

Em contrapartida, as células MDA-MB-231 tratadas com melatonina mostraram aumento da proteína I-309/CCL1, atuante no processo angiogênico [77] enquanto no co-cultivo foi observada maior expressão de MCP-3/CCL7, citocinas presentes nos processos de proliferação celular, angiogênese e formação de metástases [78, 79]. A expressão de IL-4, citocina antiinflamatória conhecida por sua atividade antitumoral [80, 81], aumentou na co-cultura. Nesse contexto, diversos estudos têm sugerido que a melatonina é capaz de aumentar a imunidade local [25, 30].

Houve aumento da expressão de trombopoietina nas células em co-cultivo, sendo essa citocina atuante na proliferação e diferenciação de megacariócitos. Em estudo de Pallard *et al.* [82] foi observado que a trombopoietina ativa a Jak2/Stat5. Sabe-se que a ativação da Stat5 esta relacionado com o pior prognóstico no câncer de mama [83, 84].

Ainda não há trabalhos na literatura que relacionam a ação da melatonina na via jak-STAT, no entanto, estudos mostram seu efeito modulador no microambiente tumoral, minimizando a inflamação, bloqueando fatores de transcrição como o NF-k $\beta$ , inibindo a expressão de citocinas e interleucinas pró-inflamatórias [85, 86], aumentando assim, a resposta das células T e liberando citocinas antiinflamatórias [87].

Em contrapartida, demais estudos mostram que citocinas antiinflamatórias exercem atividades a favor do desenvolvimento e regulação tumoral [88-92], sendo capazes de atrair células do sistema imune, favoráveis à sobrevivência e crescimento do tumor [27]. Assim, as citocinas I-309/CCL1 e MCP-3 podem ter exercido seu papel pró-inflamatório no cultivo celular e como consequência, o tratamento com melatonina reduziu seus níveis proteicos como resposta protetora no câncer de mama.

As proteínas EGF, IL-6 e OSM possuem forte atividade pró-câncerígena devido ao seu papel na proliferação de células tumorais, sobrevivência, angiogênese, inflamação e metástase [93-96]. A melatonina reduziu a expressão de EGF e OSM e aumentou os níveis de IL-6 nas células MDA-MB-231. Por outro lado as células co-cultivadas tiveram redução de IL-6 e

OSM. Estudo de Wendt *et al.* [61] mostraram que essas três proteínas se ligam aos seus receptores e ativam os membros da família *Janus* (JAK1, JAK2, ou TYK2) que promovem a ativação da STAT3, modulando a expressão de fatores da transição epitélio-mesenquimal (EMT) que influenciam na mudança do fenótipo celular a um tipo celular mais agressivo.

O tratamento com melatonina reduziu a expressão de IL-10, leptina e PDGF-BB no grupo MDA-MB-231, e as células co-cultivadas apresentaram aumento da expressão de leptina, TGF- $\beta$  e VEGF. Sansone *et al.*[7] mostraram que as proteínas leptina, PDGF-BB e VEGF, associadas à progressão tumoral e angiogênese [97-100] e IL-10, inibidora da resposta pró-inflamatória [99-101], também são capazes de acionar a STAT3, responsável por diversas atividades imunossupressoras, tais como o bloqueio da maturação das células dendríticas e a liberação de IL-10.

O TGF- $\beta$ , quando em altos níveis, correlaciona-se com os eventos de invasão, angiogênese [101], transformação e proliferação celular [18] e, pode também ser secretado por CAFs [11]. Os altos níveis de TGF- $\beta$  observados no co-cultivo após o tratamento com melatonina corrobora com o estudo de Vañhara *et al.* [102], que mostrou que células tumorais secretoras de TGF- $\beta$  como os CAFs, tem grande quantidade de STAT3 fosforilada ativados pelo receptor gp130. Esse receptor ligado a moléculas específicas do estroma como TGF- $\beta$ , contribui para a sobrevivência de células de carcinoma de cólon.

A alta expressão de VEGF, leptina e TGF- $\beta$  no co-cultivo pode indicar resistência ao tratamento e aumento da malignidade das células quando em contato com CAFs. CAFs são capazes de secretar proteínas que favorecem o crescimento de células tumorais [7, 12, 15, 17-21], sendo a leptina [103] o VEGF e TGF- $\beta$  [11, 12] alguns exemplos. Dessa forma, corroborando aos nossos achados, Rong *et al.*[104] mostraram que o tratamento com o quimioterápico taxotere em células MDA-MB-231 co-cultivadas com CAFs favorece o aumento da adesão, invasão e proliferação celulares.

O tratamento com melatonina reduziu a expressão de TNF- $\alpha$  e aumentou os níveis de DR6 e TNF-RII nas células MDA-MB-231, e, houve redução dos níveis de TNF- $\alpha$  e TNF-RII nas células em co-cultivo. O TNF é uma citocina pleiotrópica mediadora de respostas inflamatórias, capaz de regular o metabolismo celular controlando ações apoptóticas, proliferativas, pró-inflamatórias, entre outras (MISCIA *et al.*, 2002; AGGARWAL *et al.*, 2014). Essa citocina tem sido detectada em células malignas e/ou células do estroma em diversos carcinomas humanos [105], induzindo citocinas pró-inflamatórias [105, 106], além disso, exerce suas funções através da ligação com seus receptores TNF-RI e TNF-RII [107].

Estudo de Miscia *et al.* [108] mostrou que em células B humanas, o TNF- $\alpha$  induz a ativação da Jak que é acompanhada da fosforilação da STAT3. Srinivasan *et al.* [87] mostrou que a melatonina reduz a expressão de NF-kB, TNF- $\alpha$  e STAT3 em carcinoma de cólon.

A atividade anti-tumoral da melatonina deve-se ainda ao seu efeito pró-apoptótico [109-113]. A proteína DR6 é um membro da superfamília do TNF e está associado à supressão da imunidade anti-tumoral e progressão do tumor [114-116]. A região intracelular desse receptor abriga um domínio de morte celular, importante para a transdução de sinais apoptóticos [117].

Nosso estudo encontrou ainda aumento das proteínas apoptóticas citocromo C, IGFBP-3, IGFBP-5, IGFBP-6, p21, p53, livina, xIAP e hTRA e redução da caspase-3 nas células MDA-MB-231 e, quando em co-cultivo, foi observado aumento das proteínas BIM e HSP27, após o tratamento com 1 mM de melatonina.

O citocromo c apresenta um papel crucial na apoptose. Quando estimulado, é liberado no citosol onde se liga a Apaf-1 e a pró-caspase 9 para a formação do apoptossomo [118, 119]. Wang *et al.* [120] demonstraram que a melatonina induz a expressão da Apaf-1 e estimula a liberação de citocromo c, causando a ativação das caspases e induzindo a apoptose em células de câncer de mama.

A família IGFBP é constituída por seis fatores bem caracterizados (IGFBP-1 a IGFBP-6) [121]. Kim *et al.* [122] sugerem que a IGFBP-5 tem um importante papel na diferenciação celular, controlando o crescimento e a apoptose, sendo capaz de ativar as caspases-8 e 9 em células MDA-MB-231 [123]. Já a proteína IGFBP-6 atua na regulação da migração celular e apoptose [124], enquanto a IGFBP-3 atua na inibição da proliferação celular [125]. Ainda a proteína hTRA está envolvida na manutenção da homeostase mitocondrial, apoptose e sinalização celular, sendo que sua expressão reduzida, contrária à observada em nosso estudo, contribuiria para a sobrevivência de células tumorais [126].

A p53 induz a parada do crescimento celular, essencial para a supressão do tumor, impedindo dessa forma a proliferação de células danificadas [127] o que comprova mais uma vez a ação pró-apoptótica da melatonina.

Inibidores de apoptose (IAPs) são reguladores de morte celular que, entre outras funções, se ligam as caspases e interferem a sinalização através de receptores de morte por apoptose [128]. A livina e a xIAP são membros da família dos inibidores de apoptose. A alta expressão de livina esta relacionada com alta taxa de apoptose e redução do crescimento tumoral [129], enquanto a alta expressão de xIAP tem correlacionado ao pior prognóstico de

pacientes com câncer. Em contraste, outros estudos afirmam que a proteína xIAP pode ser um marcador de bom prognóstico em tumores de próstata e pulmão [130].

Diversos estudos têm mostrado que essas duas proteínas interferem a ação da caspase-3 [128-130] o que corrobora com os nossos achados. A caspase-3 desempenha importante papel na execução da apoptose por meio da produção excessiva de espécies reativas de oxigênio que esgotam as defesas antioxidantes da célula, gerando uma condição de estresse oxidativo, e consequente danos no DNA e morte celular [131].

A alta expressão das proteínas HSPs no co-cultivo após o tratamento com melatonina confirma o aumento da malignidade das células quando em contato com os fatores liberados pelos CAFs, atuantes no microambiente tumoral. Rong *et al.* [104] relatam que a presença de CAFs aumenta a resistência a diversos quimioterápicos.

As HSPs são proteínas superexpressas em diversas neoplasias e estão implicadas na proliferação de células tumorais, diferenciação, invasão, metástase e resistência ao processo apoptótico [132]. A HSP27 é uma proteína anti-apoptótica cuja expressão é associada ao prognóstico ruim no câncer gástrico, câncer de fígado, carcinoma da próstata, osteossarcoma e câncer de ovário [132-135]. BIM é uma proteína pró-apoptótica da família de BCL2, que regula a permeabilidade da membrana mitocondrial [136], além disso é um regulador chave na formação de tumores epiteliais, e metástases tumorais [137]. Estudo de Park *et al.* [138] mostraram que 1 mM de melatonina reduz a expressão de BIM em células de câncer renal.

## CONCLUSÃO

A melatonina é eficaz na redução da proliferação celular da linhagem tumoral mamária triplo negativa MDA-MB-231, dos CAFs e na interação entre essas células. O tratamento com 1 mM de melatonina inibe a expressão de proteínas pró-angiogênicas e inflamatórias e induz a expressão de proteínas pró-apoptóticas nas células MDA-MB-231 e na co-cultura com CAFs, o que confirma sua ação oncostática, anti-proliferativa e pró-apoptótica no câncer de mama. Além disso, foi confirmada a influência dos CAFs no microambiente tumoral pela liberação de fatores atuantes nos processos de progressão celular e resistência ao tratamento.

## LISTA DE ABREVIACÕES

---

<b>BCA</b>	<i>bicinchoninic acid</i>
<b>bFGF</b>	Fator de crescimento de fibroblastos básico
<b>CAF</b>	Fibroblasto associado ao câncer
<b>DMSO</b>	<i>Dimethyl sulfoxide</i>

---

---

<b>DR6</b>	Receptor de morte 6
<b>EGF</b>	Fator de crescimento epitelial
<b>ELISA</b>	Ensaio imunoenzimático
<b>ENA-78</b>	proteína epitelial ativadora de neutrófilos-78
<b>GM-CSF</b>	Fator estimulador de colônias de granulócitos e monócitos
<b>HER-2/Neu</b>	Receptor do Fator de Crescimento Epidermal 2
<b>HPS27</b>	Proteína de choque térmico 27
<b>HRP</b>	Horseradish peroxidase
<b>HSP</b>	Proteína de choque térmico
<b>hTRA</b>	Alta temperatura requerida A
<b>I-309</b>	Citocina ligante 1
<b>IGF-1</b>	Fator de crescimento semelhante a insulina -1
<b>IGF-1R</b>	Fator de crescimento semelhante a insulina receptor-1
<b>IGFBP-3</b>	Fator de crescimento semelhante a insulina proteína de ligação-3
<b>IGFBP-5</b>	Fator de crescimento semelhante a insulina proteína de ligação-5
<b>IGFBP-6</b>	Fator de crescimento semelhante a insulina proteína de ligação-6
<b>IL-10</b>	Interleucina-10
<b>IL-12p40</b>	Interleucina-12p40
<b>IL-12p70</b>	Interleucina-12p70
<b>IL-13</b>	Interleucina-13
<b>IL-15</b>	Interleucina-15
<b>IL-4</b>	Interleucina-4
<b>IL-4</b>	Interleucina-4
<b>IL-6</b>	Interleucina-6
<b>IL-8</b>	Interleucina-8
<b>ILs</b>	Interleucinas
<b>JAK</b>	Janus Kinase
<b>Jak-STAT</b>	<i>janus kinase/signal transducers and activators of transcription</i>
<b>Ki-67</b>	<i>antigen identified by monoclonal antibody Ki-67</i>
<b>LEP</b>	Leptina
<b>MAPK</b>	<i>Mitogen-activated protein kinases</i>
<b>MCP-1</b>	Proteína quimioatraente de monócitos-1
<b>MCP-2</b>	Proteína quimioatraente de monócitos-2
<b>MCP-3</b>	Proteína quimioatraente de monócitos-3
<b>MDC</b>	Quimiocina derivada de macrófagos
<b>MIP-1 delta</b>	Proteína inflamatória de macrófagos-1 delta
<b>MMP-1</b>	Metaloproteinase-1
<b>MMP-2</b>	Metaloproteinase-2
<b>MMP-3</b>	Metaloproteinase-3
<b>MMP-9</b>	Metaloproteinase-9
<b>MMPs</b>	Metaloproteinases
<b>MTT</b>	<i>3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide</i>
<b>NF-kB</b>	Fator de transcrição nuclear kappa B
<b>OSM</b>	Oncostatina M
<b>PBS</b>	Solução tampão fosfato salino
<b>PDGF</b>	Fator de crescimento derivado de plaquetas
<b>PECAM-1</b>	Molécula de adesão celular endotelial de plaquetas
<b>PI3K-Akt</b>	<i>Phosphatidylinositol 3' kinase-Akt</i>
<b>RE</b>	Receptor de estrógeno
<b>RP</b>	Receptor de progesterona

---

---

<b>SCF</b>	Fator de células tronco
<b>SDF-1</b>	Fator derivado de células do estroma -1
<b>SFB</b>	Soro fetal bovino
<b>STAT</b>	<i>Signal transducers and activators of transcription</i>
<b>TARC</b>	Quimiocina do timo regulada por ativação
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Fator de crescimento transformante beta
<b>THPO</b>	Trombopoietina
<b>TIE-2</b>	Receptor de proteína tirosina quinase-2
<b>TIMP-1</b>	Proteína inibidora de metaloproteinase tecidual 1
<b>TNF-RI</b>	Fator de necrose tumoral receptor-I
<b>TNF-RII</b>	Fator de necrose tumoral receptor-II
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Fator de necrose tumoral alfa
<b>TYK2</b>	Tirosina-Kinase-2
<b>uPAR</b>	Receptor de uroquinase
<b>VEGF</b>	Vascular Fator de crescimento vascular endotelial
<b>xIAP</b>	Proteína inibidora de apoptose ligada ao X.
<b><math>\alpha</math>-SMA</b>	$\alpha$ actina do músculo liso

---

## CONFLITO DE INTERESSE

Os autores declaram não ter conflitos de interesse.

## CONTRIBUIÇÕES DOS AUTORES

LBM realizou a coleta dos tumores; LBM e GBG desenvolveram a metodologia, análise e interpretação dos resultados e a escrita do manuscrito; MGM, TFB, BVJ e JRL auxiliaram no desenvolvimento e padronização da metodologia, análise e interpretação dos resultados; LAC e JPC auxiliaram no desenvolvimento da metodologia e escrita do manuscrito; RAR auxiliou no desenvolvimento e padronização da metodologia; DAPCZ responsável pela aquisição de recursos, supervisão e coordenação da pesquisa, escrita do manuscrito e interpretação dos resultados.

## AGRADECIMENTOS

Essa pesquisa recebeu suporte financeiro da Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). Agradecemos ao Dr. Newton Antonio Bordin Júnior, ginecologista do departamento de Ginecologia e Obstetrícia da FAMERP e ao Dr. Dalísio de Santi Neto, patologista do Departamento de Patologia e Medicina Legal da FAMERP pela colaboração neste estudo, a Dra. Eloiza Tajara e Msc. Tiago Henrique, pela colaboração nas análises de bioinformática e aos pesquisadores Lívia Carvalho Ferreira, Naiane do Nascimento Gonçalves, Camila Leonel e Gustavo Rodrigues Martins que auxiliaram tecnicamente na elaboração desse manuscrito.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. May M: **Statistics: Attacking an epidemic.** *Nature* 2014, **509**(7502):S50-51.
2. (INCA) INDC: **Estimativas da incidência e mortalidade por câncer no Brasil.** In. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde; 2014.
3. Jardim-Perassi BV, Arbab AS, Ferreira LC, Borin TF, Varma NR, Iskander AS, Shankar A, Ali MM, de Campos Zuccari DA: **Effect of melatonin on tumor growth and angiogenesis in xenograft model of breast câncer.** *PLoS One* 2014, **9**(1):e85311.
4. Orimo A, Gupta PB, Sgroi DC, Arenzana-Seisdedos F, Delaunay T, Naeem R, Carey VJ, Richardson AL, Weinberg RA: **Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion.** *Cell* 2005, **121**(3):335-348.
5. Folgueira MA, Maistro S, Katayama ML, Roela RA, Mundim FG, Nanogaki S, de Bock GH, Brentani MM: **Markers of breast câncer stromal fibroblasts in the primary tumour site associated with lymph node metastasis: a systematic review including our case series.** *Biosci Rep* 2013, **33**(6).
6. Porretti JC, Mohamad NA, Martín GA, Cricco GP: **Fibroblasts induce epithelial to mesenchymal transition in breast tumor cells which is prevented by fibroblasts treatment with histamine in high concentration.** *Int J Biochem Cell Biol* 2014, **51**:29-38.
7. Sansone P, Bromberg J: **Environment, inflammation, and câncer.** *Curr Opin Genet Dev* 2011, **21**(1):80-85.
8. Fedele C, Tothill RW, McArthur GA: **Navigating the challenge of tumor heterogeneity in câncer therapy.** *Câncer Discov* 2014, **4**(2):146-148.
9. Ishikawa M, Inoue T, Shirai T, Takamatsu K, Kunihiro S, Ishii H, Nishikata T: **Simultaneous expression of câncer stem cell-like properties and câncer-associated fibroblast-like properties in a primary culture of breast câncer cells.** *Câncers (Basel)* 2014, **6**(3):1570-1578.
10. Apostolopoulou M, Ligon L: **Cadherin-23 mediates heterotypic cell-cell adhesion between breast câncer epithelial cells and fibroblasts.** *PLoS One* 2012, **7**(3):e33289.
11. Franco OE, Shaw AK, Strand DW, Hayward SW: **Câncer associated fibroblasts in câncer pathogenesis.** *Semin Cell Dev Biol* 2010, **21**(1):33-39.
12. Kalluri R, Zeisberg M: **Fibroblasts in câncer.** *Nat Rev Câncer* 2006, **6**(5):392-401.
13. Miki Y, Ono K, Hata S, Suzuki T, Kumamoto H, Sasano H: **The advantages of co-culture over mono cell culture in simulating in vivo environment.** *J Steroid Biochem Mol Biol* 2012, **131**(3-5):68-75.
14. Marsh T, Pietras K, McAllister SS: **Fibroblasts as architects of câncer pathogenesis.** *Biochim Biophys Acta* 2013, **1832**(7):1070-1078.
15. Al-Ansari MM, Aboussekhra A: **Caffeine mediates sustained inactivation of breast câncer-associated myofibroblasts via up-regulation of tumor suppressor genes.** *PLoS One* 2014, **9**(3):e90907.
16. Mao L, Yuan L, Xiang S, Zeringue SB, Dauchy RT, Blask DE, Hauch A, Hill SM: **Molecular deficiency (ies) in MT<sub>1</sub> melatonin signaling pathway underlies the melatonin-unresponsive phenotype in MDA-MB-231 human breast câncer cells.** *J Pineal Res* 2014, **56**(3):246-253.
17. Erez N, Glanz S, Raz Y, Avivi C, Barshack I: **Câncer associated fibroblasts express pro-inflammatory factors in human breast and ovarian tumors.** *Biochem Biophys Res Commun* 2013, **437**(3):397-402.

18. Bhowmick NA, Neilson EG, Moses HL: **Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression.** *Nature* 2004, **432**(7015):332-337.
19. Le Bret SC, Newgreen DF, Thompson EW, Ackland ML: **Induction of epithelial to mesenchymal transition in PMC42-LA human breast carcinoma cells by carcinoma-associated fibroblast secreted factors.** *Breast Cancer Res* 2007, **9**(1):R19.
20. Zhang J, Liu J: **Tumor stroma as targets for cancer therapy.** *Pharmacol Ther* 2013, **137**(2):200-215.
21. Drake LE, Macleod KF: **Tumour suppressor gene function in carcinoma-associated fibroblasts: from tumour cells via EMT and back again?** *J Pathol* 2014, **232**(3):283-288.
22. Levashova Z, Backer M, Hamby CV, Pizzonia J, Backer JM, Blankenberg FG: **Molecular imaging of changes in the prevalence of vascular endothelial growth factor receptor in sunitinib-treated murine mammary tumors.** *J Nucl Med* 2010, **51**(6):959-966.
23. Park SY, Jang WJ, Yi EY, Jang JY, Jung Y, Jeong JW, Kim YJ: **Melatonin suppresses tumor angiogenesis by inhibiting HIF-1alpha stabilization under hypoxia.** *J Pineal Res* 2010, **48**(2):178-184.
24. Ali MM, Janic B, Babajani-Feremi A, Varma NR, Iskander AS, Anagli J, Arbab AS: **Changes in vascular permeability and expression of different angiogenic factors following anti-angiogenic treatment in rat glioma.** *PLoS One* 2010, **5**(1):e8727.
25. Luchetti F, Canonico B, Betti M, Arcangeletti M, Pilolli F, Piroddi M, Canesi L, Papa S, Galli F: **Melatonin signaling and cell protection function.** *FASEB J* 2010, **24**(10):3603-3624.
26. Carrillo-Vico A, Lardone PJ, Alvarez-Sánchez N, Rodríguez-Rodríguez A, Guerrero JM: **Melatonin: buffering the immune system.** *Int J Mol Sci* 2013, **14**(4):8638-8683.
27. Li YQ, Liu FF, Zhang XM, Guo XJ, Ren MJ, Fu L: **Tumor secretion of CCL22 activates intratumoral Treg infiltration and is independent prognostic predictor of breast cancer.** *PLoS One* 2013, **8**(10):e76379.
28. Korkmaz A, Rosales-Corral S, Reiter RJ: **Gene regulation by melatonin linked to epigenetic phenomena.** *Gene* 2012, **503**(1):1-11.
29. Di Bella G, Mascia F, Gualano L, Di Bella L: **Melatonin anticancer effects: review.** *Int J Mol Sci* 2013, **14**(2):2410-2430.
30. Alvarez-García V, González A, Alonso-González C, Martínez-Campa C, Cos S: **Melatonin interferes in the desmoplastic reaction in breast cancer by regulating cytokine production.** *J Pineal Res* 2012, **52**(3):282-290.
31. Santos RP, Benvenuti TT, Honda ST, Del Valle PR, Katayama ML, Brentani HP, Carraro DM, Rozenchan PB, Brentani MM, de Lyra EC *et al*: **Influence of the interaction between nodal fibroblast and breast cancer cells on gene expression.** *Tumour Biol* 2011, **32**(1):145-157.
32. Rozenchan PB, Carraro DM, Brentani H, de Carvalho Mota LD, Bastos EP, e Ferreira EN, Torres CH, Katayama ML, Roela RA, Lyra EC *et al*: **Reciprocal changes in gene expression profiles of cocultured breast epithelial cells and primary fibroblasts.** *Int J Cancer* 2009, **125**(12):2767-2777.
33. Leman ES, Siskin BF, Zimmer S, Anderson KW: **Studies of the interactions between melatonin and 2 Hz, 0.3 mT PEMF on the proliferation and invasion of human breast cancer cells.** *Bioelectromagnetics* 2001, **22**(3):178-184.
34. Lai L, Yuan L, Cheng Q, Dong C, Mao L, Hill SM: **Alteration of the MT1 melatonin receptor gene and its expression in primary human breast tumors and breast cancer cell lines.** *Breast Cancer Res Treat* 2009, **118**(2):293-305.

35. Grant SG, Melan MA, Latimer JJ, Witt-Enderby PA: **Melatonin and breast cancer: cellular mechanisms, clinical studies and future perspectives.** *Expert Rev Mol Med* 2009, **11**:e5.
36. 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* 2013, **54**(3):334-345.
37. Yuan L, Collins AR, Dai J, Dubocovich ML, Hill SM: **MT(1) melatonin receptor overexpression enhances the growth suppressive effect of melatonin in human breast cancer cells.** *Mol Cell Endocrinol* 2002, **192**(1-2):147-156.
38. 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* 2013, **137**(3):677-687.
39. Mediavilla MD, Sanchez-Barcelo EJ, Tan DX, Manchester L, Reiter RJ: **Basic mechanisms involved in the anti-cancer effects of melatonin.** *Curr Med Chem* 2010, **17**(36):4462-4481.
40. Knowler KC, To SQ, Takagi K, Miki Y, Sasano H, Simpson ER, Clyne CD: **Melatonin suppresses aromatase expression and activity in breast cancer associated fibroblasts.** *Breast Cancer Res Treat* 2012, **132**(2):765-771.
41. Hanahan D, Weinberg RA: **Hallmarks of cancer: the next generation.** *Cell* 2011, **144**(5):646-674.
42. Iwasaki H, Inoue H, Mitsuke Y, Badran A, Ikegaya S, Ueda T: **Doxycycline induces apoptosis by way of caspase-3 activation with inhibition of matrix metalloproteinase in human T-lymphoblastic leukemia CCRF-CEM cells.** *J Lab Clin Med* 2002, **140**(6):382-386.
43. Kato Y, Yamashita T, Ishikawa M: **Relationship between expression of matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 and invasion ability of cervical cancer cells.** *Oncol Rep* 2002, **9**(3):565-569.
44. Bottino J, Gelaleti GB, Maschio LB, Jardim-Perassi BV, de Campos Zuccari DA: **Immunoexpression of ROCK-1 and MMP-9 as prognostic markers in breast cancer.** *Acta Histochem* 2014.
45. Bourboulia D, Stetler-Stevenson WG: **Matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): Positive and negative regulators in tumor cell adhesion.** *Semin Cancer Biol* 2010, **20**(3):161-168.
46. Jinga DC, Blidaru A, Condrea I, Ardeleanu C, Dragomir C, Szegli G, Stefanescu M, Matache C: **MMP-9 and MMP-2 gelatinases and TIMP-1 and TIMP-2 inhibitors in breast cancer: correlations with prognostic factors.** *J Cell Mol Med* 2006, **10**(2):499-510.
47. Yousef EM, Tahir MR, St-Pierre Y, Gaboury LA: **MMP-9 expression varies according to molecular subtypes of breast cancer.** *BMC Cancer* 2014, **14**:609.
48. Mao L, Yuan L, Slakey LM, Jones FE, Burow ME, Hill SM: **Inhibition of breast cancer cell invasion by melatonin is mediated through regulation of the p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathway.** *Breast Cancer Res* 2010, **12**(6):R107.
49. Ordoñez R, Carbajo-Pescador S, Prieto-Dominguez N, García-Palomo A, González-Gallego J, Mauriz JL: **Inhibition of matrix metalloproteinase-9 and nuclear factor kappa B contribute to melatonin prevention of motility and invasiveness in HepG2 liver cancer cells.** *J Pineal Res* 2014, **56**(1):20-30.

50. POLAT A, HAZAR B, ÇOLAK T, AKÇA T, KARABACAK T: **Expression of basic fibroblastic growth factor (bFGF) in invasive ductal carcinoma of breast and its relation to angiogenesis and other prognostic parameters** In., vol. 2: Aegean Pathology Society; 2005: 131-136.
51. Rak J, Kerbel RS: **bFGF and tumor angiogenesis--back in the limelight?** *Nat Med* 1997, **3**(10):1083-1084.
52. Li Q, Gao S, Yu Y, Wang W, Chen X, Wang R, Li T, Wang C, Li X, Wu X: **A novel bFGF antagonist peptide inhibits breast cancer cell growth.** *Mol Med Rep* 2012, **6**(1):210-214.
53. Han ZB, Ren H, Zhao H, Chi Y, Chen K, Zhou B, Liu YJ, Zhang L, Xu B, Liu B *et al*: **Hypoxia-inducible factor (HIF)-1 alpha directly enhances the transcriptional activity of stem cell factor (SCF) in response to hypoxia and epidermal growth factor (EGF).** *Carcinogenesis* 2008, **29**(10):1853-1861.
54. Danza K, Pilato B, Lacalamita R, Addati T, Giotta F, Bruno A, Paradiso A, Tommasi S: **Angiogenetic axis angiopoietins/Tie2 and VEGF in familial breast cancer.** *Eur J Hum Genet* 2013, **21**(8):824-830.
55. Staton CA, Hoh L, Baldwin A, Shaw L, Globe J, Cross SS, Reed MW, Brown NJ: **Angiopoietins 1 and 2 and Tie-2 receptor expression in human ductal breast disease.** *Histopathology* 2011, **59**(2):256-263.
56. Carboni JM, Wittman M, Yang Z, Lee F, Greer A, Hurlburt W, Hillerman S, Cao C, Cantor GH, Dell-John J *et al*: **BMS-754807, a small molecule inhibitor of insulin-like growth factor-1R/IR.** *Mol Cancer Ther* 2009, **8**(12):3341-3349.
57. Sarkissyan S, Sarkissyan M, Wu Y, Cardenas J, Koeffler HP, Vadgama JV: **IGF-1 regulates Cyr61 induced breast cancer cell proliferation and invasion.** *PLoS One* 2014, **9**(7):e103534.
58. Baserga R, Peruzzi F, Reiss K: **The IGF-1 receptor in cancer biology.** *Int J Cancer* 2003, **107**(6):873-877.
59. O'Shea JJ, Holland SM, Staudt LM: **JAKs and STATs in immunity, immunodeficiency, and cancer.** *N Engl J Med* 2013, **368**(2):161-170.
60. Trikha P, Carson WE: **Signaling pathways involved in MDSC regulation.** *Biochim Biophys Acta* 2014, **1846**(1):55-65.
61. Wendt MK, Balanis N, Carlin CR, Schiemann WP: **STAT3 and epithelial-mesenchymal transitions in carcinomas.** *JAKSTAT* 2014, **3**(1):e28975.
62. Grossi V, Peserico A, Tezil T, Simone C: **p38α MAPK pathway: a key factor in colorectal cancer therapy and chemoresistance.** *World J Gastroenterol* 2014, **20**(29):9744-9758.
63. Nicolini A, Carpi A, Rossi G: **Cytokines in breast cancer.** *Cytokine Growth Factor Rev* 2006, **17**(5):325-337.
64. Steel JC, Waldmann TA, Morris JC: **Interleukin-15 biology and its therapeutic implications in cancer.** *Trends Pharmacol Sci* 2012, **33**(1):35-41.
65. Ueno T, Toi M, Saji H, Muta M, Bando H, Kuroi K, Koike M, Inadera H, Matsushima K: **Significance of macrophage chemoattractant protein-1 in macrophage recruitment, angiogenesis, and survival in human breast cancer.** *Clin Cancer Res* 2000, **6**(8):3282-3289.
66. Yu JL, Rak JW: **Host microenvironment in breast cancer development: inflammatory and immune cells in tumour angiogenesis and arteriogenesis.** *Breast Cancer Res* 2003, **5**(2):83-88.
67. Shojaei F, Wu X, Qu X, Kowanetz M, Yu L, Tan M, Meng YG, Ferrara N: **G-CSF-initiated myeloid cell mobilization and angiogenesis mediate tumor refractoriness**

- to anti-VEGF therapy in mouse models. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009, **106**(16):6742-6747.
68. Hirasawa K, Kitamura T, Oka T, Matsushita H: **Bladder tumor producing granulocyte colony-stimulating factor and parathyroid hormone related protein.** *J Urol* 2002, **167**(5):2130.
  69. Uemura Y, Kobayashi M, Nakata H, Kubota T, Bandobashi K, Saito T, Taguchi H: **Effects of GM-CSF and M-CSF on tumor progression of lung cancer: roles of MEK1/ERK and AKT/PKB pathways.** *Int J Mol Med* 2006, **18**(2):365-373.
  70. Natori T, Sata M, Washida M, Hirata Y, Nagai R, Makuuchi M: **G-CSF stimulates angiogenesis and promotes tumor growth: potential contribution of bone marrow-derived endothelial progenitor cells.** *Biochem Biophys Res Commun* 2002, **297**(4):1058-1061.
  71. Kryczek I, Wei S, Keller E, Liu R, Zou W: **Stroma-derived factor (SDF-1/CXCL12) and human tumor pathogenesis.** *Am J Physiol Cell Physiol* 2007, **292**(3):C987-995.
  72. Teicher BA, Fricker SP: **CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 pathway in cancer.** *Clin Cancer Res* 2010, **16**(11):2927-2931.
  73. DeLisser HM, Christofidou-Solomidou M, Strieter RM, Burdick MD, Robinson CS, Wexler RS, Kerr JS, Garlanda C, Merwin JR, Madri JA *et al*: **Involvement of endothelial PECAM-1/CD31 in angiogenesis.** *Am J Pathol* 1997, **151**(3):671-677.
  74. Arenberg DA, Keane MP, DiGiovine B, Kunkel SL, Morris SB, Xue YY, Burdick MD, Glass MC, Iannettoni MD, Strieter RM: **Epithelial-neutrophil activating peptide (ENA-78) is an important angiogenic factor in non-small cell lung cancer.** *J Clin Invest* 1998, **102**(3):465-472.
  75. Zhao N, Li X, He X, Qiu Y, Zhu L, Qi F: **Interleukin-15 gene therapy and the mammalian target of rapamycin inhibitor everolimus inhibit the growth of metastatic breast cancer.** *J Gene Med* 2013, **15**(10):366-374.
  76. Li Y, Wu J, Zhang W, Zhang N, Guo H: **Identification of serum CCL15 in hepatocellular carcinoma.** *Br J Cancer* 2013, **108**(1):99-106.
  77. Denis C, Deiteren K, Mortier A, Tounsi A, Fransen E, Proost P, Renauld JC, Lambeir AM: **C-terminal clipping of chemokine CCL1/I-309 enhances CCR8-mediated intracellular calcium release and anti-apoptotic activity.** *PLoS One* 2012, **7**(3):e34199.
  78. Hwang TL, Lee LY, Wang CC, Liang Y, Huang SF, Wu CM: **CCL7 and CCL21 overexpression in gastric cancer is associated with lymph node metastasis and poor prognosis.** *World J Gastroenterol* 2012, **18**(11):1249-1256.
  79. Louahed J, Struyf S, Demoulin JB, Parmentier M, Van Snick J, Van Damme J, Renauld JC: **CCR8-dependent activation of the RAS/MAPK pathway mediates anti-apoptotic activity of I-309/ CCL1 and vMIP-I.** *Eur J Immunol* 2003, **33**(2):494-501.
  80. Nagai S, Toi M: **Interleukin-4 and breast cancer.** *Breast Cancer* 2000, **7**(3):181-186.
  81. Xie M, Hu A, Luo Y, Sun W, Hu X, Tang S: **Interleukin-4 and melatonin ameliorate high glucose and interleukin-1 $\beta$  stimulated inflammatory reaction in human retinal endothelial cells and retinal pigment epithelial cells.** *Mol Vis* 2014, **20**:921-928.
  82. Pallard C, Gouilleux F, Bénit L, Cocault L, Souyri M, Levy D, Groner B, Gisselbrecht S, Dusanter-Fourt I: **Thrombopoietin activates a STAT5-like factor in hematopoietic cells.** *EMBO J* 1995, **14**(12):2847-2856.
  83. Barash I: **Stat5 in breast cancer: potential oncogenic activity coincides with positive prognosis for the disease.** *Carcinogenesis* 2012, **33**(12):2320-2325.

84. Tan SH, Nevalainen MT: **Signal transducer and activator of transcription 5A/B in prostate and breast cancers.** *Endocr Relat Câncer* 2008, **15**(2):367-390.
85. Li JH, Yu JP, Yu HG, Xu XM, Yu LL, Liu J, Luo HS: **Melatonin reduces inflammatory injury through inhibiting NF-kappaB activation in rats with colitis.** *Mediators Inflamm* 2005, **2005**(4):185-193.
86. !!! INVALID CITATION !!!
87. Srinivasan V, Pandi-Perumal SR, Brzezinski A, Bhatnagar KP, Cardinali DP: **Melatonin, immune function and cancer.** *Recent Pat Endocr Metab Immune Drug Discov* 2011, **5**(2):109-123.
88. Benchetrit F, Ciree A, Vives V, Warnier G, Gey A, Sautès-Fridman C, Fossiez F, Haicheur N, Fridman WH, Tartour E: **Interleukin-17 inhibits tumor cell growth by means of a T-cell-dependent mechanism.** *Blood* 2002, **99**(6):2114-2121.
89. Tepper RI, Coffman RL, Leder P: **An eosinophil-dependent mechanism for the antitumor effect of interleukin-4.** *Science* 1992, **257**(5069):548-551.
90. Kobayashi M, Kobayashi H, Pollard RB, Suzuki F: **A pathogenic role of Th2 cells and their cytokine products on the pulmonary metastasis of murine B16 melanoma.** *J Immunol* 1998, **160**(12):5869-5873.
91. Hamidullah, Changkija B, Konwar R: **Role of interleukin-10 in breast cancer.** *Breast Câncer Res Treat* 2012, **133**(1):11-21.
92. Lorusso G, Rüegg C: **The tumor microenvironment and its contribution to tumor evolution toward metastasis.** *Histochem Cell Biol* 2008, **130**(6):1091-1103.
93. Tanaka M, Miyajima A: **Oncostatin M, a multifunctional cytokine.** *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 2003, **149**:39-52.
94. Drygin D, Ho CB, Omori M, Bliesath J, Proffitt C, Rice R, Siddiqui-Jain A, O'Brien S, Padgett C, Lim JK *et al*: **Protein kinase CK2 modulates IL-6 expression in inflammatory breast cancer.** *Biochem Biophys Res Commun* 2011, **415**(1):163-167.
95. West NR, Murray JI, Watson PH: **Oncostatin-M promotes phenotypic changes associated with mesenchymal and stem cell-like differentiation in breast cancer.** *Oncogene* 2014, **33**(12):1485-1494.
96. Zeng F, Harris RC: **Epidermal growth factor, from gene organization to bedside.** *Semin Cell Dev Biol* 2014, **28**:2-11.
97. Yuan A, Chen JJ, Yao PL, Yang PC: **The role of interleukin-8 in cancer cells and microenvironment interaction.** *Front Biosci* 2005, **10**:853-865.
98. Malonia SK, Yadav B, Sinha S, Lazennec G, Chattopadhyay S: **Chromatin remodeling protein SMAR1 regulates NF-kB dependent Interleukin-8 transcription in breast cancer.** *Int J Biochem Cell Biol* 2014, **55C**:220-226.
99. Garofalo C, Surmacz E: **Leptin and cancer.** *J Cell Physiol* 2006, **207**(1):12-22.
100. Newman G, Gonzalez-Perez RR: **Leptin-cytokine crosstalk in breast cancer.** *Mol Cell Endocrinol* 2014, **382**(1):570-582.
101. Buijs JT, Stayrook KR, Guise TA: **TGF-β in the Bone Microenvironment: Role in Breast Cancer Metastases.** *Câncer Microenviron* 2011, **4**(3):261-281.
102. Vaňhara P, Souček K: **Mutual cytokine crosstalk between colon cancer cells and microenvironment initiates development of distant metastases.** *JAKSTAT* 2013, **2**(2):e23810.
103. Barone I, Catalano S, Gelsomino L, Marsico S, Giordano C, Panza S, Bonofiglio D, Bossi G, Covington KR, Fuqua SA *et al*: **Leptin mediates tumor-stromal interactions that promote the invasive growth of breast cancer cells.** *Câncer Res* 2012, **72**(6):1416-1427.
104. Rong G, Kang H, Wang Y, Hai T, Sun H: **Candidate markers that associate with chemotherapy resistance in breast cancer through the study on Taxotere-induced**

- damage to tumor microenvironment and gene expression profiling of carcinoma-associated fibroblasts (CAFs).** *PLoS One* 2013, **8**(8):e70960.
105. Le Bitoux MA, Stamenkovic I: **Tumor-host interactions: the role of inflammation.** *Histochem Cell Biol* 2008, **130**(6):1079-1090.
  106. Madhusudan S, Muthuramalingam SR, Braybrooke JP, Wilner S, Kaur K, Han C, Hoare S, Balkwill F, Ganesan TS: **Study of etanercept, a tumor necrosis factor-alpha inhibitor, in recurrent ovarian cancer.** *J Clin Oncol* 2005, **23**(25):5950-5959.
  107. Aggarwal BB: **Editorial: Balancing tumor necrosis factor receptor I and tumor necrosis factor receptor II jointly for joint inflammation.** *Arthritis Rheumatol* 2014, **66**(10):2657-2660.
  108. Miscia S, Marchisio M, Grilli A, Di Valerio V, Centurione L, Sabatino G, Garaci F, Zauli G, Bonvini E, Di Baldassarre A: **Tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) activates Jak1/Stat3-Stat5B signaling through TNFR-1 in human B cells.** *Cell Growth Differ* 2002, **13**(1):13-18.
  109. Yu Q, Miller SC, Osmond DG: **Melatonin inhibits apoptosis during early B-cell development in mouse bone marrow.** *J Pineal Res* 2000, **29**(2):86-93.
  110. Bejarano I, Espino J, Barriga C, Reiter RJ, Pariente JA, Rodríguez AB: **Pro-oxidant effect of melatonin in tumour leucocytes: relation with its cytotoxic and pro-apoptotic effects.** *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2011, **108**(1):14-20.
  111. Proietti S, Cucina A, D'Anselmi F, Dinicola S, Pasqualato A, Lisi E, Bizzarri M: **Melatonin and vitamin D3 synergistically down-regulate Akt and MDM2 leading to TGFβ-1-dependent growth inhibition of breast cancer cells.** *J Pineal Res* 2011, **50**(2):150-158.
  112. Rodriguez C, Martín V, Herrera F, García-Santos G, Rodriguez-Blanco J, Casado-Zapico S, Sánchez-Sánchez AM, Suárez S, Puente-Moncada N, Anítua MJ *et al*: **Mechanisms involved in the pro-apoptotic effect of melatonin in cancer cells.** *Int J Mol Sci* 2013, **14**(4):6597-6613.
  113. León J, Casado J, Jiménez Ruiz SM, Zurita MS, González-Puga C, Rejón JD, Gila A, Muñoz de Rueda P, Pavón EJ, Reiter RJ *et al*: **Melatonin reduces endothelin-1 expression and secretion in colon cancer cells through the inactivation of FoxO-1 and NF-κβ.** *J Pineal Res* 2014, **56**(4):415-426.
  114. Barua A, Yellapa A, Bahr JM, Abramowicz JS, Edassery SL, Basu S, Rotmensch J, Bitterman P: **Expression of death receptor 6 by ovarian tumors in laying hens, a preclinical model of spontaneous ovarian cancer.** *Transl Oncol* 2012, **5**(4):260-268.
  115. Kasof GM, Lu JJ, Liu D, Speer B, Mongan KN, Gomes BC, Lorenzi MV: **Tumor necrosis factor-alpha induces the expression of DR6, a member of the TNF receptor family, through activation of NF-kappaB.** *Oncogene* 2001, **20**(55):7965-7975.
  116. DeRosa DC, Ryan PJ, Okragly A, Witcher DR, Benschop RJ: **Tumor-derived death receptor 6 modulates dendritic cell development.** *Cancer Immunol Immunother* 2008, **57**(6):777-787.
  117. Sheikh MS, Huang Y: **Death receptors as targets of cancer therapeutics.** *Curr Cancer Drug Targets* 2004, **4**(1):97-104.
  118. Hüttemann M, Pecina P, Rainbolt M, Sanderson TH, Kagan VE, Samavati L, Doan JW, Lee I: **The multiple functions of cytochrome c and their regulation in life and death decisions of the mammalian cell: From respiration to apoptosis.** *Mitochondrion* 2011, **11**(3):369-381.
  119. Chen J, Wang W, Wang H, Liu X, Guo X: **Combination treatment of ligustrazine piperazine derivate DLJ14 and adriamycin inhibits progression of resistant**

- breast cancer through inhibition of the EGFR/PI3K/Akt survival pathway and induction of apoptosis.** *Drug Discov Ther* 2014, **8**(1):33-41.
120. Wang J, Xiao X, Zhang Y, Shi D, Chen W, Fu L, Liu L, Xie F, Kang T, Huang W *et al*: **Simultaneous modulation of COX-2, p300, Akt, and Apaf-1 signaling by melatonin to inhibit proliferation and induce apoptosis in breast cancer cells.** *J Pineal Res* 2012, **53**(1):77-90.
  121. Akkiprik M, Feng Y, Wang H, Chen K, Hu L, Sahin A, Krishnamurthy S, Ozer A, Hao X, Zhang W: **Multifunctional roles of insulin-like growth factor binding protein 5 in breast cancer.** *Breast Cancer Res* 2008, **10**(4):212.
  122. Kim KS, Seu YB, Baek SH, Kim MJ, Kim KJ, Kim JH, Kim JR: **Induction of cellular senescence by insulin-like growth factor binding protein-5 through a p53-dependent mechanism.** *Mol Biol Cell* 2007, **18**(11):4543-4552.
  123. Güllü G, Karabulut S, Akkiprik M: **Functional roles and clinical values of insulin-like growth factor-binding protein-5 in different types of cancers.** *Chin J Cancer* 2012, **31**(6):266-280.
  124. Micutkova L, Diener T, Li C, Rogowska-Wrzesinska A, Mueck C, Huetter E, Weinberger B, Grubeck-Loebenstien B, Roepstorff P, Zeng R *et al*: **Insulin-like growth factor binding protein-6 delays replicative senescence of human fibroblasts.** *Mech Ageing Dev* 2011, **132**(10):468-479.
  125. Yamada PM, Lee KW: **Perspectives in mammalian IGFBP-3 biology: local vs. systemic action.** *Am J Physiol Cell Physiol* 2009, **296**(5):C954-976.
  126. Zurawa-Janicka D, Skorko-Glonek J, Lipinska B: **HtrA proteins as targets in therapy of cancer and other diseases.** *Expert Opin Ther Targets* 2010, **14**(7):665-679.
  127. Haupt S, Berger M, Goldberg Z, Haupt Y: **Apoptosis - the p53 network.** *J Cell Sci* 2003, **116**(Pt 20):4077-4085.
  128. Obexer P, Ausserlechner MJ: **X-linked inhibitor of apoptosis protein - a critical death resistance regulator and therapeutic target for personalized cancer therapy.** *Front Oncol* 2014, **4**:197.
  129. Wang L, Zhang Q, Liu B, Han M, Shan B: **Challenge and promise: roles for Livin in progression and therapy of cancer.** *Mol Cancer Ther* 2008, **7**(12):3661-3669.
  130. Oberoi-Khanuja TK, Murali A, Rajalingam K: **IAPs on the move: role of inhibitors of apoptosis proteins in cell migration.** *Cell Death Dis* 2013, **4**:e784.
  131. el-Aziz MA, Hassan HA, Mohamed MH, Meki AR, Abdel-Ghaffar SK, Hussein MR: **The biochemical and morphological alterations following administration of melatonin, retinoic acid and Nigella sativa in mammary carcinoma: an animal model.** *Int J Exp Pathol* 2005, **86**(6):383-396.
  132. Ciocca DR, Calderwood SK: **Heat shock proteins in cancer: diagnostic, prognostic, predictive, and treatment implications.** *Cell Stress Chaperones* 2005, **10**(2):86-103.
  133. Geisler JP, Manahan KJ, Geisler HE, Tammela JE, Rose SL, Hiatt AK, Miller GA, Wiemann MC, Zhou Z: **Heat shock protein 27 in the placentas of women with and without severe preeclampsia.** *Clin Exp Obstet Gynecol* 2004, **31**(1):12-14.
  134. Garrido C, Brunet M, Didelot C, Zermati Y, Schmitt E, Kroemer G: **Heat shock proteins 27 and 70: anti-apoptotic proteins with tumorigenic properties.** *Cell Cycle* 2006, **5**(22):2592-2601.
  135. Zhao M, Ding JX, Zeng K, Zhao J, Shen F, Yin YX, Chen Q: **Heat shock protein 27: a potential biomarker of peritoneal metastasis in epithelial ovarian cancer?** *Tumour Biol* 2014, **35**(2):1051-1056.
  136. Elmore S: **Apoptosis: a review of programmed cell death.** *Toxicol Pathol* 2007, **35**(4):495-516.

137. Akiyama T, Dass CR, Choong PF: **Bim-targeted cancer therapy: a link between drug action and underlying molecular changes.** *Mol Cancer Ther* 2009, **8**(12):3173-3180.
138. Park EJ, Woo SM, Min KJ, Kwon TK: **Transcriptional and post-translational regulation of Bim controls apoptosis in melatonin-treated human renal cancer Caki cells.** *J Pineal Res* 2014, **56**(1):97-106.

*Artigo II*

---

CAPITULO II - Interação de fibroblastos associados ao câncer (CAFs) com linhagem metastática canina (CF-41) em resposta ao tratamento com melatonina.

**Interação de fibroblastos associados ao câncer (CAFs) com linhagem metastática canina (CF-41) em resposta ao tratamento com melatonina**

Larissa Bazela Maschio<sup>1,2</sup>, Gabriela Bottaro Gelaleti<sup>1,2</sup>, Giovanna Rossi Varallo<sup>3</sup>, Marina Gobbe Moschetta<sup>2,3</sup>, Thaiz Ferraz Borin<sup>2</sup>, Bruna Victorasso Jardim-Perassi<sup>2</sup>, Juliana Ramos Lopes<sup>1,2</sup>, Debora Aparecida Pires de Campos Zuccari<sup>1,2,3,4</sup>

<sup>1</sup>Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP/IBILCE), Programa de Pós-Graduação em Genética. Rua: Cristovão Colombo, 2265, CEP: 15054-000 – Cidade: São José do Rio Preto, SP, Brasil.

<sup>2</sup>Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP). Laboratório de Investigação Molecular do Câncer (LIMC). Avenida: Brigadeiro Faria Lima, 5416, CEP: 15090-000 – Cidade: São José do Rio Preto, SP, Brasil.

<sup>3</sup>Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP/FCAV), Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Veterinária. Rua: Prof. Paulo Donato Castellane, CEP: 14884-900 – Cidade: Jaboticabal, SP, Brasil.

<sup>4</sup>Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP), Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. Avenida: Brigadeiro Faria Lima, 5416, CEP: 15090-000 – Cidade: São José do Rio Preto, SP, Brasil.

**\*Autor de correspondência**

Endereço de correspondência: Debora Aparecida Pires de Campos Zuccari, PhD, Laboratório de Investigação Molecular no Câncer (LIMC), Faculdade de Medicina de Sao Jose do Rio Preto (FAMERP). Avenida Brigadeiro Faria Lima, 5416, Vila Sao Pedro, CEP 15090-000, São José do Rio Preto, SP, Brasil. Fax: +55-17-3201-5885. E-mail: [debora.zuccari@famerp.br](mailto:debora.zuccari@famerp.br)

LBM - [larissa\\_maschio@hotmail.com](mailto:larissa_maschio@hotmail.com)

GBG - [gabi\\_b\\_g@yahoo.com.br](mailto:gabi_b_g@yahoo.com.br)

GRV - [giovanna\\_vet03@yahoo.com.br](mailto:giovanna_vet03@yahoo.com.br)

MGM - [marinagobbe@hotmail.com](mailto:marinagobbe@hotmail.com)

TFB - thaiz80@yahoo.com.br

BVJP - brunavj@hotmail.com

JRL - jurlp@hotmail.com

DAPCZ - debora.zuccari@famerp.br

## RESUMO

O microambiente da mama canina é composto por diversos tipos celulares, incluindo os fibroblastos associados ao câncer, que participam do desenvolvimento tumoral. A melatonina, hormônio produzido na glândula pineal, tem apresentado efeitos oncostáticos e oncoprotetores no câncer de mama. Os objetivos deste estudo foram avaliar os efeitos da melatonina na viabilidade celular e na expressão diferencial de proteínas envolvidas nos processos de angiogênese, inflamação e apoptose na linhagem tumoral mamária CF-41 e seu co-cultivo com CAFs. A viabilidade celular foi mensurada pelo teste de MTT na linhagem CF-41, CAFs e no co-cultivo e a expressão proteica pelo *Membrane Antibody Array* no extrato e sobrenadante celulares das culturas isoladas e em co-cultivo. Esse estudo mostrou que o tratamento com 1 mM de melatonina reduziu a viabilidade celular nas células CF-41 ( $p \leq 0,05$ ), CAFs e no co-cultivo. A análise proteica semiquantitativa após tratamento mostrou aumento da expressão das proteínas pró-angiogênicas IL-6, IL-8, MCP-1, TIMP-2 e Angiogenina e redução de TIMP-1 ( $p \leq 0,05$ ), diminuição das proteínas inflamatórias, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, MCP-3, MCP-4, MMP-1, MMP-9, PECAM-1, IL-7, IL-10, IL-12A, IL-12B, IL-13 e MDC e aumento das proteínas IL-15, MCP-2 e SCF ( $p \leq 0,05$ ). Além disso, houve aumento das proteínas apoptóticas BCL-2, caspase-8, HTRA e SMAC e redução de BAD, TNF-RII, citocromo C, FAS ligante, livina e TNF- $\alpha$  ( $p \leq 0,05$ ). A análise por bioinformática indicou que as proteínas diferencialmente expressas estão inseridas nas vias de sinalização *cytokine-cytokine receptor interaction*, Jak-STAT e na via do câncer ( $p < 0,05$ ). Foi observada a ação dos CAFs no microambiente tumoral sendo que a melatonina mostrou-se eficaz na redução da proliferação celular e na inibição de proteínas atuantes nos processos de progressão tumoral e inflamação e indução da expressão de proteínas apoptóticas, sendo possível determinar seu potencial valor terapêutico no câncer de mama.

**Palavras-chave:** câncer de mama, fibroblastos, cachorro, microambiente tumoral, angiogênese, inflamação, apoptose.

## INTRODUÇÃO

A espécie canina é a que apresenta a maior incidência de neoplasias mamárias dentre todos os mamíferos<sup>1, 2</sup>, sendo as malignas predominantes, ocorrendo em cerca de 50% dos casos<sup>3</sup>.

O microambiente tumoral é formado por células inflamatórias, endoteliais, fibroblastos, adipócitos, entre outras<sup>4, 5</sup>. A interconexão entre células epiteliais malignas e o microambiente circundante modulam o comportamento das células tumorais<sup>6, 7</sup> e participam dos eventos de transformação maligna, indução da transição epitelial-mesenquimal (EMT), disseminação tumoral e metástases<sup>8</sup>

Os fibroblastos são as células mais abundantes no estroma do tecido mamário<sup>6, 9</sup>, sendo o principal componente do microambiente alterado. Quando ativados são conhecidos como fibroblastos associados ao câncer (CAFs)<sup>10</sup> e têm participação ativa no desenvolvimento do tumor<sup>4, 7</sup>, intermediando respostas inflamatórias, secretando citocinas, quimiocinas, interleucinas e fatores de crescimento<sup>11-13</sup> além de atuarem na promoção dos processos de proliferação, angiogênese e metástases tumorais<sup>9, 12-14</sup>.

A melatonina, hormônio naturalmente produzido e secretado na glândula pineal, tem sido eficaz na inibição do crescimento tumoral *in vitro* e *in vivo*<sup>15-17</sup>. A melatonina atua no aumento da imunidade local<sup>15,18</sup>, capacidade antioxidante celular<sup>19</sup>, expressão de genes supressores tumorais<sup>20</sup> além da indução da apoptose<sup>21</sup>. Estudos demonstram que a melatonina modula o sistema imune agindo nas respostas imunes específica e não específica<sup>22</sup>, sendo diretamente relacionada à modulação da atividade imunológica sobre a produção de citocinas<sup>22</sup>.

Os objetivos desse estudo foram determinar a eficácia da melatonina na viabilidade celular e na expressão de proteínas envolvidas nos processos de angiogênese, inflamação e apoptose na linhagem tumoral mamária CF-41 e no co-cultivo com CAFs a fim de traçar as principais vias de sinalização das proteínas atuantes no processo tumorigênico moduladas pela melatonina.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### *Considerações éticas*

Esse estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (Deliberação: 010/2013).

### ***Cultivo celular***

As células da linhagem tumoral mamária metástática (CF-41) (ATCC, Manassas, VA, USA) foram cultivadas em frascos de cultura 75 cm<sup>2</sup> (Sarstedt, Nümbrecht, Alemanha) com meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) alta glicose (Cultilab, Campinas, SP, Brasil) suplementado com 10 % de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab, Campinas, SP, Brasil), penicilina (10.000 unid/mL), estreptomicina (500 µg/mL) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e anfotericina-B (250 µg/mL) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) em estufa a 37 °C e 5 % de CO<sub>2</sub>, até atingirem 80–90 % de confluência celular.

Para o cultivo celular primário, foram coletados fragmentos tumorais de aproximadamente 1,5 cm<sup>2</sup> da mama de cadelas (n=7) com idade de 10 a 12 anos (média 13 anos), atendidas em clínicas veterinárias de São José do Rio Preto-SP submetidas ao procedimento cirúrgico para excisão tumoral. O diagnóstico histopatológico dos tumores seguiu a classificação de Misdorp et al. (1999) pela AFIP (Armed Forces Institute of Pathology), sendo incluídos apenas tumores malignos. Os fibroblastos foram isolados a partir da técnica de explante, de acordo com Santos *et al.*<sup>13</sup>, cuja técnica consiste em lavar o tumor em solução salina 1X, microfragmentar e incubar em meio de cultura DMEM baixa glicose e nutriente HAM-F12 na proporção de 1:1 (Cultilab, Campinas, SP, Brasil) suplementado com 20 % de SFB, penicilina (10.000 unid/mL), estreptomicina (500 µg/mL) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), anfotericina B (250 µg/mL) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e L-glutamina (2 mM) (Cultilab, Campinas, SP, Brasil) em estufa a 37 °C e 5 % de CO<sub>2</sub>, até que as células atinjam 80–90 % de confluência.

Após três passagens o procedimento imunocitoquímico (kit *STARR TREK Universal HRP Detection* (Medical Biocare, Concord, CA, USA) caracterizou as CAFs pela alta expressão do anticorpo anti-vimentina, diluição 1:100 (Dako), anti- $\alpha$  actina do músculo liso ( $\alpha$ -SMA), diluição 1:500 (Abcam) e anti-TGF $\beta$ , diluição 1:500 (Abcam), assim como pela expressão negativa do anticorpo anti-citoqueratina, diluição 1:500 (Abcam), seguindo as instruções do fabricante.

Após a caracterização, as células com o melhor padrão de expressão dos marcadores foram selecionadas, sendo de uma cadela de 12 anos de idade com carcinoma ductal *in situ*.

### ***Ensaio de viabilidade celular por MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)***

As células CF-41 e os CAFs foram semeados em placas de 0,31 cm<sup>2</sup> (Sarstedt, Nümbrecht, Alemanha), com 100 uL de meio contendo 0,04 x 10<sup>6</sup> CF-41/poço e 0,03 x 10<sup>6</sup>

CAFs/poço, bem como em co-cultivo, onde foram plaqueadas,  $0,03 \times 10^6$  CF-41/poço em adição a  $0,01 \times 10^6$  CAFs/poço. As células foram incubadas com meio contendo diferentes concentrações de melatonina (*Sigma-Aldrich*, St. Louis, MO, EUA) (0,001 mM; 0,01 mM; 0,1 mM and 1 mM) e adicionado um grupo veículo (sem tratamento) contendo a concentração máxima de agente diluente (etanol 0,05 %). Após 48 horas, 10 uL de solução MTT (*Invitrogen Life Technologies*, Carlsbad, CA, EUA) foram adicionadas em cada poço e as placas foram incubadas a 37 °C durante 4 horas. Para solubilizar os cristais de formazan MTT, as células foram incubadas com dimetilsulfóxido (DMSO) (*Sigma-Aldrich*, St. Louis, MO, EUA) durante 10 minutos a 37 °C. A absorbância foi medida em leitor de ELISA (*Thermo Fisher*, Waltham, MA, EUA) a 540 nm. A viabilidade celular (%) foi calculada para todos os grupos, em comparação com ao grupo veículo. Todas as amostras foram realizadas em triplicatas.

#### ***Co-cultivo celular e extração proteica***

O ensaio de co-cultivo foi realizado em placas de seis poços com área de 4,7 cm<sup>2</sup> por poço (*Corning Life Sciences*, Tewksbury, MA, USA) onde foram plaqueadas  $0,3 \times 10^6$  células epiteliais sobre a superfície de cada poço, com meio de cultura já descrito. Após 24 horas, foram inseridos os insertos com membrana de 4,2 cm<sup>2</sup> e 0,4 µm de poro (*Corning Life Sciences*, Tewksbury, MA, USA) e sob os insertos foram plaqueados  $0,09 \times 10^6$  CAFs, em meio de cultura já descrito, mimetizando a proporção entre células epiteliais e células do estroma, observada na glândula mamária (70:30), de acordo com Rozenchan et al.<sup>23</sup> Após 24 horas em co-cultivo, o meio de cultura foi substituído para meio específico de tratamento, e realizado o tratamento com 1 mM de melatonina por 48 horas para posterior quantificação proteica.

Para mensuração dos níveis proteicos, foram extraídos o lisado celular e o sobrenadante a partir das células CF41 e do co-cultivo com CAFs após o tratamento com 1 mM de melatonina e no grupo veículo. Após o período de 48 horas, as células foram lavadas com PBS 1X e em seguida foi realizada a lise celular com o tampão 1X MILLIPLEX® MAP Lysis Buffer, contendo 1 mM do inibidor de fosfatase (Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>) e 1:10 do inibidor de protease (*Sigma-Aldrich*, St. Louis, MO, EUA). A solução foi centrifugada a 5000 G por 10 minutos a 4 °C para precipitação dos “debris” celulares e coleta do sobrenadante, sendo posteriormente mantidos a -80 °C. Posteriormente foi coletado o meio sobrenadante e utilizado o dispositivo de ultrafiltração (*Amicon®*, Merck Millipore, Billerica, MA, EUA) para concentrar as proteínas presentes no meio. O sobrenadante foi incluído na coluna

contendo filtro no tamanho de três kDa, e centrifugado a 4000 G por 60 minutos, proteínas com tamanho maior que três kDa foram retidas pelo filtro, e posteriormente quantificadas.

A proteína total foi quantificada utilizando o método de bicinchoninic acid (BCA), pelo kit Micro BCA Protein Assay (*Thermo Fisher Scientific*, Waltham, MA, USA) de acordo com as instruções do fabricante, para todos os grupos.

### ***Quantificação da expressão protéica***

Para quantificação proteica, foram utilizados os kits *Human Angiogenesis Array C1*, *Custom C-series Human Cytokine Antibody Array* e *Human Apoptosis Array C1* (*RayBiotech*, Norcross, GA, EUA) (**Tabelas 1, 2 e 3**). Todas as amostras foram incluídas em duplicata, contendo controles positivos e negativos.

As membranas foram incubadas em placas de quatro cavidades com 2 mL de solução de bloqueio tampão 1X (*RayBiotech*, Norcross, GA, EUA) por 30 minutos. Foram adicionados nas membranas 600 ug de proteína de cada grupo e incubadas a 4 °C “*overnight*”, sendo 300 ug de proteínas proveniente do lisado celular e 300 ug do sobrenadante. A solução foi descartada e as membranas lavadas três vezes com tampão de lavagem 1 X (*RayBio I*, *RayBiotech*, Norcross, GA, EUA), e duas vezes com tampão de lavagem 1 X (*RayBio II*, *RayBiotech*, Norcross, GA, EUA) por 5 minutos cada. A solução de biotina conjugada anti-citocinas (*RayBiotech*, Norcross, GA, EUA) foi adicionada e as amostras foram incubadas a 4 °C “*overnight*”. As membranas foram novamente lavadas com tampão de lavagem I e II e incubadas com a solução *horseradish peroxidase* (HRP) estreptavidina 1000X (*RayBiotech*, Norcross, GA, EUA) a 4 °C “*overnight*”. Posteriormente, as membranas foram novamente lavadas e incubadas por 2 minutos em solução de detecção (*RayBiotech*, Norcross, GA, EUA) e foram expostas ao sistema *ChemiDoc* (*BioRad*, Hercules, CA, EUA) e quantificadas espectrofotometricamente.

A densidade óptica referente à expressão de cada proteína foi normalizada com o controle positivo, estabelecido para cada membrana, e quantificada utilizando o software *ImageJ* (*NIH*, Bethesda, MD, EUA).

Após a quantificação proteica, as proteínas diferencialmente expressas após o tratamento com melatonina foram submetidas à análise de homologia entre as espécies humana e canina, sendo consideradas para esse estudo aquelas com padrão de homologia acima de 80 – 90%.

**Tabela 1.** Disposição das proteínas nas membranas do *Kit Human Angiogenesis Array C1*, composto por 20 diferentes citocinas/fatores.

	A	B	C	D	E	F	G	H
1	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Angiogenina (ANG)	EGF (EGF)	ENA-78 (CXCL5)	bFGF (FGF2)
2	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Angiogenina (ANG)	EGF (EGF)	ENA-78 (CXCL5)	bFGF (FGF2)
3	GRO (CXCL1)	IFN gama (IFNG)	IGF-1 (IGF1)	IL-6 (IL6)	IL-8 (CXCL8)	Leptina (LEP)	MCP-1 (CCL2)	PDGF-BB (PDGFB)
4	GRO (CXCL1)	IFN gama (IFNG)	IGF-1 (IGF1)	IL-6 (IL6)	IL-8 (CXCL8)	Leptina (LEP)	MCP-1 (CCL2)	PDGF-BB (PDGFB)
5	PLGF (PGF)	RANTES (CCL5)	TGF- $\beta$ 1 (TGFB1)	TIMP-1 (TIMP1)	TIMP-2 (TIMP2)	Trombopoietina (THPO)	VEGF-A (VEGFA)	VEGF-D (FIGF)
6	PLGF (PGF)	RANTES (CCL5)	TGF- $\beta$ 1 (TGFB1)	TIMP-1 (TIMP1)	TIMP-2 (TIMP2)	Trombopoietina (THPO)	VEGF-A (VEGFA)	VEGF-D (FIGF)
7	Branco	Branco	Branco	Branco	Branco	Branco	Negativo	Positivo
8	Branco	Branco	Branco	Branco	Branco	Branco	Negativo	Positivo

Angiogenina; EGF = fator de crescimento epidermal; ENA-78 = Proteína epitelial ativadora de neutrófilos -78; bFGF = Fator de crescimento de fibroblastos básico; GRO = Oncogene relacionado ao crescimento; IFN gama = interferon gama; IGF-1= fator de crescimento semelhante a insulina-1; IL-6 = Interleucina-6; IL-8 = Interleucina-8; Leptina; MCP-1 = Proteína quimioatraente de monócitos-1; PDGF-BB = Fator de crescimento derivado de plaquetas-BB; PLGF= Fator de crescimento placentário; RANTES; TGF- $\beta$ 1 = Fator de crescimento transformante beta 1; TIMP-1 = proteína inibidora de metaloproteinase tecidual 1; TIMP-2 = proteína inibidora de metaloproteinase tecidual 2; Trombopoietina; VEGF = Vascular Fator de crescimento vascular endotelial; VEGF-D = Fator de crescimento vascular endotelial D.

**Tabela 2.** Disposição das proteínas nas membranas do *Kit Custom Cytokine Antibody Array*, composto por 39 diferentes citocinas/fatores.

	A	B	C	D	E	F
1	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Angiopoietina-1 ( <i>ANGPT1</i> )	Angiopoietina-2 ( <i>ANGPT2</i> )
2	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Angiopoietina-1 ( <i>ANGPT1</i> )	Angiopoietina-2 ( <i>ANGPT2</i> )
3	IL-4 ( <i>IL4</i> )	I-TAC ( <i>CXCL11</i> )	MCP-3 ( <i>CCL7</i> )	MCP-4 ( <i>CCL13</i> )	MMP-1 ( <i>MMP1</i> )	MMP-9 ( <i>MMP9</i> )
4	IL-4 ( <i>IL4</i> )	I-TAC ( <i>CXCL11</i> )	MCP-3 ( <i>CCL7</i> )	MCP-4 ( <i>CCL13</i> )	MMP-1 ( <i>MMP1</i> )	MMP-9 ( <i>MMP9</i> )
5	GM-CSF ( <i>CSF2</i> )	GRO $\alpha$ ( <i>CXCL1</i> )	IL-3 ( <i>IL3</i> )	IL-5 ( <i>IL5</i> )	IL-7 ( <i>IL7</i> )	IL-10 ( <i>IL10</i> )
6	GM-CSF ( <i>CSF2</i> )	GRO $\alpha$ ( <i>CXCL1</i> )	IL-3 ( <i>IL3</i> )	IL-5 ( <i>IL3</i> )	IL-7 ( <i>IL7</i> )	IL-10 ( <i>IL10</i> )
7	MDC ( <i>CCL22</i> )	MIG ( <i>CXCL9</i> )	MIP-1delta ( <i>CCL15</i> )	SCF ( <i>KITLG</i> )	SDF-1 ( <i>CXCL12</i> )	TARC ( <i>CCL17</i> )
8	MDC ( <i>CCL22</i> )	MIG ( <i>CXCL9</i> )	MIP-1delta ( <i>CCL15</i> )	SCF ( <i>KITLG</i> )	SDF-1 ( <i>CXCL12</i> )	TARC ( <i>CCL17</i> )
	G	H	I	J	K	L
1	Angiostatina ( <i>PLG</i> )	G-CSF ( <i>CSF3</i> )	I-309 ( <i>CCL1</i> )	IL-1 $\alpha$ ( <i>IL1A</i> )	IL-1 $\beta$ ( <i>IL1B</i> )	IL-2 ( <i>IL2</i> )
2	Angiostatina ( <i>PLG</i> )	G-CSF ( <i>CSF3</i> )	I-309 ( <i>CCL1</i> )	IL-1 $\alpha$ ( <i>IL1A</i> )	IL-1 $\beta$ ( <i>IL1B</i> )	IL-2 ( <i>IL2</i> )
3	PECAM-1 ( <i>PECAM1</i> )	TIE-2 ( <i>TEK</i> )	TNF- $\alpha$ ( <i>TNF</i> )	uPAR ( <i>PLAUR</i> )	VEGF-R2 ( <i>KDR</i> )	VEGF-R3 ( <i>FLT4</i> )
4	PECAM-1 ( <i>PECAM1</i> )	TIE-2 ( <i>TEK</i> )	TNF- $\alpha$ ( <i>TNF</i> )	uPAR ( <i>PLAUR</i> )	VEGF-R2 ( <i>KDR</i> )	VEGF-R3 ( <i>FLT4</i> )
5	IL-12p40 ( <i>IL12B</i> )	IL-12p70 ( <i>IL12A</i> )	IL-13 ( <i>IL13</i> )	IL-15 ( <i>IL15</i> )	MCP-2 ( <i>CCL8</i> )	M-CSF ( <i>CSF1</i> )
6	IL-12p40 ( <i>IL12B</i> )	IL-12p70 ( <i>IL12A</i> )	IL-13 ( <i>IL13</i> )	IL-15 ( <i>IL15</i> )	MCP-2 ( <i>CCL8</i> )	M-CSF ( <i>CSF1</i> )
7	Oncostatina M	Branco	Branco	Branco	Branco	Branco
8	Oncostatina M	Branco	Branco	Branco	Branco	Branco

Angiopoietina-1; Angiopoietina-2; Angiostatina; G-CSF = Fator estimulador de colônias de granulócitos; I-309/CCL1 = Citocina ligante 1; IL-1 $\alpha$  = Interleucina-1 alfa; IL-1 $\beta$  = Interleucina-1 beta; IL-2 = Interleucina-2; IL-4 = Interleucina-4; I-TAC = citocina alfa de células T induzida por interferon; MCP-3 = Proteína quimioatraente de monócitos-3; MCP-4 = Proteína quimioatraente de monócitos-4; MMP-1 = Metaloproteinase-1; MMP-9 = Metaloproteinase-9; PECAM-1 = Molécula de adesão celular endotelial de plaquetas; TIE-2 = Receptor de proteína tirosina quinase-2 ; TNF- $\alpha$  = Fator de necrose tumoral alfa; uPAR = Receptor de uroquinase; VEGFR-2 = Fator de crescimento vascular endotelial receptor-2; VEGFR-3 = Fator de crescimento vascular endotelial receptor-3; GM-CSF = Fator estimulador de colônias de granulócitos e monócitos; GRO- $\alpha$  = Oncogene relacionado ao crescimento alfa; IL-3 = Interleucina-3; IL-5 = Interleucina -5; IL-7 = Interleucina-7; IL-10 = Interleucina-10; IL-12p40 = Interleucina-12p40; IL12p70 = Interleucina-12p70; IL-13 = Interleucina-13; IL-15 = Interleucina-15; MCP-2 = Proteína quimioatraente de monócitos-2; M-CSF = Fator estimulador de colônias de macrófagos; MDC = Quimiocina derivada de macrófagos; MIG = Monocina induzida pelo interferon gama; MIP-1-delta = Proteína inflamatória de macrófagos-1 delta; SCF = Fator de célula-tronco; SDF-1= Fator derivado de células estromais-1; TARC = Quimiocina do timo regulada por ativação; Oncostatina-M.

**Tabela 3.** Disposição das proteínas nas membranas do *Kit Human Apoptosis Array C1*, composto por 43 diferentes fatores.

	A	B	C	D	E	F	G
1	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Branco	Branco	BAD ( <i>bad</i> )
2	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Branco	Branco	BAD ( <i>bad</i> )
3	CD40 ( <i>CD40</i> )	CD40 LIGAND ( <i>CD40LG</i> )	cIAP-2 ( <i>BIRC3</i> )	cytoC ( <i>CYCS</i> )	DR6 ( <i>TNFRSF21</i> )	Fas ( <i>FAS</i> )	Fas ligand ( <i>FASLG</i> )
4	CD40 ( <i>CD40</i> )	CD40 LIGAND ( <i>CD40LG</i> )	cIAP-3 ( <i>BIRC3</i> )	cytoC ( <i>CYCS</i> )	DR6 ( <i>TNFRSF21</i> )	Fas ( <i>FAS</i> )	Fas ligand ( <i>FASLG</i> )
5	IGFBP-1 ( <i>IGFBP1</i> )	IGFBP-2 ( <i>IGFBP2</i> )	IGFBP-3 ( <i>IGFBP3</i> )	IGFBP-4 ( <i>IGFBP4</i> )	IGFBP-5 ( <i>IGFBP5</i> )	IGFBP-6 ( <i>IGFBP6</i> )	IGF-1R ( <i>IGF1R</i> )
6	IGFBP-1 ( <i>IGFBP1</i> )	IGFBP-2 ( <i>IGFBP2</i> )	IGFBP-3 ( <i>IGFBP3</i> )	IGFBP-4 ( <i>IGFBP4</i> )	IGFBP-5 ( <i>IGFBP5</i> )	IGFBP-6 ( <i>IGFBP6</i> )	IGF-1R ( <i>IGF1R</i> )
7	TNF RII ( <i>TNFRSF1B</i> )	TNF- $\alpha$ ( <i>TNF</i> )	TNF- $\beta$ ( <i>LTA</i> )	TRAIL R1 ( <i>TNFRSF10A</i> )	TRAIL R2 ( <i>TNFRSF10B</i> )	TRAIL R3 ( <i>TNFRSF10C</i> )	TRAIL R4 ( <i>TNFRSF10D</i> )
8	TNF RII ( <i>TNFRSF1B</i> )	TNF- $\alpha$ ( <i>TNF</i> )	TNF- $\beta$ ( <i>LTA</i> )	TRAIL R1 ( <i>TNFRSF10A</i> )	TRAIL R2 ( <i>TNFRSF10B</i> )	TRAIL R3 ( <i>TNFRSF10C</i> )	TRAIL R4 ( <i>TNFRSF10D</i> )
	H	I	J	K	L	M	N
1	BAX ( <i>BAX</i> )	BCL-2 ( <i>BCL2</i> )	BCL-W ( <i>BCL2L2</i> )	BID ( <i>BID</i> )	BIM ( <i>BCL2L11</i> )	Caspase-3 ( <i>CASP3</i> )	Caspase-8 ( <i>CASP8</i> )
2	BAX ( <i>BAX</i> )	BCL-2 ( <i>BCL2</i> )	BCL-W ( <i>BCL2L2</i> )	BID ( <i>BID</i> )	BIM ( <i>BCL2L11</i> )	Caspase-3 ( <i>CASP3</i> )	Caspase-8 ( <i>CASP8</i> )
3	Branco	HSP27 ( <i>HPSB1</i> )	HSP60 ( <i>HPSA14</i> )	HSP70 ( <i>HPSA4</i> )	hTRA ( <i>HTRA1</i> )	IGF-1 ( <i>IGF1</i> )	IGF-2 ( <i>IGF2</i> )
4	Branco	HSP27 ( <i>HPSB1</i> )	HSP60 ( <i>HPSA14</i> )	HSP70 ( <i>HPSA4</i> )	hTRA ( <i>HTRA1</i> )	IGF-1 ( <i>IGF1</i> )	IGF-2 ( <i>IGF1</i> )
5	Livin ( <i>BIRC7</i> )	p21 ( <i>CDKN1A</i> )	p27 ( <i>SSSA1</i> )	p53 ( <i>TP53</i> )	SMAC ( <i>DIABLO</i> )	Survivina ( <i>BIRC5</i> )	sTNF RI ( <i>TNFSRIA</i> )
6	Livin ( <i>BIRC7</i> )	p21 ( <i>CDKN1A</i> )	p27 ( <i>SSSA1</i> )	p53 ( <i>TP53</i> )	SMAC ( <i>DIABLO</i> )	Survivina ( <i>BIRC5</i> )	sTNF RI ( <i>TNFSRIA</i> )
7	xIAP ( <i>XIAP</i> )	Branco	Branco	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo
8	xIAP ( <i>XIAP</i> )	Branco	Branco	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo

BAD = Agonista de morte celular associado a BCL2; BAX = Proteína X associada a BCL-2; BCL-2 = Linfoma de células B-2; BID = BID = Agonista de morte que interage com o domínio BH3; caspase-3; caspase-8; CD40; CD40 ligand = Ligante CD40; cIAP-2 = inibidor de apoptose celular-2; cytoC = Citocromo C; DR6 = Receptor de morte 6; Fas = Primeiro sinal de apoptose; Fas ligand = Ligante do primeiro sinal de apoptose (Superfamília do TNF, membro 6); HSP27 = Proteína de choque térmico 27; HSP60 = Proteína de choque térmico 60; HSP70 = Proteína de choque térmico 70; hTRA = alta temperatura requerida A; BCL-3 = Linfoma de células B-3; IGF-1 = fator de crescimento semelhante a insulina-1; IGF-2 = fator de crescimento semelhante a insulina-2; IGFBP1 = fator de crescimento semelhante a insulina proteína de ligação-1; IGFBP2 = fator de crescimento semelhante a insulina proteína de ligação-2; IGFBP3 = fator de crescimento semelhante a insulina proteína de ligação-3; IGFBP4 = fator de crescimento semelhante a insulina proteína de ligação-4; IGFBP5 = fator de crescimento semelhante a insulina proteína de ligação-5; IGFBP6 = fator de crescimento semelhante a insulina proteína de ligação-6; IGF-1sR = fator de crescimento semelhante a

insulina receptor-1; Livin; p21; p27; p53; SMAC = segundo ativador derivado de mitocôndrias de caspases; Survinina; TNF- $\alpha$  = Fator de necrose tumoral alfa; TNF- $\beta$  = Fator de necrose tumoral beta; sTNF RI = Fator de necrose tumoral receptor-I; sTNF RII = Fator de necrose tumoral receptor-II; TRAIL R1 = Receptor-1 do ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF; TRAIL R2 = Receptor-2 do ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF ; TRAIL R3 = Receptor-3 do ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF; TRAIL R4 = Receptor-4 do ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF; xIAP = Proteína inibidora de apoptose ligada ao X.

### **Análise estatística**

Todos os dados foram expressos em média  $\pm$  erro padrão da média como comparação entre o tratamento com melatonina e o grupo veículo utilizando-se o teste *t* de *Student* e análise de Variância (ANOVA), seguida de teste de Bonferroni com o software *GraphPad Prism 5.0* (*GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA*). Valores de  $p \leq 0,05$  foram considerados significantes.

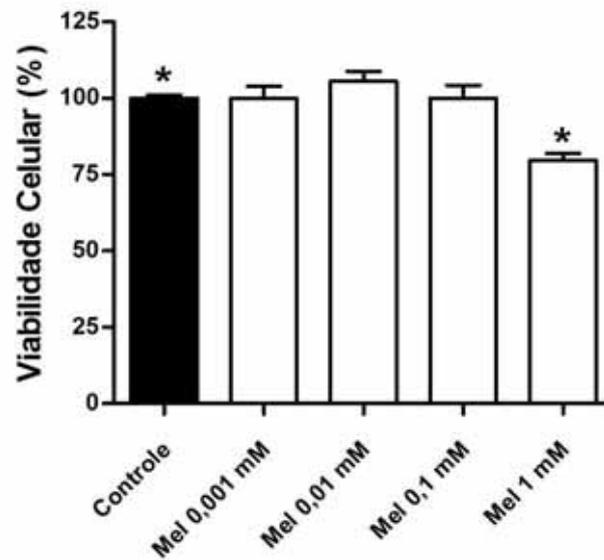
### **Bioinformática**

Após a análise proteica semiquantitativa, as proteínas diferencialmente expressas foram submetidas à análise de bioinformática, através do software *String 9.1 database* (<http://string-db.org/>) e concomitantemente dispostas no software KEGG (<http://www.kegg.jp/>), sendo reproduzidas as vias de sinalização as quais estavam inseridas. Esse procedimento foi realizado para os grupos controle e tratado com 1 mM de melatonina em ambos os cultivos celulares.

## **RESULTADOS**

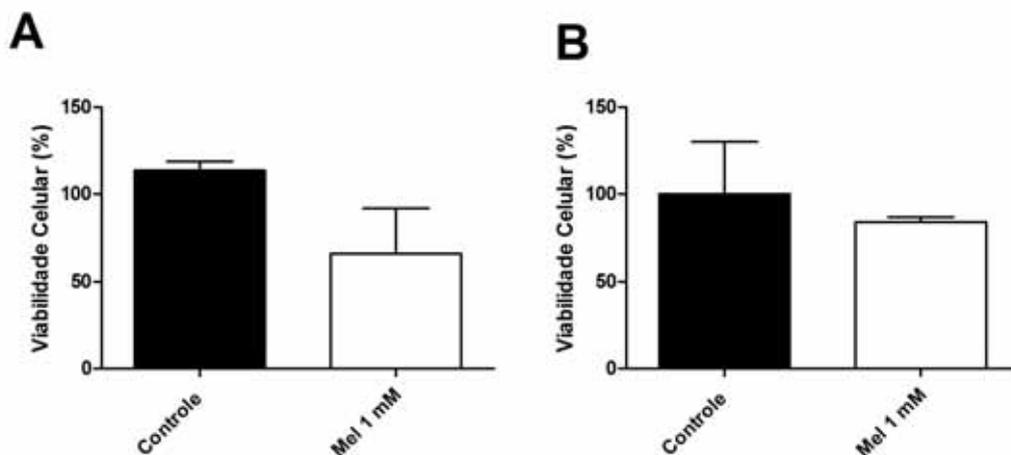
### ***Redução da viabilidade celular das células CF-41, CAFs e co-cultivo ao tratamento com 1 mM de melatonina***

Para avaliar a atividade anti-tumoral da melatonina, foi realizado o teste de viabilidade celular nas células da linhagem CF-41, nos CAFs e no co-cultivo após o tratamento com o hormônio. A melatonina foi capaz de reduzir a viabilidade celular da linhagem CF-41 em todas as concentrações testadas, sendo a concentração farmacológica de 1 mM capaz de reduzir a viabilidade celular para 79,5% com relação ao grupo controle (veículo), após 48 horas ( $p \leq 0,05$ ) (**Figura 1**)



**Figura 1 – Efeito inibitório da melatonina sobre a viabilidade das células CF-41.** As células foram tratadas nas concentrações de 0,001 mM, 0,01 mM, 0,1 mM e 1 mM de melatonina e a viabilidade celular mensurada pelo ensaio de MTT. O tratamento foi realizado por 48 horas, com redução para 79,5% da viabilidade celular ao tratamento com 1 mM de melatonina em relação ao grupo controle veículo. A coluna preta representa o grupo controle veículo, sem tratamento. As colunas brancas correspondem às células tratadas com diferentes concentrações de melatonina. Os dados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (\*) ANOVA valor significativo seguido de Bonferroni.

A concentração de 1 mM de melatonina foi eficaz na redução de 29,0% da viabilidade celular dos CAFs e 16,0% no co-cultivo com a linhagem CF-41 após tratamento com 1 mM de melatonina em relação ao grupo controle (veículo), por 48 horas, no entanto a redução não foi estatisticamente significante (**Figura 2**).



**Figura 2 – Redução da viabilidade celular dos CAFs e do co-cultivo CF-41 e CAFs. A.** Efeito inibitório da melatonina sobre a viabilidade dos CAFs, com redução de 29,0% da viabilidade celular em relação ao grupo controle veículo. **B:** Efeito inibitório da melatonina

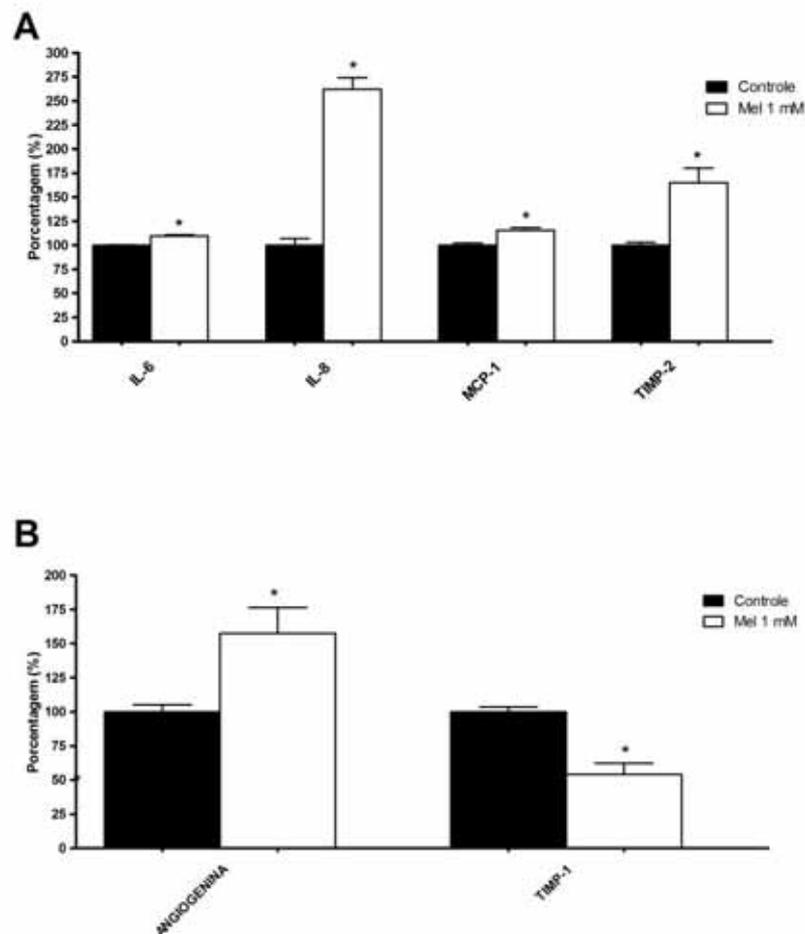
sobre a viabilidade das células CF-41 em co-cultivo com CAFs, com redução de 16 % da viabilidade celular em relação ao grupo controle veículo. As células foram tratadas na concentração de 1 mM de melatonina e a viabilidade celular mensurada pelo ensaio de MTT. O tratamento foi realizado por 48 horas. A coluna preta representa o grupo controle veículo, sem tratamento. A coluna branca corresponde às células tratadas com 1 mM de melatonina. Os dados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (\*) Teste T de *student*.

## Proteínas diferencialmente expressas após tratamento com 1 mM de melatonina

### Proteínas angiogênicas

Nas células CF-41 foi verificado aumento estatisticamente significativo na expressão das proteínas pró-angiogênicas IL-6 ( $p=0,008$ ), IL-8 ( $p=0,003$ ), MCP-1 (CCL2) ( $p=0,02$ ) e TIMP-2 ( $p=0,02$ ) após tratamento com 1 mM de melatonina por 48 horas (**Figura 3A**).

No co-cultivo, houve redução significativa da expressão da proteína TIMP-1 ( $p=0,01$ ) e aumento da expressão da angiogenina ( $p=0,05$ ) após tratamento das células com melatonina (**Figura 3B**).



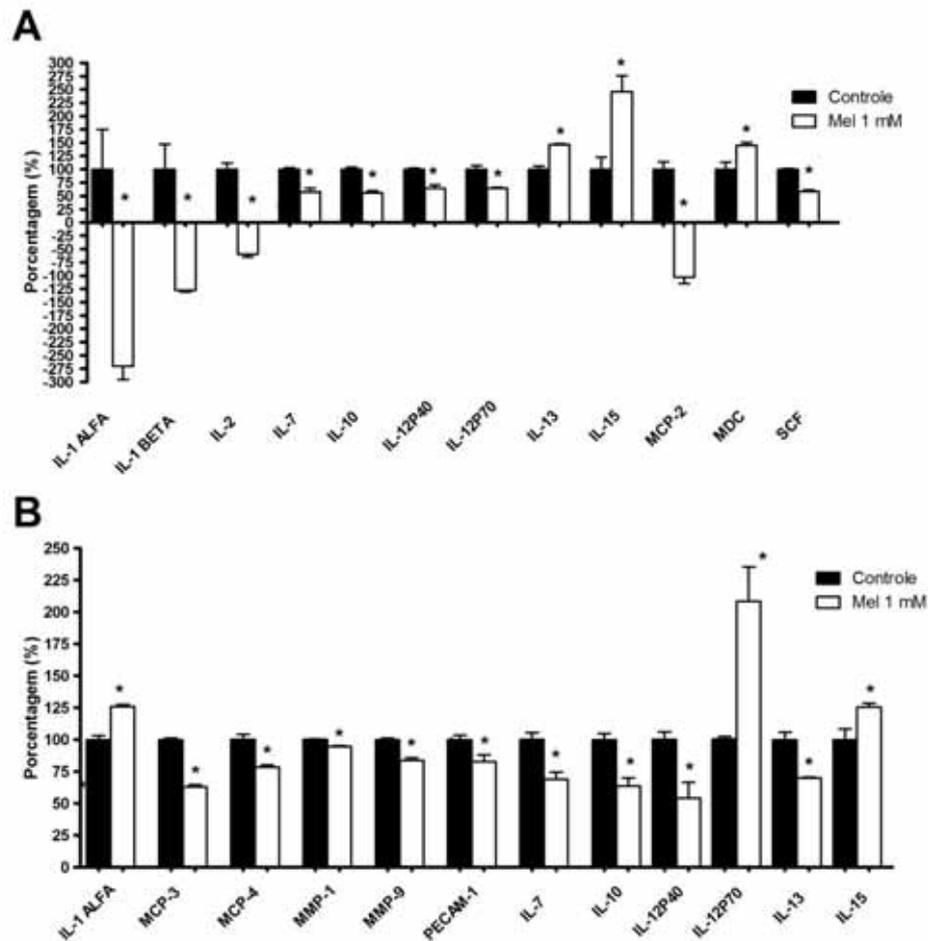
**Figura 3 – Proteínas angiogênicas diferencialmente expressas nas células CF-41 e no co-cultivo com CAFs.** Proteínas diferencialmente expressas mensuradas no *Kit Human Angiogenesis Array*. **A.** Células da linhagem tumoral mamária CF-41, **B.** Co-cultivo das

células CF-41 e CAFs. As colunas pretas representam o grupo controle veículo. As colunas brancas correspondem às células tratadas com 1 mM de melatonina por 48 horas. Os dados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (\*) Teste T de *student*.

### Proteínas inflamatórias

A análise semi-quantitativa mostrou redução estatisticamente significativa das proteínas antiinflamatórias IL-2 ( $p=0,003$ ), IL-7 ( $p=0,01$ ), IL-10 ( $p=0,003$ ), IL-12p40 ( $p=0,008$ ), IL-12p70 ( $p=0,01$ ), IL-13 ( $p=0,02$ ) e MDC (CCL22) ( $p=0,004$ ) e das pró-inflamatórias IL-1 $\alpha$  ( $p=0,02$ ), IL-1 $\beta$  ( $p=0,02$ ). Além disso, houve aumento da expressão das proteínas IL-15 ( $p=0,008$ ), MCP-2 (CCL8) ( $p=0,02$ ) e de SCF ( $p=0,04$ ) nas células CF-41 quando tratadas com 1 mM de melatonina por 48 horas (**Figura 4A**).

No co-cultivo, as proteínas IL-1 $\alpha$  ( $p=0,008$ ), IL-15 ( $p=0,02$ ) e IL-12p70 ( $p=0,01$ ) tiveram seus níveis elevados e as citocinas MCP-3 (CCL7) ( $p=0,001$ ), MCP-4 (CCL13) ( $p=0,01$ ), MMP-1 ( $p=0,01$ ), MMP-9 ( $p=0,009$ ), PECAM-1 ( $p=0,05$ ), IL-7 ( $p=0,04$ ), IL-10 ( $p=0,02$ ) e IL-12p40 ( $p=0,02$ ) foram subexpressas quando as células foram tratadas (**Figura 4B**).

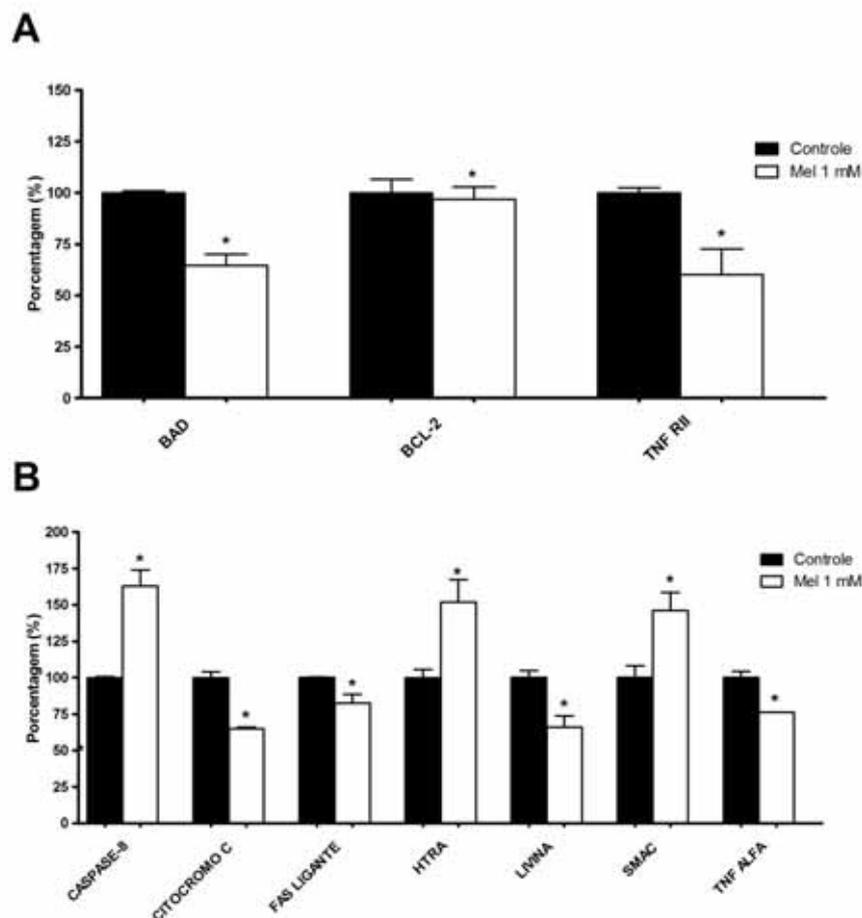


**Figura 4 – Proteínas inflamatórias diferencialmente expressas nas células CF-41 e no co-cultivo com CAFs.** Proteínas diferencialmente expressas mensuradas no *Kit Custom Cytokine Antibody Array*. **A.** Células da linhagem tumoral mamária CF-41, **B.** Co-cultivo das células CF-41 e CAFs. As colunas pretas representam o grupo controle veículo. As colunas brancas correspondem às células tratadas com 1 mM de melatonina por 48 horas. Os dados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (\*) Teste T de *student*.

### *Proteínas apoptóticas*

Houve redução estatisticamente significativa da proteína BCL-2 ( $p=0,03$ ), BAD ( $p=0,01$ ) e TNF-RII ( $p=0,04$ ) nas células CF-41 quando tratadas com 1 mM de melatonina por 48 horas (**Figura 5A**).

No co-cultivo, houve aumento da expressão das proteínas caspase 8 ( $p=0,01$ ), hTRA ( $p=0,04$ ) e SMAC ( $p=0,04$ ) e, em contraste, redução das proteínas citocromo C ( $p=0,007$ ), Fas ligante ( $p=0,05$ ), Livina ( $p=0,03$ ) e TNF- $\alpha$  ( $p=0,01$ ) após o tratamento com 1 mM de melatonina ( $p \leq 0,05$ ) (**Figura 5B**).

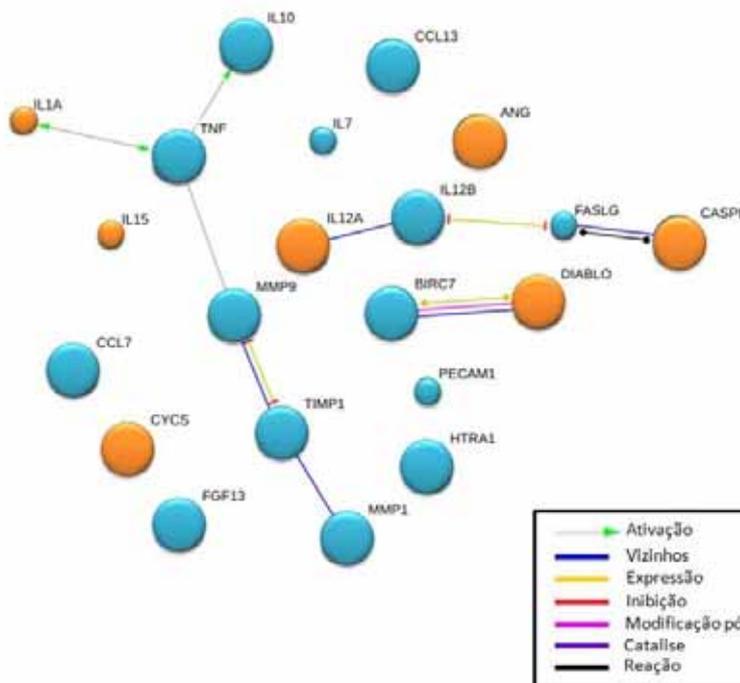


**Figura 5. Proteínas apoptóticas diferencialmente expressas nas células CF-41 e no co-cultivo com CAFs.** Proteínas diferencialmente expressas mensuradas no *Kit Human Apoptosis Array C1*. **A.** Células da linhagem tumoral mamária CF-41, **B.** Co-cultivo das células CF-41 e CAFs. As colunas pretas representam o grupo controle veículo. As colunas



altamente expressas após o tratamento com melatonina ( $p < 0,05$ ). As setas indicam a interação dessas proteínas conforme ilustrado na legenda.

O co-cultivo das células CF-41 com CAFs apresentou 21 proteínas diferencialmente expressas após o tratamento com melatonina, sendo que 11 proteínas estão presentes em três vias de sinalização distintas. As citocinas IL-1 $\alpha$ , Fas Ligand e TNF- $\alpha$  atuam na via de sinalização *cytokine-cytokine receptor interaction* ( $p < 0,05$ ), as proteínas IL-10, IL-12p40, IL-12p70 e IL-15 nas vias *cytokine-cytokine receptor interaction* e/ou *jak-STAT* ( $p < 0,05$ ) e as proteínas MMP-2, MMP-9, caspase-8 e citocromo C (cycs) estão inseridas na via do câncer ( $p < 0,05$ ) (**Figura 7**).



**Figura 7. Rede de interação das proteínas diferencialmente expressas na co-cultura entre CF-41 e CAFs.** Figura esquematizada pelo Software String representando a rede de interação entre as proteínas diferencialmente expressas nas células CF-41 em co-cultivo com CAFs após tratamento com 1 mM de melatonina. Círculos em cor azul representam as proteínas com menor expressão após o tratamento com melatonina ( $p < 0,05$ ) e círculos em cor laranja representam as proteínas altamente expressas após o tratamento com melatonina ( $p < 0,05$ ). As setas indicam a interação dessas proteínas conforme ilustrado na legenda.

## DISCUSSÃO

Tumores mamários caninos são os mais prevalentes entre os mamíferos<sup>1</sup>. Diversos estudos consideram essas neoplasias como de origem epitelial<sup>8</sup>, por outro lado, sabe-se que o crescimento tumoral é determinado também pelas células estromais, onde a interconexão

entre as células modulam o comportamento das células tumorais<sup>6,7</sup>, liberando citocinas e fatores de crescimento que atuam na progressão tumoral<sup>24, 25</sup>.

Diversos estudos têm mostrado que a melatonina é eficaz na inibição do crescimento tumoral *in vitro* e *in vivo*<sup>15, 16</sup>. Nosso estudo mostrou que 1 mM de melatonina foi capaz de reduzir a viabilidade celular das células tumorais mamárias CF-41 e em co-cultivo com CAFs. O efeito anti-proliferativo da melatonina em linhagens tumorais mamárias humanas tem sido mostrado em vários trabalhos<sup>16, 26</sup>, ainda, corroborando com os nossos achados, Lopes *et al.*<sup>27</sup> mostrou que 1 mM de melatonina é capaz de reduzir a viabilidade de células mamárias primárias tumorais caninas.

Sabe-se que CAFs modulam o microambiente celular, liberando fatores de crescimento que estimulam a proliferação de células epiteliais, tornando as células mais resistentes à atuação de fatores/agentes externos<sup>28</sup>. Além disso, CAFs atuam na promoção dos processos de proliferação, angiogênese e metástase tumorais<sup>9, 12-14</sup> e estão ainda relacionados à resistência a tratamentos quimioterápicos<sup>29</sup>. Ainda assim foi possível observar redução da viabilidade celular no co-cultivo entre CAFs e CF-41 após o tratamento com melatonina.

Parte do efeito inibitório da melatonina na proliferação celular do câncer de mama ocorre pela ligação da melatonina aos receptores de membrana MT1<sup>30</sup>, conectados à proteína G, os quais atuam na redução da proliferação e angiogênese e induzem a diferenciação celular<sup>31</sup>. Um estudo de Knowler *et al.*<sup>32</sup>, mostrou que fibroblastos primários, provenientes de pacientes com carcinoma ductal invasivo, expressam o gene do receptor 1 da melatonina (MTNR1A), dessa forma, sugerimos que os CAFs caninos reduzam a proliferação celular devido a presença de receptores de melatonina em sua superfície, considerando a homologia das espécies canina e humana em relação às características tumorais<sup>33</sup>.

A ativação da via de sinalização Jak-STAT, desempenha um papel importante na iniciação do câncer<sup>34</sup>, já que é uma via com diversas cascatas utilizadas para traduzir sinais de desenvolvimento e homeostase, além de iniciar seus mecanismos de sinalização através da ligação com citocinas e fatores de crescimento<sup>35</sup>. A ligação da citocina ao seu receptor conduz a dimerização do receptor, e a subsequente ativação da *janus kinase* (Jak). Resíduos de tirosina específicos sobre receptores são fosforilados por Jak, e estes então servem como locais de ancoragem para a família de *transdutores de sinal e ativação de transcrição* (STAT), e assim translocam-se para o núcleo celular modulando a expressão de genes alvo<sup>36</sup>. Sabe-se que a atividade aumentada das STAT3 e STAT5 contribuem para a transformação celular, desenvolvimento tumoral e deficiências imunológicas<sup>34</sup>.

Nesse contexto esse estudo mostrou que a melatonina foi capaz de reduzir a expressão de proteínas inseridas na via Jak-STAT, como a IL-2, IL-10, IL-12A e IL-13 nas células CF-41 e das interleucinas 10 e 12B nas células CF-41 e em co-cultivo com CAFs. Em contrapartida, o tratamento com melatonina aumentou os níveis de IL-15 nos dois grupos, além de elevar os níveis de IL-6 na linhagem CF-41 e IL-12A no co-cultivo.

A IL-2 é uma citocina antiinflamatória, capaz de ativar o sistema imune, aumentando a resposta contra o tumor<sup>37</sup>, da mesma forma a IL-10, IL-12A, IL-12B e IL-13 exercem essa função, sendo consideradas inibidoras da resposta pró-inflamatória<sup>38, 39</sup>, células natural killers (NK), estimulando neutrófilos, macrófagos e células dendríticas<sup>40</sup>.

Nesse contexto, diversos estudos têm sugerido que a melatonina é capaz de aumentar a imunidade local<sup>15, 18</sup>, modulando o sistema imune, sobre a produção de citocinas<sup>41</sup>. Em contraste, alguns trabalhos mostram que citocinas antiinflamatórias exercem atividades a favor do desenvolvimento e regulação tumorais<sup>42</sup>, sendo capazes de atrair células do sistema imune favoráveis à sobrevivência e crescimento do tumor<sup>43</sup>. Assim, as citocinas IL-2, IL-10, IL-12A e IL-12B podem ter exercido seu papel pró-inflamatório e o tratamento com melatonina reduziu seus níveis proteicos como resposta protetora no câncer de mama.

No mesmo contexto, a IL-6 possui forte atividade pró-câncerígena devido ao seu papel na proliferação de células tumorais, sobrevivência, angiogênese, inflamação e metástase<sup>38, 44</sup>. Não existem trabalhos na literatura que mostram a ação da melatonina sob a IL-6 em neoplasias mamárias na espécie canina, no entanto estudo de Garcia-Mauriño *et al.*<sup>45</sup> relataram que a melatonina é capaz de aumentar os níveis de IL-6 em células mononucleares do sangue periférico, sugerindo que a melatonina esta envolvida na regulação das funções imunes, em especial através da interação com monócitos.

O processo inflamatório contribui em todos os aspectos da carcinogênese<sup>24</sup> promovendo uma resposta fisiológica à proliferação e remodelação tecidual, facilitando assim a progressão neoplásica<sup>46, 47</sup>. As citocinas têm sido associadas ao câncer, uma vez que são liberadas pelas células inflamatórias e também produzidas por células tumorais, representando uma rede variável de moléculas estrutural e funcionalmente diferentes que podem atuar como fatores de crescimento ou inibição tumoral (ABBAS *et al.*, 1994).

Sabe-se que a melatonina é ainda um importante agente antiinflamatório<sup>48</sup>. Luchetti *et al.*<sup>15</sup> e Alvarez-Garcia *et al.*<sup>18</sup> sugerem que a melatonina é capaz de aumentar a imunidade local.

Esse estudo mostrou redução das proteínas IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TNF-RII e aumento de SCF, IL-8 e MCP-1 nas células CF-41 após o tratamento com melatonina, enquanto que no co-

cultivo com CAFs houve aumento de IL-1 $\alpha$  e redução de Fas Ligante e TNF- $\alpha$ , todas inseridas na via *cytokine-cytokine receptor interaction*. Sabe-se que a via Jak-STAT têm papel central na mediação da resposta inflamatória<sup>36</sup> e isso ocorre devido a todas as citocinas utilizarem essa via como mecanismo de transdução de sinal<sup>35</sup>. Dessa forma sugerimos mais uma vez que a melatonina é capaz de modular a ação da via Jak-STAT.

A IL-1 é uma citocina pró-inflamatória, que desempenha um papel importante na angiogênese tumoral<sup>49</sup>. A família IL-1 é subdividida em IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , onde ambas são moléculas altamente pró-inflamatórias<sup>49,50</sup>. Tem sido sugerido que a IL-1 $\alpha$  pode ter dupla função, na sua forma secretável, é uma citocina altamente pró-inflamatória aumentando o crescimento e invasão tumoral, e por outro lado, quando localizada na membrana ativa os mecanismos imunomediadores e conduz à destruição de células tumorais e inibição do crescimento do tumor<sup>50</sup> o que corrobora com os dados observados nesse estudo.

O TNF- $\alpha$  pode ser detectado em células malignas e/ou do estroma em diversos carcinomas humanos, linfomas e leucemias<sup>51</sup>. Seu papel na progressão tumoral é iniciado através da ligação com receptores específicos TNF-RI e TNF-RII<sup>46, 52</sup>. TNF-RI, pertence ao subgrupo de moléculas da superfamília de TNF-R que contêm um domínio de morte celular, enquanto que o TNF-RII não apresenta esse domínio<sup>52</sup>, no entanto estudos tem mostrado que esse receptor desempenha um papel essencial na proliferação celular e sobrevivência<sup>53</sup>. Além disso, Sasaki *et al.*<sup>54</sup> observaram ainda que a melatonina é capaz de reduzir significativamente os níveis de TNF- $\alpha$  em tumores mamários humanos, corroborando a nossos achados.

Esse estudo mostrou ainda alta expressão das proteínas IL-8, SCF e MCP-1 nas células CF-41 após tratamento com melatonina.

Waugh *et al.*<sup>55</sup> e Yuan *et al.*<sup>56</sup>, classificam a IL-8 como um importante fator regulador no microambiente tumoral, podendo contribuir para a progressão tumoral por meio da regulação da angiogênese, além da regulação da transcrição de genes envolvidos na proliferação celular e sobrevivência tumoral<sup>57</sup>. Além disso, Gelaleti *et al.*<sup>57</sup>, mostrou que a alta expressão de IL-8 está relacionada ao pior prognóstico de cadelas com neoplasia mamária. Da mesma forma, a proteína MCP-1, cuja expressão foi elevada em nosso estudo está envolvida nos processos de infiltração, angiogênese e menor sobrevida em pacientes com câncer de mama<sup>58</sup>.

Por outro lado, corroborando aos nossos resultados, estudo de Zuccari *et al.*<sup>59</sup> mostraram que a IL-8 pode ser utilizada como fator de bom prognóstico no câncer de mama, uma vez que sua alta expressão foi relacionada com fatores envolvidos na redução da

progressão tumoral. Dessa forma sugerimos que a melatonina atue no controle da malignidade e invasividade no câncer de mama.

O SCF é um fator de crescimento expresso por fibroblastos e células endoteliais, que promove a proliferação, migração, sobrevivência e diferenciação de células progenitoras hematopoiéticas, melanócitos e células germinais<sup>60</sup>. Além disso, diversos estudos têm mostrado que altos níveis de SCF estão diretamente relacionados a um maior fator de risco em diversos tipos de câncer<sup>61</sup>. Não há trabalhos na literatura que relacione a ação de SCF após o tratamento com melatonina no câncer de mama canino, no entanto, sugerimos mais uma vez a função imuno moduladora da melatonina no câncer de mama.

Verificamos ainda que o tratamento com melatonina foi capaz de reduzir a expressão de proteínas presentes na via do câncer. Houve redução de BCL-2 e BAD na linhagem mamária tumoral CF-41 e as proteínas citocromo C, MMP-1 e MMP-9 apresentaram menor expressão, enquanto que a caspase-8 teve sua expressão elevada no co-cultivo com CAFs, o que sugere a ação da melatonina como agente pró-apoptótico no câncer de mama.

A apoptose pode ocorrer por estímulos externos e pela interação de receptores e ligantes da família do fator de necrose tumoral (TNF, Fas e TRAIL), sendo que sua ativação induz o recrutamento da caspase-8 que ativa a caspase-3, representante dos mecanismos intrínsecos e extrínsecos da apoptose<sup>62</sup>.

A ligação de Fas ligante (FasL) ao seu receptor induz a apoptose de células NK e linfócitos T<sup>63</sup>, além da ativação das caspases<sup>64</sup>. A redução da expressão dessa proteína no co-cultivo após o tratamento com melatonina confirma a transformação maligna das células quando em contato com os fatores liberados pelos CAFs, atuantes no microambiente tumoral.

O citocromo C tem um papel crucial no processo apoptótico. Quando estimulado, é liberado no citosol onde se liga a Apaf-1 e à pró-caspase 9 para a formação do apoptossomo<sup>65</sup>. Acredita-se que o principal mecanismo de ação da família BCL-2 é a regulação da liberação de citocromo C através da alteração da permeabilidade da membrana mitocondrial pela fosforilação de BAD<sup>66</sup>. Nesse contexto, não foi possível observar expressão de BAD no co-cultivo com CAFs, sugerindo que não houve liberação de citocromo C.

Sabe-se ainda que o controle de eventos apoptóticos ocorrem através de membros da família BCL-2. As proteínas pertencentes a esta família, regulam a permeabilidade da membrana mitocondrial e podem atuar como pró-apoptóticas (BAD) ou anti-apoptóticas (BCL-2)<sup>66</sup>. Em contraste, foi verificado em nosso estudo redução da expressão de BCL-2 e BAD nas células CF-41 após o tratamento com melatonina. Esses resultados podem ser justificados uma vez que no processo neoplásico é possível ocorrer defeitos na expressão dos

membros da família BCL-2, resultando na perda da função supressora de tumor de genes pró-apoptóticos<sup>67</sup>.

A menor expressão das melatoproteinases-1 e 9 após o tratamento com melatonina observados em nosso estudo corrobora com a ação da melatonina como um agente anti-proliferativo no câncer de mama. A MMP-1 e MMP-9 estão envolvidas no desenvolvimento tumoral<sup>68, 69</sup> e são capazes de degradar a matriz extracelular, permitindo a migração, invasão e metastatização<sup>70</sup>. Diversos estudos têm confirmado a presença de MMP-1 e MMP-9 em tumores malignos e de pior prognóstico no câncer<sup>69, 71</sup>. Corroborando a nossos dados, Mao *et al.*<sup>17</sup> mostraram também que a melatonina reduz a expressão de MMP-9 em linhagem de câncer de mama humano RE positiva.

Nesse contexto, esse estudo mostrou a atuação de marcadores ainda não estudados na espécie canina com enfoque em neoplasias mamárias, sendo esse estudo pioneiro na área.

## CONCLUSÃO

A melatonina é capaz de reduzir a proliferação celular das células CF-41, dos CAFs bem como na interação entre essas células. O tratamento com 1 mM de melatonina em células tumorais mamárias e co-cultivo com CAFs reduz a expressão de proteínas atuantes nos processos de angiogênese e inflamação e modula o processo apoptótico, o que confirma a influência dos CAFs no microambiente tumoral.

## Lista de Abreviações

---

<b>BCA</b>	<i>bicinchoninic acid</i>
<b>CAF</b>	Fibroblasto Associado ao Câncer
<b>DMSO</b>	<i>Dimethyl sulfoxide</i>
<b>ELISA</b>	Ensaio imunoenzimático
<b>EMT</b>	Transição Epitelial-Mesenquimal
<b>hTRA</b>	Alta temperatura requerida A
<b>IL-10</b>	Interleucina-10
<b>IL-12p40</b>	Interleucina-12p40
<b>IL-12p70</b>	Interleucina-12p70
<b>IL-13</b>	Interleucina-13
<b>IL-15</b>	Interleucina-15
<b>IL-1<math>\alpha</math></b>	Interleucina-1 alfa
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	Interleucina 1 beta
<b>IL-2</b>	Interleucina-2
<b>IL-6</b>	Interleucina-6
<b>IL-7</b>	Interleucina-7
<b>IL-8</b>	Interleucina-8
<b>ILs</b>	Interleucinas
<b>Jak-STAT</b>	<i>janus kinase/signal transducers and activators of transcription</i>

---

---

<b>MCP-1</b>	Proteína quimioatraente de monócitos-1
<b>MCP-2</b>	Proteína quimioatraente de monócitos-2
<b>MCP-3</b>	Proteína quimioatraente de monócitos-3
<b>MCP-4</b>	Proteína quimioatraente de monócitos-4
<b>MDC</b>	Quimiocina derivada de macrófagos
<b>MMP-1</b>	Metaloproteinase-1
<b>MMP-9</b>	Metaloproteinase-9
<b>MMPs</b>	Metaloproteinases
<b>MTT</b>	<i>3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide</i>
<b>NK</b>	Células <i>natural killers</i>
<b>PBS</b>	Solução tampão fosfato salino
<b>PECAM-1</b>	Molécula de adesão celular endotelial de plaquetas
<b>SCF</b>	Fator de células tronco
<b>SFB</b>	Soro fetal bovino
<b>SMAC</b>	Segundo ativador derivado de mitocôndrias de caspases
<b>STAT</b>	<i>Signal transducers and activators of transcription</i>
<b>TIMP-1</b>	Proteína inibidora de metaloproteinase tecidual 1
<b>TIMP-2</b>	Proteína inibidora de metaloproteinase tecidual 2
<b>TNF-RI</b>	Fator de necrose tumoral receptor-I
<b>TNF-RII</b>	Fator de necrose tumoral receptor-II
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Fator de necrose tumoral alfa
<b>TRAIL</b>	Ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF
<b><math>\alpha</math>-SMA</b>	$\alpha$ actina do músculo liso

---

### Conflito de interesse

Os autores declaram não ter conflitos de interesse.

### Agradecimentos

Essa pesquisa recebeu suporte financeiro da Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). Agradecemos a Dra. Eloiza Tajara e ao Msc. Tiago Henrique, pela colaboração nas análises de bioinformática e aos pesquisadores Lívia Carvalho Ferreira, Naiane do Nascimento Gonçalves, Camila Leonel, Gustavo Rodrigues Martins e Rosimeire Aparecida Roela que auxiliaram tecnicamente na elaboração desse manuscrito.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BRODEY, R. S.; GOLDSCHMIDT, M. H.; ROSZEL, J. R., Canine Mammary Gland Neoplasms. **Journal of Am An Hosp Ass.** : 1983; Vol. 19, pp 61-89.
2. Chu, P. Y.; Hsu, N. C.; Liao, A. T.; Shih, N. Y.; Hou, M. F.; Liu, C. H., Overexpression of  $\alpha$ -enolase correlates with poor survival in canine mammary carcinoma. **BMC Vet Res** **2011**, 7, 62; Sleenckx, N.; Van Brantegem, L.; Franssen, E.; Van den Eynden, G.; Casteleyn, C.; Veldhuis Kroeze, E.; Van Ginneken, C., Evaluation of immunohistochemical markers of lymphatic and blood vessels in canine mammary tumours. **J Comp Pathol** **2013**, 148 (4), 307-17; Shafiee, R.; Javanbakht, J.; Atyabi, N.; Kheradmand, P.; Kheradmand, D.; Bahrami, A.; Daraei, H.; Khadivar, F., Diagnosis, classification and grading of canine

mammary tumours as a model to study human breast cancer: an Clinico-Cytopathological study with environmental factors influencing public health and medicine. *Cancer Cell Int* **2013**, *13*, 79.

3. Aresu, L.; Giantin, M.; Morello, E.; Vascellari, M.; Castagnaro, M.; Lopparelli, R.; Zancanella, V.; Granato, A.; Garbisa, S.; Aricò, A.; Bradaschia, A.; Mutinelli, F.; Dacasto, M., Matrix metalloproteinases and their inhibitors in canine mammary tumors. *BMC Vet Res* **2011**, *7*, 33.

4. Franco, O. E.; Shaw, A. K.; Strand, D. W.; Hayward, S. W., Cancer associated fibroblasts in cancer pathogenesis. *Semin Cell Dev Biol* **2010**, *21* (1), 33-9.

5. Lühr, I.; Friedl, A.; Overath, T.; Tholey, A.; Kunze, T.; Hilpert, F.; Sebens, S.; Arnold, N.; Rösel, F.; Oberg, H. H.; Maass, N.; Mundhenke, C.; Jonat, W.; Bauer, M., Mammary fibroblasts regulate morphogenesis of normal and tumorigenic breast epithelial cells by mechanical and paracrine signals. *Cancer Lett* **2012**, *325* (2), 175-88; Krol, M.; Pawlowski, K. M.; Skierski, J.; Rao, N. A.; Hellmen, E.; Mol, J. A.; Motyl, T., Transcriptomic profile of two canine mammary cancer cell lines with different proliferative and anti-apoptotic potential. *J Physiol Pharmacol* **2009**, *60 Suppl 1*, 95-106.

6. Folgueira, M. A.; Maistro, S.; Katayama, M. L.; Roela, R. A.; Mundim, F. G.; Nanogaki, S.; de Bock, G. H.; Brentani, M. M., Markers of breast cancer stromal fibroblasts in the primary tumour site associated with lymph node metastasis: a systematic review including our case series. *Biosci Rep* **2013**, *33* (6).

7. Porretti, J. C.; Mohamad, N. A.; Martín, G. A.; Cricco, G. P., Fibroblasts induce epithelial to mesenchymal transition in breast tumor cells which is prevented by fibroblasts treatment with histamine in high concentration. *Int J Biochem Cell Biol* **2014**, *51*, 29-38.

8. Król, M.; Pawłowski, K. M.; Szyszko, K.; Maciejewski, H.; Dolka, I.; Manuali, E.; Jank, M.; Motyl, T., The gene expression profiles of canine mammary cancer cells grown with carcinoma-associated fibroblasts (CAFs) as a co-culture in vitro. *BMC Vet Res* **2012**, *8*, 35.

9. Apostolopoulou, M.; Ligon, L., Cadherin-23 mediates heterotypic cell-cell adhesion between breast cancer epithelial cells and fibroblasts. *PLoS One* **2012**, *7* (3), e33289.

10. Erez, N.; Glanz, S.; Raz, Y.; Avivi, C.; Barshack, I., Cancer associated fibroblasts express pro-inflammatory factors in human breast and ovarian tumors. *Biochem Biophys Res Commun* **2013**, *437* (3), 397-402.

11. Bhowmick, N. A.; Neilson, E. G.; Moses, H. L., Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature* **2004**, *432* (7015), 332-7.

12. Simpkins, S. A.; Hanby, A. M.; Holliday, D. L.; Speirs, V., Clinical and functional significance of loss of caveolin-1 expression in breast cancer-associated fibroblasts. *J Pathol* **2012**, *227* (4), 490-8.

13. Santos, R. P.; Benvenuti, T. T.; Honda, S. T.; Del Valle, P. R.; Katayama, M. L.; Brentani, H. P.; Carraro, D. M.; Rozenchan, P. B.; Brentani, M. M.; de Lyra, E. C.; Torres, C. H.; Salzgeber, M. B.; Kaiano, J. H.; Góes, J. C.; Folgueira, M. A., Influence of the interaction between nodal fibroblast and breast cancer cells on gene expression. *Tumour Biol* **2011**, *32* (1), 145-57.

14. Miki, Y.; Ono, K.; Hata, S.; Suzuki, T.; Kumamoto, H.; Sasano, H., The advantages of co-culture over mono cell culture in simulating in vivo environment. *J Steroid Biochem Mol Biol* **2012**, *131* (3-5), 68-75.

15. Luchetti, F.; Canonico, B.; Betti, M.; Arcangeletti, M.; Pilolli, F.; Piroddi, M.; Canesi, L.; Papa, S.; Galli, F., Melatonin signaling and cell protection function. *FASEB J* **2010**, *24* (10), 3603-24.

16. Jardim-Perassi, B. V.; Arbab, A. S.; Ferreira, L. C.; Borin, T. F.; Varma, N. R.; Iskander, A. S.; Shankar, A.; Ali, M. M.; de Campos Zuccari, D. A., Effect of melatonin on

tumor growth and angiogenesis in xenograft model of breast cancer. *PLoS One* **2014**, *9* (1), e85311.

17. Mao, L.; Yuan, L.; Xiang, S.; Zeringue, S. B.; Dauchy, R. T.; Blask, D. E.; Hauch, A.; Hill, S. M., Molecular deficiency (ies) in MT<sub>1</sub> melatonin signaling pathway underlies the melatonin-unresponsive phenotype in MDA-MB-231 human breast cancer cells. *J Pineal Res* **2014**, *56* (3), 246-53.

18. Alvarez-García, V.; González, A.; Alonso-González, C.; Martínez-Campa, C.; Cos, S., Melatonin interferes in the desmoplastic reaction in breast cancer by regulating cytokine production. *J Pineal Res* **2012**, *52* (3), 282-90.

19. MIRUNALINI S, K. K.; DHAMODHARAN G; ., S. M. J., Studies on the chemopreventive potential of melatonin on 7,12-dimethylbenz(a)anthracene induced mammary carcinogenesis in rats. *Appl Sci Res* 2010; Vol. 6, pp 245-253; Fic, M.; Podhorska-Okolow, M.; Dziegiel, P.; Gebarowska, E.; Wysocka, T.; Drag-Zalesinska, M.; Zabel, M., Effect of melatonin on cytotoxicity of doxorubicin toward selected cell lines (human keratinocytes, lung cancer cell line A-549, laryngeal cancer cell line Hep-2). *In Vivo* **2007**, *21* (3), 513-8.

20. Mediavilla, M. D.; Sanchez-Barcelo, E. J.; Tan, D. X.; Manchester, L.; Reiter, R. J., Basic mechanisms involved in the anti-cancer effects of melatonin. *Curr Med Chem* **2010**, *17* (36), 4462-81.

21. Yu, Q.; Miller, S. C.; Osmond, D. G., Melatonin inhibits apoptosis during early B-cell development in mouse bone marrow. *J Pineal Res* **2000**, *29* (2), 86-93; Bejarano, I.; Espino, J.; Barriga, C.; Reiter, R. J.; Pariente, J. A.; Rodríguez, A. B., Pro-oxidant effect of melatonin in tumour leucocytes: relation with its cytotoxic and pro-apoptotic effects. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* **2011**, *108* (1), 14-20; Proietti, S.; Cucina, A.; D'Anselmi, F.; Dinicola, S.; Pasqualato, A.; Lisi, E.; Bizzarri, M., Melatonin and vitamin D3 synergistically down-regulate Akt and MDM2 leading to TGFβ-1-dependent growth inhibition of breast cancer cells. *J Pineal Res* **2011**, *50* (2), 150-8; Rodriguez, C.; Martín, V.; Herrera, F.; García-Santos, G.; Rodriguez-Blanco, J.; Casado-Zapico, S.; Sánchez-Sánchez, A. M.; Suárez, S.; Puente-Moncada, N.; Anítua, M. J.; Antolín, I., Mechanisms involved in the pro-apoptotic effect of melatonin in cancer cells. *Int J Mol Sci* **2013**, *14* (4), 6597-613; León, J.; Casado, J.; Jiménez Ruiz, S. M.; Zurita, M. S.; González-Puga, C.; Rejón, J. D.; Gila, A.; Muñoz de Rueda, P.; Pavón, E. J.; Reiter, R. J.; Ruiz-Extremera, A.; Salmerón, J., Melatonin reduces endothelin-1 expression and secretion in colon cancer cells through the inactivation of FoxO-1 and NF-κβ. *J Pineal Res* **2014**, *56* (4), 415-26.

22. Carrillo-Vico, A.; Lardone, P. J.; Alvarez-Sánchez, N.; Rodríguez-Rodríguez, A.; Guerrero, J. M., Melatonin: buffering the immune system. *Int J Mol Sci* **2013**, *14* (4), 8638-83.

23. Rozenchan, P. B.; Carraro, D. M.; Brentani, H.; de Carvalho Mota, L. D.; Bastos, E. P.; e Ferreira, E. N.; Torres, C. H.; Katayama, M. L.; Roela, R. A.; Lyra, E. C.; Soares, F. A.; Folgueira, M. A.; Góes, J. C.; Brentani, M. M., Reciprocal changes in gene expression profiles of cocultured breast epithelial cells and primary fibroblasts. *Int J Cancer* **2009**, *125* (12), 2767-77.

24. Sansone, P.; Bromberg, J., Environment, inflammation, and cancer. *Curr Opin Genet Dev* **2011**, *21* (1), 80-5.

25. Kalluri, R.; Zeisberg, M., Fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer* **2006**, *6* (5), 392-401; Al-Ansari, M. M.; Aboussekhra, A., Caffeine mediates sustained inactivation of breast cancer-associated myofibroblasts via up-regulation of tumor suppressor genes. *PLoS One* **2014**, *9* (3), e90907.

26. Leman, E. S.; Siskin, B. F.; Zimmer, S.; Anderson, K. W., Studies of the interactions between melatonin and 2 Hz, 0.3 mT PEMF on the proliferation and invasion of human breast cancer cells. *Bioelectromagnetics* **2001**, *22* (3), 178-84.
27. Lopes, J. R.; Maschio, L. B.; Jardim-Perassi, B. V.; Moschetta, M. G.; Ferreira, L. C.; Martins, G. R.; Gelaleti, G. B.; De Campos Zuccari, D. A., Evaluation of melatonin treatment in primary culture of canine mammary tumors. *Oncol Rep* **2015**, *33* (1), 311-9.
28. Ishikawa, M.; Inoue, T.; Shirai, T.; Takamatsu, K.; Kunihiro, S.; Ishii, H.; Nishikata, T., Simultaneous expression of cancer stem cell-like properties and cancer-associated fibroblast-like properties in a primary culture of breast cancer cells. *Cancers (Basel)* **2014**, *6* (3), 1570-8.
29. Rong, G.; Kang, H.; Wang, Y.; Hai, T.; Sun, H., Candidate markers that associate with chemotherapy resistance in breast cancer through the study on Taxotere-induced damage to tumor microenvironment and gene expression profiling of carcinoma-associated fibroblasts (CAFs). *PLoS One* **2013**, *8* (8), e70960.
30. 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* **2009**, *118* (2), 293-305.
31. 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* **2009**, *11*, e5; 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. *Mol Cell Endocrinol* **2002**, *192* (1-2), 147-56; 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* **2013**, *54* (3), 334-45.
32. Knowler, K. C.; To, S. Q.; Takagi, K.; Miki, Y.; Sasano, H.; Simpson, E. R.; Clyne, C. D., Melatonin suppresses aromatase expression and activity in breast cancer associated fibroblasts. *Breast Cancer Res Treat* **2012**, *132* (2), 765-71.
33. 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**, *96* (4), 220-7; MacEwen, E. G., Spontaneous tumors in dogs and cats: models for the study of cancer biology and treatment. *Cancer Metastasis Rev* **1990**, *9* (2), 125-36; Rismanchi, S.; Yadegar, O.; Muhammadnejad, S.; Amanpour, S.; Taghizadeh-Jahed, M.; Muhammadnejad, A., Expression of vimentin filaments in canine malignant mammary gland tumors: A simulation of clinicopathological features of human breast cancer. *Biomed Rep* **2014**, *2* (5), 725-728.
34. Doman, Review: The JAK/STAT Protein Activation – Role in Cancer Development and Targeted Therapy. *Current Signal Transduction Therapy* **2012**, *7* (3), 187-201.
35. O'Shea, J. J.; Holland, S. M.; Staudt, L. M., JAKs and STATs in immunity, immunodeficiency, and cancer. *N Engl J Med* **2013**, *368* (2), 161-70.
36. Trikha, P.; Carson, W. E., Signaling pathways involved in MDSC regulation. *Biochim Biophys Acta* **2014**, *1846* (1), 55-65.
37. Haagsman, A. N.; Witkamp, A. C.; Sjollem, B. E.; Kik, M. J.; Kirpensteijn, J., The effect of interleukin-2 on canine peripheral nerve sheath tumours after marginal surgical excision: a double-blind randomized study. *BMC Vet Res* **2013**, *9*, 155.
38. Hamidullah; Changkija, B.; Konwar, R., Role of interleukin-10 in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* **2012**, *133* (1), 11-21.
39. Lentsch, A. B.; Shanley, T. P.; Sarma, V.; Ward, P. A., In vivo suppression of NF-kappa B and preservation of I kappa B alpha by interleukin-10 and interleukin-13. *J Clin Invest* **1997**, *100* (10), 2443-8; Mumm, J. B.; Emmerich, J.; Zhang, X.; Chan, I.; Wu, L.; Mauze, S.; Blaisdell, S.; Basham, B.; Dai, J.; Grein, J.; Sheppard, C.; Hong, K.; Cutler, C.;

- Turner, S.; LaFace, D.; Kleinschek, M.; Judo, M.; Ayanoglu, G.; Langowski, J.; Gu, D.; Paporello, B.; Murphy, E.; Sriram, V.; Naravula, S.; Desai, B.; Medicherla, S.; Seghezzi, W.; McClanahan, T.; Cannon-Carlson, S.; Beebe, A. M.; Oft, M., IL-10 elicits IFN $\gamma$ -dependent tumor immune surveillance. *Câncer Cell* **2011**, *20* (6), 781-96; Zhou, R.; Qian, S.; Gu, X.; Chen, Z.; Xiang, J., Interleukin-13 and its receptors in colorectal câncer (Review). *Biomed Rep* **2013**, *1* (5), 687-690.
40. Steel, J. C.; Waldmann, T. A.; Morris, J. C., Interleukin-15 biology and its therapeutic implications in câncer. *Trends Pharmacol Sci* **2012**, *33* (1), 35-41; Zhao, N.; Li, X.; He, X.; Qiu, Y.; Zhu, L.; Qi, F., Interleukin-15 gene therapy and the mammalian target of rapamycin inhibitor everolimus inhibit the growth of metastatic breast câncer. *J Gene Med* **2013**, *15* (10), 366-74; Gee, K.; Guzzo, C.; Che Mat, N. F.; Ma, W.; Kumar, A., The IL-12 family of cytokines in infection, inflammation and autoimmune disorders. *Inflamm Allergy Drug Targets* **2009**, *8* (1), 40-52.
41. Carrillo-Vico, A.; Guerrero, J. M.; Lardone, P. J.; Reiter, R. J., A review of the multiple actions of melatonin on the immune system. *Endocrine* **2005**, *27* (2), 189-200.
42. Benchetrit, F.; Ciree, A.; Vives, V.; Warnier, G.; Gey, A.; Sautès-Fridman, C.; Fossiez, F.; Haicheur, N.; Fridman, W. H.; Tartour, E., Interleukin-17 inhibits tumor cell growth by means of a T-cell-dependent mechanism. *Blood* **2002**, *99* (6), 2114-21; Tepper, R. I.; Coffman, R. L.; Leder, P., An eosinophil-dependent mechanism for the antitumor effect of interleukin-4. *Science* **1992**, *257* (5069), 548-51; Kobayashi, M.; Kobayashi, H.; Pollard, R. B.; Suzuki, F., A pathogenic role of Th2 cells and their cytokine products on the pulmonary metastasis of murine B16 melanoma. *J Immunol* **1998**, *160* (12), 5869-73; Lorusso, G.; Rüegg, C., The tumor microenvironment and its contribution to tumor evolution toward metastasis. *Histochem Cell Biol* **2008**, *130* (6), 1091-103.
43. Li, Y. Q.; Liu, F. F.; Zhang, X. M.; Guo, X. J.; Ren, M. J.; Fu, L., Tumor secretion of CCL22 activates intratumoral Treg infiltration and is independent prognostic predictor of breast câncer. *PLoS One* **2013**, *8* (10), e76379.
44. Drygin, D.; Ho, C. B.; Omori, M.; Bliesath, J.; Proffitt, C.; Rice, R.; Siddiqui-Jain, A.; O'Brien, S.; Padgett, C.; Lim, J. K.; Anderes, K.; Rice, W. G.; Ryckman, D., Protein kinase CK2 modulates IL-6 expression in inflammatory breast câncer. *Biochem Biophys Res Commun* **2011**, *415* (1), 163-7.
45. Garcia-Mauriño, S.; Gonzalez-Haba, M. G.; Calvo, J. R.; Rafii-El-Idrissi, M.; Sanchez-Margalet, V.; Goberna, R.; Guerrero, J. M., Melatonin enhances IL-2, IL-6, and IFN- $\gamma$  production by human circulating CD4<sup>+</sup> cells: a possible nuclear receptor-mediated mechanism involving T helper type 1 lymphocytes and monocytes. *J Immunol* **1997**, *159* (2), 574-81.
46. Balkwill, F.; Mantovani, A., Inflammation and câncer: back to Virchow? *Lancet* **2001**, *357* (9255), 539-45.
47. Servais, C.; Erez, N., From sentinel cells to inflammatory culprits: câncer-associated fibroblasts in tumour-related inflammation. *J Pathol* **2013**, *229* (2), 198-207.
48. Srinivasan, V.; Pandi-Perumal, S. R.; Brzezinski, A.; Bhatnagar, K. P.; Cardinali, D. P., Melatonin, immune function and câncer. *Recent Pat Endocr Metab Immune Drug Discov* **2011**, *5* (2), 109-23.
49. Voronov, E.; Carmi, Y.; Apte, R. N., The role IL-1 in tumor-mediated angiogenesis. *Front Physiol* **2014**, *5*, 114.
50. Rider, P.; Carmi, Y.; Voronov, E.; Apte, R. N., Interleukin-1 $\alpha$ . *Semin Immunol* **2013**, *25* (6), 430-8.
51. Le Bitoux, M. A.; Stamenkovic, I., Tumor-host interactions: the role of inflammation. *Histochem Cell Biol* **2008**, *130* (6), 1079-90.
52. Bradley, J. R., TNF-mediated inflammatory disease. *J Pathol* **2008**, *214* (2), 149-60.

53. 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. *J Pineal Res* **2012**, *53* (1), 77-90.
54. Sasaki, M.; Jordan, P.; Joh, T.; Itoh, M.; Jenkins, M.; Pavlick, K.; Minagar, A.; Alexander, S. J., Melatonin reduces TNF- $\alpha$  induced expression of MAdCAM-1 via inhibition of NF- $\kappa$ B. *BMC Gastroenterol* **2002**, *2*, 9.
55. Waugh, D. J.; Wilson, C., The interleukin-8 pathway in cancer. *Clin Cancer Res* **2008**, *14* (21), 6735-41.
56. Yuan, A.; Chen, J. J.; Yao, P. L.; Yang, P. C., The role of interleukin-8 in cancer cells and microenvironment interaction. *Front Biosci* **2005**, *10*, 853-65.
57. Gelaleti, G. B.; Jardim, B. V.; Leonel, C.; Moschetta, M. G.; Zuccari, D. A., Interleukin-8 as a prognostic serum marker in canine mammary gland neoplasias. *Vet Immunol Immunopathol* **2012**, *146* (2), 106-12.
58. Ueno, T.; Toi, M.; Saji, H.; Muta, M.; Bando, H.; Kuroi, K.; Koike, M.; Inadera, H.; Matsushima, K., Significance of macrophage chemoattractant protein-1 in macrophage recruitment, angiogenesis, and survival in human breast cancer. *Clin Cancer Res* **2000**, *6* (8), 3282-9; Yu, J. L.; Rak, J. W., Host microenvironment in breast cancer development: inflammatory and immune cells in tumour angiogenesis and arteriogenesis. *Breast Cancer Res* **2003**, *5* (2), 83-8.
59. Zuccari, D. A.; Leonel, C.; Castro, R.; Gelaleti, G. B.; Jardim, B. V.; Moscheta, M. G.; Regiani, V. R.; Ferreira, L. C.; Lopes, J. R.; Neto, D. e. S.; Esteves, J. L., An immunohistochemical study of interleukin-8 (IL-8) in breast cancer. *Acta Histochem* **2012**, *114* (6), 571-6.
60. Lennartsson, J.; Rönstrand, L., Stem cell factor receptor/c-Kit: from basic science to clinical implications. *Physiol Rev* **2012**, *92* (4), 1619-49.
61. Krystal, G. W.; Hines, S. J.; Organ, C. P., Autocrine growth of small cell lung cancer mediated by coexpression of c-kit and stem cell factor. *Cancer Res* **1996**, *56* (2), 370-6.
62. Ulukaya, E.; Sarimahmut, M.; Cevatemre, B.; Ari, F.; Yerlikaya, A.; Dimas, K., Additive enhancement of apoptosis by TRAIL and fenretinide in metastatic breast cancer cells in vitro. *Biomed Pharmacother* **2014**, *68* (4), 477-82; Fuchs, L. F.; Guimarães, C. R.; Maganhin, C. C.; Simões, R. S.; Baracat, M. C.; Soares Júnior, J. M.; Baracat, E. C., [Melatonin action in apoptosis and vascular endothelial growth factor in adrenal cortex of pinealectomized female rats]. *Rev Bras Ginecol Obstet* **2010**, *32* (8), 374-80; Bhattacharjee, R.; Xiang, W.; Wang, Y.; Zhang, X.; Billiar, T. R., cAMP prevents TNF-induced apoptosis through inhibiting DISC complex formation in rat hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun* **2012**, *423* (1), 85-90.
63. Bębenek, M.; Duś, D.; Koźlak, J., Prognostic value of the Fas/Fas ligand system in breast cancer. *Contemp Oncol (Pozn)* **2013**, *17* (2), 120-2.
64. Waring, P.; Khan, T.; Sjaarda, A., Apoptosis induced by gliotoxin is preceded by phosphorylation of histone H3 and enhanced sensitivity of chromatin to nuclease digestion. *J Biol Chem* **1997**, *272* (29), 17929-36.
65. Hüttemann, M.; Pecina, P.; Rainbolt, M.; Sanderson, T. H.; Kagan, V. E.; Samavati, L.; Doan, J. W.; Lee, I., The multiple functions of cytochrome c and their regulation in life and death decisions of the mammalian cell: From respiration to apoptosis. *Mitochondrion* **2011**, *11* (3), 369-81; Chen, J.; Wang, W.; Wang, H.; Liu, X.; Guo, X., Combination treatment of ligustrazine piperazine derivate DLJ14 and adriamycin inhibits progression of resistant breast cancer through inhibition of the EGFR/PI3K/Akt survival pathway and induction of apoptosis. *Drug Discov Ther* **2014**, *8* (1), 33-41.

66. Elmore, S., Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* **2007**, *35* (4), 495-516.
67. Yip, K. W.; Reed, J. C., Bcl-2 family proteins and cancer. *Oncogene* **2008**, *27* (50), 6398-406.
68. Iwasaki, H.; Inoue, H.; Mitsuke, Y.; Badran, A.; Ikegaya, S.; Ueda, T., Doxycycline induces apoptosis by way of caspase-3 activation with inhibition of matrix metalloproteinase in human T-lymphoblastic leukemia CCRF-CEM cells. *J Lab Clin Med* **2002**, *140* (6), 382-6; Kato, Y.; Yamashita, T.; Ishikawa, M., Relationship between expression of matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 and invasion ability of cervical cancer cells. *Oncol Rep* **2002**, *9* (3), 565-9; Foley, C. J.; Kuliopulos, A., Mouse matrix metalloproteinase-1a (Mmp1a) gives new insight into MMP function. *J Cell Physiol* **2014**, *229* (12), 1875-80.
69. Bottino, J.; Gelaleti, G. B.; Maschio, L. B.; Jardim-Perassi, B. V.; de Campos Zuccari, D. A., Immunoexpression of ROCK-1 and MMP-9 as prognostic markers in breast cancer. *Acta Histochem* **2014**.
70. Bourboulia, D.; Stetler-Stevenson, W. G., Matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): Positive and negative regulators in tumor cell adhesion. *Semin Cancer Biol* **2010**, *20* (3), 161-8.
71. Jinga, D. C.; Blidaru, A.; Condrea, I.; Ardeleanu, C.; Dragomir, C.; Szegli, G.; Stefanescu, M.; Matache, C., MMP-9 and MMP-2 gelatinases and TIMP-1 and TIMP-2 inhibitors in breast cancer: correlations with prognostic factors. *J Cell Mol Med* **2006**, *10* (2), 499-510; Yousef, E. M.; Tahir, M. R.; St-Pierre, Y.; Gaboury, L. A., MMP-9 expression varies according to molecular subtypes of breast cancer. *BMC Cancer* **2014**, *14*, 609.

*Conclusões*

---

#### IV. CONCLUSÕES

O presente trabalho permitiu estabelecer as seguintes conclusões:

- A concentração de 1 mM de melatonina reduz a viabilidade celular das linhagens tumorais mamárias MDA-MB-231 e CF-41, dos CAFs e no co-cultivo das células tumorais com CAFs;
- O tratamento com melatonina reduz a expressão de proteínas atuantes nos processos de angiogênese e inflamação e modula o processo apoptótico nas linhagens MDA-MB-231 e CF-41 e no co-cultivo com CAFs;
- A influência dos CAFs no microambiente tumoral é confirmada pela liberação de fatores presentes nas vias de sinalização *cytokine-cytokine receptor interaction*, *Jak-STAT* e na via do câncer atuantes nos processos tumorigênicos e de maior resistência celular ao tratamento com melatonina.

Os resultados demonstram que a melatonina apresenta importante ação oncostática, anti-proliferativa, imunomoduladora e pró-apoptótica no microambiente tumoral mamário, o que confirma seu potencial valor terapêutico no câncer de mama.

*Referências*

---

## V. REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. S. **Cellular and molecular immunology** WB Saunders Company: 346-344 p. 1994.

ABREU, E.; KOIFMAN, S. Fatores prognósticos no câncer da mama feminina. . **Revista Brasileira de Câncerologia**, v. 48, n. 1, p. 113-131, 2002. Disponível em: < [http://www1.inca.gov.br/rbc/n\\_48/v01/pdf/revisao.pdf](http://www1.inca.gov.br/rbc/n_48/v01/pdf/revisao.pdf) >.

AL-ANSARI, M. M.; ABOUSSEKHRA, A. Caffeine mediates sustained inactivation of breast câncer-associated myofibroblasts via up-regulation of tumor suppressor genes. **PLoS One**, v. 9, n. 3, p. e90907, 2014. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24595168> >.

AL-DISSI, A. N. et al. Immunohistochemical expression of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptor-2 in canine simple mammary gland adenocarcinomas. **Can Vet J**, v. 51, n. 10, p. 1109-14, Oct 2010. ISSN 0008-5286. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21197202> >.

ALI, M. M. et al. Changes in vascular permeability and expression of different angiogenic factors following anti-angiogenic treatment in rat glioma. **PLoS One**, v. 5, n. 1, p. e8727, 2010. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20090952> >.

ALVAREZ-GARCÍA, V. et al. Melatonin interferes in the desmoplastic reaction in breast câncer by regulating cytokine production. **J Pineal Res**, v. 52, n. 3, p. 282-90, Apr 2012. ISSN 1600-079X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22151118> >.

ANDRADE, F. H. et al. Malignant mammary tumor in female dogs: environmental contaminants. **Diagn Pathol**, v. 5, p. 45, 2010. ISSN 1746-1596. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20587072> >.

APOSTOLOPOULOU, M.; LIGON, L. Cadherin-23 mediates heterotypic cell-cell adhesion between breast câncer epithelial cells and fibroblasts. **PLoS One**, v. 7, n. 3, p. e33289, 2012. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22413011> >.

ARBAB, A. S. Activation of alternative pathways of angiogenesis and involvement of stem cells following anti-angiogenesis treatment in glioma. **Histol Histopathol**, v. 27, n. 5, p. 549-57, May 2012. ISSN 1699-5848. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22419019> >.

AZUMA, K. et al. Plasma free amino acid profiles of canine mammary gland tumors. **J Vet Sci**, v. 13, n. 4, p. 433-6, Dec 2012. ISSN 1976-555X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23271187> >.

BALKWILL, F.; MANTOVANI, A. Inflammation and câncer: back to Virchow? **Lancet**, v. 357, n. 9255, p. 539-45, Feb 2001. ISSN 0140-6736. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11229684> >.

BARTELS, C. L.; TSONGALIS, G. J. MicroRNAs: novel biomarkers for human câncer. **Clin Chem**, v. 55, n. 4, p. 623-31, Apr 2009. ISSN 1530-8561. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19246618> >.

BAYLIN, S. B. DNA methylation and gene silencing in câncer. **Nat Clin Pract Oncol**, v. 2 Suppl 1, p. S4-11, Dec 2005. ISSN 1743-4254. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16341240> >.

BERGERS, G.; BENJAMIN, L. E. Tumorigenesis and the angiogenic switch. **Nat Rev Câncer**, v. 3, n. 6, p. 401-10, Jun 2003. ISSN 1474-175X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12778130> >.

BHATTACHARJEE, R. et al. cAMP prevents TNF-induced apoptosis through inhibiting DISC complex formation in rat hepatocytes. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 423, n. 1, p. 85-90, Jun 2012. ISSN 1090-2104. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22634003> >.

BHOWMICK, N. A.; NEILSON, E. G.; MOSES, H. L. Stromal fibroblasts in câncer initiation and progression. **Nature**, v. 432, n. 7015, p. 332-7, Nov 2004. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15549095> >.

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

CAO, Y. et al. Observation of incipient tumor angiogenesis that is independent of hypoxia and hypoxia inducible factor-1 activation. **Câncer Res**, v. 65, n. 13, p. 5498-505, Jul 2005. ISSN 0008-5472. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15994919> >.

CHEN, J. et al. Combination treatment of ligustrazine piperazine derivate DLJ14 and adriamycin inhibits progression of resistant breast câncer through inhibition of the EGFR/PI3K/Akt survival pathway and induction of apoptosis. **Drug Discov Ther**, v. 8, n. 1, p. 33-41, Feb 2014. ISSN 1881-7831. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24647156> >.

CHU, P. Y. et al. Overexpression of  $\alpha$ -enolase correlates with poor survival in canine mammary carcinoma. **BMC Vet Res**, v. 7, p. 62, 2011. ISSN 1746-6148. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22014164> >.

CLAPP, C. et al. Peptide hormone regulation of angiogenesis. **Physiol Rev**, v. 89, n. 4, p. 1177-215, Oct 2009. ISSN 0031-9333. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19789380> >.

CONDEELIS, J.; POLLARD, J. W. Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis. **Cell**, v. 124, n. 2, p. 263-6, Jan 2006. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16439202> >.

COULON, S. et al. Angiogenesis in chronic liver disease and its complications. **Liver Int**, v. 31, n. 2, p. 146-62, Feb 2011. ISSN 1478-3231. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21073649> >.

COUSSENS, L. M.; WERB, Z. Inflammation and câncer. **Nature**, v. 420, n. 6917, p. 860-7, 2002 Dec 19-26 2002. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12490959> >.

DRAKE, L. E.; MACLEOD, K. F. Tumour suppressor gene function in carcinoma-associated fibroblasts: from tumour cells via EMT and back again? **J Pathol**, v. 232, n. 3, p. 283-8, Feb 2014. ISSN 1096-9896. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24254977> >.

DUFFY, M. J.; O'DONOVAN, N.; CROWN, J. Use of molecular markers for predicting therapy response in câncer patients. **Câncer Treat Rev**, v. 37, n. 2, p. 151-9, Apr 2011. ISSN 1532-1967. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20685042> >.

EL-AZIZ, M. A. et al. The biochemical and morphological alterations following administration of melatonin, retinoic acid and *Nigella sativa* in mammary carcinoma: an animal model. **Int J Exp Pathol**, v. 86, n. 6, p. 383-96, Dec 2005. ISSN 0959-9673. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16309544> >.

EREZ, N. et al. Câncer associated fibroblasts express pro-inflammatory factors in human breast and ovarian tumors. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 437, n. 3, p. 397-402, Aug 2013. ISSN 1090-2104. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23831470> >.

FEDELE, C.; TOTHILL, R. W.; MCARTHUR, G. A. Navigating the challenge of tumor heterogeneity in câncer therapy. **Câncer Discov**, v. 4, n. 2, p. 146-8, Feb 2014. ISSN 2159-8290. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24501303> >.

FINLEY, S. D.; DHAR, M.; POPEL, A. S. Compartment model predicts VEGF secretion and investigates the effects of VEGF trap in tumor-bearing mice. **Front Oncol**, v. 3, p. 196, 2013. ISSN 2234-943X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23908970> >.

FRANCO, O. E. et al. Câncer associated fibroblasts in câncer pathogenesis. **Semin Cell Dev Biol**, v. 21, n. 1, p. 33-9, Feb 2010. ISSN 1096-3634. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19896548> >.

GAVALAS, N. G. et al. Angiogenesis-related pathways in the pathogenesis of ovarian câncer. **Int J Mol Sci**, v. 14, n. 8, p. 15885-909, 2013. ISSN 1422-0067. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23903048> >.

GELALETI, G. B. et al. Interleukin-8 as a prognostic serum marker in canine mammary gland neoplasias. **Vet Immunol Immunopathol**, v. 146, n. 2, p. 106-12, Apr 2012. ISSN 1873-2534. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22405680> >.

GONZALEZ-ANGULO, A. M.; MORALES-VASQUEZ, F.; HORTOBAGYI, G. N. Overview of resistance to systemic therapy in patients with breast câncer. **Adv Exp Med Biol**, v. 608, p. 1-22, 2007. ISSN 0065-2598. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17993229> >.

GRALOW, J. et al. Clinical câncer advances 2007: major research advances in câncer treatment, prevention, and screening--a report from the American Society of Clinical Oncology. **J Clin Oncol**, v. 26, n. 2, p. 313-25, Jan 2008. ISSN 1527-7755. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18086794> >.

GREENBERG, S.; RUGO, H. S. Triple-negative breast câncer: role of antiangiogenic agents. **Câncer J**, v. 16, n. 1, p. 33-8, 2010 Jan-Feb 2010. ISSN 1540-336X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20164688> >.

GRIVICICH, I. et al. Hsp70 response to 5-fluorouracil treatment in human colon câncer cell lines. **Int J Colorectal Dis**, v. 22, n. 10, p. 1201-8, Oct 2007. ISSN 0179-1958. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17390142> >.

HAHN, W. C.; WEINBERG, R. A. Rules for making human tumor cells. **N Engl J Med**, v. 347, n. 20, p. 1593-603, Nov 2002. ISSN 1533-4406. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12432047> >.

HICKS, D. G.; KULKARNI, S. Trastuzumab as adjuvant therapy for early breast câncer: the importance of accurate human epidermal growth factor receptor 2 testing. **Arch Pathol Lab Med**, v. 132, n. 6, p. 1008-15, Jun 2008. ISSN 1543-2165. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18517261> >.

HÜTTEMANN, M. et al. The multiple functions of cytochrome c and their regulation in life and death decisions of the mammalian cell: From respiration to apoptosis. **Mitochondrion**, v. 11, n. 3, p. 369-81, May 2011. ISSN 1872-8278. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21296189> >.

INCA. Estimativas sobre a Incidência e Mortalidade por Câncer no Brasil – 2002. Rio de Janeiro, 2003. Disponível em: < <http://www.inca.gov.br/estimativas/2003/> >.

INCA. Estimativas da incidência e mortalidade por câncer no Brasil. . Rio de Janeiro, 2014.

INMAN, J. L.; BISSELL, M. J. Apical polarity in three-dimensional culture systems: where to now? **J Biol**, v. 9, n. 1, p. 2, 2010. ISSN 1475-4924. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20092610> >.

ISHIKAWA, M. et al. Simultaneous expression of câncer stem cell-like properties and câncer-associated fibroblast-like properties in a primary culture of breast câncer cells. **Câncers (Basel)**, v. 6, n. 3, p. 1570-8, 2014. ISSN 2072-6694. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25089665> >.

JARDIM-PERASSI, B. V. **Avaliação da angiogênese em resposta ao tratamento com melatonina no câncer de mama: estudo in vitro e in vivo**. 2014. 122 (Doutorado). Universidade Estadual Paulista (UNESP) - Programa de Pós-Graduação em Genética, Universidade Estadual Paulista (UNESP), São José do Rio Preto - SP.

JUNTILA, M.R.; SAUVAGE, F.J. Influence of tumour micro-environment heterogeneity on therapeutic response. *Nature*, v.501, n. 7467, p. 345-354, Set 2013. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24048067> >.

KALLURI, R.; ZEISBERG, M. Fibroblasts in câncer. **Nat Rev Câncer**, v. 6, n. 5, p. 392-401, May 2006. ISSN 1474-175X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16572188> >.

KORKMAZ, A.; ROSALES-CORRAL, S.; REITER, R. J. Gene regulation by melatonin linked to epigenetic phenomena. **Gene**, v. 503, n. 1, p. 1-11, Jul 2012. ISSN 1879-0038. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22569208> >.

KROL, M. et al. Transcriptomic profile of two canine mammary cancer cell lines with different proliferative and anti-apoptotic potential. **J Physiol Pharmacol**, v. 60 Suppl 1, p. 95-106, May 2009. ISSN 1899-1505. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19609018> >.

LEBRET, S. C. et al. Induction of epithelial to mesenchymal transition in PMC42-LA human breast carcinoma cells by carcinoma-associated fibroblast secreted factors. **Breast Cancer Res**, v. 9, n. 1, p. R19, 2007. ISSN 1465-542X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17311675> >.

LEONARDI, G. C. et al. The tumor microenvironment in hepatocellular carcinoma (review). **Int J Oncol**, v. 40, n. 6, p. 1733-47, Jun 2012. ISSN 1791-2423. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22447316> >.

LEVASHOVA, Z. et al. Molecular imaging of changes in the prevalence of vascular endothelial growth factor receptor in sunitinib-treated murine mammary tumors. **J Nucl Med**, v. 51, n. 6, p. 959-66, Jun 2010. ISSN 1535-5667. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20484434> >.

LI, J. H. et al. Melatonin reduces inflammatory injury through inhibiting NF-kappaB activation in rats with colitis. **Mediators Inflamm**, v. 2005, n. 4, p. 185-93, Aug 2005. ISSN 0962-9351. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16192667> >.

LORUSSO, G.; RÜEGG, C. The tumor microenvironment and its contribution to tumor evolution toward metastasis. **Histochem Cell Biol**, v. 130, n. 6, p. 1091-103, Dec 2008. ISSN 0948-6143. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18987874> >.

LOWE, S. W.; LIN, A. W. Apoptosis in cancer. **Carcinogenesis**, v. 21, n. 3, p. 485-95, Mar 2000. ISSN 0143-3334. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10688869> >.

LUANPITPONG, S. et al. Regulation of apoptosis by Bcl-2 cysteine oxidation in human lung epithelial cells. **Mol Biol Cell**, v. 24, n. 6, p. 858-69, Mar 2013. ISSN 1939-4586. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23363601> >.

LUCHETTI, F. et al. Melatonin signaling and cell protection function. **FASEB J**, v. 24, n. 10, p. 3603-24, Oct 2010. ISSN 1530-6860. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20534884> >.

LÜHR, I. et al. Mammary fibroblasts regulate morphogenesis of normal and tumorigenic breast epithelial cells by mechanical and paracrine signals. **Cancer Lett**, v. 325, n. 2, p. 175-88, Dec 2012. ISSN 1872-7980. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22776560> >.

MACEWEN, E. G. Spontaneous tumors in dogs and cats: models for the study of cancer biology and treatment. **Cancer Metastasis Rev**, v. 9, n. 2, p. 125-36, Sep 1990. ISSN 0167-7659. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2253312> >.

MAGANHIN, C. C. et al. [Melatonin effects on the female genital system: a brief review]. **Rev Assoc Med Bras**, v. 54, n. 3, p. 267-71, 2008 May-Jun 2008. ISSN 0104-4230. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18604407> >.

MANTOVANI, A. et al. Câncer-related inflammation. **Nature**, v. 454, n. 7203, p. 436-44, Jul 2008. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18650914> >.

MAO, Y. et al. Stromal cells in tumor microenvironment and breast câncer. **Câncer Metastasis Rev**, v. 32, n. 1-2, p. 303-15, Jun 2013. ISSN 1573-7233. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23114846> >.

MARSH, T.; PIETRAS, K.; MCALLISTER, S. S. Fibroblasts as architects of câncer pathogenesis. **Biochim Biophys Acta**, v. 1832, n. 7, p. 1070-8, Jul 2013. ISSN 0006-3002. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23123598> >.

MEDIAVILLA, M. D. et al. Basic mechanisms involved in the anti-câncer effects of melatonin. **Curr Med Chem**, v. 17, n. 36, p. 4462-81, 2010. ISSN 1875-533X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21062257> >.

MICHEL, E. et al. Expression of prolactin receptors in normal canine mammary tissue, canine mammary adenomas and mammary adenocarcinomas. **BMC Vet Res**, v. 8, p. 72, 2012. ISSN 1746-6148. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22647582> >.

MIKI, Y. et al. The advantages of co-culture over mono cell culture in simulating in vivo environment. **J Steroid Biochem Mol Biol**, v. 131, n. 3-5, p. 68-75, Sep 2012. ISSN 1879-1220. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22265957> >.

MILKIEWICZ, M. et al. Vascular endothelial growth factor mRNA and protein do not change in parallel during non-inflammatory skeletal muscle ischaemia in rat. **J Physiol**, v. 577, n. Pt 2, p. 671-8, Dec 2006. ISSN 0022-3751. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16990404> >.

MIRUNALINI S, K. K.; DHAMODHARAN G; ., S. M. J. **Studies on the chemopreventive potential of melatonin on 7,12-dimethylbenz(a)anthracene induced mammary carcinogenesis in rats.** : Appl Sci Res 6: 245-253 p. 2010.

NICOLINI, A.; CARPI, A.; ROSSI, G. Cytokines in breast câncer. **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 17, n. 5, p. 325-37, Oct 2006. ISSN 1359-6101. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16931107> >.

PANDI-PERUMAL, S. R. et al. Melatonin antioxidative defense: therapeutical implications for aging and neurodegenerative processes. **Neurotox Res**, v. 23, n. 3, p. 267-300, Apr 2013. ISSN 1476-3524. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22739839> >.

PARK, S. Y. et al. Melatonin suppresses tumor angiogenesis by inhibiting HIF-1alpha stabilization under hypoxia. **J Pineal Res**, v. 48, n. 2, p. 178-84, Mar 2010. ISSN 1600-079X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20449875> >.

PAWŁOWSKI, K. M. et al. Expression and role of PGP, BCRP, MRP1 and MRP3 in multidrug resistance of canine mammary cancer cells. **BMC Vet Res**, v. 9, p. 119, 2013. ISSN 1746-6148. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23773525> >.

PHILLIPS, J. C.; LEMBCKE, L.; CHAMBERLIN, T. A novel locus for canine osteosarcoma (OSA1) maps to CFA34, the canine orthologue of human 3q26. **Genomics**, v. 96, n. 4, p. 220-7, Oct 2010. ISSN 1089-8646. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20647041> >.

PIERCE, B. L. et al. Elevated biomarkers of inflammation are associated with reduced survival among breast cancer patients. **J Clin Oncol**, v. 27, n. 21, p. 3437-44, Jul 2009. ISSN 1527-7755. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19470939> >.

PORRETTI, J. C. et al. Fibroblasts induce epithelial to mesenchymal transition in breast tumor cells which is prevented by fibroblasts treatment with histamine in high concentration. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 51, p. 29-38, Jun 2014. ISSN 1878-5875. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24685678> >.

PRADEEP, C. R.; SUNILA, E. S.; KUTTAN, G. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptors in tumor angiogenesis and malignancies. **Integr Cancer Ther**, v. 4, n. 4, p. 315-21, Dec 2005. ISSN 1534-7354. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16282508> >.

PROIETTI, S. et al. Melatonin and vitamin D3 synergistically down-regulate Akt and MDM2 leading to TGFβ-1-dependent growth inhibition of breast cancer cells. **J Pineal Res**, v. 50, n. 2, p. 150-8, Mar 2011. ISSN 1600-079X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21091766> >.

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

RASOTTO, R. et al. The dog as a natural animal model for study of the mammary myoepithelial basal cell lineage and its role in mammary carcinogenesis. **J Comp Pathol**, v. 151, n. 2-3, p. 166-80, 2014 Aug-Oct 2014. ISSN 1532-3129. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24975897> >.

RICHMOND, A.; THOMAS, H. G. Purification of melanoma growth stimulatory activity. **J Cell Physiol**, v. 129, n. 3, p. 375-84, Dec 1986. ISSN 0021-9541. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3465735> >.

RISMANCHI, S. et al. Expression of vimentin filaments in canine malignant mammary gland tumors: A simulation of clinicopathological features of human breast cancer. **Biomed Rep**, v. 2, n. 5, p. 725-728, Sep 2014. ISSN 2049-9434. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25054018> >.

ROMON, R. et al. Nerve growth factor promotes breast cancer angiogenesis by activating multiple pathways. **Mol Cancer**, v. 9, p. 157, 2010. ISSN 1476-4598. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20569463> >.

RONG, G. et al. Candidate markers that associate with chemotherapy resistance in breast câncer through the study on Taxotere-induced damage to tumor microenvironment and gene expression profiling of carcinoma-associated fibroblasts (CAFs). **PLoS One**, v. 8, n. 8, p. e70960, 2013. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23951052> >.

RYKALA, J. et al. Angiogenesis markers quantification in breast câncer and their correlation with clinicopathological prognostic variables. **Pathol Oncol Res**, v. 17, n. 4, p. 809-17, Dec 2011. ISSN 1532-2807. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21560015> >.

SANSONE, P.; BROMBERG, J. Environment, inflammation, and câncer. **Curr Opin Genet Dev**, v. 21, n. 1, p. 80-5, Feb 2011. ISSN 1879-0380. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21144738> >.

SANTOS, R. P. et al. Influence of the interaction between nodal fibroblast and breast câncer cells on gene expression. **Tumour Biol**, v. 32, n. 1, p. 145-57, Feb 2011. ISSN 1423-0380. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20820980> >.

SASAKI, M. et al. Melatonin reduces TNF- $\alpha$  induced expression of MAdCAM-1 via inhibition of NF- $\kappa$ B. **BMC Gastroenterol**, v. 2, p. 9, Apr 2002. ISSN 1471-230X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12003644> >.

SERVAIS, C.; EREZ, N. From sentinel cells to inflammatory culprits: câncer-associated fibroblasts in tumour-related inflammation. **J Pathol**, v. 229, n. 2, p. 198-207, Jan 2013. ISSN 1096-9896. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22996812> >.

SIMPKINS, S. A. et al. Clinical and functional significance of loss of caveolin-1 expression in breast câncer-associated fibroblasts. **J Pathol**, v. 227, n. 4, p. 490-8, Aug 2012. ISSN 1096-9896. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22488553> >.

SLEECKX, N. et al. Evaluation of immunohistochemical markers of lymphatic and blood vessels in canine mammary tumours. **J Comp Pathol**, v. 148, n. 4, p. 307-17, May 2013. ISSN 1532-3129. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23123127> >.

SNOUSSI, K. et al. Combined effects of IL-8 and CXCR2 gene polymorphisms on breast câncer susceptibility and aggressiveness. **BMC Câncer**, v. 10, p. 283, 2010. ISSN 1471-2407. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20540789> >.

SOUSA-NETO, J. A. S., P. M. REVISTA BRASILEIRA DE CÂNCEROLOGIA. **Melatonina e câncer – revisão da literatura**. 51: 49-58 p. 2005.

TAKAHASHI, H.; SHIBUYA, M. The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions. **Clin Sci (Lond)**, v. 109, n. 3, p. 227-41, Sep 2005. ISSN 0143-5221. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16104843> >.

TANEJA, P. et al. Classical and Novel Prognostic Markers for Breast Câncer and their Clinical Significance. **Clin Med Insights Oncol**, v. 4, p. 15-34, 2010. ISSN 1179-5549. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20567632> >.

ULUKAYA, E. et al. Additive enhancement of apoptosis by TRAIL and fenretinide in metastatic breast cancer cells in vitro. **Biomed Pharmacother**, v. 68, n. 4, p. 477-82, May 2014. ISSN 1950-6007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24755119> >.

WEIS, S. M.; CHERESH, D. A. Tumor angiogenesis: molecular pathways and therapeutic targets. **Nat Med**, v. 17, n. 11, p. 1359-70, 2011. ISSN 1546-170X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22064426> >.

WILCZYŃSKI, J. R. Câncer and pregnancy share similar mechanisms of immunological escape. **Chemotherapy**, v. 52, n. 3, p. 107-10, 2006. ISSN 0009-3157. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16612052> >.

YUAN, S. et al. The holo-apoptosome: activation of procaspase-9 and interactions with caspase-3. **Structure**, v. 19, n. 8, p. 1084-96, Aug 2011. ISSN 1878-4186. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21827945> >.

ZAMFIR CHIRU, A. A.; POPESCU, C. R.; GHEORGHE, D. C. Melatonin and cancer. **J Med Life**, v. 7, n. 3, p. 373-4, Sep 2014. ISSN 1844-3117. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25408757> >.

ZHANG, J.; LIU, J. Tumor stroma as targets for cancer therapy. **Pharmacol Ther**, v. 137, n. 2, p. 200-15, Feb 2013. ISSN 1879-016X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23064233> >.

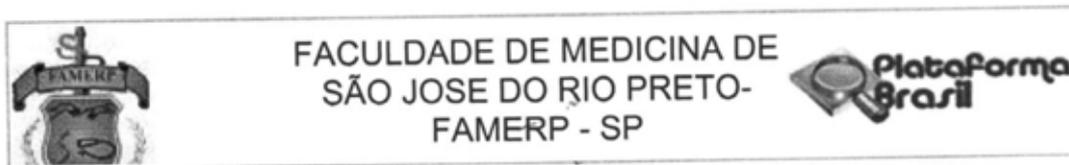
ZUCCARI, D. A. P. C. et al. **Immunohistochemical evaluation of e-cadherin, Ki-67 and PCNA in canine mammary neoplasias: Correlation of prognostic factors and clinical outcome.** : Pesq. Vet. Bras. . 28: 207-215 p. 2008.

ÖHLUND, D.; ELYADA, E.; TUVESON, D. Fibroblast heterogeneity in the cancer wound. **J Exp Med**, v. 211, n. 8, p. 1503-23, Jul 2014. ISSN 1540-9538. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25071162> >.



## VI. ANEXOS

**ANEXO 1:** Parecer da Comissão de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto.



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** INTERAÇÃO TUMORIGÊNICA DE FIBROBLASTOS EM CO-CULTURA COM LINHAGENS TUMORAIS MAMÁRIAS E A RESPOSTA TERAPÊUTICA COM O USO DA MELATONINA

**Pesquisador:** Debora Aparecida Pires de Campos Zuccari

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 16925413.2.0000.5415

**Instituição Proponente:** Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto- FAMERP - SP

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 354.970

**Data da Relatoria:** 16/07/2013

#### Apresentação do Projeto:

O projeto visa ampliar os conhecimentos dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento do câncer de mama, para tanto se pretende verificar a ação inibitória da melatonina no microambiente tumoral com foco nos fibroblastos, verificando a expressão de fatores relacionados à angiogênese, apoptose e no perfil diferencial de citocinas, que atuam diretamente no desenvolvimento tumoral.

Podendo isso ser utilizado em futuras terapias na rotina dos tratamentos de neoplasias mamárias. Oferecer novas possibilidades de tratamento e de melhora na qualidade de vida;

O projeto se encontra bem escrito e circunstanciado, com objetivos claros e bem definidos.

A metodologia é adequada para os fins desejados.

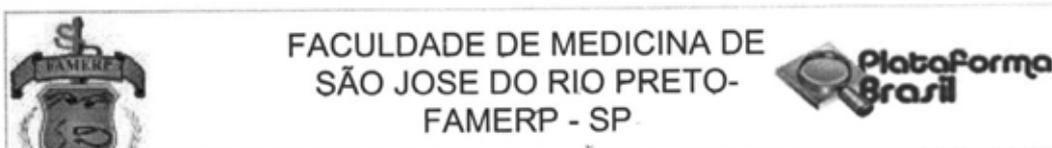
As referências são pertinentes e atualizadas.

Os pesquisadores envolvidos têm experiência neste campo de pesquisa.

#### Objetivo da Pesquisa:

Avaliar a interação dos CAFs em co-cultivo com linhagens de câncer de mama: humana e canina, e avaliar a ação inibitória da melatonina no microambiente tumoral com foco nos fibroblastos, verificando a expressão de fatores relacionados à angiogênese, apoptose e no perfil diferencial de citocinas.

**Endereço:** BRIGADEIRO FARIA LIMA, 5416  
**Bairro:** VILA SAO JOAO **CEP:** 15.090-000  
**UF:** SP **Município:** SAO JOSE DO RIO PRETO  
**Telefone:** (17)3201-5813 **Fax:** (17)3201-5813 **E-mail:** cepfamerp@famerp.br



Continuação do Parecer: 354.970

**Objetivo Secundário:**

Realizar o co-cultivo da linhagem celular metastática de câncer de mama humano (MDA-MB231) e de câncer de mama de cadela (P114) em conjunto aos CAFs, obtidas de pacientes com câncer de mama; Avaliar por ensaio MTT, a viabilidade das linhagens celulares e do co-cultivo, após a indução do tratamento com melatonina; Avaliar a expressão proteica dos fatores envolvidos nos processos de angiogênese, apoptose e perfil de citocinas antes e após os tratamentos, por meio da técnica de Antibody Array, identificando as vias de sinalização celular das proteínas diferencialmente expressas, por ferramentas de bioinformática; Validar a expressão diferencial das proteínas selecionadas por Antibodie Array e ferramentas de bioinformática, por meio do ensaio imunoenzimatico (ELISA) ou Multiplex.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Esta pesquisa não acarretara riscos para as pacientes, tendo em vista que serão utilizados fragmentos tumorais de descarte histopatológico.

**Benefícios:**

A associação de fibroblastos com células tumorais mamárias e o uso da melatonina poderão contribuir com o diagnóstico, prognóstico e possível tratamento em pacientes com câncer de mama.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Trata-se de um estudo que possibilitará compreender como fatores envolvidos no microambiente tumoral de neoplasias mamárias. Esses conhecimentos serão de grande importância por relacionar a resposta imune ao prognóstico do câncer, uma vez que os resultados desse estudo do microambiente tumoral e sua contribuição para o crescimento e progressão do câncer de mama permitirão conhecer a interação das células epiteliais e fibroblastos pelo sistema de co-cultura. A indução da melatonina permitirá avaliar os processos de angiogênese e expressão protéica, sendo que a interação com a melatonina poderá ter um elevado potencial terapêutico.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

O projeto apresenta todos os requisitos legalmente exigidos na resolução 466/12

O protocolo de pesquisa, as condições e a experiência do pesquisador e orientador são compatíveis com o proposto.

Endereço: BRIGADEIRO FARIA LIMA, 5416

Bairro: VILA SAO JOAO

CEP: 15.090-000

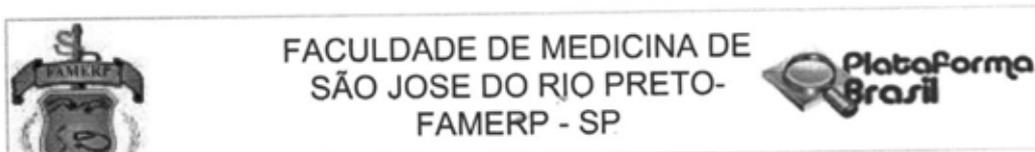
UF: SP

Município: SAO JOSE DO RIO PRETO

Telefone: (17)3201-5813

Fax: (17)3201-5813

E-mail: cepfamerp@famerp.br



Continuação do Parecer: 354.970

**Recomendações:**

Adequar os termos do TCLE, para que se torne mais compreensível às pacientes, especialmente no segundo parágrafo.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Os resultados obtidos permitirão viabilizar a interação do microambiente tumoral com o crescimento de tumores associado ao uso da melatonina como agentes terapêuticos no câncer de mama.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Aprovado desde que se atenda às recomendações acima.

SAO JOSE DO RIO PRETO, 09 de Agosto de 2013

---

**Assinador por:  
Fernando Batigália  
(Coordenador)**

Endereço: BRIGADEIRO FARIA LIMA, 5416  
Bairro: VILA SAO JOAO CEP: 15.090-000  
UF: SP Município: SAO JOSE DO RIO PRETO  
Telefone: (17)3201-5813 Fax: (17)3201-5813 E-mail: cepfamerp@famerp.br

**ANEXO 2:** Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, assinado pelas pacientes selecionadas para o estudo.

### **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

(Conselho Nacional de Saúde, resolução 196/96)

**Título da Pesquisa:** “INTERAÇÃO TUMORIGÊNICA DE FIBROBLASTOS EM CO-CULTURA COM LINHAGENS TUMORAIS MAMÁRIAS E A RESPOSTA TERAPÊUTICA COM O USO DA MELATONINA”

**Pesquisadores Responsáveis:** Profa. Dra. Debora Aparecida Pires de Campos Zuccari – Docente do Departamento de Biologia Molecular e coordenadora do LIMC / Prof. Dr. Dalisio de Santi Neto – Patologista/ Prof. Newton Antônio Bordin Junior – Oncologista clínico/ Prof. José Luiz Esteves Francisco – Mastologista.

- Para obter maior conhecimento dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento do câncer de mama, os pesquisadores da FAMERP de São José do Rio Preto (SP) 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;
- O estudo tem como objetivo verificar eficácia do tratamento com melatonina no microambiente tumoral com interesse nas células conhecidas como fibroblastos, através da expressão de fatores relacionados ao processo de formação de novos vasos sanguíneos (angiogênese), morte celular (apoptose) e inflamação, que atuam diretamente no desenvolvimento do tumor. Os resultados obtidos permitirão caracterizar a interferência do microambiente tumoral no crescimento do tumor utilizando a melatonina como agente terapêutico.
- Para isso, após a cirurgia para retirada do tumor será cortado deste material, um pedacinho que será enviado ao laboratório para cultura celular e posterior extração proteica. Não haverá mudança na técnica cirúrgica para esta coleta.
- Se eu concordar que um pedacinho do tumor retirado seja utilizado para a pesquisa não terei quaisquer benefícios ou direitos financeiros sobre os eventuais resultados decorrentes dela.
- Se eu não concordar ou decidir retirar meu consentimento em qualquer momento, minha decisão não influenciará, de nenhum modo, o meu tratamento nem a evolução da minha doença.

Declaro que, após ter sido convenientemente esclarecido pelo pesquisador sobre a utilização para estudo de um fragmento da lesão tumoral (pedacinho de aproximadamente 1 cm do tumor) a ser retirado durante o procedimento cirúrgico, já estipulado no tratamento, consinto em participar livre e espontaneamente deste estudo sem que tenha sido submetida a qualquer tipo de pressão:

Assim, consinto em participar do projeto de pesquisa em questão.

Nome do(a) participante:

Representante legal:

RG do prontuário médico:

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 Aparecida Pires de Campos Zuccari – Docente do Departamento de Biologia Molecular e coordenadora do LIMC

Prof. Newton Antônio Bordin Junior – Departamento de Ginecologia e Obstetrícia

Larissa Bazela Maschio – Pós-graduanda em genética no Laboratório de Investigação Molecular no Câncer - LIMC

Av. Brigadeiro Faria Lima, no. 5416

FAMERP - Faculdade de Medicina de S.J. Rio Preto São José do Rio Preto, SP - CEP 15090-000

Fone: (17) 3201-5885

e-mails: debora.zuccari@famerp.br;

newton\_bordin@terra.com.br,

larissa\_maschio@hotmail.com

*Em caso de dúvidas contatar a secretaria do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, telefone: (0xx17) 3201-5700, ramal 5813.*

**ANEXO 3:** Parecer da Comissão de Ética na Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto.

Comissão de Ética  
no Uso de Animais

**CEUA**  
FAMERP

*Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto*

*Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA*

DELIBERAÇÃO CEUA Nº 010/2013

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – CEUA/FAMERP, em reunião, analisou o projeto intitulado “**Interação tumorigênica de fibroblastos em co-cultura de linhagens tumorais mamárias e a resposta terapêutica com o uso da melatonina.**” (Protocolo FAMERP nº 001-002791/2013), sob responsabilidade da Profa. Dra. Debora Aparecida Pires de Campos Zuccari, e deliberou que o mesmo está de acordo com os princípios éticos estabelecidos na Lei nº 11.794/2008 e na Resolução nº 714/2002 e foi **aprovado** por essa Comissão.

Apesar da aprovação a Comissão solicita que conste no projeto:

- Constar local na FAMERP de execução do projeto;
- Esclarecer quem são os responsáveis pelas atividades relacionadas à execução do projeto;
- A Profa. Dra. Rosimeire Ap. Roela é mencionada como colaboradora do projeto, mas não está especificada a função da citada colaboradora;

Sugestões para constar no projeto:

- Na metodologia (pág 12), item 3- grupos e tratamentos (pág 13), é mencionado o uso da melatonina (grupos de estudo 2 e 4) em diferentes concentrações. Para melhor compreensão, devem ser mencionadas as concentrações que serão utilizadas, pois na justificativa do trabalho é citado que a melatonina apresenta-se como uma conduta terapêutica (pág 11);
- No item materiais e métodos, as análises:

Comissão de Ética  
no Uso de Animais

**CEUA**  
FAMERP

*Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto*

*Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA*

6- Análise da expressão proteica, técnica de microarray de proteínas, será realizada em um laboratório da FAMERP ou em um laboratório em outra instituição?

7- Ensaio imunoenzimático (ELISA) e Multiplex: utilizando ELISA e LUMINEX, será realizada em um laboratório da FAMERP ou em outra instituição?

Para melhorar a compreensão da metodologia, é interessante mencionar o local de execução dessas técnicas.

Atenção: **Até 30 dias após a finalização do projeto**, o pesquisador deverá preencher o Formulário do Relatório Final disponível no site e enviar à CEUA. O descumprimento desta obrigação poderá prejudicar o andamento de futuras solicitações.

São José do Rio Preto, 10 de maio de 2013.



Prof. Dr. Júlio César André  
Presidente da CEUA – FAMERP

**ANEXO 4:** Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, assinado pelos proprietários dos animais selecionados para o estudo.

### **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)

Pesquisadores Responsáveis: Profa. Dra. Debora Ap. P. C. Zuccari – Coordenadora Giovanna Rossi Varallo – Doutorado / Larissa Bazela Maschio – Mestrado.

Para obter maior conhecimento dos mecanismos envolvidos no câncer de mama em cadelas, os pesquisadores estão desenvolvendo uma pesquisa científica a fim de obter maior conhecimento a respeito da biologia tumoral e do prognóstico de cada subtipo fenotípico, para assim oferecer novas possibilidades de tratamentos e melhora na qualidade de vida dos animais.

Nesse âmbito, os pesquisadores estão desenvolvendo os projetos de pesquisa intitulados “Classificação fenotípica prognóstica das neoplasias mamárias em cadelas por marcadores imunohistoquímicos” e “Interação tumorigênica de fibroblastos em co-cultura com linhagens tumorais mamárias e a resposta terapêutica com o uso da melatonina” sob orientação da professora Dr<sup>a</sup>. Debora Aparecida Pires de Campos Zuccari. O objetivo principal dos estudos é determinar cinco grupos distintos de tumores de mama em cadelas baseados nas características fenotípicas de cada neoplasia e, assim, prever com maior propriedade o prognóstico da doença e verificar a ação inibitória da melatonina no microambiente tumoral com foco nos fibroblastos, verificando a expressão de fatores relacionados à angiogênese, apoptose e no perfil diferencial de citocinas, que atuam diretamente no desenvolvimento tumoral. Podendo isso ser utilizado em futuras terapias na rotina dos tratamentos de neoplasias mamárias.

Para tanto, é preciso que as amostras neoplásicas possuam alta qualidade, visto que serão submetidas às análises laboratoriais sensíveis. Portanto, o método de colheita é de suma importância para o êxito das futuras avaliações.

Assim, será coletada uma amostra sanguínea do animal (3 a 5 mL) e três pedaços do tumor, bem como da região adjacente, no momento da cirurgia. Não haverá mudança na técnica cirúrgica e nem na conduta do veterinário para as coletas.

Declaro que, após ter sido convenientemente esclarecido pelo pesquisador sobre a utilização para estudo de amostra sanguínea e fragmento tumoral a ser retirado durante o procedimento cirúrgico, já estipulado no tratamento, consinto em participar livre e espontaneamente deste estudo e manter contato com o grupo para informações adicionais, posterior a cirurgia. Assim, consinto em participar do projeto de pesquisa em questão, e comprometo-me a manter o pesquisador informado no caso de mudança de endereço ou telefone.

Nome do(a) proprietário(a):

Nome do animal:

Idade do animal:

Data em que o tumor foi observado pelo(a) proprietário(a):

Data em que o animal foi levado para consulta:

Data do diagnóstico do tumor pelo profissional:

Início do tratamento:

Terapia utilizada:

Endereço residencial: n°

Bairro:

Telefone: 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 da pesquisadora: Debora Aparecida Pires de Campos Zuccari

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

Assinatura: .....

Inscrição no Conselho Regional: 8134 - SP

Laboratório de Investigação Molecular do Câncer – LIMC.  
Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP  
Av. Brigadeiro Faria Lima, nº5416  
15090-000 - São José do Rio Preto, SP  
Fone: (17) 3201-5885  
e-mail: debora.zuccari@famerp.br

**ANEXO 5:** Modelo da ficha clínica do animal.**FICHA CLÍNICA Nº**

Nome da paciente:		
Raça:	Idade:	Peso:
Registro LIMC:		
Veterinário Colaborador:		
Proprietário:	Telefone:	

**História Clínica:**

1.  Recidiva                       Metástase  
 2.  Nulípara                         Multípara

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

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

**Envolvimento de linfonodos regionais (macroscopia):** \_\_\_\_\_

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: onde?** \_\_\_\_\_

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 (  )

**OUTRAS INFORMAÇÕES RELEVANTES:**

Instituído tratamento prévio: (  ) sim (  ) não

Qual: (  ) cirúrgico – tipo de mastectomia:

(  ) quimioterápico – protocolo:

nº ciclos/sessões:

(  ) outro – qual:

Presença de outros nódulos pelo corpo: (  ) sim (  ) não      Onde:

Possui diagnóstico histopatológico:      (  ) sim (  ) não      Laudo:

Histórico familiar acerca de neoplasias: (  ) não sabe informar

( ) ausente  
 ( ) presente Quem: Tumor:

**Relação Hormonal:**

Castrada: ( ) sim ( ) não Quando:

Administração de anticoncepcionais: ( ) sim ( ) não Qual:

Ciclo estral: ( ) não sabe informar ( ) regular ( ) irregular ( ) não observa

Se regular → frequência: duração:

Nº de gestações:

Falsa gravidez: ( ) sim ( ) não

Se sim → frequência: secreção: ( ) sim ( ) não tipo:

**Dieta / Escore Corporal**

Alimentação: ( ) ração ( ) comida caseira ( ) ambas

Escore corporal: ( ) caquético ( ) magro ( ) normal ( ) sobrepeso ( ) obeso

**PROCEDIMENTO CIRÚRGICO:**

**Técnica Cirúrgica Empregada na Remoção da Neoplasia**

Mastectomia regional ( )

Mastectomia unilateral ( )

Nodulectomia ( )

**De qual cadeia foi removido o tumor?**

( ) cadeia direita ( ) cadeia esquerda

**Data da colheita:**

**Mapeamento e Caracterizações das Lesões** (mensurações e descrições dos tumores)

Cadeia Mamária Direita	Cadeia Mamária Esquerda
M1:	M1:
M2:	M2:
M3:	M3:
M4:	M4:
M5:	M5:

M1: torácica cranial;

M2: torácica caudal;

M3: abdominal cranial;

M4: abdominal caudal;

M5: inguinal

**Dimensões do maior 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

Pós-graduando responsável: