



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**EFECTO DE MELATONINA SOBRE LA CAPACIDAD
INVASIVA DE CELULAS DE CARCINOMA MAMARIO
CANINO (*Canis lupus familiaris*) CF41.Mg**

CONSUELO FRANCISCA SERRANO GONZÁLEZ

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Ciencias Clínicas

PROFESOR GUÍA: CRISTIAN GABRIEL TORRES MENDOZA

SANTIAGO, CHILE
2017



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**EFFECTO DE MELATONINA SOBRE LA CAPACIDAD
INVASIVA DE CELULAS DE CARCINOMA MAMARIO
CANINO (*Canis lupus familiaris*) CF41.Mg**

CONSUELO FRANCISCA SERRANO GONZÁLEZ

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Ciencias Clínicas

NOTA FINAL:

PROFESOR GUÍA: CRISTIAN TORRES
PROFESOR CORRECTOR: JOSE IGNACIO ARIAS
PROFESOR CORRECTOR: OSCAR PERALTA

SANTIAGO, CHILE
2017

AGRADECIMIENTOS

A mi familia por apoyarme y dejarme estudiar esta maravillosa carrera.

A mis amigos y pareja, que me ayudaron a nunca rendirme, seguir adelante y trabajar para lograr mis metas a futuro.

A todos mis compañeros y amigos del laboratorio los cuales siempre me brindaron su apoyo y ayuda durante todo el proceso de la tesis.

Finalmente a mi profesor Guía, Dr. Cristian Torres por enseñarme la importancia de la investigación y su aplicación en diversos quehaceres de la profesión.

RESUMEN

La neoplasia mamaria es una enfermedad que afecta comúnmente a hembras caninas. En el microambiente tumoral existe una subpoblación de células tumorales que exhiben características de troncalidad (CSC), que pueden formar esferas *in vitro*, resistir tratamientos antitumorales, explicando en parte la recurrencia de algunas neoplasias. Previamente, se ha descrito que esferas derivadas de células de carcinoma mamario canino CF41.Mg exhiben características de troncalidad. Melatonina ha mostrado efectos antitumorales sobre células tumorales mamarias; sin embargo, sus efectos han sido pobremente evaluados en CSC mamarias caninas. Melatonina modula la expresión de proteínas relacionadas con transición epitelio-mesénquima en CSC mamarias, como E-cadherina y OCT-4. El objetivo de este estudio fue determinar los efectos de melatonina sobre la proliferación, migración e invasión de células CF41.Mg y esferas derivadas de ellas. Se cultivaron células CF41.Mg en DMEM alto en glucosa suplementado con suero fetal bovino y L-glutamina. Las esferas se cultivaron en placas de ultra-baja adherencia con DMEM/F12 en presencia de EGF, bFGF, insulina, B27 y heparina. La proliferación (reducción de MTS) y los ensayos de migración/invasión (transwell) celular se realizaron en presencia de melatonina (0,01, 0,1 o 1 mM). Melatonina indujo un efecto antiproliferativo a 1 mM ($P < 0.05$), sin embargo, el efecto sobre las esferas fue mayor ($P < 0.0001$). La migración/invasión celular fue inhibida en respuesta a concentraciones no citotóxicas de melatonina ($P < 0.05$) en ambos tipos celulares. Estos resultados indican que melatonina juega un papel en la actividad proliferativa e invasiva de células CF41.Mg, siendo un potencial agente contra CSC mamarias.

Palabras clave: Melatonina, Carcinoma mamario canino, células CF41.Mg, células neoplásicas troncales.

ABSTRACT

Mammary cancer is a common disease affecting female dogs. In the tumor microenvironment there is a subpopulation of cancer cells with stem cell-like features (CSC), that can form *in vitro* spheres and resist conventional antitumor treatments explaining in part the recurrence of some cancers. It has been previously reported that spheres derived from CF41.Mg canine mammary carcinoma cells exhibit some stemness features. Melatonin has shown antitumor effects on cancer mammary cells; nevertheless, its effects has been poorly evaluated on canine mammary CSC. Recent reports have showed that melatonin modulates the expression of proteins related to epithelial-mesenchymal transition in breast CSC, such as E-cadherin, vimentin and OCT-4. The aim of this study was to determine the effects of melatonin on proliferation, migration and invasion of canine mammary carcinoma CF41.Mg cells and spheres derived from them. CF41.Mg cells were grown in DMEM high glucose supplemented with FBS and L-glutamine. CF41.Mg-spheres were cultured in ultra-low attachment plates with serum-free DMEM/F12 in presence of EGF, bFGF, insulin, B27 and heparin. Cell proliferation (MTS reduction) and migration/invasion (transwell) assays were conducted in presence of melatonin (0.01, 0.1 or 1 mM). Melatonin induced an antiproliferative effect at 1 mM ($P < 0.05$), however the effect on spheres was higher ($P < 0.0001$) than in parental cells. Cell migration/invasion was inhibited in response to non-cytotoxic concentrations of melatonin ($P < 0.05$) both in spheres and in parental cells. These results indicate that melatonin plays a role in the proliferative and invasive activity of CF41.Mg cells, representing a valuable potential agent against mammary CSC.

Key words: Melatonin, canine mammary carcinoma, CF41.Mg cells, cancer stem cells.

INTRODUCCIÓN

En Medicina Veterinaria, los tumores mamarios representan las neoplasias más frecuentemente diagnosticadas en hembras caninas. Aproximadamente el 50% de ellas son de naturaleza patológica maligna, siendo la mayoría de los tumores de origen epitelial (Sontas *et al.*, 2009; Salas *et al.*, 2015). Su incidencia es mayor en hembras adultas (edad promedio de 10,5 años), reproductivamente enteras, de raza pura y tamaño pequeño (Poodle, Cocker Spaniel, entre otras) (Salas *et al.*, 2015).

Estos tumores pueden variar en tamaño desde unos pocos milímetros a algunos centímetros, y en el 50% de los casos se presentan como masas múltiples (Salas *et al.*, 2015). La exposición temprana a hormonas ováricas, tales como estradiol y progesterona, es un factor etiológico relevante que predispone al desarrollo de esta neoplasia (Sorenmo *et al.*, 2011).

Hasta la fecha, la cirugía es el tratamiento de elección para esta enfermedad (Nooshinfari *et al.*, 2016), sin embargo, esta opción terapéutica no es factible en el caso de tumores no resectables, muy extensos y/o asociados a metástasis. La quimioterapia puede representar una alternativa terapéutica adyuvante en casos de neoplasias con alta probabilidad de diseminación, no obstante, algunas células tumorales pueden adquirir resistencia a los fármacos comúnmente disponibles (Torres *et al.*, 2015), por lo tanto es relevante buscar nuevas alternativas terapéuticas.

Células neoplásicas troncales

La existencia de subpoblaciones de células tumorales con características de troncalidad (CNT), también llamadas células iniciadoras de tumores, puede explicar en parte algunas características de la progresión tumoral, como la recurrencia neoplásica post tratamiento y metástasis (Torres *et al.*, 2015). Estas células exhiben la capacidad de autorenovación, quimio y radioresistencia, fomentan la formación de vasos sanguíneos, promueven la motilidad celular y están implicadas en el proceso metastásico (Charafe *et al.*, 2008). Es posible obtenerlas *in vitro* a partir de líneas celulares por medio del ensayo de formación de esferas, el cual es una de las estrategias más utilizadas para aislar e identificar

CNT (Torres *et al.*, 2015). Estas esferas son estructuras celulares que se cultivan en ausencia de suero fetal bovino y en condiciones libres de anclaje, y tienen una población celular heterogénea la cual incluye una alta proporción de células que exhiben características de troncalidad (Michishita *et al.*, 2011; Torres *et al.*, 2015).

Se ha descrito que células tumorales que están en transición epitelio-mesénquima (TEM) pueden adquirir características de troncalidad. La TEM es mediada por factores transcripcionales y de crecimiento que inducen pérdida de uniones intracelulares propias de las células epiteliales, adquisición de morfología mesenquimal, pérdida de la polaridad celular basal-apical y habilidad de migración e invasión (Goncalves *et al.*, 2016).

La invasión tumoral es un proceso biológico complejo que comienza con el desprendimiento de las células tumorales desde la masa neoplásica principal y la invasión posterior del tejido adyacente, vasos sanguíneos y/o linfáticos circundantes (Cos *et al.*, 1998; Leman *et al.*, 2001). A continuación, una proporción no despreciable de esas células tumorales pueden colonizar órganos, formando depósitos tumorales secundarios, fenómeno conocido como metástasis (Cos *et al.*, 1998). La migración e invasión celular son fenómenos dependientes de moléculas de adhesión que permiten interacciones célula-célula como también célula-matriz extracelular (Cos *et al.*, 1998).

Las CNT de origen mamario expresan un fenotipo CD44⁺/CD24^{-bajo} (Michishita *et al.*, 2011). La glicoproteína de superficie CD44 se relaciona con adhesión, agregación y migración celular, y es expresada en altos niveles en neoplasias de alto grado histológico y en células metastásicas (Roa *et al.*, 2001; Torres *et al.*, 2015). Recientes estudios han demostrado que CD44 está involucrada en al menos dos de las etapas de la cascada invasiva, como son la adhesión a la matriz extracelular y motilidad (Roa *et al.*, 2001). Es así como esferas derivadas de células de carcinoma mamario canino CF41.Mg expresan en una alta proporción el fenotipo CD44⁺/CD24^{-bajo}, además de otras características de troncalidad como autorenovación y quimioresistencia relativa a doxorubicina y paclitaxel (Torres *et al.*, 2015). Por otro lado, las CNT también expresan factores de transcripción asociados a troncalidad, incluyendo OCT4, que juega un importante rol en la carcinogénesis y provee un mecanismo por el cual las células tumorales podrían adquirir o mantener un fenotipo resistente a diversas terapias (Goncalves *et al.*, 2016).

Melatonina

Melatonina (N-acetyl-5-methoxytryptamine) es una hormona indólica, identificada por primera vez en el año 1960 y sintetizada por la glándula pineal de mamíferos (Hill *et al.*, 2015). Actualmente, existe evidencia que la síntesis de melatonina ocurre también en otros órganos tales como la retina, tracto gastrointestinal, piel, médula ósea y linfonodos (Hill *et al.*, 2015). La producción de melatonina está regulada por el fotoperiodo. Así, tanto su síntesis como secreción son inducidas por la oscuridad y reprimidas por la luz en hembras caninas (Hill *et al.*, 2015), por lo tanto, sus concentraciones en el plasma son bajas durante el día y alcanzan su “*peak*” (concentración media de 1 nM) durante la noche (Cos *et al.*, 2003). Esta hormona no sólo regula el ritmo circadiano, sino que también induce propiedades antioxidantes, inmunoestimulantes, pro-apoptóticas y antiproliferativas, producto de la interacción con sus receptores específicos MT1 y MT2 (Leman *et al.*, 2001; Di Bella *et al.*, 2013; Li Ya *et al.*, 2017).

Se ha descrito que una disminución en la actividad de la glándula pineal (y consecuentemente una baja en la producción de melatonina), y condiciones que generen disrupción del ritmo circadiano (exposición a luz artificial por la noche, falta de sueño, trabajo nocturno) podría contribuir al desarrollo de cáncer mamario, permitiendo un incremento de la susceptibilidad de células epiteliales mamarias a daños oxidativos además de generar un estado de hiperestrogenismo relativo (Cos y Sanchez-Barceló, 2000; Nooshinfari *et al.*, 2016; Touitou *et al.*, 2017).

Concentraciones *in vitro* de melatonina de 1 nM, correspondientes a niveles plasmáticos fisiológicos en humanos durante la noche, ejercen un efecto antiproliferativo directo sobre células de carcinoma mamario humano estradiol-dependientes MCF-7 (Cos *et al.*, 1998). En este contexto, numerosos estudios demuestran que melatonina ejerce diversos efectos oncostáticos (Ramos *et al.*; 2015; Ferraz *et al.*; 2016; Gelaleti *et al.*; 2016). Estos estudios sugieren que existe una variedad de mecanismos mediados por la interacción de la hormona con el receptor de estradiol tipo α (RE α) presente en este tipo de células neoplásicas, incluyendo represión de la actividad transcripcional inducida por la activación de este (Hill *et al.*, 2015).

Así, esta hormona actúa como un inhibidor de la proliferación celular, y un inductor de apoptosis, disminuyendo la respuesta mitogénica de células tumorales a estradiol (Luzía *et al.*, 2015 y Alonso *et al.*, 2016). No obstante, también ejerce efectos antineoplásicos sobre células tumorales RE α negativas (Ramos *et al.*, 2015). De este modo, melatonina podría ser un excelente adyuvante para las drogas comúnmente utilizadas en la prevención y tratamiento del cáncer mamario de distintos grados histológicos (Ramos *et al.*, 2015). Existe evidencia que melatonina reduce la invasión de células neoplásicas, produciendo una disminución en la movilidad y unión celular, por medio de una modulación en el citoesqueleto. Además, esta hormona induce una regulación negativa de la vía de señalización intracelular p38-MAP quinasas y una inhibición tanto de la expresión como de la actividad de metaloproteinasas de matriz tipo 2 y 9, proteasas que participan activamente en la motilidad celular (Goncalves *et al.*, 2016).

Recientemente se ha descrito que melatonina disminuye la expresión de OCT4 en células de cáncer mamario canino CMT-U2229 (Goncalves *et al.*, 2016). También está descrito que melatonina interferiría con la TEM en esferas derivadas de la misma línea celular, induciendo un aumento de la expresión de E-cadherina (biomarcador epitelial) y una disminución de N-cadherina y vimentina (biomarcadores mesenquimáticos) (Goncalves *et al.*, 2016). Diversos estudios han demostrado que una baja expresión de E-cadherina se asocia con metástasis, invasión de linfonodos y un mal pronóstico en cáncer mamario, mientras que, la sobreexpresión de N cadherina y vimentina está correlacionada con un mal pronóstico en cáncer (Kalluri y Weinberg, 2009).

Aun cuando se han desarrollado una gran cantidad de estudios del efecto de melatonina sobre células neoplásicas mamarias, la mayoría se relaciona con su capacidad antiproliferativa, siendo escasa la información referida a su potencial actividad sobre fenómenos invasivos, más aún sobre CNT de carcinoma mamario canino, por lo que se hace sumamente importante realizar más estudios al respecto.

El objetivo de este estudio fue estudiar el efecto *in vitro* de melatonina sobre la capacidad invasiva de células parentales y, CNT derivadas de células de carcinoma mamario, de manera de robustecer las observaciones que describen un rol antitumoral para esta hormona.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los experimentos requeridos para el desarrollo de esta memoria de título fueron realizados en el Laboratorio de Biomedicina y Medicina Regenerativa, Departamento de Ciencias Clínicas de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile.

Cultivo celular

La línea celular CF41.Mg (CRL-6232, ATCC) se cultivó en medio DMEM alto en glucosa, suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), 2 mM glutamina, 100 U/ml de penicilina G, 100 µg/ml de estreptomycin y 0.25 µg/ml de anfotericina B. Fueron mantenidas a 37°C en una atmósfera humidificada con 5% CO₂ y el medio de cultivo fue cambiado cada 48 horas previo lavado de las células con buffer PBS.

Para la desagregación de células, una vez alcanzado un 80-90% de confluencia, estas fueron lavadas con PBS y luego incubadas con Tripsina 2,5%/ETDA 0.2g/L por 10 minutos. La reacción fue detenida con DMEM más 10% SFB; luego las células fueron centrifugadas a 200 x g por 10 minutos a 4°C y finalmente se recuperaron del pellet obtenido y se sembraron. La concentración de células vivas se evaluó a través del método de exclusión con azul tripán y hemocitometría.

Cultivo de esferas

Células parentales (CF41.Mg adherentes) fueron disgregadas, lavadas con DPBS, centrifugadas y luego sembradas en medio de cultivo de esferas constituido por DMEM-F12, suplementado con B27 2%, heparina 4 µg/ml, insulina recombinante humana (IRH) 5 µg/mL, factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF) 10 ng/mL, factor de crecimiento epidérmico (EGF) 10 ng/mL, 20 U/mL de penicilina G, 20 µg/mL de estreptomycin y 0,05 µg/ml de anfotericina B. Estas células se cultivaron bajo condiciones libre de anclaje utilizando placas de ultra baja adherencia y en ausencia de suero fetal bovino.

Ensayo de viabilidad celular

Células adherentes, fueron sembradas en placas de 96 pocillos de fondo plano, a una concentración de 2.000 células/pocillo. En esferas, se utilizó una densidad de 5.000

células/pocillo que fueron sembradas en placas de 96 pocillos de ultra baja adherencia. En ambos, se dejó un blanco en triplicado que solo contuvo medio de cultivo más melatonina. Para ambas condiciones, 24 horas después de la siembra, se les aplicó en triplicado, melatonina en distintas concentraciones (0.01, 0.1, 1 mM). A las 48 y 72 horas de incubación se analizó la viabilidad celular a través del método de reducción de MTS ((3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfoxifenil)-2H-trazolium). Se aplicó 20 μL de CellTiter 96® (Promega) cada 100 μL de medio de cultivo y se dejó incubando por tres horas a 37° C en una atmósfera humidificada con 5% CO₂. La densidad óptica (D.O.) resultante se midió en un lector de multiplacas a 490 nm, previa agitación lenta por un minuto. La viabilidad, referida como la proporción de células vivas luego de realizado el experimento, se calculó como un valor relativo en relación con el control no estimulado, donde el promedio de D.O. del grupo control se consideró como 100% de viabilidad. Se realizaron a lo menos 3 experimentos en forma independiente.

Ensayos de migración e invasión celular

Para este ensayo se usaron canastillos tipo transwell con membranas de policarbonato con poros de 8 μm de diámetro posicionados dentro de placas de 24 pocillos. Primero, se activó la membrana de policarbonato con 100 μL de medio más SFB y se dejó por 30 segundos, se retiró y se añadió a cada canastillo 100 μL de Matrigel (concentración de 12 $\mu\text{g}/\text{mL}$; BD-Biosciences). Se dejó en con una atmósfera de 5% CO₂ a 37°C por 2 horas. Al cabo de este tiempo, se retiró el sobrenadante del matrigel y se sembraron 5×10^3 células, tanto células adherentes como esferas, en 300 μL de medio sin SFB dentro de los canastillos. En los pocillos, se añadió 500 μL de medio más 5% SFB como agente quimioatrayente. Se incubaron las células con concentraciones no citotóxicas de Melatonina por 48 horas. Una vez cumplido el tiempo de incubación, se removió el medio de cada canastillo, y se lavó dos veces con PBS, se fijó y permeabilizó con metanol frío, y se tiñó con Giemsa 1%. Luego, se removieron las células presentes sobre la membrana del transwell donde fueron sembradas con un hisopo estéril, de manera que solo quedaran las células que atravesaron la membrana, es decir las células con capacidad invasiva. Posteriormente, se removió la membrana de policarbonato con un bisturí para montarla sobre un portaobjetos. Finalmente, se seleccionaron al azar 6 campos de 10x, realizándose

el recuento de células invasivas con el software Image J y su herramienta “cell counter”. En paralelo, se realizaron experimentos de migración celular utilizando transwells, de la misma forma a lo ya descrito para invasión, con la única diferencia que estos no fueron pre-incubados con Matrigel. Cada experimento se realizó en duplicado. Se realizaron 3 experimentos en forma independiente.

Análisis de los resultados

La descripción de los resultados se llevó a cabo mediante medias y desviaciones estándar. Se utilizó el test Shapiro-Wilk para determinar el tipo de distribución de los datos. Luego, para la determinación de diferencias estadísticamente significativas entre los grupos control y los grupos con tratamiento, se realizó ANOVA de una vía junto con un análisis Post Hoc de Tukey o Kruskal Wallis. Se consideró significancia estadística con un $p < 0.05$. El análisis se llevó a cabo mediante el software Infostat (Córdoba, AR).

RESULTADOS

Objetivo 1

Para determinar la concentración no citotóxica de melatonina, se realizaron ensayos de viabilidad celular mediante el método de reducción con MTS con mediciones a las 24 y 48 horas post aplicación de la hormona. Se observó una disminución en la viabilidad de células CF41.Mg adherentes en respuesta a 1 mM de melatonina a las 48 horas ($p < 0,05$), efecto no detectado con las otras concentraciones estudiadas (0,01 y 0,1 mM) (Figura 1). En esferas derivadas de las células CF41.Mg, 1 mM de melatonina también indujo una disminución en su viabilidad, tanto a las 24 como a las 48 horas de incubación ($p < 0,05$), efecto que fue dependiente del tiempo dado que a las 48 hrs se observó una menor viabilidad celular (Figura 2).

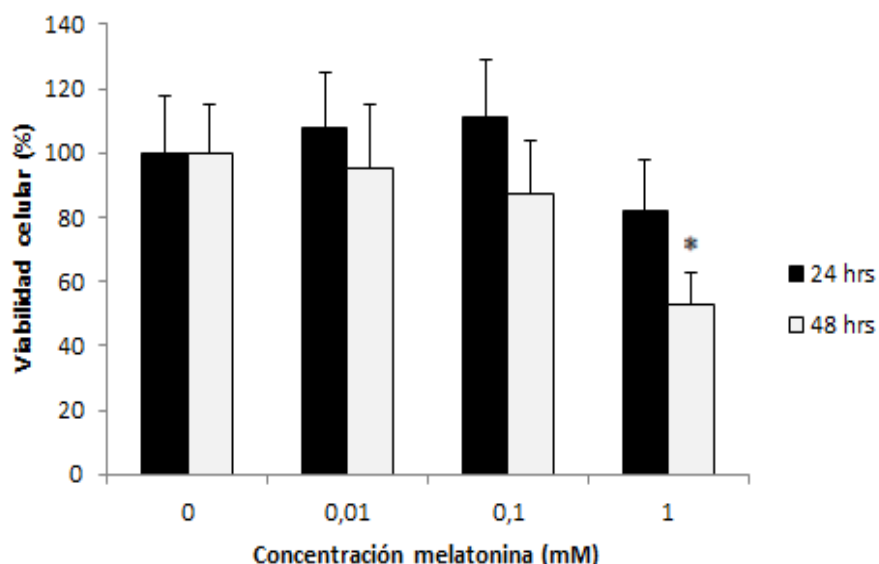


Figura 1: Viabilidad de células CF41.Mg en respuesta a distintas concentraciones de melatonina (0-1 mM) por 24 y 48 horas. Ensayo de reducción de MTS. Los valores son medias \pm DE de 3 experimentos independientes hechos en triplicado. * Indica significancia estadística respecto al grupo control, $p < 0,05$ (test ANOVA y Bonferroni).

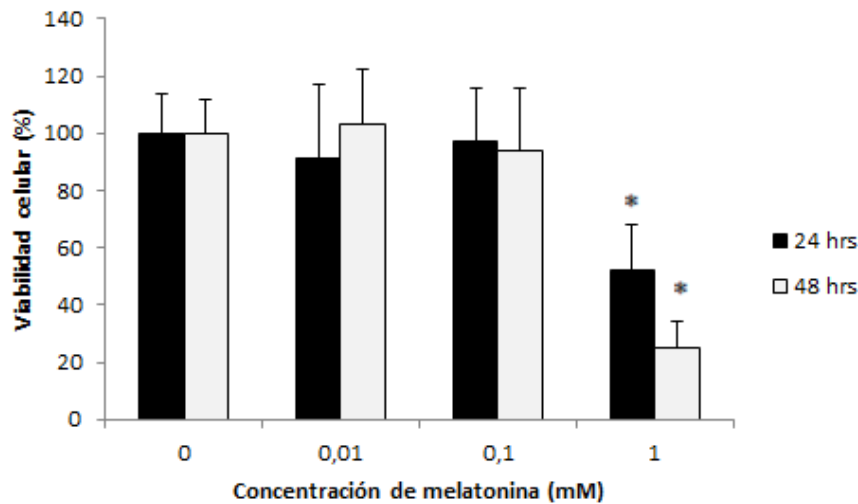


Figura 2: Viabilidad de esferas derivadas de células CF41.Mg en respuesta a distintas concentraciones de melatonina (0-1mM) por 24 y 48 horas. Ensayo de reducción de MTS Los valores son medias \pm DE de 3 experimentos independientes en triplicado. * $p < 0,05$ entre los tratamientos v/s el control negativo (test ANOVA y Bonferroni).

Posteriormente, se realizó una comparación entre las viabilidades observadas en respuesta a melatonina por 48 hrs en ambos tipos celulares para evaluar un efecto diferencial dependiente del tipo celular. Las esferas celulares exhibieron mayor sensibilidad a melatonina a la concentración de 1 mM ($p < 0,0001$), tal como se muestra en la Figura 3.

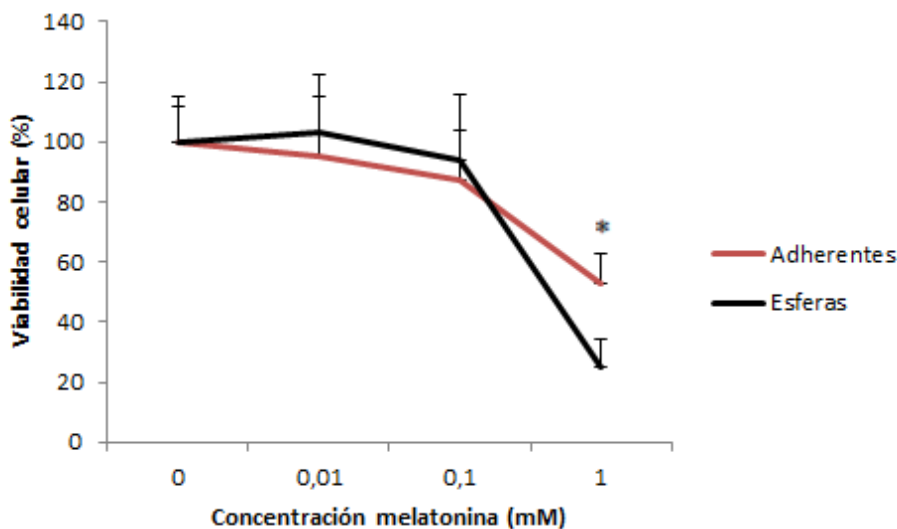


Figura 3: Comparación de viabilidades entre células CF41.Mg adherentes y esferas derivadas en respuesta a melatonina por 48 horas. Los valores de ambos experimentos son medias \pm DE de 3 experimentos independientes en triplicado. * $p < 0,0001$ entre ambos tipos celulares. (Prueba de T).

Objetivo 2

El ensayo de migración celular se realizó con concentraciones no citotóxicas de melatonina, lo cual fue determinado en los experimentos de viabilidad celular ya expuestos. Melatonina generó una disminución en la capacidad de migración tanto en células adherentes CF41.Mg (140 ± 42 vs 81 ± 37 células) ($p < 0,05$) (Figuras 4 y 5) como en esferas derivadas de ellas (146 ± 25 vs 72 ± 23 células) ($p < 0,05$) (Figuras 6 y 7) a la concentración de 0,1 mM luego de 48 hrs de incubación.

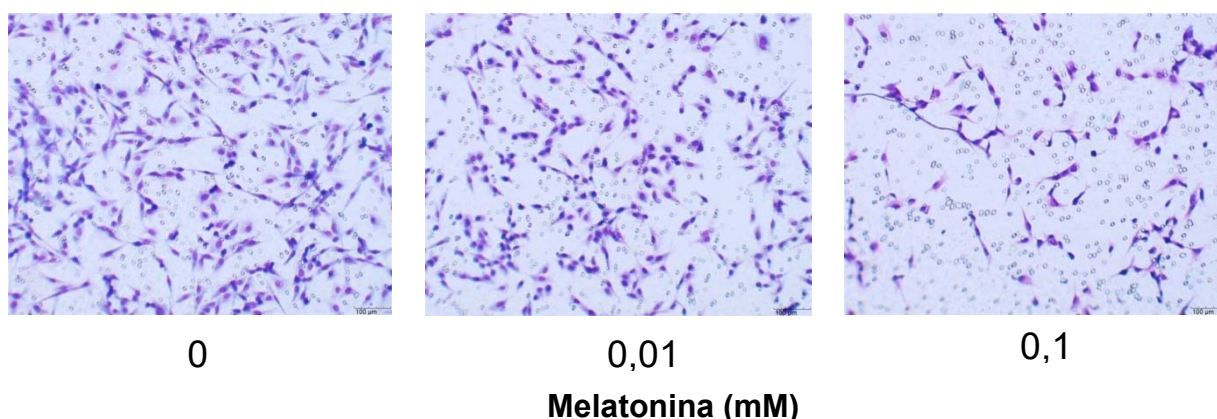


Figura 4. Microfotografías representativas de migración de células CF41.Mg tratadas con 0, 0,01 y 0,1 mM de melatonina por 48 horas. Magnificación 100X.

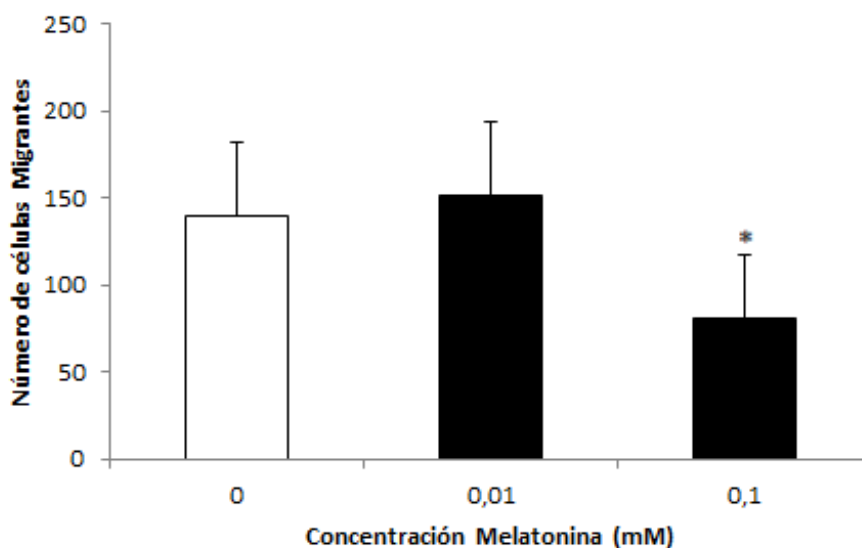


Figura 5. Cuantificación del número de células adherentes migradas en respuesta a distintas concentraciones de melatonina (0-0,1mM) por 48 horas. Método Transwell. Los valores son medias \pm DE de 3 experimentos en duplicado. * $p < 0,05$ en relación a la condición control (test Kruskal Wallis).

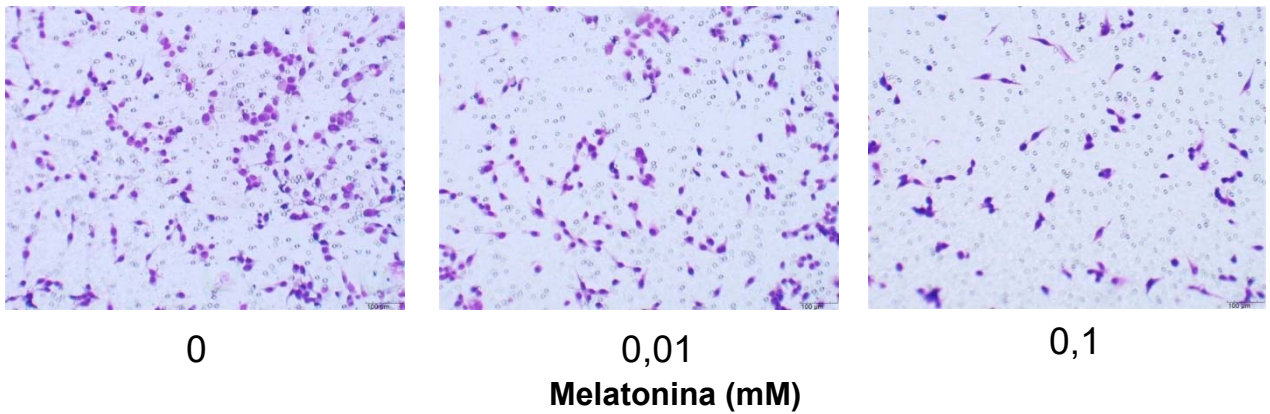


Figura 6. Microfotografías representativas de migración de esferas derivadas de células CF41.Mg tratadas con melatonina por 48 horas. Magnificación 100X.

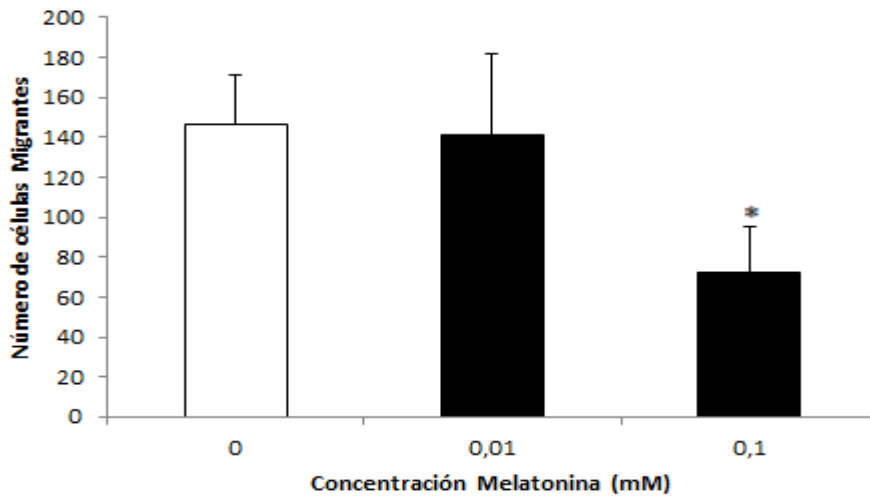


Figura 7. Cuantificación del número de esferas derivadas de células CF41.Mg migradas en respuesta a distintas concentraciones de melatonina (0-0,1mM) por 48 horas. Método Transwell. Los valores son medias \pm DE de 3 experimentos en duplicado. * $p < 0,05$ en relación a la condición control (test Kruskal Wallis).

Objetivo 3

En los ensayos de invasión celular se observó que melatonina indujo una disminución de la capacidad invasiva en ambos tipos celulares. En células adherentes, la droga a una concentración de 0,1 mM redujo (144 ± 41 vs 68 ± 35 células) esta habilidad ($p < 0.05$) (Figuras 8 y 9). No obstante, las esferas celulares mostraron mayor sensibilidad a los efectos anti-invasivos de melatonina, ya que tanto 0.001 (63 ± 25 vs 45 ± 13 células) como 0.1 mM (63 ± 25 vs 25 ± 12 células) disminuyeron esta capacidad ($p < 0.05$), tal como se aprecia en las Figuras 10 y 11.

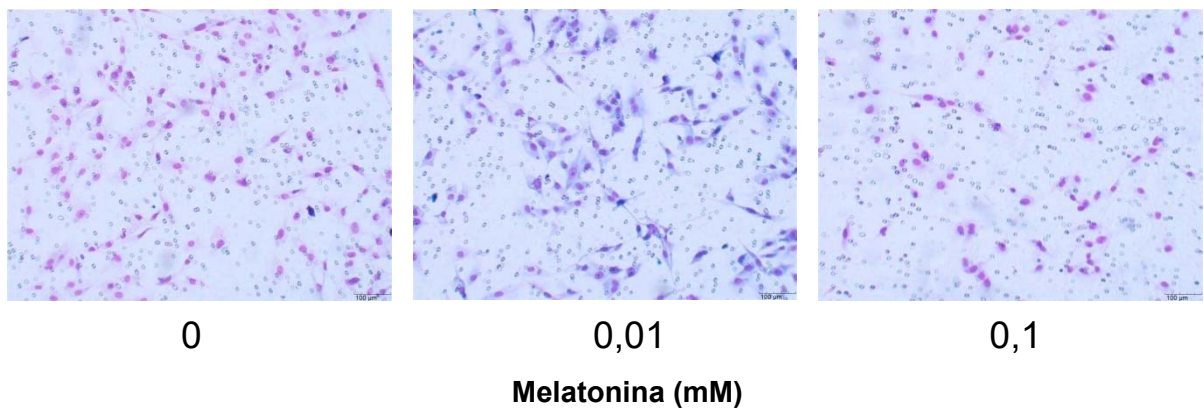


Figura 8. Microfotografías representativas de invasión de células CF41.Mg tratadas con 0, 0,01 y 0.1 mM de melatonina por 48 horas. Magnificación 100X.

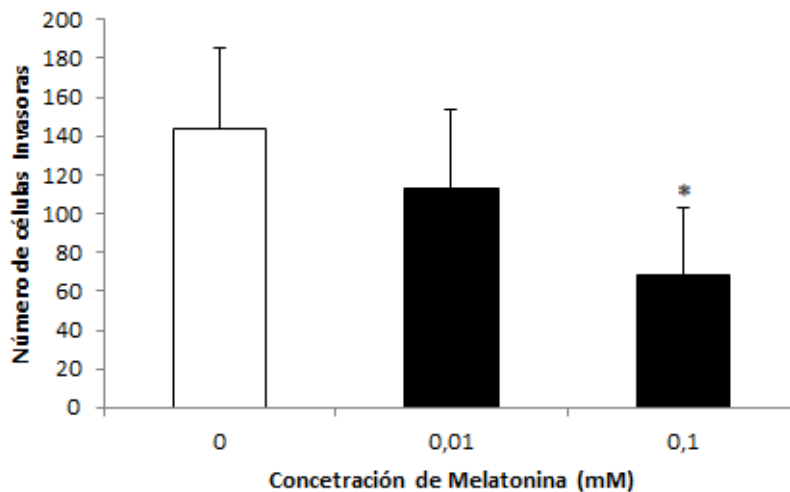


Figura 9. Cuantificación del número de células CF41.Mg invasivas en respuesta a distintas concentraciones de Melatonina (0-0,1 mM) a 48 horas. Método Transwell. Los

valores son promedios \pm DE de 3 experimentos en duplicado. * $p < 0,05$ en relación a la condición control (test ANOVA).

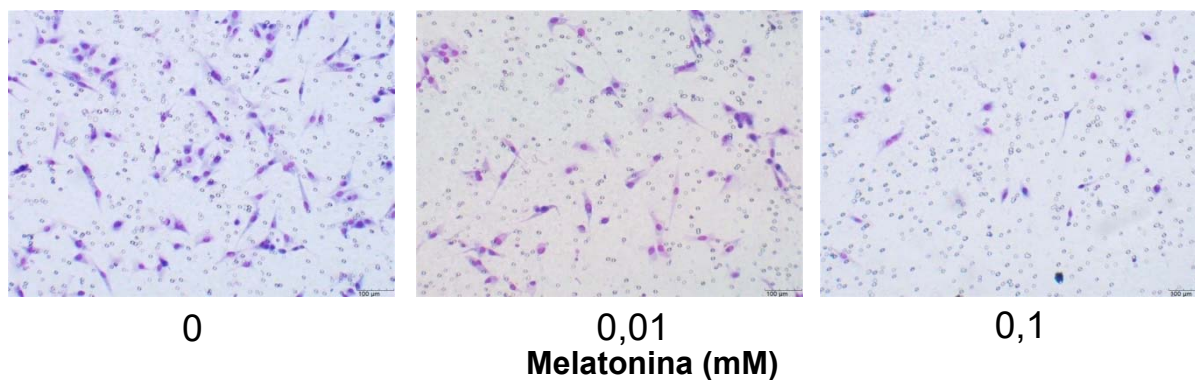


Figura 10. Microfotografías representativas de invasión de esferas derivadas de células CF41.Mg tratadas con 0, 0,01 y 0,1 mM de melatonina por 48 horas. Magnificación 100X.

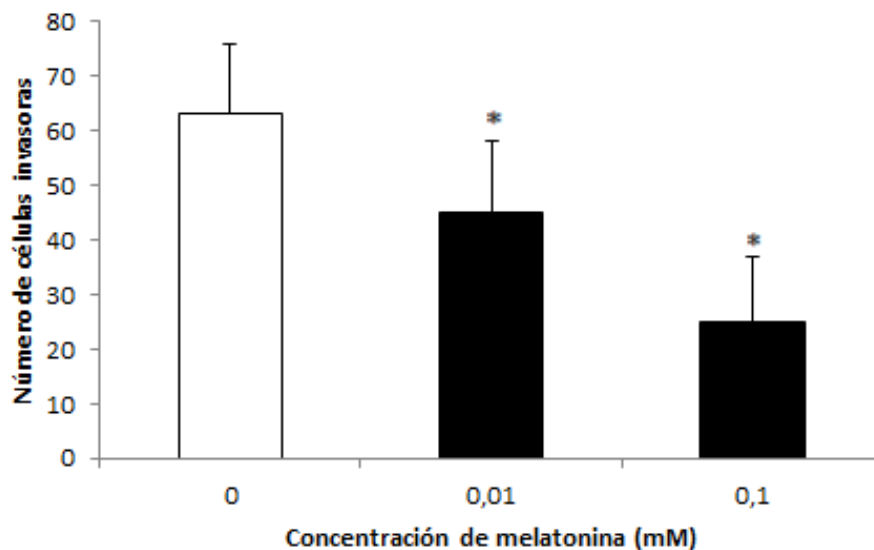


Figura 11. Cuantificación del número de células derivadas de esferas invasivas en respuesta a distintas concentraciones de melatonina (0-0,1mM) por 48 horas. Los valores son promedios \pm DE de 3 experimentos en duplicado. * $p < 0,05$ en relación a la condición control (test de Kruskal Wallis).

DISCUSIÓN

Las neoplasias mamarias son los tumores más comúnmente observados en hembras caninas (Salas *et al.*, 2015). Los tratamientos para esta enfermedad están principalmente limitados a la cirugía y a la quimioterapia, sin embargo, algunos tumores pueden desarrollar recidiva clínica, metástasis y quimioresistencia (Torres *et al.*, 2015). La presencia de una pequeña proporción de CNT en el nicho tumoral podría explicar parcialmente la progresión neoplásica, incluyendo el desarrollo de resistencia a drogas. Estas células poseen una alta capacidad de autorenovación y potencial de iniciar nuevos tumores (Michishita *et al.*, 2011), por lo tanto, es necesario buscar nuevas alternativas con potencial terapéutico que ejerzan un efecto sobre ellas.

En los últimos años, se han comenzado a realizar estudios con melatonina como un potencial agente antitumoral sobre diversas neoplasias humanas, incluyendo las neoplasias mamarias (Goncalves *et al.*, 2016). La mayoría de los estudios se han enfocado en los efectos antiproliferativos y pro-apoptóticos de la hormona, sin embargo, esta puede inducir efectos oncostáticos mediante otras vías bloqueando invasión celular, angiogénesis y estrés oxidativo, entre otros (Cos, *et al.*, 1998; Di Bella *et al.*, 2013; Ramos *et al.*, 2015; Goncalves *et al.*, 2016). En los últimos años los estudios al respecto han ido en aumento, no obstante, hay escasas publicaciones en neoplasias mamarias caninas, donde una de ellas incluye el efecto de melatonina sobre CNT (Goncalves *et al.*, 2016).

En el presente estudio se realizó inicialmente una evaluación de viabilidad celular para determinar las concentraciones citotóxicas de melatonina sobre la línea celular CF41.Mg. Lo con el objetivo de realizar experimentos de migración e invasión celular en respuesta a concentraciones no citotóxicas de la hormona y evitar así una interpretación errada de los resultados. Esto debido a que ambos procesos podrían ser afectados por la inducción de muerte celular y no por un efecto directo sobre la capacidad de migración e invasión de las células neoplásicas.

Melatonina a una concentración farmacológica de 1 mM indujo citotoxicidad, la cual fue más marcada en esferas derivadas de células CF41.Mg adherentes. El efecto antiproliferativo descrito concuerda con lo informado en diversas publicaciones utilizando

técnicas similares (Ramos *et al.*, 2015; Gelaleti *et al.*, 2016; Goncalves *et al.*, 2016). Sin embargo, la mayor sensibilidad exhibida por esferas fue un resultado no esperable dado que este tipo de células ha mostrado resistencia a drogas relativa a células parentales (Torres *et al.*, 2015).

Diferentes mecanismos antiproliferativos asociados a esta hormona han sido identificados; uno de ellos es la inhibición de precursores de estradiol sintetizados en el ovario, reduciendo así la respuesta mitogénica sobre células tumorales mamarias humanas estradiol-dependientes (Ramos *et al.*, 2015). Por otro lado, melatonina puede modular simultáneamente las vías de señalización intracelular COX-2/PGE2, p300/NF- κ B, y PI3K/Akt y, la activación de la vía intrínseca de apoptosis mediante una regulación positiva de Apaf-1 (Li Ya *et al.*, 2017). Resultados preliminares del laboratorio donde se realizó el presente estudio indican que células CF41.Mg expresan el RE α , por lo que el efecto antiproliferativo observado podría ser mediado por el bloqueo de vías de señalización asociadas a la activación de este receptor.

En estudios realizados en células tumorales obtenidas de cultivos primarios de neoplasias mamarias caninas, se observó que tanto células RE α -positivas como negativas mostraron sensibilidad proliferativa a melatonina, siendo las células RE α -positivas más susceptibles al efecto de la hormona, pues una menor concentración inhibió la proliferación celular (1 mM v/s 10 mM en células no dependientes de estradiol) (Ramos *et al.*, 2015). En otro estudio, se evidenció que melatonina tiene un efecto antiproliferativo sobre células de carcinoma mamario canino CF41.Mg y CMT-U229 a concentraciones de 1 mM, lo cual coincide con observaciones descritas en este estudio (Gelaleti *et al.*, 2016). Resultados similares se han descrito en células de carcinoma mamario humano ER α -positivas (MCF7) y negativas (MDA-MB 231) en respuesta a 1 mM de melatonina (Ferraz *et al.*, 2016).

Como ya se ha mencionado, nuestros experimentos mostraron que células derivadas de esferas fueron más sensibles a melatonina que las células neoplásicas parentales, lo cual implica que las CNT mostraron mayor sensibilidad a la hormona. Esto se contradice con lo publicado en la literatura, ya que se describe que una de las características de este tipo de células es exhibir quimioresistencia a través de diversos mecanismos tales como la

permanencia en un estado de quiescencia, permitiéndoles conservar su capacidad de autorenovación y evadir el efecto citotóxico de drogas con potencial antiproliferativo (Harmes y Di Renzo, 2009).

Estudios publicados recientemente en mamosferas derivadas de células neoplásicas mamarias caninas CMT-U229 y en líneas celulares humanas MCF-7 y MDA-MB231, han reportado que tratamientos con 1 mM de melatonina inducen una disminución de proliferación, crecimiento celular, y en la expresión del $Re\alpha$. Este efecto fue mediado por una disminución en la expresión del factor de transcripción OCT4 codificado por el gen POU5F1, el cual es un factor crítico para autorrenovación, mantención de pluripotencia, carcinogénesis y quimioresistencia (Goncalves *et al.*, 2016, Lopez *et al.*; 2016, Lopez *et al.*; 2017). Este mecanismo podría explicar en parte que melatonina tenga un mayor efecto sobre CNT, dado que estas debiesen expresar mayores niveles de OCT4 que células parentales, aunque sin duda, falta investigar el o los mecanismos involucrados.

Con respecto a migración e invasión celular, concentraciones no citotóxicas de melatonina indujeron una disminución significativa de estos procesos en ambos tipos celulares estudiados. Al respecto, se ha observado en diversos estudios que los niveles plasmáticos de melatonina disminuyen significativamente en pacientes con cáncer y metástasis, en comparación con aquellos sin metástasis (Mao *et al.*, 2010). Concentraciones fisiológicas de melatonina de 1 nM (correspondiente a los valores del peak nocturno en humanos) inhibió la capacidad invasiva *in vitro* de células MCF7 estimuladas con estradiol, no evidenciándose efectos a concentraciones subfisiológicas de 0.1 pM ni a concentraciones farmacológicas de 10 μ M (Cos *et al.*, 1998). Las observaciones anteriores han sido extendidas posteriormente a otros tipos celulares de cáncer mamario (Mao *et al.*, 2010). Adicionalmente, melatonina incrementa la expresión de proteínas de adhesión como E-cadherina e integrina β 1, lo que sugiere que el efecto anti-invasivo podría estar mediado por el efecto de la hormona sobre estas moléculas (Cos *et al.*, 1998). Melatonina tiene la capacidad de revertir algunas características del proceso de transición epitelio-mesénquima, el cual promueve motilidad e invasión celular y, se encuentra activado en CNT. Así, la hormona aumenta la expresión de la molécula de adhesión E-cadherina y disminuye la expresión de biomarcadores mesenquimáticos N-cadherina y vimentina en células de

carcinoma mamario canino (Goncalves et al., 2016). Este efecto podría inducir una modulación negativa sobre la capacidad de invasión tumoral, tal como lo observado por los grupos de investigación de Cos y Mao (Cos et al., 1998; Mao et al., 2010). Es interesante considerar que ambos grupos recién mencionados observaron efectos anti-invasivos *in vitro* a concentraciones menores a las utilizadas en esta tesis. Sin embargo, sus experimentos fueron realizados por tiempos mayores (4 y 6 días) a los analizados en nuestro estudio. Una posible explicación a esta discordancia podría ser el potencial efecto tiempo-dependiente de melatonina.

Otras de las vías por las cuales melatonina podría disminuir la invasión de células neoplásicas mamarias sería a través de una regulación negativa de la vía señalización de P38 y una inhibición de la expresión y actividad de las metaloproteinasas de matriz 2 y 9, ambas relacionadas con degradación de matriz extracelular y altamente expresadas en neoplasias de alto grado histológico facilitando la migración e invasión de células neoplásicas (Coronato et al., 2012).

El presente estudio pretendió aportar con el estudio del efecto de melatonina en células de carcinoma mamario canino y esferas derivadas de ellas. Si bien los resultados concuerdan con la mayoría de los estudios publicados sobre el tema, sería interesante ampliar estos a otras líneas celulares caninas, y realizar los experimentos en paralelo con líneas celulares no neoplásicas que posean alta capacidad proliferativa para evaluar la selectividad de melatonina. Por otro lado, también se podrían realizar experimentos de viabilidad, invasión y migración utilizando melatonina como adjuvante a otras drogas antineoplásicas que presentan poca selectividad, de modo de evaluar potenciales efectos quimiosensibilizadores de esta hormona (Aslan et al., 2015; Li et al., 2017; Onseong et al., 2017). Los resultados expuestos aquí abren la puerta al uso de melatonina como un nuevo agente terapéutico sobre tumores mamarios de alto grado de malignidad, los cuales tienden a tener una mayor presencia de CNT, y en consecuencia, una alta probabilidad de quimioresistencia y desarrollo de metástasis.

Se concluye de este estudio que melatonina tiene efectos antiproliferativos y anti-invasivos sobre células de carcinoma mamario canino CF41.Mg, siendo las esferas

derivadas de células parentales de esta línea celular más sensibles a los efectos de la hormona.

BIBLIOGRAFIA

ALONSO, C.; GONZÁLEZ, A.; MARTÍNEZ, C.; MENÉNDEZ, J.; GÓMEZ, J.; GARCÍA, A.; COS, S. 2016. Melatonin enhancement of the radiosensitivity of human breast cancer cells is associated with the modulation of proteins involved in estrogen biosynthesis. *Cancer Lett.* 370:145–152.

ASLAN, P.; NAZIROG, M.; SUAT, I.; CIG, B. 2015. Synergic Effects of Doxorubicin and Melatonin on Apoptosis and Mitochondrial Oxidative Stress in MCF-7 Breast Cancer Cells: Involvement of TRPV1 Channels. *J Membrane Biol.* 1-12.

CHARAFE, E.; MONVILLE, F.; GINESTIER, C.; DONTU, G.; BIRNBAUM, D.; WICHA, M. 2008. Cancer Stem Cells in Breast Current Opinion and Future Challenges. *Pathobiology.* 75(2):75-84.

COS, S.; FERNANDEZ, R.; GUEZMES, A.; SANCHEZ-BARCELO. 1998. Influence of Melatonin on Invasive and Metastatic Properties of MCF-7 Human Breast Cancer Cells. *Cancer Res* 58:4383-4390.

COS, S.; SANCHEZ BARCELO, E.J. 2000. Melatonin, experimental basis for a possible application in breast cancer prevention and treatment. *Histol Histopathol.* 15:637-647.

COS, S.; SANCHEZ BARCELO, E.J.; MEDIAVILLA, M.D. 2003. Melatonin and mammary cancer: a short review. *Endocr-relat Cancer.* 10:153–159.

CORONATO, S.; LAGUEN, G.; DI GIROLAMO, V. 2012. Rol de las metaloproteinasas y sus inhibidores en patología tumoral. *Medicina (B. Aires).* 72: 495-502.

DI BELLA, G.; MASCIA, F.; GUALANO, L.; DI BELLA, L. 2013. Melatonin Anticancer Effects: Review. *Int. J. Mol. Sci.* 14:2410-2430.

FERRAZ, T.; SYED, A.; BOTTARO, G.; CARVLHO, L.; GOBBE, M.; VICTORASSO, B.; ISKANDER, A.; ADARSH, V.; BENEDICK V.; ALVES, V.; GARCIA, J.; PIRES DE CAMPOS, D. 2016. Melatonin decreases breast cancer

metastasis by modulating Rho-associated kinase protein-1 expression. *J. Pineal Res.* 60:3–15

GONCALVES, N.; COLOMBO, J.; RAMOS, J.; BOTTARO, G.; GOBBE, M.; MARTINS, N.; HELLMEN, E.; DE FREITAS, C.; OLIANI, S.; PIRES DE CAMPO, D. 2016. Effect of melatonin in epithelial mesenchymal transition markers and invasive properties of breast cancer stem cells of canine and human cell lines. *PLoS ONE* 11(3):1-16.

GELALETI, G.; BORIN T.; MASCHINO-SIGNORINI, L.; MOSCHETTA, M.; HELLMÉN, E. 2016. Melatonin and IL-25 modulate apoptosis and angiogenesis mediators in metastatic (CF-41) and non-metastatic (CMT-U229) canine mammary tumour cells. *Vet. Comp. Oncol.* 1-13.

HARMES, D.; DI RENZO, J. 2009. Cell quiescence in mammary stem cells and breast tumor stem cells: got testable hypotheses? *J. Mammary Gland. Biol. Neoplasia.* 14(1):19-27.

HILL, S.; BELANCIO, V.; DAUCHY, R.; XIANG, S.; BRIMER, S.; MAO, L.; HAUCH, A.; LUNDBERG, P.; SUMMERS, W.; YUAN, L. ; FRASCH, T.; BLASK, D. 2015. Melatonin: an inhibitor of breast cancer. *Endocr-relat Cancer.* 22(3):183.204.

KALLURI, R.; WEINBERG, A. 2009. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J. Clin. Invest.* 119(6):1420-1428.

LEMAN, E.; SISKEN, B.; ZIMMER, S.; ANDERSON, K. 2001. Studies of the Interactions Between Melatonin and 2 Hz, 0.3mT PEMF on the Proliferation and Invasion of Human Breast Cancer Cells. *Bioelectromagnetics.* 22:178-184.

LI, Y.; LI, S.; ZHOU, Y.; MENG, X.; ZHANG, J.; XU, D.; LI, H. 2017. Melatonin for the prevention and treatment of cancer. *Oncotarget.* 24(8):39896-39921.

LOPES, J.; ARNOSTI, D.; TROSKO, J.; TAI, M.; ZUCCARI, D. 2016. Melatonin decreases estrogen receptor binding to estrogen response elements sites on the OCT4 gene in human breast cancer stem cells. *Genes Cancer.* 7(5-6):209-17.

LOPES, J.; DA SILVA, M.; DE MEDEIROS, F.; DE CAMPOS, D. 2017. Evaluation of melatonin effect on human breast cancer stem cells using a three dimensional growth method of mammospheres. *Anticancer Agents Med. Chem.* 17(7):961-965.

LUZÍA, E.; HONRIO-FRANCA, A.; TRINIDADE DA SILVA, R.; FERRERIRA, C.; SOUZA, C.; PILLA, F. 2015. The Effect of Melatonin Adsorbed to Polyethylene Glycol Microspheres on the Survival of MCF-7 Cells. *Neuroimmunomodulation.* 23:27–32.

MAO, L.; YUAN, L; SLAKEY, L.; JONES, F.; BUROW.; HILL, S. 2010. Inhibition of breast cancer cell invasion by melatonin is mediated through regulation of the p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathway. *Breast Cancer Res.* 12:1-14.

MICHISHITA, M.; AKIYOSHI, R.; YOSHIMURA, H.; KATSUMOTO, T.; ICHIKAWA, H.; OHKUSU-TSUKADA, K.; NAKAGAWA, T.; SASAKI, N.; TAKAHASHI, K. 2011. Characterization of spheres derived from canine mammary gland adenocarcinoma cell lines. *Vet. Sci.* 91: 254-260.

NOOSHINFARI, E.; SAFAROGHLI, A.; DAVOOD, B.; ESMAEIL, M. 2016. Melatonin, an inhibitory agent in breast cancer. *Breast Cancer Res.* 1:10.

ONSENG, K.; PRATHEEPAWANIT, N.; PHARM, J.; KHUAYJARERNPANISHK, T.; SUBONGKOT, S.; PRIPREM, A.; HURST, C.; JOHNS, J. 2017. Beneficial Effects of Adjuvant Melatonin in Minimizing Oral Mucositis Complications in Head and Neck Cancer Patients Receiving Concurrent Chemoradiation. *J Altern Complement. Med.* 0:1-7.

RAMOS, J.; BAZELA, L.; VICTORASSO, B.; GOBBE, M.; CARVALHO, L.; RODRIGUEZ, G.; BOTTARO, G.; PIRES.; D. 2015. Evaluation of melatonin treatment in primary culture of canine mammary tumors. *Oncol rep.* 33:311-319.

ROA, I.; VILLASECA, M.; ARAYA, J.; ROA, J.; DE ARETXABALA, X.; IBACACHE, G.; GARCÍA, M. 2001. Expresión de CD44 (HCAM) en el carcinoma subseroso de la vesícula biliar. *Rev. Méd. Chile* 129(7): 727-734.

SALAS, Y.; MARQUEZ, A.; DIAZ, D.; ROMERO, L. 2015. Epidemiological Study of Mammary Tumors in Female Dogs Diagnosed during the Period 2002-2012: A Growing Animal Health Problem. 2015. *PLoS ONE* 10(5):1-15.

SONTAS, B. H.; OZYOGURTCU, H.; GUREL, A.; EKICI, H. 2009. Evaluation of clinical and pathological characteristics of 155 canines with mammary tumours: a retrospective study. *Arch. Med Vet.* 41:53-59.

SORENMO, U.; RASOTTO, R.; ZAPPULLI, V.; GOLDSCHMIDT, M. H. 2011. Development, Anatomy, Histology, Lymphatic Drainage, Clinical Features, and Cell Differentiation Markers of Canine Mammary Gland Neoplasms. *Vet Pathol.* 48(1):85-97.

TORRES, C.; OLIVARES, A.; STOORE, C. 2015. Simvastatin exhibits antiproliferative effects on spheres derived from canine mammary carcinoma cells. *Oncol Rep.* 33:2235-2244.

TOUITOU, Y.; REINBERG, A.; TOUITOU, D. 2017. Association between light at night, melatonin secretion, sleep deprivation, and the internal clock : health impacts and mechanisms of circadian disruption. *Life Sci J.* 1-46.