

**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS  
ESCUELA DE POSTGRADO Y POSTÍTULO



**EFECTO DE MELATONINA SOBRE LA  
QUIMIORRESISTENCIA EJERCIDA POR CÉLULAS  
NEOPLÁSICAS TRONCALES DERIVADAS DE CARCINOMA  
MAMARIO CANINO**

**DANIA FRANCISCA CATALDO SILVA**

Proyecto de tesis para optar al título profesional de Médico Veterinario y al grado académico de Magíster en Ciencias Animales y Veterinarias.

PROFESOR GUIA: Cristian Torres Mendoza

Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias y  
Pecuarias, Departamento de Ciencias Clínicas

FONDECYT 1201441

SANTIAGO - CHILE  
2023

# **INFORME APROBACIÓN TESIS DE MAGISTER**

## **FUENTES DE FINANCIAMIENTO Y DEPARTAMENTO**

El presente trabajo de tesis fue financiado por el proyecto Fondecyt 1201441, y se llevó a cabo en el Laboratorio centralizado de investigación veterinaria (LaCIV) y en el laboratorio de Biomedicina y Medicina Regenerativa, del Departamento de Ciencias Clínicas de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile.

## **BIOGRAFÍA**

Mi nombre es Dania Francisca Cataldo Silva, nací el 2 de febrero de 1996 en la ciudad de Santiago, Chile. Mi familia se compone de mis dos padres y mi hermano mayor. Desde temprana edad tuve contacto con animales, pues mi abuela paterna vivía en el campo (comuna de Putaendo), tenía cabras, ovejas, gallinas entre otros, pase gran parte de mi infancia en ese lugar aprendiendo sus diferentes cuidados.

Cursé mi enseñanza básica en diferentes instituciones, inicialmente estudié en el colegio Francisco Arriarán, ubicado en Santiago, hasta segundo básico, luego mis padres decidieron mudarse a su ciudad de origen, San Felipe, ubicada en la V región. Allí terminé mi enseñanza básica en la escuela Marie Poussepin en la comuna de Putaendo, posteriormente realicé mi enseñanza media en el colegio Santa Juana de Arco, egresando el año 2013.

El 2015 ingreso a estudiar a la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, siguiendo mis anhelos. Durante el pregrado fui ayudante de las asignaturas de Patología II (Fisiopatología) y Patología toxicológica, egresando el 2019.

El 2020 entro al programa de Magíster en Ciencias Animales y Veterinarias de la Universidad de Chile, motivada a conseguir mi meta de desempeñarme en investigación y docencia en el área de Patología.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi abuela paterna, que ya no está conmigo, y a mi padre por apoyarme y acompañarme durante esta maravillosa carrera. A mis amigos, que me ayudaron a nunca rendirme y a seguir adelante. A todos mis compañeros y amigos de laboratorio, los cuales siempre me brindaron su apoyo y ayuda durante todo el proceso de tesis, principalmente a Liliana Ortiz, mi mentora.

Finalmente, a mí misma por creer en mí, por no tener días libres, por nunca renunciar y por haber realizado un gran trabajo.

# ÍNDICE DE CONTENIDOS

INTRODUCCIÓN .....	1
1. Revisión Bibliográfica.....	3
1.1 Cáncer de mama canino.....	3
1.2 Células neoplásicas troncales .....	6
1.3 Melatonina .....	9
2. HIPOTESIS.....	13
3. OBJETIVOS.....	13
3.1 Objetivo general.....	13
3.2 Objetivos específicos.....	13
4. MATERIALES Y MÉTODOS .....	14
4.1 Cultivo celular .....	14
4.2 Cultivo de esferas .....	15
Objetivo 1 .....	15
4.3 Ensayo de viabilidad celular: Determinación óptima de Mitoxantrona .....	15
4.4 Ensayo de viabilidad celular .....	16
Objetivo 2 .....	17
4.5 Expresión de MDR1 y ABCG2 en líneas celulares expuestas a melatonina .....	17
4.6 Expresión de genes MDR1 y ABCG2 en líneas celulares expuestas a melatonina .....	18
4.7 Expresión de genes MT1 y MT2 en ambas líneas celulares.....	19
4.8 Análisis de los datos .....	19
5. RESULTADOS .....	20
Objetivo 1 .....	20
Objetivo 2 .....	26
6. Discusión .....	30
7. CONCLUSIONES .....	37
8. BIBLIOGRAFÍA.....	38
9. MATERIAL COMPLEMENTARIO.....	48

## ÍNDICE DE AYUDAS ILUSTRATIVAS

Tabla 1. Grupos experimentales en ensayos de viabilidad celular. ....	17
Tabla 2. Partidores utilizados para el análisis de expresión génica mediante qRT-PCR .....	48
Tabla 3. Partidores utilizados para el análisis de expresión génica mediante qRT-PCR. ....	48
Figura 1. Viabilidad de esferas-CF41.Mg en respuesta a distintas concentraciones de mitoxantrona (1-1000 nM) por 48 y 72 horas. ....	21
Figura 2. Viabilidad de esferas-REM 134 esferas en respuesta a distintas concentraciones de mitoxantrona (1-1000 nM) por 48 y 72 horas. ....	22
Figura 3. Viabilidad celular de esferas-CF41.Mg expuestas a doxorubicina 1 nM y distintas concentraciones de melatonina (0,1-1 mM) por 48 y 72 horas. ....	23
Figura 4. Viabilidad de esferas-CF41.Mg expuestas a mitoxantrona y distintas concentraciones de melatonina (0,1-1 mM) por 48 y 72 horas. ....	24
Figura 5. Viabilidad de esferas-REM 134 expuestas a doxorubicina 1 nM y melatonina 1 mM por 48 y 72 horas. ....	25
Figura 6. Viabilidad de esferas-REM 134 esferas expuestas a mitoxantrona y melatonina 1 mM por 48 y 72 horas. ....	26
Figura 7. Expresión relativa de gen ABCG2 en esferas CF41.Mg(a) y REM 134(b), respectivamente en respuesta a melatonina (0,1 - 1 mM). ....	27
Figura 8. Expresión relativa de gen MDR1 en esferas CF41.Mg(a) y REM 134(b), respectivamente en respuesta a melatonina (0,1 - 1 mM). ....	28
Figura 9. Expresión proteica ABCG2 en esferas CF41.Mg en respuesta a melatonina (0,1 - 1 mM). ....	29

Figura 10. Expresión proteica ABCG2 en esferas REM 134 en respuesta a melatonina (0,1 - 1 mM)..... 29

## RESUMEN

El cáncer mamario es una enfermedad frecuente en hembras caninas, donde una alta proporción de casos corresponden a tumores malignos que pueden exhibir resistencia a drogas. Dentro del microambiente tumoral mamario, existe una subpoblación celular las células neoplásicas troncales (CSC), que son capaces de formar esferas *in vitro* y resistir tratamientos antitumorales, explicando en parte la recurrencia de algunos tumores. Previamente, se ha descrito que esferas derivadas de células de carcinoma mamario canino CF41.Mg y REM 134 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. El objetivo de este estudio fue analizar el efecto de melatonina sobre la quimiorresistencia que exhiben células neoplásicas troncales derivadas de carcinoma mamario canino a drogas citotóxicas como doxorrubicina y mitoxantrona. Se cultivaron células CF41.Mg y REM 134 en DMEM alto en glucosa suplementado con suero fetal bovino y L-glutamina. Las esferas se cultivaron en placas de ultra-baja adherencia en medio DMEM/F12 sin suero fetal bovino y con diferentes factores de crecimiento. Se estudió la viabilidad de células derivadas de esferas (reducción de MTS) en presencia de melatonina (0,1 o 1 mM), doxorrubicina y mitoxantrona. Además, se analizó la expresión génica (RT-qPCR) y proteica (Western blot) de las bombas de multirresistencia MDR1 y ABCG2 en presencia de melatonina. Melatonina 1 mM ( $P < 0.0001$ ) redujo la viabilidad únicamente en esferas CF41.Mg, no induciendo un efecto aditivo al co-incubarse con las drogas citotóxicas. En ambas líneas celulares la expresión génica relativa de ABCG2 y MDR1 se vio disminuida en respuesta a la hormona ( $P < 0.001$ ), lo cual también fue observado preliminarmente a nivel de expresión proteica. Estos resultados indican que melatonina modula negativamente la expresión de MDR1 y ABCG2 en esferas derivadas de células CF41.Mg, efectos que no son suficientes para contrarrestar la resistencia a doxorrubicina y mitoxantrona.

Palabras clave: Melatonina, Carcinoma mamario canino, células CF41.Mg, células REM 134, células neoplásicas troncales.

## ABSTRACT

Breast cancer is a frequent disease in female dogs, where a high proportion of cases correspond to malignant tumors that may exhibit resistance to drugs. Within the mammary tumor microenvironment, there is a cellular subpopulation, cancer stem cells (CSCs), which are capable of forming spheres *in vitro* and resisting anti-tumor treatments, partly explaining the recurrence of some tumors. Previously, it has been described that spheres derived from canine mammary carcinoma cells CF41.Mg and REM 134 exhibit stemness characteristics. Melatonin has shown antitumor effects on mammary tumor cells; however, its effects have been poorly evaluated in canine mammary CSCs. The aim of this study was to analyze the effect of melatonin on the chemoresistance exhibited by stem-like neoplastic cells derived from canine mammary carcinoma to cytotoxic drugs such as doxorubicin and mitoxantrone. CF41.Mg and REM 134 cells were cultured in high-glucose DMEM supplemented with fetal bovine serum and L-glutamine. The spheres were cultured in ultra-low attachment plates in DMEM/F12 medium without fetal bovine serum and with different growth factors. The viability of sphere-derived cells (MTS reduction) was studied in the presence of melatonin (0.1 or 1 mM), doxorubicin, and mitoxantrone. In addition, the gene expression (RT-qPCR) and protein expression (Western blot) of the multidrug resistance genes MDR1 and ABCG2 were analyzed in the presence of melatonin. Melatonin 1 mM ( $P < 0.0001$ ) reduced viability only in CF41.Mg spheres, without inducing an additive effect when co-incubated with cytotoxic drugs. In both cell lines, the relative gene expression of ABCG2 and MDR1 was decreased in response to the hormone ( $P < 0.001$ ), which was also observed preliminarily at the protein expression level. These results indicate that melatonin negatively modulates the expression of MDR1 and ABCG2 in spheres derived from CF41.Mg cells, effects that are not sufficient to counteract resistance to doxorubicin and mitoxantrone.

Keywords: Melatonin, Canine mammary carcinoma, CF41.Mg cells, REM 134 cells, cancer stem-like c

## INTRODUCCIÓN

La neoplasia o cáncer mamario canino (CMC) es de presentación frecuente en Medicina Veterinaria, representando más del 50% de todos los cánceres que afectan a hembras caninas (Flores y Cattaneo, 2001; Salas *et al.*, 2015; Iturriaga *et al.*, 2017). Entre el 50-60% de los CMC se clasifican histológicamente como malignos, lo que implica capacidad invasiva local y el potencial de inducir metástasis. Su diagnóstico tardío puede comprometer el tratamiento y reducir la tasa de supervivencia de los animales afectados (Flores y Cattaneo, 2001; Pinho *et al.*, 2012; Salas *et al.*, 2015; Michishita, 2020).

La carcinogénesis mamaria se relaciona con diversos factores de riesgo, donde destaca la exposición a hormonas sexuales. Así, tumores de baja malignidad muestran una dependencia a estradiol y progesterona (medida por la presencia de sus receptores específicos), sin embargo, aquellos tumores que carecen de estos tienen un peor pronóstico (Pinho *et al.*, 2012; Tran *et al.*, 2016). El tratamiento actual de CMC consiste en la extirpación quirúrgica del tumor asociada a quimioterapia en casos de alta malignidad (Flores y Cattaneo, 2001; Hermo *et al.*, 2005; Fulawka *et al.*, 2014; Michishita, 2020).

Las células neoplásicas troncales corresponden a una subpoblación celular presente en tumores mamarios y que exhiben variadas características como autorrenovación, quimio y radio-resistencia, capacidad invasiva e iniciadora de tumores (Yu *et al.*, 2012; Klopfleisch *et al.*, 2016; Rybicka y Król, 2016; Serrano *et al.*, 2019). Lo anterior, podría explicar, al menos en parte, la capacidad de ciertos tumores de desarrollar metástasis y reaparición local después del tratamiento. En este contexto es imperativo la búsqueda de drogas que ejerzan un efecto inhibitorio sobre estas células (Li y Zhou, 2011; Yu *et al.*, 2012; Lopez *et al.*, 2015; Torres *et al.*, 2015; Gonçalves *et al.*, 2016; Iturriaga *et al.*, 2017).

Melatonina es una hormona cronobiológica, que ha mostrado efectos antitumorales, ampliamente estudiados en cáncer de mama humano (Klopfleisch

*et al.*, 2011; Di bella *et al.*, 2013; Jardim-Perassi *et al.*, 2014; Koşar *et al.*, 2016). Así, pacientes tratados mostraron mejores tasas de remisión, mayor supervivencia general y, al mismo tiempo, menos efectos secundarios relacionados con la quimioterapia (Kong *et al.*, 2020; Pistoli *et al.*, 2021). Sin embargo, en Medicina Veterinaria y en particular en CMC sus efectos aún no están completamente dilucidados. Datos recientes han mostrado que esta hormona modularía negativamente a células neoplásicas troncales mamarias caninas, lo cual podría tener un impacto sobre la biología de la enfermedad (Li y Zhou, 2011; Yu *et al.*, 2012).

El objetivo de este estudio fue analizar el efecto de melatonina sobre la quimiorresistencia que exhiben células neoplásicas troncales derivadas de células de carcinoma mamario a drogas citotóxicas como doxorrubicina y mitoxantrona.

# 1. Revisión Bibliográfica

## 1.1 Cáncer de mama canino

El carcinoma mamario canino (CMC) es una enfermedad genética que representa más del 50% de todos los cánceres que afectan a hembras caninas. Alrededor del 50-60% de los tumores mamarios se clasifican histológicamente como malignos, los cuales en su gran mayoría corresponden a carcinomas (Flores y Cattaneo, 2001; Salas *et al.*, 2015; Iturriaga *et al.*, 2017; Michishita, 2020). Tiene diversos factores de riesgo, como la edad, con una mediana de presentación de 9-10 años, la condición reproductiva, donde la ovariectomía antes de la pubertad reduce significativamente el riesgo, no así cuando la esterilización ocurre después del segundo año de vida, obesidad a edad temprana, entre otros factores (Pinho *et al.*, 2012; Lopez *et al.*, 2015; Iturriaga *et al.*, 2017).

La carcinogénesis mamaria es multifactorial y se caracteriza por involucrar los tres mecanismos clásicos de iniciación, promoción, y progresión (Torres *et al.*, 2009; Tran *et al.*, 2016). La iniciación consiste en la inducción de mutaciones en protooncogenes o genes supresores de tumores específicos, alteraciones que gatillan cambios funcionales que sobrepasan los mecanismos de regulación de la proliferación y supervivencia celular. Un ejemplo de lo recién descrito es la mutación en el gen supresor de tumores p53, lo cual puede ocurrir en CMC, asociándose con un mal pronóstico de supervivencia (Torres *et al.*, 2009; Pinho *et al.*, 2012). Luego, es fundamental que la célula transformada se exponga a un microambiente promotor, el que promueve proliferación celular y posteriormente inestabilidad genómica, donde se generan nuevas mutaciones, induciendo heterogeneidad genética y fenotípica. Finalmente, diversos mecanismos favorecerán la progresión tumoral, tanto local como sistémicamente (Torres *et al.*, 2009; Tran *et al.*, 2016; Rybicka y Król, 2016; Iturriaga *et al.*, 2017; Michishita, 2020).

El análisis histopatológico es fundamental para diagnosticar CMCs, correspondiendo la gran mayoría de los tumores a carcinomas. Adicionalmente, es relevante considerar al grado histológico que tiene relación directa con el grado de diferenciación tumoral. Estos son grado I (bajo), II (intermedio) y III (alto), donde el grado I es más diferenciado y de comportamiento clínico-patológico menos maligno, mientras que el grado III muestra escasa diferenciación, con un comportamiento más agresivo (Goldschmidt *et al.*, 2011; Cannon *et al.*, 2015).

Alrededor del 50% de las CMC malignas expresan el receptor de estradiol  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) y receptor de progesterona (PR), los cuales están presentes en más del 70% de los CMC benignos, así como también en el tejido mamario normal (Flores y Cattaneo, 2001; Li y Zhou, 2011; Pinho *et al.*, 2012; Iturriaga *et al.*, 2017). Los tumores que no expresan estos receptores son más agresivos, anaplásicos y con alta capacidad de generar metástasis, proceso que comprende múltiples etapas, como el aumento de la proliferación y crecimiento tumoral, transición epitelial a mesenquimal (EMT), invasión e intravasación (migración transendotelial de células neoplásicas a los vasos), extravasación y colonización metastásica (Arenas *et al.*, 2016; Litviakov *et al.*, 2020; Maroufi *et al.*, 2020a; Maroufi *et al.*, 2020b; Michishita, 2020).

Desde el punto de vista terapéutico, la cirugía es de elección para tumores localizados (Flores y Cattaneo, 2001; Hermo *et al.*, 2005; Fulawka *et al.*, 2014; Rybicka y Król, 2016). En ejemplares reproductivamente enteras, la ovariectomía realizada en conjunto con la remoción del tumor mamario prolonga el tiempo libre de enfermedad tumoral en pacientes con CMC maligno (Pinho *et al.*, 2012; Fulawka *et al.*, 2014; Lopez *et al.*, 2015; Salas *et al.*, 2015). La quimioterapia adyuvante podría ralentizar el avance sistémico de aquellos CMC con alto grado de malignidad, prolongando significativamente el intervalo

libre de enfermedad y la sobrevida total, sin embargo, no es curativa (Flores y Cattaneo, 2001; Hasanabady y Kalalinia, 2016; Wang *et al.*, 2019).

Las drogas quimioterápicas más utilizadas en el control clínico de esta enfermedad pertenecen a la familia de las antraciclinas, como Doxorubicina y Mitoxantrona. Estos fármacos son importantes sustratos de las proteínas MDR1 (ABCB1) y ABCG2, transportadores de la familia ABC (del inglés “*ATP-binding cassette*”), que están ubicados en la membrana plasmática y participan en el metabolismo de xenobióticos. Además, diversos reportes han demostrado su participación en el desarrollo de multirresistencia a drogas contra el cáncer. Ambas proteínas se expresan mayormente en CMC malignos, lo que se asocia positivamente a un fenotipo histológico más agresivo y quimiorresistente (Flores y Cattaneo, 2001; Honscha *et al.*, 2009; Pang *et al.*, 2011; Rybicka y Król, 2016; Cruz *et al.*, 2018).

El desarrollo de quimiorresistencia en tumores puede ser intrínseca, y otros, que inicialmente son quimiosensibles, pueden adquirir resistencia durante la terapia (resistencia adquirida) (Hasanabady y Kalalinia, 2016; Cruz *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2019). Los fármacos quimioterapéuticos son citotóxicos y de acción no selectiva, es decir, inducen daño al ADN en células tanto neoplásicas como no neoplásicas, aumentando las probabilidades de aparición de nuevas mutaciones, mecanismo que promueve la adquisición de quimiorresistencia (Huang *et al.*, 2015; Pang y Argyle, 2015; Hasanabady y Kalalinia, 2016). Además, subpoblaciones celulares tumorales resistentes preexistentes, son responsables de la recurrencia después del tratamiento quimioterápico (Flores y Cattaneo, 2001; Hasanabady y Kalalinia, 2016).

El plan de tratamiento farmacológico debe tener en cuenta la prevención o el retraso de la farmacorresistencia adquirida (Hasanabady y Kalalinia, 2016), sin embargo, las opciones terapéuticas actuales son limitadas. Es por ello que la búsqueda y desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas en CMC es

fundamental para contrarrestar la quimio-resistencia y aumentar así, la supervivencia de los pacientes.

## 1.2 Células neoplásicas troncales

Las células neoplásicas troncales (CSCs) corresponden a una subpoblación celular presente en una pequeña proporción en tumores sólidos con capacidad de iniciación de tumores, invasión, autorrenovación (división celular asimétrica), diferenciación en múltiples linajes celulares y resistencia a la quimio y radioterapia (Im *et al.*, 2015; Lopes *et al.*, 2015; Klopffleisch *et al.*, 2016; Serrano *et al.*, 2019). Estas células expresan diversos marcadores de superficie celular como CD44, CD133, molécula de adhesión de células epiteliales (EpCAM) y aldehído deshidrogenasa (ALDH), lo que ha permitido aislarlas y caracterizarlas (Lopes *et al.*, 2015; Gonçalves *et al.*, 2016; Klopffleisch *et al.*, 2016). El fenotipo CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-bajo</sup> es característico de CSCs mamarias humanas y caninas, observándose con mayor frecuencia en tumores de alto grado y metástasis linfonodulares, indicando un mal pronóstico. La glicoproteína CD24 se identificó con mayor frecuencia en neoplasias de bajo grado, mientras que CD44 se expresa en tumores de alto grado histológico (Korkaya *et al.*, 2011; Di Bella *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2014; De Faria *et al.*, 2020; Maroufi *et al.*, 2020a; Maroufi *et al.*, 2020b).

La principal forma de aislar este tipo de células es mediante el establecimiento *in vitro* de esferas, donde se genera un cultivo celular en ausencia de anclaje y de suero fetal bovino (Lopes *et al.*, 2015). Esferas derivadas de células de carcinoma mamario canino REM134 y CF41.Mg exhiben un fenotipo troncal, lo que incluye quimiorresistencia relativa a doxorubicina y paclitaxel-doxorubicina respectivamente y una conducta invasiva, siendo un buen modelo de estudio in

vitro de tumores mamarios de alto grado histológico (Huang *et al.*, 2015; Lopes *et al.*, 2015).

Se ha descrito una asociación positiva entre la presencia de CSCs y la activación del proceso de transición epitelio-mesénquima (EMT), donde las células adquieren fenotipos asociados con latencia y troncalidad, pierden uniones intercelulares propias de las células epiteliales, adquieren una morfología mesenquimal, expresan marcadores mesenquimales como N-cadherina y vimentina, pierden su polaridad celular basal-apical y exhiben capacidad de migración e invasión a tejidos contiguos. Esta transición es mediada por factores transcripcionales claves como SNAIL y SLUG, ambos relacionados con la recurrencia del tumor, progresión metastásica y también pueden actuar como moduladores positivos de CSCs (Di Bella *et al.*, 2013; Lopes *et al.*, 2015; Klopffleisch *et al.*, 2016; Serrano *et al.*, 2019; Chengizkhan *et al.*, 2020; Gooding y Schiemann, 2020; Zhang *et al.*, 2022). La EMT es un proceso reversible, por lo tanto, CSCs pueden transformarse en células de tipo epitelial después de llegar a órganos distantes formando nuevos tumores (Chengizkhan *et al.*, 2020; Gooding y Schiemann, 2020; Zhang *et al.*, 2022).

Las CSCs desarrollan quimiorresistencia a través de diversos mecanismos celulares y moleculares, como mutaciones genéticas y/o cambios epigenéticos, eflujo de medicamentos por alta expresión de genes de multirresistencia (MDR), quiescencia, entre otros (Honscha *et al.*, 2009; Pang *et al.*, 2011; Hasanabady y Kalalinia, 2016; Zhao *et al.*, 2016; Cruz *et al.*, 2018; Serrano *et al.*, 2019).

MDR1 (ABCB1) y ABCG2 están involucrados en el aumento del eflujo de drogas quimioterápicas, lo cual conduce a una disminución de la concentración intracelular de estas, favoreciendo la resistencia a la quimioterapia (Hasanabady y Kalalinia, 2016; Cruz *et al.*, 2018). MDR1 es una proteína de membrana que posee múltiples sitios de unión a fármacos, lo cual le permite bombear una amplia variedad de sustratos hacia el espacio extracelular, como Doxorubicina,

Paclitaxel y otros. ABCG2 por su parte, es el principal transportador asociado al eflujo de fármacos en la resistencia asociada al cáncer de mama en humanos, donde puede transportar fármacos quimioterapéuticos como Mitoxantrona y otras Antraciclina (Liu *et al.*, 2005; Honscha *et al.*, 2009; Michishita *et al.*, 2011; Pang *et al.*, 2011; Cruz *et al.*, 2018;).

Alteraciones epigenéticas (independientes de la transcripción génica) también contribuyen a la resistencia a medicamentos a través de la metilación del ADN, modificación de histonas, remodelación de la cromatina y cambios en la expresión de microARN. Además, dichas alteraciones cumplen un rol relevante en el desarrollo de otros mecanismos de resistencia, como el aumento de la excreción celular de fármacos (Hasanabady y Kalalinia, 2016; Cruz *et al.*, 2018). Los microARN (miARN) son pequeños ARN endógenos no codificantes, que regulan la resistencia a drogas mediante la modulación de la expresión génica, a nivel postranscripcional, de transcritos asociados con EMT y transportadores de la familia ABC (Pang *et al.*, 2011; Hasanabady y Kalalinia, 2016). Por ejemplo, se ha descrito que miR-200c regula negativamente a ABCG2, y la EMT, reteniendo el fenotipo epitelial; mientras que miR-27a ejerce una regulación positiva sobre estos procesos. Además, los miARN modulan la quimiorresistencia a través de mecanismos que incluyen la regulación de la apoptosis y autofagia, el control de la biotransformación de quimioterápicos y la reparación del ADN (Honscha *et al.*, 2009; Pang y Argyle, 2015; Hasanabady y Kalalinia, 2016).

Diversas vías de señalización intracelular y factores de transcripción (FT) se activan en CSCs mamarias y se han relacionado con la regulación de su plasticidad, heterogeneidad y malignidad, incluyendo las vías Wnt/ $\beta$ -catenina, Notch, y Hedgehog; y los FT como SOX2, OCT4 y NANOG, involucrados en la autorrenovación y pluripotencia de CSCs mamarias (Liu *et al.*, 2005; Gonçalves *et al.*, 2016; Zhan *et al.*, 2017; Timmermans-Sprang *et al.*, 2019; Chengizkhan *et al.*, 2020; Gooding y Schiemann, 2020; Li *et al.*, 2021; Zhang *et al.*, 2022a; Zhang

*et al.*, 2022b). La vía Wnt/ $\beta$ -catenina o Wnt canónica regula funciones celulares como supervivencia, diferenciación y migración celular, sensibilidad a fármacos y metástasis, entre otros (Lopes *et al.*, 2015; Klopffleisch *et al.*, 2016; Romo, 2016; Timmermans-Sprang *et al.*, 2019; Maroufi *et al.*, 2020a; Maroufi *et al.*, 2020b). Una vez activada, promueve la expresión de varios genes, entre ellos MDR1, ABCG2, CD44 y OCT4, involucrados en la farmacorresistencia de CSCs (Liu *et al.*, 2005; Di bella *et al.*, 2013; Arenas *et al.*, 2016; Cruz *et al.*, 2018).

### 1.3 Melatonina

La melatonina (*N*-acetil-5-metoxitriptamina) es una hormona indol sintetizada principalmente por la glándula pineal en mamíferos, pero también es producida por otros tejidos como la piel, médula ósea, retina y tracto gastrointestinal. La síntesis y secreción pineal de melatonina son reguladas por la exposición a la luz, induciendo los ritmos circadianos. Así, sus concentraciones plasmáticas se elevan durante la noche (Liu *et al.*, 2005; Jardim-Perassi *et al.*, 2014; Rybicka y Król, 2016; Timmermans-Sprang *et al.*, 2019; Kong *et al.*, 2020; Moloudizargari *et al.*, 2021; Pistoli *et al.*, 2021).

Es una hormona liposoluble, y es transportada por las plaquetas en estructuras de su citoplasma, denominadas “cuerpos densos”, se conjuga con adenosina, a través de enlaces de hidrógeno, y es fácilmente absorbible por las membranas celulares (Slominski *et al.*, 2012; Koşar *et al.*, 2016; Zhao *et al.*, 2016).

La melatonina induce efectos antitumorales mediante distintos mecanismos; ha mostrado efectos antiproliferativos y proapoptóticos, a través de la inducción de arresto celular y activación de la vía intrínseca de la apoptosis regulando positivamente a Apaf-1 (Fulawka *et al.*, 2014; Rybicka y Król, 2016). Esto se ha demostrado en la línea celular de cáncer de mama humano MCF-7, donde melatonina a una concentración de 1 nM detiene el ciclo celular modulando positivamente a la proteína p53 (Maroufi *et al.*, 2020a; Maroufi *et al.*, 2020b). También induce mecanismos antiangiogénicos, promoviendo la inhibición de la

expresión del factor de transcripción inducido por hipoxia (HIF-1 $\alpha$ ), y el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), lo cual puede reducir la progresión tumoral (Jardim-Perassi *et al.*, 2014; Rybicka y Król, 2016; Koşar *et al.*, 2016). Además, se describe que ejerce efectos antioxidantes, actuando como un eliminador de radicales libres, a través de mecanismos dependientes e independientes de su receptor, limitando la toxicidad de la quimioterapia (Slominski *et al.*, 2012; Fulawka *et al.*, 2014; Hill *et al.*, 2015; Romo, 2016). Asimismo, melatonina suprime la metástasis de mamíferos (esferas celulares de origen mamario) inhibiendo la expresión y función de las metaloproteinasas 2 y 9 (MMP-2, MMP-9), encargadas de degradar el colágeno tipo IV, y por medio de la prevención de la EMT manteniendo de la estructura celular, aumentando la expresión de e-cadherina y disminuyendo la de Snail (Maroufi *et al.*, 2020a; Maroufi *et al.*, 2020b).

Los principales efectos de melatonina han sido ampliamente estudiados en cáncer de mama humano y otros tipos de cáncer, donde se ha demostrado sus efectos antitumorales (Slominski *et al.*, 2012; Fulawka *et al.*, 2014; Hill *et al.*, 2015; Koşar *et al.*, 2016; Romo, 2016). Estos efectos están mediados principalmente por la interacción con sus receptores de membrana específicos MT1 y MT2, aunque también puede actuar de manera independiente de estos (Kong *et al.*, 2020; Maroufi *et al.*, 2020c; Moloudizargari *et al.*, 2021; Pistoli *et al.*, 2021; Sadoughi *et al.*, 2022). Estos receptores están acoplados a proteína G, e inducen una inhibición de la adenilato ciclasa, inhibición de la movilización de Ca<sup>2+</sup> y de la liberación de ácido araquidónico, junto con una disminución de AMP cíclico, lo que se traduce en efectos antitumorales *in vitro* (Goldschmidt *et al.*, 2011; Li y Zhou, 2011; Slominski *et al.*, 2012; França *et al.*, 2016). A través de inmunohistoquímica se ha observado que MT1 predomina tanto en el tejido mamario normal como neoplásico, y en este último existe una mayor intensidad de expresión del receptor (Kong *et al.*, 2020; Maroufi *et al.*, 2020c; Pistoli *et al.*, 2021).

Adicionalmente, la hormona ejerce estas propiedades de forma estradiol-dependiente, inhibiendo los precursores del estradiol, la actividad transcripcional del gen del receptor de estradiol, ER $\alpha$ , e inhibe la actividad de la aromatasa en células de cáncer mamario ER $\alpha$ -positivas. Los tumores ER $\alpha$ -positivos tienen una alta expresión del receptor MT1 y responden mejor al tratamiento con esta hormona, sin embargo, melatonina también ejerce efectos antineoplásicos sobre células tumorales ER $\alpha$ -negativas (Liu *et al.*, 2005; Fulawka *et al.*, 2014; Jardim-Perassi *et al.*, 2014; Zhan *et al.*, 2017; Timmermans-Sprang *et al.*, 2019).

Se ha descrito que melatonina interfiere con la EMT en CSCs mamarias caninas CMT-U229, disminuyendo significativamente los niveles de expresión de marcadores mesenquimales como vimentina, N-cadherina y OCT4, aumentando los niveles de e-cadherina (Yu *et al.*, 2012; Di bella *et al.*, 2013; Pang y Argyle, 2015). En coherencia con lo anterior, recientemente se ha informado que melatonina reduce la viabilidad celular, migración e invasión de CSCs derivadas de la línea celular CF41.Mg, sugiriendo que esta hormona, modularía negativamente CSCs mamarias caninas (Yu *et al.*, 2012; Koşar *et al.*, 2016), no obstante, es fundamental fortalecer estas observaciones.

Los resultados de los tratamientos contra el cáncer de mama en perros siguen siendo extremadamente limitados y, a menudo, temporales, a pesar del aumento en la disponibilidad de nuevos fármacos y estrategias terapéuticas (Huang *et al.*, 2015; Salas *et al.*, 2015; Fulawka *et al.*, 2014). Como ya se ha mencionado, la quimioterapia no es curativa y es potencialmente tóxica dado que sus efectos citotóxicos no son selectivos. Además, es capaz de seleccionar clones de células tumorales cada vez más resistentes y agresivas. Por lo cual es urgente continuar estudiando la resistencia a drogas en cáncer mamario, especialmente de alta malignidad (Herms *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 2015; Salas *et al.*, 2015; Tran *et al.*, 2016).

Estudios *in vitro* muestran que melatonina puede actuar en sinergia con drogas

quimioterápicas y otros tratamientos antitumorales potenciando sus acciones citotóxicas. Puede disminuir la quimiorresistencia, sensibilizando a células tumorales mamarias humanas a drogas como doxorubicina, regulando negativamente algunas quinasas y la expresión de la proteína ABCG2 (Pang *et al.*, 2011; Cruz *et al.*, 2018; Kong *et al.*, 2020; Maroufi *et al.*, 2020c; Moloudizargari *et al.*, 2021; Pistioli *et al.*, 2021; Sadoughi *et al.*, 2022). Otros estudios en células de cáncer de colon sugieren que, esta hormona inhibe la actividad de ABCG2 induciendo metilación del ADN (Honscha *et al.*, 2009; Romo, 2016). De este modo, es necesario profundizar en los efectos y en algunos mecanismos asociados a la acción farmacológica de melatonina sobre células de cáncer mamario canino, especialmente en fenotipos que exhiben quimiorresistencia.

## **2. HIPOTESIS**

Melatonina reduce la quimiorresistencia de esferas derivadas de células de carcinoma mamario canino, modulando negativamente a las moléculas asociadas a farmacorresistencia, MDR1 y ABCG2.

## **3. OBJETIVOS**

### **3.1 Objetivo general**

Determinar el efecto de melatonina sobre la quimiorresistencia de esferas derivadas de carcinoma mamario canino.

### **3.2 Objetivos específicos**

- I. Determinar el efecto de melatonina sobre la viabilidad de esferas derivadas de células de carcinoma mamario canino expuestas a doxorubicina y mitoxantrona.
- II. Determinar la expresión de MDR1 y ABCG2 en esferas derivadas de células de carcinoma mamario canino en respuesta a melatonina.
- III. Determinar la expresión de MT1 y MT2 en esferas derivadas de células de carcinoma mamario canino.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

Los experimentos requeridos para el desarrollo de esta memoria de título fueron realizados en el Laboratorio centralizado de investigación veterinaria (LaCIV) y en el laboratorio de Biomedicina y Medicina Regenerativa, del Departamento de Ciencias Clínicas de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile.

### 4.1 Cultivo celular

Las líneas celulares de carcinoma mamario canino CF41.Mg (CRL-6232, ATCC) y REM 134 (12122002, ECACC) fueron cultivadas en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) con alto contenido de glucosa (SH30081.02 HyClone™) y medio esencial mínimo (MEM) (SH30265.02 HyClone™) respectivamente, suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB 04-127-1a Biological industries), 2 mM de glutamina (35050-061 GlutaMAX™ Supplement Gibco™) y penicilina/estreptomicina (03-031-1B Biological industries). Fueron mantenidas a 37°C en una atmósfera humidificada con 5% CO<sub>2</sub> en un incubador SHEL LAB® y el medio de cultivo fue cambiado cada 48 horas previo lavado de las células con PBS estéril. Para la desagregación de células, una vez alcanzado un 80-90% de confluencia, estas fueron lavadas con DMEM y luego incubadas con 2 ml de Tripsina/EDTA (Tripsina 0,25%, EDTA 0,05%, 03-052-1A Biological industries) por 4-10 minutos. La reacción fue detenida con 2 ml de medio de cultivo; luego las células fueron centrifugadas a 1800 rpm por 10 minutos a 4°C en un equipo Hermle Labortechnik Z366 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 0.4% (15250-061 Gibco™) y hemocitometría.

## 4.2 Cultivo de esferas

Las células parentales (CF41.Mg y REM 134 adherentes) fueron disgregadas, lavadas con PBS y centrifugadas, para luego ser resuspendidas en medio de cultivo para esferas. El medio de esferas CF41.Mg contiene DMEM-F12, suplementado con B27 al 2%, 4 µg/ml de heparina, 5 µg/ml de insulina recombinante humana (IRH), 10 ng/ml de factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF), 10 ng/ml de factor de crecimiento epidérmico (EGF), 20 U/ml de penicilina G, 20 µg/ml de estreptomina y 0,05 µg/ml de anfotericina B. Para la línea REM 134, el medio de esferas contuvo DMEM-F12 más 20 nM progesterona, 100 µM putrescina, 30 nM selenita de sodio, 25 µg/mL transferrina, 20 µg/mL insulina recombinante humana (IRH) bFGF, EGF y antibióticos (Pang *et al.*, 2011). Las células fueron sembradas en placas de ultra baja adherencia y en ausencia de suero fetal bovino.

### Objetivo 1

## 4.3 Ensayo de viabilidad celular: Determinación óptima de Mitoxantrona

Esferas derivadas de células CF41.Mg y REM 134 fueron sembradas en placas de 96 pocillos de ultra baja adherencia, con una densidad de 5.000 células/pocillo y 10.000 células/pocillo respectivamente, en 100 µl de medio de esferas en cuádruplicado. Se dejó un blanco en cuádruplicado, que sólo contenía medio de cultivo. 24 horas después de la siembra, se aplicó mitoxantrona en distintas concentraciones (1, 10, 100 y 1000 nM). 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). Para esto, se aplicaron 20  $\mu\text{L}$  de CellTiter 96® (Promega) cada 100  $\mu\text{L}$  de medio de cultivo y se dejaron incubando por tres horas a 37° C en una atmósfera humidificada con 5%  $\text{CO}_2$ . La densidad óptica (D.O.) resultante se midió en un lector de multiplacas AgileReader™, modelo AMPR-900 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, donde el promedio de D.O. del grupo control se consideró como 100% de viabilidad. Se realizaron al menos 3 experimentos independientes.

#### **4.4 Ensayo de viabilidad celular 48 y 72 horas**

Esferas derivadas de células CF41.Mg y REM 134 fueron sembradas en placas de 96 pocillos de ultra baja adherencia, con una densidad de 5.000 células/pocillo y 10.000 células/pocillo respectivamente, en 100  $\mu\text{l}$  de medio de esferas en cuádruplicado. Se dejó un blanco en cuádruplicado, que sólo contenía medio de cultivo. 24 horas después de la siembra, se aplicó melatonina (Sigma-Aldrich- M5250) en distintas concentraciones (0, 0,1, 1 mM) en presencia/ausencia de doxorubicina y mitoxantrona (1 nM). 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). Para esto, se aplicaron 20  $\mu\text{l}$  de CellTiter 96® (Promega) cada 100  $\mu\text{l}$  de medio de cultivo y se dejaron incubando por tres horas a 37 ° C en una atmósfera humidificada con 5%  $\text{CO}_2$ . La densidad óptica (D.O.) resultante se midió en un lector de multiplacas AgileReader™, modelo AMPR-900 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, donde el promedio de D.O. del grupo control se consideró como 100% de viabilidad. Se realizaron al menos 3 experimentos

independientes. Los grupos tratamiento se resumen en la Tabla 1.

Tabla 1. Grupos experimentales en ensayos de viabilidad celular.

Línea celular	Grupos experimentales*	Melatonina (MLT)				Mitoxantrona (MTX)		Doxorrubicina (Dox)	
		0,1 mM		1 mM		1 nM		1nM	
		Horas				Horas		Horas	
		24	48	24	48	24	48	24	48
CF41.Mg / REM134**	Control								
	MLT 1	+	+						
	MLT 2			+	+				
	MTX					+	+		
	Dox							+	+
	MLT 1 + MTX	+	+			+	+		
	MLT 1 + Dox	+	+					+	+
	MLT 2 + MTX			+	+	+	+		
MLT 2+ Dox			+	+			+	+	

\* La viabilidad celular fue medida mediante densidad óptica después de aplicar al cultivo CellTiter 96® (Promega). Cada grupo se realizó en triplicado.

\*\* Las células fueron previamente incubadas por un periodo de 24 horas.

## Objetivo 2

### 4.5 Expresión de MDR1 y ABCG2 en líneas celulares expuestas a melatonina

La expresión proteica de MDR1 y ABCG2 se analizó mediante Western blot. Se sembraron  $5 \times 10^6$  células derivadas de esferas en placas de cultivo de 100 mm de diámetro de ultra baja adherencia; después de 48 h, las células de ambas líneas fueron expuestas a melatonina en diversas concentraciones: 0, 0,1 y 1 mM por 24 horas. Para la extracción de la proteína total, las células fueron recuperadas, centrifugadas y expuestas a buffer de lisis RIPA que contiene Tris-

HCl 20 mM pH 7.5, NaCl 150 mM, Na<sub>2</sub>EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, 1 % NP-40, desoxicolato de sodio al 1%, pirofosfato de sodio 2,5 mM,  $\beta$ -glicerofosfato 1 mM, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1 mM, leupetina 1  $\mu$ g / ml e inhibidores de proteasas. Luego, los extractos fueron sonicados, centrifugados (15.000 x g por 15 min) y la proteína se cuantificó en los sobrenadantes mediante el método BCA. Para la electroforesis, las muestras fueron denaturadas a 95 °C por 5 minutos para posteriormente cargar 20-40  $\mu$ g de proteína por carril en geles de poliacrilamida al 10% en condiciones denaturantes. La electroforesis se realizó utilizando cámaras pertinentes. Posteriormente, las bandas fueron electrotransferidas a membranas de PVDF, e inmunodetectadas usando anticuerpos primarios anti-ABCG2 (monoclonal de conejo, ZRB1217-25UL ZooMAb<sup>®</sup>) y anti-MDR1 (clon C219, monoclonal de ratón MA1-26528, Invitrogen <sup>™</sup>) y anticuerpos secundarios anti-ratón y anti-conejo conjugados con peroxidasa. El revelado se llevó a cabo con quimioluminiscencia. Como control de carga, se inmunodetectó  $\beta$ -actina (monoclonal de ratón mAb 8H10D10, Cell signaling technology <sup>™</sup>).

#### **4.6 Expresión de genes MDR1 y ABCG2 en líneas celulares expuestas a melatonina**

Las células de ambas líneas se cultivaron en las mismas condiciones descritas anteriormente, en presencia de melatonina 0, 0,1 y 1 mM durante 24 horas. El ARN total se aisló utilizando el kit RNAeasy (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Después de la cuantificación del ARN total, mediante el kit Qubit<sup>™</sup> RNA BR (Broad-Range), se realizó la reacción de transcripción inversa (RT) utilizando el kit Brilliant SYBR Green II RT-PCR (Agilent Technologies, Santa Clara, EE. UU.). El cDNA resultante se utilizó para la amplificación utilizando partidores específicos para MDR1 y ABCG2 según lo descrito en la Tabla 2 (Material complementario. Maroufi *et al.*, 2020a). Se utilizó  $\beta$  actina como control

de normalización endógena. El PCR en tiempo real se realizó utilizando 2x SYBR green PCR master mix. La expresión relativa se determinó usando el protocolo de análisis  $\Delta\Delta CT$  (cuantificación relativa).

#### **4.7 Expresión de genes MT1 y MT2 en ambas líneas celulares**

Las células se cultivaron en las mismas condiciones descritas anteriormente. El ARN total se aisló utilizando el kit RNeasy (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Después de la cuantificación del ARN total, mediante el kit Qubit™ RNA BR (Broad-Range), se realizó la reacción de transcripción inversa (RT) utilizando el kit Brilliant SYBR Green II RT-PCR (Agilent Technologies, Santa Clara, EE. UU.). El cDNA resultante se utilizó para la amplificación utilizando primarios específicos para MT1 y MT2 según lo descrito en la Tabla 3 (Material complementario. Maroufi *et al.*, 2020a). Se utilizó  $\beta$  actina como control de normalización endógena. El PCR en tiempo real se realizó utilizando 2x SYBR green PCR master mix. La expresión relativa se determinó usando el protocolo de análisis  $\Delta\Delta CT$  (cuantificación relativa).

#### **4.8 Análisis de los datos**

Se utilizó la prueba de Shapiro-Wilk para determinar el tipo de distribución de los datos. Se realizaron al menos 3 experimentos independientes en el contexto de cada ensayo. Se utilizó ANOVA-Bonferroni o la prueba de Kruskal para evaluar las diferencias entre las condiciones experimentales. Se consideró significativo un  $p \leq 0.05$ . Los datos se analizaron mediante el software Infostat para Windows, AR (Infostat, 2008).

## 5. RESULTADOS

Se ha descrito que esferas derivadas de células de carcinoma mamario canino REM134 y CF41.Mg exhiben quimiorresistencia relativa a doxorrubicina y paclitaxel-doxorrubicina respectivamente (Lopes *et al.*, 2015; Huang *et al.*, 2015), sin embargo, aún no se ha descrito el efecto de mitoxantrona en este tipo de células.

Por otro lado, y dado que se trabajó con melatonina, se evaluó la expresión génica de sus receptores específicos MT1 y MT2 en esferas derivadas de ambos tipos celulares mediante ensayos RT-qPCR. En ambas líneas celulares se observó una expresión consistente del gen MT1, efecto no observado con el receptor MT2 (datos no mostrados).

### Objetivo 1

Para determinar el efecto de melatonina en esferoides de carcinoma mamario canino CF41.Mg y REM134 expuestas a doxorrubicina y mitoxantrona, se realizaron ensayos de viabilidad celular mediante el método de reducción con MTS con lecturas a las 48 y 72 horas post aplicación de la hormona.

### Determinación concentración óptima mitoxantrona

Se determinó la concentración óptima de mitoxantrona en esferas de ambas líneas celulares, para lo cual se sometieron a prueba cuatro concentraciones: 1, 10, 100 y 1000nM. La viabilidad celular no disminuyó en esferas derivadas de las células CF41.Mg, en respuesta a las diferentes concentraciones estudiadas, tal como se muestra en la figura 1. En esferas REM 134 a las 48 horas de incubación, la viabilidad celular disminuyó únicamente en respuesta a

mitoxantrona 10 nM ( $p < 0,05$ ). Sin embargo, a las 72 horas no se observaron diferencias significativas, en respuesta a las distintas concentraciones de mitoxantrona (figura 2). Así, para los análisis posteriores, se utilizó la concentración más baja (1 nM), concentración que se acerca a la concentración plasmática máxima alcanzada en respuesta a dosis de uso clínico en perros (Kirsch *et al.*, 2019).

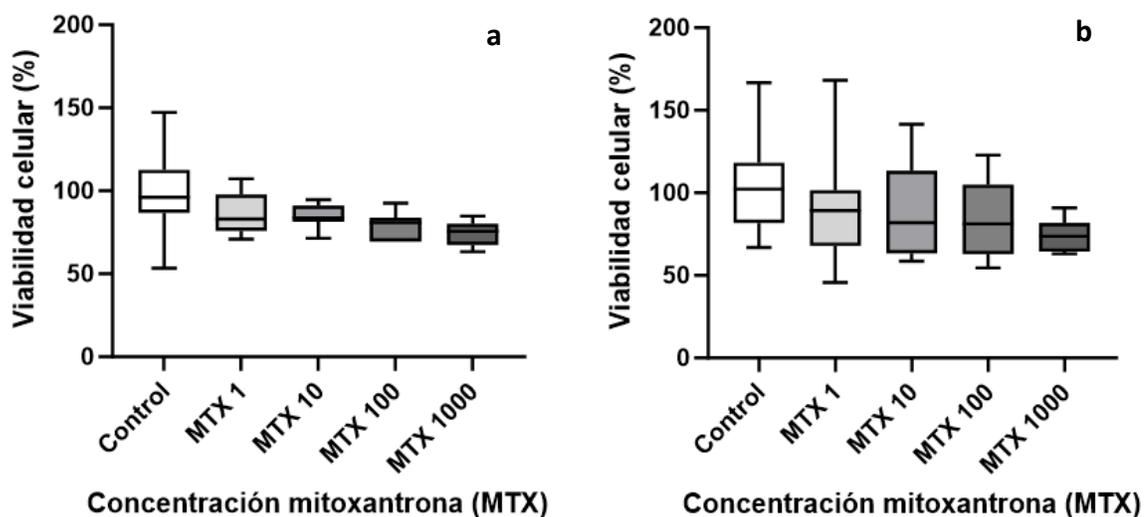


Figura 1. Viabilidad de esferas-CF41.Mg en respuesta a distintas concentraciones de mitoxantrona (1-1000 nM) por 48 (a) y 72 horas (b). Los valores son medias  $\pm$  DE de 3 experimentos independientes hechos en triplicado (test ANOVA y Bonferroni). La disminución de viabilidad se realizó en relación con los controles. La medición se basó en la reducción de MTS.

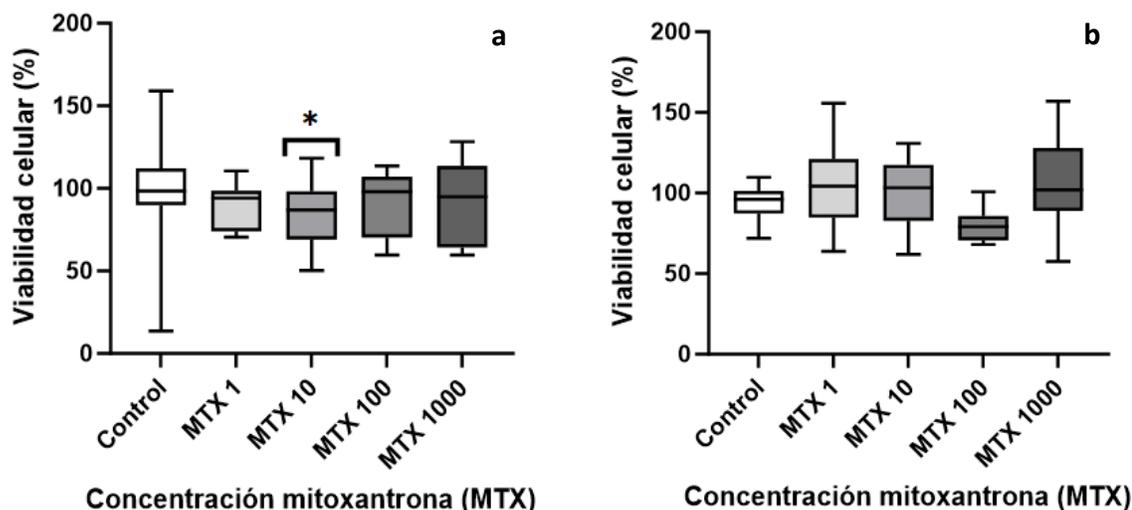


Figura 2. Viabilidad de esferas-REM 134 esferas en respuesta a distintas concentraciones de mitoxantrona (1-1000 nM) por 48 (a) y 72 horas (b). Ensayo de reducción de MTS. Los valores son medias  $\pm$  DE de 3 experimentos independientes hechos en triplicado. \* Indica significancia estadística respecto al grupo control, \*  $p < 0,05$  (test ANOVA y Bonferroni).

### Viabilidad esferas derivadas de ambas líneas celulares expuestas a mitoxantrona y doxorubicina, en respuesta a melatonina

En esferas derivadas de células CF41.Mg se observó una disminución en la viabilidad celular en respuesta a 1 mM de melatonina, tanto a las 48 como a las 72 horas de incubación ( $p < 0,0001$ ), efecto no detectado con la otra concentración estudiada (0,1 mM). La viabilidad celular de esferas expuestas a una dosis única de doxorubicina 1 nM y en combinación con melatonina (0,1 mM y 1 mM) no mostró cambios significativos a las 48 horas de incubación. Mientras que, a las 72 horas se apreció una disminución de la viabilidad en ambos grupos tratados con doxorubicina y melatonina (0,1 mM y 1 mM) en comparación al control (Figura 3). La combinación de drogas no indujo una mayor citotoxicidad en relación a la condición de doxorubicina sola, no obstante, melatonina sola redujo

significativamente la viabilidad celular en comparación a doxorubicina sola.

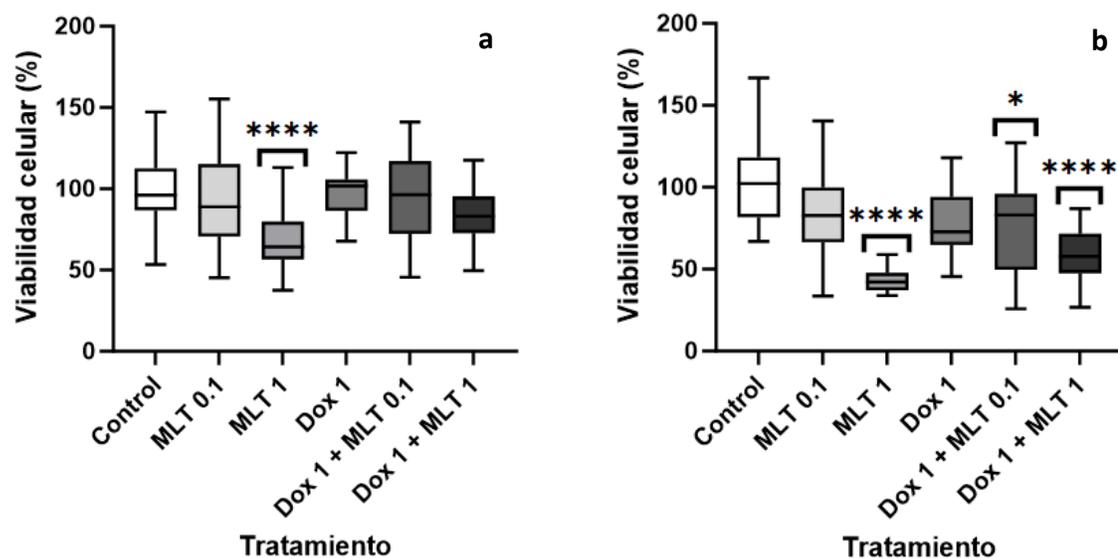


Figura 3. Viabilidad celular de esferas-CF41.Mg expuestas a doxorubicina 1 nM y distintas concentraciones de melatonina (0,1-1 mM) por 48 (a) y 72 horas (b). Ensayo de reducción de MTS. Los valores son medias  $\pm$  DE de 3 experimentos independientes hechos en triplicado. \* Indica significancia estadística respecto al grupo control \*  $p < 0,05$  y \*\*\*\*  $p < 0,0001$  (test ANOVA y Bonferroni).

Respecto al uso combinado de mitoxantrona y melatonina, tanto a las 48 como a las 72 horas de incubación, se observó una disminución en la viabilidad celular de esferas CF41.Mg en respuesta a mitoxantrona 1 nM más melatonina 1 mM ( $P \leq 0.0001$ ) (Figura 4). Esta combinación indujo una reducción significativa de la viabilidad celular en relación con la condición mitoxantrona sola a las 48 hrs, no así a las 72 hrs.

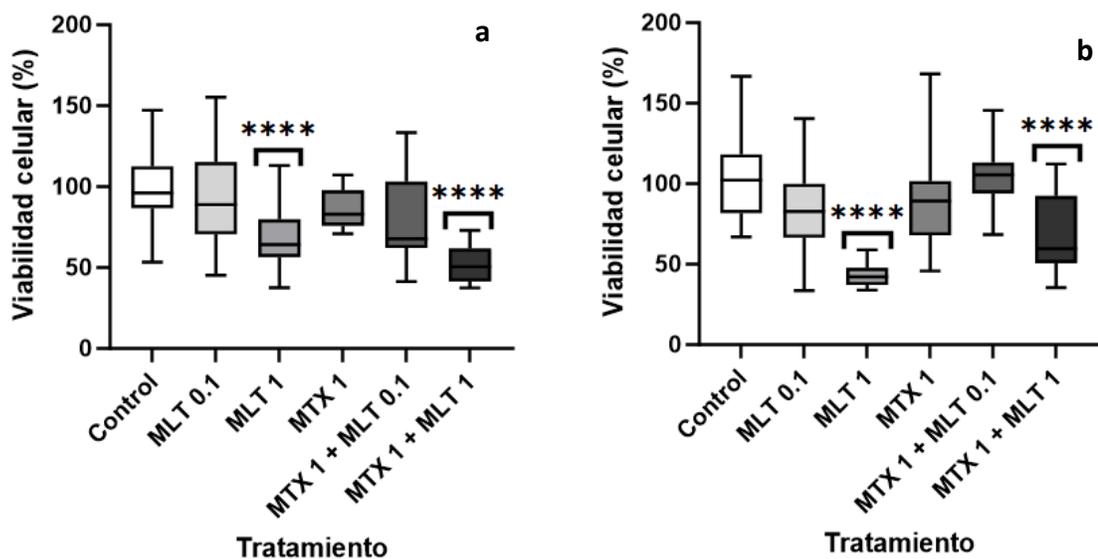


Figura 4. Viabilidad de esferas-CF41.Mg expuestas a mitoxantrona y distintas concentraciones de melatonina (0,1-1 mM) por 48 (a) y 72 horas (b). Ensayo de reducción de MTS. Los valores son medias  $\pm$  DE de 3 experimentos independientes hechos en triplicado. \* Indica significancia estadística respecto al grupo control, \*\*\*\*  $p < 0,0001$  (test ANOVA y Bonferroni).

En esferas derivadas de las células REM 134 la viabilidad celular no presentó cambios en respuesta a ambas concentraciones de melatonina (0,1 – 1 mM) y en combinación con doxorubicina 1 nM, tanto a las 48 como a las 72 horas de incubación (Figura 5).

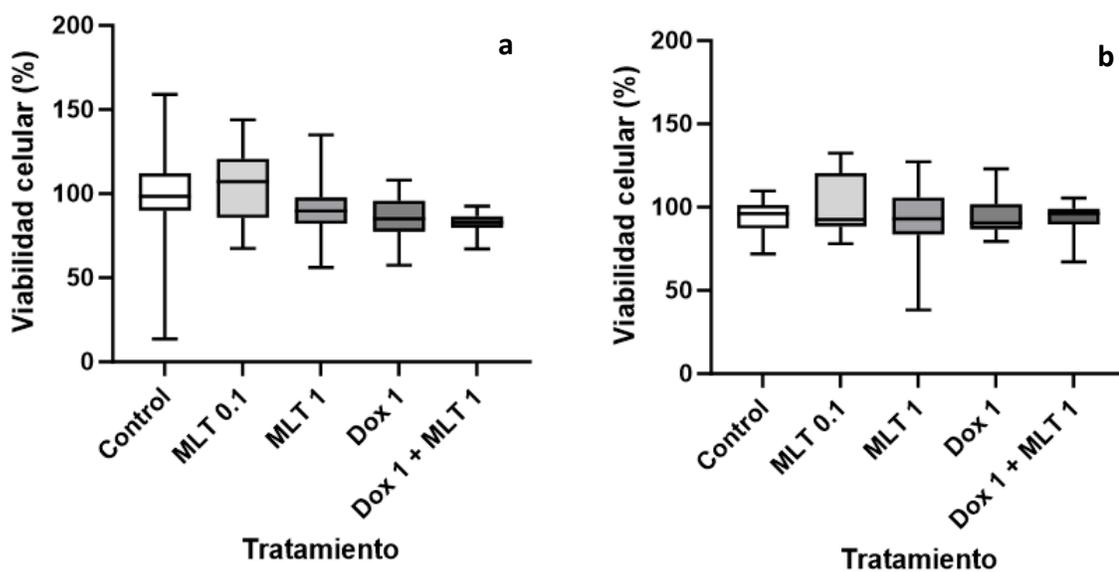


Figura 5. Viabilidad de esferas-REM 134 expuestas a doxorubicina 1 nM y melatonina 1 mM por 48 (a) y 72 horas (b). Ensayo de reducción de MTS. Los valores son medias  $\pm$  DE de 3 experimentos independientes hechos en triplicado (test ANOVA y Bonferroni).

En esferas REM 134 expuestas a mitoxantrona en combinación con melatonina 1 mM, tal como lo observado para doxorubicina, la viabilidad celular permaneció sin cambios tanto a las 48 como a las 72 horas de incubación (Figura 6).

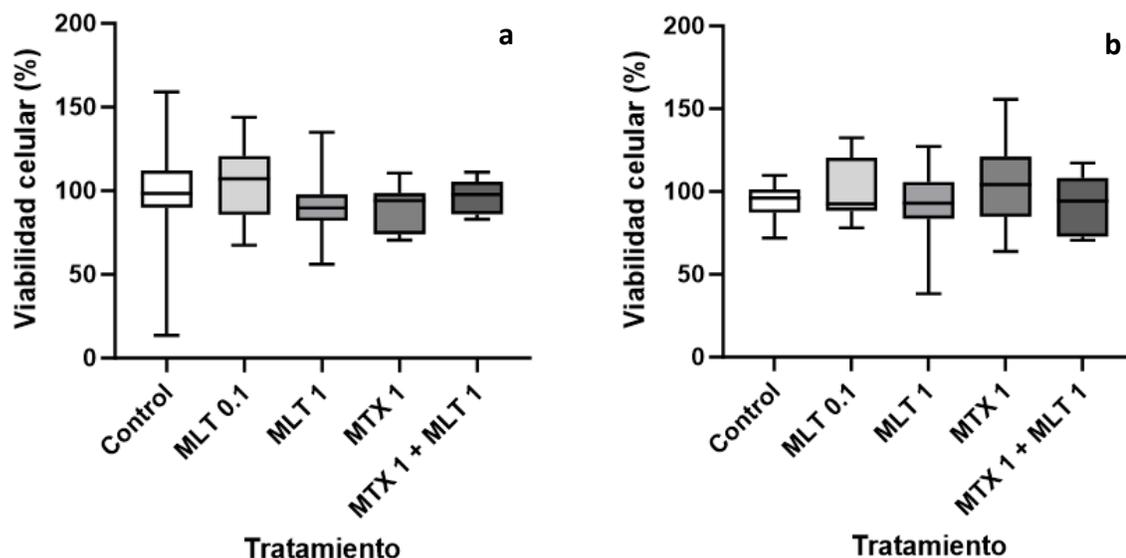


Figura 6. Viabilidad de esferas-REM 134 esferas expuestas a mitoxantrona y melatonina 1 mM por 48 (a) y 72 horas (b). Ensayo de reducción de MTS. Los valores son medias  $\pm$  DE de 3 experimentos independientes hechos en triplicado (test ANOVA y Bonferroni).

## Objetivo 2

### Expresión de genes MDR1 y ABCG2 en ambas líneas celulares

Para determinar la expresión génica de MDR1 y ABCG2 en esferas derivadas de células de carcinoma mamario canino CF41.Mg y REM 134 en respuesta a melatonina (0,1 — 1 mM), se realizaron ensayos RT-qPCR.

Se observó una disminución en la expresión relativa de ABCG2 en esferas CF41.Mgen respuesta tanto a melatonina 0,1 mM ( $p < 0,0001$ ) como a 1 mM ( $p < 0,001$ ). En cuanto a las esferas REM 134, la expresión relativa de ABCG2 también se vio disminuida en respuesta a ambas concentraciones de melatonina, 0,1 mM ( $p < 0,05$ ) y 1 mM ( $p < 0,001$ ) (Figura 7).

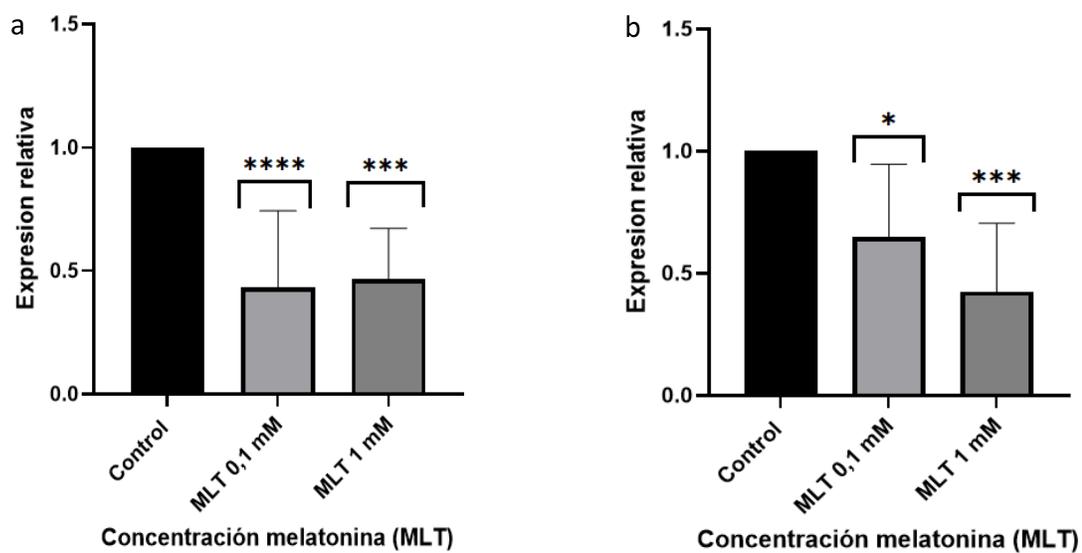


Figura 7. Expresión relativa de gen ABCG2 en esferas CF41.Mg (a) y REM 134 (b), respectivamente en respuesta a melatonina (0,1 - 1 mM). Ensayo de RT-qPCR. Los valores son medias  $\pm$  DE de 3 experimentos independientes hechos en triplicado. \* Indica significancia estadística respecto al grupo control, \*  $p < 0,05$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$  (test ANOVA y Bonferroni).

La expresión relativa de MDR1 en esferas CF41.Mg en respuesta, tanto a melatonina 0,1 mM como a 1 mM, disminuyó de manera significativa respecto al control ( $p < 0,001$ ). Por otro lado, en esferas REM 134, la expresión relativa de MDR1 disminuyó únicamente en respuesta a melatonina 1 mM ( $p < 0,0001$ ) (Figura 8).

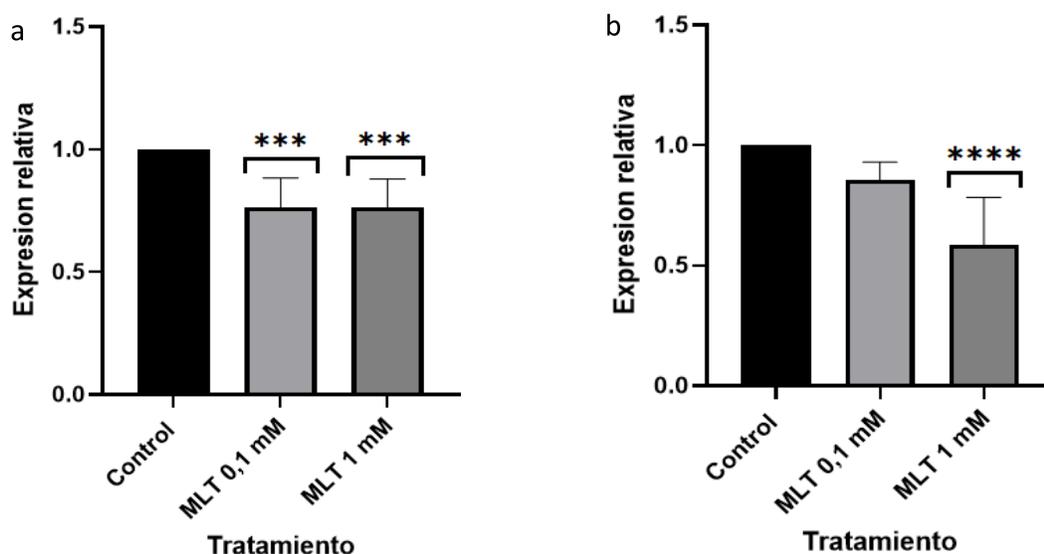


Figura 8. Expresión relativa de gen MDR1 en esferas CF41.Mg(a) y REM 134(b), respectivamente en respuesta a melatonina (0,1 - 1 mM). Ensayo de RT-qPCR. Los valores son medias  $\pm$  DE de 3 experimentos independientes hechos en triplicado. \* Indica significancia estadística respecto al grupo control, \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$  (test ANOVA y Bonferroni).

### Expresión de proteínas MDR1 y ABCG2 en ambas líneas celulares

Para determinar la expresión proteica de MDR1 y ABCG2 en esferas derivadas de células de carcinoma mamario canino CF41.Mg y REM 134 en respuesta a melatonina (0,1 - 1 mM), se realizaron Western blot, sin embargo y debido a diversos inconvenientes técnicos, se muestran resultados preliminares.

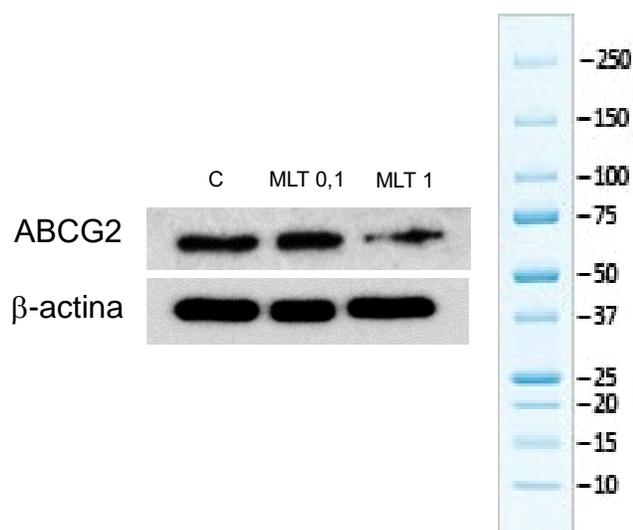


Figura 9. Expresión proteica de ABCG2 en esferas CF41.Mg en respuesta a melatonina (0,1 - 1 mM). Ensayo de Western blot (C: control, MLT 0,1: melatonina 0,1 mM, MLT 1: melatonina 1 mM).

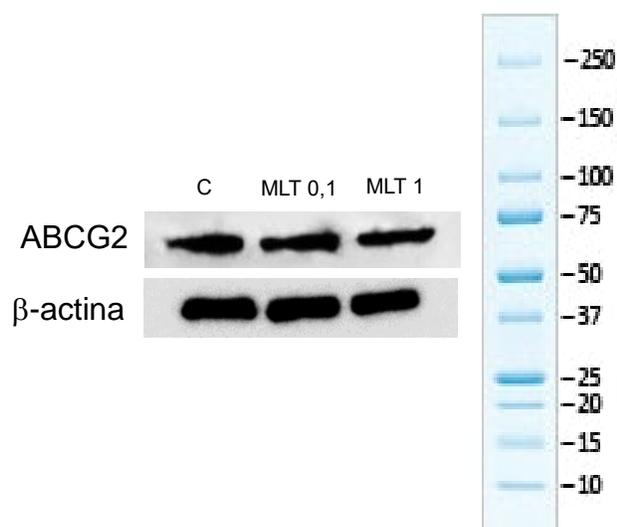


Figura 10. Expresión proteica ABCG2 en esferas REM134 en respuesta a melatonina (0,1 - 1 mM). Ensayo de Western blot (C: control, MLT 0,1: melatonina 0,1 mM, MLT 1: melatonina 1 mM).

## 6. Discusión

A pesar de todos los avances en medicina veterinaria, aún existe un gran desconocimiento en los campos del diagnóstico, tratamiento y pronóstico del cáncer en animales. El CMC es considerado la neoplasia maligna más común en perras y presenta una baja tasa de respuesta al tratamiento, debido a que algunos tumores pueden desarrollar recidiva clínica, metástasis y quimiorresistencia (Salas *et al.*, 2015; Serrano *et al.*, 2019; Valdivia *et al.*, 2021). En este contexto, una pequeña proporción de células localizadas dentro del nicho tumoral explica parcialmente este último fenómeno, promoviendo la progresión neoplásica. Las células madre de cáncer, poseen una alta capacidad de autorrenovación y potencial de iniciar nuevos tumores (Michishita *et al.*, 2011), por lo cual, se debe realizar un esfuerzo significativamente mayor para generar conocimiento y desarrollar terapias dirigidas específicas para perros.

La melatonina se ha identificado como un agente seguro y eficaz contra muchos tipos de cáncer. Así, se ha demostrado que en cáncer de mama humano, la indolamina interfiere con la progresión tumoral debido a su potencial para modular diversos procesos celulares y moleculares como la apoptosis, proliferación celular y la quimiorresistencia, entre otros (Moloudizargari *et al.*, 2021).

Dado que, en oncología veterinaria existe escasa información acerca del rol de esta hormona sobre tumores mamarios en perras, fue interesante evaluar si la hormona puede regular la resistencia a drogas ejercida por células neoplásicas troncales.

Inicialmente se evaluó la expresión génica de los receptores de melatonina, MT1 y MT2, con el objetivo de dilucidar si estas células pudieran responder a la hormona. Esferas CF41.Mg y REM 134 expresaron únicamente el gen MT1, sugiriendo que ambas líneas celulares son sensibles a la hormona. De acuerdo con lo descrito en la literatura, melatonina modula la proliferación de células de cáncer de mama a través de sus receptores de membrana MT1/MT2 o de

manera independiente a ellos, conduciendo a la fosforilación y transactivación de una serie de factores de transcripción (Jablonska *et al.*, 2013). De este modo, la expresión del gen MT1, no necesariamente es indicativo de que la indolamina ejerce sus efectos a través de este, dado que sus efectos biológicos pueden ser mediados por su interacción con otras moléculas intracelulares (Kong *et al.*, 2020; Pistoli *et al.*, 2021). En este contexto, datos preliminares de nuestro laboratorio (no mostrados), indican que luzindol, un antagonista farmacológico del receptor MT1, no bloquea el efecto antiproliferativo de la hormona, sugiriendo que esta actúa de manera independiente de la unión a su receptor específico. Esto contrasta con diversos estudios que reportan que la inhibición del desarrollo del cáncer de mama humano por melatonina, es dependiente de la unión a MT1 (Hill *et al.*, 2015; Kong *et al.*, 2020; Moloudizargari *et al.*, 2021; Franco *et al.*, 2023). Así, Pistoli *et al.*, (2021), observó una expresión predominante de este receptor en células neoplásicas mamarias, lo cual parece incrementar la eficacia de la actividad oncostática de melatonina. La unión hormona-MT1 promueve la disminución en la síntesis de AMPc a través de, la inhibición de la adenil-ciclasa, la reducción de la actividad de la proteína quinasa C (PKC), la proteína quinasa A (PKA) y las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK). Este mecanismo tiene un impacto negativo en la expresión de los genes implicados en los procesos de proliferación, angiogénesis y migración celular (Jablonska *et al.*, 2013; Fic *et al.*, 2017; Tanriover *et al.*, 2022; Ramos *et al.*, 2023).

Estudios previos, han reportado que esferas derivadas de las líneas celulares estudiadas, REM134 y CF41.Mg, exhiben un fenotipo troncal, lo que incluye resistencia a drogas quimioterápicas (Huang *et al.*, 2015; Lopes *et al.*, 2015). En concordancia y tal como se describe en la sección de resultados, las esferas derivadas de ambas líneas celulares exhibieron resistencia a doxorubicina y mitoxantrona. Estos efectos podrían ser mediados por una mayor expresión y actividad de transportadores de eflujo como MDR1 (ABCB1) y ABCG2 (BCRP) (Hasanabady y Kalalinia, 2016). En este contexto, se conoce que las CSC

muestran una alta expresión de estos transportadores de fármacos, que las hacen resistentes a las señales de muerte, que inducen los fármacos contra el cáncer. Recientemente se ha descrito que la expresión o activación del marcador de troncalidad CD44, regula positivamente a ABCB1, lo que indica que la troncalidad está inherentemente relacionada a quimiorresistencia (Lee y Frank, 2021).

En el presente estudio se evaluó la viabilidad de mamosferas en presencia de melatonina (0, 0,1 y 1 mM), y doxorubicina y mitoxantrona a concentraciones equivalentes a las alcanzadas a nivel plasmático cuando se utilizan clínicamente en perros (1 nM en ambos casos). En esferas CF41.Mg, melatonina 1 mM indujo un efecto detrimental sobre la viabilidad celular, tanto a las 48 como a las 72 horas de incubación. Este efecto no fue observado en respuesta a las antraciclinas antes mencionadas, concordando con el comportamiento quimiorresistente informado en la literatura. La disminución en la viabilidad de mamosferas CF41.Mg por acción de melatonina, es concordante con estudios previos que indican un rol prooxidante de la hormona sobre células neoplásicas, activando la vía intrínseca y/o extrínseca de la apoptosis (Reiter *et al.*, 2023). De manera similar, diversos autores han documentado el rol proapoptótico de melatonina en células madre de cáncer de colon, células madre de glioma, células de cáncer de ovario y en líneas celulares de cáncer de mama humano, ER $\alpha$ -positivas (MCF7) y negativas (MDA-MB 231), donde se han identificado mecanismos antiproliferativos específicos asociados a la hormona, reduciendo así la progresión tumoral (Kannen *et al.*, 2011; Fulawka *et al.*, 2014; Martin *et al.*, 2014; Hill *et al.*, 2015; Ferraz *et al.*, 2016; Fic *et al.*, 2017; Cuciello *et al.*, 2023; Smaniotto *et al.*, 2023).

Nuestros experimentos, mostraron que al combinar ambos quimioterápicos con melatonina sobre esferas CF41.Mg, no se contrarrestó la quimiorresistencia antes mencionada, pues no se visualizó un efecto aditivo. Dichos resultados

contrastan con lo informado en estudios previos. En este sentido, se ha documentado efectos sinérgicos de la combinación de melatonina con temozolomida y paclitaxel sobre células madre tumorales cerebrales, promoviendo su apoptosis (Martin *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2018; Xiang *et al.*, 2019). Por otro lado, mamosferas derivadas de la línea celular de cáncer de mama humano MDA-MB-231, expuestas a trióxido de arsénico en combinación con melatonina, experimentaron un aumento de la tasa de muerte celular mediante la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Maroufi *et al.*, 2020b; Franco *et al.*, 2023). Dado que los mecanismos de resistencia a drogas son múltiples (Zhao *et al.*, 2016; Cruz *et al.*, 2018), es posible que melatonina solo esté modulando algunos, y su efecto, no sea suficiente para reducir la quimioresistencia exhibida por esferas-CF41.Mg a antraciclinas.

Así, los resultados expuestos aquí, indican que el efecto de la hormona es dependiente del tipo celular. Al respecto, y a diferencia de lo observado en esferas CF41.Mg, las esferas REM 134 mostraron resistencia a la hormona y sus combinaciones con ambos quimioterápicos. Actualmente, no hay evidencia que demuestre en detalle el perfil genético y proteico de células CF41.Mg y REM134, de manera que no es posible, definir las bases moleculares de esta respuesta diferencial a melatonina.

Nuestros resultados evidenciaron una modulación negativa inducida por la hormona indol, sobre la expresión génica relativa de MDR1 y ABCG2 en esferas derivadas de ambas líneas estudiadas. Cabe destacar que en esferas REM 134, la expresión relativa de MDR1 solo disminuyó en respuesta a 1 mM de melatonina. En este contexto, un estudio previo en células madre tumorales cerebrales documentó la disminución en la expresión y función de ABCG2 después del tratamiento con melatonina 1 mM, al inducir la metilación de su promotor (Martín *et al.*, 2013). Hsieh *et al.*, (2020), han informado resultados similares para el transportador ABCB1 en líneas celulares de cáncer oral resistentes a vincristina, donde melatonina inhibió la expresión del transportador,

redujo su funcionamiento, regulando al alza la susceptibilidad de las células resistentes a apoptosis.

Sin embargo, y a pesar de la modulación negativa inducida por melatonina sobre la expresión de estos transportadores en esferas derivadas de CMC, la hormona no revirtió la resistencia a doxorubicina y mitoxantrona. Para comprender estos resultados, es necesario entender los diversos mecanismos moleculares que regulan la expresión de ambos transportadores. Esto implica que una modulación negativa sobre la expresión de los transportadores, no necesariamente se traducirá en una menor actividad funcional.

La expresión de ABCB1 (ARNm y proteína) en las CSC se rige en gran medida por la regulación transcripcional de diversos factores como OCT-4/POU5F1, NANOG/STAT3, *Twist*, TGF $\beta$  y vías de señalización como la Wnt/ $\beta$ -catenina (Lee y Frank, 2021). También se ha informado la modulación de su expresión a través de mecanismos postraduccionales y no canónicos, ampliando el rango de reguladores de esta proteína, favoreciendo la multiresistencia (Lee y Frank, 2021). La represión de la expresión de ABCB1, puede ocurrir a través de la unión de proteínas quiméricas oncogénicas, metilación del ADN o una combinación de la activación de los factores de transcripción, antes mencionados (Lee y Frank, 2021). Esto evidencia la complejidad del fenómeno de quimiorresistencia; además, este no solo está determinado por la expresión de ABCB1 en la membrana plasmática, sino también por su expresión funcional a nivel intracelular que restringe aún más el ingreso de las drogas al núcleo celular. Por otra parte, la funcionalización de ABCB1 está determinada también por la composición de los fosfolípidos en su vecindad inmediata dentro de la membrana plasmática, su fluidez y la longitud de la cadena de ácidos grasos (Lee y Frank, 2021). Lo anterior sugiere que en esferas CF41.Mg, melatonina modula negativamente la expresión de ABCB1 a nivel transcripcional y traduccional, sin embargo, no afecta su funcionalidad, pues se conservó el perfil de resistencia a las antraciclina estudiadas.

La expresión de ABCG2, al igual que MDR1, está regulada por diversos factores de transcripción, quinasas, factores epigenéticos, miARN, hormonas, factores de crecimiento y polimorfismos genéticos (Kukal *et al.*, 2021). Se ha estudiado que la supresión de BCRP a través de la regulación negativa de la vía de señalización intracelular PI3K/Akt, se puede traducir en un restablecimiento de la sensibilidad a drogas citotóxicas en mamíferos humanos, lo que sugiere que, la modulación de esta vía puede ayudar a superar la multiresistencia (Kukal *et al.*, 2021). Otro factor que puede regular a la baja este transportador, es el silenciamiento de caveolina-1, generando una disminución del flujo de salida de fármacos (Nakanishi y Ross, 2012; Kukal *et al.*, 2021). Debido a lo anterior y de manera similar a lo observado con MDR1, melatonina modula negativamente la expresión de BCRP, previo a la maduración y generación de la proteína funcional.

Como se mencionó anteriormente, las células madre de cáncer muestran una expresión elevada de ABCG2 y ABCB1, en respuesta a diversos factores como survivina (proteína inhibidora de la apoptosis), HIF-2 $\alpha$ , c-MYC, TNF $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , TGF $\beta$  y Nrf2 (Kukal *et al.*, 2021). En este contexto, se ha documentado la sobreexpresión de los transportadores en cuestión en líneas celulares de carcinoma de mama humano (MCF-7, MDA-MB-231 y HT-29), carcinoma de colon, carcinoma gástrico, fibrosarcoma, glioblastoma y mieloma, lo que se asocia con una mayor supervivencia celular, la evasión de apoptosis y un mayor potencial metastásico (Kukal *et al.*, 2021). Por lo tanto, para controlar la multiresistencia, es esencial comprender el rol de ABCG2 y MDR1 desde un punto de vista fisiopatológico, pues intervenciones terapéuticas dirigidas directamente a la función de alguno de estos transportadores podrían inducir efectos secundarios graves.

La presente investigación, pretendió aportar con el estudio del efecto de melatonina sobre esferas derivadas de células de carcinoma mamario canino, expuestas a doxorubicina y mitoxantrona. Gran parte de los resultados

concuerdan con los estudios publicados acerca del tema, sin embargo, la hipótesis planteada no se cumple. En este contexto, sería interesante ampliar las investigaciones acerca de otros mecanismos implicados en el desarrollo de quimiorresistencia en las líneas celulares estudiadas, y el cómo melatonina puede modular estos, evaluando su capacidad de reversión del fenómeno de resistencia, según lo descrito en cáncer de mama humano. Por otra parte, una evaluación más exhaustiva de las esferas derivadas de la línea celular REM134, pareciera ser interesante, puesto que se mostraron resistentes a la hormona, pese a que esta, fue capaz de modular negativamente la expresión de los transportadores asociados a quimiorresistencia, planteando una interrogante plausible acerca de los mecanismos moleculares involucrados en dichos procesos.

Los resultados aquí expuestos complementan lo observado anteriormente en estudios *in vitro*, promoviendo el estudio y potencial uso de melatonina como un nuevo agente terapéutico, para ejemplares con carcinomas mamarios, especialmente de alto grado de malignidad.

## 7. CONCLUSIONES

Melatonina no redujo la quimiorresistencia ejercida por esferas CF41.Mg, a doxorubicina y mitoxantrona. No obstante, reduce la viabilidad celular en forma significativa.

El efecto antiproliferativo de melatonina sobre esferas mamarias caninas es dependiente del tipo celular.

Melatonina modula negativamente la expresión génica, y preliminarmente la expresión proteica de las bombas ABCG2 y MDR1, efecto que no es suficiente para contrarrestar la quimiorresistencia exhibida por esferas CF41.Mg y REM134.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

- **ARENAS, C.; PEÑA, L.; GRANADOS-SOLER, J.; PEREZ-ALENZA, M.** 2016. Adjuvant therapy for highly malignant canine mammary tumours: Cox-2 inhibitor versus chemotherapy: a case-control prospective study. *Vet Rec.* 179(5), 125.
- **CANNON, C.; POZNIAK, J.; SCOTT, M.; ITO, D.; GORDEN, B.; GRAEF, A.; MODIANO, J.** 2015. Canine osteosarcoma cells exhibit resistance to aurora kinase inhibitors. *Veterinary and comparative oncology.* 13 (1), 48–59.
- **CHENGIZKHAN, G.; BHASKARAN, N.; KUMARAN, R.; RAMACHANDRAN, I.** 2020. Cancer Stem Cells and Tumour Aggressiveness. *Cancer Stem Cells: New Horizons in Cancer Therapies.* Springer.
- **CRUZ, P.; REYES, F.; TORRES, C.** 2018. Simvastatin modulates  $\beta$ -catenin/MDR1 expression on spheres derived from CF41.Mg canine mammary carcinoma cells. *Pol J Vet Sci.* 21(1), 95-99.
- **CUCIELO, M.; FREIRE, P.; EMILIO-SILVA, M.; ROMAGNOLI, G.; CARVALHO, R.; KANENO, R.; HIRUMA-LIMA, C.; DELELLA, F.; REITER, R.; CHUFFA, L.** 2023. Melatonin enhances cell death and suppresses the metastatic capacity of ovarian cancer cells by attenuating the signaling of multiple kinases. *Pathology, research and practice.* 248, 154637.
- **DE FARIA, P.; BRANDI, A.; LEIS, A.; PRADO, M.; KOBAYASHI, P.; LAUFER- AMORIM, R.; FONSECA-ALVES, C.** 2020. Establishment and Characterization of Canine Mammary Gland Carcinoma Cell Lines With Vasculogenic Mimicry Ability in vitro and in vivo. *Front Vet Sci.*7, 802.
- **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.* 60:315
- **FIC, M.; GOMULKIEWICZ, A.; GRZEGRZOLKA, J.; PODHORSKA-OKOLOW, M.; ZABEL, M.; DZIEGIEL, P.; JABLONSKA, K.** 2017. The Impact of Melatonin on Colon Cancer Cells' Resistance to Doxorubicin in an in Vitro Study. *Int. J. Mol. Sci.* 18, 1396.
  - **FLORES, E.; CATTANEO, G.** 2001. Tumores mamarios en caninos domésticos, epidemiología, criterios de diagnóstico y enfoque terapéutico. *Monogr Med Vet.* 21(1).
  - **FRANÇA, E.; HONORIO-FRANÇA, A.; FERNANDES, R.; MARINS, C.; PEREIRA, C.; VAROTTI, P.** 2016. The Effect of Melatonin Adsorbed to Polyethylene Glycol Microspheres on the Survival of MCF-7 Cells. *Neuroimmunomodulation.* 23(1), 27-32.
  - **FRANCO, P.; DO CARMO NETO, J.; MILHOMEM, A.; MACHADO, J.; MIGUEL, M.** 2023. Antitumor effect of melatonin on breast cancer in experimental models: A systematic review. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer.* Volume 1878, Issue 1.
  - **FULAWKA, L.; DONIZY, P.; HALON, A.** 2014. Cancer stem cells - the current status of an old concept: literature review and clinical approaches. *Biol Res.* 47, 1-9.
  - **GOLDSCHMIDT, M.; PEÑA, L.; RASOTTO, R.; ZAPPULLI, V.** 2011. Classification and grading of canine mammary tumors. *Veterinary pathology.* 48(1), 117–131.
  - **GOLDSCHMIDT, M.; PEÑA, L.; ZAPPULLI, V.** 2016. Tumors of the Mammary Gland. *Tumor in domestic animals.* 5ª edición. Raleigh, Carolina del Norte, EE. UU, pp 723- 765.
  - **GONCALVES, N.; COLOMBO, J.; LOPES, J.; GELALETI, G.;**

- MOSCHETTA, M.; SONEHARA, M.; HELLMEN, E.; ZANON, C.; OLIANI, S.; DE CAMPOS ZUCCARI, 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).
- **GOODING, A.; SCHIEMANN, W.** 2020. Programas de transición epitelial-mesenchimatoso y fenotipos de células madre cancerosas: mediadores de la resistencia a la terapia del cáncer de mama. *Mol Cancer Res*. 18 (9): 1257–1270.
  - **HASANABADY, M.; KALALINIA, F.** 2016. ABCG2 inhibition as a therapeutic approach for overcoming multidrug resistance in cancer. *J Biosci*. 41(2), 313-324.
  - **HERMO, G.; RIPOLL, G.; LORENZANO, M.; FARINA, H.; GABRI, M.; TURIK, E.; LAMB, C.; NOVARO, V.; SCURSONI, A.; GOMEZ, D.; ALONSO, D.; GOBELLO, C.** 2005. Tumores de mama en la perra. *Cienc Vet*.7.
  - **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.
  - **HONSCHA, K.; SCHIRMER, A.; REISCHAUER, A.; SCHOON, H.; EINSPANIER, A.; GABEL, G.** 2009. Expression of ABC-transport proteins in canine mammary cancer: consequences for chemotherapy. *Reprod Domest Anim*. 44, 218-223.
  - **HSIEH, M.; LIN, C.; SU, S.; REITER, R.; CHEN, A.; CHEN, M.; YANG, S.** 2020. Effects of miR-34b/miR-892a Upregulation and Inhibition of ABCB1/ABCB4 on Melatonin-Induced Apoptosis in VCR-Resistant Oral Cancer Cells. *Mol Ther Nucleic Acids*. 19: 877-889.
  - **HUANG, Z.; YOU, J.; LUO, W.; CHEN, B.; FENG, Q.; WU, B.; JIANG, L.; LUO, Q.** 2015. Reduced tumorigenicity and drug resistance through the downregulation of octamer-binding protein 4 and Nanog transcriptional factor

- expression in human breast stem cells. *Mol Med Rep.* 11(3), 1647-1654.
- **IM, K.; JANG, Y.; SHIN, J.; KIM, N.; LIM, H.; LEE, S.; KIM, J.; SUR, J.** 2015. CD44+/CD24– Cancer Stem Cells Are Associated With Higher Grade of Canine Mammary Carcinomas. *52(6)*, 1041-1044.
  - **INFOSTAT.** 2008. Manual del Usuario InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba. 1ª Edición, Argentina.
  - **ITURRIAGA, M.; PAREDES, R.; ARIAS, J.; TORRES, C.** 2017. Meloxicam decreases the migration and invasion of CF41.Mg canine mammary carcinoma cells. *Oncol Lett.* 14(2), 2198-2206.
  - **JABLONSKA, K.; PULA, B.; ZEMLA, A.; OWCZAREK, T.; WOJNAR, A.; RYS, J.; AMBICKA, A.; PODHORSKA-OKOLOW, M.; UGORSKI, M.; DZIEGIEL, P.** 2013. Expression of melatonin receptor MT1 in cells of human invasive ductal breast carcinoma. *Journal of pineal research.* 54(3), 334–345.
  - **JARDIM-PERASSI, B.; ARBAB, V.; FERREIRA, A.; CARVALHO, L.; VARMA, T.; ISKANDER, N.; SHANKAR, A.; ALI, A.; DE CAMPOS ZUCCARI, D.** 2014. Effect of Melatonin on Tumor Growth and Angiogenesis in Xenograft Model of Breast Cancer. *PLoS One.* 9(1), 85311.
  - **KANNEN, V.; MARINI, T.; ZANETTE, D.; FRAJACOMO, F.; SILVA, G.; SILVA, W.; GARCÍA, S.** 2011. The melatonin action on stromal stem cells within pericryptal area in colon cancer model under constant light. *Biochem Biophys Res Commun.* 405 (4): 593–8.
  - **KLOPFLEISCH, R.; KOHN, B.; GRUBER, A.** 2016. Mechanisms of tumour resistance against chemotherapeutic agents in veterinary oncology. *Vet J.* 207, 63-72.
  - **KLOPFLEISCH, R.; VON EULER, H.; SARLI, G.; PUNHO, S.; GÄRTNER, F.; GRUBER, A.** 2011. Molecular carcinogenesis of canine mammary tumors: news from an old disease. *Vet Pathol.* 48(1), 98-116.
  - **KONG, X.; GAO, R.; WANG, Z.; WANG, X.; FANG, Y.; GAO, J.; REITER,**

- R.; WANG, J.** 2020. Melatonin: A Potential Therapeutic Option for Breast Cancer. *Trends in Endocrinology & Metabolism*. 31 (11).
- **KORKAYA, H.; LIU, S.; WICHA, M.** 2011. Breast cancer stem cells, cytokine networks, and the tumor microenvironment. *J Clin Invest*. 121(10), 3804.
  - **KOŞAR, P.; NAZIROĞLU, M.; ÖVEY, İ.; ÇİG, B.** 2016. Synergic Effects of Doxorubicin and Melatonin on Apoptosis and Mitochondrial Oxidative Stress in MCF-7 Breast Cancer Cells: Involvement of TRPV1 Channels. *J Membr Biol*. 249(1-2), 129-140.
  - **KUKAL, S.; GUIN, D.; RAWAT, C.; BORA, S.; MISHRA, M.; SHARMA, P.; PAUL, P.; KANOJIA, N.; GREWAL, G.; KUKRETI, S.; SASO, L.; KUKRETI, R.** 2021. Multidrug efflux transporter ABCG2: expression and regulation. *Cell. Mol. Life Sci*. 78, 6887–6939.
  - **LEE, H.; LEE, H.; JUNG, J.; SHIN, E.; KIM, S.** 2018. Melatonin disturbs SUMOylation-mediated crosstalk between c-Myc and nestin via MT1 activation and promotes the sensitivity of paclitaxel in brain cancer stem cells. *J Pineal Res*. 65: 12496.
  - **LEE, W.; FRANK, T.** 2021. Teaching an old dog new tricks: reactivated developmental signaling pathways regulate ABCB1 and chemoresistance in cancer. *Cancer drug resistance*. 4(2), 424–452.
  - **LI, J.; QI, D.; HSIEH, T.; HUANG, J.; WU, J.; WU, E.** 2021. Trailblazing perspectives on targeting breast cancer stem cells. *Pharmacology & Therapeutics*. Volume 223.
  - **LI, J.; ZHOU, B.** 2011. Activation of  $\beta$ -catenin and Akt pathways by Twist are critical for the maintenance of EMT associated cancer stem cell-like characters. *BMC Cancer*. 11.
  - **LITVIAKOV, N.; IBRAGIMOVA, M.; TSYGANOV, M.; KAZANTSEVA, P.; DERYUSHEVA, I.; PEVZNER, A.; GARBUKOV, E.; TARABANOVSKAYA, N.; SLOMINSKAYA, E.** 2020. Amplifications of stemness genes and the capacity of breast tumors for metastasis. *Oncotarget*. 11(21), 1988-2001.

- **LIU, S.; DONTU, G.; WICHA, M.** 2005. Mammary stem cells, self-renewal pathways, and carcinogenesis. *Breast Cancer Res.* 7(3), 86.
- **LOPES, J.; MASCHIO, L.; JARDIM-PERASSI, B.; MOSCHETTA, M.; FERREIRA, L.; MARTINS, G.; GELALETI, G.; DE CAMPOS ZUCCARI, D.** 2015. Evaluation of melatonin treatment in primary culture of canine mammary tumors. *Oncol Rep.* 33(1), 311-319.
- **MAROUFI, N.; AMIRI, M.; DIZAJI, B.; VAHEDIAN, V.; AKBARZADEH, M.; ROSHANRAVAN, N.; HAIATY, S.; NOURI, M.; RASHIDI, M.** 2020a. Inhibitory effect of melatonin on hypoxia-induced vasculogenic mimicry via suppressing epithelial-mesenchymal transition (EMT) in breast cancer stem cells. *European Journal of Pharmacology.* Volumen 881.
- **MAROUFI, N.; ASHOURI, N.; MORTEZANIA, Z.; ASHOORI, Z.; VAHEDIAN, V.; AMIRZADEH-IRANAQ, M.; FATTAHI, A.; KAZEMZADEH, H.; BIZZARRI, M.; AKBARZADEH, M.; NEJABATI, H.; FARIDVAND, Y.; RASHIDI, M.; NOURI, M.** 2020b. The potential therapeutic effects of melatonin on breast cancer: An invasion and metastasis inhibitor. *Pathol Res Pract.* 216 (10).
- **MAROUFI, N.; VAHEDIAN, V.; HEMATI, S.; RASHIDI, M.; AKBARZADEH, M.; ZAHEDI, M.; POUREMAMALI, F.; ISAZADEH, A.; TAEFEHSHOKR, S.; HAJAZIMIAN, S.; SERAJI, N.; NOURI, M.** 2020c. Targeting cancer stem cells by melatonin: Effective therapy for cancer treatment. *Pathol Res Pract.* 216 (5).
- **MARTIN, V.; SANCHEZ, A.; HERRERA, F.; GOMEZ-MANZANO, C.; FUEYO, J.; ALVAREZ-VEGA, M.; ANTOLIN, I.; RODRIGUEZ, C.** 2013. Melatonin-induced methylation of the ABCG2/BCRP promoter as a novel mechanism to overcome multidrug resistance in brain tumour stem cells. *Br J Cancer.* 108(10).
- **MARTÍN, V.; SANCHEZ-SANCHEZ, A.; PUENTE-MONCADA, N.; GOMEZ-LOBO, M.; ALVAREZ-VEGA, M.; ANTOLÍN, I.; RODRIGUEZ, C.** 2014.

Involvement of autophagy in melatonin-induced cytotoxicity in glioma-initiating cells. *Journal of pineal research*, 57(3), 308–316.

- **MICHISHITA, M.** 2020. Understanding of tumourigenesis in canine mammary tumours based on cancer stem cell research. *Vet J.* 265, 105560.
- **MICHISHITA, M.; AKIYOSHI, R.; YOSHIMURA, H.; KATSUMOTO, T.; ICHIKAWA, H.; OHKUSU-TSUKADA, K.; NAKAGAWA, T.; SASASKI, N.; TAKAHASHI, K.** 2011. Characterization of spheres derived from canine mammary gland adenocarcinoma cell lines. *Res Vet Sci.* 91(2), 254-260.
- **MOLOUDIZARGARI, M.; MORADKHANI, F.; HEKMATIRAD, S.; FALLAH, M.; ASGHARI, M.; REITER, R.** 2021. Therapeutic targets of cancer drugs: Modulation by melatonin. *Life Sciences.* Volumen 267.
- **NAKANISHI, T.; ROSS, D.** 2012. Breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2): its role in multidrug resistance and regulation of its gene expression. *Chin J Cancer.* (2): 73-99.
- **PANG, L.; ARGYLE, D.** 2015. The evolving cancer stem cell paradigm: Implications in veterinary oncology. *Vet J.* 205(2), 154-160.
- **PANG, L.; CERVANTES-ARIAS, A.; ELSE, R.; ARGYLE, D.** 2011. Canine Mammary Cancer Stem Cells are Radio- and Chemo-Resistant and Exhibit an Epithelial-Mesenchymal Transition Phenotype. *Cancers (Basel).* 3(2), 1744.
- **PINHO, S.; CARVALHO, S.; CABRAL, J.; REIS, C.; GÄRTNER, F.** 2012. Canine tumors: a spontaneous animal model of human carcinogenesis. *Transl Res.* 159(3), 165-172.
- **PISTIOLI, L.; KATSARELIAS, D.; AUDISIO, R.; BAGGE, R.** 2021. The Intricate Relationship between Melatonin and Breast Cancer: A Short Review. *Chirurgia.* 116 (2).
- **RAMOS, E.; EGEE, J.; LÓPEZ-MUÑOZ, F.; GIL-MARTÍN, E.; ROMERO, A.** 2023. Therapeutic Potential of Melatonin Counteracting Chemotherapy-Induced Toxicity in Breast Cancer Patients: A Systematic

Review. *Pharmaceutics*. 15(6):1616.

- **REITER, R.; SHARMA, R.; TAN, D.; HUANG, G.; DE ALMEIDA, L.; ANDERSON, G.** 2023. Melatonin modulates tumor metabolism and mitigates metastasis. *Expert Review of Endocrinology & Metabolism*, 18:4, 321-336.
- **ROMO, M.** 2016. Efecto de metformina sobre la viabilidad de esferas derivadas de células de carcinoma mamario canino (*Canis lupus familiaris*) CF41.Mg. Memoria de título, Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad de Chile, Santiago, Chile.
- **RYBICKA, A.; KROL, M.** 2016. Identification and characterization of cancer stem cells in canine mammary tumors. *Acta Vet Scand*. 58(1), 86.
- **SADOUGHI, F.; DANA, P.; ASEMI, Z.; SHAFABAKHASH, R.; MOHAMMADI, S.; HEIDAR, Z.; MIRZAMORADI, M.; TARGHAZEH, N.; MIRZAEI, H.** 2022. Molecular and cellular mechanisms of melatonin in breast cancer. *Biochimie*. 202.
- **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. *PLoS One*. 10(5).
- **SERRANO, C.; GUZMAN, S.; ARIAS, J.; TORRES, C.** 2019. Melatonin decreases in vitro viability and migration of spheres derived from CF41.Mg canine mammary carcinoma cells. *BMC Vet Res*. 15(1), 1-6.
- **SLOMINSKI, R.; REITER, R.; SCHLABRITZ-LOUTSEVITCH, N.; OSTROM, R.; SLOMINSKI, A.** 2012. Melatonin membrane receptors in peripheral tissues: distribution and functions. *Mol Cell Endocrinol*. 351(2), 152-166.
- **TANRIOVER, G.; DILMAC, S.; AYTAC, G.; FAROOQI, A.; SINDEL, M.** 2022. Effects of Melatonin and Doxorubicin on Primary Tumor And Metastasis in Breast Cancer Model. *Anti-cancer agents in medicinal chemistry*. 22(10), 1970–1983.
- **TIMMERMANS-SPRANG, E.; COLLIN, R.; HENKES, A.; PHILIPSEN, M.;**

- MOL, J.** 2019. P-cadherin mutations are associated with high basal Wnt activity and stemness in canine mammary tumor cell lines. *Oncotarget*. 10(31), 2930- 2946.
- **TORRES, C.; OLIVARES, A.; SERRANO, C.** 2015. Simvastatin exhibits antiproliferative effects on spheres derived from canine mammary carcinoma cells. *Oncol Rep*. 33(5), 2235-2244.
  - **TORRES, C.; PINO, A.; SIERRALTA, W.** 2009. A cyclized peptide derived from alpha fetoprotein inhibits the proliferation of ER-positive canine mammary cancer cells. *Oncol Rep*. 21(6), 1397-1404.
  - **TRAN, C.; MOORE, A.; FRIMBERGER, A.** 2016. Surgical treatment of mammary carcinomas in dogs with or without postoperative chemotherapy. *Vet Comp Oncol*. 14(3), 252-262.
  - **VALDIVIA, G.; ALONSO, A.; PEREZ-ALENZA, D.; PEÑA, L.** 2021. From Conventional to Precision Therapy in Canine Mammary Cancer: A Comprehensive Review. *Front. Vet. Sci*. 8.
  - **WANG, N.; WANG, Z.; PENG, C.; YOU, J.; SHEN, J.; HAN, S.; CHEN, J.** 2014. Dietary compound isoliquiritigenin targets GRP78 to chemosensitize breast cancer stem cells via  $\beta$ -catenin/ABCG2 signaling. *Carcinogenesis*. 35(11), 2544-2554.
  - **WANG, X.; ZHANG, H.; CHEN, X.** 2019. Drug resistance and combating drug resistance in cancer. *Cancer Drug Resist*. 2(2), 141-160.
  - **XIANG, S.; DAUCHY, R.; HOFFMAN, A.; POINTER, D.; FRASCH, T.; BLASK, D.; HILL, S.** 2019. Epigenetic inhibition of the tumor suppressor ARHI by light at night-induced circadian melatonin disruption mediates STAT3-driven paclitaxel resistance in breast cancer. *Journal of pineal research*. 67(2), e12586.
  - **YU, Z.; PESTELL, T.; LISANTI, M.; PESTELL, R.** 2012. Cancer Stem Cells. *Int J Biochem Cell Biol*. 44(12), 2144-2155.
  - **ZHAN, T.; RINDTORFF, N.; BOUTROS, M.** 2017. Wnt signaling in cancer.

Oncogene. 36(11), 1461-1473.

- **ZHANG, H.; XIANG, J.; YI, B.; YE, B.** 2023. Overcoming Multidrug Resistance by Base-Editing-Induced Codon Mutation. *ACS pharmacology & translational science*. 6 (5), 812–819.
- **ZHANG, R.; TU, J.; LIU, S.** 2022a. Novel molecular regulators of breast cancer stem cell plasticity and heterogeneity. *Seminars in Cancer Biology*. 82.
- **ZHANG, T.; ZHOU, H.; WANG, K.; WANG, X.; WANG, M.; ZHAO, W.; XI, X.; LI, Y.; CAI, M.; ZHAO, W.; XU, Y.; SHAO, R.** 2022b. Role, molecular mechanism and the potential target of breast cancer stem cells in breast cancer development. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 147.
- **ZHAO, H.; WANG, Y.; YUAN, B.; LIU, B.; MAN, S.; XU, H.; LU, X.** 2016. A novel LC-MS/MS assay for the simultaneous determination of melatonin and its two major metabolites, 6-hydroxymelatonin and 6-sulfatoxymelatonin in dog plasma: Application to a pharmacokinetic study. *J Pharm Biomed Anal*. 117, 390-397.

## 9. MATERIAL COMPLEMENTARIO

Tabla 2. Partidores utilizados para el análisis de expresión génica mediante qRT- PCR (Maroufi *et al.*, 2020a).

Gen	Número de acceso de Genbank	Secuencias de pares de cebadores
$\beta$ - ACTINA	<u>NC_000071.7</u>	FWD: 5'-CAAATGTGGATCAGCAAGCAG-3' REV: 5'-GAAAGGGTGTAACGCAACTAAAG-3'
MDR1	<u>NC_006596.2</u>	FWD: 5'-ACAGGAGATTGGCTGGTTTG-3' REV: 5'-AAGTCCAAGAACAGGGCTGA-3'
ABCG2	<u>NC_006614.2</u>	FWD: 5'-GACCTCCAACGACCTGAAGA-3' REV: 5'-GAAGATTTGCCTCCACCTGT-3'

Tabla 3. Partidores utilizados para el análisis de expresión génica mediante qRT- PCR (Maroufi *et al.*, 2020a).

Gen	Secuencias de pares de cebadores
MT1	FWD: 5'-TGTGCTTTCTAAACCTTTCTCCT-3' REV: 5'-CACGAAGCCACTGATTTGGC-3'
MT2	FWD: 5'-CTTGCTGACTTTTGCTCCCT-3' REV: 5'-CGAATGACACTCAGCCCCAT -3'