

Jeferson Araújo Gonçalves

EFEITO DA LEPTINA EM CÉLULAS DE CÂNCER DE MAMA

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre

Orientador: Prof. Dr. Arianne Zamoner Pacheco de Sousa

Coorientador: Prof. Dr. Fabíola Branco Filippin Monteiro

Florianópolis/SC  
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária  
da UFSC.

Gonçalves, Jeferson Araújo

Avaliação do efeito tumoral da leptina na modulação funcional do microambiente tumoral em câncer de mama / Jeferson Araújo Gonçalves ; orientadora, Ariane Zamoner Pacheco Sousa ; coorientadora, Fabíola Branco Filippin Monteiro. - Florianópolis, SC, 2016.

84 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós Graduação em Farmácia.

Inclui referências

1. Farmácia. 2. Leptina. 3. Receptor de leptina (LepR, Ob-R). 4. Estradiol. 5. Microambiente. I. Sousa, Ariane Zamoner Pacheco. II. Monteiro, Fabíola Branco Filippin. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmácia. IV. Título.

Jeferson Araújo Gonçalves

EFEITO DA LEPTINA EM CÉLULAS DE CÂNCER DE MAMA

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de Mestre, e aprovada em sua forma final pelo Programa Pós-Graduação em Farmácia

Florianópolis, 29 de fevereiro de 2016.

---

Prof<sup>ª</sup>, Dra. Tânia Beatriz Creczynski Pasa  
Coordenador do Curso

**Banca Examinadora:**

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ariane Zamoner Pacheco Souza  
Orientadora  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Prof.<sup>ª</sup>. Dr.<sup>ª</sup>. Lilian Sibelle Campos Bernardes  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Prof.<sup>ª</sup>. Dr.<sup>ª</sup>. Fátima Regina Mena Barreto Silva  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Prof.<sup>ª</sup>. Dr.<sup>ª</sup>. Áurea Elisabeth Linder  
Universidade Federal de Santa Catarina

Dedico este trabalho à minha amada esposa e à minha família e, em especial à minha querida mãe que nunca me deixou baixar a cabeça diante dos desafios.



## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente agradeço a Deus pelo estímulo e curiosidade em procurar na ciência a compreensão e a busca do conhecimento. Em especial agradeço a minha adorável esposa, Letícia F. S. Gonçalves que no silêncio e na ternura de seu amor me encoraja diariamente nesta minha infundável busca.

Agradeço à professora Ariane Zamoner Pacheco Souza que aceitou o desafio de orientar este trabalho, agradeço à participação da professora Fabíola Branco Filippin Monteiro pela contribuição com sua visão e experiência.

Agradeço à professora Tânia Beatriz Creczynski Pasa, a qual me acolheu amistosamente no seu grupo e contribuiu efetivamente, não somente com sua experiência profissional, mas também com sua experiência de vida.

E, finalmente, agradeço aos meus Irmãos e Irmãs de laboratório, os quais nos momentos mais difíceis, ali estiveram para me suportar, aconselhar e apoiar, não somente no trabalho, mas também no coração.

Agradeço aos membros da banca pela disponibilidade em avaliar e contribuir com este trabalho.

Ao programa de pós-graduação em farmácia da UFSC que possibilitou a implementação deste trabalho.

Sou também grato aos órgãos que garantiram o suporte financeiro deste projeto CNPQ, CAPES e FAPESC.



O ensino não deve ter sentido apenas, mas efeito duradouro, que possa trazer bênçãos não só para aqueles que o aceitam como também para os que estão “longe”, ou seja, aqueles que ainda serão alcançados pela Palavra.

(Messias Braz Santos, 2010)





## RESUMO

A leptina é um hormônio produzido pelo tecido adiposo, participa da regulação da homeostase energética e pode atuar em diversos processos fisiológicos no organismo. A leptina atua via receptor transmembrana e acessa diversas vias de transcrição no núcleo celular, que podem estimular efeitos mitogênicos no microambiente da mama. Por esta razão, a leptina, produzida proporcionalmente ao tecido adiposo, relaciona a obesidade ao câncer de mama. No entanto, a leptina é parte de uma rede de sinalização e pode interagir com diversos componentes do microambiente, tal como o estradiol, outro hormônio com atividade mitogênica. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito em diferentes concentrações de leptina, estradiol e na combinação leptina-estradiol nas linhagens celulares de câncer de mama: a MCF-7 (estrógeno-sensível), MDA-MB-231 (insensível ao estrógeno) e em co-cultura com linhagem murina de câncer de mama 4T1 incubada com adipócitos. A leptina 100 ng/mL e a combinação leptina-estradiol 100 ng-pg/mL estimularam a proliferação na linhagem MCF-7. A leptina estimulou a migração na MDA-MB-231 incubada na concentração de 1000 ng/mL de leptina, mas não afetou o ciclo celular em nenhuma das linhagens. Na co-cultura entre a linhagem 4T1 e adipócitos incubados com leptina 100 ng/mL, estradiol 100 pg/mL e a combinação leptina-estradiol nas respectivas concentrações, foi observado tendência no aumento da expressão de IL-6 e IGF-1. Em ensaio para avaliar o efeito da viabilidade celular em cultura de MCF-7 e MDA-MB-231 incubadas com doxorrubicina, foi observado que os hormônios, nas concentrações supracitadas, reduziram o valor da  $CC_{50}$  da doxorrubicina. Contrariamente, na linhagem MCF-7, incubada nas mesmas condições da MDA-MB-231, porém com o tamoxifeno, fármaco inibidor do receptor de estradiol, os hormônios aumentaram a  $CC_{50}$  do tamoxifeno. Portanto, em conjunto, os resultados sugerem que a leptina desempenha papel importante na proliferação e viabilidade de células de câncer de mama, reforçando estudos prévios que apontam a existência de uma possível correlação entre obesidade e o câncer de mama.

Palavras-chave: leptina, receptor de leptina (LepR, Ob-R), estradiol, microambiente.



## ABSTRACT

Leptin is hormone produced by adipose tissue and plays an important role in the balance of energy homeostasis. Leptin acts through its receptor to control many routes of transcription in the cell nucleus, which induces proliferation, migration, adhesion and cell cycle regulation. For this reason, obesity can be associated with breast cancer, because leptin is proportionally produced by adipose tissue. However, leptin integrates a web of signalization which molds the microenvironment of the breast, and interacts with many others mitogenic compounds, as estrogen, a hormone with proliferative action in the context of the breast cancer. Under these circumstances, the aim of this work is evaluate the effects of leptin, estradiol and their combination in diferents concentrations in the breast cancer cell lines: MCF-7 (estrogen-sensitive cell), MDA-MB-231 (estrogen-insensitive cell) and coculture with 4T1 and adipocytes. MCF-7 cell line incubated, with leptin 100 ng/mL and the combination of leptin-estradiol 100 ng-pg/mL, was induced to proliferate in 48 hours. As for to the MDA-MB-231, which was induced to migrate after incubation with leptin 1000 ng/mL for 48 hours. Leptin, estradiol and the combination of leptin-estradiol did not change the cell cycle of both cell lines. The 4T1 cell line in coculture with adipocyte incubated with leptin 100 ng/mL, estradiol 100 pg/mL and the combination of leptin-estradiol in the respective concentration reveled a tendency to increase the expression of IL-6 and IGF-1. In the viability assay with MCF-7 and MDA-MB-231 treated with doxorubicin, was observed that, leptin 100 ng/mL, estradiol 100 pg/mL and the combination of leptin-estradiol in the respective concentration, decreased the IC50 compared to control. In contrast, the cell line MCF-7 incubated in the same conditions with hormones, but with tamoxifen, showed an increase in the IC50 compared to control. In conclusion, the data suggest a proliferation and viability role of leptin in the breast cancer cells, supporting previous studies in the literature which demonstrated the existence of a possible correlation between obesity and breast cancer.

Keywords: leptin, leptin receptor (LepR, Ob-R), estradiol, microenvironment.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Isoformas dos receptores de leptina.....	29
<b>Figura 2</b> – Ação da leptina nos neurônios anorexigênicos e orexigênicos.....	30
<b>Figura 3</b> – Vias de sinalização celular da leptina.....	32
<b>Figura 4</b> – Efeito sistêmico da leptina em órgãos e tecidos.....	33
<b>Figura 5</b> – Leptina aumenta a expressão de estradiol no microambiente da mama.....	35
<b>Figura 6</b> – Efeito da leptina e do estradiol na migração celular.....	36
<b>Figura 7</b> – Moléculas do tamoxifeno e doxorrubicina.....	39
<b>Figura 8</b> – Avaliação da proliferação celular em linhagens de células tumorais MCF-7 e incubadas com os hormônios leptina e estradiol.....	51
<b>Figura 9</b> – Avaliação da proliferação celular em linhagens de células tumorais MDA-MB-231 incubadas com os hormônios leptina e estradiol.....	53
<b>Figura 10</b> – Avaliação do efeito da leptina, do estradiol e da combinação leptina-estradiol nas fases do ciclo celular das linhagens MCF-7 e MDA-MB-231 .....	54
<b>Figura 11</b> – Avaliação do efeito da leptina, do estradiol e da combinação leptina-estradiol nas fases do ciclo celular das linhagens MCF-7 e MDA-MB-231 .....	57
<b>Figura 12</b> – Avaliação do efeito da leptina, do estradiol e da combinação dos hormônios na migração da linhagem celular MDA-MB-231.....	59
<b>Figura 13</b> – Avaliação do efeito da leptina, do estradiol e da combinação dos hormônios na migração da linhagem celular MCF-7 .....	60
<b>Figura 14</b> – Determinação das citocinas em sobrenadante de co-cultura entre linhagem tumoral 4T1 e adipócitos.....	64
<b>Figura 15</b> – Ensaio de viabilidade com MDA-MB-231 avaliando o efeito na curva de doxorrubicina com DMEM +10% SBF sem SBF .....	66
<b>Figura 16</b> – Avaliação dos efeitos dos hormônios com meio com SR2, ou com e sem SBF .....	67
<b>Figura 17</b> – Avaliação do efeito dos hormônios em ensaio de viabilidade celular em linhagem celular MDA-MB-231 tratada com doxorrubicina .....	69
<b>Figura 18</b> – Avaliação do efeito dos hormônios em ensaio de viabilidade celular em linhagem celular MCF-7 tratada com doxorrubicina .....	70
<b>Figura 19</b> – Avaliação do efeito dos hormônios na viabilidade celular da MCF-7 tratada com tamoxifeno .....	71



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AgRP – Agouti-Related peptide  
AMPK – Proteína Cinase Ativada por AMP  
AP-1 – Fator de transcrição nuclear  
ARC – Arcuate Nucleus ou Núcleo Arqueado  
CART – Transcrito regulado pela cocaína e anfetamina  
CC<sub>50</sub> – Concentração capaz de matar 50% da população de células  
CREB – Elemento de ligação a proteínas de resposta ao AMPc  
CRTC2 – Coativador de transcrição ativado por CREB-2  
Dx - Doxorrubicina  
Es – Estradiol  
ER – Receptores de estradiol  
ERK – Cinase regulada por sinais sinais extracelular  
E10 – Estradiol 10 pg/mL  
E100 – Estradiol 100 pg/mL  
E1000 – Estradiol 1000 pg/mL  
JAK – Janus Cinase  
IGF-1 – Fator de crescimento semelhante à insulina  
IL-6 – Interleucina-6  
IRS – Adaptador de Substrato de Insulina  
Lep – Leptina  
LepR – Receptores de leptina  
L10 – Leptina 10 ng/mL  
L100 – Leptina 100 ng/mL  
L1000 – Leptina 1000 ng/mL  
LE10 – Leptina 10 ng/mL + Estradiol 10 pg/mL  
LE100 – Leptina 100 ng/mL + Estradiol 100 pg/mL  
LE1000 – Leptina 1000 ng/mL + Estradiol 1000 pg/mL  
MAPK - Proteína cinase ativada por mitógeno  
NPY – Neuropeptídeo Y  
Ob-R – Receptor da obesidade, sinônimo para LepR  
PI3K – Fosfatidoinositol-3-cinase  
PONC – Pro-opiomelanocortin  
PPAR – Proteínas receptoras de hormônios  
PTP1B – Fosfotirosina Fosfatase-1B  
SBF – Soro Bovino Fetal  
SH-2 – Domínio contendo tirosina cinase  
SOCS – Supressor de Sinalização de Citocina  
STAT – proteína Transdutora de Sinal e Ativação de Transcrição  
STK11 - Cinase Serina-Treonina 11



TNF-alfa – Fator de necrose tumoral-alfa

Tx – Tamoxifeno

VEGF – Fator de Crescimento Endotelial

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>21</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>25</b>
2.1 CÂNCER.....	25
2.2 CÂNCER DE MAMA É UMA DOENÇA MULTIFATORIAL ....	25
2.3 A INFLUÊNCIA DO TECIDO ADIPOSEO .....	27
2.4 LEPTINA .....	27
2.5 RECEPTORES DE LEPTINA.....	28
2.6 SINALIZAÇÃO CELULAR DA LEPTINA .....	30
2.7 AÇÃO SISTÊMICA DA LEPTINA .....	31
2.8 LEPTINA E O MICROAMBIENTE DO CÂNCER DE MAMA ..	33
2.9 LEPTINA E O MICROAMBIENTE NA FARMACOTERAPIA DO CÂNCER DE MAMA .....	38
<b>3 OBJETIVOS .....</b>	<b>41</b>
3.1 OBJETIVO GERAL.....	41
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	41
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>43</b>
4.1 REAGENTES.....	43
4.2 CULTURA DE CÉLULAS.....	43
4.3 ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR COM AZUL DE TRYPAN.....	44
4.4 ENSAIO DE CICLO CELULAR.....	44
4.5 ENSAIO DE MIGRAÇÃO CELULAR (SCRATCHING).....	45
4.6 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR POR RESAZURINA SÓDICA.....	46
4.7 ENSAIO DE CO-CULTURA COM 4T1 E ADIPÓCITOS DE CULTURA PRIMÁRIA.....	46
4.8 IMUNOENSAIO PARA DOSAGENS DE IL-6, TNF-ALFA, IGF- 1, ADIPONECTINA E LEPTINA MURINO .....	47
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>49</b>
5.1 A LEPTINA E A SUA COMBINAÇÃO COM ESTRADIOL INDUZEM A PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS DE CÂNCER DE MAMA DA LINHAGEM MCF-7 APÓS 48 HORAS DE TRATAMENTO .....	49

5.2 A LEPTINA, ESTRADIOL E A COMBINAÇÃO LEPTINA-ESTRADIOL NÃO ALTERAM O CICLO CELULAR DE CÉLULAS DE CÂNCER DE MAMA APÓS 48 HORAS DE TRATAMENTO ...	53
5.3 A LEPTINA EM CONDIÇÕES SUPRAFISIOLÓGICAS (FARMACOLÓGICAS) FAVORECE A MIGRAÇÃO DE CÉLULAS DA LINHAGEM MDA-MB-231.....	58
5.5 A LEPTINA, O ESTRADIOL E COMBINAÇÃO LEPTINA-ESTRADIOL REDUZ A $CC_{50}$ DA DOXORRUBICINA NAS LINHAGENS MCF-7 E MDA-MB-231, MAS AUMENTA A $CC_{50}$ DO TAMOXIFENO E EXERCE EFEITO PROTETIVO NA LINHAGEM MCF-7.....	64
<b>6 CONCLUSÃO .....</b>	<b>73</b>
<b>7 PERSPECTIVAS.....</b>	<b>75</b>
<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>77</b>







## 1 INTRODUÇÃO

O câncer é uma doença antiga que ultrapassou séculos da história da humanidade até que pudesse ser compreendida e definida. O avanço da ciência e os estudos realizados sobre o câncer permitiram à sociedade científica compreender que o câncer não é uma única doença, mas sim um conjunto de doenças com uma característica em comum: o crescimento e a proliferação desordenada de células que podem se estabelecer em órgãos e tecidos formando os tumores, ou migrar para outros sítios do organismo, caracterizando a metástase (OMS, 2015, INCA, 2015). O câncer é uma doença multifatorial que pode ser desencadeada por diversos estímulos, desde fatores relacionados ao estilo de vida de cada pessoa (tabagismo, sedentarismo, dieta não balanceada), fatores ambientais (poluição, exposição à radiação, ou produtos tóxicos) e, até mesmo por fatores inerentes à fisiologia do próprio organismo (fatores hereditários, ou doenças) (DALAMAGA et al., 2012).

O câncer de mama se enquadra a este contexto com algumas particularidades. De acordo com o INCA (2015), o câncer de mama afeta tanto os homens, quanto as mulheres, no entanto a prevalência no homem é em torno de 1%. Em função desta prevalência, fica evidente que o gênero feminino é mais suscetível ao desenvolvimento do câncer de mama, pois para 2015 foram estimados mais de 50.000 casos de câncer de mama pelo Ministério da Saúde. Esse dado corresponde a aproximadamente 20% dos casos de câncer que acometem o gênero feminino e coloca o câncer de mama em primeiro lugar entre os cânceres que mais afetam as mulheres. A suscetibilidade pode estar associada à fisiologia feminina, por exemplo, a exposição ao estrogênio, um hormônio produzido nos ovários com função de modular o desenvolvimento dos órgãos genitais feminino, o crescimento do endométrio e à inibição do hormônio folículo estimulante (BOONYARATANAKORNKIT e PATEETIN, 2015), e utilizado também em terapias de reposição hormonal (INCA, 2015 e OMS, 2015). Além disso, como o câncer de mama é mais comum em mulheres e, até os 35 anos é mais raro, com o processo de senilidade, a mulher tem uma tendência em ter uma redução da massa muscular e consequente aumento do tecido adiposo (SIPILÄ, 2003). O aumento do tecido adiposo pode representar um risco ao desenvolvimento do câncer de mama (DALAMAGA, 2013), pois o tecido adiposo libera adipocinas (peptídeos e proteínas) capazes de modular diversas vias de transcrição, entre elas as vias de proliferação celular por intermédio da leptina – uma

proteína que atua primariamente no equilíbrio do balanço energético do organismo (ANDÔ e CATALANO, 2012).

O papel clássico da leptina consiste em atuar no controle do gasto energético e na captação de alimento. A leptina atua sobre os neurônios anorexigênicos e neurônios orexigênicos (UPADHYAY et al, 2015). A concentração sérica da leptina é diretamente proporcional à massa de tecido adiposo, portanto, quanto maior a quantidade de células adiposa, maior será a presença de leptina (SAXENA et al., 2013). O aumento da massa de tecido adiposo ocorre naturalmente com o processo de senilidade. Contudo, também ocorre devido à má alimentação, comportamento sedentário e doenças como o diabetes, resultando então a obesidade, que pode ser considerada um dos fatores de risco para o câncer de mama em função dos efeitos mitogênicos da leptina, como discutido amplamente na literatura (DALAMAGA, 2012, DELORT et al, 2015 NEWMAN e GONZALES-PERES, 2013, RAY et al, 2007).

Desde sua descoberta em meados da década de 1990, tem-se demonstrado que a leptina exerce efeito direto sobre diversos órgãos e tecidos. A leptina atua no cérebro regulando o apetite e a saciedade, atua no sistema imune mediando quimiotaxia de células imunológicas, interfere na sensibilidade à insulina e permite o tecido adiposo modular diversos microambientes no organismo e, dentre estes, o microambiente da mama onde se podem desenvolver células tumorais (BLÜHER e MANTZOROS, 2015).

A leptina exerce seu efeito mediante interação com o receptor de leptina (LepR) e, partir deste, desencadeia uma cascata de fosforilação capaz de induzir a proliferação, a migração, diferenciação e crescimento celular. Eventos que favorecem o estabelecimento de células tumorais na mama (MÜNZBER e MORRISON, 2015). A ação da leptina não se restringe ao estímulo celular, a ação pode modular o microambiente tornando-o pró-inflamatório por somatizar os efeitos gerados por citocinas, como a IL-6 e IGF-1, que articulam efeitos moduladores semelhantes aos da leptina.

Assim, se a leptina desempenha papel modulador no microambiente tumoral, a pergunta que este trabalho procurou responder foi: qual seria o efeito exercido pela leptina no microambiente sob o efeito de fármacos usados para tratar o câncer de mama, tal como o tamoxifeno e o doxorrubicina, quimioterápicos de primeira escolha usados em tratamentos de câncer de mama (INCA, 2001). O tamoxifeno é um inibidor dos receptores de estradiol e compete com o estradiol pelo receptor ER-alfa no citoplasma celular. Além de inibir o efeito proliferativo do estradiol, o tamoxifeno desempenha um papel citotóxico



nas células tumorais. Quanto à doxorubicina, seu mecanismo primário consiste em inibir a topoisomerase 1, enzima responsável por manter a integridade da fita de DNA durante o processo de síntese de DNA.

Por este motivo, o foco deste trabalho foi avaliar o efeito da leptina nas linhagens celulares de câncer de mama MCF-7 sensível ao estrógeno e a MDA-MB-231, insensível de estrógeno. Portanto, o objetivo deste trabalho foi simular um microambiente tumoral sob o efeito da leptina e sua combinação com estradiol (hormônios relacionados ao aumento do tecido adiposo) podem modular a proliferação, a progressão do ciclo, migração e secreção de citocinas proliferativas em células de câncer de mama com diferentes fenótipos.



## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 CÂNCER

O câncer é um conjunto de diversas doenças que possui como característica comum o crescimento e a proliferação desordenada de células, que podem se estabelecer em órgãos e tecidos formando os tumores, ou migrar para outros sítios do organismo, caracterizando a metástase.

Indiferente ao gênero, à classe social e etnias, o câncer assumiu diferentes formas e capacidades de se desenvolver, de forma que se tornou uma doença dinâmica e global. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS, 2015), cerca de 8,2 milhões de pessoas morre de câncer a cada ano, o que representa pouco mais de 10% das mortes em todo o mundo. Enquanto que no Brasil, o Instituto Nacional do Câncer (INCA) estimou para o ano de 2016 aproximadamente 600 mil casos novos.

### 2.2 CÂNCER DE MAMA É UMA DOENÇA MULTIFATORIAL

O câncer não faz distinção entre gêneros, embora haja cânceres que são mais comuns em homens, e outros em mulheres, como no caso do câncer de mama, o qual apresenta maior prevalência no sexo feminino. De acordo com o INCA (2015), das 14.388 mortes causadas por câncer de mama em 2013, 181 foram em homens, enquanto que 14.207 acometeram mulheres. Em função desta prevalência, fica evidente que o gênero feminino é mais suscetível ao desenvolvimento do câncer de mama.

Todavia, o gênero não é o único fator de risco a expor a mulher ao câncer de mama. Diversos outros fatores relacionados à fisiologia da mulher também podem representar algum risco ao desenvolvimento de tumor na mama. Primariamente há fatores hereditários como histórico familiar, em destaque aqueles com mutações nos genes BRCA1 e BRCA2. O gene BRCA1 codifica fosfoproteínas responsáveis pela manutenção e estabilidade genômica no processo de supressão tumoral. A codificação de proteínas pelo BRCA1 pode se combinar a outros supressores tumorais: sensores de danos ao DNA e proteínas transdutoras de sinal para assim formar um complexo proteico conhecido como o Complexo de Sobrevivência Associado ao Genoma BRCA1 (BASC), responsável por corrigir possíveis erros no DNA (WANG et al., 2000). Semelhantemente, o gene BRCA2, também envolvido na manutenção e estabilidade, em particular via RAD51 (uma proteína essencial no pareamento homólogo do DNA) que basicamente

atua como uma recombinase ressintetizando o dano da região afetada do DNA (ESASHI et al., 2007 e LE CALVEZ-KELM et al., 2012).

Além de fatores genéticos, há fatores intrínsecos à fisiologia feminina que podem ser considerados fatores de risco: menarca precoce, menopausa tardia e terapias de reposição hormonal, provavelmente devido à exposição prolongada ao estrógeno (INCA, 2015 e OMS, 2015).

O estrogênio faz parte de uma classe de esteroides secretados pelos ovários. Sua função primária está associada ao desenvolvimento dos órgãos genitais feminino, ao crescimento do endométrio e à inibição do hormônio folículo estimulante. Além disso, os estrogênios estão associados às respostas inflamatórias, ao efeito protetivo contra estresse oxidativo e dano muscular, e ainda desempenham papel importante na estimulação da proliferação e crescimento celular. Sua ação parte da interação com receptores de estrógenos (ER-alfa e ER-beta). O ER-alfa encontra-se expresso em diversos órgãos: útero, ovário, mama, ossos, tecido adiposo, enquanto que o ER-beta pode estar expresso no colón, na medula óssea, e no tecido epitelial (HORSTMAN et al., 2012).

Os hormônios estradiol e estriol, dois estrogênios produzidos entre a puberdade e a faixa etária dos 20 anos, apresentam ação proliferativa em experimentos *in vitro* com linhagens celular T47 e MCF-7 de câncer de mama que expressam receptores de estrógeno (DILLER et al., 2014). Por esta evidência, compreende-se o porquê da exposição da mulher aos efeitos proliferativos do estrógeno ser considerada um fator de risco ao desenvolvimento do câncer de mama.

O estradiol, em particular, tem sido usado em terapias de reposição hormonal por ter a propriedade de auxiliar no reparo do tecido muscular e em processos regenerativos ao agir como antioxidante, e ainda atuar na manutenção do tecido ósseo por controlar a ação dos osteoblastos. Ou seja, durante o processo de senilidade, a mulher tem uma tendência a diminuir a massa muscular e, naturalmente aumentar a massa de tecido adiposo, de maneira que o uso do estradiol pode apresentar benefícios na manutenção e prevenção da saúde da mulher (SIPILÄ, 2003). Embora muitos estudos sejam controversos a respeito da terapia de reposição hormonal oferecer um risco ao desenvolvimento do câncer de mama, o INCA e a OMS consideram-na um potencial fator de risco, devido aos efeitos proliferativos do estradiol.

A inversão promovida pela senilidade causada pela diminuição da massa muscular e aumento da massa de tecido adiposo tem merecido destaque no contexto do câncer de mama, pois este fenômeno pode ser intensificado por fatores comportamentais, tais como tabagismo,

sedentarismo e má alimentação; o resultado seria o sobrepeso e consequente obesidade, a qual é reconhecidamente um grave problema de saúde pública que afeta expressiva parcela da população em países industrializados, além de que, diversos estudos tem relacionado a obesidade como fator de risco para o câncer de mama, justamente em função do aumento da massa de tecido adiposo (DALAMAGA, 2013).

### 2.3 A INFLUÊNCIA DO TECIDO ADIPOSEO

Conceitualmente o tecido adiposo era compreendido por sua função de armazenamento de energia. Contudo, a funcionalidade do tecido adiposo foi ampliada à medida que citocinas, liberadas por adipócitos, também chamadas de adipocinas, foram sendo identificadas e suas funções descritas em processos fisiológicos e patológicos (DALAMAGA et al., 2012).

As adipocinas são um conjunto de proteínas produzidas e liberadas pelo tecido adiposo e que não pertencem a um grupo funcional em particular. Podem desempenhar funções relacionadas à regulação do apetite e homeostase energética, imunidade, sensibilidade à insulina, angiogênese e metabolismo lipídico, alguns exemplos são a leptina, a adiponectina, a IL-6, o TNF-alfa (TRAYHURN e WOOD, 2004).

A leptina em particular, foi a primeira adipocina identificada na década de 1990 pelo grupo do pesquisador Jeffrey M Friedman, e que mais tarde permitiu ampliar a concepção de que o tecido adiposo poderia ser um sítio de secreção de proteínas e não somente um tecido armazenador de energia (ZHANG et al., 1994). Com o avanço dos estudos e a compreensão da ação da leptina, diversas outras adipocinas foram sendo identificadas e estudadas nas duas últimas décadas (BLÜHER e MANTZOROS, 2015).

### 2.4 LEPTINA

A leptina é uma proteína de 16 kDa formado por 167 aminoácidos que desempenha o papel de um hormônio (MADEJ et al., 1995). O tecido adiposo maduro secreta majoritariamente a leptina, embora outros tecidos e órgãos também a possam produzir em quantidades pequenas, como no caso da placenta, mucosa gástrica, medula óssea, epitélio mamário, músculo esquelético, glândula pituitária, hipotálamo e tecido ósseo (FRÜHBECK, 2006).

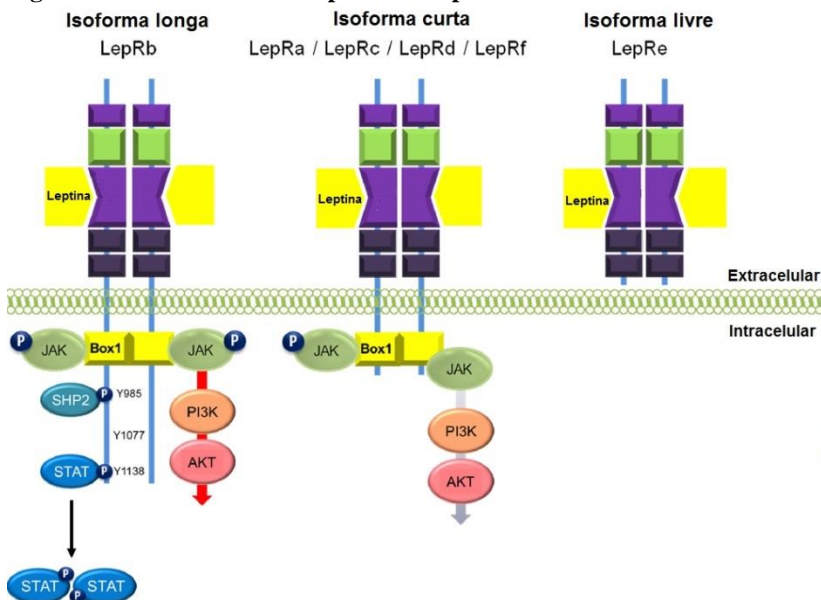
Um dos primeiros trabalhos sobre a ação da leptina avaliou seu efeito em ensaio *in vivo*: experimentos com leptina recombinante a partir de *Escherichia coli*, demonstrou que a leptina exercia efeito regulatório no ganho e perda de peso de camundongos e, que este efeito estava

relacionado ao sistema nervoso central (CAMPFIELD et al., 1995), além disso, foi demonstrado que a leptina desencadeava o efeito mediante interação com receptores de leptina (TARTAGLIA et al., 1995).

## 2.5 RECEPTORES DE LEPTINA

Os LepR são proteínas transmembranas codificadas a partir dos genes da família gp130 responsáveis pela expressão dos receptores classe 1 de citocina (TARTAGLIA et al., 1995; SAITO et al., 1992). Os LepRs são expressos em seis isoformas LepR (a-f) e podem ser divididos em três grupos: isoforma longa, representado pelo LepRb, isoformas curtas (LepR a, c, d, f) e a isoforma livre LepRe (Figura 1), sendo que esta última atua na regulação sérica e no carreamento da leptina aos seus sítios de ação (GORSKA et al., 2010). Os receptores de leptina apresentam três regiões distintas: extracelular, constituída de 816 aminoácidos, uma região transmembrana com 34 aminoácidos e a região intracelular que pode variar de 32 a 303 aminoácidos, ou seja, a porção intracelular varia no comprimento e composição. A região extracelular possui a porção N-terminal onde se localiza o domínio de ligação da leptina, enquanto que na região intracelular localiza-se a porção terminal-carboxil. Os receptores podem ser encontrados no cérebro e nos tecidos periféricos, onde todas as isoformas também são encontradas (GARCIA-ROBLES et al., 2013 e PARK e AHIMA, 2014).

**Figura 1 – Isoformas dos receptores de leptina**



Adaptado de Kwon et al (2016) – variedade de isoformas de LepR, sendo a LepRb a possuidora da porção intracelular mais longa e, LepRe a isoforma livre responsável pela manutenção da leptina sérica.

O papel clássico da leptina relaciona-se à regulação da captação de alimentos e gastos de energia, ao atuar em neurônios responsáveis pelo controle da saciedade. A Leptina inibe a produção do neuropeptídeo Y (NPY) e do peptídeo agouti-relacionado (AgRP) e estimula produção do Pró-ópiomelanocortina (POMC) e do peptídeo transcrito regulado pela cocaína e anfetamina (CART) que resulta na diminuição da captação de alimentos (SCHWARTZ et al., 1996, AHIMA et al., 1999 e COWLEY et al., 2001). Ou seja, a leptina interage com LepR nos neurônios anoréxicos e estimula o POMC e CART, os quais modulam a resposta da saciedade reduzindo a captação de alimento e aumentando o gasto de energia, enquanto que, também inibe os neurônios orexígenos, produtores de AgRP e NPY, neuropeptídios que estimulam captação de alimento e consequente diminuição do gasto de energia, de forma a contribuir e desempenhar importante papel na homeostase energética (Figura 2).



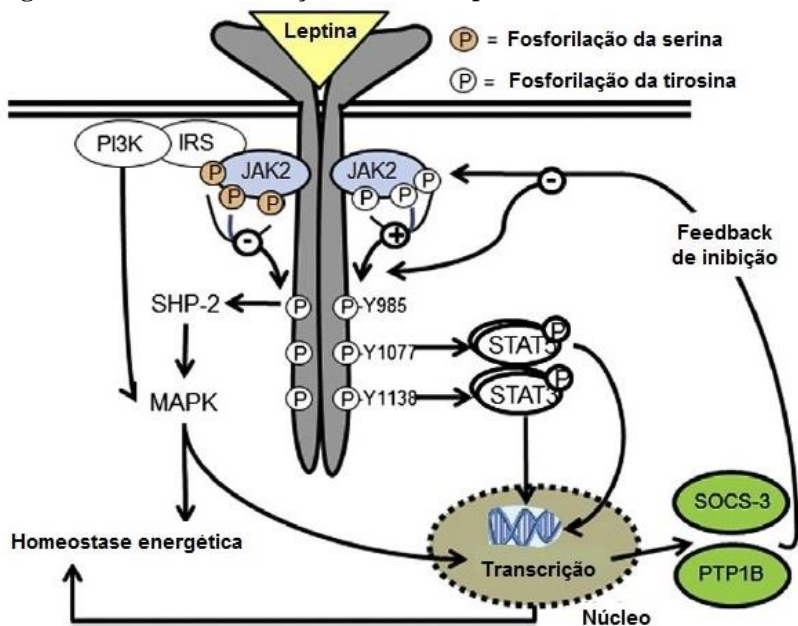


citoplasmática do receptor e, consequente fosforilação dos resíduos de aminoácido Y985, Y1077 e Y1138, de onde as vias das STATs são fosforiladas e então estimulam diversas rotas de transcrição no núcleo celular: incluindo, o aumento da expressão das proteínas Fosfotirosina Fosfatase-1B (PTP1B) e Supressor de Sinalização de Citocina (SOCS-3), responsáveis pelo feedback de inibição da ação da leptina, de forma que o aumento destas proteínas desfosforilam a JAK e desativam a cascata (MÜNZBERG e Morrison, 2015) (Figura 3).

## 2.7 AÇÃO SISTÊMICA DA LEPTINA

Como já mencionado anteriormente, os receptores de leptina podem ser encontrados no cérebro e nos tecidos periféricos, e também podem ser encontrados em diversos órgãos e tecidos: pulmão, rins, adipócitos, células endoteliais, células mononucleares sanguíneas, estômago, músculo, fígado, ilhas pancreáticas, queratinócitos, osteoblastos, endométrio, placenta, e até mesmo no cordão umbilical (HEGYI et al., 2004). Consequentemente, a leptina secretada pelo tecido adiposo pode estimular a transcrição gênica em diversos órgãos e tecidos, desencadeando assim, diversos processos e mecanismos regulatórios em contextos fisiológicos e patológicos: como no caso da obesidade, a qual a leptina está diretamente relacionada. Ou seja, a leptina pode atuar sistemicamente no organismo por induzir efeitos muito mais amplos do que simplesmente regular o apetite, a saciedade e o gasto de energia (Figura 4). A leptina desempenha papel regulatório em eventos cardiovascular crônicos, como pressão arterial, ou mesmo na regulação do diabetes (DO CARMO et al., 2015), contribui com a regulação da glicose (SCHWARTZ et al., 2000), ou ainda, a leptina pode agir no sistema imune e afetar a proliferação de linfócitos T (LORD et al., 1998), ou mesmo afetar a produção de citocinas pró-inflamatórias (LOFFREDA et al., 1998).

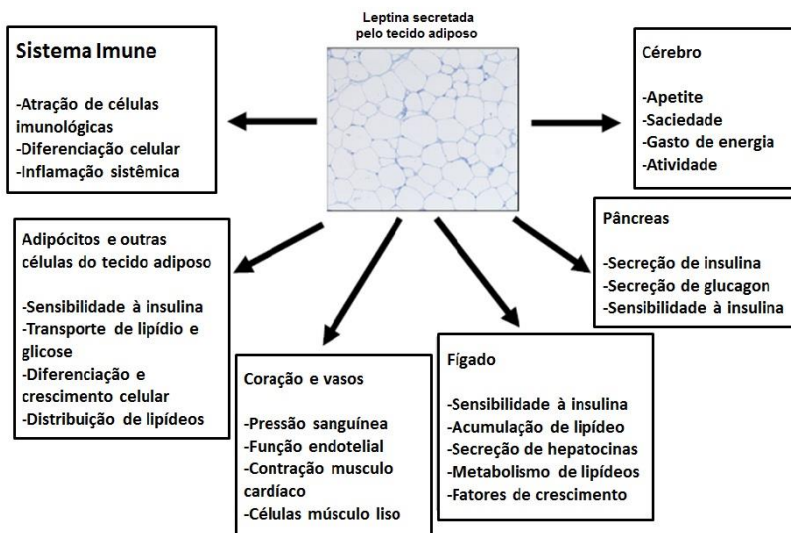
**Figura 3 -- Vias de sinalização celular da leptina**



Adaptado de Münzberg e Morrison (2015) – Leptina interage com porção extracelular do receptor e desencadeia uma cascata de fosforilação via JAK/STAT responsável por ativação de vias de transcrição relacionadas à homeostase energética. PI3K – Fosfatidoinositol-3-cinase, IRS – Adaptador de Substrato de Insulina, JAK – Janus Cinase 2, SH-2 – Domínio contendo tirosina cinase 2, MAPK - Proteína cinase ativada por mitógeno, STAT – Proteína transdutora de sinal e ativação de transcrição 3, SOCS – Supressor de Sinalização de Citocina 3, PTP1B – Fosfotirosina Fosfatase-1B.

A concepção de ação sistêmica da leptina ampliou o papel do tecido adiposo à função de um órgão endócrino (AHIMA, 2006). E permitiu relacionar doenças como a diabetes à obesidade. Ou associar a obesidade a outras doenças, como no caso do câncer de mama, que pode receber estímulos mitogênicos da leptina devido à elevação na concentração sérica, em função do aumento do tecido adiposo no organismo (GHILARDI e SKODA, 1997; DUBOIS et al., 2014).

**Figura 4 – Efeito sistêmico da leptina em órgãos e tecidos**



Adaptado de Blüher e Mantzoros (2015) – Efeitos sistêmicos da leptina

## 2.8 LEPTINA E O MICROAMBIENTE DO CÂNCER DE MAMA

A glândula mamária é formada por uma variada combinação de células e tecidos, que formam uma trama complexa de interações, determinantes do microambiente funcional saudável da mama (POLYAK e KELLURI, 2010). O contexto do microambiente da mama é único, porque diferentemente de outros órgãos que, durante o processo de embriogênese, se formam e conservam a estrutura básica ao longo da vida, o tecido mamário continua mudando a estrutura por todo o período fértil feminino (WISEMAN, 2002). Essa mudança contínua envolve muitos eventos capazes de garantir a integridade fisiológica do órgão e também de proteger o tecido contra o desenvolvimento de células tumorais (POLYAK e KELLURI, 2010).

Neste contexto, o desenvolvimento e o estabelecimento das células de câncer no tecido são extremamente dependentes do ambiente que as envolvem. A interação das células tumorais com os tecidos, componentes e o sistema de sinalização do microambiente da mama, pode, ou não favorecer o processo de tumorigênese. As células do câncer não são totalmente autônomas para proliferar, crescer, migrar e se fixar no tecido, pois dependem dos efeitos produzidos pelo tecido estromal circundante: células mesenquimais (fibroblastos, adipócitos, células do sangue, e leucócitos) e componentes da matriz extracelular

(fibronectina, colágeno, proteoglicanos), capazes de influenciar o crescimento e a proliferação celular: não somente do tecido da mama, mas também das células do tumor (ANDÓ e CATALANO, 2012, ANDÒ et al., 2014 e STUDEBAKER et al., 2008).

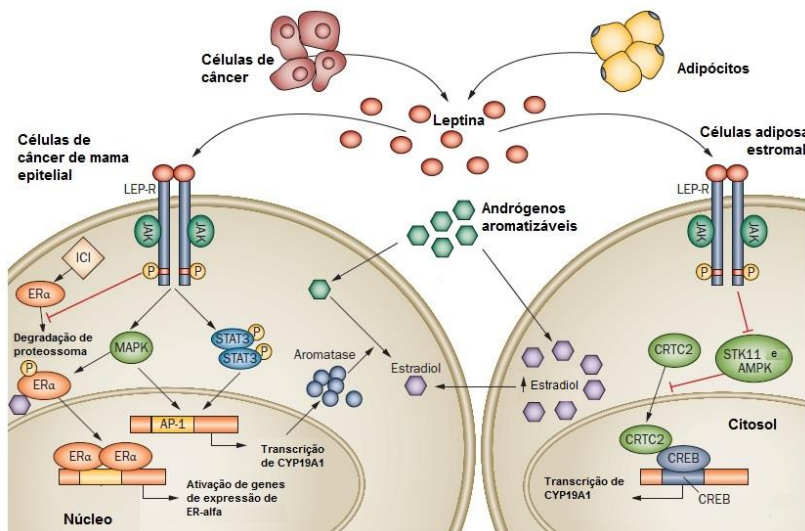
Embora já tenha sido demonstrado que o microambiente da mama seja hábil em reverter o fenótipo maligno de células tumorais (DECOSSE et al., 1973), as anormalidades como infiltração linfocítica, fibrose e angiogênese são anormalidades que podem estimular a progressão de células de câncer e favorecer o estabelecimento do tumor na mama (POLYAK e KALLURI, 2010; RAY e RAY, 2015).

Neste microambiente, a leptina liberada por células do tecido adiposo e pelas células tumorais, interage com o LepR na própria célula tumoral e estimula o aumento da proliferação ao fosforilar o eixo JAK/STAT, o qual ativa o fator de transcrição nuclear AP-1 (ativador de proteína-1) responsável pelo aumento da expressão de CYP19A1 (gene de expressão da aromatase), além de que, a via MAPK mediada pela fosforilação da JAK também aumenta a expressão da aromatase (CATALANO et al., 2003). E ainda, a leptina interage com as células adiposas estromais e induz a transcrição de CYP19A1 por diminuição da ação da Cinase Serina-Treonina 11 (STK11), o que reduz a fosforilação da Proteína Cinase Ativada por AMP (AMPK) e, conseqüentemente, aumento da translocação do Coativador de Transcrição Ativado por CREB-2 (CRTC2) para o núcleo (BROWN et al., 2009). O resultado é o aumento da concentração de estradiol no microambiente do câncer de mama (SAMAVAT e KURZER, 2014) (Figura 5).

Outro exemplo de sinalização mediado pelo tecido adiposo, favorável ao estabelecimento de células tumorais e combinado ao estradiol, é o aumento da expressão de caderinas, proteínas de adesão que facilitam o crescimento tumoral no microambiente da mama: a leptina, via eixo das Cinases Reguladoras de Sinais Extracelular 1/2 (ERK1/2) ativa uma cascata de fosforilação capaz de ativar o receptor de estradiol ER-alfa no citosol e a o elemento de ligação a proteínas de resposta ao AMPc (CREB) no núcleo, e assim, estimula a expressão de caderina 1, concomitante à ação do estradiol via ER-alfa que forma um complexo com o fator de transcrição Sp1 que também aumenta a expressão de caderina (MAURO et al., 2007). Todavia, o tecido adiposo não representa somente desvantagem ao organismo: os adipócitos também secretam um hormônio chamado adiponectina, o qual modula um efeito protetivo no microambiente do câncer de mama devido a sua ação antiproliferativa. A baixa concentração séria deste hormônio tem

sido relacionada a diversos cânceres, entre eles o câncer de mama (GROSSMANN e CLEARY, 2012).

**Figura 5 – Leptina aumenta a expressão de estradiol no microambiente da mama**



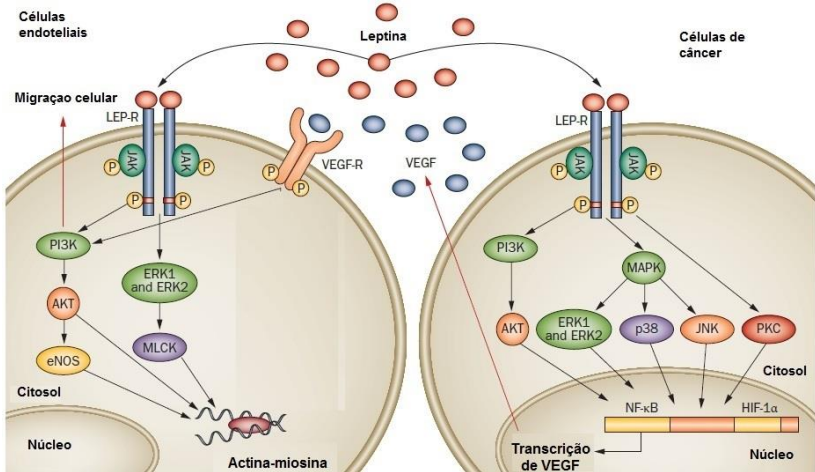
Adaptado de Andò e Catalano (2012) – Leptina aumenta a expressão de estradiol por transcrição de CYP19A1 via JAK/STAT e/ou regulação da proteína STK11/AMPK. ER-alfa – Receptor de estradiol-alfa, ICI – Tamoxifeno, JAK – Janus Cinase, STAT – Proteína transdutora de sinal e ativação de transcrição, MAPK - Proteína cinase ativada por mitógeno PI3K – Fosfatidoinositol-3-cinase, CREB – Elemento de ligação a proteínas de resposta ao AMPc, CRTC2 – Coativador de transcrição ativado por CREB-2, STK11 - Cinase Serina-Treonina 11, AMPK – Proteína Cinase Ativada por AMP, AP-1 – Fator de transcrição nuclear.

A leptina pode promover a ativação de ERK1/2 responsáveis pelo estímulo da expressão de *c-myc* – um oncogene associado à proliferação e crescimento de células tumorais (YIN et al., 2004). Modula o ciclo celular pelo aumento da expressão de proteínas responsáveis pela transição de fases no ciclo celular, tal como as ciclinas D1 e cdk-2, recruta coativadores específicos de transcrição (histonas acetiltransferases) e regula os níveis de PPAR-alfa e PPAR-gama, proteínas-receptores de hormônios, que possuem função de fatores de transcrição gênica e que são encontradas na superfície do núcleo celular (OKUMURA et al., 2002).

A leptina também modula a migração celular via PI3K/AKT. Promove o aumento da expressão do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), o qual pode ser liberado pela célula e estimular a organização das fibras de actina-miosina atuantes no processo de mobilidade celular (GOETZE et al., 2002) (Figura 6).

Portanto, a leptina desempenha um importante papel mitogênico, ao modular o microambiente tumoral favorável à proliferação celular. No entanto, a leptina pode exercer outros efeitos no microambiente da mama, tal como atividades pró-inflamatória, pois a leptina estimula a proliferação de monócitos e regula a função dos fagócitos por intermédio do aumento da expressão de TNF-alfa e IL-6 (LOFFREDA et al., 1998).

**Figura 6 – Efeito da leptina e do estradiol na migração celular**



Adaptado de Andó e Catalano (2012) – Leptina estimula migração e expressão de VEGF via eixo via JAK/PI3K/AKT. JAK – Janus Cinase, PI3K – Fosfatidoinositol-3-cinase, AKT – Proteína cinase B, ERK – Cinase regulada por sinais extracelular 1/2, MLCK – Proteína cinase serina/treonina específica, p38, JNK, JKC – Classe de MAPK.

A IL-6, particularmente representa um papel complexo e dúbio no microambiente do câncer por desempenhar papel pró-tumoral e também antitumoral. A IL-6 pode estimular a expressão de proteínas anti-apoptóticas (BCL-2, MCL-1) e promover maior adaptação e sobrevivência das células tumorais (LEU et al., 2003 e BROCKE-HEIDRICH et al., 2004). Em alguns contextos a IL-6 pode aumentar a resistência de células tumorais à doxorrubicina (CONZE et al., 2001). E,

contrariamente, a IL-6 pode inibir a proliferação por apoptose ao fragmentar o DNA (CHIU et al., 1996), ou suprimir a proliferação por inibição de IGF-1 (SHEN et al., 2002). Ou seja, a IL-6 não somente exerce seu efeito nas células de câncer, mas também influencia o microambiente onde o tumor está estabelecido, indiretamente afetando o câncer, favoravelmente, ou não (HEO et al., 2016 e KNÜPFER e PREIS, 2007).

A IL-6 pode ser produzida em pequenas quantidades pelo tecido adiposo devido à infiltração de macrófagos, em particular nos casos de obesidade e no microambiente tumoral da mama. Semelhantemente, outras citocinas podem ser liberadas mediante ação da leptina (TNF-alfa, IGF-1, IL-1 e IL-17) e da mesma forma induzir proliferação, migração, adesão e modulação do ciclo celular.

O fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1) apresenta potencial mitogênico no microambiente do câncer, no entanto, seu efeito é potencializado na presença do estradiol. O estradiol sensibiliza as células dependentes de estradiol ao efeito do IGF-1 por aumentar: a expressão de receptores de IGF-1 (IGF-1R), a progressão do ciclo celular, a expressão intracelular do adaptador de substrato de receptor de insulina-1/2 (IRS-1/2) e atividade da PI3K (CHONG et al., 2006).

Embora a literatura apresente dados contraditórios sobre o TNF-alfa, a alta concentração sérica desta citocina tem sido relacionada com mal prognóstico de câncer de mama. O TNF-alfa atua na expressão de aromatase, o que pode aumentar a concentração de estradiol no microambiente do tumor, assim como a leptina também o faz. Portanto, pode ocorrer uma potencialização do aumento da concentração de estradiol por intermédio do TNF-alfa e da leptina, além de que, o TNF-alfa encontra-se aumentado no quadro da obesidade devido ao aumento da massa de tecido adiposo (NEWMAN e GONZALES-PERES, 2014; KHAN et al., 2013 e SAXENA e SHARMA, 2013). Enquanto que a IL-1, apesar de ser superexpressa em carcinoma ductal da mama, em geral aparece em pequenas quantidades no microambiente tumoral. A IL-1 associa-se à proliferação, angiogênese, invasão e inibição da apoptose por estar associada ao aumento da atividade da aromatase (ESQUIVEL-VELÁSQUEZ et al., 2015). E a IL-17, pode ter efeito direto sobre as células do câncer de mama por suprimir a apoptose em linhagens como a MDA-MB-231, estimular a progressão e tumorigênese via MAPK e STAT3 na linhagem MCF-7, ou estimular a proliferação em MCF-7 e MDA-MB-231 por ativação da STAT3 (WELTE e ZHANG, 2015).

Portanto, a leptina desempenha importante papel modulador no microambiente do câncer de mama, podendo favorecer o

desenvolvimento e o estabelecimento tumoral por diversas vias celular. Sendo assim, se ocorre a modulação do microambiente a favor do tumor, então, de alguma maneira a leptina deve interferir na ação de fármacos utilizados no tratamento do câncer de mama.

## 2.9 LEPTINA E O MICROAMBIENTE NA FARMACOTERAPIA DO CÂNCER DE MAMA

No Brasil, segundo o Instituto Nacional do Câncer, o tratamento farmacológico do câncer de mama depende de confirmação diagnóstica para avaliar a extensão do tumor, avaliação clínica da condição do paciente e consequentemente, do estadiamento do câncer e, da estratégia terapêutica – se necessário adotar procedimento cirúrgico, ou radioterapia de maneira que se possa inserir a farmacoterapia. Por exemplo, dois fármacos usados são o tamoxifeno e a doxorrubicina que podem ser utilizados em terapias sistêmicas (INCA, 2001 e FERNANDES et al., 2011).

O tamoxifeno é um fármaco antineoplásico pertencente à classe dos moduladores seletivo dos receptores de estrógeno (Figura 7), e pode apresentar ação estrogênica e antiestrogênica, pois apesar de possuir um núcleo comum dietilbestrol, a molécula possui uma cadeia adicional formando um isômero trans, o qual é responsável por seu efeito antiestrogênico (JORDAN, 2006). Seu mecanismo de ação consiste em inibir competitivamente a ligação do estradiol ao receptor de estrógeno, como resultado, o fármaco reduz a síntese de DNA e a resposta celular dependente de estrógenos e, no contexto do câncer de mama, pode atuar na regulação da expressão de IGF-1, atuante na estimulação do crescimento de células de câncer (JORDAN, 1993) e na expressão de mRNA de leptina (MACHINAL-QUÉLIN et al., 2002).

No Brasil, segundo a Sociedade Brasileira de Cancerologia, nas últimas três décadas, o tamoxifeno tem sido usado como terapia padrão em mulheres com idade fértil e na menopausa, o uso deste fármaco tem sido recomendado em terapias adjuvantes e, dependendo do contexto terapêutico, tem sido indicado em hormonioterapia paliativa em mulheres em pré-, ou pós-menopausa, exceto em situações de gestação (GAROFALLO e SURMACZ, 2004 e FERNANDES et al., 2011).

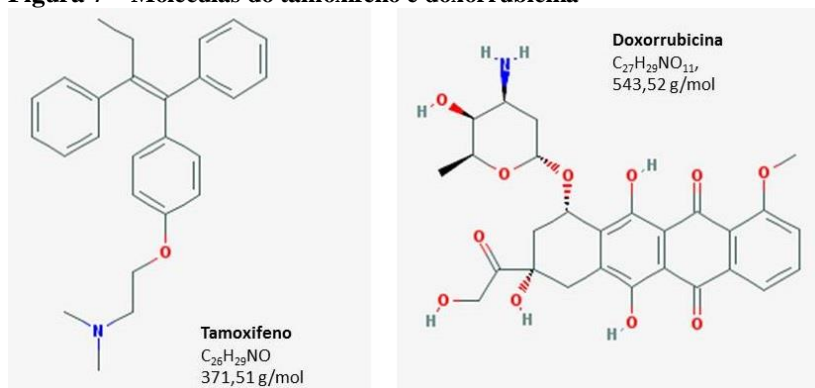
A doxorrubicina é uma antraciclina isolada de *Streptomyces peucetius* que apresenta atividade antineoplásico (Figura 7) (LAMOVSKAYA et al., 1999). Este fármaco tem a capacidade de se intercalar aos pares de bases do DNA de modo a interferir na replicação desta molécula, naturalmente isso interfere na síntese de proteínas. Além deste mecanismo, a doxorrubicina também inibe a enzima



topoisomerase 2, uma enzima que forma um complexo estável ligado ao DNA durante a sua síntese com a função de conservar a ligação dos nucleotídeos na fita após a quebra da dupla fita.

No Brasil, a doxorubicina tem sido indicada no tratamento de tumores avançados e inoperáveis, assim como também tem sido indicado como opção terapêutica de primeira, ou segunda linha no tratamento adjuvante, porém também é contraindicada em gestantes (INCA, 2001 e FERNANDES et al., 2011). A doxorubicina tem sido utilizada, especialmente em casos de tumores triplo-negativo: aqueles que não respondem aos tratamentos hormonais (PERES et al., 2010).

**Figura 7 – Moléculas do tamoxifeno e doxorubicina**



Fonte: National Center of Biotechnology Information (2015)

Portanto, devido a esta trama intrínseca do microambiente da mama, fica evidente o quão complexo podem ser as condições para uma célula de câncer se estabelecer e, quando estabelecida, quais são suas ferramentas para se adaptar e explorar o ambiente a seu favor para que a célula gere um tumor que se desenvolva. E, quando este tumor se encontra agredido por um tratamento farmacológico, ele ainda possui opções que podem lhe garantir sobrevivência, embora não se tenha muitos trabalhos que descrevam a interação entre a leptina e fármacos utilizados no tratamento do câncer de mama.

A leptina e o estradiol exercem efeito mitogênico nas células tumorais de câncer de mama com discutido na literatura. O efeito da leptina e do estradiol podem variar em cada linhagem de célula tumoral de mama. Por esta razão, avaliar o efeito da leptina e do estradiol e da combinação de ambos pode ampliar a compreensão de seus efeitos no microambiente tumoral.

Sendo assim, a hipótese de que a leptina interfere no microambiente do câncer de forma a modular a proliferação e estimulação de citocinas pro-inflamatórias (IL-6, TGF-1), e ainda, interferir no efeito do tamaxifeno e da doxorubicina, possivelmente atenuando o efeito citotóxico dos fármacos. Portanto, o foco deste trabalho é estudar como o microambiente tumoral, baseado em leptina e sua combinação com estradiol, podem relacionar os efeitos funcionais destes hormônios associados ao tecido adiposo à proliferação, progressão de ciclo, migração e secreção de fatores inflamatórios em células de câncer de mama com diferentes fenótipos e, finalmente, avaliar o efeito da leptina e sua combinação com o estradiol em células tumorais incubadas com tamoxifeno, ou doxorubicina.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Simular um microambiente tumoral sob o efeito leptina e sua combinação com estradiol e observar como estes hormônios relacionados ao aumento do tecido adiposo podem modular a proliferação, a progressão do ciclo, migração e secreção de citocinas proliferativas em células de câncer de mama com diferentes fenótipos.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar o efeito da leptina e sua combinação com estradiol na proliferação de células da linhagem MCF-7 que expressa receptores de estradiol e a linhagem triplo-negativa MDA-MB-231 (que não expressa receptores de estradiol, progesterona e HER).

Avaliar o efeito da leptina e sua combinação com estradiol na progressão de ciclo celular nas linhagens celulares MCF-7 e MDA-MB-231.

Avaliar o efeito da leptina e sua combinação com estradiol na progressão da migração celular das linhagens celulares MCF-7 e MDA-MB-231.

Simular em co-cultura direta o efeito de interação de culturas primárias de adipócitos murinos sobre a linhagem murina 4T1 de câncer de mama na produção adipocinas do microambiente celular relacionadas com câncer (leptina, IGF-1, IL-6)

Avaliar a possível interferência da leptina e sua combinação com estradiol na atividade citotóxica sobre as linhagens celulares MCF-7 e MDA-MB-231 de dois fármacos utilizados na clínica no tratamento do câncer de mama (tamoxifeno e doxorrubicina).



## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 REAGENTES

A leptina, o  $\beta$ -estradiol, o Serum Replacement 2 (SR2) (50x), os meios de cultura Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) e Roswell Park Memorial Institute (RPMI), tamoxifeno, ácido N-[2-Hidróxi-2-etil]piperazina-N'-[2-etanosulfônico] (HEPES), Tween 20 para cultura celular, o azul de Trypan, o corante bisbenzimidazoles hoescht 33342, a resazurina sódica, 4',6-diamino-2-fenilindole dihidroclorato (DAPI), dimetil sulfoxido (DMSO) foram obtidos de Sigma Aldrich (St. Louis, EUA). O soro fetal bovino (SBF) foi comprado da Cultilab (São Paulo, Brasil); a penicilina e estreptomicina, assim como a colagenase tipo II foram adquiridos da Gibco® (Grand Island, EUA); o bicarbonato de sódio  $\text{NaHCO}_3$ , o carbonato de sódio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), o cloreto de potássio (KCl), o cloreto de sódio (NaCl) e o fosfato de potássio monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) foram obtidos da Reagen (Rio de Janeiro, Brasil). O etanol absoluto foi obtido da LAFAN (São Paulo, Brasil). O fosfato de sódio monobásico ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) e ácido fosfórico ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) foram adquiridos da Merck (Darmstadt, Alemanha). O kit de elisa para IL-6 foi adquirido da BD Bioscience (San Diego, EUA) e para os kits de IGF-1 da R&D System (Minneapolis, EUA) e leptina murina Millipore (Missouri, EUA).

### 4.2 CULTURA DE CÉLULAS

Para os ensaios deste estudo foram usadas duas linhagens de células de câncer de mama humano: a MCF-7 e a MDA-MB-231. Ambas as linhagens são adenocarcinoma de células de glândula mamária derivadas de sítio metastático, são células do tipo epitelial com característica aderente quando em cultura. A MCF-7 expressa receptores de estrogênio e possui a habilidade para processar o estradiol via receptores citoplasmáticos de estrogênio. Enquanto que a MDA-MB-231 é uma linhagem celular que não expressa receptores de estrogênio, receptores de progesterona e nem receptores do tipo HER segundo American Type Culture Collection (ATCC).

Além das linhagens humanas, foi usada a linhagem 4T1 de câncer de mama *Mus musculus*, extraído de glândula mamária, morfologia de célula epitelial e apresenta-se aderida quando em cultura (ATCC). As três linhagens foram adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ). E, um quarto tipo de célula usada foi adipócito obtido por cultura primária de tecido adiposo murino *Mus musculus* (Aprovação CEUA/UFSC: PP892 – 11/2013).

A MCF-7 foi mantida em cultura com meio RPMI sem vermelho de fenol e com 20% de soro bovino fetal (SBF) e a MDA-MB-231 foi mantida com meio DMEM com 10% de SBF, enquanto que 4T1 foi mantida em RPMI com 10% de SBF e, o adipócito primário, quando em cultura, em DMEM com 10% de SBF. Cada meio foi suplementado com 100 U/mL de penicilina, 100 mg/mL de estreptomicina, 10 mM de HEPES em pH 7,2 e incubadas em temperatura de 37°C com saturação de 5% de CO<sub>2</sub>.

Para os ensaios experimentais, o soro bovino fetal (SBF) do RPMI usado para a MCF-7 foi substituído por Serum Replacement 2 (SR2) 0,5x.

#### 4.3 ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR COM AZUL DE TRYPAN

O ensaio de proliferação foi feito com as linhagens MCF-7 e MDA-MB-231. Para cada linhagem foram plaqueadas 20.000 células por poço em placas de 24 poços. As placas foram incubadas com o objetivo de atingirem uma confluência de 70%, aproximadamente 24 a 48 horas. Após este período as células passaram por um processo de sincronização do ciclo celular com meio de cultura com 1% de SBF por 24 horas (Campisi et al., 1984; Pardee, 1989). Então, as células foram tratadas com as concentrações de leptina 10 ng/mL, leptina 100 ng/mL ou leptina 1000 ng/mL; estradiol 10 pg/mL, estradiol 100 pg/mL ou estradiol 1000 pg/mL; as respectivas concentrações leptina 10 ng/mL mais estradiol 10 pg/mL; leptina 100 ng/mL mais estradiol 100 pg/mL ou, por fim, leptina 1000 ng/mL mais estradiol 1000 pg/mL. A coleta de dados foi feita nos tempos de 24 e 48 horas após os tratamentos por contagem direta das células coradas com azul de Trypan em câmara de Neubauer. O resultado foi transformado em porcentagem, considerando as células não tratadas, o controle como 100%.

#### 4.4 ENSAIO DE CICLO CELULAR

O ensaio de ciclo celular foi realizado com as linhagens celular MCF-7 e MDA-MB-231 e, assim como no ensaio de proliferação, os tratamentos foram feitos com leptina 10, 100 ou 1000 ng/mL e estradiol 10, 100 ou 1000 pg/mL e as respectivas concentrações nos tratamentos de leptina mais o estradiol. Para este ensaio foram plaqueadas 350.000 células por poço e incubadas por 24 horas, após este período o meio com SBF foi retirado e substituído por meio com SR2 mais os tratamentos com os hormônios e novamente incubados por 10, 24 e 48 horas. Os

dados foram coletados por citometria de fluxo no FACSverse (BD Bioscience, Sas Jose, EUA).

Para a coleta de dados, os meios foram retirados e transferidos de cada poço para correspondentes microtubos e então reservados. Em seguida foi adicionado cerca de 100  $\mu\text{L}$  de tripsina a cada poço por cerca de dois minutos com o objetivo de soltar as células. Após a soltura, as células em tripsina foram coletadas de seus poços e colocadas nos respectivos tubos contendo o sobrenadante previamente coletado e, então, foram centrifugadas por 10 minutos a 1500 rpm. Após a centrifugação o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas com 500  $\mu\text{L}$  de PBS 1x e centrifugadas por 10 minutos a 1500 rpm, sendo que esta lavagem foi feita três vezes. Ao final do processo foram adicionados 200  $\mu\text{L}$  de etanol 70% gelado aos tubos e deixados por 30 minutos em temperatura de  $-4^{\circ}\text{C}$ . Após este período, descartou-se o etanol e adicionou-se 1 mL de PBS 1x + 2% de BSA. Então as células foram centrifugadas novamente com os mesmo parâmetros anteriores. Finalmente, após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 500  $\mu\text{L}$  de RNAase 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  + 0,1% de Triton-X em PBS 1x. As amostras foram conservadas em gelo para leitura e, no momento da análise, em todos os tubos foram adicionados 10  $\mu\text{L}$  de iodeto de propídio (20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).

#### 4.5 ENSAIO DE MIGRAÇÃO CELULAR (SCRATCHING)

O ensaio de migração foi feito com as linhagens celulares MCF-7 e MDA-MB-231. Foram plaqueadas 350.000 células por poço numa placa de 12 poços e, após 24 horas, fez-se um corte reto vertical em cada poço para delimitar uma fenda na monocamada de células. Em seguida, o meio de cultura do plaqueamento foi substituído por meio de cultura com SR2 e com os mesmos tratamentos usados nos ensaios de proliferação e ciclo celular, por fim foram feitas microfotografias das fendas nos tempos zero em microscópio ótico invertido no aumento de 10x. As microfotografias também foram feitas nos tempos de 24 e 48 horas após os tratamentos. Os resultados foram produzidos pela análise das imagens no software livre imageJ, onde se delimitou a área inicial no tempo zero e as áreas remanescentes 24 e 48 horas após a feita as fendas e subsequente tratamentos e quantificadas em pixels. Os resultados foram transformados em porcentagem e expressos em porcentagem de área remanescente.

#### 4.6 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR POR RESAZURINA SÓDICA

O ensaio de viabilidade com resazurina sódica foi feito para determinar a concentração citotóxica de doxorrubicina (Dx) e de tamoxifeno (Tx) para 50% das células (CC50). Este ensaio foi realizado com a linhagem celular MCF-7 e a MDA-MB-231 em placas de 96 poços, onde foram plaqueadas 10.000 células por poço e incubadas por 24 horas para posterior tratamento com os hormônios leptina 100 ng/mL (L100), estradiol 100 pg/mL (E100) ou leptina mais estradiol (LE100) nas respectivas concentrações, em seguida as placas foram incubadas por 48 horas. Depois deste período foi adicionado doxorrubicina em doses de 3,16; 10; 31,6; 100; 316 e 1000  $\mu$ M numa das placas, para cada linhagem; enquanto que foi adicionado de 0,316; 1; 3,16; 10; 31,6 e 100  $\mu$ M de tamoxifeno noutra placas para cada linhagem celular. Os resultados foram coletados 24 horas após a adição dos fármacos.

Para a coleta de dados, os meios das placas foram descartados e substituídos pelos respectivos meios de cada célula com 10% de resazurina sódica (1 mg/mL), em seguida as placas foram re-incubadas por 2 horas e, ao final deste período, a leitura foi feita por fluorimetria em comprimento de onda de 590 nm para a determinação da fluorescência em cada concentração.

#### 4.7 ENSAIO DE CO-CULTURA COM 4T1 E ADIPÓCITOS DE CULTURA PRIMÁRIA

A co-cultura foi realizada com a linhagem celular 4T1 de câncer de mama e adipócitos de cultura primária, ambos murinos. Foram utilizadas duas placas de cultura de 24 poços, de modo que numa placa foram plaqueadas 500.000 células por poço em 0,5 mL de RPMI + 10 % de SBF da linhagem 4T1 e incubadas por 24 horas. Após este período, o meio foi trocado por DMEM + 10% SBF, sendo que em três poços foram adicionados leptina 100 ng/mL, em outros três, estradiol 100 pg/mL e nos últimos três foram adicionados os dois hormônios com as respectivas concentrações. Três poços foram deixados para controle. Nestes mesmos 12 poços foram plaqueados os adipócitos para realização da co-cultura. Portanto, os 12 poços restantes, permaneceram plaqueados somente com a linhagem 4T1. Na segunda placa, em 12 poços, foram plaqueadas os adipócitos, no entanto, sem a 4T1.

Os adipócitos foram adquiridos de tecido adiposo murino previamente coletados e armazenados a temperatura de  $-4^{\circ}\text{C}$ . Cerca de 5 gramas de tecido adiposo foi triturado e cortado com lâmina de bisturi em pequenos pedaços até que se formasse uma massa homogênea, e em



seguida o tecido foi transferido para um tubo cônico de 15 mL com adição de 10 mL de meio de digestão: DMEM sem SBF e com adição de colagenase do tipo II (1 mg/mL). O tubo foi colocado num agitador orbital a 110 rpm durante 30 minutos. Após este período, o conteúdo do tubo foi filtrado num tecido estéril de malha fina, sendo transferido para um tubo cônico de capacidade de 50 mL, em seguida o tubo foi delicadamente homogeneizado e centrifugado a 400 g por 30 segundos. Feito isto, o sobrenadante foi transferido pra um novo tubo cônico de 15 mL e seu volume foi completado para 10 mL e novamente centrifugado com os mesmos parâmetros. Ao final da centrifugação notou-se um sedimento na superfície do meio, porção onde se encontram os adipócitos. Transferiu-se 10 µL deste sedimento (correspondente a cerca de 50.000 células) por poço: a 12 poços da placa (controle e tratados com hormônios) com 4T1 em cultura. E na segunda placa, adicionou-se 0,5 mL de meio DMEM em 12 poços e finalmente os adipócitos foram inseridos da mesma maneira. O sistema foi incubado por 48 horas, então o sobrenadante foi colhido de maneira cuidadosa para não pegar adipócitos, pois estes permanecem flutuantes no meio de cultura, então os sobrenadantes foram transferidos para respectivos microtubos, identificados e armazenados à temperatura – 80°C para posterior determinação de citocinas.

#### 4.8 IMUNOENSAIO PARA DOSAGENS DE IL-6, TNF-ALFA, IGF-1, ADIPONECTINA E LEPTINA MURINO

Para a dosagem das citocinas IL-6 e TNF-alfa foram usados kits comerciais da BD Bioscience, assim o procedimento foi de acordo com instruções do fabricante. Da mesma forma foi feito para as citocinas IGF-1, adiponectina e leptina, no entanto os kits comerciais são da R&D System. A dosagem foi feita a partir do sobrenadante coletado no ensaio de co-cultura, os quais foram conservados a -80oC até o momento da análise. Para o procedimento experimental, eles foram descongelados e mantidos em gelo até que suas aliquotas fossem usadas no procedimento, de acordo com as instruções do kit.



## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 A LEPTINA E A SUA COMBINAÇÃO COM ESTRADIOL INDUZEM A PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS DE CÂNCER DE MAMA DA LINHAGEM MCF-7 APÓS 48 HORAS DE TRATAMENTO

Para avaliar o efeito da leptina e a da combinação com o estradiol na proliferação celular, foram utilizadas as linhagens celulares MCF-7 e MDA-MB-231. Foram plaqueadas 20 mil células por poço em placas de 24 poços. As células foram mantidas em meio de cultivo até atingirem confluência de aproximadamente 70% (cerca de 48 horas). Após atingir a confluência desejada, as células foram sincronizadas com meio de cultura contendo 1% de soro bovino fetal (SBF) por 24 horas. Após este período, o meio de sincronização, foi retirado e substituído por meio contendo SR2 (0,5x), leptina nas concentrações de 10, 100 ou 1000 ng/mL, estradiol nas concentrações de 10, 100 ou 1000 pg/mL e a combinação leptina-estradiol nas respectivas concentrações na relação 1:1. Após 24 e 48 horas de tratamento com os hormônios, isolados ou em associação, as células foram tripsinizadas, coradas com azul de trypan e contadas em câmara de Neubauer.

Os resultados obtidos mostraram que os testes na linhagem celular MCF-7 incubadas com leptina, ou estradiol, ou a combinação leptina-estradiol na relação (1:1) não estimularam a proliferação celular após 24 horas de incubação (Figura 8a). Por outro lado, as incubações com leptina 100 ng/mL, ou estradiol 100 pg/mL, ou a combinação leptina-estradiol 100 ng-pg/mL estimularam o aumento da proliferação da linhagem MCF-7. O efeito estimulatório da leptina na concentração de 100 ng/mL na proliferação das células MCF-7 foi de aproximadamente 200% (Figura 8b). Também foi observado resultado significativo para a combinação de leptina-estradiol 100 ng-pg/mL com média aproximada de 400% no estímulo proliferativo (Figura 8b).

O efeito proliferativo da leptina em células de câncer de mama tem sido estudado e descrito na literatura em diversas linhagens celulares: MCF-7, MDA-MB-231, SK-BR-3, T-47. A via JAK/STAT é a via clássica relacionada à proliferação celular por estimular os mecanismos de transcrição nuclear. A fosforilação ativada a partir da JAK pode mobilizar a MAPK e estimular a transcrição dos genes de proliferação (FOS, JUN e JUNB) relacionados à regulação de transcrição e formação de AP-1 (ANDÒ e CATALANO, 2012, DUBOIS et al., 2014). De acordo com a literatura, a relação entre leptina e estradiol forma uma rede de sinalização que contribui para a

proliferação, o crescimento, a migração e modulação do ciclo celular, pois a leptina eleva a expressão de receptores de estradiol (ER), e o estradiol, por sua vez, aumenta a expressão de RNAm da leptina, o que pode justificar o efeito potencializado da combinação leptina-estradiol na concentração 100 ng-pg/mL (ANDÒ et al., 2015). Além disso, no microambiente da mama, a leptina aumenta a expressão e a atividade da aromatase na linhagem celular MCF-7. A aromatase é uma enzima responsável pela conversão de andrógenos aromatizáveis em estradiol, com consequente aumento da concentração local do estradiol a mama (CATALANO et al., 2003).

Outra consideração que pode ser feita para a linhagem MCF-7 relaciona-se à tendência proliferativa observada. Das três concentrações de leptina (10, 100 e 1000 ng/mL), a maior média foi observada na concentração de 100 ng/mL e menor média na concentração de 1000 ng/mL nos tempos de 24 e 48 horas. Enquanto que o estradiol demonstrou uma tendência dose-dependente, ou seja, quanto maior a concentração, maior foi a média na proliferação.

Ao se comparar a tendência da leptina à tendência da combinação da leptina-estradiol, observa-se semelhança entre ambos. As células incubadas com leptina-estradiol (10, 100 e 1000 ng-pg/mL) apresentaram maior proliferação na combinação 100 ng-pg/mL e menor proliferação na combinação 1000 ng-pg/mL. Portanto, pode-se propor que, por algum motivo, o efeito da leptina se sobrepõe ao efeito do estradiol na combinação dos dois hormônios (Figuras 8a e 8b).

A evidência que pode fortalecer esta observação é a comparação das médias das incubações leptina 1000 ng/mL ( $\pm 150\%$ ), estradiol 1000 pg/mL ( $\pm 250\%$ ) e da combinação 1:1 dos hormônios nestas concentrações ( $\pm 100\%$ ) no tempo de 48 horas (Figura 8b). E, da mesma forma, esta tendência ocorre no tempo de 24 horas (Figura 8a). Ou seja, a leptina na concentração 1000 ng/mL, de algum modo, limitou ou se prevaleceu sobre o estímulo proliferativo do estradiol na concentração de 1000 pg/mL na linhagem MCF-7 em teste *in vitro* (Figura 8a e 8b).



também foram limitadas na proliferação com concentrações superior a 400 ng/mL (WEICCHAUS et al., 2013), de forma que esta possibilidade pode ser melhor explorada na linhagem celular MCF-7.

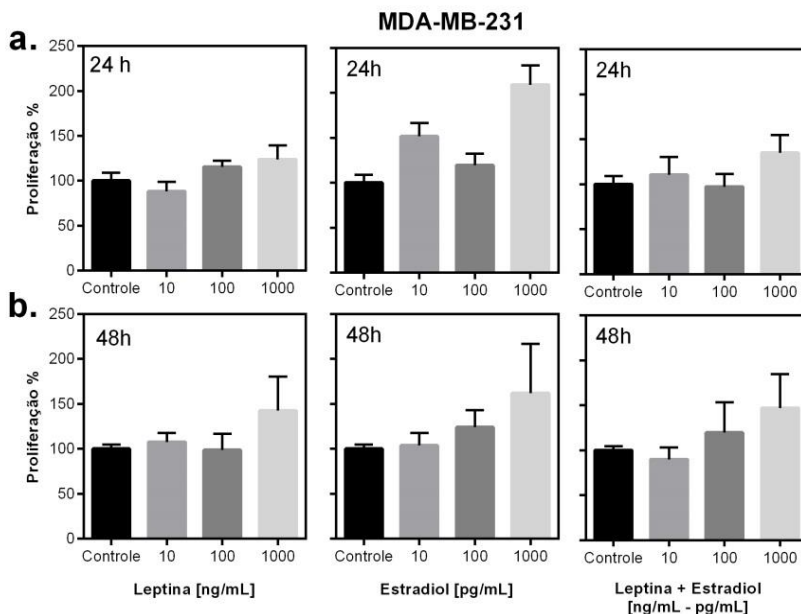
A linhagem MDA-MB-231, incubada nas mesmas condições que MCF-7, assim como relatado na literatura, não apresentou resultado significativo com tendência mitogênica nas incubações com leptina, estradiol e na combinação dos dois hormônios em nenhuma das concentrações utilizadas no ensaio (Figura 9a e 9b). Apesar da linhagem MDA-MB-231 não expressar receptores de estradiol, o que naturalmente limita sua proliferação, a possível presença de receptores de leptina seria uma possível opção ao estímulo proliferativo. No entanto, de acordo com a literatura, há relatos controversos quanto a expressão de RNAm de receptores de leptina da própria expressão do LepR.

Existem trabalhos que identificam a presença de RNAm do receptor e o próprio LepR, assim como demonstram a responsividade ao receptor estimulando o efeito mitogênico na MDA-MB-231 (DUBOIS et al., 2014 e RAY et al., 2007). Porém, há trabalhos que demonstram ausência da expressão de LepR e, conseqüentemente, ausência do efeito proliferativo da leptina na MDA-MB-231 (FUSCO et al., 2010). Além disso, a ausência dos receptores de estradiol é uma opção a menos à proliferação da linhagem MDA-MB-231 e ao efeito proliferativo da leptina. Quando a linhagem MDA-MB-231 é induzida a expressar receptores de estradiol, via transfecção por plasmídeo, o efeito da leptina fica evidente nas linhagens que expressam LepR (BINAI et al., 2010).

Portanto, o resultado observado pode estar relacionado à baixa expressão de LepR e à ausência de receptores de estradiol na linhagem MDA-MB-231.

Entretanto, ao se observar as concentrações de estradiol 1000 pg/mL e a combinação leptina-estradiol que foi incubada com referida a concentração, ficou evidente uma proliferação mais elevada na proliferação da linhagem MDA-MB-231 nos tempos de 24 e 48 horas. E, nos tempos de 48 horas, observa-se a relação dose-dependente nas células que foram incubadas na presença do estradiol e da combinação dos dois hormônios. Evidência que poderia questionar se a linhagem utilizada neste trabalho MDA-MB-231 não poderia ter receptores de estradiol expresso.

**Figura 9 – Avaliação da proliferação celular em linhagens de células tumorais MDA-MB-231 incubadas com os hormônios leptina e estradiol.**

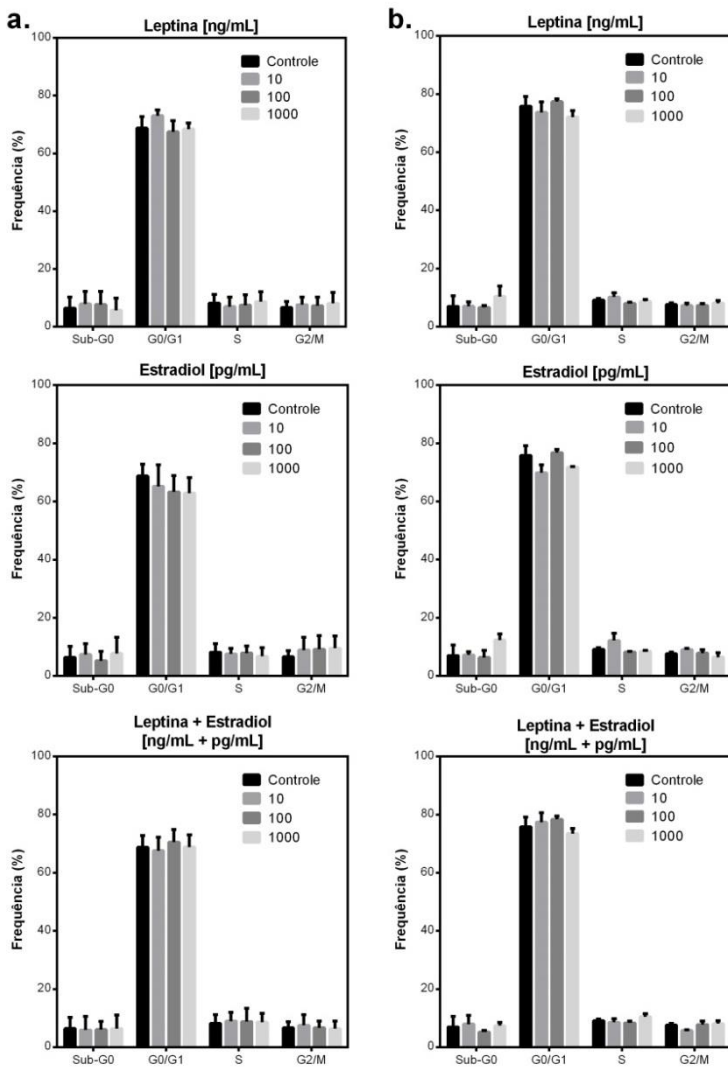


Cada gráfico representa a porcentagem de proliferação da linhagem celular MDA-MB-231, incubada com os hormônios leptina, estradiol e a sua combinação em três concentrações diferentes comparadas ao controle (100%) incubado com DMEM + SR2 0,5x. Em (a) os resultados no tempo 24 horas (n=3) e (b) os resultados em 48 horas (n=3). Para análise estatística foi utilizado ANOVA de uma via, seguido do pós-teste de Dunnett comparado ao controle.

## 5.2 A LEPTINA, ESTRADIOL E A COMBINAÇÃO LEPTINA-ESTRADIOL NÃO ALTERAM O CICLO CELULAR DE CÉLULAS DE CÂNCER DE MAMA APÓS 48 HORAS DE TRATAMENTO

O ensaio de ciclo celular foi feito com as duas linhagens no tempo de 48 horas, devido ao resultado significativo identificado no ensaio de proliferação. Os grupos experimentais foram: controle, leptina (10, 100 e 1000 ng/mL), estradiol (10, 100 e 1000 pg/mL) ou leptina-estradiol com as respectivas concentrações combinadas.

**Figura 10 – Avaliação do efeito da leptina, do estradiol e da combinação leptina-estradiol nas fases do ciclo celular das linhagens MCF-7 e MDA-MB-231**



Em cada gráfico, as colunas representam a frequência em porcentagem do conteúdo de DNA em cada fase do ciclo celular, das linhagens celular MCF-7 e MDA-MB-231 tratadas com três diferentes concentrações de leptina, estradiol e da combinação dos hormônios na relação 1:1 (n=3). (a) resultados para MCF-7



no tempo 48 horas. (b) resultados para MDA-MB-231 no tempo 48 horas. Para análise estatística foi utilizado ANOVA de duas via, seguido do pós-teste de Dunnett comparado ao controle.

Para o ensaio de ciclo celular foram plaqueadas 350.000 células por poço em placas de 12 poços e incubadas por 24 horas. Após este período as células foram sincronizadas com meio de cultura contendo 1% SBF por 24 horas. Então, o meio de sincronização, foi retirado e substituído por meio contendo SR2 (0,5x), leptina nas concentrações de 10, 100 e 100 ng/mL, estradiol nas concentrações de 10, 100 e 1000pg/mL e a combinação leptina-estradiol nas respectivas concentrações na relação 1:1. Para a coleta de dados foi avaliado a frequência de células em porcentagem em cada fase do ciclo celular, das linhagens celulares de MCF-7 e MDA-MB-231, incubadas com leptina, estradiol e a combinação dos dois hormônios num período de 48 horas.

O objetivo do ensaio era identificar uma possível alteração no conteúdo de DNA numa das fases do ciclo celular. Contudo, não houve alteração em nenhuma das fases no tempo de 48 horas (Figura 10a. e 10b.). Devido a este resultado, considerando o aumento na proliferação e o relato contraditório sobre os efeitos da leptina nas fases do ciclo celular na literatura, suspeitou-se da possibilidade de ocorrer alguma alteração em tempos inferiores a 24 horas, deste modo o ensaio foi reproduzido nas mesmas condições, no entanto com coleta de dados em 10 e 20 horas: não foi observado resultado significativo (Figura 11a e 11b).

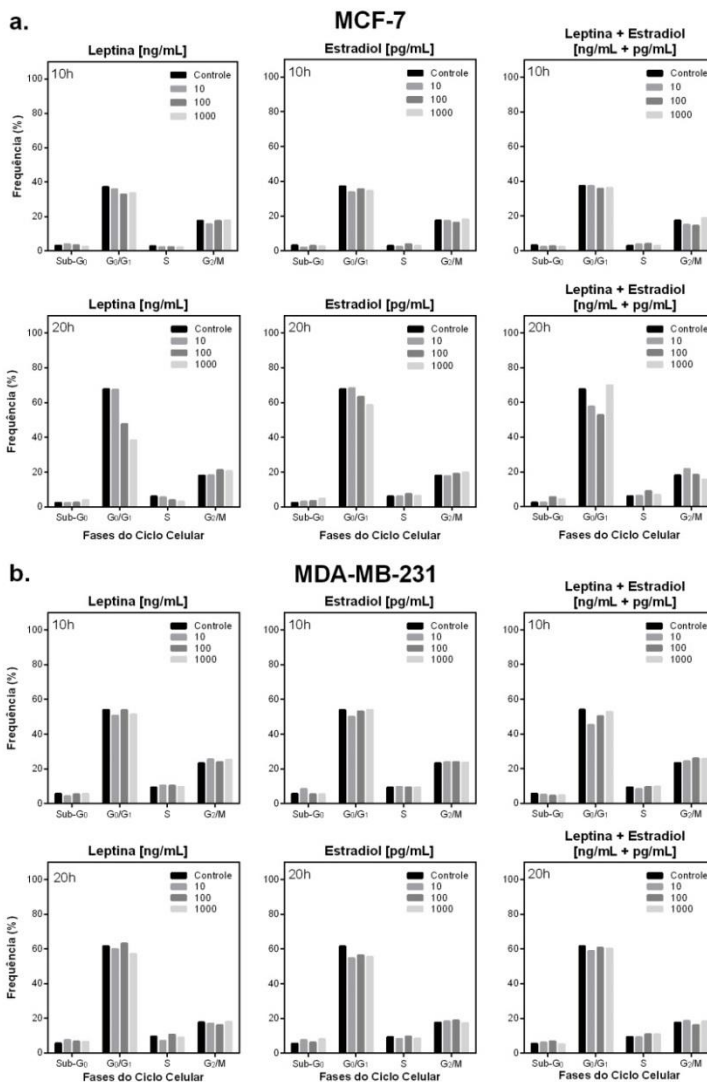
Embora não tenha sido identificada alteração nas fases do ciclo celular em nenhuma das duas linhagens, compreende-se que o ciclo não alterado significa que o metabolismo mitótico da célula encontra-se funcional para que ocorra a divisão celular e ainda que, a proliferação elevada, nas concentrações observadas com diferença significativa no ensaio de proliferação, não altera, necessariamente, as populações de células nas fases do ciclo celular, portanto o ciclo celular não alterado pode ser uma evidencia de que as células estão metabolicamente ativas para se dividirem e proliferarem. Alguns trabalhos não identificaram alterações nas fases do ciclo celular para a MCF-7 e para MDA-MB-231 (DUBOIS et al., 2014, KATAI et al., 2009 e WEICCHAUS et al., 2013).

Entretanto, a literatura relata que a leptina estimula a proliferação celular, altera a fase S do ciclo celular (fase de síntese de DNA) e que a expressão de ciclinas D1 é ativa na fase G<sub>1</sub> do ciclo, quando formam complexos com cinases dependentes de ciclinas responsáveis ao

catalisar a transição da fase  $G_1$  para a fase S do ciclo (SAXENA et al., 2007). Trabalhos que demonstram resultados semelhantes, porém considerando tratamentos crônicos com a leptina em concentrações fisiológicas (10 – 100 ng/mL), realizou ensaios nos períodos de 1, 2 e 7 dias. Os tratamentos de até dois dias apresentaram resposta proliferativa e aumento na população de células na fase S e  $G_2/M$ , porém, de forma interessante, o tratamento crônico de sete dias apresentou estímulo atenuado na proliferação e no aumento nas fases S e  $G_2/M$  (VALLE et al., 2011).

Todavia, o que poderia explicar estas discrepâncias, pode se relacionar às condições experimentais, as pequenas variações nas linhagens celulares, diferenças metodológicas e até mesmo condições particulares associadas à cultura das células (DUBOIS et al., 2014).

**Figura 11 – Avaliação do efeito da leptina, do estradiol e da combinação leptina-estradiol nas fases do ciclo celular das linhagens MCF-7 e MDA-MB-231**



Em cada gráfico, as colunas representam a frequência em porcentagem do conteúdo de DNA em cada fase do ciclo celular, das linhagens celular MCF-7 e MDA-MB-231 tratadas com três diferentes concentrações de leptina, estradiol e

da combinação dos hormônios na relação 1:1. (a) resultados para MCF-7 nos tempos 10 e 20 horas. (b) resultados para MDA-MB-231 nos tempos 10 e 20 horas. Para análise estatística foi utilizado ANOVA de duas via, seguido do post-teste de Dunnett comparado ao controle.

### 5.3 A LEPTINA EM CONDIÇÕES SUPRAFISIOLÓGICAS (FARMACOLÓGICAS) FAVORECE A MIGRAÇÃO DE CÉLULAS DA LINHAGEM MDA-MB-231

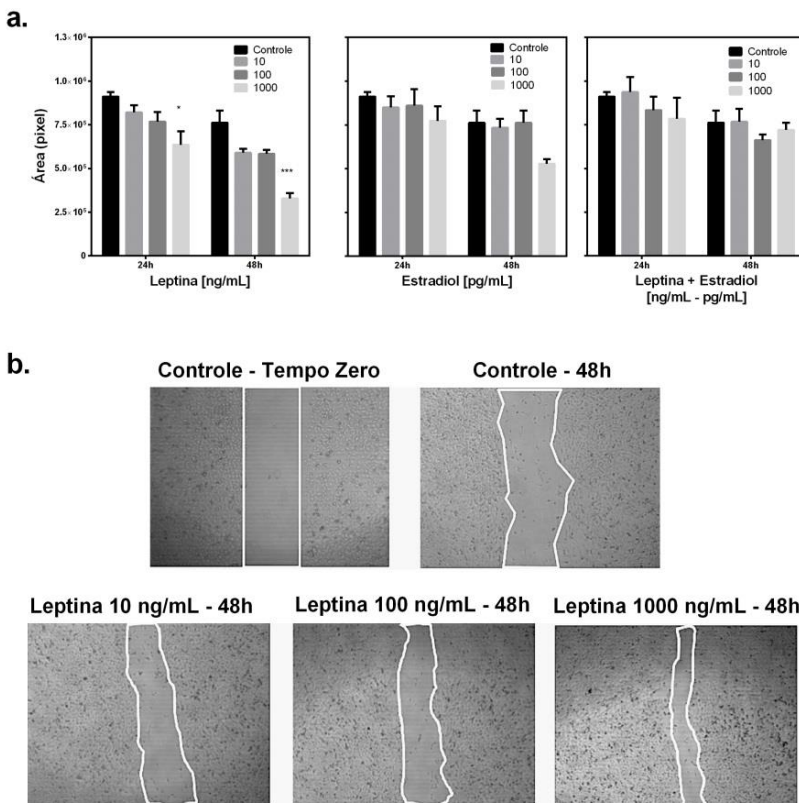
O ensaio de migração com fenda em monocamada foi realizado com as duas linhagens. Foram plaqueadas 300 mil células por poço em placas de 12 poços e incubadas por 24 horas. Após este período, foi feito um corte (com uma ponteira de 200  $\mu\text{L}$ ) na monocamada de células que se formou no fundo de cada poço. Então, o meio foi delicadamente retirado e substituído por meio contendo SR2 (0,5x), leptina nas concentrações de 10, 100 e 1000 ng/mL, estradiol nas concentrações de 10, 100 e 1000 pg/mL e a combinação leptina-estradiol nas respectivas concentrações na relação 1:1. Em seguida, foram feitas microfotografias de cada poço para registrar o tempo zero dos controles e das células incubadas com os hormônios. As microfotografias foram obtidas nos tempos de 24 e 48 horas após o tratamento. Então, as imagens foram processadas no software livre ImageJ e os resultados expressos em área remanescente medida em pixels.

Na linhagem MDA-MB-231 foi observado tendência migrativa em todas as concentrações de leptina, estradiol e leptina mais estradiol. No entanto, o resultado significativo, comparado ao controle, foi observado somente nos tempos de 24 e 48 horas nas incubações com leptina 1000 ng/mL, a qual estimulou maior migração ao apresentar a menor área remanescente (Figura 12a e 12b).

A leptina estimula a migração celular por vias intracelulares, em particular pelo eixo JAK/STAT e PI3K/AKT, que pode estimular fibras de actina-miosina (ANDÓ e CATALANO, 2012). A leptina estimula a proliferação da linhagem celular MDA-MB-231 (SAXENA et al., 2008). Além disso, a literatura relata trabalhos que avaliaram o efeito da leptina sobre a migração celular de células na MDA-MB-231 mediante uso de forskolina (um estimulador AMPc), o qual inibiu a migração celular por diminuição de integrina beta-3, proteína de adesão da matriz extracelular, e de Cinase de Adesão Focal (FAK), tirosina cinase citoplasmática co-localizada às integrinas no processo de adesão. Basicamente, o experimento consistiu em estimular a migração da MDA-MB-231 com a leptina e, demonstrar que pelo aumento de AMPc a migração poderia ser contida pelo uso de forskolina (SPINA et al.,

2012). A migração estimulada pela leptina também pode ser inibida pelo uso da antagonista da via extracelular das cinases (YUAN et al., 2013). Ambos os experimentos tinham como objetivo demonstrar que a estimulação na migração celular estimulada nas células por leptina poderia ter sua habilidade migrativa inibida.

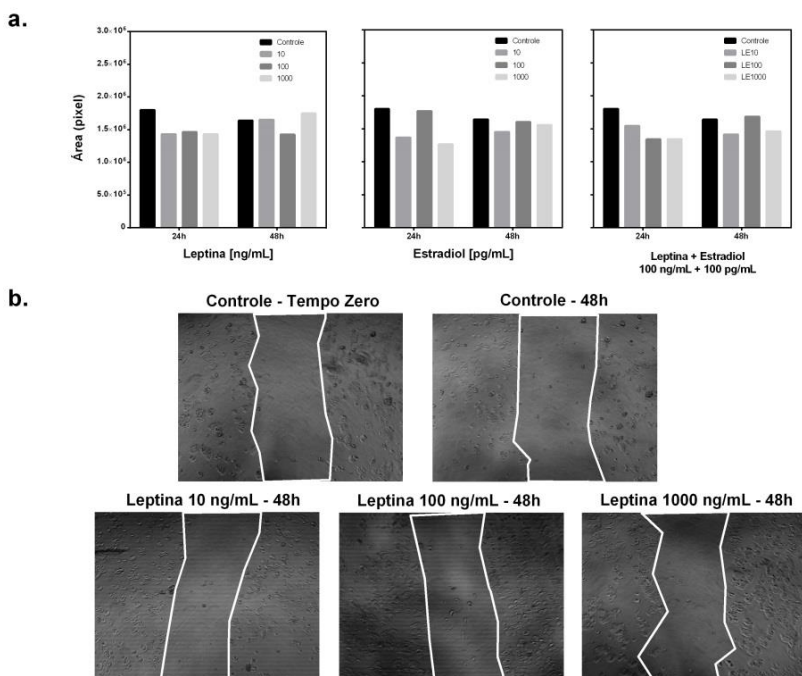
**Figura 12 – Avaliação do efeito da leptina, do estradiol e da combinação dos hormônios na migração da linhagem celular MDA-MB-231.**



(a) As colunas de cada gráfico representam a medida da área em pixels nos tempos 24 e 48 horas para linhagem celular MDA-MB-231 (n=3). (b) Imagens representativas do controle no tempo zero, controle 48 horas, leptina 10, 100 e 1000 ng/mL em 48 horas. (\* $P < 0,01$ ) e leptina 1000 ng/mL no tempo 48 horas (\*\* $P < 0,0001$ ). Para análise estatística foi utilizado ANOVA de duas vias, seguido do teste de Dunnett.

Os resultados observados na linhagem MCF-7 demonstraram tendência migrativa nos tempos 24 e 48 horas. No entanto, foram avaliados dados de um experimento em triplicata (Figura 13a e 13b). As características de formação de grumos em colônia, o que dificulta a formação da monocamada, limitou a realização de microfotografias e, conseqüente coleta de dados com o ImageJ. Outro fator limitante é que a linhagem MCF-7 não é uma linhagem invasiva, e apresenta capacidade de migração inferior comparada a outras linhagens, sendo usada como controle negativo em protocolos de ensaios de migração, motivo pelo qual não se insistiu no ensaio (THOMPSON et al., 1988, MCMURTRY et al., 2008 e CORNING, 2008).

**Figura 13 – Avaliação do efeito da leptina, do estradiol e da combinação dos hormônios na migração da linhagem celular MCF-7**



(a) As colunas de cada gráfico representam a medida da área em pixels nos tempos 24 e 48 horas para linhagem celular MDA-MB-231 (n=3). (b) Imagens representativas do controle no tempo zero, controle 48 horas, leptina 10, 100 e 1000 ng/mL em 48 horas. Para análise estatística foi utilizado ANOVA de duas vias, seguido do teste de Dunnett.

#### 5.4 A LEPTINA MODULA A EXPRESSÃO DE IL-6 E IGF-1 EM MICROAMBIENTE SIMULADO ENTRE A LINHAGEM 4T1 E A ADIPÓCITOS

O ensaio de co-cultura foi idealizado com o propósito de simular um microambiente de câncer de mama e, a partir do ensaio, evidenciar um possível efeito da leptina entre a linhagem celular de câncer de mama murino 4T1 e adipócitos murino em cultura primária. Para identificar tal evidência, foram dosadas as citocinas IL-6, IGF-1 e leptina murina no sobrenadante da cultura. A dosagem foi feita com o uso de kits comerciais de ELISA e de acordo com instruções dos fabricantes.

Os grupos experimentais usados na co-cultura foram: o grupo constituído de 4T1 e adipócitos sem tratamento com os hormônios (Controle), 4T1 mais adipócitos incubados com leptina 100 ng/mL (4T1 + Adipo L100), 4T1 mais adipócitos incubados com estradiol 100 pg/mL (4T1 + Adipo E100), 4T1 mais adipócitos incubados com leptina 100 ng/mL e estradiol 100 pg/mL (4T1 + Adipo LE100), grupo plaqueado somente com a linhagem 4T1 (4T1) e sem adição dos hormônios e por fim, o grupo plaqueado somente com adipócitos e sem adição dos hormônios (Adipo).

A determinação de IL-6 não apresentou resultado significativo entre os grupos incubados com os hormônios e comparados ao controle. Apenas os grupos tratados com os hormônios e o grupo Adipo tiveram IL-6 determinada nos sobrenadantes, enquanto que, o grupo 4T1 não apresentou resultado detectável (Figura 14a). Logo, a IL-6 foi detectada nos grupos contendo adipócitos, o que se justifica, pois a IL-6 é uma adipocina (NEWMAN e GONZALES-PERES, 2014). O grupo controle apresentou a média da concentração mais elevada ( $\pm 50$  pg/mL), seguido dos grupos incubados com leptina ( $\pm 40$  pg/mL) e com a combinação leptina-estradiol ( $\pm 30$  pg/mL) (Figura 14a), possivelmente, devido à atividade da leptina que pode aumentar a expressão de IL-6 (DELORT et al., 2015).

Como mencionado, o grupo controle apresentou a maior concentração de IL-6, o que permite sugerir que a interação entre a linhagem 4T1 e os adipócitos favoreceu a expressão de IL-6, pois a 4T1 não apresentou concentração detectável e os adipócitos isolados expressou a menor concentração de IL-6 ( $\pm 10\%$ ). No entanto, ao observar a interação da linhagem 4T1 e dos adipócitos incubados com os hormônios, de alguma maneira, a expressão da IL-6 pode ter sido

suprimida pela presença da leptina, do estradiol e da combinação leptina-estradiol (Figura 14a).

O significado desta diminuição pode ser relativo, pois a IL-6 apresenta um papel dúbio no microambiente do câncer, podendo desempenhar um papel favorável, ou desfavorável às células tumorais como descrito na literatura (KNÜPFER E PREIS, 2007).

No contexto inflamatório induzido por células tumorais, a IL-6 no microambiente do câncer de mama, pode promover maior capacidade de invasão às células tumorais, assim como o crescimento celular e metástase (ESQUIVEL-VELÁSQUEZ et al., 2015), além de agir como fator de crescimento em linhagens de carcinomas de mama (CHIU et al., 1996). Em particular, a IL-6 exerce seu efeito em linhagens tumorais que expressam receptores de estrógeno, seu mecanismo é via fosforilação da STAT3 com consequente aumento do crescimento e capacidade de invasão, de forma que a IL-6 tem se demonstrado uma opção como alvo terapêutico no tratamento do câncer (STUDEBAKER et al., 2008 e CASNEUF et al., 2016). Portanto, o aumento da IL-6, naturalmente, seria prejudicial ao contexto fisiológico da mama por favorecer as células tumorais.

Assim, diante do exposto, na presença da leptina e do estradiol, a expressão de IL-6 pode ser suprimida, o que seria favorável à proteção do organismo e, conseqüentemente, teria um efeito antitumoral no microambiente do câncer de mama.

Todavia, como discutido anteriormente, a IL-6 desempenha papel duplo no câncer de mama, por também atuar de forma protetiva contra as células tumorais no microambiente. Por exemplo, a IL-6 pode diminuir a proliferação ao inibir uma série de efeitos gerados pela IGF-1: a síntese de DNA, inibição da atividade antiapoptótica, ou a habilidade de fosforilação dos receptores de insulina (SHEN et al., 2002). Ou seja, diante deste contexto, a presença dos hormônios, desfavoreceria o efeito protetivo da IL-6 no microambiente do câncer, por ter a expressão limitada leptina e pelo estradiol.

Diante destas possibilidades, o papel da leptina poderia ser considerado duplo devido à sua possível influência na expressão de IL-6. ainda que a literatura discuta que, tanto a leptina quanto a IL-6 possam encontrar-se elevada no microambiente do câncer (ESQUIVEL-VELÁSQUEZ et al., 2015). Portanto, fica evidente a possibilidade de se investigar melhor essa possível relação.

A dosagem de IGF-1 nos grupos experimentais não foi diferente do grupo controle (Figura 14b). No entanto, a co-cultura de 4T1 e adipócitos, incubados com leptina 100 ng/mL e na cultura de adipócitos,

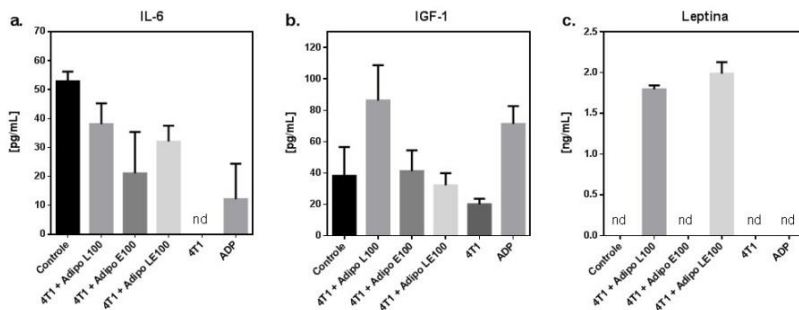


foram observados uma tendência no aumento da expressão de IGF-1. A leptina interage com vários mediadores promotores de câncer, entre eles a IGF-1, a qual pode ser expressa pelas células tumorais e pelos adipócitos (SAXENA e SHARMA, 2013). Embora discreta, nas co-culturas incubadas com estradiol e a combinação leptina-estradiol, também foi observado tendência no aumento de expressão de IGF-1 (SAXENA et al., 2008).

A IGF-1 no microambiente do câncer desempenha influente papel como promotor tumoral, assim como a leptina e o estradiol. Todavia, de acordo com a literatura, que o papel da IGF-1 no desenvolvimento e na progressão tumoral resulta de eventos multifatoriais de diversas interações fisiológicas, por exemplo: a interação entre a leptina, o estrógeno e o IGF-1 é capaz de afetar o mecanismo de promoção tumoral no microambiente da mama (SCHMIDT et al., 2015). O fenótipo obeso estimula tanto a produção de IGF-1 quanto de leptina (RENEHAN et al., 2006 e DALAMAGA et al., 2012), o que favorece o *crosstalk* entre a leptina que fosforila o receptor de IGF-1 e, a IGF-1 que fosforila o receptor de leptina, desencadeando atividades metastáticas e de invasão e migração e, tanto a leptina quanto o IGF-1 aumentam a expressão de aromatase, o que que pode culminar em aumento da concentração de estradiol no microambiente tumoral (CATALANO et al 2003 e CHONG et al., 2006). Além disso, a leptina interage com a via da IGF-1 na rota de ativação da PI3K e MAPK estimulando então vias proliferativas (SAXENA et al., 2008).

Quanto ao resultado observado na dosagem de leptina: o objetivo 7 de determinar a leptina no sobrenadante da co-cultura baseia-se na informação de que a leptina presente no microambiente do câncer pode estimular a célula tumoral a expressar mais leptina (ANDÔ e CATALANO, 2012). No entanto, o ensaio detectou leptina somente nos grupos onde foi adicionado a leptina (4T1 + Adipo L100 e 4T1 + Adipo LE100), de forma que os demais grupos apresentaram resultados abaixo do nível de detecção (Figura 14c).

**Figura 14 – Dosagem das citocinas em sobrenadante de co-cultura entre linhagem tumoral 4T1 e adipócitos em cultura primária**



(a) Colunas representam a concentração de IL-6 em pg/mL, nd = não detectado. (b) Colunas representam a concentração de IGF-1 em pg/mL. (c) Colunas representam a concentração de leptina em ng/mL, nd = não detectado. Para análise estatística foi utilizado o teste ANOVA de uma via, seguido do teste de Dunnett.

### 5.5 A LEPTINA, O ESTRADIOL E COMBINAÇÃO LEPTINA-ESTRADIOL REDUZ A $CC_{50}$ DA DOXORRUBICINA NAS LINHAGENS MCF-7 E MDA-MB-231, MAS AUMENTA A $CC_{50}$ DO TAMOXIFENO E EXERCE EFEITO PROTETIVO NA LINHAGEM MCF-7

A viabilidade celular, das linhagens MCF-7 e MDA-MB-231, foi avaliada pelo método fluorimétrico/colorimétrico da redução da resazurina sódica. A redução do sal de resazurina permite a detecção de medias quantitativas/qualitativas por fluorimetria em comprimento de onda de excitação entre 530-560 nm e de emissão em 590nm, indicando a presença ou ausência de células viáveis (RAMPERSAD, 2012).

Para avaliar o efeito da leptina, estradiol e da combinação leptina-estradiol em culturas de linhagens celulares MCF-7 e MDA-MB-231 incubadas com doxorubicina e tamoxifeno, foram plaqueadas 10.000 células por poço em placas de 96 poços e incubadas por 24 horas. Após este período o meio de plaqueamento foi substituído por meio contendo os hormônios: leptina 100 ng/mL, estradiol 100 pg/mL ou a combinação leptina-estradiol nas referidas concentrações. Em seguida as células foram re-incubadas por 48 horas e, após este período, os fármacos foram adicionados nas respectivas concentrações para a curva de viabilidade celular de doxorubicina (3,16; 10; 31,6; 100; 316 e 1000  $\mu$ M) para as linhagens MCF-7 e MDA-MB-231 e para a curva de viabilidade celular

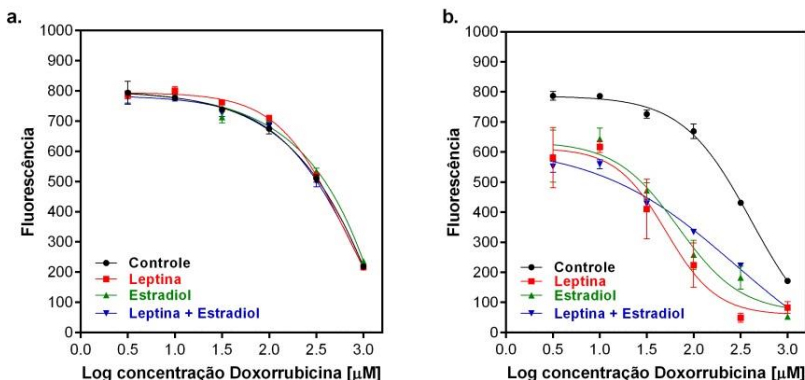
de tamoxifeno (0,316; 1,0; 3,16; 10; 31,6 e 100  $\mu\text{M}$ ), o qual foi usado somente para a linhagem MCF-7.

Conjuntamente a estes ensaios, foram realizados dois ensaios que avaliaram duas situações distintas: primeiro, foi avaliado o efeito dos hormônios na linhagem MDA-MB-231 em DMEM +10% SBF e em DMEM sem SBF. Segundo, foi avaliado o efeito dos hormônios nas linhagens MCF-7 com RMPI + SR2 0,5x e RPMI sem SR2 na linhagem MDA-MB-231 com DMEM + SR2 0,5x e DMEM sem SR2.

No ensaio que avaliou o efeito dos hormônios na MDA-MB-231 incubada em DMEM + 10% de SBF, foi observado que o meio com soro mascarou o resultado dos hormônios, pois não houve diferença entre as tendências das curvas que se apresentaram sobrepostas (Figura 15a). Contrariamente, o ensaio que avaliou o efeito dos hormônios na MDA-MB-231 incubada em meio sem SBF apresentou maior variação nas tendências das curvas de viabilidade. A curva controle apresentou maior fluorescência entre os log [ $\mu\text{M}$ ] 0,5 a 3,0 em relação às curvas de doxorubicina na presença de leptina, estradiol e da combinação leptina-estradiol. Entre os log [ $\mu\text{M}$ ] 0,5 e 1,5 a curva leptina-estradiol apresentou a menor fluorescência e, a partir do log [ $\mu\text{M}$ ] 1,5, a fluorescência da curva leptina-estradiol apresentou fluorescência superior à da curva da leptina e à curva do estradiol (Figura 15b).

No ensaio com a linhagem MDA-MB-231 para comparar a viabilidade das células em meio com SR2, meio sem SBF, meio com os tratamentos leptina 100 ng/mL, estradiol 100 pg/mL ou leptina-estradiol nas respectivas concentrações, porém sem SR2, ficou evidente que os meios sem SR2, mesmo que tratados com leptina, estradiol e leptina mais estradiol, apresentaram viabilidade inferior e com diferença significativa quando comparados ao meio com SR2 (Figura 16a). De maneira semelhante, a MCF-7 apresentou viabilidade reduzida para os grupos meios s/ SBF, leptina, estradiol ou leptina-estradiol.

**Figura 15 – Ensaio de viabilidade com MDA-MB-231 avaliando o efeito na curva de doxorrubicina com DMEM + 10% SBF e sem SBF**



(a) Gráfico com a curva de concentração de doxorrubicina com DMEM + 10% SBF. A presença de SBF não permite notar diferença nas tendências das curvas entre o controle e os tratamentos com os hormônios. (b) Gráfico com a curva de concentração de doxorrubicina com DMEM sem SBF. DMEM sem SBF não apresenta perfil gráfico sem tendência definida.

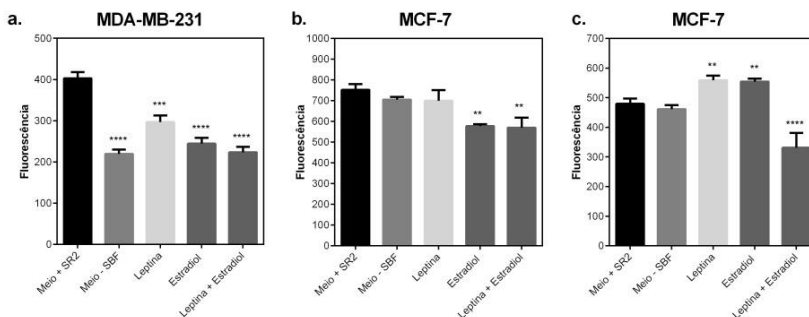
No entanto, a diferença significativa foi identificada somente nos tratamentos com estradiol e no tratamento de leptina mais estradiol (Figura 16b). O fato do tratamento com a leptina não apresentar diferença significativa na linhagem MCF-7, reforça seu potencial proliferativo, assim como na linhagem MDA-MB-231, pois mesmo com a diferença significativa indicando viabilidade inferior ao meio + SR2, o tratamento com a leptina 100 ng/mL apresentou a maior média para esta linhagem, também reforçando o potencial proliferativo da leptina (Figura 16c).

O ensaio com adição de SR2, nas incubações com os hormônios, corroboram os efeitos descritos no ensaio de proliferação com a MCF-7 para a concentração de 100 ng/mL (Figura 8b), pois a concentração de 100 ng/mL promoveu maior proliferação celular, assim como promoveu maior viabilidade celular (Figura 16c). No entanto, a concentração da combinação de leptina-estradiol (100 ng-pg/mL) limitou a viabilidade celular (Figura 16c), enquanto que no ensaio de proliferação apresentou potencialização do efeito (Figura 8b).

Contudo, os resultados foram úteis para demonstrar que os efeitos da leptina, do estradiol e da combinação ficam mascarados em meio com SBF e indefinidos em meio sem SBF. O SR2 é necessário para que

os efeitos dos hormônios sejam distintos e identificáveis nas incubações realizadas com as duas linhagens celulares utilizadas.

**Figura 16 – Avaliação dos efeitos dos hormônios nas linhagens incubadas com meio com SR2, ou em meio sem SR2**



(a) As colunas representam os dados brutos em fluorescência para o ensaio de viabilidade com a linhagem celular MDA-MB-231, os grupos com os hormônios não possui adição de SBF e nem adição de SR2. (b) As colunas representam os dados brutos em fluorescência para o ensaio de viabilidade com a linhagem celular MCF-7, os grupos com os hormônios não possui adição de SBF e nem adição de SR2. (c) As colunas representam os dados brutos em fluorescência para o ensaio de viabilidade com a linhagem celular MCF-7, aos grupos contendo os hormônios foi adicionado SR2. Para análise estatística foi utilizado one-way ANOVA, seguido do teste de Dunnett. Valores de  $**p>0,005$ ,  $***p>0,0001$  e  $****p>0,00001$  foram considerados estatisticamente significativos quando comparados com o controle (n=3).

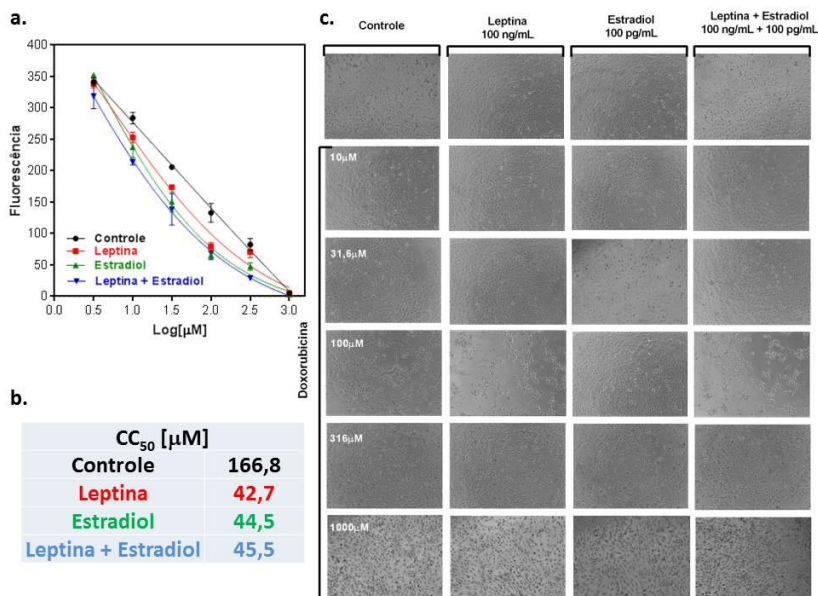
Os resultados obtidos na determinação da  $CC_{50}$  para a linhagem MDA-MB-231 tratada com doxorrubicina apresentou a seguinte tendência nas curvas de controle (doxorrubicina sem hormônios), leptina 100 ng/mL, estradiol 100 pg/mL e na combinação leptina-estradiol em suas correspondentes concentrações: o controle apresentou viabilidade mais elevada do que os demais tratamentos com os hormônios, assim como observado nas curvas de viabilidade entre os valores de log [ $\mu$ M] 0,5 a 3,0. A curva da leptina demonstrou viabilidade superior ao estradiol e leptina-estradiol (Figura 17a). No entanto, recorda-se que, o ensaio de proliferação não demonstrou resultado significativo para a linhagem MDA-MB-231 incubada com os hormônios, embora se saiba que a leptina possa estimular, ou não o efeito proliferativo na MDA-MB-231 (RAY et al., 2007, WEICHAUS et al., 2013 e DUBOIS et al., 2014), de forma que os resultados do ensaio de viabilidade e o de proliferação confirme o efeito da leptina, do estradiol e da combinação

leptina-estradiol neste contexto experimental. E, os resultados da  $CC_{50}$  confirmam as tendências das curvas (Figura 17b). A curva de viabilidade demonstrou a tendência dose-resposta do efeito da doxorrubicina, quanto maior a concentração, menor a viabilidade em consequentemente maior o dano celular. Como se pode observar nas microfotografias a degradação morfológica da cultura das células de cada concentração (Figura 17c). Observou-se com estes dados que a presença dos hormônios no tratamento com doxorrubicina, nas condições deste ensaio *in vitro*, reduziu a  $CC_{50}$  nos tratamentos, ou seja, uma concentração de doxorrubicina menor, capaz de matar 50% da população de células, foi determinada respectivamente na presença de leptina 100 ng/mL, na presença de estradiol 100 pg/mL ou leptina-estradiol nas consecutivas concentrações quando comparadas à  $CC_{50}$  do controle (Figura 17b). Alguns trabalhos da literatura demonstram que leptina pode alterar o efeito da doxorrubicina sobre as células de câncer, duas possibilidades são o aumento da expressão de IL-6, que pode ocorrer por ação da leptina, ou por aumento da concentração plasmática de AMPc citoplasmático (CONZE et al., 2001, NAVIGLIO et al., 2010 e SPINA et al., 2013)

Embora a MDA-MB-231 seja uma linhagem estrógeno-independente, essa discrepância também foi notada no ensaio de proliferação que, apesar de não apresentar resultado significativo para linhagem MDA-MB-231, foi observada discreta tendência na proliferação na presença do estradiol quando observado em relação ao controle (Figura 9b). Sendo assim, compreende-se que os efeitos da leptina na MDA-MB-231 pode ser variável, de acordo com as condições experimentais e com a suscetibilidade desta linhagem (DUBOIS et al., 2014)

O mesmo ensaio feito para a determinação da  $CC_{50}$  da doxorrubicina para MCF-7 demonstrou resultado semelhante. No entanto, observou-se que a viabilidade celular na combinação leptina-estradiol, apresentou-se inferior à viabilidade da curva do estradiol somente no intervalo log [ $\mu$ M] 1,0 a 2,5 (Figura 18a). E, como observado na MDA-MB-231, os hormônios também reduziram as  $CC_{50}$  na linhagem MCF-7 que foram incubadas com leptina, estradiol e a combinação dos hormônios (Figura 18b). A MCF-7 demonstrou-se proporcionalmente sensível às concentrações da doxorrubicina (Figura 18a) demonstrando maior dano morfológico nas células quanto maior foi a concentração de doxorrubicina (Figura 18c).

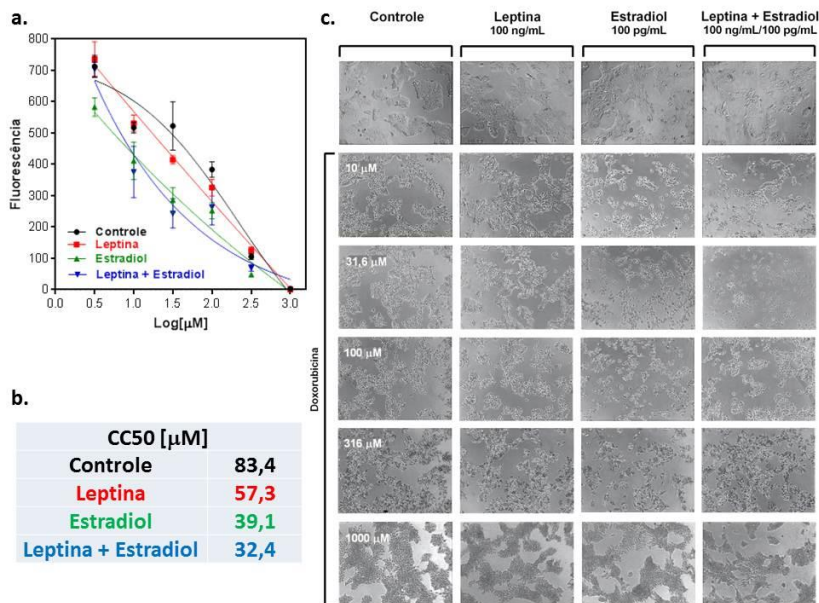
**Figura 17 – Avaliação do efeito dos hormônios em ensaio de viabilidade celular em linhagem celular MDA-MB-231 tratada com doxorubicina**



(a) Gráfico da curva de viabilidade celular em linhagem MDA-MB-231, a curva está expressa em dados brutos fluorescência x log [μM]. (b) Resultado das CC<sub>50</sub> do controle, leptina, estradiol e leptina + estradiol calculados a partir do Log [μM] de dados normalizados. (c) Microfotografias feitas em microscópio ótico invertido em aumento de 10x evidenciando a alteração morfológica proporcional à concentração de doxorubicina. Para análise estatística foi utilizado o teste ANOVA de uma via, seguido do teste de Dunnett (n=1).

Uma possível razão para estas discrepâncias pode estar relacionada ao mecanismo de ação do fármaco, pois a doxorubicina é um inibidor da topoisomerase II, conseqüentemente pode afetar o processo mitogênico e assim variar o resultado da proliferação, do ciclo e da viabilidade celular. Além disso, a doxorubicina também atua produzindo formas de radicais livres de oxigênio e com isso aumentar a citotoxicidade na peroxidação de lipídios na membrana celular. Todavia, não há muito trabalhos avaliando o efeito da leptina no tratamento *in vitro* de linhagens tumorais com doxorubicina, o que identifica essa possibilidade como potencial a ser investigado.

**Figura 18 – Avaliação do efeito dos hormônios em ensaio de viabilidade celular em linhagem celular MCF-7 tratada com doxorrubicina**

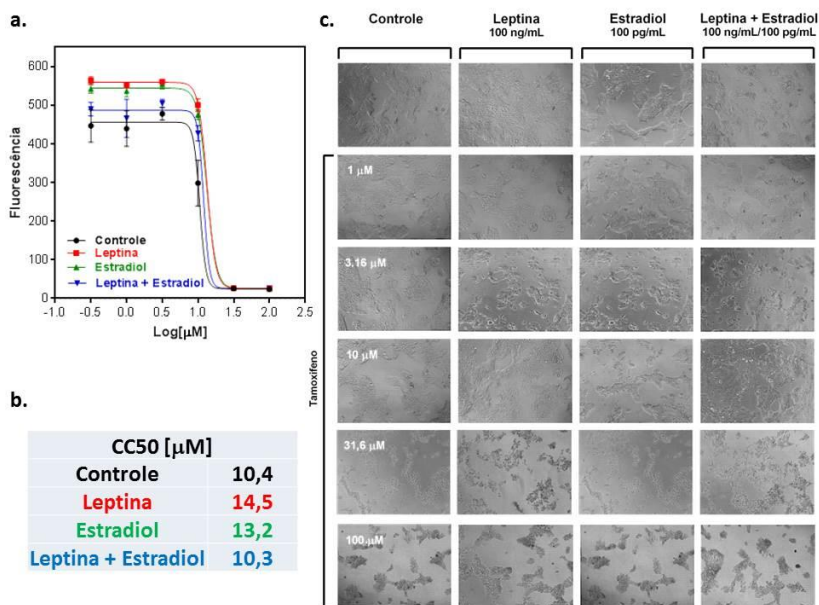


(a) Gráfico da curva de viabilidade celular em linhagem MCF-7, a curva está expressa em dados brutos fluorescência x log [ $\mu\text{M}$ ]. (b) Resultado das  $\text{CC}_{50}$  do controle, leptina, estradiol e leptina + estradiol calculados a partir do Log [ $\mu\text{M}$ ] de dados normalizados. (c) Microfotografias feitas em microscópio óptico invertido em aumento de 10x evidenciando a alteração morfológica proporcional à concentração de doxorrubicina. Para análise estatística foi utilizado o teste ANOVA de uma via, seguido do teste de Dunnett ( $n=2$ ).

Por fim, foi realizado o ensaio para avaliar o efeito dos hormônios na viabilidade celular da linhagem MCF-7 incubadas com tamoxifeno. As curvas neste ensaio apresentaram maior regularidade e evidenciou viabilidade mais elevada no grupo tratado com leptina, seguido do estradiol, da leptina-estradiol e por último o controle (Figura 19a). Portanto, os hormônios promoveram, de alguma forma, uma ação protetiva sobre células, pois a  $\text{CC}_{50}$  aumentou com a presença dos hormônios (Figura 19b). A mesma tendência dose-resposta dos ensaios anteriores também foi observada no efeito do tamoxifeno. A curva demonstra que quanto maior a concentração, menor a viabilidade celular na linhagem MCF-7 (Figura 19a), assim como maior é dano nas células (Figura 19c).



**Figura 19 – Avaliação do efeito dos hormônios na viabilidade celular da MCF-7 tratada com tamoxifeno**



(a) Gráfico da curva de viabilidade celular em linhagem MCF-7, a curva está expressa em dados brutos fluorescência x log [μM]. (b) Resultado das CC<sub>50</sub> do controle, leptina, estradiol e leptina + estradiol calculados a partir do Log [μM] de dados normalizados. (c) Microfotografias feitas em microscópio óptico invertido em aumento de 10x evidenciando a alteração morfológica proporcional à concentração de doxorrubicina. Para análise estatística foi utilizado o teste ANOVA de uma via, seguido do teste de Dunnett (n=3).

Os efeitos proliferativos dose-dependente da adição da leptina em cultura de MCF-7 interferem no efeito inibitório do receptor de estradiol pelo tamoxifeno. O Leptina pode fazer isso por diversas vias: acelerando a proliferação por aumento da expressão de ciclinas D1, ou cdk-2, aumento da expressão de aromatase, ou mesmo da estimulação do crescimento celular pelas vias ativadas pelo eixo JAK/STAT (CATALANO et al., 2003, CHEN et al., 2013 e OKAMURA et al., 2002). No mesmo sentido, outros trabalhos demonstram que a leptina aumenta a viabilidade celular em tratamento concomitante ao estradiol, tanto em MDA-MB-231, quanto em MCF-7. O mecanismo pode estar relacionado, não somente ao aumento dos receptores de estradiol, mas

também ao aumento da expressão de receptores HER-2 e fosforilação da STAT3 (PAPANIKOLAOU et al., 2014). Isso pode acontecer em tratamentos agudos em experimentos *in vitro* e também em tratamentos crônicos que podem deixar as células mais sensíveis ao efeito do estradiol (VALLE et al., 2011 e PAPANIKOLAOU et al., 2014).

Portanto, a leptina promove efeito protetivo nas células tumorais e, como detectado neste trabalho, a literatura relata que a leptina pode aumentar a  $CC_{50}$  do tamoxifeno para valores próximos a  $14,5 \mu\text{M}$  (VALLE et al., 2011), assim como a média determinada neste ensaio. Por esta razão, a leptina tem sido indicada como um potencial alvo terapêutico para células tumorais sensíveis ao estradiol, pois foi demonstrado que o silenciamento com siRNA do gene responsável pela expressão de receptor de leptina aumenta o efeito antiestrogênico do tamoxifeno deixando as células mais sensíveis à citotoxicidade deste fármaco (QIAN et al., 2015 e YOM et al., 2013).

## 6 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos:

- A leptina na concentração 100 ng/mL estimulou a proliferação na linhagem MCF-7 em aproximadamente 200% no tempo 48 horas.

- A combinação leptina-estradiol na concentração 100 ng-pg/mL potencializou a proliferação da linhagem MCF-7 em aproximadamente 400% no tempo 48 horas.

- A leptina na concentração 100 e 1000 ng/mL estimulou a migração celular da linhagem MD-MB-231 no tempo de 48 horas.

- Apesar da leptina, do estradiol e nem a combinação leptina-estradiol alterar o ciclo celular, sabe-se que o ciclo pode ser alterado, em particular na fase S (síntese) do ciclo.

- Na co-cultura, foi observada uma tendência no aumento da expressão de IL-6 na presença da linhagem 4T1 e adipócitos, 4T1 e adipócitos incubados com leptina 100 ng/mL, estradiol 100 pg/mL e a combinação leptina-estradiol 100 ng-pg/mL e na incubação de adipócitos sem estímulos dos hormônios.

- Na co-cultura, foi observada uma tendência no aumento da expressão de IGF-1 na presença da linhagem 4T1 e adipócitos, 4T1 e adipócitos incubados com leptina 100 ng/mL, estradiol 100 pg/mL e a combinação leptina-estradiol 100 ng-pg/mL e nas incubações de 4T1 sem estímulos dos hormônios e dos adipócitos sem estímulo dos hormônios.

- A leptina, o estradiol e a combinação leptina-estradiol reduziram a  $CC_{50}$  da doxorrubicina das linhagens MCF-7 e MDA-MB-231.

- A leptina, o estradiol e a combinação leptina-estradiol reduziram a  $CC_{50}$  do tamoxifeno das linhagens MCF-7.

Portanto, em conjunto, os resultados sugerem que leptina desempenha papel importante na proliferação e viabilidade de células de câncer de mama, reforçando estudos prévios que acompanham a existência de uma possível correlação entre a obesidade e o câncer de mama, pois a leptina é produzida pelo tecido adiposo e é diretamente proporcional à quantidade de células adiposa, ou seja, quanto mais células adiposas, mais leptina será produzida, logo pode ocorrer o

aumento da leptina no microambiente da mama e assim favorecer a proliferação de células tumorais.

Além disso, a presença da leptina ou da combinação da leptina-estradiol pode amenizar o efeito citotóxico do tamoxifeno na linhagem MCF-7 em ensaio *in vitro*. Enquanto que, a leptina ou a combinação leptina-estradiol possivelmente pode aumentar o efeito citotóxico da doxorrubicina nas linhagens MCF-7 e MDA-MB-231 em ensaios *in vitro*.

## 7 PERSPECTIVAS

Até o momento este trabalho proporcionou conclusões pertinentes, no entanto alguns estudos ainda podem ser realizados para melhor conclusão dos resultados.

- Avaliar a expressão de PTP1B e SOCS3 para responder o possível efeito limitador da combinação leptina-estradiol na concentração 1000 ng-pg/mL na avaliação da proliferação celular da linhagem MCF-7.

- Avaliar a expressão dos receptores de estradiol na linhagem MDA-MB-231 para responder à possível tendência na proliferação observada no ensaio de proliferação

- Avaliar o efeito protetivo da leptina na linhagem MCF-7 incubada com tamoxifeno por análise morfométrica nuclear, que pode oferecer um panorama se a célula se encontra em apoptose, necrose, mitose catastrófica, senescência.

- Repetir o ensaio de co-cultura e dosar para melhor avaliar a relação da leptina com a expressão de IL-6 e IGF-1, e dosar TNF-alfa, adiponectina: citocinas moduladoras do microambiente do câncer de mama.

- Avaliar melhor o efeito da leptina em linhagens de células tratadas com doxorrubicina.

- Avaliar o efeito da leptina na expressão de microRNA reguladores das vias de sinalização relacionadas à proliferação celular.



## BIBLIOGRAFIA

AHIMA, Rexford S. **Adipose Tissue As an Endocrine Organ**. *Obesity*, v. 15, n. 3, p. 140–146, 2006.

AHIMA, Rexford S. e colab. **Distinct physiologic and neuronal responses to decreased leptin and mild hyperleptinemia**. *Endocrinology*, v. 140, n. 11, p. 4923–4931, 1999.

AXEL, Amy E e colab. **Interleukin-6 is a potential therapeutic target in interleukin-6 dependent , estrogen receptor-  $\alpha$  - positive breast cancer**. p. 13–27, 2016.

BARROS, A.C.S.D.; BARBOSA, E.M.; GEBRIM, L.H. **Diagnóstico e Tratamento do Câncer de Mama**. [S.l.: s.n.], 2001. Documento pertencente ao Projeto Diretrizes, iniciativa conjunta da Associação Médica Brasileira e Conselho Federal de Medicina. Disponível em: <[http://www.projetodiretrizes.org.br/projeto\\_diretrizes/024.pdf](http://www.projetodiretrizes.org.br/projeto_diretrizes/024.pdf)>. Acesso em: 17 fev. 2016.

BINAI, Nadine A. e colab. **Expression of estrogen receptor alpha increases leptin-induced STAT3 activity in breast cancer cells**. *International Journal of Cancer*, v. 127, n. 1, p. 55–66, 2010.

BJORBAK, Christian e colab. **SOCS3 mediates feedback inhibition of the leptin receptor via Tyr985**. *Journal of Biological Chemistry*, v. 275, n. 51, p. 40649–40657, 2000.

BLÜHER, Matthias e MANTZOROS, Christos S. **From leptin to other adipokines in health and disease: Facts and expectations at the beginning of the 21st century**. *Metabolism: Clinical and Experimental*, v. 64, n. 1, p. 131–145, 2015.

BROCKE-HEIDRICH, Katja e colab. **Interleukin-6 – dependent gene expression profiles in multiple myeloma INA-6 cells reveal a Bcl-2 family – independent survival pathway closely associated with Stat3 activation**. *Survival*, v. 103, n. 1, p. 242–251, 2004.

BROWN, Kristy A. e colab. **Subcellular localization of cyclic AMP-responsive element binding protein-regulated transcription coactivator 2 provides a link between obesity and breast cancer in postmenopausal women**. *Cancer Research*, v. 69, n. 13, p. 5392–5399, 2009.

CAMPFIELD, L a e colab. **Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks.** *Science (New York, N.Y.)*, v. 269, n. 5223, p. 546–549, 1995.

CATALANO, Stefania e colab. **Leptin enhances, via AP-1, expression of aromatase in the MCF-7 cell line.** *Journal of Biological Chemistry*, v. 278, n. 31, p. 28668–28676, 2003.

CHEN, Xiaofeng e colab. **Leptin attenuates the anti-estrogen effect of tamoxifen in breast cancer.** *Biomedicine and Pharmacotherapy*, v. 67, n. 1, p. 22–30, 2013.

CHIU, J J e SGAGIAS, M K e COWAN, K H. **Interleukin 6 acts as a paracrine growth factor in human mammary carcinoma cell lines.** *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, v. 2, n. 1, p. 215–221, 1996.

CONZE, D e colab. **Autocrine production of interleukin 6 causes multidrug resistance in breast cancer cells.** *Cancer Res*, v. 61, n. 24, p. 8851–8858, 2001.

CORNING LIFE SCIENCES. **Cell migration, chemotaxis and invasion assay protocol.** Massachusetts: Corning, [2008]. Disponível em: <[https://www.corning.com/media/worldwide/cls/documents/an\\_Che motaxis\\_protocol.pdf](https://www.corning.com/media/worldwide/cls/documents/an_Che motaxis_protocol.pdf)>. Acesso em: 17. março. 2016.

COWLEY, M a e colab. **Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus.** *Nature*, v. 411, n. 6836, p. 480–484, 2001.

DALAMAGA, Maria. **Nicotinamide phosphoribosyl-transferase/visfatin: A missing link between overweight/obesity and postmenopausal breast cancer? Potential preventive and therapeutic perspectives and challenges.** *Medical Hypotheses*, v. 79, n. 5, p. 617–621, 2012.

DALAMAGA, Maria. **Obesity, insulin resistance, adipocytokines and breast cancer: New biomarkers and attractive therapeutic targets.** *World journal of experimental medicine*, v. 3, n. 3, p. 34–42, 2013.

DALAMAGA, Maria e DIAKOPOULOS, Kalliope N. e MANTZOROS,



Christos S. **The role of adiponectin in cancer: A review of current evidence.** *Endocrine Reviews*, v. 33, n. 4, p. 547–594, 2012.

DECOSSE, J J e colab. **Breast cancer: induction of differentiation by embryonic tissue.** *Science (New York, N.Y.)*, v. 181, n. 4104, p. 1057–8, 1973.

DELORT, Laetitia e colab. **Leptin, adipocytes and breast cancer: Focus on inflammation and anti-tumor immunity.** *Life Sciences*, v. 140, p. 37–48, 2015.

DILLER, Magnus e colab. **Effects of estriol on growth, gene expression and estrogen response element activation in human breast cancer cell lines.** *Maturitas*, v. 77, n. 4, p. 336–343, 2014.

GORSKA E., POPKO K., STELMASZCZYK-EMMEL A., CIEPIELA O., KUCHARSKA A., Wasik M.. **Leptin receptors.** *eUroPeAn JoUrnAL of MediCAL reSeArCh*, v. 15, p. 50 – 54, 2010.

ESASHI, Fumiko e colab. **Stabilization of RAD51 nucleoprotein filaments by the C-terminal region of BRCA2.** *Nature structural & molecular biology*, v. 14, n. 6, p. 468–474, 2007.

ESQUIVEL-VELÁZQUEZ, Marcela e colab. **The Role of Cytokines in Breast Cancer Development and Progression.** *Journal of Interferon & Cytokine Research*, v. 35, n. 1, p. 1–16, 2015.

FRÜHBECK, Gema. **Intracellular signalling pathways activated by leptin.** *The Biochemical journal*, v. 393, n. Pt 1, p. 7–20, 2006.

GARCÍA-ROBLES, Mayra J. e SEGURA-ORTEGA, Jorge E. e FAFUTIS-MORRIS, Mary. **The Biology of Leptin and Its Implications in Breast Cancer: A General View.** *Journal of Interferon & Cytokine Research*, v. 33, n. 12, p. 717–727, 2013.

GHILARDI, N e SKODA, R C. **The leptin receptor activates janus kinase 2 and signals for proliferation in a factor-dependent cell line.** *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*, v. 11, n. 4, p. 393–399, 1997.

GOETZE, S. e colab. **Leptin Induces Endothelial Cell Migration Through Akt, Which Is Inhibited by PPAR -Ligands.** *Hypertension*, v. 40, n. 5, p. 748–754, 2002.

HE, Donggou e colab. **IL-17 promotes tumor development through the induction of tumor promoting microenvironments at tumor sites and myeloid-derived suppressor cells.** Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950), v. 184, n. 5, p. 2281–8, 2010.

HEGYI, Krisztina e colab. **Leptin-induced signal transduction pathways.** Cell Biology International, v. 28, n. 3, p. 159–169, 2004.

HEO, Tae-hwe e WAHLER, Joseph e SUH, Nanjoo. **Potential therapeutic implications targeting agents in breast cancer.** 2016.

HORSTMAN, Astrid M. e colab. **The role of androgens and estrogens on healthy aging and longevity.** Journals of Gerontology - Series A Biological Sciences and Medical Sciences, v. 67, n. 11, p. 1140–1152, 2012.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **Condutas do INCA: Câncer de mama.** Revista Brasileira de Cancerologia, v. 47, n. 1, p. 9–19, 2001.

JR, Fernandes e colab. **Sociedade Brasileira de Mastologia Federação Brasileira das Associações de Ginecologia e Obstetrícia.** p. 1–15, 2011.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (BRASIL). **Controle do câncer de mama: documento de consenso.** Rio de Janeiro: INCA, 2004. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/publicacoes/ConsensoIntegra.pdf>>. Acesso em: 17 fev. 2016.

KATAI J. Nkhata, AMITABHA Ray, TODD F. Schuster e CLEARY, Michael E. GROSSMANN and MARGOT P. **Effects of adiponectin and leptin co-treatment on human breast cancer cell growth.** Oncology reports, v. 21, p. 223–230, 2009.

KHAN, Sajid e colab. **Role of adipokines and cytokines in obesity-associated breast cancer: Therapeutic targets.** Cytokine and Growth Factor Reviews, v. 24, n. 6, p. 503–513, 2013.

KNÜPFER, Heike e PREIS, Rainer. **Significance of interleukin-6 (IL-6) in breast cancer (review).** Breast Cancer Research and Treatment, v. 102, n. 2, p. 129–135, 2007.

KWON, Obin e KIM, Ki Woo e KIM, Min-Seon. **Leptin signalling pathways in hypothalamic neurons.** Cellular and molecular life sciences:

CMLS, v. 73, n. 7, p. 1457–1477, 2016.

LE CALVEZ-KELM, Florence e colab. **RAD51 and Breast Cancer Susceptibility: No Evidence for Rare Variant Association in the Breast Cancer Family Registry Study.** PLoS ONE, v. 7, n. 12, 2012.

LEU, Chuen-Miin e colab. **Interleukin-6 acts as an antiapoptotic factor in human esophageal carcinoma cells through the activation of both STAT3 and mitogen-activated protein kinase pathways.** Oncogene, v. 22, n. 49, p. 7809–18, 2003.

LOFFREDA, S e colab. **Leptin regulates proinflammatory immune responses.** The FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology, v. 12, p. 57–65, 1998.

LORD, G M e colab. **Leptin modulates the T-cell immune response and reverses starvation-induced immunosuppression.** Nature, v. 394, n. 6696, p. 897–901, 1998.

MADEJ, Thomas e BOGUSKI, Mark S. e BRYANT, Stephen H. **Threading analysis suggests that the obese gene product may be a helical cytokine.** FEBS Letters, v. 373, n. 1, p. 13–18, 1995.

MAURO, Loredana e colab. **Evidence that leptin up-regulates E-cadherin expression in breast cancer: Effects on tumor growth and progression.** Cancer Research, v. 67, n. 7, p. 3412–3421, 2007.

SCHWARTZ, Michael W. e colab. **Specificity of Leptin Action on Elevated Blood Glucose Levels and Hypothalamic Neuropeptide Y Gene Expression in ob/ob Mice.** American Journal of Medical Genetics, v. 234, n. August 1999, p. 228–234, 2000.

MUKHERJEE, Siddhartha. **O imperador de todos os males.** 1a. ed. São Paulo: Cia. das Letras, 2012.

MÜNZZBERG, Heike e MORRISON, Christopher D. **Structure, production and signaling of leptin.** Metabolism: Clinical and Experimental, v. 64, n. 1, p. 13–23, 2015.

NATIONAL CENTER OF BIOTECHNOLOGY INFORMATION.  
**Pubchem Compound DataBase;** CID=31703,  
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/31703> Acesso em  
(23/12/2015)

NATIONAL CENTER OF BIOTECHNOLOGY INFORMATION.  
**Pubchem Compound DataBase;** CID=2733256  
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2733526> Acessaod em  
(123/12/2015)

NAVIGLIO, Silvio e colab. **Leptin potentiates antiproliferative action of cAMP elevation via protein kinase A down-regulation in breast cancer cells.** *Journal of Cellular Physiology*, v. 225, n. 3, p. 801–809, 2010.

NEWMAN, Gale e GONZALEZ-PEREZ, Ruben Rene. **Leptin-cytokine crosstalk in breast cancer.** *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 382, n. 1, p. 570–582, 2014.

OKUMURA, Mie e colab. **Leptin and high glucose stimulate cell proliferation in MCF-7 human breast cancer cells: Reciprocal involvement of PKC- $\alpha$  and PPAR expression.** *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, v. 1592, n. 2, p. 107–116, 2002.

PAPANIKOLAOU, Vassilis e colab. **Synergy of leptin/STAT3 with HER2 receptor induces tamoxifen resistance in breast cancer cells through regulation of apoptosis-related genes.** *Cellular Oncology*, p. 155–164, 2014.

PARK, Hyeong Kyu e AHIMA, Rexford S. **Physiology of leptin: energy homeostasis, neuroendocrine function and metabolism.** *Metabolism: Clinical and Experimental*, v. 64, n. 1, p. 24–34, 2014.

PIETRAS, Kristian e ÖSTMAN, Arne. **Hallmarks of cancer: Interactions with the tumor stroma.** *Experimental Cell Research*, v. 316, n. 8, p. 1324–1331, 2010.

POLYAK, Kornelia e KALLURI, Raghu. **The role of the microenvironment in mammary gland development and cancer.** *Cold Spring Harb Perspect Biol*, v. 2, n. 11, p. a003244, 2010.

RAMPERSAD, Sephra N. **Multiple applications of alamar blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays.** *Sensors (Switzerland)*, v. 12, n. 9, p. 12347–12360, 2012.

RAY, Alpana e RAY, Bimal K. **Induction of Ras by SAF-1/MAZ through a feed-forward loop promotes angiogenesis in breast cancer.** *Cancer medicine*, v. 4, n. 2, p. 224–34, 2015.

RAY, Amitabha e NKHATA, Katai J. e CLEARY, Margot P. **Effects of leptin on human breast cancer cell lines in relationship to estrogen receptor and HER2 status.** International Journal of Oncology, v. 30, n. 6, p. 1499–1509, 2007.

SAITO, M e colab. **Molecular cloning of a murine IL-6 receptor-associated signal transducer, gp130, and its regulated expression in vivo.** Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950), v. 148, n. 12, p. 4066–4071, 1992.

SAMAVAT, Hamed e KURZER, Mindy S. **Estrogen metabolism and breast cancer.** Cancer Letters, v. 356, n. 2, p. 231–243, 2015.

SAXENA, Neeraj K. e SHARMA, Dipali. **Multifaceted leptin network: The molecular connection between obesity and breast cancer.** Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia, v. 18, n. 3-4, p. 309–320, 2013.

SCHWARTZ, Michael W. e colab. **Identification of targets of leptin action in rat hypothalamus.** Journal of Clinical Investigation, v. 98, n. 5, p. 1101–1106, 1996.

SHEN, Wen-hong e colab. **Proinflammatory Cytokines Block Growth of Breast Cancer Cells by Impairing Signals from a Growth Factor Receptor 1.** p. 4746–4756, 2002.

SIPILA, S. **Body composition and muscle performance during menopause and hormone replacement therapy.** J Endocrinol Invest, v. 26, n. 9, p. 893–901, 2003.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CANCEROLOGIA; et al. **Câncer de mama: terapia endócrina e terapia alvo.** [S.l.: s.n.], 2011. Documento pertencente às Diretrizes Clínicas na Saúde Suplementar, iniciativa conjunta Associação Médica Brasileira e Agência Nacional de Saúde Suplementar. Disponível em: [http://www.projetodiretrizes.org.br/ans/diretrizes/cancer de mama-terapia endocrina e terapia alvo.pdf](http://www.projetodiretrizes.org.br/ans/diretrizes/cancer_de_mama-terapia_endocrina_e_terapia_alvo.pdf) Acesso em: 17 fev. 2016.

STUDEBAKER, Adam W. e colab. **Fibroblasts isolated from common sites of breast cancer metastasis enhance cancer cell growth rates and invasiveness in an interleukin-6-dependent manner.** Cancer Research, v. 68, n. 21, p. 9087–9095, 2008.

TALIAFERRO-SMITH, LaTonia e colab. **Integral role of PTP1B in adiponectin-mediated inhibition of oncogenic actions of leptin in breast carcinogenesis.** *Neoplasia* (New York, N.Y.), v. 15, n. 1, p. 23–38, 2013.

TARTAGLIA, Louis A. e colab. **Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R.** *Cell*, v. 83, n. 7, p. 1263–1271, 1995.

THOMPSON, E W e colab. **Differential regulation of growth and invasiveness of MCF- Breast Cancer Cells by Antiestrogens.** *Cancer Res*, v. 48, n. 38, p. 6764–6768, 1988.

TRAYHURN, Paul e WOOD, I Stuart. **Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue.** *The British journal of nutrition*, v. 92, n. 3, p. 347–355, 2004.

UPADHYAY, Jagriti e FARR, Olivia M. e MANTZOROS, Christos S. **The role of leptin in regulating bone metabolism.** *Metabolism: Clinical and Experimental*, v. 64, n. 1, p. 105–113, 2015.

VALLE, Adamo e colab. **Chronic leptin treatment sensitizes MCF-7 breast cancer cells to estrogen.** *Cellular Physiology and Biochemistry*, v. 28, n. 5, p. 823–832, 2011.

WANG, Yi e colab. **BASC, a super complex of BRCA1-associated proteins involved in the recognition and repair of aberrant DNA structures.** *Genes and Development*, v. 14, n. 8, p. 927–939, 2000.

WELTE, Thomas e ZHANG, Xiang H F. **Interleukin-17 could promote breast cancer progression at several stages of the disease.** *Mediators of Inflammation*, v. 2015, 2015.

WISEMAN, B. S. **Stromal Effects on Mammary Gland Development and Breast Cancer.** *Science*, v. 296, n. 5570, p. 1046–1049, 2002.

QIAN e colab. **ObRb downregulation increases breast cancer cell sensitivity to tamoxifen.** *Tumor Biology*, v. 36, n. 9, p. 6813–6821, 2015.

YIN, N. **Molecular Mechanisms Involved in the Growth Stimulation of Breast Cancer Cells by Leptin.** *Cancer Research*, v. 64, n. 16, p. 5870–5875, 2004.

YUAN, H J e SUN, K W e YU, K. **Leptin promotes the proliferation and**

**migration of human breast cancer through the extracellular-signal regulated kinase pathway.** *Mol Med Rep*, v. 9, n. 1, p. 350–354, 2014.

ZHANG, Y e colab. **Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue.** *Nature*, v. 372, n. 6505, p. 425–32, 1994.