



MELATONIN MODULATION OF RADIATION AND CHEMOTHERAPEUTICS-INDUCED CHANGES ON DIFFERENTIATION OF BREAST FIBROBLAST

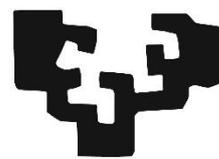
Enrique García Nieto



UC

UNIVERSIDAD
DE CANTABRIA

eman ta zabal zazu



UPV EHU



DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA Y FARMACOLOGÍA

UNIVERSIDAD DE CANTABRIA

Director: Samuel Cos Corral; Codirectora: Alicia González Cabeza

ÍNDICE

RESUMEN.....	2
INTRODUCCIÓN.....	3
1. <i>Melatonina</i>	
2. <i>Cáncer de mama</i>	
3. <i>Reacción desmoplásica</i>	
OBJETIVOS.....	7
MATERIAL Y MÉTODOS.....	8
1. <i>Cultivos celulares</i>	
2. <i>Tratamientos y compuestos químicos</i>	
3. <i>Procedimiento de radiación de las células</i>	
4. <i>Experimentos de cocultivos celulares</i>	
5. <i>Medida de la viabilidad celular. Método del MTT</i>	
6. <i>Estudios de expresión génica</i>	
7. <i>Determinación de la diferenciación de adipocitos mediante tinción con Oil Red O</i>	
8. <i>Medida directa de la actividad aromatasasa</i>	
9. <i>Análisis estadístico de los datos</i>	
RESULTADOS.....	19
1. <i>Efectos de la melatonina sobre los cambios inducidos por el docetaxel y la vinorelbina en la diferenciación de preadipocitos tumorales mamarios</i>	
2. <i>Efectos de la melatonina sobre los cambios inducidos por la radiación sobre la diferenciación de preadipocitos mamarios</i>	
3. <i>Efectos de la melatonina sobre los cambios provocados por el docetaxel, la vinorelbina y la radiación en la expresión de C/EBPα y PPARγ en preadipocitos mamarios</i>	
4. <i>Efectos de la melatonina sobre la actividad y la expresión de la aromatasasa en preadipocitos mamarios tras la administración de docetaxel, vinorelbina y la aplicación de radiación</i>	
5. <i>Efectos de la melatonina sobre la expresión de citoquinas antiadipogénicas en preadipocitos tratados con docetaxel, vinorelbina y radiación</i>	
6. <i>Efectos de la melatonina sobre los cambios en la expresión de COX-1 y COX-2 en preadipocitos tratados con docetaxel, vinorelbina y radiación</i>	
DISCUSIÓN.....	29
CONCLUSIONES.....	34
BIBLIOGRAFÍA.....	35

RESUMEN

La melatonina ejerce un papel oncostático sobre diferentes tipos de tumores, especialmente, en el cáncer de mama cuyo crecimiento y desarrollo depende de las concentraciones de estrógenos. Además, la melatonina sensibiliza las células tumorales frente a los quimioterápicos y la radiación incrementando sus efectos terapéuticos. Por ello, en nuestro estudio hemos investigado los efectos de los quimioterápicos docetaxel y vinorelbina y la radiación sobre células normales, particularmente preadipocitos humanos mamarios, un tipo celular crucial en el microambiente tumoral del cáncer de mama, y su modulación por melatonina.

Docetaxel y vinorelbina juegan un papel en la reacción desmoplásica en cáncer de mama, inhibiendo la proliferación y estimulando la diferenciación de los preadipocitos a adipocitos, mediante un incremento en la expresión de dos de los principales reguladores de la diferenciación adipogénica, C/EBP α y PPAR γ , y mediante una disminución de la expresión de citoquinas antiadipogénicas, como son TNF- α , IL-6 o IL-11. La aplicación de radiación inhibió tanto la proliferación como la diferenciación de los preadipocitos a través de una disminución de la expresión de C/EBP α y PPAR γ y también estimuló la expresión de TNF- α . Además, el docetaxel y la radiación disminuyeron la actividad y expresión de la enzima aromatasa, mediante una reducción de la expresión del mRNA del promotor II de aromatasa y de las enzimas COX-1 y COX-2. La melatonina potenció el efecto estimulador del docetaxel y la vinorelbina sobre la diferenciación y también sus efectos inhibitorios en la expresión y actividad de la enzima aromatasa, mediante una estimulación de la expresión de C/EBP α y PPAR γ y una reducción de la expresión de las citoquinas antiadipogénicas y las ciclooxigenasas. En combinación con la radiación, la melatonina neutralizó el efecto inhibitorio ejercido sobre la diferenciación de los preadipocitos mediante un incremento de la expresión de C/EBP α y PPAR γ y un descenso de la expresión de TNF- α inducida por la radiación. La melatonina también potenció el efecto inhibitorio ejercido por la radiación sobre la actividad y expresión de aromatasa disminuyendo la expresión del promotor II y las enzimas COX-1 y COX-2.

Nuestros resultados sugieren que la quimioterapia y la radiación ejercen efectos reguladores sobre los preadipocitos (diferenciación y actividad y expresión de aromatasa) y que la melatonina en este sentido modula esas acciones, lo cual la convierte en un promotor adyuvante para el tratamiento con quimioterapia y radioterapia, habiendo demostrado efectos antitumorales sinérgicos.

INTRODUCCIÓN

1. MELATONINA

La N-acetil-5-metoxitriptamina o melatonina es la principal hormona secretada por la glándula pineal, y está involucrada en muy diferentes actividades fisiológicas y contextos biológicos [1]. La producción fisiológica de melatonina está regulada por el ciclo circadiano, siendo estimulada la síntesis y secreción en situaciones de oscuridad (noche) y reprimida en presencia de luz (día) [2].

En cuanto a los niveles de melatonina en sangre, están regulados por la síntesis, ya comentada, y por la degradación periférica de la misma, principalmente en el hígado, aunque se han descrito otras vías de degradación secundarias [3]. Además de la síntesis de melatonina en la glándula pineal, se han descrito otros orígenes de la misma, como por ejemplo la retina, el tracto gastrointestinal la piel, la médula ósea, los linfocitos y otros tejidos [4].

La melatonina ejerce una gran cantidad de acciones biológicas; sin embargo, la mejor descrita es la acción crono-biológica como neurohormona y coordinadora del ciclo luz/oscuridad. Los niveles elevados durante las horas de oscuridad en sangre informan a las diferentes células y tejidos del organismo de la duración de la noche. Alteraciones en la longitud del día o el tiempo de exposición a la luz pueden modificar la producción de melatonina, des-sincronizando el llamado ‘reloj humano’ [5].

La melatonina utiliza una gran cantidad de mecanismos para ejercer su función [6]. Sus acciones están basadas en su capacidad para unirse a los receptores de membrana, los cuales están acoplados mayoritariamente a proteínas G que se encargan de activar las cascadas de transducción de las señales [7]. También puede actuar a través de receptores huérfanos o moléculas como la calmodulina o realizar acciones no mediadas por ningún receptor como la neutralización de radicales libres y derivados reactivos de oxígeno [8,9].

El importante papel oncostático ejercido por la melatonina sobre las células tumorales mamarias está claramente descrito y demostrado [10,11]. Gran cantidad de estos efectos anticancerígenos de melatonina están mediados por la unión de la hormona a dos de sus receptores encontrados en humanos como son el MT₁ y el MT₂ [12]. Ambos receptores están expresados en varios órganos, pero muestran diferentes perfiles de expresión [7]. La importancia de la expresión de estos receptores está ampliamente descrita tanto que varios estudios han correlacionado la expresión del receptor MT₁ por las células tumorales mamarias con un mejor pronóstico y progresión de la enfermedad que los casos en los que no lo expresan [13,14,15].

2. CÁNCER DE MAMA

Según la Asociación Española Contra el Cáncer (AECC), el cáncer de mama es el tumor maligno más frecuentemente diagnosticado entre las mujeres de todo el mundo.

En el año 2008 se diagnosticaron aproximadamente 1.380.000 casos nuevos de cáncer de mama en el mundo. En la actualidad es el tumor más frecuente en la población femenina tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo. La incidencia en España es baja, sobre todo comparada con otros países como Estados Unidos, Canadá, Reino Unido, Alemania o Francia. En España se diagnostican unos 26.000 casos al año, lo que representa casi el 30% de todos los tumores del sexo femenino en nuestro país. La mayoría de los casos se diagnosticaron entre los 35 y 80 años, con un máximo entre los 45 y 65 años. Tanto en número de casos como las tasas de incidencia aumentan lentamente en España y en el mundo, probablemente debido al envejecimiento de la población y a un diagnóstico cada vez más precoz.

El cáncer de mama supone la primera causa de mortalidad por cáncer en mujeres con 6.312 fallecimientos en 2011. En el año 2002, el cáncer de mama fue la causa de 411.000 muertes en todo el mundo, siendo la primera causa de muerte por cáncer entre las mujeres. En España fallecen unas 6000 mujeres al año por cáncer de mama, lo que representa el 16,7% de todos los fallecimientos por cáncer del sexo femenino en el país y el 3,3% del total de muertes entre las mujeres. También en el caso de la mortalidad, al igual que en la incidencia, España tiene una de las tasas más bajas a nivel del territorio europeo.

En cuanto a la terapéutica del cáncer de mama, la principal herramienta usada en la clínica es la quimioterapia, la cual consiste en la administración de fármacos tóxicos para la célula cancerosa tanto de manera oral como intravenosa. Además de la quimioterapia, en muchos casos se requiere del uso de terapias adyuvantes como la radioterapia [16].

El cáncer de mama es un modelo de cáncer maligno hormono-dependiente. Un alto porcentaje de los nuevos casos de cáncer de mama son inicialmente hormono-dependientes, tanto en mujeres pre como post menopáusicas. El estradiol, principal hormona sexual biológicamente activa presente en el tejido mamario, juega un papel muy relevante en la génesis y progresión del tumor en mujeres. Por este motivo además se puede considerar al estradiol como un “carcinógeno mamario” [17].

En este sentido, los estrógenos contribuyen a la patogénesis del cáncer de mama. Altas concentraciones de estradiol encontradas en algunos tumores mamarios podrían deberse tanto a la captación de estrógenos del torrente sanguíneo como a la síntesis in-situ. Una de las vías más

importantes involucradas en la síntesis de estrógenos en células tumorales de mama es la vía de la aromatasa, la cual transforma andrógenos en estrógenos [17].

Los precursores esteroideos más importantes para la síntesis local de estrógenos son la dehidroepiandrosterona (DHEA) y su sulfato (DHEA-S), que proceden principalmente de la corteza suprarrenal. La **Figura 1** muestra una visión general de los mecanismos básicos enzimáticos que se llevan a cabo en la formación y transformación de estrógenos humanos en las células tumorales mamarias.

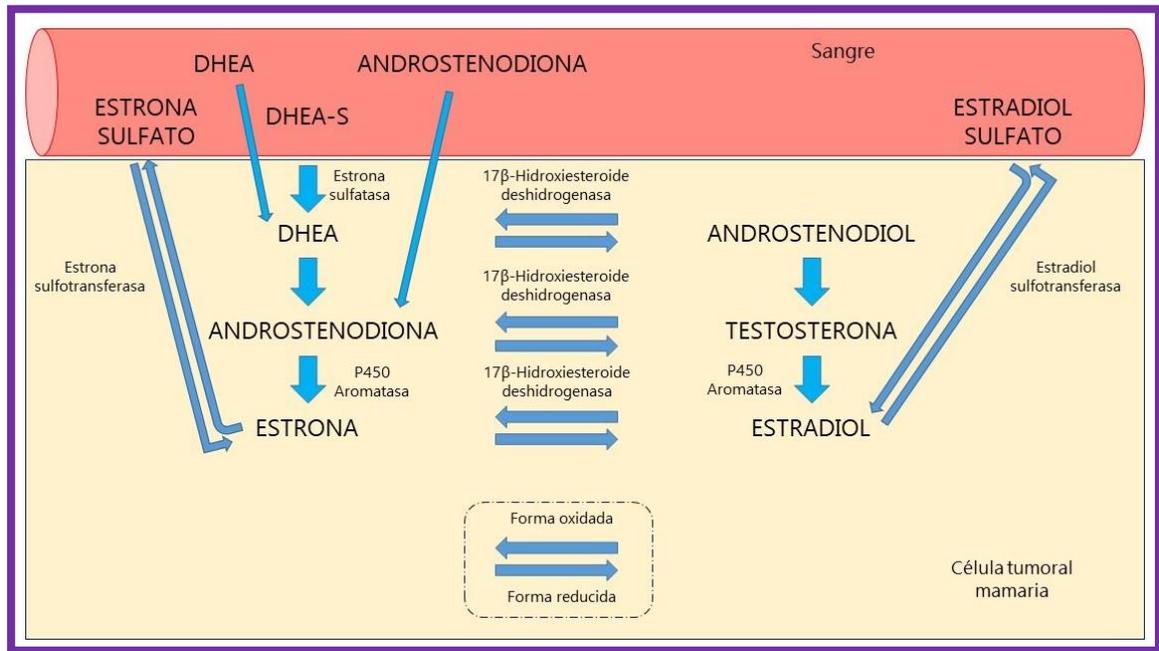


Figura 1. Mecanismos enzimáticos relacionados con la biosíntesis local de estrógenos a nivel del tejido tumoral mamario. (Abreviaturas: DHEA, dehidroepiandrosterona; DHEA-S, dehidroepiandrosterona sulfato)

Se han descrito varios mecanismos para explicar las acciones oncostáticas producidas por la melatonina en células tumorales mamarias [17]. Entre otros, cabe destacar los efectos indirectos derivados de la interacción entre melatonina y el eje neuroendocrino reproductivo, disminuyendo los valores de hormonas influyentes en el crecimiento del tumor como los estrógenos [1]. También se han descrito acciones antiestrogénicas directas sobre las células tumorales mamarias [18], regulando la actividad de varios de los enzimas responsables de la síntesis de estrógenos en el entorno tumoral [19].

3. REACCIÓN DESMOPLÁSICA

Se ha descrito en multitud de ocasiones y mediante muy diferentes mecanismos la influencia que tiene el microambiente tumoral en el crecimiento y mantenimiento de las células tumorales mamarias. Tanto las células adiposas indiferenciadas (preadipocitos) como las células

del endotelio vascular van a proporcionar un soporte estructural y bioquímico para el crecimiento del tumor, principalmente incrementando la biosíntesis local de estrógenos (vía activación de la aromatasas) en respuesta a las señales paracrinas secretadas por las células tumorales [20,21].

Las células tumorales mamarias secretan citoquinas (TNF- α , interleucina-11 e interleucina-6) que inhiben la diferenciación de los preadipocitos del entorno peritumoral a adipocitos maduros, principalmente mediante la inhibición de la expresión de factores de transcripción como PPAR γ y C/EBP α . A su vez, la secreción de citoquinas antiadipogénicas y la indiferenciación de las células adiposas primarias van a suponer un incremento de la actividad aromatasas en el entorno tumoral. A este fenómeno fisiológico se le conoce comúnmente como reacción desmoplásica o acumulación de adipocitos indiferenciados con gran actividad aromatasas alrededor de las células tumorales mamarias.

Las células tumorales mamarias, específicamente, encuentran regulada su expresión de la enzima aromatasas formadora de estrógenos principalmente por los promotores II y I.3, los cuales están regulados a su vez por los niveles locales de AMP cíclico (cAMP).

Las células tumorales mamarias secretan también prostaglandina E₂ (PGE₂) la cual estimula la expresión y actividad de la aromatasas en preadipocitos (vía cAMP) y aumenta las concentraciones de citoquinas antiadipogénicas. La PGE₂ se sintetiza gracias a la actividad de las ciclooxigenasas (COX), tanto la isoforma COX-1 como la COX-2. COX-1 está constitutivamente expresada en la mayoría de los tejidos y COX-2 es inducible, y se ha visto que está presente en tejido tumoral mamario, no encontrándose en tejido mamario no tumoral.

La melatonina, en este sentido, reduce la presencia de preadipocitos en el entorno peritumoral estimulando su diferenciación a adipocitos maduros y reduciendo así la actividad aromatasas a través de un descenso de la concentración de citoquinas antiadipogénicas [19,22,23], **Figura 2.**

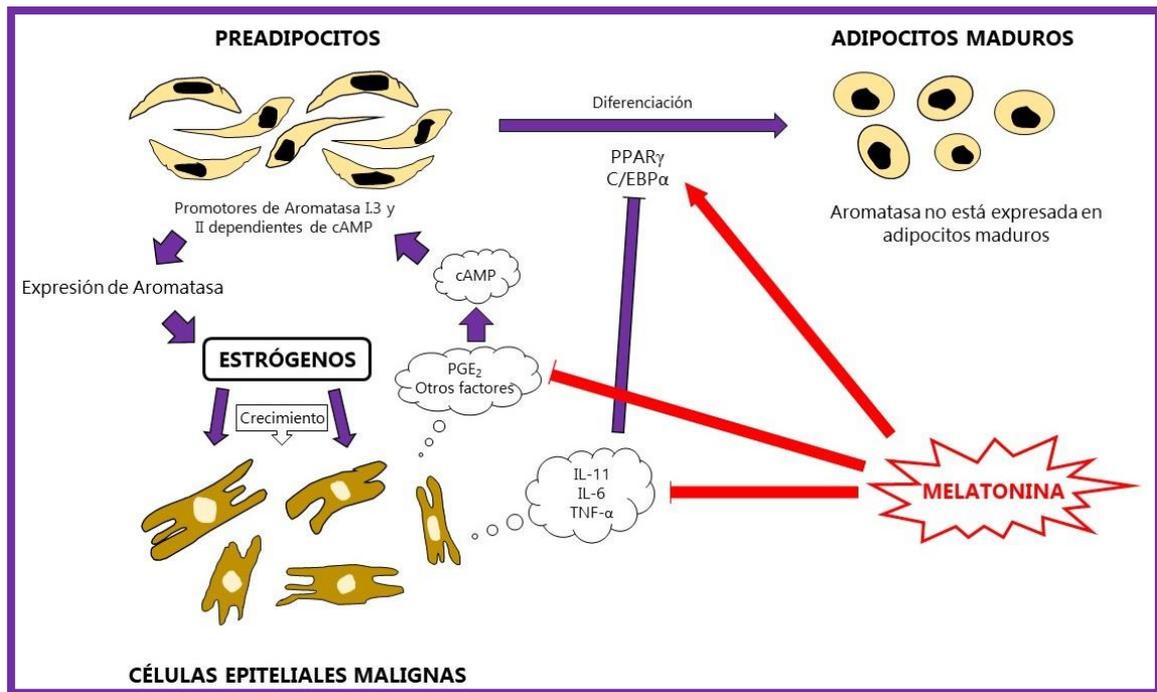


Figura 2. Interacciones entre subtipos celulares en tumores mamarios inhiben la diferenciación y aumentan la formación de estrógenos mediante el incremento de la actividad aromatasa en preadipocitos. Todas estas acciones están mediadas por el Factor de Necrosis Tumoral subtipo α (TNF- α), interleucina 6 (IL-6), interleucina 11 (IL-11), prostaglandina E2 (PGE2) y otros factores producidos por las células tumorales. La melatonina reduce el número de preadipocitos estimulando su diferenciación y disminuyendo la actividad aromatasa.

Niveles bajos de TNF- α , interleucina 11 e interleucina 6 permiten la diferenciación de los preadipocitos y reducen la actividad y expresión de la aromatasa. PPAR γ y C/EBP α , reguladores de la diferenciación de los preadipocitos, van a aumentar sus niveles bajo la acción de la melatonina. También, la melatonina va a reducir la producción de PGE₂ por las células tumorales, la cual incrementa la actividad aromatasa en preadipocitos vía cAMP y aumenta la producción de interleucina 11 [19,22,23].

4. OBJETIVOS

El objetivo fundamental de este trabajo es estudiar los efectos ejercidos por los quimioterápicos, docetaxel y vinorelbina, y la radiación sobre la diferenciación de preadipocitos mamarios humanos y la modulación de estos efectos por la melatonina.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. CULTIVOS CELULARES

1.1. Líneas celulares utilizadas en el estudio

Para este trabajo se ha utilizado la línea celular denominada BRF (*Breast Fibroblasts*) adquirida en la ATCC (*American Type Culture Collection*). El origen de la línea es el fibroblasto mamario humano y el medio de cultivo utilizado es Medio de Preadipocitos (PM-1) (ZenBio, Inc, NC, USA).

También se ha utilizado la línea celular denominada MCF-7 (*Michigan Cancer Foundation*) adquirida en la ATCC. Esta línea celular surge de células epiteliales de adenocarcinoma mamario humano (ER+). El medio de cultivo utilizado para esta línea celular es el DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) + 10% de Suero Fetal Bobino.

1.2. Condiciones de cultivo

- Tipo de cultivo: células adherentes en monocapa.
- Mantenimiento rutinario en placas de cultivo de 10 cm de diámetro (Falcon).
- En todos los casos, a los medios de cultivo se les añadió una protección antibiótica consistente en 0,6 mg/mL de penicilina y 0,1 mg/mL de estreptomina (Biowest).
- Las líneas celulares se incubaron en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂ a 37°C.
- Un stock de cada una de las líneas celulares empleadas en este trabajo fue mantenido a una temperatura de -150°C en una preparación crioprotectora que contiene 90% (v/v) de SFB (PAA) y 10% de dimetil-sulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich).
- Las células se cultivaron utilizando como nutriente el medio específico para cada línea celular.
- Para la diferenciación de las BRF en adipocitos maduros se utilizó Medio de Diferenciación (DM-2) (ZenBio, Inc, NC, USA).

1.3. Condiciones de subcultivo

Cuando las células alcanzan el 70-80% de confluencia, se realiza su subcultivo para asegurar el crecimiento exponencial de las mismas. Para ello, se retira el medio de la placa y se lava con PBS (*Phosphate Buffered Saline*: NaCl 8g/L, KCl 0,2 g/L, Na₂HPO₄ 1,4 g/L, KH₂PO₄

0,24 g/L, pH 7,4) (Sigma-Aldrich). A continuación, se añade una solución de 0,25% de tripsina-EDTA (0,25% de tripsina (p/v), 0,2 g/L EDTA) (Sigma-Aldrich) y se incuban de 3 a 5 minutos a 37°C para despegar las células de la superficie de la placa. Posteriormente, las células se recogen en el medio de cultivo correspondiente, actuando el suero como inactivador de la tripsina, y se centrifugan a 100 x g durante 5 minutos. Finalmente el sedimento se resuspende en medio de cultivo fresco, repartiendo la suspensión celular en distintas placas.

1.4. Recuentos celulares para siembras. Viabilidad celular

De la suspensión celular obtenida en cada subcultivo, se tomaron 20 μ L para llevar a cabo el recuento celular en una cámara de Neubauer (Marienfeld, GmbH) mediante un microscopio óptico de fluorescencia invertido (Nikon TMS) utilizando un aumento de 10X y haciendo doble contaje. En todos los casos se realizó la tinción de la muestra con el colorante *trypan blue* 0,4% v/v (Sigma-Aldrich), que permitió valorar la proporción de células viables (las que excluyen el colorante), frente a las no viables.

2. TRATAMIENTOS Y COMPUESTOS QUÍMICOS

El stock de melatonina se preparó mediante disolución en etanol 100% a una concentración de 100 mM, almacenándose a -4°C en forma de alícuotas.

Además se han utilizado dos fármacos antineoplásicos utilizados actualmente en las pacientes de cáncer de mama: docetaxel y vinorelbina. El docetaxel (1 μ M o 10 nM) (Sigma) es un antimetabólico que interfiere en la multiplicación de las células, pertenece al grupo de los taxanos y actúa sobre los microtúbulos de las células cancerosas, estimulando el ensamblaje de los microtúbulos y estabilizando su formación inhibiendo su despolimerización. La vinorelbina (1 μ M o 10 nM) (Sigma), en cambio, es un fármaco antineoplásico de la familia de los alcaloides de la vinca. A nivel molecular, actúa sobre el equilibrio dinámico de la tubulina en el sistema microtubular de la célula. Bloquea la mitosis en G2-M, causando la muerte celular en la interfase o en la siguiente mitosis. Ambos quimioterápicos se disolvieron en etanol 100% a una concentración de 0,1 M. De ahí se lleva a 0,001 M y se almacenaron en forma de alícuotas a una temperatura de -4°C como stock. Se utilizó a una concentración final de 1 μ M.

3. PROCEDIMIENTO DE RADIACIÓN DE LAS CÉLULAS

Se expusieron las células a radiación X utilizando un modelo YXLON SMART 200 tube (Yxlon International, Hamburg, Germany) a temperatura de ambiente. Inicialmente, utilizamos diferentes dosis de 4, 6, 8 y 10 Gy, de radiación. Para el resto de los experimentos, utilizamos radiación de 8 Gy como la dosis de radiación óptima. La radiación se administró

como una dosis única de 8 Gy en un tamaño de campo de 11,5 cm x 8,5 cm, placas de 6 pocillos múltiples, a una tasa de dosis de 0,92 Gy/min. La distancia de la mitad de la profundidad de la fuente se calculó inicialmente para obtener una tasa de dosis constante de 0,92 Gy/min. Las células de control se retiraron de la incubadora y se colocaron durante el mismo período de tiempo en el irradiador pero sin radiación.

4. EXPERIMENTOS DE COCULTIVOS CELULARES

Con la finalidad de simular el microambiente tumoral y así explorar el comportamiento de las células BRF en presencia de células tumorales malignas, empleamos cocultivos de los tipos celulares BRF y MCF-7 obteniendo un modelo de cáncer de mama *in vitro*.

Para ello, se utilizaron placas de cultivo de 6 pocillos (Falcon) en las que se sembraron células procedentes de las líneas celulares estudiadas. En cada pocillo se colocó un *insert* o soporte (Falcon) provisto de una membrana permeable de 0,45 μm de tamaño de poro, sobre el que se sembraron células de una línea celular distinta a la que se encontraba en el compartimento inferior. El uso de este dispositivo permitió analizar las relaciones paracrinias que ocurrieron entre células pertenecientes a líneas diferentes. La **Figura 3** muestra una representación esquemática del mecanismo utilizado en los experimentos de cocultivos, compuesto por un pocillo perteneciente a una multiplaca de 6 pocillos y su soporte correspondiente.

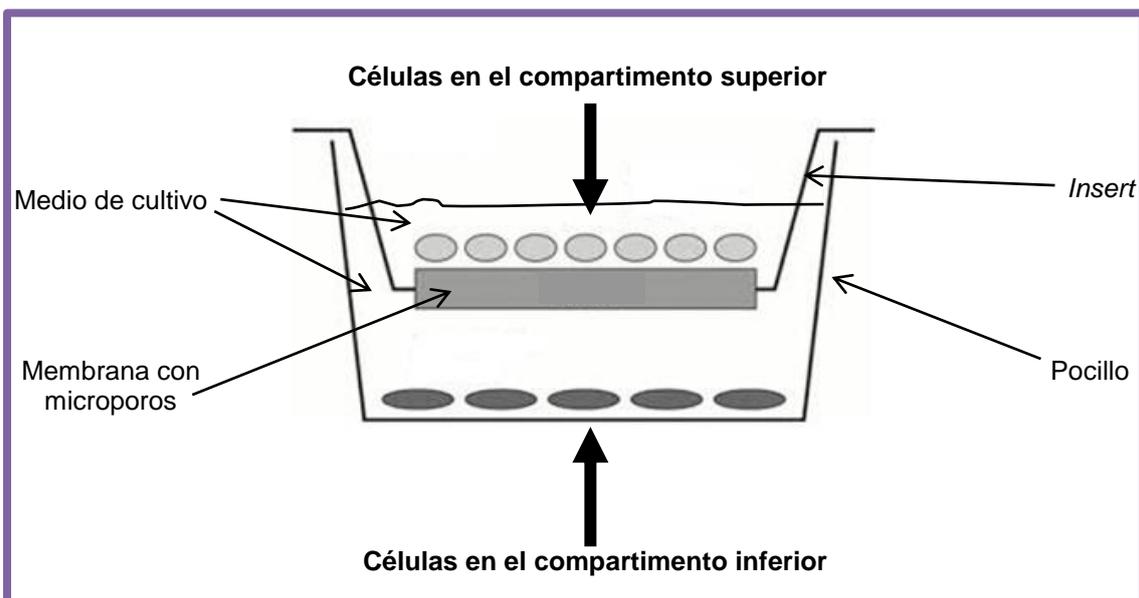


Figura 3. Representación esquemática de un pocillo y un insert permeable utilizados en los experimentos de cocultivos celulares

Las células BRF se sembraron en placas de 6 pocillos (Falcon), a una densidad de 12×10^3 células/pocillo en medio de preadipocitos. Al día siguiente, se introdujeron los *inserts* y sobre su membrana permeable se sembraron las células MCF-7 a una densidad de 5×10^3 células/*insert*. En este momento se añadió medio de diferenciación de preadipocitos junto con los tratamientos correspondientes durante un total de 10 días, renovándose el medio cada 3 días. Una vez finalizado el tiempo de diferenciación, se eliminan los *insert* y se evalúan los efectos producidos en las células BRF.

5. MEDIDA DE LA VIABILIDAD CELULAR. MÉTODO DEL MTT

Se utilizó el método del MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 bromuro difeniltetrazolio] (Molecular Probes) como método para examinar la viabilidad y proliferación celular de manera indirecta. Es un ensayo colorimétrico que mide la actividad metabólica de las células en fase de proliferación activa. Está basado en la rotura del anillo de tetrazolio del MTT (color amarillo) por diferentes deshidrogenasas mitocondriales, formándose cristales de formazán (color violeta). Los cristales de formazán son insolubles en agua pero pueden solubilizarse con disolventes orgánicos, y su concentración se determina midiendo la densidad óptica a una longitud de onda de 570 nm, siendo la cantidad de formazán obtenido directamente proporcional al número de células proliferantes (metabólicamente activas) hasta aproximadamente 10^6 células/pocillo.

La medida de la proliferación celular se llevó a cabo mezclando 1 mL de una solución madre de MTT (12 nM) disuelta en PBS, con 10 mL de medio correspondiente sin rojo fenol y sin suero. Tras retirar el medio de cultivo de la placa, se añadieron 110 μ L de la mezcla a cada pocillo. A las 4 horas de incubación de la placa a 37°C, se solubilizaron los cristales de formazán añadiendo 100 μ L/pocillo de una solución de SDS-HCl (0,01 N), conteniendo 1 g de SDS. La absorbancia se midió, a las 24 horas de incubación con esta segunda solución, empleando un lector de microplacas (Labsystems MultiSkan RC) y midiendo a 620 nm. En todos los casos se restó la absorbancia de los blancos, que contenían todos los reactivos, pero no las células. Dado que la relación entre la densidad óptica y el número de células es lineal en un rango de hasta 10^6 células, la proliferación celular se representó como medida de la absorbancia. Cada experimento se realizó al menos por triplicado y los resultados se indicaron como la media \pm SEM (error estándar de la media) de cinco experimentos independientes y los datos se presentan como porcentaje de células control no tratadas.

6. ESTUDIOS DE EXPRESIÓN GÉNICA

6.1. Extracción de ARN total de las células en cultivo

La medición de la expresión de diferentes genes en células endoteliales se realizó mediante transcripción inversa en tiempo real RT-PCR. Para la extracción de ARN total de las células diferentemente tratadas se utilizó el kit comercial *NZY Total RNA Isolation Kit*.

El procedimiento seguido es el siguiente, las células se lavaron con PBS y se homogeneizaron sobre la placa de cultivo, utilizando un tampón de lisis con un alto contenido en tiocinato de guanidina, que inactiva las RNasas. El lisado se dispuso en una columna de filtración (*NZYSpin Homogenization Columns*) para reducir la viscosidad de la muestra y aumentar su pureza. Una vez centrifugada a 11.000 x g, se le añadió etanol al 70% (v/v) para ajustar las condiciones óptimas de unión, y se transfirió el lisado a una nueva columna (*NZYSpin Binding Columns*), en la que el ARN total se unió a la membrana de sílica gel de la misma. El ADN contaminante, que también se une a la membrana, se eliminó mediante la incubación con una DNasa reconstituida (*DNase I solution*). Después de 3 lavados sucesivos para eliminar los restos de sales y componentes celulares no deseados, se diluyó el ARN en 40 μ L de agua libre de RNasas.

6.2. Determinación de la cantidad y pureza del ARN

Para determinar la cantidad y la pureza del ARN extraído se realizó una lectura de su absorbancia a 260 nm en el Nanodrop 1000 V 3.6 (Thermo Scientific). Este espectrofotómetro capilar cuantifica la pureza mediante el cociente entre absorbancia a 260 nm y a 280 nm, el cual hace referencia a la cantidad de proteínas presentes en la muestra. Un resultado de 2,0 indica un ARN puro, sin contaminantes. En todos los experimentos, este cociente fue siempre superior a 1,8.

6.3. Síntesis de ADN complementario (ADNc)

La síntesis de ADNc se llevó a cabo a partir de 1 μ g de ARN total (factible hasta 5 μ g), en un volumen de reacción final de 20 μ L, utilizando el kit comercial *NZY First-Strand cDNA Synthesis Kit*, que se basa en la acción de una retro-transcriptasa reversa (*NZY Reverse Transcriptase*) y un inhibidor de ribonucleasas para proteger el ARN de su degradación (*NZY Ribonuclease Inhibitor*). El volumen de los componentes para una reacción se muestra en la **Tabla 1**.

COMPONENTE	CANTIDAD
ARN	1 μg (n μL)
<i>NZYRT 2x Master Mix</i> ⁽¹⁾	10 μL
<i>NZYRT Enzyme Mix</i> ⁽²⁾	2 μL
<i>NZY RNase H (E. coli)</i>	1 μL
DEPC-H ₂ O	Hasta 20 μL

Tabla 1. Componentes empleados en la reacción de retrotranscripción. (1) Incluye oligo(dT)₁₈, random hexamers, MgCl₂ y dNTPs. (2) Incluye NZY Reverse Transcriptase y NZY Ribonuclease Inhibitor.

La reacción se llevó a cabo en dos tiempos. Inicialmente, se preparó en hielo el ARN junto con los complejos *NZY Reverse Transcriptase* y *NZY Ribonuclease Inhibitor*. Se continuó la reacción en las siguientes condiciones: 25°C, 10 minutos, 50°C, 30 minutos y 85°C, 5 minutos. Por último, se adicionó el compuesto *NZY RNase H (E. coli)* y se incubó a 37°C durante 20 minutos.

6.4. Diseño de los oligonucleótidos cebadores para la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR)

En el diseño de los oligonucleótidos cebadores para la RT-PCR se utilizaron los programas informáticos *Sequence Analysis 1.6* y *DNAMAN* (Lynnon Corporation) así como la página web *The Sequence Manipulation Suite*. Se consideran adecuadas las parejas de oligonucleótidos cuya longitud estuviera en torno a 20-25 bases, su porcentaje de G+C fuera de aproximadamente el 50%, su T_m estuviera en torno a 60°C y su composición no favoreciera la aparición de estructuras secundarias. Al inicio de todos los experimentos, se optimizó el ensayo con una matriz de diferentes concentraciones de los distintos oligonucleótidos cebadores (Sigma-Genosys), para identificar la concentración que obtuviera un menor valor de C_T y una mayor fluorescencia. La ausencia de dímeros y productos de amplificación indeseados se analizó sometiendo los productos de amplificación a electroforesis en gel de agarosa-Tris-Borato EDTA al 1% (p/v). La longitud de los fragmentos de ADN amplificados osciló entre 100 y 180 pares de bases. A modo de control interno de cada reacción, se diseñó una pareja de oligonucleótidos específicos del gen codificante de la subunidad S14 del ARN ribosomal humano (ARNr). Todos los oligonucleótidos empleados en los estudios de expresión génica se detallan en la **Tabla 2**.

Gen	Secuencia	Concentración (nM)
<i>hARO fw</i>	5'- GTCGTGGACTTGGTCATGC -3'	100
<i>hARO rv</i>	5'- CGAGTCTGTGCATCCTTCC -3'	100
<i>hC/EBPα fw</i>	5'- AGGTGCTGGAGCTGACCAGT -3'	200
<i>hC/EBPα rv</i>	5'- AAGCCTCGAGATCCGGCGAC -3'	200
<i>hPPARγ fw</i>	5'- GATGCACTGCCTATGAGCACTT -3'	400
<i>hPPARγ rv</i>	5'- AGAGGTCCACAGAGCTGATTCC -3'	400
<i>hpI.3 fw</i>	5'- GGGCTTCCTTGTTTTGACTGTAA -3'	200
<i>hpI.3 rv</i>	5'- AGAGGGGGCAATTTAGAGTCTGTT -3'	200
<i>hpII fw</i>	5'- CTCTGAAGCAACAGGAGCTATAGA -3'	100
<i>hpII rv</i>	5'- CAGGCACGATGCTGGTGATG -3'	100
<i>hTNFα fw</i>	5'- TGGGGTTTGTGAAACTGTGA -3'	50
<i>hTNFα rv</i>	5'- GTTCCTGCACATTCCTCTC -3'	50
<i>hIL-6 fw</i>	5'- AGGAGACTTGCCTGGTGAAA -3'	200
<i>hIL-6 rv</i>	5'- CAGGGGTGGTTATTGCATCT -3'	200
<i>hIL-11 fw</i>	5'- GCTGGTTTCGAACTCCTGAC -3'	200
<i>hIL-11 rv</i>	5'- CAGGGTGACTTGTGGAACCT -3'	200
<i>COX-1 fw</i>	5'- ACCCGCACGGGCTATCCGGC -3'	200
<i>COX-1 rv</i>	5'- AGGCGCATGAGCATCTCTCGG -3'	200
<i>COX-2 fw</i>	5'- ATGTATGAGTGTGGGATTTGA -3'	200
<i>COX-2 rv</i>	5'- TCCAAAATCCCTTGAAGTGGG -3'	200

Tabla 2. Oligonucleótidos empleados en los estudios de expresión génica.

6.5. Detección de la expresión génica mediante PCR a tiempo real

La medición de la expresión de diferentes genes de ARNm se realizó mediante transcripción inversa en tiempo real RT-PCR después de la incubación de células, que se pretrataron durante una semana con melatonina 1 mM o no; y se trataron 4 horas con docetaxel 1 μ M o vinorelbina 1 μ M o su diluyente (etanol a una concentración final inferior al 0,001%); o bien se radiaron con 8 Gy. Después de la extracción del ARN y síntesis de ADNc anteriormente descrita, se llevó a cabo la amplificación génica. Los cebadores utilizados para la amplificación (Sigma Genosys Ltd., Cambridge, Reino Unido) se enumeran en la **Tabla 2**. Como cuantificación de control, el ARNm de S14 también se sometió a RT-PCR en tiempo real utilizando un conjunto de cebadores específicos (Sigma Genosys Ltd., Cambridge, Reino Unido).

El programa de PCR calculó automáticamente el ciclo fraccionario en el que la cantidad de objetivos amplificados se vuelve significativa (C_t).

La reacción de PCR a tiempo real (RT-PCR) consiste en monitorizar el progreso de la reacción de PCR a medida que va ocurriendo, desde el comienzo hasta el final. La detección se realiza al mismo tiempo que la amplificación, por lo que esta tecnología sustituye a la amplificación tradicional y la electroforesis.

En esta técnica se marca un umbral de fluorescencia (*threshold*), en el punto en que la reacción de amplificación se encuentra en fase exponencial. El ciclo en el cual la reacción de amplificación atraviesa este umbral de fluorescencia se denomina C_T (*threshold cycle*) y depende de la cantidad de ADNc presente en cada muestra.

Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un termociclador de PCR a tiempo real MX3000P Real-Time PCR (Stratagene) usando tubos de 0,2 mL (Cmb Bioline, Cultek). En cada reacción se añadieron 6,25 μ L de mezcla de Brilliant® SYBR® Green PCR Master Mix (Stratagene), entre 0,63 (50 nM) y 2,5 μ L (200 nM) de cada oligonucleótido, 1 μ L de ADNc, y agua libre de RNasas hasta completar un volumen final de reacción de 12,5 μ L. Cada muestra se analizó por triplicado, y el experimento se repitió un mínimo de 3 veces en idénticas condiciones.

Las condiciones de amplificación fueron una modificación de las establecidas por el programa: desnaturalización inicial de 10 minutos a 95°C seguida de 45 ciclos de 95°C durante 30 segundos, anillamiento a 55°C durante 45 segundos y extensión a 72°C durante 30 segundos. Para verificar la especificidad de la reacción se añadió un paso adicional, la curva de disociación, donde las muestras se calentaron lentamente desde 55°C hasta 95°C,

monitorizándose continuamente la fluorescencia emitida. La temperatura a la cual el ADN se desnaturaliza se observa como una drástica caída de la fluorescencia debido a la disociación del SYBR Green, apareciendo un pico cuando se representa la derivada de la fluorescencia frente a la temperatura, correspondiente a la temperatura de fusión del producto (T_m). El área del pico es proporcional a la cantidad de producto de amplificación obtenido. En las condiciones en las que se amplifica más de un producto, se detectan varios picos, cada uno con una T_m característica.

6.6. Cuantificación y análisis de la expresión génica relativa (valores de C_T)

Los resultados fueron analizados con un programa específico de análisis, Stratagene MXPro software versión 3.0 (Stratagene), donde se normalizó el resultado obtenido en las muestras de los genes problemas con respecto al gen de referencia (S14), utilizando un método de comparación de los valores de C_T (ΔC_T) (Livak KJ, Schmittgen, 2001), que se resume en el siguiente esquema:

$$\Delta C_T = C_T \text{ gen interés} - C_T \text{ gen de referencia}$$

$$\Delta \Delta C_T = \Delta C_T \text{ condición problema} - \Delta C_T \text{ condición control}$$

$$\text{Cambio relativo de la expresión} = 2^{-\Delta \Delta C_T}$$

7. DETERMINACIÓN DE LA DIFERENCIACIÓN DE ADIPOCITOS MEDIANTE TINCIÓN CON *OIL RED O*

El *Oil Red O* es un colorante neutro que, debido a sus características de solubilidad es capaz de unirse a los depósitos de triglicéridos presentes en el citoplasma de los adipocitos dándoles una coloración rojiza con un máximo de absorción a 518 nm. Debido a que el grado de diferenciación de un adipocito está directamente relacionado con el acúmulo de lípidos en su citoplasma, la tinción celular con el colorante *Oil Red O* constituye un método eficaz en el estudio de la adipogénesis.

Una vez finalizado el proceso de diferenciación de los adipocitos, se lavaron dos veces con PBS y se fijaron con paraformaldehído al 4% (v/v). La placa se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos. A continuación se lavó 3 veces con agua destilada y se añadió el colorante *Oil Red O*. Después de 3 horas a temperatura ambiente y oscuridad y tras 2 lavados con agua destilada, se eliminó la humedad de la placa mediante una incubación de 5 minutos a 65°C. Los lípidos intracelulares se extrajeron con alcohol isopropílico. Finalmente, se determinó

la concentración lipídica mediante la medida de la densidad óptica a 510 nm en un lector de microplacas (Labsystems MultiSkan RC).

8. MEDIDA DIRECTA DE LA ACTIVIDAD AROMATASA

La actividad aromatasa se evaluó mediante el ensayo de liberación de agua tritiada en las células BRF, y en cocultivos con células MCF-7. Este ensayo se basa en la formación de agua tritiada durante la aromatización de un sustrato androgénico marcado con ^3H , como es la $[1\beta\text{-}^3\text{H(N)}]\text{-androst-4-ene-3,17-diona}$ y es un método basado en el descrito por Ackerman y cols. [40].

La enzima aromatasa, presente en el retículo endoplásmico de las células, se encarga de transformar la androstenediona en estrona, en una reacción en la que se libera agua. Por tanto, la detección del agua marcada radiactivamente nos permite cuantificar la actividad aromatasa presente en las células.

Al final de los experimentos de diferenciación de adipocitos, las células BRF, tanto cultivadas en solitario como en cocultivos junto con células de la línea MCF-7, se incubaron en medio de preadipocitos en presencia del sustrato radiactivo $[1\beta\text{-}^3\text{H(N)}]\text{-androst-4-ene-3,17-diona}$ a una concentración de 100 nM (NEN Life Sciences Products) y de 25 a 30 Ci/nM, junto con los tratamientos correspondientes. Tras 24 horas de incubación, las placas se colocaron en hielo para recoger todo el vapor de agua que pudiese haber sido condensado al sacarlas de la estufa a temperatura ambiente; el medio se transfirió a tubos que contenían 0,25 mL de ácido tricloroacético glacial al 30% frío (p/v) (Sigma-Aldrich), se mezcló con el vórtex y se centrifugó a 1700 x g durante 15 minutos a 4°C. A la fase acuosa resultante se le añadió cloroformo hidratado frío, se mezcló en vórtex y se centrifugó 15 minutos a 4°C a 1700 x g. Se recogió la fase acuosa sin tocar la interfase y se añadió DCC al 10% (Sigma-Aldrich), se mezcló con el vórtex y se centrifugó a 1700 x g durante 15 minutos a 4°C. El sobrenadante obtenido se mezcló con 3 mL de una solución *cocktail* de centelleo (Hydrofluor, National Diagnostics) y la radiactividad se cuantificó en un contador beta (Beckman LS 6000 IC). La cantidad de radiactividad medida en el agua tritiada se corrigió restando los valores blanco a cada muestra, que se obtuvieron mediante la incubación de medio sin andrógeno marcado radiactivamente en placas de cultivo de 60 x 15 mm (Falcon) que no contenían células. Los valores se corrigieron también tomando en consideración la retención de tritio en el agua en todo el proceso del ensayo. Para ello, se incubaron paralelamente varias placas de cultivo de 60 x 15 mm a las que se añadieron concentraciones conocidas de agua tritiada (NEN Life Sciences Products) con el fin de valorar las posibles pérdidas de radiactividad a lo largo del procesado de las muestras. En

todos los casos, la retención fraccional de tritio en el medio incubado con agua durante todo el proceso fue superior al 85%.

9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

Los análisis estadísticos fueron realizados utilizando el programa GraphPad Prisma 4.0 (Graphpad Software). Los estudios estadísticos realizados fueron en todos los casos estudios paramétricos, aplicados a variables ajustadas a una distribución normal. En concreto, se realizaron análisis paramétricos de la varianza (ANOVA) seguidos, en caso de valores significativos del mismo, del test de Student-Newman-Keuls, para calcular las diferencias estadísticamente significativas existentes entre los distintos grupos experimentales. Los resultados se consideraron estadísticamente significativos para valores de $P < 0,05$. A no ser que se especifique lo contrario, todos los experimentos se repitieron 3 veces en idénticas condiciones y los resultados se indicaron como la media \pm error estándar de la media (SEM).

RESULTADOS

1. EFECTOS DE LA MELATONINA SOBRE LOS CAMBIOS INDUCIDOS POR EL DOCETAXEL Y LA VINOURELBINA EN LA DIFERENCIACIÓN DE PREADIPOCITOS TUMORALES MAMARIOS

Inicialmente, investigamos los efectos del docetaxel y la vinorelbina añadidos durante el proceso de diferenciación de los preadipocitos. Como se muestra en la **Figura 4**, docetaxel 1 μM y vinorelbina 1 μM redujeron la proliferación celular e incrementaron el contenido de triglicéridos de los adipocitos, un indicador de diferenciación adipogénica. El tratamiento con melatonina 1 mM también disminuyó la proliferación celular e incrementó la adipogénesis de manera estadísticamente significativa ($p < 0,001$). Además, la melatonina potenció el efecto inhibitorio en la proliferación ejercido por los quimioterápicos y potenció el efecto estimulador ejercido por docetaxel y vinorelbina sobre la diferenciación de preadipocitos mamarios.

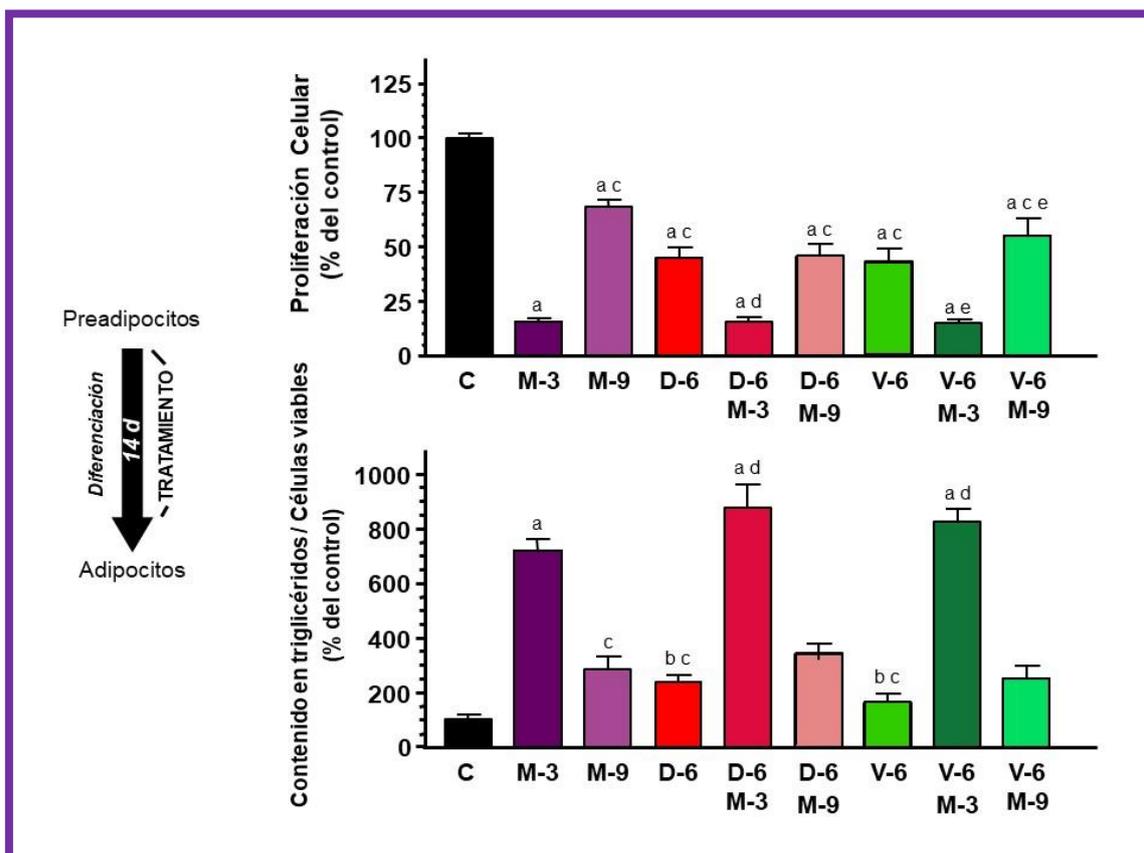


Figura 4. Efectos de melatonina, docetaxel y vinorelbina sobre la proliferación y diferenciación de preadipocitos. (Abreviaturas: M, melatonina; D, docetaxel; V, vinorelbina; -3, 10^{-3} M=1 mM; -6, 10^{-6} M=1 μM ; -9, 10^{-9} M= 1 nM). a, $p < 0,001$ vs C; b, $p < 0,05$ vs C; c, $p < 0,001$ vs M-3; d, $p < 0,001$ vs D-6; e, $p < 0,001$ vs V-6.

A continuación, estudiamos los efectos de la administración de docetaxel, vinorelbina y melatonina en células adiposas ya diferenciadas. El tratamiento se realizó durante 3 días después de finalizada la diferenciación de los preadipocitos tanto con vinorelbina 1 μM como con docetaxel 1 μM . Los efectos obtenidos fueron un descenso en la proliferación celular sin una modificación significativa en el contenido en triglicéridos, **Figura 5**. La administración de melatonina 1 mM también potenció la reducción de la proliferación y en este caso también incrementó el contenido de triglicéridos acumulados por los adipocitos diferenciados, sola y en combinación con docetaxel y vinorelbina.

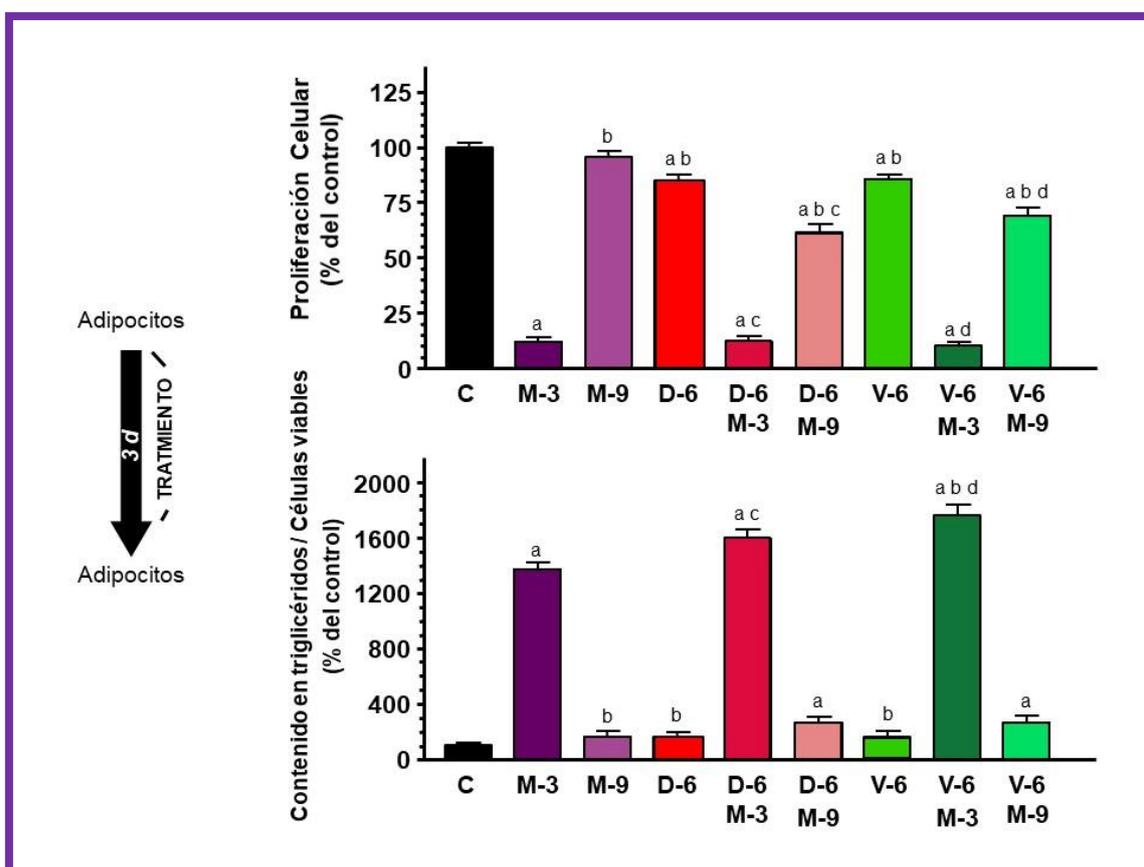


Figura 5. Efectos de la administración durante 3 días de melatonina, docetaxel y vinorelbina sobre la proliferación y diferenciación de adipocitos ya diferenciados. (Abreviaturas: M, melatonina; D, docetaxel; V, vinorelbina; -3, 10^{-3} M=1 mM; -6, 10^{-6} M=1 μM ; -9, 10^{-9} M= 1 nM). a, $p < 0,001$ vs C; b, $p < 0,05$ vs C; c, $p < 0,001$ vs M-3; d, $p < 0,001$ vs D-6; e, $p < 0,001$ vs V-6.

Tras la obtención de los resultados anteriores, estudiamos los efectos de docetaxel, vinorelbina y melatonina sobre la diferenciación en cocultivos de preadipocitos (BRF) y células tumorales mamarias (MCF-7). En la línea de los resultados descritos anteriormente, la presencia de células tumorales malignas redujo el contenido en triglicéridos de los preadipocitos

diferenciados. La administración de docetaxel y vinorelbina potenció la diferenciación aumentando el contenido en triglicéridos. La administración de melatonina 1 mM estimuló la diferenciación y a su vez potenció el efecto estimulador inducido por docetaxel y vinorelbina (Figura 6).

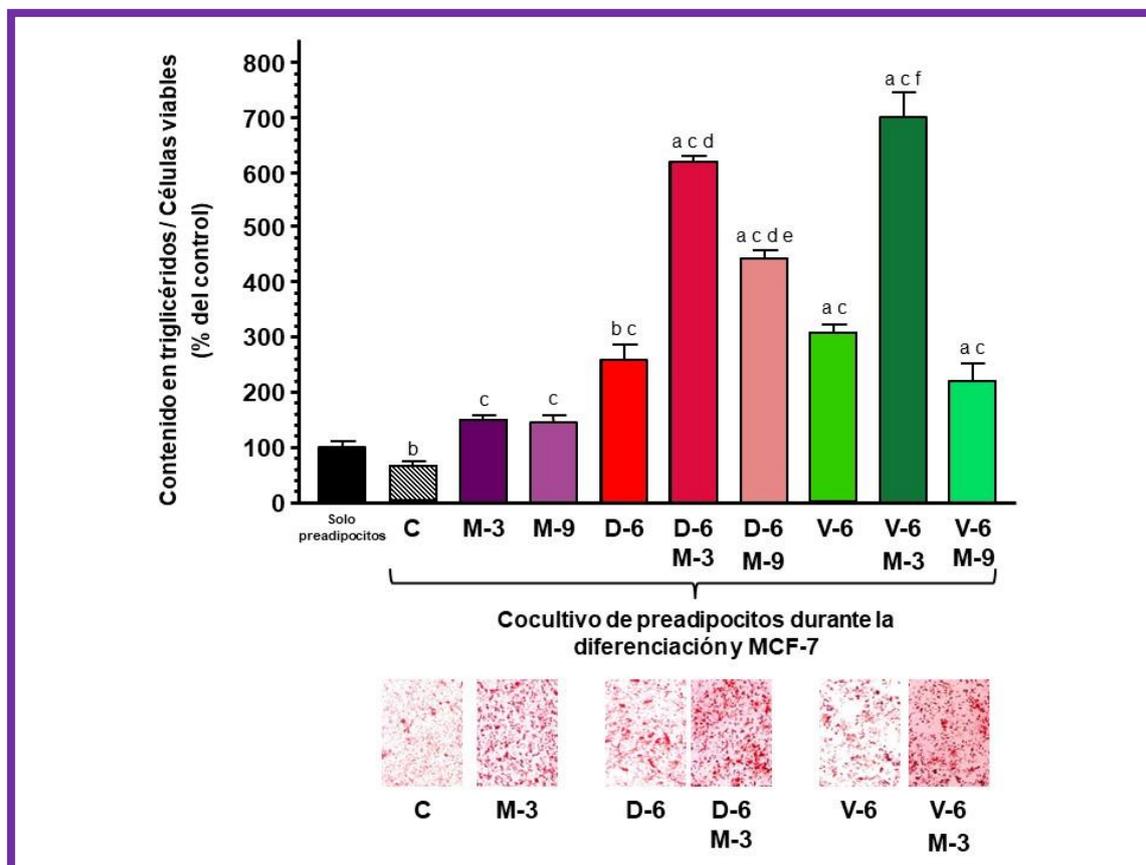


Figura 6. Efectos sobre la diferenciación de preadipocitos, en cocultivo con células tumorales mamarias, ejercidos por la administración de melatonina, docetaxel y vinorelbina. Imágenes obtenidas tras la aplicación de la técnica Oil-Red O sobre los diferentes grupos tratados. (Abreviaturas: M, melatonina; D, docetaxel; V, vinorelbina; -3, 10^{-3} M=1 mM; -6, 10^{-6} M=1 μ M; -9, 10^{-9} M= 1 nM). a, $p < 0,001$ vs C; b, $p < 0,05$ vs C; c, $p < 0,001$ vs M-3; d, $p < 0,001$ vs D-6; e, $p < 0,001$ vs V-6.

2. EFECTOS DE LA MELATONINA SOBRE LOS CAMBIOS INDUCIDOS POR LA RADIACIÓN SOBRE LA DIFERENCIACIÓN DE PREADIPOCITOS MAMARIOS

La radiación ionizante redujo significativamente ($p < 0,001$) la proliferación celular y el contenido citoplasmático de triglicéridos. La melatonina 1 mM incrementó la reducción de la proliferación celular y contrarrestó el efecto de la radiación incrementando la diferenciación adipogénica (Figura 7).

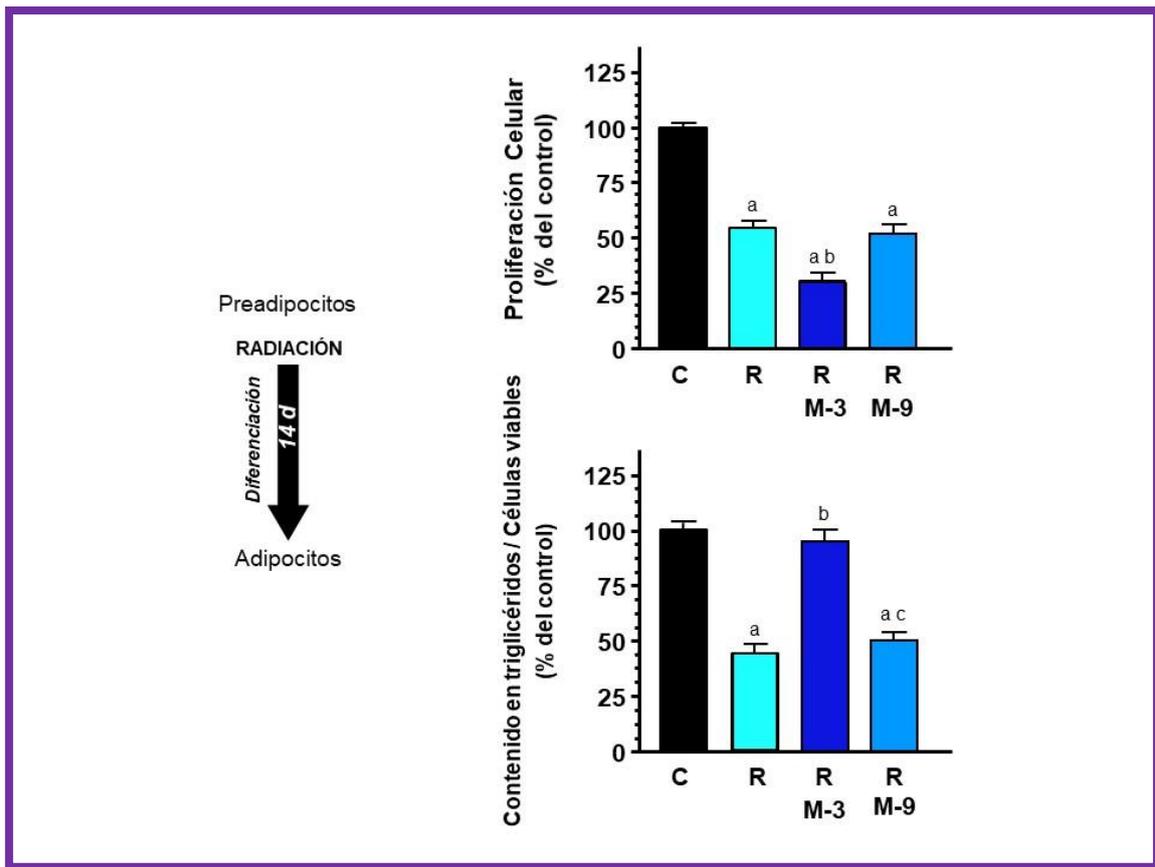


Figura 7. Efectos de la melatonina sobre la diferenciación de adipocitos ya diferenciados y radiados. (Abreviaturas: M, melatonina; R, radiación; -3, 10^{-3} M=1 mM; -9, 10^{-9} M= 1 nM). a, $p<0,001$ vs C; b, $p<0,05$ vs C; c, $p<0,001$ vs M-3; d, $p<0,001$ vs D-6; e, $p<0,001$ vs V-6.

Una vez obtenidos los resultados anteriores, estudiamos los efectos de la presencia de melatonina sobre el contenido en triglicéridos de las células adiposas en cocultivos de preadipocitos (BRF) y células tumorales mamarias (MCF-7). En este caso, la presencia de células tumorales mamarias redujo el contenido de triglicéridos, al igual que en el caso anterior, y la radiación ionizante también redujo su contenido. En cambio, la melatonina (tanto 1 mM como 1nM) incrementó el contenido de triglicéridos de las células adiposas (**Figura 8**).

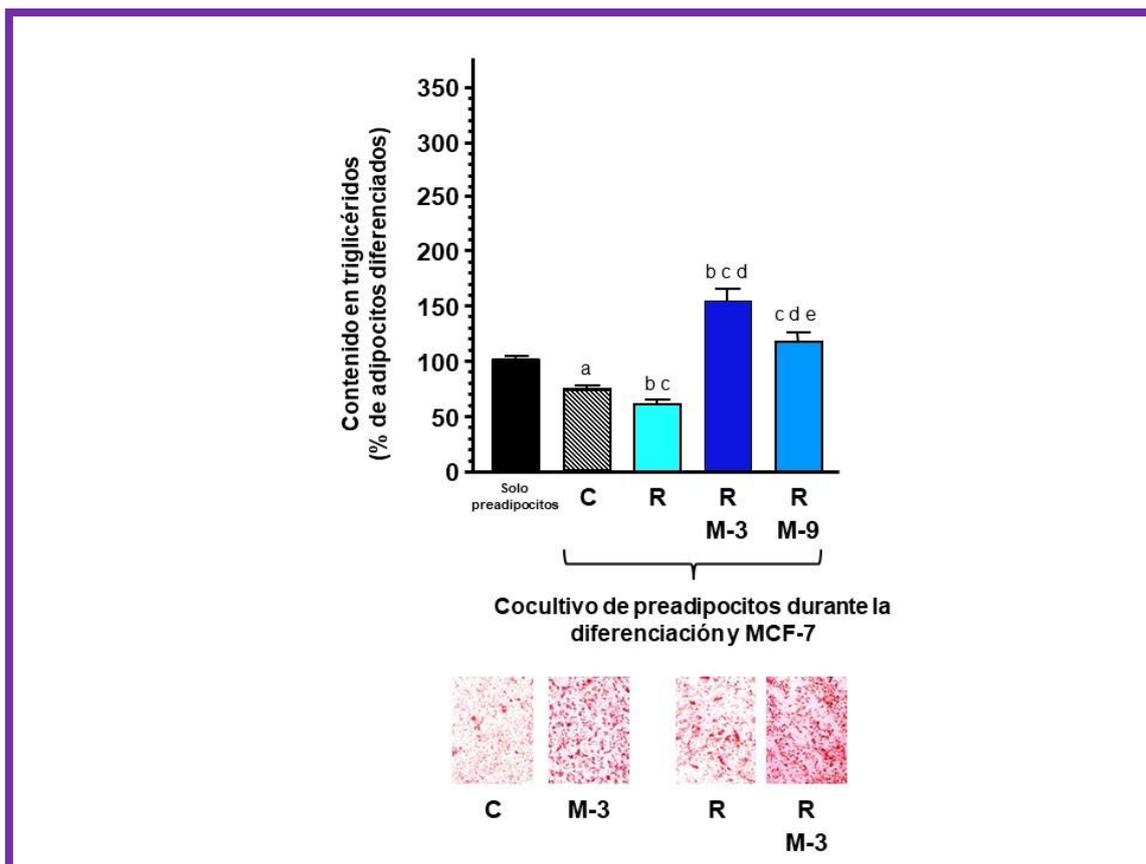


Figura 8. Efectos, sobre adipocitos ya diferenciados y radiados, ejercidos por la administración de melatonina en cocultivo con células tumorales mamarias. Imágenes obtenidas tras la aplicación de la técnica Oil-Red O sobre los diferentes grupos tratados. (Abreviaturas: M, melatonina; R, radiación; -3, 10^{-3} M=1 mM; -9, 10^{-9} M= 1 nM). a, $p<0,001$ vs C; b, $p<0,05$ vs C; c, $p<0,001$ vs M-3; d, $p<0,001$ vs D-6; e, $p<0,001$ vs V-6.

3. EFECTOS DE LA MELATONINA SOBRE LOS CAMBIOS PROVOCADOS POR EL DOCETAXEL, LA VINOURELBINA Y LA RADIACIÓN EN LA EXPRESIÓN DE C/EBP α Y PPAR γ EN PREADIPOCITOS MAMARIOS

La expresión de factores de transcripción específicos como C/EBP α y PPAR γ va a ser determinante en la condición fenotípica de los adipocitos. Por ello, analizamos mediante RT-PCR los efectos que ejercen docetaxel, vinorelbina y la aplicación de radiación durante la diferenciación en la expresión de estos factores de transcripción con y sin melatonina.

Docetaxel y vinorelbina incrementaron significativamente la expresión del mRNA de C/EBP α y PPAR γ . La melatonina potenció el efecto estimulador de ambos quimioterápicos en la expresión de C/EBP α y PPAR γ . La radiación disminuyó la expresión de C/EBP α y PPAR γ ,

en este caso, la administración de melatonina neutralizó este efecto inhibitor ejercido por la radiación e incrementó significativamente la expresión de C/EBP α y PPAR γ (Figura 9).

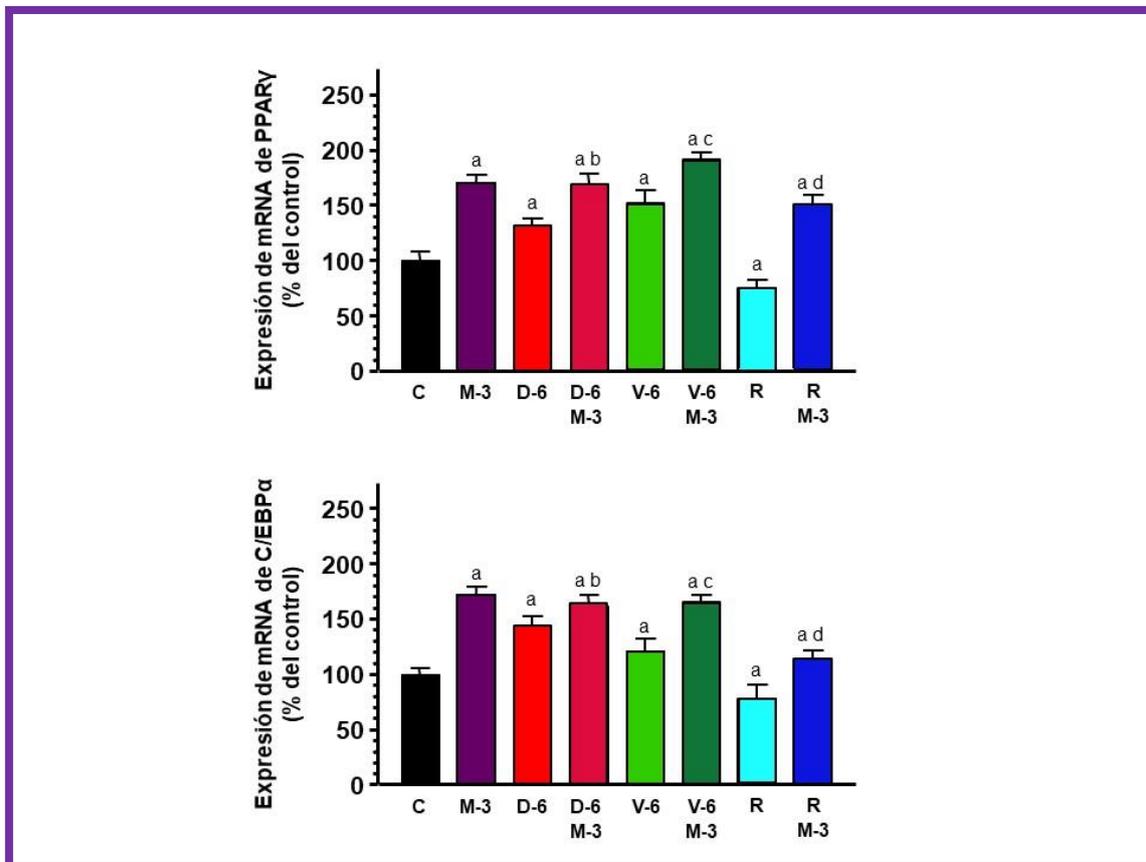


Figura 9. Efectos de melatonina, docetaxel, vinorelbina y radiación sobre la expresión de los factores de transcripción C/EBP α y PPAR γ . (Abreviaturas: M, melatonina; D, docetaxel; V, vinorelbina; R, radiación; -3, 10^{-3} M=1 mM; -6, 10^{-6} M=1 μ M). a, $p < 0,001$ vs C; b, $p < 0,05$ vs C; c, $p < 0,001$ vs M-3; d, $p < 0,001$ vs D-6; e, $p < 0,001$ vs V-6.

4. EFECTOS DE LA MELATONINA SOBRE LA ACTIVIDAD Y LA EXPRESIÓN DE LA AROMATASA EN PREADIPOCITOS MAMARIOS TRAS LA ADMINISTRACIÓN DE DOCETAXEL, VINOURELBINA Y LA APLICACIÓN DE RADIACIÓN

Dado que la enzima aromatasa está considerada como un indicador de diferenciación de los preadipocitos, medimos tanto la actividad como la expresión de este enzima tras la administración de docetaxel, vinorelbina y tras la aplicación de radiación, tanto en ausencia como presencia de melatonina (Figura 10).

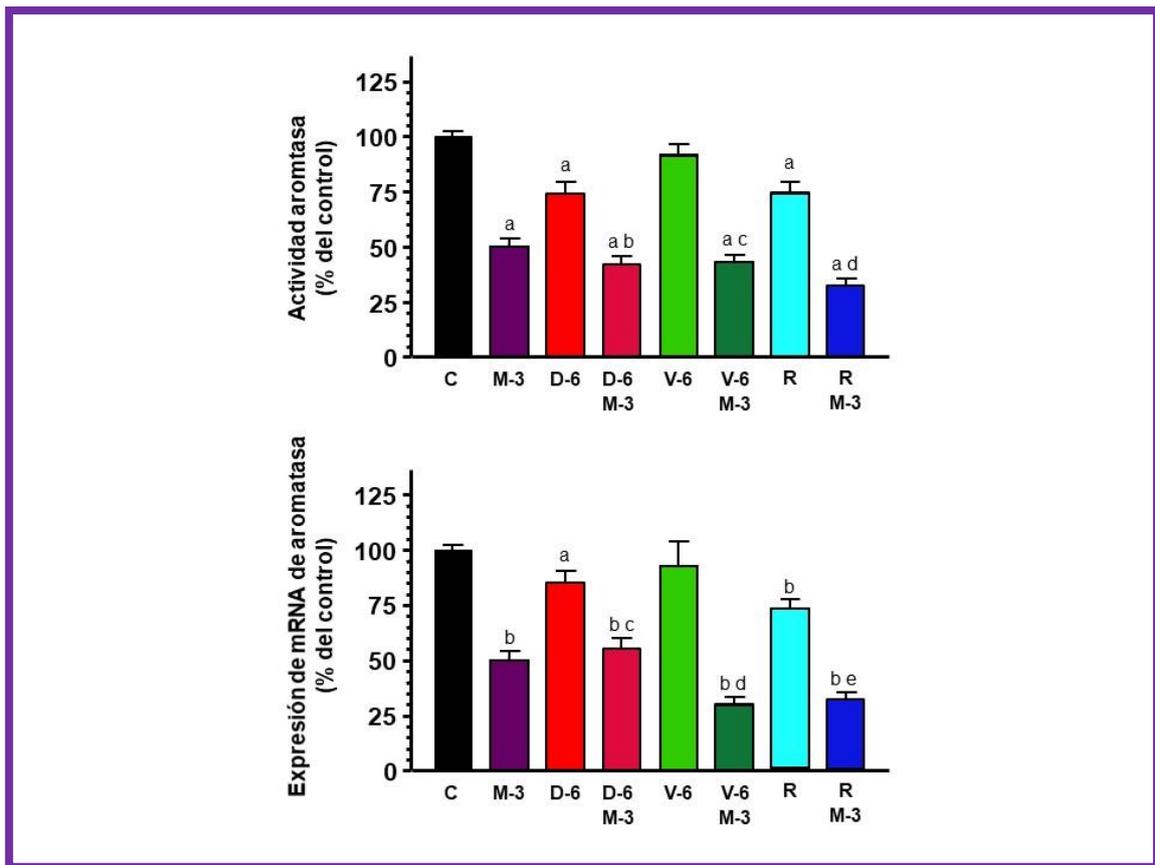


Figura 10. Efectos de la melatonina sobre la actividad y la expresión de la aromatasa en preadipocitos tras la administración de docetaxel, vinorelbina y la aplicación de radiación. (Abreviaturas: M, melatonina; D, docetaxel; V, vinorelbina; R, radiación; -3, 10^{-3} M=1 mM; -6, 10^{-6} M=1 μ M; -9, 10^{-9} M= 1 nM). a, $p<0,001$ vs C; b, $p<0,05$ vs C; c, $p<0,001$ vs M-3; d, $p<0,001$ vs D-6; e, $p<0,001$ vs V-6.

Como vemos en la **Figura 10**, docetaxel y radiación redujeron tanto la expresión como la actividad aromatasa, efecto que fue en ambos casos potenciado significativamente por la presencia de melatonina. En este sentido, para tratar de determinar si el mecanismo de inhibición descrito es debido a una regulación negativa de los principales promotores de la aromatasa en adipocitos (promotor I.3 y II), medimos mediante RT-PCR la expresión de mRNA de ambos promotores (**Figura 11**).

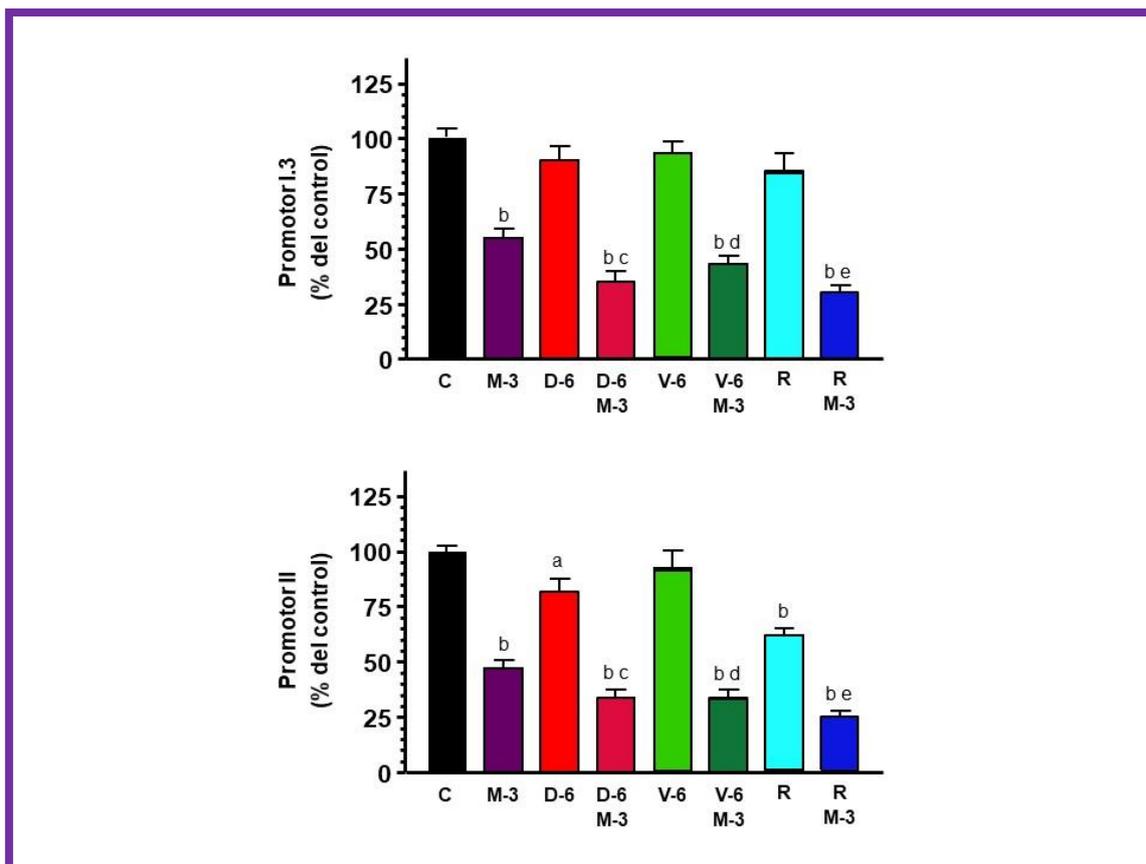


Figura 11. Efectos sobre la expresión de los promotores I.3 y II ejercidos por la administración de melatonina, docetaxel, vinorelbina y la aplicación de radiación. (Abreviaturas: M, melatonina; D, docetaxel; V, vinorelbina; R, radiación; -3, $10^{-3} M=1 \text{ mM}$; -6, $10^{-6} M=1 \mu\text{M}$).

5. EFECTOS DE LA MELATONINA SOBRE LA EXPRESIÓN DE CITOQUINAS ANTIADIPOGÉNICAS EN PREADIPOCITOS TRATADOS CON DOCETAXEL, VINOELBINA Y RADIACIÓN

Dado que las citoquinas antiadipogénicas secretadas por las células tumorales mamarias malignas, como $\text{TNF-}\alpha$, IL-6 e IL-11, inhiben la diferenciación de preadipocitos a adipocitos y estimulan la expresión de la aromatasa, estudiamos los efectos ejercidos por melatonina sobre la expresión de estas citoquinas en preadipocitos tratados con docetaxel, vinorelbina y radiación (Figura 12).

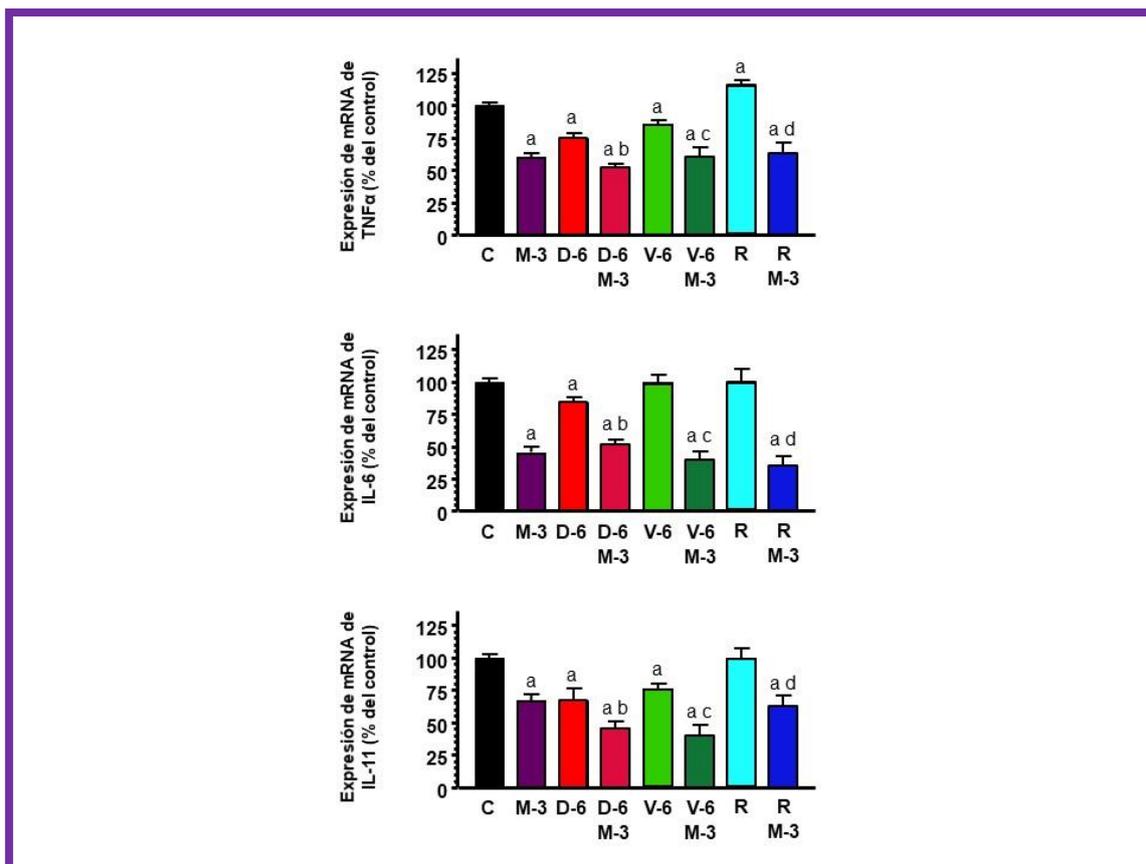


Figura 12. Efectos de la melatonina, docetaxel, vinorelbina y la aplicación de radiación sobre la expresión de las citoquinas TNF α , IL-6 e IL-11. (Abreviaturas: M, melatonina; D, docetaxel; V, vinorelbina; R, radiación; -3, $10^{-3} M=1 \text{ mM}$; -6, $10^{-6} M=1 \mu M$)

Docetaxel inhibió la expresión de las tres citoquinas antiadipogénicas. Vinorelbina redujo la expresión del mRNA de TNF- α e IL-11. La radiación incrementó la expresión de TNF- α . La melatonina redujo la expresión de TNF- α , IL-6 e IL-11 significativamente y potenció el efecto inhibitorio del docetaxel sobre la expresión de las tres citoquinas, también incrementó el efecto inhibitorio de la vinorelbina sobre TNF- α e IL-11 y neutralizó el efecto estimulador de la radiación sobre TNF- α .

6. EFECTOS DE LA MELATONINA SOBRE LOS CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN DE COX-1 Y COX-2 EN PREADIPOCITOS TRATADOS CON DOCETAXEL, VINOELBINA Y RADIACIÓN

La expresión de enzimas como las ciclooxigenasas (COX), tanto la subunidad 1 como la 2, va a ser un factor desfavorecedor de la diferenciación. Las ciclooxigenasas van a ser la principal vía de formación de prostaglandinas, como la prostaglandina E₂ y con ello el aumento

del cAMP y la activación de la enzima aromatasa. En este sentido, analizamos mediante PCR a tiempo real los efectos que ejercen docetaxel, vinorelbina y la aplicación de radiación con y sin melatonina sobre la expresión de estos enzimas (**Figura 13**).

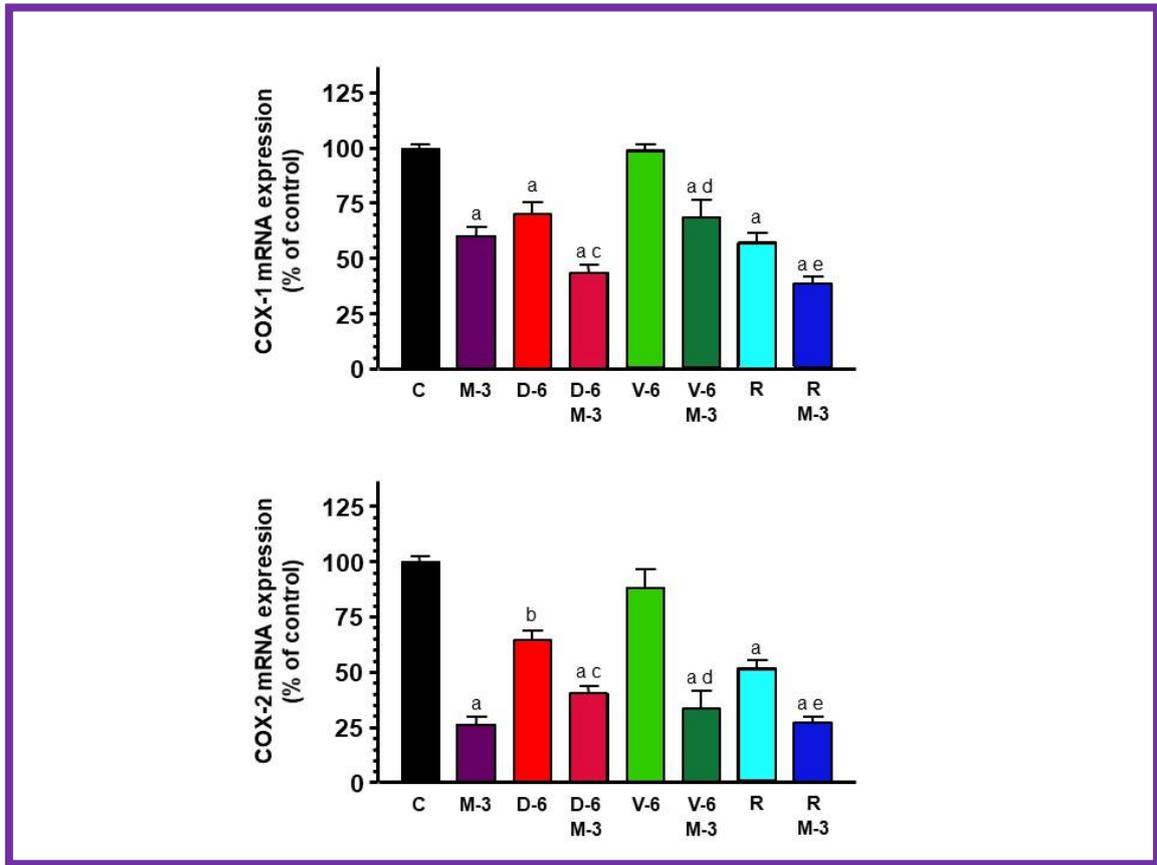


Figura 13. Efectos de melatonina, docetaxel, vinorelbina y la aplicación de radiación sobre la expresión de los enzimas COX-1 y COX-2. (Abreviaturas: M, melatonina; D, docetaxel; V, vinorelbina; R, radiación; -3, $10^{-3} M = 1 \text{ mM}$; -6, $10^{-6} M = 1 \mu M$; -9, $10^{-9} M = 1 \text{ nM}$).

El docetaxel y la radiación inhibieron la expresión de las dos isoformas de la ciclooxigenasa. La melatonina inhibió la expresión de ambas enzimas y potenció el efecto inhibitor producido por el docetaxel y la radiación sobre COX-1 y COX-2.

DISCUSIÓN

Las interacciones entre los diferentes tipos celulares presentes en el entorno tumoral son muy importantes para la formación y desarrollo del cáncer de mama. Tanto adipocitos, preadipocitos, fibroblastos, células endoteliales, como las células del sistema inmune innato y adaptativo y numerosos factores de señalización van a ser capaces de estimular o inhibir el crecimiento del tumor [24,25,26].

El crecimiento del cáncer de mama tiene lugar en un microambiente favorable en el que se concentran fibroblastos indiferenciados con gran actividad aromatasa favoreciendo la ya conocida reacción desmoplásica. Las interacciones entre las células tumorales mamarias, los preadipocitos y las células endoteliales adyacentes son las responsables de la síntesis local de estrógenos y la indiferenciación del tejido adipogénico [21,27,28].

Las células tumorales malignas secretan citoquinas (como TNF- α , IL-6 o IL-11) que inhiben la diferenciación de los preadipocitos incrementando la actividad y expresión de aromatasa [20,29]. De esta manera las células tumorales van a estar rodeadas de células capaces de sintetizar estrógenos lo que favorece el crecimiento del cáncer.

La melatonina por el contrario, va a estimular la diferenciación de los preadipocitos a adipocitos, disminuyendo así la actividad y expresión de aromatasa y reduciendo la producción local de estrógenos [22,23]. Por este motivo, en nuestro estudio investigamos los efectos de los quimioterápicos docetaxel y vinorelbina y la inducción de radiación en la diferenciación de preadipocitos del tejido mamario humano y la modulación de estos efectos ejercida por la presencia de melatonina.

En el estudio podemos observar como docetaxel, vinorelbina y la radiación no solo tienen efectos antineoplásicos sobre las células tumorales sino que también ejercen su acción frente a otros tipos celulares que forman el microambiente tumoral. Docetaxel y vinorelbina inhiben la proliferación celular e incrementan el contenido en triglicéridos de los adipocitos, lo cual es un indicador de diferenciación, tanto en cultivos de preadipocitos solos como en cocultivo con células tumorales mamarias. También observamos como la administración de melatonina 1 mM potenció el efecto ejercido por los quimioterápicos.

Hasta ahora, hay varios estudios sobre los efectos de la melatonina en la adipogénesis con resultados contradictorios. Así, Maldonado y cols. (2006), González y cols. (2012) y Kato y cols. (2015) han descrito un efecto estimulador dosis dependiente de melatonina en la diferenciación de fibroblastos 3T3-L1 mediante un aumento de la expresión de C/EBP α y PPAR γ [23,30,31]. También, Yang y cols. (2017) describen que melatonina promueve la

diferenciación de adipocitos bovinos a adipocitos incrementando la expresión de C/EBP α , C/EBP β y PPAR γ vía receptor de melatonina MT2 [32]. Sin embargo, algunos estudios como el de Alonso-Vale y cols (2009) demuestran cómo melatonina inhibe la diferenciación adipogénica a través de una disminución de la expresión de C/EBP α , C/EBP β y PPAR γ [33]. Por este motivo, la implicación de la melatonina en la adipogénesis no está completamente clara, de manera que las acciones de la melatonina pueden ser diferentes dependiendo de la especie animal o de la dosis empleada.

La conversión de preadipocitos en adipocitos maduros se desarrolla mediante la activación de una cascada de factores de transcripción que modulan la expresión de diferentes proteínas involucradas en el establecimiento del fenotipo de célula adiposa madura. En esta secuencia de activación, los dos principales reguladores son PPAR γ y C/EBP α , los cuales inducen la transcripción de varios genes que codifican a proteínas involucradas en la progresión y mantenimiento del fenotipo adiposo maduro [34,35]. Docetaxel y vinorelbina incrementaron significativamente la expresión de sus mRNAs, mientras que el tratamiento conjunto con melatonina potenció el efecto de ambos quimioterápicos sobre la expresión de los mRNA de PPAR γ y C/EBP α .

Por otro lado, en nuestro estudio, la radiación redujo tanto la proliferación celular como el contenido intracitoplasmático de triglicéridos. La melatonina 1 mM disminuyó la proliferación celular y neutralizó el efecto de la radiación incrementando la diferenciación adipogénica. El efecto inhibitorio de la radiación sobre la diferenciación adipogénica está regulado principalmente por PPAR γ y C/EBP α . Así, la radiación disminuyó la expresión del mRNA de C/EBP α y PPAR γ . La melatonina en cambio fue capaz de inhibir el efecto ejercido por la radiación e incrementó significativamente la expresión de estos dos factores de transcripción.

Estos resultados obtenidos coinciden con trabajos previos que demostraron cómo la radiación inhibía la capacidad osteogénica y adipogénica de las células madre mesenquimales de la médula ósea [36]. La luz ultravioleta A también inhibe la diferenciación adipogénica en el tejido adiposo humano derivado de células madre mesenquimales mediante una reducción de la expresión de los mRNAs de PPAR γ y C/EBP α [37]. En un estudio reciente, Shreder y cols. (2018) describen como la exposición a rayos X reduce de una manera dosis dependiente la proliferación celular e incrementa la concentración de lípidos en preadipocitos humanos [38]. Estos autores describen que la expresión de los marcadores de diferenciación adipogénica (C/EBP α , PPAR γ y C/EBP β) no sufren cambios significativos y por eso sugieren que existe una respuesta inducida por la radiación y relacionada con la inflamación. El efecto inductor de la

expresión de los mRNAs de C/EBP α y PPAR γ ejercido por la melatonina ya fue descrito en fibroblastos 3T3-L1 a través de un receptor específico para melatonina [23].

Otro marcador de indiferenciación de preadipocitos es la expresión de la enzima aromatasa [39,40]. El docetaxel y la radiación fueron capaces de disminuir la actividad y la expresión de aromatasa y este efecto fue potenciado significativamente por la presencia de melatonina. Hasta ahora, no está descrito el efecto de la radiación sobre la biosíntesis local de estrógenos. En el caso del docetaxel, nuestros resultados concuerdan con la disminución de la expresión y actividad de aromatasa, en tumores mamarios y otros tejidos ya descrita [22,23,41,42].

En el cáncer de mama, los fibroblastos adiposos tumorales mamarios y las células tumorales malignas incrementan la expresión de la enzima aromatasa mediante la estimulación de los promotores II y I.3 [43]. En nuestro estudio, la inhibición de la expresión del mRNA de aromatasa inducida por docetaxel y vinorelbina, puede explicarse a través de la disminución de la expresión del mRNA del promotor II. La melatonina inhibe la expresión de los mRNA de los promotores II y I.3 y así potencia el efecto inhibitorio ejercido por docetaxel y la radiación en el promotor II. Se ha descrito que la melatonina disminuye la expresión del mRNA de la enzima aromatasa y la expresión del gen de los promotores II y I.3 en células tumorales mamarias y en preadipocitos mamarios [22,23].

El incremento de los promotores de aromatasa II y I.3 en preadipocitos mamarios está relacionado con el incremento intracelular de cAMP a través de la prostaglandina PGE₂ secretada por las células tumorales malignas [44]. Por ello, se ha propuesto una relación entre la enzima aromatasa y la expresión de las enzimas ciclooxigenasas (COX), de manera que el incremento en la actividad de las COX elevaría los niveles de PGE₂, incrementando los niveles de cAMP intracelulares y activando los promotores II y I.3, consiguiendo por último un incremento en la expresión de la aromatasa. Las ciclooxigenasas (COX-1 y COX-2) son enzimas que catalizan la conversión de ácido araquidónico en prostaglandinas. La isoforma COX-1 está expresada constitutivamente en la mayoría de células y tejidos y la isoforma COX-2 es inducible en procesos como la inflamación o el cáncer [45].

En nuestro estudio, el docetaxel y la radiación disminuyeron la expresión de las dos isoformas de ciclooxigenasa y la administración de melatonina inhibió la expresión de ambas y potenció el efecto inhibitorio del docetaxel y la radiación. Esta inhibición de la expresión de las ciclooxigenasas puede explicar la reducción del promotor II y la inhibición de la expresión de aromatasa ejercidas por el docetaxel y la radiación. Por lo tanto, podemos sugerir que en nuestro estudio, la disminución de la expresión del mRNA de las ciclooxigenasas puede reducir la producción de PGE₂ por los preadipocitos, disminuyendo los niveles intracelulares de cAMP y

consecuentemente la activación del promotor de aromatasa II, resultando en un descenso en la expresión de aromatasa.

Como ya habíamos descrito previamente, las células tumorales mamarias secretan citoquinas antiadipogénicas que inhiben la diferenciación de los preadipocitos a adipocitos e incrementan su actividad y expresión de la aromatasa [20,43,46]. También ha sido descrito cómo en cocultivos de células tumorales mamarias y fibroblastos 3T3-L1, disminuyen los niveles de TNF- α , IL-6 e IL-11 en el medio de cultivo y disminuye la expresión de sus respectivos mRNAs [19]. En este sentido, nuestros resultados han demostrado como el docetaxel disminuyó la expresión de TNF- α , IL-6 e IL-11 y la vinorelbina redujo la expresión de TNF- α e IL-11. Estos resultados concuerdan con lo ya descrito previamente para docetaxel, el cual reducía la expresión de aromatasa intratumoral a través de la reducción de la expresión del mRNA de TNF- α en tumores mamarios humanos [41]. La reducción de la expresión de TNF- α , IL-6 e IL-11 inducida por los quimioterápicos puede ser una explicación del incremento de la diferenciación adipogénica. La melatonina en este sentido incrementó el efecto inhibitorio ejercido por docetaxel y vinorelbina sobre las citoquinas antiadipogénicas citadas, lo cual explica que la melatonina potencia el efecto estimulador ejercido por docetaxel y vinorelbina sobre la diferenciación de los preadipocitos. Sin embargo, la radiación incrementó la expresión del mRNA de TNF- α lo cual justifica por qué la radiación inhibe la diferenciación adipogénica. El incremento de la expresión de TNF- α después de la radiación ha sido descrito en tejido adiposo humano durante radioterapia [47]. La melatonina neutralizó este efecto producido por la radiación y disminuyó la expresión de mRNA de TNF- α estimulando así la diferenciación adipogénica.

En resumen, los resultados de nuestro estudio indican que los quimioterápicos docetaxel y vinorelbina juegan un papel en la regulación de la reacción desmoplásica en el cáncer de mama, inhibiendo la proliferación y estimulando la diferenciación de preadipocitos mamarios, incrementando la expresión de dos de los principales reguladores de la adipogénesis como son C/EBP α y PPAR γ e inhibiendo la liberación de citoquinas antiadipogénicas como TNF- α , IL-6 e IL-11. La radiación inhibió tanto proliferación como diferenciación en preadipocitos a través de una inhibición de C/EBP α y PPAR γ y estimulando TNF- α . Además, docetaxel y vinorelbina disminuyeron la actividad y expresión de aromatasa disminuyendo la expresión del mRNA del promotor II y la expresión de las enzimas COX-1 y COX-2. La melatonina potenció el efecto estimulador ejercido por docetaxel y vinorelbina sobre la diferenciación y el efecto inhibitorio sobre la expresión y actividad de aromatasa, mediante un incremento en el efecto estimulador ejercido por los quimioterápicos sobre la expresión de C/EBP α y PPAR γ y potenciando la reducción de las citoquinas antiadipogénicas y la expresión de las ciclooxigenasas.

En combinación con la radiación, la melatonina neutralizó el efecto inhibitorio ejercido por la radiación sobre la diferenciación de los preadipocitos, incrementando la expresión de C/EBP α y PPAR γ y disminuyendo la expresión de TNF- α inducida por la radiación. La melatonina también potenció el efecto inhibitorio ejercido por la radiación sobre la expresión y actividad de la enzima aromatasa, potenciando la reducción de la expresión del promotor II y las enzimas COX-1 y COX-2.

En el microambiente tumoral mamario, la melatonina modula la respuesta de los preadipocitos (diferenciación, actividad y expresión de aromatasa) al tratamiento con quimioterápicos o con radiación. Nuestro estudio apoya el uso de la melatonina como adyuvante al tratamiento con quimioterapia y radioterapia, demostrando efectos sinérgicos antitumorales [25,48].

CONCLUSIONES

- Los quimioterápicos docetaxel y vinorelbina y la radiación juegan un papel en la regulación de la reacción desmoplásica en el cáncer de mama pues inhibieron la proliferación y estimularon la diferenciación de preadipocitos mamarios.
- Los principales mecanismos de acción utilizados por el docetaxel y la vinorelbina son la estimulación de los factores de transcripción C/EBP α y PPAR γ y la inhibición de las citoquinas antiadipogénicas TNF- α , IL-6 e IL-11.
- La radiación inhibió la proliferación y la diferenciación de los preadipocitos a través de inhibir los factores de transcripción C/EBP α y PPAR γ y estimular TNF- α .
- Docetaxel y radiación disminuyeron la actividad y la expresión de la aromatasa, otro indicador de diferenciación, inhibiendo la expresión del promotor II y de las ciclooxigenasas COX-1 y COX-2.
- La melatonina modula la respuesta de los preadipocitos del microentorno tumoral al tratamiento con los quimioterápicos docetaxel y vinorelbina potenciando su efecto estimulador sobre la diferenciación y su efecto inhibitorio sobre la aromatasa, a través de un aumento de la expresión de los factores de transcripción C/EBP α y PPAR γ y un aumento de la inhibición de la expresión de las citoquinas antiadipogénicas y de las ciclooxigenasas.
- La melatonina contrarrestó el efecto inhibitorio de la radiación sobre la diferenciación de los preadipocitos aumentando la expresión de los factores de transcripción C/EBP α y PPAR γ y disminuyendo la expresión de TNF- α inducida por la radiación.
- La melatonina potenció el efecto inhibitorio de la actividad y la expresión de la aromatasa provocado por la radiación, a través de inhibir la expresión del promotor II de la aromatasa y de las ciclooxigenasas.
- La melatonina se postula como un posible adyuvante para mejorar el tratamiento del cáncer de mama con quimioterapia y radioterapia habiendo demostrado efectos antitumorales sinérgicos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Reiter RJ. The pineal and its hormones in the control of reproduction in mammals. *Endocrine Review*. 1980; 1:109-131.
2. Brainard GC, Hanifin JP, Greeson JM, Byrne B, Glickman G, Herner E, Rollag MD. Action spectrum for melatonin reevaluation in humans: evidence for a novel circadian photoreceptor. *Journal of Neuroscience*. 2001; 63:867-872.
3. Kelleher FC, Rao A, Maguire A. Circadian molecular clocks and cancer. *Cancer Letters*. 2014; 342:9-18.
4. Acuña-Castroviejo D, Escames G, Venegas C, Díaz-Casado ME, Lima-Cabello E, López LC, Rosales-Corral S, Tan DX, Reiter RJ. Extrapineal melatonin: sources, regulation, and potential functions. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2014; 71:2997-3025
5. Slominski RM, Rieter RJ, Schlabritz-Loutsevitch N, Ostrom RS, Slominski AT. Melatonin membrane receptors in peripheral tissues: Distribution and functions. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2012; 351:152-166.
6. Reiter RJ, Tan DX, Fuentes-Broto L. Melatonin: Exceeding expectation. *Physiology Bethesda*. 2014; 29:325-333.
7. Hill SM, Belancio VP, Dauchy RT, Xiang S, Brimer S, Mao L, Hauch A, Lundberg PW, Summers W, Yuan L, Frasch T, Blask D. Melatonin: an inhibitor of breast cancer. *Endocrine-Related Cancer*. 2015; 22:183-204
8. Dai J, Ram PT, Yuan L, Spriggs LL, Hill SM. Transcriptional repression of ROR α activity in human breast cancer cells by melatonin. *Molecular Cell Endocrinology*. 2001; 176:111-120.
9. Reiter RJ, Tan DX, Manchester LC, Lopez-Burillo S, Sainz RM, Mayo JC. Melatonin: Detoxification of oxygen and nitrogen-based toxic reactants. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2003; 527:539-548.
10. Cos S, Sánchez-Barceló EJ. Melatonin and mammary pathological growth. *Frontiers in Neuroendocrinology*. 2000; 21:133-170.
11. Cos S, Sánchez-Barceló EJ. Melatonin and mammary cancer: a short review. *Endocrine-Related Cancer* 2003; 10:153-159.
12. Dubocovich ML, Rivera-Bermudez MA, Gerdin MJ, Masana MI. Molecular pharmacology, regulation and function of mammalian melatonin receptors. *Frontiers in Bioscience*. 2003; 8:1093-1108.
13. Lai L, Yuan L, Cheng Q, Dong C, Mao L, Hill SM. Alteration of the MT1 melatonin receptor gene and its expression in primary human breast tumors and

- breast cancer cell lines. *Breast Cancer Research and Treatment*. 2009; 118:293-305.
14. Rögelsperger O, Ekmekcioglu C, Jäger W, Klimpfinger M, Königsberg R, Krenbek D, Sellner F, Thalhammer T. Coexpression of the melatonin receptor 1 and nestin in human breast cancer specimens. *Journal of Pineal Research*. 2009; 46:422-432.
 15. Jablonska K, Pula B, Zemla A, Owczarek T, Wojnar A, Rys J, Ambicka A, Podhorska-Okolow M, Ugorski M, Dziegiel P. Expression of melatonin receptor MT1 in cells of human invasive ductal breast carcinoma. *Journal of Pineal Research*. 2013; 54:334-345.
 16. Martinez-Campa C, Menéndez-Menéndez J, Alonso-González C, González A, Álvarez-García V, Cos S. What is known about melatonin, chemotherapy and altered gene expression in breast cancer. *Oncology Letters*. 2017; 13:2003-2014.
 17. Cos S, González A, Álvarez-García V, Alonso-González C, Martínez-Campa C. Melatonin and Breast Cancer: Selective Estrogen Enzyme Modulator Actions. *Advances in Cancer Drug Targets*. 2013; 1:207-237
 18. Cos S, Blask DE, Lemus-Wilson A, Hill SM. Effects of melatonin on the cell cycle kinetics and estrogen rescue of MCF-7 human breast cancer cells in culture. *Journal of Pineal Research*. 1994; 8:1681-1690.
 19. Álvarez-García V, González A, Alonso-González C, Martínez-Campa C, Cos S. Melatonin interferes in the desmoplastic reaction in breast cancer by regulating cytokine production. *Journal of Pineal Research*. 2012; 52:282-290.
 20. Meng LI, Zhou J, Sasano H, Suzuki T, Zeitoun KM, Bulun SE. Tumor necrosis factor α and interleukin 11 secreted by malignant breast epithelial cells inhibit adipocyte differentiation by selectively down-regulating CCAAT/enhancer binding protein α and peroxisome proliferator-activated receptor γ : mechanism of desmoplastic reaction. *Cancer Research*. 2001; 61:2250-2255.
 21. Bulun SE, Chen D, Lu M, y cols. Aromatase excess in cancers of breast, endometrium and ovary. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 2007; 106:81-96.
 22. Knowler KC, To SQ, Takagi K. Melatonin suppresses aromatase expression and activity in breast cancer associated fibroblast. *Breast Cancer Research and Treatment*. 2012; 132:765-771.
 23. González A, Álvarez-García V, Martínez-Campa C, Alonso-González C, Cos S. Melatonin promotes differentiation of 3T3-L1 fibroblast. *Journal of Pineal Research*. 2012; 52:12-20.
 24. Wang YM, Jin BZ, Ai F, Duan CH, Lu YZ, Dong TF, Fu QL. The efficacy and safety of melatonin in concurrent chemotherapy or radiotherapy for solid tumors: A

- meta-analysis of randomized controlled trials. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. 2012; 69:1213-1220.
25. Najafi M, Goradel NH, Farhood B, Salehi E, Solhjoo S, Toolee H, Kharazinejad N, Mortezaee K. Tumor microenvironment: interactions and therapy. *Journal of Cellular Physiology*. 2019; 234:5700-5721.
 26. Najafi M, Salehi E, Farhood B, Nashtaei MS, Goradel NH, Khanlarkhani N, Namjoo Z. Adjuvant chemotherapy with melatonin for targeting human cancers: a review. *Journal of Cellular Physiology*. 2019; 234:2356-2372.
 27. Ramírez-Zacarias JL, Castro-Muñozledo F, Kuri-Harcuch W. Quantitation of adipose conversión and triglycerides by staining intracytoplasmic lipids with Oil red O. *Histochemistry* 1992, 97:493-497.
 28. Guerrero J, Tobar N, Caceres M y cols. Soluble factors derived from tumor mammary cell lines induce a stromal mammary adipose reversion in human and mice adipose cells. Possible role of TGF- β 1 and TNF- α . *Breast Cancer Research and Treatment*. 2010; 119:497-508.
 29. Cos S, Alvarez-García V, González A, Alonso-González C, Martínez-Campa C. Melatonin modulation of crosstalk among malignant epithelial, endothelial and adipose cells in breast cancer. *Oncology Letters*. 2014; 8:487-492.
 30. Maldonado MD, Siu AW, Sánchez-Hidalgo M et al. Melatonin and lipid uptake by murine fibroblasts: clinical implications. *Neuro Endocrinology Letters*. 2006; 27:601-608.
 31. Kato H, Tanaka G, Masuda S, Ogasawara J, Sakurai T, Kizaki T, Ohno H, Izawa T. Melatonin promotes adipogenesis and mitochondrial biogenesis in 3T3-L1 preadipocytes. *Journal of Pineal Research*. 2015; 59:267-275.
 32. Yang W, Tang K, Wang Y, Zhang Y, Zan L. Melatonin promotes triacylglycerol accumulation via MT2 receptor during differentiation in bovine intramuscular preadipocytes. *Scientific Reports*. 2017; 7:15080.
 33. Alonso-Vale MIC, Peres SB, Vernochet C et al. Adypocyte differentiation is inhibited by melatonin through the regulation of c/EBP β transcriptional activity. *Journal of Pineal Research*. 2009; 47:221-227.
 34. Ntambi JM, Kim YC. Adipocyte differentiation and gene expression. *Journal of Nutrition*. 2000; 130:3122S-3126S.
 35. Lane MD, Tang QQ. From multipotent stem cell to adipocyte. *Birth Defects Research Part A*. 2005; 73:476-477.

36. Wang Y, Zhu G, Wang J, Chen J. Irradiation alters the differentiation potential of bone marrow mesenchymal stem cells. *Molecular Medicine Report*. 2016; 13:213-223.
37. Lee J, Lee J, Jung E, Kim YS, Roh K, Jung KH, Park D. Ultraviolet A regulates adipogenic differentiation of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells via up-regulation of kruppel-like factor 2. *Journal of Biological Chemistry*. 2010; 285:32647-32656.
38. Schreder K, Rapp F, Tsoukala I, Rzeznik V, Wabitsch M, Fischer-Posovszky P, Fournier C. Impact of X-ray exposure on the proliferation and differentiation of human pre-adipocytes. *International Journal of Molecular Science*. 2018; 19:2717.
39. Russo J, Russo IH. The role of estrogen in the initiation of breast cancer. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 2006; 102:89-96.
40. Ackerman GE, Smith ME, Mendelson CR et al. Aromatization of androstenedione by human adipose tissue stromal cells in monolayer culture. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 1981; 53:412-417.
41. Miyoshi Y, Kim SJ, Akazawa K, Kamigaki S, Ueda S, Yanagisawa T, Inoue T, Taguchi T, Tamaki Y, Noguchi S. Down-regulation of intratumoral aromatase messenger RNA levels by docetaxel in human breast cancers. *Clinical Cancer Research*. 2004; 10:8163-8169.
42. Alvarez-García V, González A, Martínez-Campa C, Alonso-González C, Cos S. Melatonin modulates aromatase activity and expression in endothelial cells. *Oncology Reports*. 2013; 29:2058-2064.
43. Bulun SE, Lin Z, Imir G et al. Regulation of aromatase expression in estrogen-responsive breast and uterine disease: from bench to treatment. *Pharmacology Review*. 2005; 57:359-383.
44. Brueggemeier RW., Richards JA, Petrel TA. Aromatase and cyclooxygenases: enzymes in breast cancer. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 2003; 86:501-507.
45. Díaz-Cruz ES, Shapiro CL, Brueggemeier RW. Cyclooxygenase inhibitors suppress aromatase expression and activity in breast cancer cells. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2005; 90:2563-2570.
46. Torti FM, Torti SV, Larrick JW, et al. Modulation of adipocyte differentiation by tumor necrosis factor and transforming growth factor β . *Journal of Cell Biology*. 1989; 108:1105-1113.
47. Meng G, Tang X, Yang Z, Benesch MGK, Marshall A, Murray D, Hemmings DG, Wuest F, McMullen TPW, Brindley DN. Implications for breast cancer treatment

from increased autotaxin production in adipose tissue after radiotherapy. *FASEB J* 2017, 31:4064-4077.

48. Farhood, B., Goradel, N.H., Mortezaee, K., Khanlarkhani, N., Salehi, E., Nashtaei, M.S., Mirtavoos-Mahyari, H., Motevaseli, E., Shabeeb, D., Musa, A.E. and Najafi, M. Melatonin as an adjuvant in radiotherapy for radioprotection and radiosensitization. *Clinical Translational Oncology*. 2019; 21:268-279