

**UNIVERSIDAD DE CANTABRIA**  
**FACULTAD DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA Y FARMACOLOGÍA**



**ACCIONES ONCOSTÁTICAS DE LA MELATONINA EN  
MODELOS *IN VITRO* DE TEJIDO TUMORAL Y  
PERITUMORAL MAMARIO**

---

Memoria presentada por **Virginia Álvarez García** para optar al grado de  
**Doctora por la Universidad de Cantabria**

**TESIS DOCTORAL  
SANTANDER 2013**





D. **Samuel Cos Corral**, Profesor Titular del Departamento de Fisiología y Farmacología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Cantabria y D. **Carlos Manuel Martínez Campa**, Profesor Titular del Departamento de Fisiología y Farmacología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Cantabria,

CERTIFICAN:

Que Dña. Virginia Álvarez García ha realizado el trabajo de investigación correspondiente a esta Tesis Doctoral que lleva por título "Acciones oncostáticas de la melatonina en modelos *in vitro* de tejido tumoral y peritumoral mamario", bajo su dirección en el Departamento de Fisiología y Farmacología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Cantabria.

Santander, Enero de 2013.

Samuel Cos Corral

Carlos Manuel Martínez Campa



*"No sé lo que pareceré a los ojos del mundo, pero a los míos es como si hubiese sido un muchacho que juega en la orilla del mar y se divierte de tanto en tanto encontrando un guijarro más pulido o una concha más hermosa, mientras el inmenso océano de la verdad se extendía, inexplorado, frente a mí".*

Isaac Newton



## **AGRADECIMIENTOS**

---

---



## AGRADECIMIENTOS

*Me gustaría comenzar expresando mi más profundo agradecimiento a los doctores Samuel Cos Corral y Carlos Martínez Campa, directores de esta Tesis doctoral, por haberme ofrecido la posibilidad de desarrollar este trabajo de investigación, por sus enseñanzas y consejos y por el apoyo y dedicación que me han prestado a lo largo de estos años.*

*Asimismo, quiero extender mi agradecimiento al doctor Emilio Sánchez Barceló, por haberme permitido formar parte de su grupo de investigación, por sus valiosas enseñanzas y sus sabios consejos.*

*También me gustaría dar las gracias a mis compañeros del grupo de investigación, especialmente a mis compañeras de despacho. A Carol, por los buenos ratos que hemos pasado juntas, tanto en el laboratorio como fuera de él, y por su apoyo durante todo este tiempo. A Alicia por su sinceridad, y su constante ayuda y consejos, que han sido fundamentales a lo largo del desarrollo de este trabajo. A Noemí por su simpatía y por haberme transmitido su entusiasmo, ilusión y dedicación a la ciencia. A Andrea por escucharme y animarme siempre.*

*Al resto de compañeros del área de Fisiología: M<sup>ra</sup> José, Mar, Lola, Chari y José Antonio, por el apoyo científico y humano que he recibido de ellos a lo largo de estos años y por su buena disposición a ayudarme siempre que lo he necesitado. Gracias también a Gema por su generosidad y su inestimable ayuda en el laboratorio.*

*Al doctor Fidel Madrazo Toca, del servicio de microscopía del IFIMAV, por su valiosa ayuda en los experimentos de microscopía, y por sus consejos a la hora de interpretar los resultados.*

*Por supuesto, no puedo dejar de incluir en estos agradecimientos a mis compañeros de la Facultad de Medicina de Santander, por todos los buenos momentos que hemos compartido tanto dentro como especialmente fuera de los laboratorios, y por hacer de mi estancia aquí, en definitiva, un tiempo inolvidable. Mi más sincero agradecimiento a Alfonso, por su cariño y comprensión y por haber participado en esta Tesis a través de sus consejos e ideas. A Rocío, Ana, Bea, Inma, Eva y Sandra por su amistad, por las cenas de los jueves y por todos los buenos momentos que hemos compartido. A Fernanda, Cris, Nacho, Lolo, Alejandro, y tantos otros, por su buen recibimiento en los primeros momentos, sus enseñanzas y consejos. Gracias por ser unos compañeros geniales.*

*No puedo dejar de incluir en estos agradecimientos al doctor Francisco Parra y a todo el laboratorio de Virología de la Universidad de Oviedo, por permitirme dar mis primeros pasos en Ciencia y guiarme en el camino.*

*Por supuesto, a Bea, Beíta, Águeda, María, Yoli y Paqui por su amistad y por el apoyo personal incalculable que me han brindado.*

*Por último, me gustaría expresar mi más sentido agradecimiento a mi madre y a mi hermana, pues sin su afecto y apoyo incondicional esta Tesis no habría sido posible. Del mismo modo, quiero agradecer el ánimo infundido por el resto de mi familia, especialmente por Tina, Javi, Eva y Álvaro, gracias por vuestros consejos y por vuestro apoyo.*

## **ÍNDICE**

---

---



<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	viii
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	xi
<b>ABREVIATURAS</b> .....	xv
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>1.1. EL CÁNCER DE MAMA</b> .....	3
1.1.1. Epidemiología y etiología.....	3
1.1.2. Papel de los estrógenos en el cáncer de mama.....	6
1.1.3. Terapia antiestrogénica en los tumores mamarios hormono- dependientes.....	8
<b>1.2. MECANISMOS DE SÍNTESIS DE HORMONAS ESTEROIDEAS</b> .....	10
1.2.1. Las hormonas esteroideas.....	10
1.2.2. Síntesis de estradiol.....	10
1.2.3. Enzimas implicados en la síntesis de estradiol.....	11
1.2.3.1. El complejo enzimático P450 aromatasas.....	11
1.2.3.2. Esteroidesulfatasa.....	18
1.2.3.3. 17 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa.....	19
1.2.3.4. Estrógeno sulfotransferasa.....	21
1.2.4. Los enzimas implicados en la síntesis de estrógenos como dianas terapéuticas en el cáncer de mama estrógeno-dependiente.....	22
<b>1.3. TEJIDO PERITUMORAL MAMARIO: LA REACCIÓN DESMOPLÁSICA</b> .....	24
1.3.1. Concepto de reacción desmoplásica.....	24
1.3.2. Papel del tejido adiposo en la reacción desmoplásica.....	25
1.3.3. Interacción paracrina entre el tejido adiposo y el tejido epitelial tumoral.....	26
1.3.4. La matriz extracelular en la reacción desmoplásica.....	28

<b>1.4. LA ANGIOGÉNESIS EN EL TEJIDO PERITUMORAL MAMARIO.....</b>	<b>30</b>
1.4.1. La angiogénesis fisiológica.....	30
1.4.2. La angiogénesis tumoral.....	31
1.4.3. Formación y remodelado de los vasos sanguíneos.....	31
1.4.4. La matriz extracelular en la angiogénesis tumoral.....	32
1.4.5. Factores solubles.....	33
1.4.5.1. VEGF.....	33
1.4.5.2. Angiopoyetinas.....	38
1.4.5.3. Factor de crecimiento de fibroblastos.....	39
1.4.5.4. Interleuquina 8 y metaloproteasa de la matriz 2.....	39
1.4.5.5. Otros factores solubles.....	40
1.4.6. Terapia antiangiogénica.....	40
<b>1.5. LA MELATONINA.....</b>	<b>43</b>
1.5.1. Síntesis, secreción, circulación y metabolismo de la melatonina..	43
1.5.2. Regulación de la síntesis de melatonina.....	45
1.5.3. Mecanismo de acción de la melatonina.....	46
1.5.4. Acciones de la melatonina.....	48
1.5.5. Melatonina y cáncer de mama.....	49
1.5.6. La melatonina como antiestrógeno: propiedades SERM y SEEM	50
1.5.6.1. Propiedades SERM de la melatonina.....	51
1.5.6.2. Propiedades SEEM de la melatonina.....	52
1.5.7. Papel de la melatonina en la angiogénesis tumoral.....	54
<b>2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....</b>	<b>57</b>
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>63</b>
3.1. Cultivos celulares.....	65
3.1.1. Líneas celulares utilizadas en el estudio.....	65
3.1.2. Condiciones de cultivo.....	65
3.1.2.1. Comunes a todas las líneas celulares.....	65
3.1.2.2. Específicas de cada línea celular.....	66
3.1.3. Condiciones de subcultivo.....	66

3.1.4. Recuentos celulares para siembras. Viabilidad celular.....	67
3.1.5. Tratamiento del suero para la eliminación de los estrógenos.....	67
3.2. Tratamientos y compuestos químicos.....	68
3.3. Experimentos de cocultivos celulares.....	68
3.1. Cocultivos de células 3T3-L1 y MCF-7.....	69
3.2. Cocultivos de células HUVEC y MCF-7.....	69
3.4. Obtención de medio condicionado de células MCF-7.....	70
3.5. Medida de la proliferación celular. Método del MTT.....	70
3.6. Estudios de expresión génica.....	71
3.6.1. Extracción de RNA total de las células en cultivo.....	71
3.6.2. Determinación de la cantidad y pureza del RNA.....	72
3.6.4. Síntesis de DNA complementario (cDNA).....	73
3.6.5. Diseño de oligonucleótidos cebadores para RT-PCR.....	74
3.6.6. Detección de la expresión génica mediante PCR a tiempo real.....	76
3.6.7. Cuantificación y análisis de la expresión génica relativa ....	77
3.6.8. Estudio de la expresión génica en distintas líneas celulares	77
3.6.8.1. Expresión de <i>CYP19</i> , promotores de aromatasa pl.3, pl.4, COX-1 y COX-2 en células MCF-7.....	77
3.6.8.2. Expresión de citoquinas antiadipogénicas en células MCF-7.....	77
3.6.8.3. Expresión de PPAR $\gamma$ y C/EBP $\alpha$ en células 3T3-L1	78
3.6.8.4. Expresión de citoquinas antiadipogénicas en células 3T3-L1.....	78
3.6.8.5. Expresión de <i>CYP19</i> y promotor pl.7 de aromatasa en células HUVEC.....	79
3.6.8.6. Expresión del Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (VEGF) en células MCF-7.....	79
3.7. Medida de los niveles de proteína en el medio extracelular.....	79
3.7.1. Ensayo de Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA).....	80
3.7.2. Cuantificación de la concentración proteica.....	81

3.7.3. Cuantificación de los niveles de citoquinas y factores de crecimiento.....	81
3.7.3.1. Cuantificación de citoquinas antiadipogénicas.....	81
3.7.3.2. Cuantificación de VEGF.....	82
3.8. Ensayo por inmunoabsorción competitiva.....	82
3.9. Cuantificación de los niveles de AMPc intracelulares.....	83
3.10. Determinación de la diferenciación de adipocitos mediante tinción con <i>Oil Red O</i> .....	85
3.11. Determinación de la actividad aromatasa celular .....	85
3.11.1. Medida directa de la actividad aromatasa.....	85
3.11.1.1. Medida de la actividad aromatasa en células 3T3-L1.....	86
3.11.1.2. Medida de la actividad aromatasa en células HUVEC.....	87
3.11.2. Medida indirecta de la actividad aromatasa.....	87
3.12. Ensayos de migración celular.....	88
3.13. Ensayos de invasión.....	88
3.14. Ensayos de tubulogénesis.....	90
3.14.1. Formación de túbulos.....	90
3.14.2. Disgregación de túbulos.....	91
3.15. Análisis estadístico de los datos.....	91
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>93</b>
<b>4.1. ESTUDIO DE LOS MECANISMOS A TRAVÉS DE LOS CUALES LA MELATONINA REGULA LA EXPRESIÓN Y ACTIVIDAD DE LA AROMATASA EN CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA.....</b>	<b>95</b>
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>95</b>
4.1.1. La melatonina inhibe la expresión mediada por los promotores pl.3, pl.4 y pl.4 del gen <i>CYP19</i> en células MCF-7.....	95
4.1.2. La melatonina inhibe la actividad ciclooxygenasa en células MCF-7.....	96

4.1.3. La melatonina inhibe la expresión de COX-1 y COX-2 en células MCF-7.....	97
4.1.4. La melatonina inhibe la expresión del gen de la aromatasa inducida por PGE <sub>2</sub> en células MCF-7.....	98
4.1.5. La melatonina disminuye los niveles intracelulares de AMPc, lo que se correlaciona con la inhibición de la expresión del gen <i>CYP19</i> en células MCF-7.....	99
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>103</b>
<b>4.2. ESTUDIO DE LA CAPACIDAD DE LA MELATONINA PARA MODULAR LA ADIPOGÉNESIS Y LA SÍNTESIS DE ESTRÓGENOS EN FIBROBLASTOS DEL TEJIDO ADIPOSO .....</b>	<b>109</b>
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>109</b>
4.2.1. La melatonina estimula la acumulación intracitoplasmática de triglicéridos en los preadipocitos.....	109
4.2.2. La melatonina reduce la actividad aromatasa en células 3T3-L1.....	112
4.2.3. La melatonina inhibe la expresión del gen <i>CYP19</i> en células 3T3-L1.....	114
4.2.4. La melatonina estimula la expresión génica de PPAR $\gamma$ y C/EBP $\alpha$ en células 3T3-L1.....	115
4.2.5. La melatonina aumenta la acumulación de triglicéridos intracitoplasmáticos a través de la acción de PPAR $\gamma$ .....	116
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>118</b>
<b>4.3. ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE LA MELATONINA EN LA REACCIÓN DESMOPLÁSICA PERITUMORAL.....</b>	<b>123</b>
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>123</b>
4.3.1. La melatonina estimula la adipogénesis de células 3T3-L1 cultivadas conjuntamente con células MCF-7.....	123
4.3.2. La melatonina inhibe la actividad aromatasa de células 3T3-L1 cultivadas conjuntamente con células MCF-7.....	124

4.3.3. Estudios de proliferación del tejido adiposo peritumoral.....	126
4.3.4. La melatonina inhibe la expresión de las citoquinas antiadipogénicas TNF $\alpha$ , IL-6 e IL-11 en células MCF-7.....	127
4.3.5. La melatonina inhibe la expresión de las citoquinas antiadipogénicas TNF $\alpha$ , IL-6 e IL-11 en células 3T3-L1.....	129
4.3.6. La melatonina reduce los niveles proteicos de TNF $\alpha$ , IL-6 e IL-11 en el medio de cocultivos de células 3T3-L1 y MCF-7.....	131
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>133</b>
<b>4.4. EFECTO DE LA MELATONINA SOBRE LA PROLIFERACIÓN, ACTIVIDAD AROMATASA Y EXPRESIÓN DEL GEN <i>CYP19</i> EN LAS CÉLULAS DEL ENDOTELIO VASCULAR.....</b>	<b>139</b>
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>139</b>
4.4.1. La melatonina inhibe la proliferación celular en la línea endotelial HUVEC.....	139
4.4.2. La melatonina revierte el efecto estimulador inducido por estradiol sobre la proliferación celular en la línea HUVEC.....	140
4.4.3. La melatonina revierte el efecto estimulador de la testosterona sobre la proliferación de las células endoteliales. Medida indirecta de la actividad aromatasa.....	141
4.4.4. La melatonina inhibe la actividad aromatasa en las células endoteliales.....	143
4.4.5. La melatonina reduce la expresión del gen <i>CYP19</i> y del promotor pl.7 de la aromatasa en la línea celular HUVEC.....	144
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>145</b>
<b>4.5. ESTUDIO DEL PAPEL DE LA MELATONINA EN LA REGULACIÓN DEL FACTOR DE CRECIMIENTO ENDOTELIAL VASCULAR (VEGF) EN EL TEJIDO TUMORAL MAMARIO.....</b>	<b>149</b>
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>149</b>
4.5.1. La melatonina revierte el incremento en la proliferación de las células endoteliales inducido por VEGF.....	149
4.5.2. La melatonina inhibe la expresión génica de VEGF	151

inducida por CoCl <sub>2</sub> en células MCF-7.....	
4.5.3. La melatonina reduce la producción de VEGF en las células MCF-7.....	153
4.5.4. La melatonina revierte la proliferación de las células HUVEC inducida por la presencia de células MCF-7 en el cocultivo.....	153
4.5.5. La melatonina disminuye los niveles proteicos de VEGF en cocultivos de células HUVEC y MCF-7.....	155
4.5.6. El VEGF liberado por las células MCF-7 estimula la proliferación de las células HUVEC. Influencia de la melatonina.....	156
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>158</b>
<b>4.6. ACCIONES DE LA MELATONINA EN LA ANGIOGÉNESIS.....</b>	<b>163</b>
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>163</b>
4.6.1. La melatonina inhibe la capacidad de invasión de las células HUVEC.....	163
4.6.2. La melatonina inhibe la migración de las células HUVEC....	164
4.6.3. Estudio de la capacidad de las células HUVEC para formar estructuras tubulares.....	166
4.6.4. Estudio de la disgregación de las estructuras tubulares formadas por las células HUVEC.....	168
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>172</b>
<b>DISCUSIÓN GENERAL.....</b>	<b>177</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>195</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>199</b>
<b>ANEXOS: PUBLICACIONES.....</b>	<b>227</b>



## ÍNDICE DE FIGURAS

---

<b>Figura 1.1.</b> Vías de síntesis de hormonas esteroideas en las gónadas.....	11
<b>Figura 1.2.</b> Organización del gen <i>CYP19</i> humano.....	13
<b>Figura 1.3.</b> Mecanismo de acción de la aromatasa.....	15
<b>Figura 3.1.</b> Representación esquemática del dispositivo utilizado en cocultivos celulares.....	69
<b>Figura 3.2.</b> Etapas del método de extracción de RNA.....	72
<b>Figura 3.3.</b> Esquema del Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas.....	80
<b>Figura 4.1.</b> Efecto de la melatonina en la expresión de los promotores pl.3, plI y pl.4 del gen <i>CYP19</i> en células MCF-7.....	96
<b>Figura 4.2.</b> Efecto de la melatonina sobre la actividad ciclooxigenasa en células MCF-7.....	97
<b>Figura 4.3.</b> Efecto de la melatonina en la expresión génica de COX-1 y COX-2 en células MCF-7.....	98
<b>Figura 4.4.</b> Efecto de la melatonina sobre la expresión del gen <i>CYP19</i> inducida por PGE <sub>2</sub> en células MCF-7.....	99
<b>Figura 4.5.</b> Efecto de la melatonina sobre la concentración de AMPc intracelular y correlación con la expresión del gen <i>CYP19</i> en células MCF-7....	101
<b>Figura 4.6.</b> Efecto de la melatonina en la acumulación intracitoplasmática de triglicéridos en células 3T3-L1.....	111
<b>Figura 4.7.</b> Efecto de la melatonina sobre la actividad aromatasa en células 3T3-L1.....	113
<b>Figura 4.8.</b> Efecto de la melatonina sobre la expresión del gen <i>CYP19</i> en células 3T3-L1.....	114
<b>Figura 4.9.</b> Efecto de la melatonina sobre la expresión génica de PPAR $\gamma$ y C/EBP $\alpha$ en células 3T3-L1.....	116
<b>Figura 4.10.</b> Efecto de la melatonina sobre la diferenciación de las células 3T3-L1 mediada por PPAR $\gamma$ .....	117
<b>Figura 4.11.</b> Efecto de la melatonina sobre la adipogénesis en cocultivos de células 3T3-L1 y MCF-7 .....	124

<b>Figura 4.12.</b> Efecto de la melatonina sobre la actividad aromatasa en cocultivos de células 3T3-L1 y MCF-7.....	125
<b>Figura 4.13.</b> Efecto de la presencia de células MCF-7 sobre la proliferación de células 3T3-L1.....	126
<b>Figura 4.14.</b> Efecto de la melatonina sobre la expresión génica de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-11 en células MCF-7.....	128
<b>Figura 4.15.</b> Efecto de la melatonina sobre la expresión génica de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-11 en células 3T3-L1.....	130
<b>Figura 4.16.</b> Medida de los niveles de citoquinas antiadipogénicas en el medio de cocultivos de células 3T3-L1 y MCF-7.....	132
<b>Figura 4.17.</b> Efecto de la melatonina sobre la proliferación de células HUVEC.	140
<b>Figura 4.18.</b> Efecto de la melatonina y el estradiol sobre la proliferación de células HUVEC.....	141
<b>Figura 4.19.</b> Efecto de la melatonina sobre la proliferación de las células HUVEC dependiente de la biotransformación de testosterona en estrógenos...	142
<b>Figura 4.20.</b> Efecto de la melatonina en la actividad aromatasa de células HUVEC.....	143
<b>Figura 4.21.</b> Efecto de la melatonina en la expresión del gen de la aromatasa y su promotor pl.7 en células HUVEC.....	144
<b>Figura 4.22.</b> Efecto de VEGF y melatonina sobre la proliferación de las células HUVEC.....	150
<b>Figura 4.23.</b> Efecto de la melatonina sobre la expresión de VEGF en células MCF-7.....	152
<b>Figura 4.24.</b> Efecto de la melatonina sobre los niveles proteicos de VEGF en el medio de cultivo de células MCF-7.....	153
<b>Figura 4.25.</b> Efecto de la presencia de células MCF-7 sobre la proliferación de las células HUVEC.....	154
<b>Figura 4.26.</b> Efecto de la presencia de células MCF-7 sobre los niveles proteicos de VEGF en cocultivos de células HUVEC y MCF-7.....	155
<b>Figura 4.27.</b> Efectos paracrinicos del VEGF liberado por las células MCF-7 sobre la proliferación de las células HUVEC e influencia de la melatonina.....	156
<b>Figura 4.28.</b> Efecto de la melatonina sobre la capacidad invasiva de las células HUVEC.....	164

<b>Figura 4.29.</b> Efecto de la melatonina sobre la migración de células HUVEC.....	165
<b>Figura 4.30.</b> Efecto de la melatonina sobre la formación de túbulos por parte de las células HUVEC.....	167
<b>Figura 4.31.</b> Efecto de la melatonina en la disgregación de estructuras tubulares formadas por células HUVEC.....	169

## ÍNDICE DE TABLAS

---

<b>Tabla 3.1.</b> Resumen de las líneas celulares utilizadas en este trabajo .....	65
<b>Tabla 3.2.</b> Componentes empleados en la reacción de retrotranscripción .....	73
<b>Tabla 3.3.</b> Oligonucleótidos empleados en los estudios de expresión génica .....	74

## **ABREVIATURAS**

---

---



## ABREVIATURAS

---

A lo largo de todo el texto, mantendremos algunas abreviaturas según su origen en inglés. Consideramos que su uso está tan consolidado que la traducción al español de las siglas dificulta su comprensión.

<b>17<math>\beta</math>-HSD:</b> 17 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa	<b>DMBA:</b> 9,10-dimetyl-1,2-benzantraceno
<b>8-Br-AMPc:</b> 8-bromoadenosín monofosfato cíclico	<b>DMEM:</b> “ <i>Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium</i> ”
<b>AChE:</b> PGE <sub>2</sub> -acetilcolinesterasa	<b>DMSO:</b> Dimetil sulfóxido
<b>Adiol:</b> Androstenediol	<b>DNA:</b> Ácido desoxirribonucléico
<b>AINE:</b> Antiinflamatorio no esteroideo	<b>dNTPs:</b> Desoxinucleótidos trifosfato
<b>AMPc:</b> Adenosín monofosfato cíclico	<b>D.O:</b> Densidad óptica
<b>Ang:</b> Angiopoyetina	<b>E<sub>2</sub>:</b> Estradiol
<b>ATCC:</b> “ <i>American Type Culture Collection</i> ”	<b>EDTA:</b> Ácido etilendiaminotetraacético
<b>BBE:</b> Extracto de cerebro bovino	<b>ELISA:</b> Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
<b>BME:</b> Extracto de membrana basal	<b>ER<math>\alpha</math>:</b> Receptor de estrógenos $\alpha$
<b>Ca<sup>2+</sup>:</b> Calcio	<b>ER<math>\beta</math>:</b> Receptor de estrógenos $\beta$
<b>CaM:</b> Calmodulina	<b>ERE:</b> Elemento de respuesta a estrógenos
<b>cDNA:</b> DNA complementario	<b>EST:</b> Estrógeno sulfotransferasa
<b>C/EBP<math>\alpha</math>:</b> <i>CCAAT enhancer-binding protein <math>\alpha</math></i>	<b>FBS:</b> Suero fetal bovino
<b>CoCl<sub>2</sub>:</b> Cloruro de cobalto	<b>FDA:</b> <i>Food and Drug Administration</i>
<b>COX:</b> Ciclooxygenasa	<b>FGF:</b> Factor de crecimiento de fibroblastos
<b>CREB:</b> “ <i>cAMP response element binding protein</i> ”	<b>FSH:</b> Hormona estimulante del folículo
<b>C<sub>T</sub>:</b> Ciclo umbral	<b>GAPDH:</b> Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
<b>DCC:</b> “ <i>Dextran-coated charcoal</i> ”	
<b>DHEAS:</b> Dehidroepiandrosterona sulfato	

**GnRH:** Hormona liberadora de gonadotropina

**HUVEC:** “*Human Umbilical Vein Endothelial Cells*”

**IBMX:** Isobutilmetilxantina

**ICER:** “*Inducible cAMP early repressor gene*”

**IFN:** Interferón

**IGF:** Factor de crecimiento similar a insulina

**IL-6:** Interleuquina 6

**IL-8:** Interleuquina 8

**IL-11:** Interleuquina 11

**kDa:** KiloDalton

**LH:** Hormona luteinizante

**MAPK:** *Mitogen Activated protein kinase*

**MBV:** Membrana basal venular

**Mel:** Melatonina

**MMP:** Metaloproteasa de la matriz

**MT<sub>1</sub>:** Receptor de melatonina 1

**MT<sub>2</sub>:** Receptor de melatonina 2

**MT<sub>3</sub>:** Receptor de melatonina 3

**MTT:** 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 bromuro difeniltetrazolio

**mRNA:** RNA mensajero

**NADPH:** Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

**NAT:** N-acetil-transferasa

**NO:** Óxido nítrico

**NOS:** Óxido nítrico sintasa

**NSQ:** Núcleo supraquiasmático

**OMS:** Organización Mundial de la Salud

**pl.3:** Promotor I.3 de la aromatasa

**plI:** Promotor II de la aromatasa

**pl.4:** Promotor I.4 de la aromatasa

**pl.7:** Promotor I.7 de la aromatasa

**pb:** Pares de bases

**PBS:** Tampón fosfato salino

**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa

**PDGF:** Factor de crecimiento derivado de plaquetas

**PGE<sub>2</sub>:** Prostaglandina E<sub>2</sub>

**PI3K:** Fosfoinositol 3-kinasa

**PIP<sub>2</sub>:** Fosfatidil inositol bifosfato

**PKA:** Proteína kinasa A

**PKC:** Proteína kinasa C

**PMA:** Forbol 12-miristato 13-acetato

**PPAR $\gamma$ :** *Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$*

**RFU:** Unidades arbitrarias de fluorescencia

**RHT:** Tracto retino-hipotalámico

**RNA:** Ácido ribonucleico

**ROS:** Especies reactivas de oxígeno

**Rp-AMPC:** Adenosín monofosfato cíclico isómero Rp

**rpm:** Revoluciones por minuto

**RT-PCR:** PCR a tiempo real

**s14:** subunidad 14S del RNA ribosomal

**SDS:** Dodecilsulfato sódico

**SEEM:** Modulador selectivo de enzimas estrogénicos

**SERM:** Modulador selectivo del receptor de estrógenos

**sFBS:** suero fetal bovino

**STS:** Esteroide sulfatasa

**SULT:** Sulfotransferasas

**TGF- $\beta$ :** Factor de crecimiento transformante  $\beta$

**TIMP:** Inhibidor tisular de las metaloproteasas  
**TNF $\alpha$ :** Factor de necrosis tumoral  $\alpha$   
**TNFR1:** Receptor del factor de necrosis tumoral  $\alpha$   
**TPA:** Tetradecanoil forbol acetato

**VCBM:** “*Vascular Cell Basal Medium*”  
**VDA:** Agente de disrupción vascular  
**VEGF:** Factor de crecimiento endotelial vascular  
**VEGFR:** Receptor del factor de crecimiento endotelial vascular



## **INTRODUCCIÓN**

---

---



El objetivo del presente trabajo de Tesis Doctoral ha sido profundizar en el conocimiento del papel de la melatonina como inhibidor del desarrollo tumoral en lo que se refiere, fundamentalmente, a las interacciones entre el tejido tumoral y peritumoral mamario. Comenzaremos esta introducción describiendo las características del cáncer de mama haciendo hincapié en aquellos que son hormono-dependientes. A continuación, nos centraremos en las acciones de las hormonas esteroideas, analizando en detalle su síntesis, con especial atención a los enzimas implicados en la vía de síntesis de estrógenos. Posteriormente introduciremos el concepto de reacción desmoplásica, donde abordaremos la composición del tejido peritumoral mamario y analizaremos la relación de comunicación paracrina existente entre los distintos tipos celulares que componen el tumor. A continuación, describiremos las principales características de la vasculatura tumoral, destacando su formación y remodelado, así como las moléculas que intervienen en la angiogénesis tumoral. Finalmente, dedicaremos un apartado a la melatonina, hormona pineal de la que pretendemos demostrar sus propiedades oncostáticas tanto sobre las células tumorales como sobre las células que se encuentran adyacentes al tumor.

## **1.1. EL CÁNCER DE MAMA**

### **1.1.1. Epidemiología y etiología**

El cáncer de mama constituye una importante causa de muerte en las mujeres de países desarrollados (World Cancer Report, 2008). Su incidencia ha ido en aumento en los últimos años, llegando a ser la primera causa de muerte por cáncer en mujeres a nivel mundial (Dumitrescu y Cotarla, 2005). Cada año se diagnostican un millón de nuevos casos de cáncer de mama en todo el mundo y este aumento de la incidencia se debe, en parte, a cambios en el estilo de vida y al aumento de factores de riesgo como obesidad, disminución en el número de hijos o maternidad tardía, terapia hormonal contraceptiva, etc.

Los estudios epidemiológicos muestran que la incidencia de la enfermedad tiende a ser mayor en países desarrollados, registrándose las tasas más elevadas entre la población blanca de EEUU, y las más bajas en países subdesarrollados de Asia y África (Parkin y cols., 1997). En Europa, los países del norte y oeste presentan una mayor incidencia de la enfermedad así como un incremento en la tasa de mortalidad en comparación con el resto de países analizados (Botha y cols., 2003).

La etiología del cáncer de mama es multifactorial, y en su aparición y desarrollo existen algunos parámetros que cabe destacar:

- 1) Edad: la incidencia del cáncer de mama aumenta a lo largo de toda la vida de la mujer, siendo este incremento mayor durante los años fértiles para después estabilizarse a partir de la menopausia, en torno a los 50 años. Cabe destacar que aproximadamente el 78% de las mujeres diagnosticadas con cáncer de mama invasivo están en un rango de edad comprendido entre 40 y 50 años (Ries y cols., 2001).
- 2) Factores genéticos: un 5-10% de los casos tienen origen hereditario. El riesgo de padecer cáncer de mama alcanza un 80-90% en mujeres que presentan una mutación hereditaria en cualquiera de los genes BRCA1 o BRCA2 (Yoshida y Miki, 2004).
- 3) Raza: el riesgo de padecer cáncer de mama es mayor en mujeres de raza blanca en comparación con africanas o asiáticas (Bernstein, 2002). La prognosis de la enfermedad varía también en función de la raza. Así, las mujeres africanas suelen presentar tumores más agresivos y asociados a una mayor mortalidad (Morris y Mitchel, 2008).
- 4) Estilo de vida: dietas ricas en ácidos grasos están asociadas a un mayor riesgo de padecer cáncer mamario (Wu y cols., 1999), como también lo están el consumo de alcohol (Longnecker y cols., 1995) y el tabaquismo

(IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, 2004).

- 5) Talla y peso: la talla de los individuos está directamente relacionada con el riesgo de padecer cáncer de mama, aumentando este riesgo en un 10% por cada 10 cm de altura (Hunter y Willett, 1993). La obesidad constituye igualmente un factor de riesgo, especialmente en mujeres postmenopáusicas (Brown y Simpson, 2012).
- 6) Estatus reproductor: la menarquia temprana se correlaciona con un mayor riesgo de padecer cáncer de mama, de manera que por cada año de retraso en la menarquia, el riesgo de cáncer disminuye un 5%. Del mismo modo, las mujeres que presentan una menopausia tardía ven incrementada la posibilidad de padecer tumores mamarios, aumentando ésta en un 3% por cada año de retraso en la menopausia (Key y cols., 2001). Ambos factores se relacionan con un mayor tiempo de exposición a los estrógenos a lo largo de la vida. El embarazo a edades avanzadas o el número de hijos también inciden en el riesgo de padecer la enfermedad (MacMahon y cols., 1970).
- 7) Terapia hormonal sustitutiva: el uso de terapia hormonal sustitutiva durante la menopausia aumenta la probabilidad de desarrollar tumores mamarios, especialmente durante la administración combinada de estrógenos y progestágenos (Ross y cols., 2000; Schairer y cols., 2000).
- 8) Factores ambientales: recientemente está cobrando gran importancia la consideración de los factores medioambientales a la hora de explicar el gran incremento en la aparición de tumores mamarios en los últimos años. Dentro de los factores susceptibles de actuar como carcinógenos se incluyen agentes físicos (exposición a radiación ionizante o a campos electromagnéticos), químicos (disolventes orgánicos, metales) y otros relacionados con conductas laborales (alteración de los ritmos circadianos). En muchos casos, el efecto de estos factores es demasiado bajo para que se puedan considerar carcinogénicos por sí mismos. Sin embargo, sus

efectos son aditivos y a largo plazo, pueden causar alteraciones hormonales (Davis y cols., 2001; Silva y cols., 2002; Rajapakse y cols., 2002; Tinwell y Ashby, 2004.).

Al analizar en profundidad los factores de riesgo, hay un dato común a prácticamente todos ellos: la mayor exposición a estrógenos naturales o sintéticos a lo largo de la vida conlleva un mayor riesgo de aparición de tumores mamarios. La correlación entre la función ovárica y el cáncer de mama fue descrita por primera vez en 1896 por Beatson, quien observó que la ovariectomía bilateral inhibía el crecimiento de los tumores de mama en mujeres. Desde entonces, han surgido un gran número de estudios clínicos y experimentales que relacionan la exposición sostenida y acumulativa de estrógenos a lo largo de la vida con un mayor riesgo de desarrollar cáncer de mama (Howell y cols., 1997; Thomas y cols., 1997; Russo y Russo, 1998). En este sentido, es importante considerar que dos tercios de los tumores de mama se detectan en mujeres postmenopáusicas, en las que los ovarios han dejado de ser funcionales y cuyos niveles de estrógenos circulantes son mínimos. En la menopausia, tras el cese de la función folicular, y excepto una pequeña contribución ovárica, la totalidad de los estrógenos se sintetizan, tras la menopausia, en los tejidos periféricos a partir de los andrógenos de origen fundamentalmente suprarrenal (Yue y cols., 1998). Esto explica los elevados niveles de estrógenos presentes en la mama tumoral con respecto a la mama normal o a la concentración de estrógenos plasmática (Landeghem y cols., 1985).

### **1.1.2. Papel de los estrógenos en el cáncer de mama**

El cáncer de mama es un ejemplo de enfermedad hormono-dependiente. Más del 95% de los casos diagnosticados son inicialmente estrógeno-dependientes, tanto en mujeres pre- como postmenopáusicas. La génesis y progresión de la enfermedad dependen en gran medida de la acción de los estrógenos, que actúan a través de la unión a su receptor específico, presente en dos variantes diferentes (ER $\alpha$  y ER $\beta$ ), regulando la transcripción génica. Durante la pubertad y a lo largo de la madurez sexual, el desarrollo de la mama está estimulado por el 17 $\beta$ -estradiol,

que es el principal esteroide ovárico y la hormona más activa que actúa sobre el tejido mamario. Sin embargo, a pesar de su papel fundamental para el desarrollo mamario, los estrógenos, y especialmente el  $17\beta$ -estradiol son también considerados como agentes carcinógenos (Germain, 2011).

Numerosos estudios clínicos y epidemiológicos muestran una asociación entre la exposición a los estrógenos y un mayor riesgo de desarrollar tumores mamarios (Li y cols., 1983; Yager, 2000). Estudios recientes han demostrado la naturaleza carcinogénica de los estrógenos sobre la mama humana mediante un sistema experimental en el cual tanto el  $17\beta$ -estradiol como algunos de sus metabolitos fueron capaces de inducir la transformación neoplásica en células epiteliales mamarias humanas *in vitro*, a un nivel similar al alcanzado por otros carcinógenos reconocidos (Russo y cols., 2006). Sin embargo, los mecanismos implicados en los efectos carcinogénicos de los estrógenos aún no han sido completamente esclarecidos. Algunas de las hipótesis que se han postulado hasta el momento son las siguientes:

- 1) Efectos mediados por la unión al receptor de estrógenos: la interacción de los estrógenos con su receptor específico provoca la activación del mismo, dando lugar a una cascada de señalización que en último término estimulará la expresión de genes implicados en la supervivencia y la proliferación celular. Este incremento en la tasa de proliferación celular, favorece la aparición de errores en la replicación del DNA, generándose por tanto mutaciones puntuales.
- 2) Efectos genotóxicos: los estrógenos pueden metabolizarse generando derivados de quinonas. Estos compuestos presentan gran afinidad por las bases de adenina y guanina del DNA, pudiendo unirse a ellas desestabilizando su enlace glicosídico y provocando su eliminación por la maquinaria de corrección de errores del DNA, en el proceso de despurinización. Estas modificaciones son potencialmente capaces de generar una mutación puntual, lo que podría dar lugar a una transformación neoplásica. (Bocchinfuso y cols., 1999; Yue y cols., 2003).

Esta hipótesis se apoya además en la evidencia experimental de ratones *knockout* para el receptor de estrógenos que son capaces de desarrollar tumores cuando son tratados con estradiol (Bocchinfuso y Korach, 1997).

- 3) Inducción de aneuploidía: la aneuploidía, o segregación anormal de cromosomas durante la mitosis o la meiosis, dando lugar a células hijas con un número aberrante de cromosomas, es un evento que está presente en el 65 al 90% de los procesos tumorales en sus inicios (Arnerlov y cols., 2001). El estradiol parece estar implicado en los patrones de aneuploidía que aparecen en los primeros estadíos de las lesiones tumorales mamarias (Quick y cols., 2007).

Todas estas hipótesis reflejan la posibilidad de que el  $17\beta$ -estradiol pueda actuar como un carcinógeno sin necesidad de actuar a través del ER $\alpha$ . Sin embargo, no se puede descartar la posibilidad de que otros receptores, como el ER $\beta$  o bien otros mecanismos, entre los que se incluyen algunas isoformas del ER $\alpha$  (García-Pedrero y cols., 2003), puedan estar implicados en la transformación de células epiteliales mamarias humanas en células tumorales.

### **1.1.3. Terapia antiestrogénica en los tumores mamarios hormono-dependientes**

Debido al papel de los estrógenos como carcinógenos mamarios, uno de los principales objetivos de la terapia antineoplásica consiste en contrarrestar los efectos perjudiciales de los estrógenos sobre la glándula mamaria. La ovariectomía fue el primer “tratamiento” antiestrogénico conocido, y desde entonces, el abordaje de la enfermedad ha evolucionado hasta incluir tratamientos localizados en la región mamaria basados en cirugía y radioterapia, así como tratamientos centrados en la hormonoterapia y la administración de fármacos.

Dentro de las estrategias farmacológicas empleadas para contrarrestar de forma selectiva los efectos de los estrógenos sobre la mama se encuentran:

- a) Fármacos capaces de modular la actividad del receptor de estrógenos (*Selective Estrogen Receptor Modulators*, SERM). Dentro de este grupo, los ejemplos más representativos son el tamoxifeno y sus derivados, que se comportan como agonistas parciales o antagonistas de los estrógenos.
  
- b) Fármacos que interfieren en la síntesis de hormonas esteroideas inhibiendo los enzimas implicados en la interconversión de precursores androgénicos (*Selective Estrogen Enzime Modulators*, SEEM). Este grupo lo componen tanto compuestos de origen esteroideo (Formestrano o Exemestrano) como no esteroideos (Anastrozol, Letrozol). Este tipo de fármacos, no sólo previenen los efectos directos derivados de la unión de estrógenos a sus receptores, sino que también bloquean las posibles acciones mutagénicas generadas por los esteroides o sus metabolitos (Preston-Martin y cols., 1990; Yue y cols., 2003).

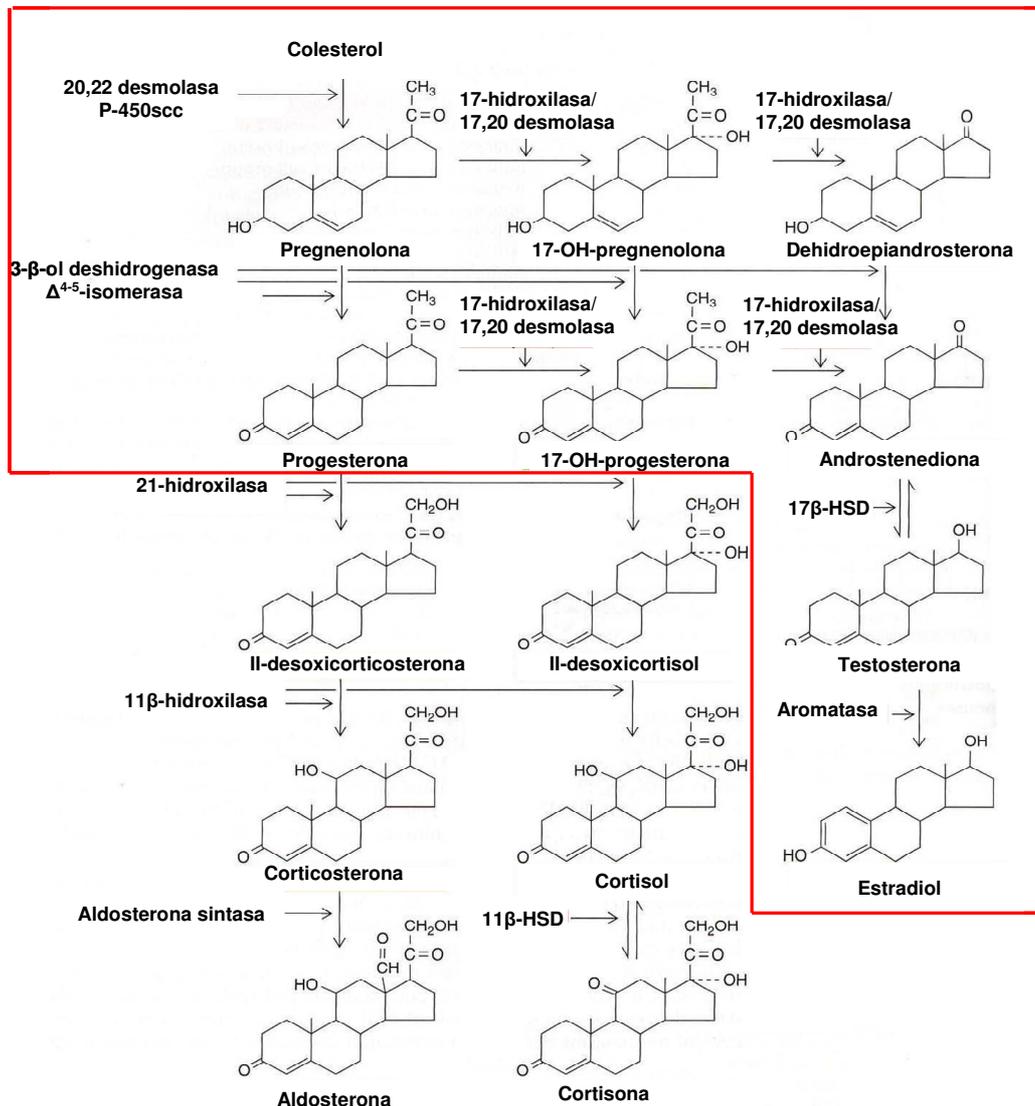
## 1.2. MECANISMOS DE SÍNTESIS DE HORMONAS ESTEROIDEAS

### 1.2.1. Las hormonas esteroideas

Las hormonas esteroideas son un conjunto de sustancias químicas derivadas del colesterol. A este grupo pertenecen las hormonas sexuales, que se clasifican en tres grandes categorías en función de la naturaleza de sus acciones: estrógenos, progestágenos y andrógenos. La vía de síntesis de esteroides sexuales implica la acción de varios enzimas, entre los cuales cabe destacar a la aromatasa, que es el principal responsable de la conversión de andrógenos (testosterona y androstenediona fundamentalmente) en estrógenos (estradiol y estrona, respectivamente). Los estrógenos más importantes sintetizados por el organismo humano, clasificados de mayor a menor actividad son: el  $17\beta$ -estradiol ( $E_2$ ), la estrona ( $E_1$ ) y el estriol ( $E_3$ ) (Jordan y cols., 1985). Todos ellos tienen 18 carbonos y comparten una estructura común formada por 4 anillos de carbono unidos entre sí para formar la unidad del ciclopentanoperhidrofenantreno. Debido a su naturaleza esteroidea y a su elevada solubilidad lipídica, son capaces de difundir con facilidad a través de las membranas celulares, para unirse, una vez en el interior de la célula, a su proteína receptora específica, el receptor de estrógenos (ER).

### 1.2.2. Síntesis de estradiol

El primer paso en la síntesis de estradiol es la transformación del colesterol en pregnenolona. La 20-22 desmolasa cataliza la hidrólisis de la cadena lateral del colesterol, siendo éste el paso limitante tanto en la síntesis de estrógenos como de andrógenos y progesterona. La síntesis de estradiol en las células de la granulosa del folículo ovárico requiere cinco oxidaciones hasta la síntesis del andrógeno testosterona. La  $17\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa cataliza la oxidación del carbono 19 de la dehidroepiandrosterona generando androstenediona. A su vez, este compuesto será oxidado a testosterona, sustrato de la aromatasa P450, que es el enzima que completa la síntesis de estradiol con la aromatización del anillo A de la testosterona y la reducción del grupo 3-ceto a hidroxilo (**figura 1.1**).



**Figura 1.1.** Resumen de las vías de síntesis de hormonas esteroideas en las gónadas, con la indicación de los enzimas implicados en cada caso. La ruta señalada en rojo corresponde a la vía de síntesis del estradiol.

### 1.2.3. Enzimas implicados en la síntesis de estradiol

#### 1.2.3.1. El complejo enzimático P450 aromatasa

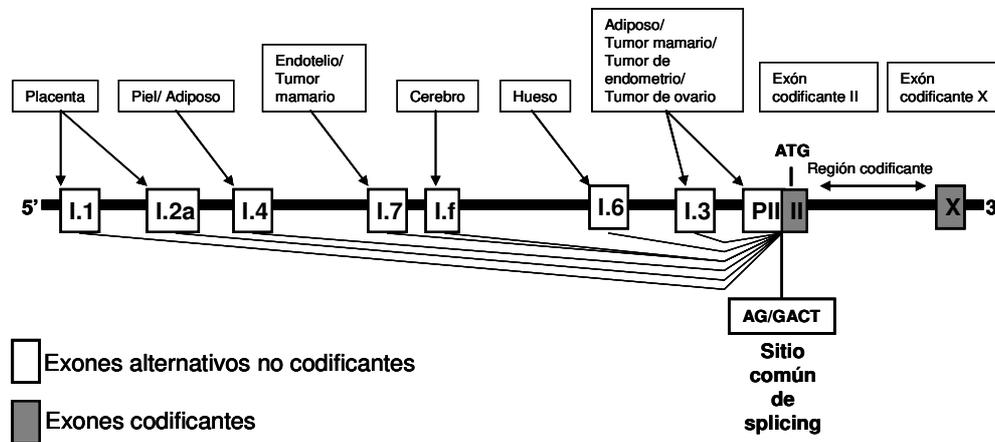
El enzima clave en la biosíntesis de estrógenos forma parte de la superfamilia de citocromos P450 y se denomina P450 aromatasa. Es un complejo enzimático localizado en el retículo endoplásmico de las células productoras de

estrógenos y está compuesto por dos polipéptidos: una aromatasa citocromo P450 (P450arom) que se une al sustrato, y una flavoproteína, la adenina dinucleótido fosfato (NADPH)-citocromo-P450 reductasa, que se expresa de forma ubicua en el organismo. El citocromo P450 aromatasa está altamente conservado en todos los vertebrados, especialmente en los mamíferos. Debido a su escasa homología con otros miembros de la familia de los citocromos P450, la aromatasa se ha clasificado dentro de una familia de genes diferente. El gen que codifica para esta proteína es el *CYP19*, localizado en el brazo corto del cromosoma 15 (15q21.2). La aromatasa humana consta de 503 aminoácidos y tiene un peso molecular de aproximadamente 58000 daltons (Kagawa y cols., 2004).

- Organización génomica de la aromatasa

Se estima que el gen completo de la aromatasa humana tiene un tamaño superior a 120 kb (Simpson y cols., 1994), siendo el mayor de toda la familia de los citocromos P450. A pesar de las dificultades iniciales que presentó su caracterización debido a su complejidad, hoy en día se conoce la organización precisa del gen *CYP19* humano (Bulun y cols., 2003). Según la localización de las regiones 5' y 3', se sabe que la dirección de transcripción va desde el telómero al centrómero del cromosoma 15 humano. Únicamente la región 3', con un tamaño de 30 kb codifica para el enzima aromatasa, mientras que el resto del gen está constituido por regiones reguladoras de la transcripción, lo que le otorga una elevada especificidad de tejido (**figura 1.2**). El exón codificador II contiene el sitio ATG de inicio de la transcripción. En posición 5' con respecto al sitio de inicio de la transcripción, se encuentra una región que contiene varios promotores específicos de tejido seguidos de sus respectivos exones.

## GEN DE LA AROMATASA (*CYP19*)



**Figura 1.2.** Organización del gen *CYP19* humano. (Modificado de Bulun y cols., 2007).

Los promotores específicos, enumerados según la distancia al sitio de inicio de la transcripción por orden creciente son:

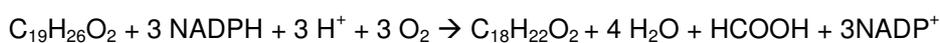
- **pl.ii**: es el más proximal a la región codificadora y es específico de ovario, se encuentra sobreexpresado en tumores mamarios.
- **pl.iii**: se expresa en el tejido adiposo y en tumores mamarios.
- **pl.vi**: específico de tejido óseo.
- **pl.f**: se expresa en cerebro.
- **pl.vii**: específico de tejido endotelial, está sobreexpresado en tumores mamarios.
- **pl.iv**: expresado en la piel y el tejido adiposo, es el responsable de la expresión de aromatasa en el tejido mamario sano.

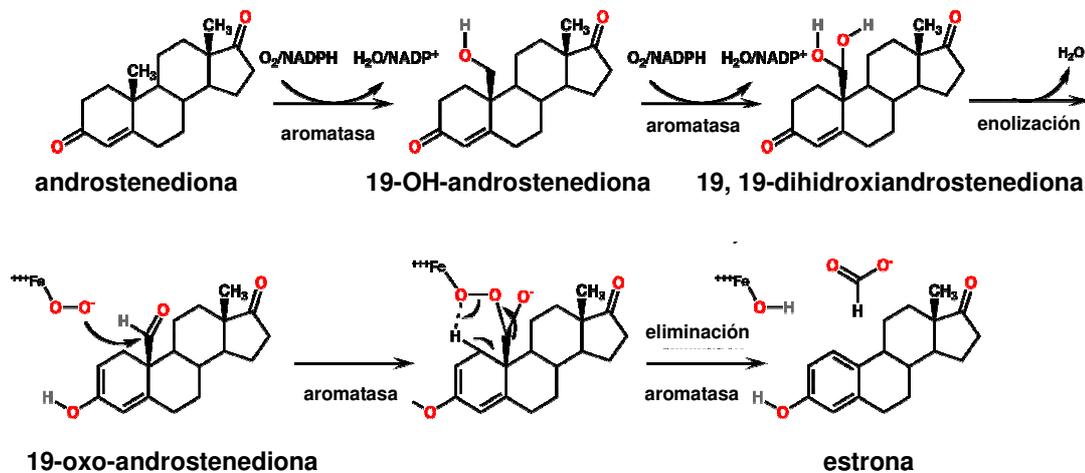
- **p2a y pl.1:** ambos son específicos de la placenta. La actividad del pl.1 es responsable de prácticamente la totalidad de los estrógenos circulantes en mujeres embarazadas.

Debido a la existencia de estos promotores alternativos, los transcritos de aromatasa procedentes de distintos tejidos contienen una región 5' específica que se ensambla mediante procesamiento alternativo al exón codificante II en un sitio común de unión que se encuentra 38 pb en posición 5' con respecto al codón ATG de inicio de la transcripción (Chen y cols., 2009). Como resultado, todos los mRNAs de aromatasa generados a partir de distintos promotores dan lugar, mediante el proceso de traducción, a una misma proteína.

- Mecanismo de acción de la aromatasa

Los dos componentes del complejo aromatasa, P450arom y reductasa, se encuentran anclados a la membrana del retículo endoplasmático liso. Este complejo enzimático cataliza tres hidroxilaciones independientes que conducen a la conversión de androstenediona en estrona o de testosterona en estradiol (**figura 1.3**). Las dos primeras dan lugar a la formación de las estructuras 19-hidroxi-androstenediona y 19-oxo-androstenediona, y consumen dos moléculas de NADPH, liberando a su vez dos moléculas de agua. En un tercer paso de hidroxilación, que aún hoy no ha sido completamente caracterizado, una actividad desmolasa culminaría la aromatización del anillo A aromático, catalizando la hidrólisis del grupo metilo en posición 19 con desprendimiento de ácido fórmico y consumiendo además una molécula de NADPH (Conley y Walters, 1999). Para la síntesis de un mol de estrógeno a partir de andrógeno, es necesaria la transferencia de tres pares de electrones, consumiendo tres moles de oxígeno y tres de NADPH según la siguiente ecuación estequiométrica:





**Figura 1.3.** Mecanismo de acción de la aromatasa. El compuesto cuyo nombre no está indicado corresponde a un compuesto intermediario de la reacción. La androstenediona, con aporte de oxígeno y donadores de electrones (NADPH), se transforma en estrona, ácido fórmico y agua.

- Distribución de la aromatasa

El ovario, y en particular las células de la granulosa ovárica, constituyen el tejido más rico en aromatasa en la mujer premenopáusica. La hormona luteinizante (LH) controla la producción de andrógenos en las células del compartimento de la teca en el folículo, mientras que la hormona estimulante del folículo (FSH) regula la expresión de la aromatasa en el compartimento de la granulosa. LH y FSH actúan sincrónicamente, de manera que las células de la teca producen los andrógenos que serán sustrato de la aromatasa mientras que en la granulosa se produce este enzima encargado de convertir los andrógenos en estrógenos. En los días que preceden a la ovulación, la actividad conjunta de ambos tipos celulares producen un incremento de hasta 10 veces en la cantidad de estrógenos circulantes (Stocco, 2012).

En la mujer postmenopáusica, el ovario deja de responder al estímulo de la FSH por lo que se reduce drásticamente la producción de aromatasa en este tejido. El mayor aporte de estrógenos en mujeres postmenopásicas procede de la síntesis en los tejidos periféricos, particularmente en el tejido

adiposo y el músculo. La expresión de aromatasa tiene una amplia distribución en los tejidos extraováricos, entre los que se incluyen la placenta, el hipotálamo, el hígado, el músculo, el tejido adiposo y el mamario.

- Regulación de la actividad aromatasa

La regulación de la expresión génica de la aromatasa se consigue gracias a la organización estructural del gen basada en la actividad de distintos promotores. En cuanto a la regulación de la actividad enzimática, ésta se encuentra sujeta al control mediado por distintas hormonas y factores de crecimiento. En concreto, la FSH estimula la actividad aromatasa en células de la granulosa del ovario. Además, aumenta la síntesis del enzima en estas células, en un mecanismo mediado por AMPc (Steinkampf y cols., 1987). Algunos glucocorticoides como el cortisol o la dexametasona también ejercen una regulación positiva sobre la actividad aromatasa en adipocitos humanos, siendo esta estimulación mayor en el tejido adiposo de mujeres postmenopáusicas que en las premenopáusicas (McTernan y cols., 2002). Tanto la insulina como el factor de crecimiento IGF-I (*insulin-like growth factor I*) parecen tener un papel regulador sobre este enzima incrementando su actividad (Willis y cols., 1997). Se han descrito además, acciones reguladoras de la actividad aromatasa en el tejido adiposo de la mama peritumoral por parte de otros factores de crecimiento, como son el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), la interleuquina 6 (IL-6) y la prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) (Singh y cols., 1999).

La aromatasa presenta, a su vez, una regulación mediada por su sustrato específico, de manera que tanto la testosterona como la 5 $\alpha$ -dehidrotestosterona son capaces de promover la actividad enzimática, tal y como se ha descrito a partir de experimentos realizados en tejido cerebral de primates (Roselli y Resko, 2001). Del mismo modo, se ha demostrado en microsomas de placenta humana, que los estrógenos son capaces de unirse al complejo P450 aromatasa e inhibir el proceso de aromatización de

andrógenos mediante un mecanismo de inhibición por producto (Shimizu y cols., 1993). También se ha sugerido que los estrógenos podrían controlar directamente la expresión de la aromatasa en el cerebro de peces teleósteos a través de elementos de respuesta a estrógenos (ERE) encontrados en un promotor del gen CYP19b expresado en cerebro (Tchoudakova, 2001).

- Aromatasa y cáncer de mama:

Existen dos fuentes principales de estrógenos en las mujeres postmenopáusicas. Por un lado, los estrógenos pueden proceder de la actividad aromatasa en tejidos extraováricos como el tejido adiposo subcutáneo o la piel, llegando hasta la mama tumoral de manera endocrina. Y por otro lado, es el propio tejido mamario el encargado de aumentar la concentración local de estrógenos mediante la sobreexpresión del gen de la aromatasa. Ambos mecanismos han sido apoyados por evidencias experimentales. Chetrite y colaboradores, demostraron, en el año 2000, que tanto la concentración local de estrógenos como la actividad aromatasa era superior en el tejido tumoral mamario que en la mama sana.

Otros grupos de investigación han apoyado esta evidencia al demostrar que los niveles de actividad enzimática así como los niveles de mRNA indicativos de la expresión del gen de la aromatasa alcanzan niveles superiores en el tejido adiposo de mama adyacente al tumor en comparación con la grasa distal o el tejido adiposo de la mama sana (Bulun y cols., 2012). Incluso existe un modelo *in vivo* de ratón transgénico a partir del cual se demostró que la sobreexpresión de la aromatasa en el tejido mamario era suficiente para mantener una hiperplasia en ausencia de estrógenos circulantes (Tekmal y cols., 1999). La sobreexpresión de este enzima en carcinomas mamarios es un hecho de gran relevancia en el transcurso de la enfermedad, que se pone de manifiesto al demostrarse la eficacia terapéutica alcanzada mediante el uso de fármacos inhibidores de la aromatasa.

### 1.2.3.2. Esteroidesulfatasa

La esteroide sulfatasa (STS) es uno de los 12 miembros de la superfamilia de las sulfatasas en mamíferos, cuyo gen se localiza en el brazo corto del cromosoma X. Este gen tiene un tamaño de 146 kb y está formado por 10 exones y varios intrones, cuya expresión está regulada en distintos tejidos por la presencia de 6 promotores, dando lugar a una variedad de moléculas de mRNA que generan, mediante *splicing* alternativo, variantes con un mismo exón codificante inicial (Dalla-Valle y cols., 2007). La proteína generada consta de 583 aminoácidos. La STS es el enzima encargado de hidrolizar el grupo sulfato presente en algunos tipos de esteroides sulfatados inactivos, como estrona sulfato, estradiol sulfato, dehidroepiandrosterona sulfato y colesterol sulfato, para convertirlos en esteroides activos. A pesar de que los esteroides sulfatados son biológicamente inactivos debido a su naturaleza hidrofílica y a su incapacidad para unirse al ER, su vida media es larga, y este hecho, sumado a las elevadas concentraciones circulantes de estas hormonas, hace suponer que constituyen un reservorio de esteroides que serán sustrato de la STS para formar esteroides biológicamente activos (Purohit y cols., 2011).

Además de participar en la síntesis de estrona y estradiol, la vía de la STS es también responsable de la formación de androstenediol (Adiol), que es un esteroide con propiedades estrogénicas. La dehidroepiandrosterona sulfato (DHEAS), secretada por el córtex adrenal, se convierte en dehidroepiandrosterona (DHEA) por acción de la STS, para ser, a continuación, reducida a Adiol por acción de la 17 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa. A pesar de ser un andrógeno, el Adiol tiene capacidad para unirse al ER, aunque con una afinidad menor que el sustrato natural de este receptor. Las elevadas concentraciones circulantes de Adiol junto con su capacidad estrógena han llevado a comparar sus propiedades estrogénicas con las del propio estradiol (Spinola y cols., 1986).

Se ha descrito que algunas citoquinas, especialmente TNF $\alpha$  e IL-6 son capaces de estimular la actividad STS en células de tumor mamario *in vitro*,

aunque este efecto parece estar debido a un mecanismo postraduccional en lugar de afectar directamente a la transcripción génica o a la estabilidad del mRNA (Newman y cols., 2000). Así mismo, la presencia de EREs en las regiones promotoras del gen de la STS permite al estradiol ejercer un papel regulador en la expresión de este gen.

La actividad sulfatasa está presente en una gran cantidad de carcinomas mamarios, en una proporción incluso mayor que la propia actividad aromatasa, lo que se ha correlacionado con un aumento en el tamaño tumoral y un mayor riesgo de recurrencia. Su expresión a nivel de mRNA se ha detectado en tejidos tumorales mamarios en una proporción mayor que en el tejido mamario sano, asociándose por tanto a un peor pronóstico clínico de la enfermedad. Reed y cols., propusieron, en el año 2005, que a la hora de valorar las diferentes rutas de biosíntesis de estrógenos intratumorales, la ruta de la sulfatasa debía cobrar una importancia mayor y equiparable a la de la aromatasa, debido a su valor pronóstico de la enfermedad.

### **1.2.3.3. 17 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa**

Las 17 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasas (17 $\beta$ -HSD) son un grupo de alcohol oxidorreductasas capaces de realizar la interconversión de esteroides sexuales biológicamente activos e inactivos. La eliminación del hidrógeno en posición 17 del anillo esteroideo en una reacción oxidativa por parte de la 17 $\beta$ -HSD inactiva a los esteroides, mientras que la hidrogenación en esa misma posición consigue la activación de los andrógenos y estrógenos, en una reacción en la que los nucleótidos de nicotinamida (NADH, NADPH) actúan como donantes o aceptores de electrones. La actividad 17 $\beta$ -HSD oxidativa actúa preferentemente en el tejido mamario normal, mientras que la actividad reductora es la dominante en tumores mamarios.

Hasta el momento se han identificado 14 isoformas de la 17 $\beta$ -HSD en mamíferos y 12 subtipos en humanos, siendo las más conocidas las isoformas 1 y 2 (Lukacik y cols., 2006). Todas ellas difieren en su distribución tisular, localización subcelular y preferencia catalítica, gracias a la cual unos enzimas realizan reacciones de oxidación mientras que otras isoformas llevan a cabo procesos reductores. La 17 $\beta$ -HSD tipo 1 cataliza la conversión de la estrona, que es un estrógeno débil en un estrógeno más potente como es el estradiol; mientras que la 17 $\beta$ -HSD tipo 2 realiza la reacción opuesta.

La expresión de la 17 $\beta$ -HSD tipo 1 se ha detectado en varias líneas celulares derivadas de carcinoma mamario humano así como en más del 50% de las células de tumores mamaros procedentes de pacientes (Sasano y cols., 1996), lo que ha hecho que este enzima sea considerado un marcador pronóstico en tumores mamaros hormono-dependientes (Gunnarsson y cols., 2008). La actividad reductora de la 17 $\beta$ -HSD tipo 1 se ve incrementada en presencia de algunos factores de crecimiento como IGF-I, IGF-II, IL-6 y TNF $\alpha$ .

La 17 $\beta$ -HSD tipo 2 es el enzima que cataliza el paso limitante en la inactivación del estradiol, en una reacción opuesta a la realizada por la 17 $\beta$ -HSD tipo 1. Es el subtipo predominante en el epitelio de la mama sana, donde se encuentra en una concentración 50 veces superior al subtipo 1 (Miettinen y cols., 1999). Sin embargo, en pacientes con carcinoma mamario se detectan frecuentemente unos niveles de expresión de 17 $\beta$ -HSD tipo 2 apenas apreciables. La baja expresión de 17 $\beta$ -HSD tipo 2 combinada con una sobreexpresión de 17 $\beta$ -HSD tipo 1 se asocia con una menor supervivencia en pacientes con cáncer de mama (Gunnarsson y cols., 2005).

En cuanto al resto de las isoformas, las 17 $\beta$ -HSD tipos 7 y 12 tienen en común su actividad reductora catalizando ambas la conversión de estrona en estradiol. La presencia de estas isoformas se ha detectado en varios tejidos humanos, especialmente en tumores mamaros hormono-dependientes. Así mismo, la expresión de estas isoformas se correlaciona con la presencia del receptor de estrógenos  $\beta$  (ER $\beta$ ), de manera que se postula que la acción

combinada de aromatasa y 17 $\beta$ -HSD tipos 7 y 12 contribuyen a la producción local de estrógenos en carcinomas mamarios, estimulando la proliferación del epitelio vía ER $\beta$  (Song y cols., 2006; Luu-The y cols., 2006).

Por su parte, la 17 $\beta$ -HSD tipo 14 se encarga de catalizar la transformación del estradiol en estrona. Esta actividad se detecta en carcinomas mamarios humanos y su expresión está asociada a una mayor supervivencia y menor recurrencia de la enfermedad. Sin embargo, su contribución a la inactivación del estradiol se considera notablemente menor a la de la isoforma 17 $\beta$ -HSD tipo 2 (Nagasaki y cols., 2009). La función fisiológica de algunas de las demás isoformas aún resulta desconocida.

#### **1.2.3.4. Estrógeno sulfotransferasa**

Las sulfotransferasas citosólicas (SULTs) catalizan la transferencia de un grupo sulfuro a un sustrato aceptor. En humanos existen 3 familias de sulfotransferasas, SULT1, SULT2 y SULT4, que incluyen varias subfamilias. Dentro de la familia SULT1 se encuentra la SULT1E1, encargada de sulfatar estrógenos y también conocida como estrógeno sulfotransferasa (EST).

El gen de la EST se localiza en el cromosoma 4q13.2 y codifica para una proteína de 294 aminoácidos. El enzima funcional es un homodímero de 35 kDa que une dos moléculas de estradiol en cada subunidad. Su expresión se ha detectado en varios tejidos humanos y se cree que este enzima está implicado en la protección de los tejidos periféricos frente a concentraciones de estrógenos elevadas (Suzuki y cols., 2011).

La acción de la EST tiene gran relevancia, pues no sólo cataliza la inactivación de los estrógenos sino que estos conjugados esteroideos constituyen un reservorio local de la hormona tras la hidrólisis del grupo sulfato mediante la acción de la STS (Pasqualini, 2009). Los estrógenos sulfatados son inactivos, pues presentan cargas negativas que les impiden atravesar la

membrana celular, requiriendo la acción de transportadores específicos para su importación. Además, son incapaces de unirse al receptor de estrógenos por lo que carecen de actividad genómica. La expresión de EST está regulada por progesterona a lo largo del ciclo menstrual y durante las primeras fases del embarazo.

#### **1.2.4. Los enzimas implicados en la síntesis de estrógenos como dianas terapéuticas en el cáncer de mama estrógeno-dependiente**

A día de hoy, los fármacos inhibidores de la aromatasas constituyen el tratamiento endocrino más efectivo contra el cáncer de mama estrógeno-dependiente (Santen, 2002). La estrategia terapéutica basada en la inhibición de la síntesis de estrógenos ha resultado más efectiva que el bloqueo de los efectos estrogénicos en tumores hormono-dependientes.

La búsqueda de inhibidores de la aromatasas comenzó en los años 60 (Santen y cols., 2009), siendo la aminoglutetimida el primer inhibidor no selectivo ensayado con este propósito. Aunque en un principio se planteó su desarrollo como una alternativa a la adrenalectomía, en 1974 la aminoglutetimida fue propuesta por primera vez como un inhibidor no selectivo de la aromatasas. A pesar de sus notables propiedades en el bloqueo de la aromatasas total, sus abundantes efectos secundarios, derivados de su falta de especificidad, impidieron su uso clínico. En aquel momento, el tamoxifeno era el fármaco más utilizado en la terapia contra el cáncer de mama dependiente de estrógenos, y su uso precedió al desarrollo de los inhibidores antiaromatasas de segunda y tercera generación, superando estos últimos en eficacia al tamoxifeno (Bulun y cols., 2007). Los inhibidores actuales, también denominados de nueva generación, se caracterizan por suprimir la producción de estrógenos tanto en los tejidos periféricos como en el propio tejido tumoral, lo que reduce la recurrencia y prolonga la supervivencia ante la enfermedad. El uso de estos inhibidores ha demostrado también su eficacia en el tratamiento de tumores mamarios ER positivos resistentes al tamoxifeno (Goss y cols., 2003). Algunos de estos inhibidores, como letrozol, anastrozol y exemestano

han sido utilizados con éxito consiguiendo buenos resultados en términos de mayor supervivencia y menor recurrencia en mujeres postmenopáusicas, a pesar de que también se han descrito casos de resistencia al fármaco y otros efectos relacionados con la deprivación de estrógenos. En la actualidad, la evolución de los tratamientos antiaromatasa pasa por la búsqueda y desarrollo de nuevos fármacos capaces de inhibir la aromatasa de forma selectiva en el tejido tumoral con el fin de reducir la resistencia y los efectos secundarios asociados a la utilización de estos inhibidores, que incluyen la pérdida de masa ósea y alteraciones en el metabolismo lipídico (Hong y Chen, 2011).

La importancia de la vía de la sulfatasa en su contribución al crecimiento de tumores mamarios hormono-dependientes ha motivado la búsqueda y desarrollo de posibles inhibidores de este enzima a lo largo de más de una década. Hasta la fecha, la mayor eficacia inhibidora de la STS ha sido atribuida a los compuestos aril sulfonatos tanto esteroideos como no esteroideos, siendo el *667 coumate* (Irosustat) el primero en superar ensayos clínicos en fase I (Stanway y cols., 2006). Actualmente se están realizando ensayos consistentes en analizar la eficacia de la administración de inhibidores de la STS en combinación con inhibidores de la aromatasa, que son los más desarrollados en este momento, con el fin de determinar las ventajas de utilizar fármacos combinados en lugar de agentes únicos en la terapia oncológica (Purohit y cols., 2011).

El interés por desarrollar inhibidores de la  $17\beta$ -HSD ha ido en aumento en los últimos años (Brozic y cols., 2008; Day y cols., 2008). Compuestos como los flavonoides (Brozic y cols., 2009) o bien inhibidores sintéticos como el EM-1745 (Hong y cols., 2011) se perfilan como posibles candidatos a ser utilizados en la terapia contra el cáncer de mama dependiente de estrógenos, aunque su estudio aún se encuentra en fases preliminares. La tendencia actual pasa por llegar a realizar, en un futuro, tratamientos personalizados. Para ello, será necesario adquirir métodos nuevos y precisos para evaluar la expresión y actividad de la aromatasa, STS y el resto de enzimas implicados en la síntesis de estrógenos con el fin de modular su función biológica en patologías oncológicas mamarias.

### **1.3. TEJIDO PERITUMORAL MAMARIO: LA REACCIÓN DESMOPLÁSICA**

#### **1.3.1. Concepto de reacción desmoplásica**

La carcinogénesis mamaria se origina a partir de un desajuste en los mecanismos que controlan el crecimiento del tejido. Comienza con una proliferación incontrolada de las células epiteliales a consecuencia de una acumulación de daños en el DNA originada como resultado de la acción de un agente carcinógeno, la mutación de un proto-oncogén o bien por la ausencia o mutación de un gen supresor de tumores. La acumulación de mutaciones generadas a partir de estos factores y la ausencia de mecanismos eficaces de reparación del daño en el DNA producen un crecimiento celular acelerado que puede resultar en un aumento de la proliferación celular local dando lugar a tumores benignos, o bien, en los casos más agresivos, el daño acumulado puede llegar a originar tumores con capacidad de invadir otros tejidos. En el momento en el que se altera la proliferación celular, el microambiente tumoral va adquiriendo una estructura dinámica capaz de adaptarse a las condiciones del tejido. Bajo esta circunstancia, tiene lugar la reacción desmoplásica o desmoplasia, que se refiere al crecimiento de una capa densa de tejido conectivo rodeando el tumor. Este crecimiento se caracteriza por presentar una baja tasa de división celular, pues las células del estroma tienden a aumentar de tamaño en lugar de dividirse, y por un grado bajo de diferenciación así como por la aparición de gran cantidad de fibras extracelulares (colágeno, fibronectina y proteoglicanos, entre otras). La reacción desmoplásica tumoral es muy similar a la reacción fisiológica que tiene lugar cuando se produce un corte o herida, pues en ambos casos se produce un aumento de la matriz extracelular así como un incremento en la síntesis y secreción de factores de crecimiento, que en último término dan lugar al desarrollo del tejido. La matriz extracelular está compuesta por una gran variedad de moléculas cargadas negativamente, lo que permite la unión de multitud de factores de crecimiento y citoquinas secretadas al medio actuando como un reservorio de estas moléculas.

El microambiente del tejido tumoral, a través de contactos célula-célula, la secreción de factores solubles y la composición de la matriz extracelular, ejercen una importante influencia sobre el crecimiento y la progresión del tumor. Es por esto

que los distintos tipos celulares presentes en el estroma del tumor (fibroblastos, células endoteliales y células inflamatorias del sistema inmune) pueden ejercer una notable influencia sobre el comportamiento y el fenotipo de las células epiteliales malignas (Martínez y Cifuentes, 2011), hasta el punto de considerarse la reacción desmoplásica como un indicador pronóstico de la enfermedad a la hora de estimar la supervivencia en los pacientes (Cardone y cols., 1997). Al mismo tiempo, los factores de secreción producidos por las células epiteliales pueden influenciar el estroma circundante para modificarlo de forma que se favorezca la progresión del tumor.

### **1.3.2. Papel del tejido adiposo en la reacción desmoplásica**

Los tipos celulares más abundantes de entre todos los que componen el microambiente del tumor mamario son los componentes del tejido adiposo, formado por los adipocitos maduros y sus células precursoras, los fibroblastos o preadipocitos. El tejido adiposo presenta una importante actividad endocrina, gracias a la secreción de gran cantidad de hormonas, sustancias proinflamatorias, proteínas de la matriz extracelular y otros factores de crecimiento, también conocidos como adipoquinas (Deng y Scherer, 2001). En 2005, Celis y colaboradores identificaron más de 350 proteínas producidas en el tejido mamario de pacientes de cáncer sometidas a mastectomía. La mayoría de estas moléculas estaban relacionadas con procesos biológicos tales como transducción de señales, comunicación celular, metabolismo, respuesta inmune o apoptosis, entre otros. Estas observaciones sugerían la existencia de una comunicación paracrina entre las células tumorales y los adipocitos, secretando cada uno de estos tejidos gran cantidad de factores encaminados a promover el crecimiento y desarrollo del tumor. Estudios posteriores *in vitro* demostraron que los productos secretados por el tejido adiposo tienen efecto sobre la supervivencia y proliferación de las células epiteliales malignas (Iyengar y cols., 2003).

### **1.3.3. Interacción paracrina entre el tejido adiposo y el tejido epitelial tumoral**

Los estrógenos, y especialmente el  $17\beta$ -estradiol juegan un papel esencial en el desarrollo del cáncer de mama hormono-dependiente. La biosíntesis de estrógenos en las mujeres postmenopáusicas ocurre principalmente a través de la conversión de precursores androgénicos en estrógenos y tiene lugar mayoritariamente por la acción de la aromatasa en los tejidos extraováricos. El tejido adiposo juega un papel fundamental en este proceso, lo que se pone de manifiesto al observar que la incidencia de la enfermedad es directamente proporcional a la cantidad de tejido adiposo corporal. La mayor parte de la actividad aromatasa del tejido adiposo tumoral reside principalmente en los fibroblastos indiferenciados mientras que los adipocitos maduros presentan unos niveles menores del enzima (Kovacic y cols., 2004). Lo mismo ocurre con los transcritos de mRNA, que provienen en un 80-90% de los preadipocitos (Price y cols., 1992). La contribución del tejido adiposo a la expresión de la aromatasa y por tanto a la producción de estrógenos en el tejido tumoral se debe a varias razones. En primer lugar, la cantidad de tejido adiposo adyacente al tumor es muy elevada en comparación con el resto de tipos celulares presentes en la zona. Además, los fibroblastos son el tipo celular con mayor expresión de aromatasa en el tumor. Debido a esto, una gran expresión aromatasa está considerada como un marcador indicativo de una pobre diferenciación de los fibroblastos del tejido adiposo. Finalmente, los valores de expresión y actividad aromatasa en los preadipocitos del tejido adiposo adyacente al tumor son entre 10 y 15 veces mayores a los encontrados en las células epiteliales u otros tipos celulares (Bulun y cols., 2007).

Miller y O'Neill, en el año 1987 realizaron un importante avance en el conocimiento de la regulación de la aromatasa en la mama tumoral, pues fueron los primeros en demostrar que el cuadrante de la mama en el que se localiza el tumor presentaba mayores niveles de actividad aromatasa que el resto del tejido. Este hallazgo, que fue confirmado posteriormente a nivel de expresión y actividad del enzima, sugería que el desarrollo del tumor tenía lugar en áreas de elevada actividad aromatasa dentro del tejido mamario, o bien que los propios tumores producían factores capaces de estimular la actividad aromatasa en los tejidos

adyacentes. Estudios posteriores confirmaron esta última hipótesis al identificar la secreción de una serie de moléculas con capacidad para estimular la actividad aromatasa en los tejidos adyacentes al tumor (Purohit y cols., 2002).

En el tejido tumoral, las células epiteliales consiguen aumentar la población de fibroblastos adiposos en sus inmediaciones secretando grandes cantidades de citoquinas, tales como el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), interleuquina 11 (IL-11) y factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), que inhiben la diferenciación de los preadipocitos a adipocitos maduros, siendo este hecho un evento clave en el desarrollo de la reacción desmoplásica. El bloqueo de la diferenciación de los adipocitos está mediado por la inhibición de la expresión de C/EBP $\alpha$  (*CCAAT enhancer-binding protein  $\alpha$* ) y PPAR $\gamma$  (*peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$* ), factores de transcripción esenciales en la adipogénesis (Meng y cols., 2001). Los propios estrógenos también parecen potenciar estas acciones antiadipogénicas a través de varios mecanismos indirectos, que incluyen el aumento de la expresión de IL-11 por parte de las células epiteliales tumorales (Crishton y cols., 1996) así como de la expresión del receptor de TNF $\alpha$  (TNFR1) cuya unión a su ligando es responsable de la inhibición de la adipogénesis en los fibroblastos del tejido adiposo (Deb y cols., 2004). La excesiva producción de aromatasa junto con el consiguiente incremento en la biosíntesis de estrógenos por parte del tejido adiposo, ejerce un efecto de retroalimentación positiva sobre la propia reacción desmoplásica, de manera que los estrógenos inducen el crecimiento de las células epiteliales, que a su vez producen más citoquinas consolidando así la densa capa de fibroblastos que rodea al tumor.

Las células epiteliales tumorales consiguen, a través de mecanismos de comunicación de tipo paracrino y autocrino, incrementar la expresión local de aromatasa y por tanto la producción de estrógenos en el tejido que rodea al tumor, lo cual explica las elevadas concentraciones de estrógenos presentes en la mama tumoral. Este fenómeno tiene lugar gracias a la activación de una serie de promotores del gen de la aromatasa, principalmente en los fibroblastos del tejido adiposo, que se encuentran inactivos en la mama sana así como en las células epiteliales malignas. En el caso de los adipocitos de la mama sana, éstos mantienen

unos niveles reducidos de expresión del gen de la aromatasa, controlada fundamentalmente por el promotor pl.4, mientras que la aportación de los promotores pl.3 y pll a la totalidad de los mRNAs de aromatasa en estas células es muy reducida, debido a la presencia de factores represores de la transcripción en estas regiones. Sin embargo, la transcripción del gen *CYP19* a partir de los promotores pl.3 y pll aumenta drásticamente en los fibroblastos del tejido adiposo de la mama tumoral, así como en el propio tejido epitelial maligno. Además, las células endoteliales próximas al tumor constituyen otro lugar de expresión del gen de la aromatasa a partir de su promotor específico pl.7, que también se encuentra sobreexpresado en las células epiteliales tumorales (Chen y cols., 2009).

El aumento en la actividad de los promotores pl.3 y pll es determinante en la sobreexpresión del gen de la aromatasa que tiene lugar en los fibroblastos del tejido adiposo peritumoral. El mecanismo por el cual se modifica la activación de los distintos promotores no ha sido aún completamente esclarecido. Aún así, se ha observado en experimentos *in vitro* con fibroblastos del tejido adiposo que la falta de suero en el medio de cultivo induce la activación del promotor pl.3 a la vez que se inactiva el pl.4. La PGE<sub>2</sub> estimula la actividad de los promotores pl.3 y pll de la aromatasa a través de vías dependientes de cAMP, PKA y PKC (Zhao y cols., 1996). Otros mecanismos de regulación de la actividad de los promotores pl.3 y pll pasan por la existencia de activadores (LRH-1), silenciadores y represores de la transcripción (el silenciador S1 asociado con represores como EAR-2, COUP-TF1 y RAR $\gamma$ ), corre reguladores como el butirato sódico (NaBu) y regulación epigenética mediante metilación del DNA, si bien la acetilación de histonas parece no tener lugar en este caso (Bulun y cols., 2007).

#### **1.3.4. La matriz extracelular en la reacción desmoplásica**

La composición de la matriz extracelular, organizada alrededor de las células del estroma, es fundamental para el desarrollo del tumor. A pesar de que siempre se la ha considerado una estructura estable con la única finalidad de proporcionar un soporte sobre el que mantener la morfología del tejido, actualmente se reconoce a la

matriz extracelular como una estructura dinámica y versátil que ejerce gran influencia sobre las células de su entorno (Lu y cols., 2012). La matriz extracelular está compuesta por una amplia variedad de moléculas entre las que se incluyen proteínas, glicoproteínas, proteoglicanos y polisacáridos, todas ellas con distintas propiedades físicas y bioquímicas. La combinación de estos compuestos da lugar tanto a la membrana basal, que separa el componente epitelial y endotelial del estroma, como a la matriz intersticial, ocupada principalmente por células del estroma.

A pesar de contar con múltiples mecanismos de control para regular su remodelado, en situaciones patológicas, como es el caso de los procesos tumorales, la matriz extracelular se desorganiza y sus propiedades se modifican debido principalmente a una alteración de la actividad de los principales enzimas de remodelado. La desorganización de la matriz extracelular ocurre con frecuencia en muchos tipos de tumores (Frantz y cols., 2010) y esta alteración de sus propiedades bioquímicas tiene efectos en el comportamiento de las células tumorales, afectando a los patrones de liberación de factores de crecimiento y potenciando los efectos de estos factores.

Además de los cambios en sus propiedades bioquímicas, la arquitectura de la matriz extracelular asociada al tumor presenta características distintas a las del estroma propio del tejido normal. En lugar de organizarse formando fibras sin una orientación definida, el colágeno tipo I se encuentra mayoritariamente en disposición lineal y orientado de forma adyacente al epitelio o bien se proyecta perpendicularmente hacia el tejido, según se ha observado en multitud de tumores mamarios. Como consecuencia de estos cambios, la expresión de varios enzimas de remodelado de la matriz extracelular se encuentra alterada. Heparanasas, catepsinas, uroquinasas y especialmente metaloproteasas de la matriz (MMPs) suelen estar sobreexpresadas en distintos tipos de cáncer (Kessenbrock y cols., 2010).

## **1.4. LA ANGIOGÉNESIS EN EL TEJIDO PERITUMORAL MAMARIO**

### **1.4.1. La angiogénesis fisiológica**

La vasculatura adulta se deriva de una red de vasos sanguíneos creada en el embrión en un proceso en el que los vasos se forman *de novo* a partir de los angioblastos, o precursores endoteliales. En este proceso, denominado vasculogénesis, los angioblastos forman una red vascular primitiva denominada plexo capilar, que servirá como estructura sobre la que se desarrollará posteriormente el resto de la vasculatura. En etapas posteriores del desarrollo, el plexo capilar primario se remodela mediante el crecimiento y la ramificación de nuevos vasos a partir de aquellos ya existentes, en el proceso conocido como angiogénesis (Bergers y Benjamin, 2003).

La mayoría de los procesos de angiogénesis ocurren en el embrión, en el cual se establece la estructura vascular primaria que permitirá vascularizar los órganos que se encuentran en proceso de desarrollo. En el individuo adulto la angiogénesis no patológica ocurre en situaciones puntuales como son el ciclo ovárico, el embarazo y en el proceso fisiológico de reparación y cicatrización de heridas (Klagsbrun y D'Amore, 1991). El proceso angiogénico tiene lugar además mm en determinadas enfermedades entre las que se incluyen la artritis reumatoide, la psoriasis y la tumorigénesis. Los procesos tumorales requieren, frecuentemente, la formación de nuevos vasos sanguíneos en sus proximidades, lo que permite abastecer sus necesidades metabólicas y de eliminación de desechos por parte de las células que componen el tumor. La principal diferencia entre la angiogénesis fisiológica y tumoral está en el hecho de que en el caso de ésta última nunca se alcanza un estado de resolución en cuanto a la formación de los vasos, sino que la demanda de oxígeno y nutrientes aumenta junto con el tamaño del tumor, por lo que la angiogénesis se vuelve un proceso persistente en el tiempo.

### **1.4.2. La angiogénesis tumoral**

La angiogénesis tumoral comparte gran cantidad de procesos con la angiogénesis fisiológica, pues en ambas condiciones existe una amplia variedad de funciones celulares altamente coordinadas que promueven la formación de nuevos vasos sanguíneos en respuesta a un aumento en la demanda de oxígeno y nutrientes, así como en la eliminación de desechos (Chung y Ferrara, 2002). En este estado patológico, los vasos sanguíneos presentes en el tejido crecen y se ramifican en las inmediaciones del tumor con el fin de cubrir estas nuevas necesidades metabólicas, lo que genera además la posibilidad de proporcionar una vía para la diseminación de células tumorales dando lugar a metástasis. Los vasos sanguíneos tumorales, junto con el sistema linfático, constituyen la vía principal a través de la cual las células cancerosas pueden generar metástasis en tejidos alejados del tumor a la vez que permiten la infiltración de células del sistema inmune.

A pesar de que los vasos sanguíneos que se forman en las inmediaciones del tumor son aparentemente similares al resto de los vasos del organismo, su ultraestructura es muy diferente. La mayoría de estos vasos carecen de pericitos funcionales, se encuentran dilatados y tienen una morfología intrincada. Además, son excepcionalmente permeables debido a la presencia de fenestraciones capilares y a la ausencia de una membrana basal completa, lo que facilita la diseminación de células neoplásicas para dar lugar a metástasis. Incluso las paredes del vaso pueden estar formadas por una combinación de células endoteliales y tumorales, lo que refleja la naturaleza patológica de este proceso (Nagy y cols., 2009).

### **1.4.3. Formación y remodelado de los vasos sanguíneos**

En condiciones patológicas, como es el caso del cáncer, los mecanismos de angiogénesis se utilizan con el fin de promover el desarrollo de la enfermedad. La angiogénesis tumoral comienza con la aparición de los llamados vasos iniciadores a partir de las vénulas o, en menor medida, de los capilares ya existentes en el tejido

próximo al tumor. Estos vasos son de gran tamaño y presentan una pared fina y muy permeable.

El primer paso en la formación de los vasos iniciadores consiste en la degradación, mediante una serie de proteasas liberadas por las células tumorales, de la membrana basal venular (MBV), una estructura rígida formada principalmente por colágeno tipo IV, laminina, entactina y heparán sulfato. La degradación de la MBV provoca el desprendimiento de los pericitos que rodean al vaso, lo que permite que el endotelio pueda ensancharse y extenderse sobre la superficie extracelular que ha sido previamente remodelada. La desestabilización del vaso provoca la pérdida de contactos entre las células endoteliales, que comienzan a migrar hacia otros lugares siguiendo una serie de estímulos quimiotácticos.

De manera simultánea, las células del estroma sintetizan una nueva matriz sobre la que descansarán los vasos formados. Esta matriz, sobre la que se vierten algunos factores solubles, promueve la proliferación y la migración de las células endoteliales. Una vez que han proliferado hasta formar una población suficiente, las células endoteliales se organizan formando una monocapa que da lugar a una estructura en forma de túbulo. En ese momento se adhieren los pericitos a la superficie de la microvasculatura a la vez que se degrada el vaso precursor carente de pericitos. Finalmente, se establece un flujo sanguíneo a través del nuevo vaso, que permitirá el aporte de nutrientes al tumor (Dvorak y cols., 2011).

#### **1.4.4. La matriz extracelular en la angiogénesis tumoral**

El papel de la matriz extracelular es fundamental en el desarrollo de la angiogénesis tumoral, pues además de facilitar la migración celular y la ramificación de los vasos, algunos de sus componentes parecen estar implicados en la supervivencia y proliferación endotelial, así como en la morfogénesis y otros aspectos relacionados con la tubulogénesis (Davis y Senger, 2005). La composición y propiedades mecánicas de la matriz extracelular tienen gran importancia en este proceso, lo que se pone de manifiesto al observar que los patrones de ramificación

vasculares varían según la elasticidad de la matriz (Myers y cols., 2011), lo que viene dado por su composición y la actividad de los enzimas de remodelado. La matriz extracelular que forma la membrana basal en el tejido que rodea a los nuevos vasos durante la angiogénesis tiene una porosidad mayor que las membranas basales convencionales (Hashizume y cols., 2000), lo que facilita las metástasis y la infiltración de células del sistema inmune a la vez que promueve el crecimiento del tumor.

Algunos componentes de la matriz extracelular tienen un papel destacado en la angiogénesis tumoral. Tal es el caso de algunas proteínas como endostatina, tumstatina, hexastatina y otros derivados del colágeno IV y XVIII, que ejercen un potente efecto estimulador sobre la angiogénesis tanto por sí mismas como en colaboración con otros factores proangiogénicos. Las metaloproteasas de la matriz (MMPs) secretadas por las células tumorales son las encargadas de la degradación y remodelación de la matriz en la formación de los nuevos vasos y la ramificación de los mismos (Lu y cols., 2012).

#### **1.4.5. Factores solubles**

La angiogénesis es un proceso que presenta una regulación compleja, la cual está mediada por moléculas tanto pro- como antiangiogénicas. En condiciones normales el balance entre unos y otros factores hace que la angiogénesis no tenga lugar. Sin embargo, cuando se produce el crecimiento del tumor, el equilibrio se rompe debido al aumento en la producción de factores proangiogénicos, en lo que se conoce como el *switch* angiogénico.

##### **1.4.5.1. VEGF**

El factor angiogénico más potente y mejor caracterizado es el Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (VEGF). VEGF-A es el miembro con mayor actividad angiogénica de una familia de genes que incluye otros factores, como son VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D y el factor de crecimiento de la placenta (PGF). El

gen VEGF-A está organizado de forma que es capaz de generar 6 isoformas del factor, compuestas por 121, 145, 165, 183, 189 y 206 aminoácidos respectivamente, mediante *splicing* alternativo, siendo la isoforma VEGF<sub>165</sub> la más abundante. A pesar de que todas las isoformas presentan una actividad biológica similar, VEGF<sub>121</sub> y VEGF<sub>165</sub> se secretan al espacio extracelular, mientras que el resto de isoformas permanecen asociadas a la célula o a la matriz extracelular en mayor o menor medida debido a su afinidad por los heparán sulfatos.

El factor VEGF<sub>165</sub> es una glicoproteína homodimérica con un peso molecular de 45 kDa (Conn y cols., 1990). Presenta unos niveles de expresión bajos en una gran variedad de tejidos humanos (Dvorak y cols., 1995) mientras que en la placenta, el tejido fetal y la mayoría de los tumores humanos la expresión de VEGF es muy elevada. La disponibilidad de estos factores también puede verse afectada por procesado proteolítico. Así, el plasminógeno y algunas metaloproteasas de la matriz extracelular actúan sobre VEGF<sub>165</sub> eliminando su extremo C-terminal para dar lugar a fragmentos más difusibles y que presentan una menor capacidad de unirse a las glicoproteínas de la matriz (Lee y cols., 2005).

Muchas líneas celulares tumorales expresan VEGF *in vitro* (Senger y cols., 1986), e incluso se ha demostrado que el gen de VEGF se encuentra sobreexpresado en la mayoría de tumores humanos, entre los que se incluyen pulmón, mama, ovario, riñón y tracto gastrointestinal (Ferrara, 1995). La sobreexpresión de VEGF está estrechamente relacionada con la densidad vascular del tejido tumoral y es indicativa de un peor pronóstico de la enfermedad (Hanahan y cols., 1996; Salven y cols., 1997).

- Receptores del VEGF

El efecto angiogénico del VEGF se basa en su unión a tres tipos de receptores tirosina kinasa: Flt-1 (VEGFR-1), KDR/Flk-1 (VEGFR-2) y Flt-4 (VEGFR-3) (Papetti y Herman, 2002). Todos ellos pertenecen a la familia de

receptores 7-Ig, caracterizados por presentar 7 dominios extracelulares similares a inmunoglobulina, un fragmento insertado en la membrana y un dominio tirosina kinasa altamente conservado. De todos ellos, VEGFR-1 es el receptor con mayor afinidad por VEGF y se expresa en el endotelio del adulto y del embrión así como en el tejido próximo a las heridas en proceso de cicatrización (Peters y cols., 1993). Sin embargo, este receptor no parece estar involucrado en acciones como proliferación, migración o reordenamiento de las fibras del citosqueleto endotelial, sino que es el receptor VEGF-2, con una afinidad mucho menor, el encargado de llevar a cabo tales acciones (Waltenberger y cols., 1994). Este receptor se expresa en los precursores endoteliales y hematopoyéticos así como en las células endoteliales que proliferan en el embrión. El receptor VEGF-3 se expresa principalmente en el endotelio de los vasos linfáticos en el adulto y está implicado en la linfangiogénesis. Se caracteriza porque no une VEGF directamente sino complejos formados por VEGF y otras proteínas similares, como VEGF-C o VEGF-D.

La neuropilina-1 es un receptor de VEGF que no pertenece a la familia de los receptores tirosina kinasa. Además de expresarse en el tejido nervioso, también se encuentra en la superficie de las células endoteliales (Soker y cols., 1998). La neuropilina-1 une VEGF<sub>165</sub> pero no VEGF<sub>121</sub>, y promueve la unión de este complejo al receptor VEGFR-2, potenciando así sus efectos angiogénicos.

- Acciones del VEGF

Una de las acciones más importantes de VEGF consiste en promover el aumento de la permeabilidad vascular, lo que consigue mediante la activación de las vacuolas, orgánulos que facilitan el transporte de metabolitos entre compartimentos celulares (Kohn y cols., 1992). De forma paralela, también incrementa la permeabilidad vascular alterando las uniones adherentes de las

células endoteliales dispuestas en la monocapa mediante la reorganización de complejos cadherina-catenina (Esser y cols., 1998).

Numerosos estudios han demostrado la capacidad del VEGF para estimular la proliferación de las células endoteliales (Connolly y cols., 1989, Ferrara y cols., 2003) siendo este efecto específico de los componentes del endotelio vascular, pues no se da en otros tipos celulares. Además, es capaz de potenciar la migración endotelial (Breen, 2007), que es el paso inicial en la ramificación del endotelio a partir de los vasos preexistentes. También actúa como factor de supervivencia celular inhibiendo la apoptosis de las células endoteliales, como se ha demostrado en estudios *in vitro* (Gerber y cols., 1998).

Varios experimentos han demostrado la implicación del VEGF en la angiogénesis *in vivo*. Así, se ha visto que los ratones deficientes en el gen de VEGF así como del receptor VEGFR-2 (Flk-1) presentan una vasculogénesis incompleta en la etapa embrionaria (Shalaby y cols., 1995). Sin embargo, los ratones carentes del gen que codifica para el receptor VEGFR-1 (Flt-1) son capaces de formar estructuras vasculares pero tanto la organización como el ensamblado vascular son incorrectos (Fong y cols., 1995). Estos resultados apoyan la idea de que el receptor VEGFR-1 tiene importancia en el remodelado vascular pero no en la creación de vasos sanguíneos *de novo*. Incluso existen hipótesis que apuntan a un papel del VEGFR-1 como regulador negativo de VEGFR-2, secuestrando moléculas de VEGF e impidiendo su unión a este último (Park y cols., 1994; Hiratsuka y cols., 1998).

- Regulación de la expresión y síntesis de VEGF

La expansión de la masa tumoral está frecuentemente asociada a la aparición de zonas internas en las que la concentración de oxígeno es insuficiente para el crecimiento del tumor, debido al incremento de la distancia entre la fuente de oxígeno procedente de los vasos sanguíneos y el interior del

tumor. Por otro lado, la hipoxia tumoral también puede deberse al incremento en la actividad metabólica celular. En ambos casos, el tumor requiere la formación de nuevos vasos sanguíneos que proporcionen una cantidad de oxígeno y nutrientes adecuada a su crecimiento (Liao y Johnson, 2007).

La concentración local de oxígeno en el microambiente tumoral constituye el principal factor regulador de la producción de VEGF (Shweiki y cols., 1992). Las condiciones de hipoxia estimulan la producción de VEGF a través de la unión del factor inducible por hipoxia (HIF) a elementos en *cis* del promotor del gen de VEGF, lo que estimula tanto la transcripción del gen como la estabilidad del mRNA (Kimura y cols., 2000). Estudios recientes llevados a cabo por Mizukami y colaboradores (2006) sugieren la existencia de un mecanismo alternativo de inducción de la producción de VEGF a través de una vía dependiente de PI3K (*phosphoinositide 3-kinase*) en la que estaría implicado c-Myc. Las patologías asociadas a la angiogénesis, como son los tumores, utilizan la producción de VEGF no sólo como un mecanismo para estimular la angiogénesis en general a través de su efecto sobre las células endoteliales, sino como una forma de estimular la angiogénesis en respuesta a bajas concentraciones locales de oxígeno.

La actividad transcripcional de VEGF también está sometida a regulación por determinadas hormonas. Así, el gen de VEGF presenta un elemento de respuesta a estrógenos (ERE) 1520 pb aguas arriba del sitio de inicio de la transcripción (Buteau-Lozano y cols., 2002). Tanto el receptor de estrógenos  $\alpha$  como el  $\beta$  pueden interaccionar con este ERE, aunque el efecto producido por el estradiol o el tamoxifeno depende del tipo celular. La progesterona también puede inducir la transcripción de VEGF a través de los receptores de progesterona A y B, debido a la presencia de elementos de respuesta a la progesterona en el promotor de VEGF (Páges y Pouyssegur, 2005).

- Mecanismos de señalización de VEGF

El mecanismo de señalización de VEGF se inicia con la unión de este factor a su receptor específico de membrana, siendo el receptor VEGFR-2 el más relevante a la hora de mediar respuestas angiogénicas. En la señalización mediada por este tipo de receptores, incluidos en la familia de los receptores tirosina kinasa, están habitualmente implicadas las vías de las MAPK (*mitogen activated protein kinase*) y PI3K (fosfatidil inositol 3 kinasa) entre otras, afectando en último término, todas ellas, a la actividad endotelial (Ferrara y cols., 2003) a través de la activación de la expresión de varios factores fundamentales en la angiogénesis, que incluyen proteínas antiapoptóticas, moléculas de adhesión celular y metaloproteasas de la matriz extracelular (MMPs).

#### **1.4.5.2. Angiopoyetinas**

Las angiopoyetinas son proteínas de secreción con un peso molecular de unos 70 kDa que juegan un papel fundamental en la angiogénesis. Hasta la fecha se han descrito cuatro miembros de la familia de las angiopoyetinas y todas ellas se unen a receptores de la familia Tie. Angiopoyetina 1 (Ang1), a través de un mecanismo que se inicia tras su unión al receptor Tie2, remodela los capilares recién formados y los estabiliza, favoreciendo la interacción entre las células endoteliales y otras células que se encuentran en las inmediaciones del tumor (Suri y cols., 1998). Sin embargo, la Angiopoyetina 2 (Ang2), caracterizada inicialmente como un homólogo estructural de Ang1 que se une igualmente al receptor Tie2, funciona a modo de antagonista de Ang1 induciendo la desestabilización y regresión de los vasos formados e impidiendo un excesivo crecimiento y ramificación vascular (Holash y cols., 1999). Esta desestabilización inducida por Ang2 favorece la plasticidad vascular y facilita su remodelado en presencia de otros factores de crecimiento. Ang2 se expresa únicamente en las células endoteliales de los vasos presentes en el tumor pero no en vasos normales, lo que convierte a este factor en un marcador biológico de vascularización tumoral (Zagzag y cols., 1999).

#### **1.4.5.3. Factor de crecimiento de fibroblastos**

El primer factor conocido derivado de un tumor y capaz de estimular la proliferación de las células endoteliales e inducir la vascularización *in vivo* fue aislado por Folkman y colaboradores en el año 1971. Los factores de crecimiento de fibroblastos básico y ácido (FGFs), que se diferencian en su punto isoeléctrico, son polipéptidos cuyo peso molecular es de 18 a 25 kDa, pertenecientes a una familia de factores de crecimiento muy conservada. Los FGFs son capaces de inducir varios procesos implicados en la angiogénesis, incluyendo proliferación, migración, producción de activador del plasminógeno y colagenasa y formación de estructuras similares a túbulos en células endoteliales (Gospodarowicz y cols., 1989; Montesano y cols., 1986). La acción de estos factores parece estar coordinada con los efectos mediados por VEGF en la angiogénesis. Así, mientras el factor VEGF es crucial en el inicio de la angiogénesis, los FGFs son importantes para el mantenimiento de la misma. Incluso se ha propuesto que ambos factores actúan de forma coordinada en el aumento de la proliferación endotelial y la formación de estructuras tubulares (Papetti y Herman, 2002).

#### **1.4.5.4. Interleuquina 8 y metaloproteasa de la matriz 2**

Uno de los factores de crecimiento menos conocidos implicados en la angiogénesis tumoral es la interleuquina 8 (IL-8). Su papel angiogénico surgió de la observación de la presencia de esta interleuquina, producida por los macrófagos, en algunas enfermedades inflamatorias crónicas con el fin de mediar en procesos de neovascularización. Varios estudios han puesto de manifiesto la capacidad mitogénica y quimiotáctica de la IL-8 sobre las células endoteliales *in vitro*, e incluso se ha visto que es capaz de estimular la angiogénesis *in vivo* en animales (Koch y cols, 1992). El papel de la IL-8 en el tejido tumoral se apoya en evidencias experimentales tales como su sobreexpresión en el tejido neoplásico y la correlación existente entre dicha expresión y el grado de vascularización tisular (Yuan y cols., 2000).

En estudios realizados en células de melanoma transfectadas con el gen de IL-8 se observó que dichas células presentaban un aumento tanto en la actividad de la metaloproteasa de la matriz 2 (MMP-2) como en la expresión de este gen (Luca y cols., 1997). De ahí se dedujo que la angiogénesis inducida por IL-8 estaba, en parte, mediada por su capacidad para estimular la producción de MMP-2, una proteasa que degrada y remodela la matriz extracelular para facilitar la invasión y migración celulares, en lo que constituye uno de los primeros pasos de la angiogénesis, tanto fisiológica como patológica.

#### **1.4.5.5. Otros factores solubles**

Algunos factores como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) y la angiogenina, capaces de mediar en la angiogénesis fisiológica, también participan en la neovascularización tumoral, aunque sus funciones aún no han sido completamente caracterizadas y se cree que tienen una importancia menor.

A pesar de ser una pequeña molécula con sólo unos pocos segundos de vida media, el óxido nítrico (NO), producto principal del enzima óxido nítrico sintasa (NOS), tiene un papel importante en la angiogénesis. Debido a su pequeño tamaño, es fácilmente difusible a través de las membranas celulares. En las células endoteliales actúa a modo de factor de supervivencia, inhibiendo la apoptosis mediada por caspasas y promoviendo la proliferación celular (Liao y Johnson, 2007).

#### **1.4.6. Terapia antiangiogénica**

Dado el papel de la angiogénesis en el crecimiento y progresión del tumor, la vasculatura tumoral, y especialmente los factores y vías de señalización asociados a su desarrollo, han sido propuestos como diana terapéutica para frenar el curso de la enfermedad. En las últimas décadas, numerosos anticuerpos específicos capaces de neutralizar VEGF-A han sido desarrollados y ensayados con éxito para suprimir

la angiogénesis en varios modelos tumorales (Kim y cols., 1993). En el año 2003, la FDA (*USA Food and Drug Administration*) aprobó el uso del anticuerpo monoclonal anti-VEGF-A *bevacizumab* como el primer agente antiangiogénico desarrollado para el tratamiento del cáncer colorrectal y cuyo uso fue posteriormente aprobado para el tratamiento de cáncer de pulmón y de mama (Ferrara y Kerbel, 2005). Desde entonces, han sido aprobados otros tratamientos basados en la inhibición de VEGF o de sus receptores, entre los que destacan *sorafenib*, *sunitinib* y *pazopanib*, todos ellos inhibidores de los receptores tirosina kinasa. A pesar de la eficacia de estos fármacos, no todos los pacientes obtienen buenos resultados tras su uso, lo que pone de manifiesto la necesidad de desarrollar no sólo nuevos marcadores que permitan predecir el curso de la enfermedad sino también identificar las vías de señalización que median en la angiogénesis independiente de VEGF.

Una alternativa a los anticuerpos monoclonales son los inhibidores de VEGF, pequeñas moléculas con capacidad de bloquear la angiogénesis y la progresión del tumor. Hasta el momento se han caracterizado más de 40 moléculas inhibitoras, que pueden dividirse en cuatro grupos principales: interferones (IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$  e IFN- $\gamma$ ), fragmentos proteolíticos (angiostatina), interleuquinas (IL-4) e inhibidores tisulares de las metaloproteasas (TIMPs) (Papetti y Herman, 2002). Su principal ventaja frente al resto de agentes antiangiogénicos reside en su capacidad demostrada no sólo para reducir el crecimiento del tumor sino que además, uno de estos inhibidores, la endostatina, un fragmento proteico derivado del colágeno tipo XVIII, es conocido por no inducir resistencia en tratamientos prolongados y repetidos, una de las principales desventajas que ofrecen los tratamientos de quimioterapia (Feldman y Libutti, 2000).

Un nuevo tipo de agentes antiangiogénicos clasificados como inhibidores del enzima COX-2 han sido desarrollados con éxito en los últimos años, basándose en estudios que demuestran que tanto la hipoxia como algunos factores de crecimiento promueven la angiogénesis al inducir la producción de prostaglandina E2 (PGE2) mediada por el enzima COX-2 (Atquir-Rahman y Toi, 2003). Los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), a través de la inhibición de la expresión de COX-2, tienen efectos beneficiosos en varios tipos de tumores. Se ha descrito que pueden reducir

tanto el tamaño como el número de tumores inducidos a través de la producción de prostaglandinas, incluso se ha descrito un descenso del 40-50% en el riesgo relativo de sufrir cáncer colorrectal en pacientes que utilizan habitualmente AINEs (Dubois R.N., 2000). Los tratamientos con inhibidores selectivos de COX-2 (*celecoxib*) reducen significativamente la densidad vascular a través de la inhibición de la expresión de factores angiogénicos en varios tipos de tumores entre los que se incluyen colon, cabeza y cuello, piel y vejiga (Masferrer y cols., 2000).

En los últimos tiempos, la búsqueda de inhibidores de la angiogénesis ha llevado al estudio de los denominados agentes de disrupción vascular (VDAs) cuya eficacia reside en la inducción del colapso vascular generando hipoxia y necrosis en la masa tumoral, lo que disminuye el crecimiento del tumor. El flavonoide ASA404 es uno de estos agentes, capaz de inducir apoptosis en las células endoteliales asociadas al tumor (Cooney y cols., 2006), lo que resulta en una desorganización vascular y por tanto en un descenso en el aporte sanguíneo a la masa tumoral. Este fármaco se encuentra actualmente en fase de ensayos clínicos en pacientes de cáncer de pulmón.

## **1.5. LA MELATONINA**

En el año 1958, Lerner y cols. aislaron, a partir de glándulas pineales bovinas, una sustancia a la que identificaron como N-acetil-5-metoxitriptamina. Debido a su capacidad para blanquear la piel de los renacuajos y dado que derivaba de la serotonina, esta nueva molécula fue denominada comúnmente melatonina. La melatonina es una hormona indólica, derivada del aminoácido triptófano, que se encuentra presente en multitud de organismos a lo largo de toda la escala evolutiva, desde las bacterias a los vertebrados (Tan y cols., 2003).

### **1.5.1. Síntesis, secreción, circulación y metabolismo de la melatonina**

La síntesis de melatonina se lleva a cabo principalmente en los pinealocitos de la glándula pineal. Se han descrito otros lugares como retina, tracto gastrointestinal, tiroides, piel o médula ósea, pero la contribución de estos sitios extrapineales a los niveles plasmáticos de melatonina es poco significativa (Stefulj y cols., 2001).

Una de las características más notables de la liberación pineal de melatonina en todos los animales es su patrón de secreción, que tiene lugar a lo largo del ciclo de 24 horas, y se ajusta de forma precisa a cambios en la iluminación ambiental (Buscemi y cols., 2004). Así, en condiciones normales de alternancia de luz/oscuridad en períodos de 24 horas, las concentraciones plasmáticas de melatonina son bajas durante el día (en presencia de luz) y elevadas durante la noche (en oscuridad). La ritmicidad circadiana de esta hormona se pone de manifiesto cuando se alteran las señales medioambientales que indican la alternancia día/noche. Es por esto que cuando los sujetos se sitúan en oscuridad continua, el ritmo de secreción de melatonina persiste, si bien con una periodicidad ligeramente distinta a la de 24 horas.

En los mamíferos, incluidos los humanos, el núcleo supraquiasmático (NSQ) del hipotálamo es el principal marcapasos endógeno que controla la síntesis de melatonina, pues contiene neuronas que exhiben un patrón circadiano de actividad,

siendo la luz el principal agente sincronizador medioambiental de este marcapasos endógeno.

La retina es el órgano fotorreceptor de los mamíferos y cuenta con fotorreceptores especializados en medir niveles de luminosidad. Hasta ahora, se habían identificado como receptores clásicos de la percepción lumínica a los conos y bastones de la retina. Sin embargo, recientemente se ha caracterizado un tercer fotorreceptor, que son las células ganglionares intrínsecamente fotosensibles de la retina (*ipRGCs*), cuya función es percibir la luz que estimula al sistema circadiano del NSQ. Por lo tanto, la retina en los mamíferos presenta un sistema visual dual; por un lado la visión clásica mediada por conos y bastones, y por otro la visión “circadiana” mediada por las *ipRGCs*. De estas últimas, únicamente entre un 1 y un 2% de todas las células ganglionares son realmente capaces de responder a la luz gracias a la presencia de melanopsina. La sensibilidad de este pigmento está restringida a una pequeña parte del espectro electromagnético, comprendida en el rango de 460-480 nm. Por tanto, únicamente una pequeña fracción del espectro visual electromagnético es capaz de regular la función del sistema visual circadiano (Reiter y cols., 2011).

Los axones originados en las células ganglionares se proyectan hacia el NSQ, formando los tractos retino-hipotalámicos (RHT). Algunos de los axones de las células ganglionares de la retina llegan al núcleo geniculado lateral para terminar también en el NSQ, constituyendo los tractos retino-genículo-hipotalámicos (RGHT). Ambas vías (RHT y RGHT) son pues las encargadas de transmitir las señales fotoperiódicas hasta el NSQ para sincronizar su actividad a los ciclos día/noche. Los axones originados en las neuronas de los NSQ se proyectan hacia el ganglio cervical superior, perteneciente al sistema simpático, donde hacen sinapsis con las neuronas postganglionares cuyos axones, en ausencia de luz, liberan norepinefrina en la proximidad de los pinealocitos, provocando la síntesis de melatonina.

Una vez sintetizada, la melatonina no se almacena en la glándula pineal sino que difunde directamente a la sangre, donde circula mayoritariamente unida a albúmina o bien se libera hacia el líquido cefalorraquídeo, donde se encuentran

niveles de melatonina muy superiores a los circulantes (Tan y cols., 2003). Los niveles de melatonina se incrementan en el momento en que predomina la oscuridad, existiendo un pico de concentración en la primera mitad de la noche (02:00-04:00 horas) que decrece gradualmente durante la segunda mitad.

La síntesis de melatonina se inicia en el feto a partir de la semana 26 de gestación, aunque el patrón rítmico no se adquiere hasta 2-3 meses después del nacimiento. Además, las concentraciones plasmáticas varían con la edad, alcanzándose niveles máximos a partir del primer año y hasta los 3 años de vida. Estos niveles caen bruscamente en la pubertad para ir descendiendo paulatinamente a partir de la misma (Waldhouser y cols., 1988). Este descenso ha hecho pensar en una posible relación de esta hormona con el proceso de envejecimiento, proponiéndose a la melatonina como agente anti-envejecimiento debido fundamentalmente, y entre otras, a sus propiedades antioxidantes.

La mayor parte de la melatonina circulante se inactiva mediante conversión hepática a 6-hidroxi-melatonina, la cual es excretada en la orina en forma de compuestos sulfatados o, en menor medida, glucuronados. En los humanos, el principal metabolito urinario es la 6-sulfatoximelatonina. Otra parte de la melatonina circulante se oxida en el cerebro formando kynurenina y únicamente una pequeña porción (0,5%) es eliminada por la orina en forma libre.

### **1.5.2. Regulación de la síntesis de melatonina**

La síntesis de melatonina se inicia por la unión de noradrenalina a los receptores  $\beta_1$  adrenérgicos en la membrana del pinealocito, causando la activación de la adenilato ciclasa a través de una proteína G reguladora, con lo que aumentan los niveles intracelulares de AMPc. Adicionalmente, la noradrenalina se une también a receptores  $\alpha_1$ , estimulando la entrada de calcio al pinealocito y la producción de diacilglicerol a partir de la hidrólisis del fosfatidil inositol bifosfato ( $PIP_2$ ), lo que lleva a la translocación y activación de una proteínquinasa dependiente de calcio (PKC).

Se cree que esta última estimula la fosforilación de algún componente del sistema potenciando la acumulación intracelular de AMPc.

El aumento de la concentración de AMPc en el citoplasma del pinealocito da lugar a la activación de la proteínquinasa A (PKA), que induce la activación del enzima aril N-acetil-transferasa (NAT). Este enzima, presente en todas las especies en forma inactiva, es limitante en la síntesis de melatonina. Además, esta misma PKA fosforila al factor de transcripción CREB (*cAMP response element binding protein*) que actúa modulando la síntesis *de novo* de NAT. De esta forma, tanto la NAT activada como la sintetizada *de novo* catalizan la transformación de serotonina en N-acetilserotonina, que será a continuación metilada por el enzima hidroxindol-O-metiltransferasa para generar melatonina. Existe además, un mecanismo de inhibición de la transcripción del gen NAT que depende de la expresión del gen represor ICER (*inducible cyclic AMP early repressor gene*). La proteína CREB, por tanto, es la encargada tanto de iniciar la transcripción de NAT como de finalizarla, mediante la transcripción del gen represor ICER.

### 1.5.3. Mecanismo de acción de la melatonina

Se han descrito una gran diversidad de acciones de la melatonina, para las cuales se han propuesto distintos mecanismos, algunos de los cuales son:

- 1) Unión a receptores de membrana: hasta el momento se han clonado y caracterizado dos tipos de receptores de melatonina de alta afinidad en mamíferos: MT<sub>1</sub> (que previamente se denominaron ML<sub>1a</sub>) y MT<sub>2</sub> (que se corresponden con los inicialmente llamados ML<sub>1b</sub>) (Molinari y cols., 1996). Además, se ha identificado una tercera proteína capaz de unir melatonina, denominada MT<sub>3</sub> (anteriormente conocida como ML<sub>2</sub>), aunque no puede ser considerado un receptor en sentido estricto ya que se trata del enzima citosólico quinona reductasa 2, la cual se une a la melatonina con baja afinidad (Reppert y cols., 1994). Los receptores MT<sub>1</sub> y MT<sub>2</sub> son miembros de la gran familia de receptores con siete dominios transmembrana acoplados a

proteínas  $G_i$  que median la inhibición de la adenilato ciclasa. Los receptores  $MT_1$  poseen una afinidad ( $K_D= 20-40$  pM) algo mayor que los  $MT_2$  ( $K_D= 160$  pM) y controlan la movilización de  $Ca^{++}$  a través de proteínas  $Gq11$ , mientras que los  $MT_2$  inhiben la guanilato ciclasa. Los receptores  $MT_3$ , menos conocidos, parece ser que participan en la protección frente al estrés oxidativo. Los receptores  $MT_1$  y  $MT_2$  han sido localizados tanto en estructuras del SNC como en regiones extraneurales. Entre las primeras se encuentran el NSQ, hipotálamo medio basal, córtex, tálamo, cerebelo, hipocampo y retina. Fuera del SNC, han sido descritos receptores para melatonina en la *pars tuberalis* de la adenohipófisis, arterias cerebrales, linfocitos, células epiteliales prostáticas, células granulosas de folículos preovulatorios, espermatozoides, mucosa del colon, plaquetas y tejido mamario.

- 2) Unión a receptores nucleares: algunos de los efectos de la melatonina no pueden explicarse debido a su unión a receptores de membrana. Dada la naturaleza lipofílica de la melatonina y su capacidad para atravesar fácilmente la membrana plasmática y alcanzar el núcleo celular, se consideró la posibilidad de que algunos de los receptores RZR/ROR (receptores huérfanos para los que se desconocen ligandos específicos) pudiesen ser el sitio de unión de la hormona pineal (Reiter, 1991; Becker-Andre y cols., 1994; Reiter y cols., 1998). Estos receptores son factores de transcripción que pertenecen a la superfamilia de receptores del ácido retinoico, y su naturaleza como receptores nucleares de melatonina resulta aún controvertida.
  
- 3) Interacción con la calmodulina (CaM): la melatonina es capaz de interactuar con proteínas intracelulares, como la calmodulina (CaM). Esta unión impide la unión de la CaM al calcio inhibiendo la actividad de enzimas dependientes de calmodulina, tales como quinasas, AMP fosfodiesterasa y óxido nítrico sintasa, entre otros. Éste constituye un mecanismo de acción de la melatonina independiente de su unión a receptores (Benítez-King y cols. 1993).

- 4) Neutralización de radicales libres: la melatonina es un potente neutralizador de radicales libres debido a su capacidad para transferir electrones a radicales hidroxilo, aniones superóxido, peróxido de hidrógeno, ácido hipocloroso, óxido nítrico y aniones peroxidonítricos (Allegra y cols., 2003). A esta función de la melatonina como antioxidante, habría que añadir su capacidad de estimular la expresión de enzimas antioxidantes, lo que en conjunto sugiere que la hormona pineal podría tener un papel protector en procesos neurodegenerativos e interferir en algunos aspectos del envejecimiento (Bonfont-Rousselot y cols., 2010).

#### **1.5.4 Acciones de la melatonina**

A pesar de que los mecanismos de síntesis y secreción de la melatonina son bien conocidos, así como sus receptores y su mecanismo de acción, el papel fisiológico de la hormona pineal en humanos aún no ha sido totalmente esclarecido. La melatonina funciona a modo de señal química que mide la duración de la noche, y por tanto, la del día y el paso de las estaciones, lo que permite pensar que su función está principalmente relacionada básicamente con la regulación de los ritmos biológicos (Arendt, 1986). Sin embargo, hay otras acciones de esta indolamina que, al menos directamente, no parecen estar relacionadas con el sistema circadiano y se asemejan más a las de cualquier hormona. Entre las acciones no circadianas de la melatonina se encuentran el control de la termorregulación (Atkinson y cols., 2005), la regulación de la respuesta inmune (Pozo y cols. 1997; Trubiani y cols., 2005), propiedades antioxidantes (Mayo y cols., 2002), inhibición de enzimas prooxidativas como la óxido nítrico sintasa (Bettahi y cols., 1996; Guerrero y cols., 1997) e inhibición de la actividad telomerasa (Martínez-Campa y cols., 2008). En este trabajo nos hemos centrado en las acciones antineoplásicas de la melatonina, dependientes de su capacidad para interactuar con el eje neuroendocrino-reproductor, haciendo énfasis en la naturaleza antiestrogénica de esta hormona.

### **1.5.5. Melatonina y cáncer de mama**

En 1978, Cohen y colaboradores publicaron un artículo en el que exponían su hipótesis de que la disminución de la función pineal podría formar parte de los factores etiológicos del cáncer de mama. Su hipótesis estaba basada en numerosos datos indirectos, entre los que se encontraba la baja incidencia del cáncer de mama en pacientes tratadas con fenotiazinas, un compuesto que incrementa los niveles séricos de melatonina, o bien la correlación positiva existente entre las calcificaciones pineales, interpretadas como déficit de la función pineal, y el cáncer mamario. Estos autores sugerían que el descenso en la función pineal podía inducir un estado relativo de hiperestrogenismo, que tendría como consecuencia el desarrollo de tumores mamarios debido a la elevada exposición de la mama a los estrógenos. Tiempo después, Tamarkin y colaboradores (1982) describieron la relación entre la concentración plasmática de melatonina y el cáncer de mama al observar que mujeres con adenocarcinomas mamarios en los que estaban presentes los receptores estrogénicos tenían concentraciones plasmáticas nocturnas de melatonina significativamente más bajas que las mujeres sanas o aquellas con tumores que eran receptor estrogénico negativos.

Desde entonces, han sido numerosos los datos que indirectamente han apoyado el posible papel de la melatonina en el cáncer mamario. Entre ellos, cabe destacar la baja incidencia de este tipo de tumores en mujeres ciegas (Coleman y Reiter, 1992). Además, se ha observado que el riesgo de cáncer mamario disminuye con el grado de déficit visual de las mujeres estudiadas, lo que sugiere una relación dosis-respuesta entre la luz visible y el riesgo de cáncer mamario (Verkasalo y cols., 1999). De esta manera, la supresión parcial o total del estímulo luminoso podría inducir un aumento en los niveles de melatonina circulante, que podría explicar la baja incidencia de los tumores. Otro dato indirecto se basa en la existencia de alteraciones en los ritmos de secreción de melatonina en mujeres con tumores mamarios. La incidencia de esta enfermedad es mayor en mujeres expuestas a luz durante la noche o a radiaciones electromagnéticas de baja intensidad (Blask y colaboradores., 2005). El efecto supresor de los niveles nocturnos de melatonina por un pequeño haz de luz durante la noche ha sido demostrado en el laboratorio

(Cos y cols., 2006) en ratas sometidas a contaminación lumínica nocturna, lo que aumentaba el desarrollo de tumores mamarios inducidos químicamente.

Todas estas evidencias indirectas, junto con varios estudios *in vivo* en diferentes modelos animales han avalado la hipótesis de las acciones oncostáticas de la melatonina sobre los tumores mamarios hormono-dependientes. La supresión de la función pineal se acompaña generalmente de una mayor tumorigénesis mamaria, mientras que el aumento en dicha función, bien de forma endógena o mediante la administración de melatonina, suele resultar en la inhibición de la carcinogénesis.

#### **1.5.6. La melatonina como antiestrógeno: propiedades SERM y SEEM**

Al contrario de lo que ocurre en animales con reproducción estacional, donde la melatonina juega un papel fundamental controlando directamente la actividad gonadal a través del eje hipotálamo-hipofisario, el papel de la hormona pineal resulta controvertido en los humanos. Varias observaciones experimentales han apoyado la hipótesis de que esta hormona podría ejercer un papel relevante en la regulación del eje neuroendocrino-reproductivo regulando la síntesis de esteroides ováricos. Así mismo, se ha descrito la existencia de una relación inversa entre la melatonina presente en el suero y la actividad ovárica en mujeres (Kauppila y cols., 1987), además de un aumento significativo del estradiol circulante en mujeres expuestas a la luz durante la noche (Luboshitzky y cols., 1999), en las que la función pineal está alterada. El papel regulador de la melatonina sobre la función ovárica en humanos se apoya en varias evidencias experimentales. En primer lugar, se ha descrito la presencia de melatonina en el fluido folicular humano a concentraciones muy superiores a las plasmáticas. Este hecho, junto con la identificación de receptores de melatonina en células granulosas y luteínicas del ovario así como la presencia de esta hormona en el fluido folicular humano a concentraciones superiores a las plasmáticas han contribuido al conocimiento de la influencia de la melatonina en la regulación de la función ovárica (Soares y cols., 2003).

La melatonina ejerce sus acciones antiestrogénicas a través de dos tipos de mecanismos:

- 1) La interacción con la vía de señalización mediada por receptores de estrógenos (ER) comportándose entonces como un *Selective Estrogen Receptor Modulator* (SERM). Sin embargo, la melatonina, a diferencia de otros antiestrógenos sintéticos como el tamoxifeno, no afecta a la unión de coactivadores del ER $\alpha$  (del Río y cols., 2004), lo que pone de manifiesto que sus acciones antiestrogénicas se llevan a cabo mediante mecanismos distintos.
- 2) La inhibición, por parte de la melatonina, de la síntesis de hormonas estrogénicas ya sea actuando sobre el eje hipotálamo-hipófisis, mediante la disminución de la liberación de GnRH y gonadotropinas, o bien modulando la actividad de los enzimas implicados en la síntesis de estrógenos, tanto a nivel gonadal como extragonadal. En este caso la melatonina lleva a cabo acciones de tipo *Selective Estrogen Enzyme Modulator* (SEEM).

#### **1.5.6.1. Propiedades SERM de la melatonina**

Una de las propiedades más interesantes de la melatonina es su capacidad para contrarrestar los efectos del estradiol sobre sus tejidos diana, comportándose como un antiestrógeno natural. En cuanto a sus acciones como SERM, la melatonina disminuye la expresión del ER $\alpha$  e inhibe la unión del complejo E<sub>2</sub>-ER $\alpha$  al elemento de respuesta a estrógenos (ERE) en el DNA (Baldwin y cols., 1998; Jones y cols., 2000; Ram y cols., 2000) siendo este efecto dependiente de la unión previa de esta hormona a su receptor de membrana MT<sub>1</sub>. El mecanismo de acción ha sido objeto de controversia. Por un lado, hay autores que proponen la inhibición de la producción de AMPc como posible causa (Godson y Reppert., 1997; Kiefer y cols., 2002; Sánchez-Barceló y cols., 2003). Se ha descrito que la unión de la melatonina a su receptor de membrana provoca una disminución de los niveles de AMPc en la célula debido

a la inactivación de la adenilato ciclasa. Esto impide la fosforilación del ER, necesaria para el proceso de unión al ERE y el inicio de la transcripción (Arónica y cols., 1994).

Sin embargo, otros autores apuntan hacia la calmodulina (CaM) como posible elemento de interacción entre los estrógenos y la melatonina (García-Pedrero y cols., 2002). La unión de la melatonina al complejo  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM impide la interacción de esta proteína con el complejo  $\text{E}_2$ -ER, inhibiendo la unión al ERE y por tanto, la transcripción génica (Rato y cols., 1999). La interacción de la CaM con el ER es específica del subtipo  $\alpha$ , ya que no se produce ni en el  $\text{ER}_\beta$  ni en un mutante del receptor  $\alpha$  en la zona de unión a CaM (del Río y cols., 2004), lo cual explica la razón por la cual la melatonina actúa únicamente sobre el receptor  $\alpha$ .

#### **1.5.6.2. Propiedades SEEM de la melatonina**

La melatonina ejerce efectos oncostáticos en distintos tipos de tumores, especialmente en aquellos hormono-dependientes, como es el caso del cáncer de mama. Uno de los mecanismos de interacción de la melatonina con las vías de señalización de los estrógenos está relacionado con su capacidad para regular la actividad de los enzimas encargados de la síntesis y transformación de los estrógenos tanto a nivel gonadal como extragonadal (González y cols., 2008).

En la mama normal, la síntesis local de estrógenos está desplazada hacia la producción de estrona, mientras que en el tejido carcinogénico predomina la formación del estrógeno biológicamente activo  $17\beta$ -estradiol. Las células tumorales tienden a sobreexpresar aromatasa, sulfatasa y  $17\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa I, estando todos estos enzimas implicados en la ruta de síntesis de estradiol, lo que resulta en la acumulación de esta hormona en los alrededores del tumor. Por su parte, la estrógeno sulfotransferasa, encargada de inactivar la estrona y el estradiol se encuentra frecuentemente expresada en niveles bajos en la mama tumoral.

Trabajos realizados en nuestro laboratorio han demostrado que, en células de tumor mamario hormono-dependiente (MCF-7), la melatonina es capaz de inhibir la expresión y la actividad del enzima aromatasa, que cataliza la conversión de los andrógenos en estrógenos (Cos y cols., 2005). También *in vivo*, valorando el crecimiento de tumores mamarios inducidos por un carcinógeno químico (DMBA) en ratas ovariectomizadas y tratadas con andrógenos, se demostró la capacidad de la melatonina para inhibir el crecimiento tumoral, bloqueando la transformación de los andrógenos en estrógenos, dependiente de la aromatasa (Cos y cols., 2006). Más recientemente, nuestro grupo demostró que la melatonina modula no sólo la aromatasa, sino también la actividad de otros enzimas implicados en la interconversión de esteroides. Concretamente, inhibe tanto la expresión como la actividad de la esteroide sulfatasa y la 17 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa I, mientras que aumenta ambos parámetros en el caso de la estrógeno sulfotransferasa (González y cols., 2008), en la línea celular MCF-7.

Los efectos antiaromatasa de la melatonina han sido demostrados *in vitro* en otro tipo de tumores. Trabajos realizados en nuestro laboratorio en células de glioma humano, demostraron que la melatonina es capaz de contrarrestar el efecto estimulador de la proliferación de estas células inducido por testosterona, cuya conversión en estradiol está mediada por la aromatasa. La expresión basal del gen de la aromatasa disminuye en presencia de melatonina (González y cols., 2007), al igual que la actividad y expresión de la esteroide sulfatasa y la 17 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa I, en esta misma línea celular (González y cols., 2010). Por analogía con la función de la aromatasa en otros tipos de tumores estrógeno-dependientes, es posible que la melatonina tenga un papel regulador en el control del crecimiento de los glioblastomas mediante la modulación de los enzimas implicados en la producción de estrógenos.

### 1.5.7. Papel de la melatonina en la angiogénesis tumoral

Las propiedades oncostáticas de la melatonina pueden explicarse a partir de distintos mecanismos y uno de ellos se basa en su capacidad para inhibir la creación de nuevos vasos sanguíneos que aporten oxígeno y nutrientes al tumor. La correlación entre melatonina y algunos factores angiogénicos ha sido demostrada a partir de varias evidencias experimentales. En concreto, se ha comprobado el efecto inhibitorio de la melatonina sobre la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) tanto en ensayos *in vitro* realizados en varias líneas celulares humanas (Dai y cols., 2008) como *in vivo* en ovario de ratas (Romeu y cols., 2011). El mecanismo por el cual tiene lugar esta inhibición del VEGF, siendo éste uno de los principales factores angiogénicos aún no ha sido totalmente esclarecido, aunque algunos estudios apuntan a la desestabilización del factor HIF-1 $\alpha$  o bien a la inhibición de su expresión, impidiendo así la transcripción del gen de VEGF en condiciones de hipoxia (Park y cols., 2009; Park y cols., 2010). La actividad antiangiogénica de la melatonina también ha sido estudiada en pacientes terminales de cáncer, en los que se observó que el tratamiento con melatonina estaba asociado a una disminución de los niveles de VEGF en sangre, lo cual sugiere que esta hormona es capaz de controlar el crecimiento tumoral, al menos en parte, gracias a sus propiedades antiangiogénicas (Lissoni y cols., 2001).

La presencia de receptores de melatonina MT<sub>1</sub> y MT<sub>2</sub>, así como de receptores nucleares ROR/RZR $\alpha$  y ROR/RZR $\beta$  en las células endoteliales, sugieren que estas células podrían ser una posible diana de acción de la hormona pineal (Cui y cols., 2008). Esta hipótesis ha sido corroborada mediante experimentos *in vitro* que han puesto de manifiesto la capacidad antiproliferativa e inductora de apoptosis de la melatonina sobre las células endoteliales mediante un mecanismo independiente de VEGF, regulando el ciclo celular a través de la modulación de la expresión de P53, Bax y Bcl-2 (Cui y cols., 2006). La vía de señalización intracelular mediada por ERK/PI3K/Akt/PKC/NF- $\kappa$ B parece estar implicada en los efectos antiproliferativos que la melatonina ejerce sobre las células endoteliales (Cui y cols., 2008).

Se ha propuesto que la actividad antiangiogénica de la melatonina también tiene lugar mediante una serie de mecanismos indirectos. Uno de ellos se basa en la inhibición de algunos factores de crecimiento (IGF, EGF y ET-1), que además de funcionar como mitógenos, también tienen propiedades proangiogénicas. Además, y debido a sus propiedades antioxidantes, la melatonina es capaz de neutralizar las especies reactivas de oxígeno generadas durante la hipoxia y que afectan a la estabilización de HIF-1 $\alpha$ , lo que constituye un mecanismo indirecto de inhibición de la angiogénesis tumoral (Dai y cols., 2008).



## **JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS**

---

---



## JUSTIFICACIÓN:

El desarrollo experimental que planteamos como punto de partida de este trabajo encuentra su justificación en los siguientes puntos, ya comentados a lo largo de la introducción y que ahora resumimos:

- La producción intratumoral de estrógenos, resultado de la acción conjunta de varios enzimas, juega un papel importante en la patogénesis y el desarrollo de tumores mamarios hormono-dependientes.
- La melatonina ejerce acciones oncostáticas sobre el desarrollo de tumores estrógeno-dependientes.
- Entre los mecanismos de la acción antitumoral de la melatonina se han descrito acciones reguladoras sobre los enzimas que intervienen en la síntesis tumoral de estrógenos, comportándose la melatonina como un SEEM (modulador selectivo de enzimas estrogénicos).
- Tanto en estudios *in vitro*, en cultivos de células de cáncer mamario humano, como *in vivo*, en tumores mamarios inducidos en animales con carcinógenos químicos, la melatonina reduce la actividad y la expresión de la aromatasa, el enzima que convierte andrógenos en estrógenos. Se desconocían, en el momento de iniciar este trabajo, los mecanismos a través de los cuales la melatonina ejerce sus acciones antiaromatasa.
- Dado que en el tejido peritumoral mamario existen células adiposas y endoteliales capaces de producir estrógenos, cabe formular la hipótesis de que la melatonina ejerza también acciones antiaromatasa a nivel del tejido peritumoral.
- Hay evidencias de interacciones paracrinas entre las células tumorales mamarias y el tejido peritumoral, responsables de la reacción desmoplásica o acúmulo de células indiferenciadas productoras de estrógenos adyacentes

a las células tumorales. Se desconoce si la melatonina, sobre la base de sus acciones antiaromatasa, puede interferir en la reacción desmoplásica regulando algunas de las citoquinas producidas por las células tumorales.

- Dado que la producción local de VEGF por las células tumorales juega un papel importante en las interacciones paracrinas entre las células epiteliales malignas y las células endoteliales peritumorales, cabe formular la hipótesis de que la regulación de la producción de VEGF por parte de la melatonina, a nivel de su producción por parte de las células tumorales, pueda ser un mecanismo a través del cual la melatonina reduzca el número de células productoras de estrógenos adyacentes al tumor.
  
- La secreción tumoral de VEGF funciona de manera paracrina facilitando tanto la expansión como el desarrollo del tumor a través de la formación de estructuras vasculares aumentando el aporte de oxígeno y nutrientes al tumor. No hay, en estos momentos, trabajos en los que se estudie la influencia de la melatonina sobre la angiogénesis tumoral estimulada por las células epiteliales malignas mamarias.

**OBJETIVOS:**

1. Profundizar en el conocimiento de los mecanismos mediante los cuales la melatonina regula la expresión y la actividad de la aromatasa en células de cáncer mamario.
2. Estudiar, en células de tejido adiposo, el efecto de la melatonina sobre: I) la diferenciación de preadipocitos en adipocitos; II) la expresión de algunos de los principales factores de transcripción implicados en la adipogénesis; III) la capacidad de estas células de sintetizar estrógenos a partir de la actividad y expresión de la aromatasa.
3. Estudiar la influencia de la melatonina sobre la producción y liberación de factores secretados por las células tumorales que intervienen en la reacción desmoplásica tumoral.
4. Caracterizar el efecto de la melatonina sobre la actividad y la expresión de la aromatasa en células del endotelio vascular.
5. Determinar el papel de la melatonina en la regulación del factor de crecimiento endotelial (VEGF) en el tejido peritumoral mamario.
6. Estudiar el papel de la melatonina en la angiogénesis tumoral inducida por las células tumorales mamarias.



## **MATERIAL Y MÉTODOS**

---

---



### 3.1. CULTIVOS CELULARES

#### 3.1.1. Líneas celulares utilizadas en el estudio

Para la realización de los experimentos descritos en este trabajo se han utilizado las líneas celulares siguientes: 3T3-L1, MCF-7 y HUVEC (**tabla 3.1**), adquiridas en la ATCC (*American Type Culture Collection*).

Línea celular	Origen de la línea	Medio de cultivo
3T3-L1	Fibroblasto embrionario de ratón	DMEM + 10% SFB
MCF-7	Célula epitelial de adenocarcinoma mamario humano	DMEM + 10% SFB
HUVEC	Célula endotelial de cordón umbilical humano	VCBM + 2% SFB

**Tabla 3.1. Resumen de las líneas celulares utilizadas en este trabajo.** Abreviaturas: 3T3-L1: *3-day transfer, inoculum  $3 \times 10^5$  cells*; MCF-7: *Michigan Cancer Foundation*; HUVEC: *Human Umbilical Vein Endothelial Cells*; DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*; VCBM: *Vascular Cell Basal Medium*; SFB: *Suero Fetal Bovino*.

#### 3.1.2. Condiciones de cultivo

##### 3.1.2.1. Comunes a todas las líneas celulares

- 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 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina (Sigma-Aldrich).
- Los cultivos celulares se mantuvieron a 37 °C en una atmósfera saturada de agua y con 5% de CO<sub>2</sub>.
- Un stock de cada una de las líneas celulares empleadas en este trabajo fue mantenido a -150 °C en una preparación crioprotectora que contiene 90% (v/v) de SFB (PAA) y 10% de dimetil-sulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich).

### **3.1.2.2. Específicas de cada línea celular**

- Las células 3T3-L1 y las células MCF-7 se cultivaron usando como nutriente el medio DMEM con rojo fenol (Cambrex, BioWhittaker), suplementado con 10% (v/v) de SFB.
- Para la diferenciación de las 3T3-L1 en adipocitos maduros se utilizó medio de diferenciación, compuesto por 10% SFB/DMEM suplementado con 0,5 mM isobutilmetilxantina (IBMX) (Sigma-Aldrich), 0,25  $\mu$ M dexametasona (Sigma-Aldrich) y 10  $\mu$ g/ml insulina (Sigma-Aldrich) durante 2 días, tras los cuales las células se incubaron durante 8 días adicionales con medio 10% SFB/DMEM y 10  $\mu$ g/ml insulina.
- Para las células HUVEC se usó el medio VCBM (ATCC) suplementado con 2% de SFB (ATCC) y con el kit de crecimiento celular endotelial-BBE (ATCC) que contiene 0,2% de extracto de cerebro bovino (BBE), 5 ng/ml rhEGF (Factor de Crecimiento Epidérmico recombinante humano), 10 mM L-glutamina, 0,75 U/ml heparina sulfato, 1  $\mu$ g/ml hidrocortisona hemisuccinato y 50  $\mu$ g/ml ácido ascórbico.
- Para evitar mutación genética y un descenso en la viabilidad celular, no se utilizaron células HUVEC mantenidas durante más de 5 pases.

### **3.1.3. Condiciones de subcultivo**

Cuando las células alcanzaron el 70-80% de confluencia, se procedió a su subcultivo para asegurar el crecimiento exponencial de las mismas. Para ello, se retiró el medio de la placa y se lavó con PBS (*Phosphate Buffered Saline*: NaCl 8 g/L, KCl 0,2 g/L, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,4 g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,24 g/L, pH 7,4). A continuación, se añadió una solución de 0,25% de tripsina-EDTA (0,25% de tripsina (p/v), 0,2 g/L EDTA) (Sigma-Aldrich) y se incubó de 3 a 5 minutos a 37 °C para despegar las células de la superficie de la placa. Posteriormente, las células se recogieron en el medio de cultivo correspondiente, actuando el suero como inactivador de la tripsina, y se centrifugaron a 100 x g durante 5 minutos. El sedimento se resuspendió en medio de cultivo fresco, repartiendo la suspensión celular en distintas placas.

### 3.1.4. Recuentos celulares para siembras. Viabilidad celular

De la suspensión celular obtenida en cada subcultivo, se tomaron 100  $\mu$ 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. 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.

### 3.1.5. Tratamiento del suero para la eliminación de los estrógenos

Las células en cultivo requieren, para su crecimiento, la presencia en el medio de numerosos factores de crecimiento y hormonas como el estradiol. Muchas de estas moléculas están incluidas en el suero. En algunos experimentos de proliferación celular y expresión génica, en los que se añaden tratamientos para evaluar la acción de distintos factores de crecimiento, fue necesario reducir, en la medida de lo posible, los niveles de los mismos en el medio de cultivo sin que se viera comprometida la viabilidad celular. Para ello, las células se sembraron en medios sin rojo fenol, un colorante utilizado como indicador de pH que posee actividad estrogénica (Berthois y cols., 1986), y con suero libre de estrógenos.

La eliminación de las hormonas esteroideas y factores de crecimiento del suero se realizó adaptando el protocolo descrito por Samuels y cols., (1979). Éste consiste en una incubación del suero con 1% (p/v) de carbón activado (Sigma-Aldrich) y 0,1% (p/v) de dextrano T-70 (Sigma-Aldrich), a 56 °C durante 30 minutos en agitación, seguido de centrifugación durante 15 minutos a 4000 x g a 4 °C. El sobrenadante se trató de nuevo con las mismas concentraciones de carbón y dextrano, seguido de una incubación a 37 °C durante 30 minutos y posterior sedimentación por centrifugación durante 60 minutos a 6500 x g. Las partículas de pequeño tamaño se eliminaron mediante filtración a través de un filtro de tamaño de poro de 0,22  $\mu$ m (Millipore), a la vez que se procedía a la esterilización del suero.

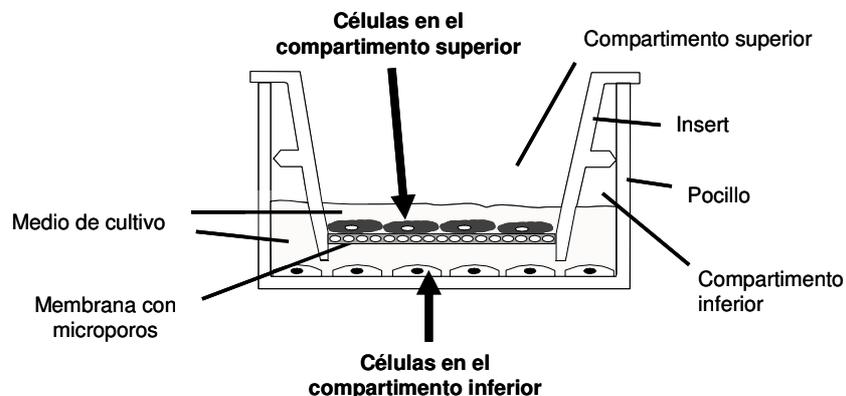
### 3.2. TRATAMIENTOS Y COMPUESTOS QUÍMICOS

Los reactivos melatonina, luzindol, tetradecanoil forbol acetato (TPA), araquidonato sódico, prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), GW9662, CoCl<sub>2</sub>, forbol 12-miristato 13-acetato (PMA), testosterona y aminoglutetimida se prepararon disolviéndolos en etanol 100% a una concentración de 100 mM, almacenándose el stock a -20 °C en forma de alícuotas. En el caso de los compuestos 8-Br-AMPC y RP-AMPC, la disolución se realizó en agua destilada y las alícuotas se almacenaron a -20 °C. La proteína recombinante VEGF 165 humana (R&D Systems Europe Ltd.) se disolvió en PBS en presencia de 0,1 % de albúmina de suero bovino (BSA) a una concentración de 100 µg/ml y se prepararon alícuotas que se almacenaron a -20 °C. El anticuerpo recombinante *anti human-VEGF antibody* (R&D Systems Europe Ltd.) se preparó disolviéndolo en PBS a una concentración de 0,1 mg/ml. Las alícuotas obtenidas se almacenaron a -20 °C y -80 °C. Para las diluciones sucesivas hasta alcanzar la concentración deseada se empleó en todos los casos el mismo disolvente. En el momento de proceder al tratamiento de las células se realizó una dilución de 1000 veces en el medio de cultivo, de manera que la concentración de etanol o PBS en el medio fue de 0,1% (v/v) por cada compuesto utilizado. Una cantidad equivalente de etanol o agua fue añadida a las células que constituyeron el grupo control. Todos los reactivos se obtuvieron en Sigma-Aldrich, a no ser que se indique lo contrario.

### 3.3. EXPERIMENTOS DE COCULTIVOS CELULARES

Para los experimentos de cocultivos celulares se utilizaron placas de cultivo de 24 pocillos (Falcon) en las que se sembraron células procedentes de las líneas celulares estudiadas. En cada pocillo se colocó un 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 3.1** muestra una representación esquemática del mecanismo utilizado en los experimentos de

cocultivos, compuesto por un pocillo perteneciente a una multiplaca de 24 y su soporte correspondiente.



**Figura 3.1.** Representación esquemática de un pocillo y un soporte permeable utilizados en los experimentos de cocultivos celulares.

### 3.3.1. Cocultivos de células 3T3-L1 y MCF-7

Las células 3T3-L1 se sembraron en placas de 24 pocillos (Falcon), a una densidad de  $12 \times 10^3$  células/pocillo en medio DMEM sin rojo fenol, suplementado con 10% SFB, 2mM de L-Glutamina, penicilina y estreptomycin. Al día siguiente, se introdujeron los soportes y sobre su membrana permeable se sembraron las células MCF-7 a una densidad de  $6 \times 10^3$  células/soporte. En ese momento se añadió medio de diferenciación de preadipocitos junto con los tratamientos correspondientes durante un total de 10 días, renovándose el medio cada 2 días. Al final del experimento, se recogió el medio de las últimas 48 horas para analizar la concentración de citoquinas antiadipogénicas mediante ELISA. Además, se evaluó el índice de proliferación de las células 3T3-L1 con el método del MTT.

### 3.3.2. Cocultivos de células HUVEC y MCF-7

Las células HUVEC se sembraron en placas de 24 pocillos (Falcon) a una concentración de  $24 \times 10^3$  células/pocillo en medio VCBM suplementado con 2% SFB. Al día siguiente se introdujeron los soportes y sobre su membrana permeable

se sembraron las células MCF-7 a una densidad de  $11 \times 10^3$  células/soporte en medio 2% SFB/VCBM. En el momento en que las células se encontraron adheridas a la superficie del soporte, se lavó la placa 2 veces con PBS y se añadió medio VCBM sin suero. Al cabo de 72 horas se recogió el medio para determinar la concentración de VEGF mediante un ELISA y se evaluó la proliferación de las células HUVEC con el método del MTT.

### **3.4. OBTENCIÓN DE MEDIO CONDICIONADO DE CÉLULAS MCF-7**

Las células MCF-7 se sembraron en una placa de 24 pocillos a una densidad de  $3 \times 10^4$  células/pocillo en medio DMEM sin rojo fenol suplementado con 10% de SFB. Una vez adheridas a la superficie de la placa, las células se lavaron 2 veces con PBS y se añadió medio VCBM sin suero. Al cabo de 24 horas se recogió el medio de cada pocillo y se filtró a través de un filtro con un tamaño de poro de  $0,2 \mu\text{m}$  (Milipore). El medio condicionado se alicuotó y almacenó a  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ .

### **3.5. MEDIDA DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR. MÉTODO DEL MTT**

El método del MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 bromuro difeniltetrazolio] (Molecular Probes) 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 por pocillo (Mosmann, 1983; Denizot y Lang, 1986).

Los ensayos de proliferación se llevaron a cabo en la línea celular HUVEC y también en los cocultivos de células 3T3-L1 y MCF-7 o bien de HUVEC y MCF-7. Las células HUVEC se sembraron en placas de 96 pocillos (Falcon), a una densidad

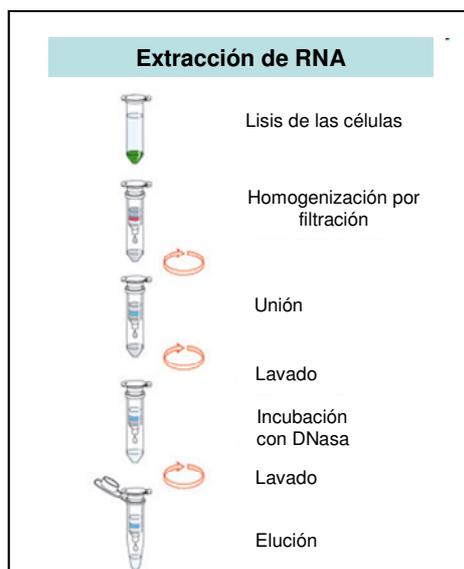
de  $8 \times 10^3$  células/pocillo, en medio VCBM suplementado con 2% de SFB. Una vez adheridas a la placa, se realizaron dos lavados con PBS y se añadió medio VCBM sin suero junto con los tratamientos correspondientes. La proliferación celular se evaluó a las 24 ó 48 horas mediante el método del MTT. En el caso de los cocultivos, tanto de 3T3-L1 y MCF-7 como de HUVEC y MCF-7, se siguieron los protocolos descritos anteriormente.

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 DMEM sin rojo fenol. Tras retirar el medio de cultivo de la placa, se añadieron 110  $\mu$ 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  $\mu$ l por 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). 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  $\pm$  error estándar de la media (SEM).

### **3.6. ESTUDIOS DE EXPRESIÓN GÉNICA**

#### **3.6.1. Extracción de RNA total de las células en cultivo**

Para la extracción de RNA total de las células se utilizó el kit comercial NucleoSpin II (Macherey-Nagel), cuyo protocolo se resume en el siguiente esquema (**figura 3.2**).



**Figura 3.2.** Etapas del método de extracción de RNA mediante el kit comercial NucleoSpin RNA II (Macherey-Nagel).

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 para reducir la viscosidad de la muestra y aumentar su pureza. Una vez centrifugada a 11000 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, en la que el RNA total se unió a la membrana de silica gel de la misma. El DNA contaminante, que también se une a la membrana, se eliminó mediante incubación con DNasa reconstituida. Después de 3 lavados sucesivos para eliminar los restos de sales y componentes celulares no deseados, se eluyó el RNA en 40 µl de agua libre de RNasas.

### 3.6.2. Determinación de la cantidad y pureza del RNA

Para descartar muestras con un cierto grado de degradación se evaluó el estado del RNA mediante un gel de agarosa-Tris-Borato EDTA al 1% (p/v). La cuantificación de las muestras se realizó mediante la lectura de su absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro (Nanodrop 1000 V 3.6). La pureza se midió

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 RNA puro, sin contaminantes. En todos los experimentos, este cociente fue siempre superior a 1,8.

### 3.6.3. Síntesis de DNA complementario (cDNA)

La síntesis de cDNA se realizó utilizando como molde 0,5 ó 1 µg de RNA total, en un volumen de reacción final de 20 µl, utilizando el kit comercial *cDNA Synthesis Kit* (Bioline) que se basa en la acción de una retrotranscriptasa reversa (*Bioscript*), aislada del virus de la leucemia murina de Moloney (MMLV) y con una baja actividad RNasa H, lo que se traduce en una alta eficiencia de actividad retrotranscriptasa. El volumen de los componentes para una reacción se muestra en la **tabla 3.2**.

COMPONENTE	CANTIDAD
RNA	0,5-1 µg ( <i>n</i> µl)
Oligo ( <i>dT</i> ) <sub>18</sub>	1 µl
<i>Random Hexamer</i>	1 µl
dNTPs 10 mM	1 µl
<i>Bioscript Buffer 5X</i>	4 µl
Inhibidor de RNasa	1 µl
Enzima <i>Bioscript</i> 200 U/µl	0,25 µl
DEPC-H <sub>2</sub> O	Hasta 20 µl

**Tabla 3.2.** Componentes empleados en la reacción de retrotranscripción.

La reacción se llevó a cabo en dos tiempos. Inicialmente, se incubó el RNA junto con el Oligo (*dT*)<sub>18</sub>, el *Random Hexamer* y los dNTPs a 65 °C durante 10 minutos en un termociclador (BioRad) e inmediatamente se colocó en hielo durante 2 minutos. Seguidamente, se añadieron el resto de componentes y se continuó la reacción en las siguientes condiciones: 45 °C, 52 minutos y 70 °C, 15 minutos.

### 3.6.4. Diseño de los oligonucleótidos cebadores para 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 consideraron 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<sub>m</sub> estuviera en torno a 60 °C y su composición no favoreciese 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<sub>T</sub> 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 DNA 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 gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) de ratón y de la subunidad 14S del RNA ribosomal humano (rRNA). Todos los oligonucleótidos empleados en los estudios de expresión génica se detallan en la **tabla 3.3**.

Gen	Secuencia	Longitud amplificación (pb)	Concentración (nM)
<b>hARO fw</b>	5'- GTCGTGGACTTGGTCATGC -3'	109	100
<b>hARO rv</b>	5'- CGAGTCTGTGCATCCTTCC -3'		
<b>hpl.3 fw</b>	5'-GGGCTTCCTTGTTTTGACTGTAA-3'	88	200
<b>hpl.3 rv</b>	5'-AGAGGGGGCAATTTAGAGTCTGTT-3'		
<b>hplI fw</b>	5'-CTCTGAAGCAACAGGAGCTATAGA-3'	167	200
<b>hplI rv</b>	5'-CAGGCACGATGCTGGTGATG-3'		
<b>hpl.4 fw</b>	5'-AACGTGACCAACTGGAGCCTG-3'	152	200
<b>hpl.4 rv</b>	5'-CATCACCAGCATCGTGCCTG-3'		

Gen	Secuencia	Longitud amplicón (pb)	Concentración (nM)
COX-1 fw	5'-ACCCGCACGGGCTATTCCGGC-3'	167	200
COX-1 rv	5'-AGGCGCATGAGCATCTCTCGG-3'		200
COX-2 fw	5'-ATGTATGAGTGTGGGATTTGA-3'	164	200
COX-2 rv	5'-TCCAAAATCCCTTGAAGTGGG-3'		200
mARO fw	5'-GAAGTGCCTGCAACTACTAC-3'	171	400
mARO rv	5'-GCTGCAGTGCATCGGCATGC-3'		400
C/EBP $\alpha$ fw	5'-AGGTGTTGGAGTTGACCAGT-3'	224	200
C/EBP $\alpha$ rv	5'-CAGCCTAGAGATCCAGCGAC-3'		200
PPAR $\gamma$ fw	5'-GATGCACTGCCTATGAGCACTT-3'	97	400
PPAR $\gamma$ rv	5'-AGAGGTCCACAGAGCTGATTCC-3'		400
hTNF $\alpha$ fw	5'-TGGGGTTTGTGAACTGTGA-3'	121	50
hTNF $\alpha$ rv	5'-GTTCTGCACATCCCTCTC-3'		50
hIL-6 fw	5'-AGGAGACTTGCCTGGTGA-3'	180	200
hIL-6 rv	5'-CAGGGGTGGTTATTGCATCT-3'		200
hIL-11 fw	5'-GCTGGTTTCGAACTCCTGAC-3'	137	200
hIL-11 rv	5'-CAGGGTGA-3'		200
mTNF $\alpha$ fw	5'-CCTCCCTCTCATCAGTTCTA-3'	102	200
mTNF $\alpha$ rv	5'-ACTTGGTGGTTTGCTACGAC-3'		200
mIL-6 fw	5'-ACAACCACGGCCTTCCCTACTT-3'	129	200
hIL-6 rv	5'-CAGGATTTCCAGCGAACATGTG-3'		200
mIL-11 fw	5'-GAAGTTCTAGCTCGCCAACC-3'	170	200
mIL-11 rv	5'-CAGCTATCGTCAACATCATGG-3'		200
hpl.7 fw	5'- AACACTCAGCTTTTTCCCAAC -3'	100	200
hpl.7 rv	5'- CTTGCTGATTTACCCCTTT -3'		200
hVEGF fw	5'-ACCAAGGCCAGCACATAGG-3'	160	200
hVEGF rv	5'-ACGCTCCAGGACTTATACCG-3'		200
hs14 fw	5'-TCCTGCGAGTGCTGTCAGAG-3'	159	200
hs14 rv	5'-TCACCGCCCTACACATCAAAC-3'		200
mGAPDH fw	5'-CCACTCACGGCAAATTCAACGGCA-3'	149	100
mGAPDH rv	5'-ACCAGTAGACTCCACGACATACTC-3'		100

**Tabla 3.3.** Oligonucleótidos empleados en los estudios de expresión génica.

### 3.6.6. Detección de la expresión génica mediante PCR a tiempo real

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 cDNA 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 Bionline, Cultek). En cada reacción se añadieron 6,25  $\mu$ l de mezcla de Brilliant® SYBR® Green PCR Master Mix (Stratagene), entre 0,63 (50 nM) y 2,5  $\mu$ l (200 nM) de cada oligonucleótido, 1  $\mu$ l de cDNA, y agua libre de RNasas hasta completar un volumen final de reacción de 12,5  $\mu$ 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 las establecidas por el programa con algunas modificaciones: 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. Cuando se representa la derivada de la fluorescencia frente a la temperatura, aparece un pico 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.

### 3.6.7. 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 problema con respecto al gen de referencia (s14, GAPDH), utilizando un método de comparación de los valores de  $C_T$  ( $\Delta C_T$ ) (Livak y Schmittgen, 2001), que se resume en el siguiente esquema:

$$\begin{aligned}\Delta C_T &= C_T \text{ gen interés} - C_T \text{ gen de referencia} \\ \Delta\Delta C_T &= \Delta C_T \text{ condición problema} - \Delta C_T \text{ condición control} \\ \text{Cambio relativo de la expresión} &= 2^{-\Delta\Delta C_T}\end{aligned}$$

### 3.6.8. Estudio de la expresión génica en distintas líneas celulares

#### **3.6.8.1. Expresión de CYP19, promotores de aromatasa pl.3, pl.4, COX-1 y COX-2 en células MCF-7**

El análisis de la expresión del gen de la aromatasa y sus promotores pl.3, pl.4, así como de la expresión de los genes que codifican para COX-1 y COX-2 se llevó a cabo sembrando MCF-7 a una densidad de  $8 \times 10^5$  células en placas de poliestireno de 60 x 15 mm (Falcon) en medio DMEM sin rojo fenol suplementado con 10% de SFB. Tras 24 horas de incubación, se lavaron las células con PBS y se añadió medio DMEM suplementado con 0,5% DCC (*Dextran-coated charcoal*) junto con los tratamientos correspondientes, detallados a lo largo de la descripción de los resultados. La extracción del RNA total se realizó tras 2 horas de incubación con los tratamientos utilizando el kit NucleoSpin II (Macherey-Nagel).

#### **3.6.8.2. Expresión de citoquinas antiadipogénicas en células MCF-7**

En el estudio de la expresión génica de las citoquinas antiadipogénicas TNF $\alpha$ , IL-6 e IL-11 en un modelo *in vitro* de tejido epitelial tumoral, se emplearon células MCF-7. Para ello, se sembraron células MCF-7 a una densidad de  $8 \times$

$10^5$  células en placas de poliestireno de 60 x 15 mm (Falcon) en medio DMEM sin rojo fenol suplementado con 10% de SFB. Tras 24 horas de incubación, se lavaron las células con PBS y se añadió medio DMEM suplementado con DCC al 0,5% junto con los tratamientos correspondientes, detallados a lo largo de la descripción de los resultados. Tras 2 horas de incubación con dichos compuestos, se procedió a la extracción del RNA total usando el kit NucleoSpin II (Macherey-Nagel).

#### **3.6.8.3. Expresión de PPAR $\gamma$ y C/EBP $\alpha$ en células 3T3-L1**

El estudio de la expresión de los genes que codifican para los factores de transcripción PPAR $\gamma$  y C/EBP $\alpha$  se llevó a cabo en la línea celular 3T3-L1. Las células se sembraron en placas de poliestireno de 60 x 15 mm (Falcon) a una densidad de  $8 \times 10^5$  células y se mantuvieron en medio de diferenciación de adipocitos durante 10 días. Una vez diferenciadas, las células se incubaron en medio DMEM sin rojo fenol suplementado con 10% SFB, insulina (10  $\mu\text{g/ml}$ ) y los tratamientos correspondientes durante 120 minutos. Transcurrido ese tiempo, se procedió a la extracción del RNA total mediante el kit NucleoSpin II (Macherey-Nagel).

#### **3.6.8.4. Expresión de citoquinas antiadipogénicas en células 3T3-L1**

En el estudio de la expresión de las citoquinas antiadipogénicas TNF $\alpha$ , IL-6 e IL-11 en los fibroblastos del tejido adiposo, se emplearon células 3T3-L1. Para ello, se sembraron células 3T3-L1 a una densidad de  $8 \times 10^5$  células en placas de poliestireno de 60 x 15 mm (Falcon) en medio DMEM sin rojo fenol suplementado con 10% de SFB. Tras 24 horas de incubación, las células se lavaron con PBS y se incubaron con medio DMEM suplementado con DCC al 0,5% junto con los tratamientos correspondientes, detallados a lo largo de la descripción de los resultados. Tras 2 horas de incubación con dichos compuestos, se procedió a la extracción del RNA total usando el kit NucleoSpin II (Macherey-Nagel).

#### **3.6.8.5. Expresión de CYP19 y promotor p1.7 de aromatasa en células HUVEC**

El estudio de la expresión del gen de la aromatasa y su promotor 1.7 en células endoteliales se realizó en la línea celular HUVEC. Para ello, las células se sembraron en placas de poliestireno de 60 x 15 mm (Falcon) a una densidad de  $5 \times 10^5$  células en medio VCBM suplementado con 2% de SFB. Transcurridas 24 horas, las células se lavaron con PBS y se reemplazó el medio por VCBM sin suero en presencia de los distintos tratamientos. Tras 4 horas de incubación, se extrajo el RNA total de las muestras.

#### **3.6.8.6. Expresión del Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (VEGF) en células MCF-7**

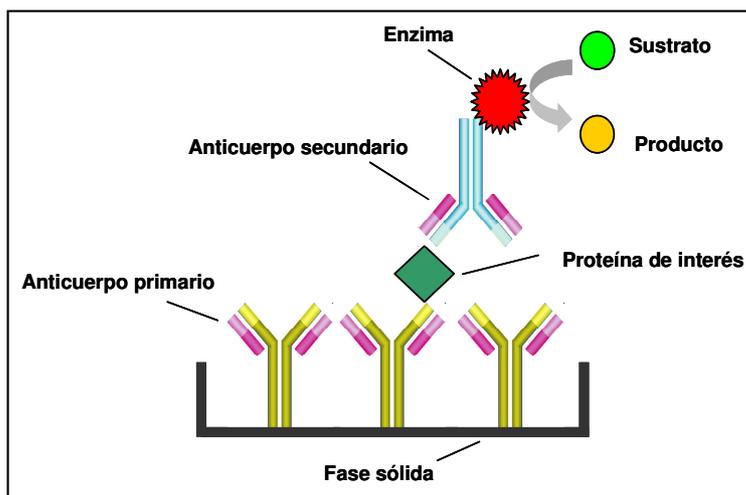
El estudio de la expresión del Factor de Crecimiento Endotelial (VEGF) en células de tumor mamario se llevó a cabo en la línea celular MCF-7. En líneas generales, las células se sembraron en placas de poliestireno de 60 x 15 mm (Falcon) a una densidad de  $7 \times 10^5$  células en medio DMEM sin rojo fenol suplementado con 10% de SFB. Una vez que las células se encontraron adheridas a la placa, se lavaron con PBS y el medio se reemplazó por DMEM suplementado con 0,5% DCC (v/v) para eliminar los factores de crecimiento del medio. Tras una incubación de 24 horas, se renovó el medio y se añadieron los tratamientos correspondientes. Finalmente, tras 4 horas de incubación, se procedió a la extracción del RNA total.

### **3.7. MEDIDA DE LOS NIVELES DE PROTEÍNA EN EL MEDIO EXTRACELULAR**

La determinación de la concentración de las distintas proteínas objeto de estudio en el medio de cultivo celular se realizó mediante un Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA). En todos los casos se utilizaron kits comerciales de *ELISA Immunoassay* (R&D Systems Europe Ltd.), procesándose las muestras según las instrucciones del proveedor.

### 3.7.1. Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA)

El método utilizado para determinar la concentración de proteína en el medio fue el *Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas* (ELISA) en fase sólida, cuyo principio básico se resume en el siguiente esquema (**figura 3.3**).



**Figura 3.3.** Esquema del Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas.

El medio de cultivo se recogió y se centrifugó durante 5 minutos para eliminar los posibles restos celulares y partículas en suspensión. Las muestras se añadieron a una placa de ELISA de 96 pocillos por triplicado y se incubaron durante 2 horas con el fin de permitir la unión del antígeno (en este caso, la proteína de interés) y el anticuerpo primario inmovilizado en la placa de ensayo. A continuación, se realizaron 3 lavados con una disolución tampón de lavado para eliminar las moléculas no adheridas, y se añadió el anticuerpo secundario, que se encontraba a su vez enlazado a una determinada actividad enzimática capaz de generar un cambio en el color de la muestra. El conjugado se incubó durante 2 horas para favorecer la unión al complejo antígeno-anticuerpo primario y, tras 3 lavados con solución de lavado, se añadió el sustrato del enzima a cada pocillo. A lo largo de los 20 minutos de incubación posteriores, el color de la muestra fue virando en función de la concentración de la proteína problema, de manera que las muestras que contenían una mayor cantidad de proteína obtuvieron un color más intenso que

aquellas cuya concentración proteica era menor. Finalmente se añadió la solución requerida para finalizar la reacción y se determinó la densidad óptica de cada pocillo en un lector de placas (Multiscan PC, Thermo Scientific) a una longitud de onda de 450 nm, aplicándose una corrección en todas las muestras con una lectura de la densidad óptica a 540 nm.

### **3.7.2. Cuantificación de la concentración proteica**

La cuantificación de la concentración de la proteína de interés en cada muestra se realizó mediante la elaboración de una recta de calibrado. Para ello, se añadieron a la placa de ELISA concentraciones conocidas de la proteína a ensayar, por duplicado. Las muestras de la recta patrón se procesaron de manera idéntica a las muestras problema.

Para elaborar la recta estándar se representó la media de los valores obtenidos en la lectura de la densidad óptica frente a la concentración de proteína y se elaboró una recta de regresión lineal cuyo coeficiente de regresión  $r^2$  fue siempre superior a 0,99. La determinación de la concentración proteica en cada muestra problema se realizó por interpolación, en la recta de calibrado, de la medida de la densidad óptica registrada en cada caso, con ayuda de la ecuación obtenida para la recta estándar. Cada experimento se realizó por duplicado y las muestras se analizaron, como mínimo, por triplicado.

### **3.7.3. Cuantificación de los niveles de citoquinas y factores de crecimiento**

#### **3.7.3.1. Cuantificación de citoquinas antiadipogénicas**

Para la determinación de la concentración de citoquinas antiadipogénicas se emplearon cocultivos de células 3T3-L1 y MCF-7, tal y como se describe en el apartado 3.1. En este modelo *in vitro* se cuantificaron los niveles de las citoquinas TNF $\alpha$ , IL-6 e IL-11 mediante ELISA y se valoraron las diferencias de

concentración en función de los distintos tratamientos, que se encuentran detallados a lo largo de la descripción de los resultados.

### **3.7.3.2. Cuantificación de VEGF**

En el caso del estudio de la concentración del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), se emplearon células MCF-7. En líneas generales, las células MCF-7 se sembraron en placas de 96 pocillos (Falcon) a una densidad de  $1,5 \times 10^4$  células por pocillo en medio DMEM suplementado con 10% de SFB. Al día siguiente, se lavaron las células 2 veces con PBS y el medio se reemplazó por DMEM suplementado con 0,5% DCC, que se mantuvo durante 24 horas para permitir la secreción de VEGF. Al día siguiente, el medio de cultivo se recogió, se centrifugó para eliminar posibles partículas en suspensión y se utilizó para realizar un ensayo ELISA de cuantificación de la proteína VEGF en el medio de cultivo celular.

## **3.8. ENSAYO POR INMUNOABSORCIÓN COMPETITIVA**

Con un fundamento similar al del ELISA, este ensayo se basa en la competición entre las moléculas de prostaglandina  $E_2$  ( $PGE_2$ ) y  $PGE_2$ -acetilcolinesterasa (AChE) (trazador) por la unión a un anticuerpo monoclonal anti- $PGE_2$ . Dado que la concentración del trazador se mantiene constante, mientras que la concentración de  $PGE_2$  varía en función de la muestra, la cantidad del trazador que es capaz de unirse al anticuerpo será inversamente proporcional a la concentración de  $PGE_2$  en la muestra.

La determinación de la actividad ciclooxygenasa celular, definida por la síntesis de  $PGE_2$ , se realizó en la línea celular MCF-7. Las células se sembraron en placas de 12 pocillos a una densidad de  $1,5 \times 10^5$  células por pocillo y se mantuvieron en 10% SFB/DMEM durante 24 horas para favorecer su adhesión a la placa. A continuación se incubaron en medio sin suero, el cual se reemplazó 24 horas después por medio fresco suplementado con araquidonato sódico (un precursor de

la PGE<sub>2</sub>) y los tratamientos correspondientes. Tras 5 horas de incubación a 37 °C, se recogió el medio, se centrifugó para obtener una fracción libre de células y se almacenó a -70 °C hasta el momento de llevar a cabo el ensayo. Las muestras se añadieron a una placa de 96 pocillos por triplicado y se incubaron durante 18 horas a 4 °C con el fin de permitir la unión del complejo PGE<sub>2</sub>-anticuerpo al anticuerpo policlonal adherido a la superficie del pocillo. Una vez transcurrido el tiempo suficiente para favorecer la unión, se lavó la placa abundantemente con una disolución tampón de lavado para eliminar cualquier molécula no unida y, a continuación, se añadió el reactivo de Ellman, que contiene el sustrato de la AChE. La lectura de absorbancia se realizó en los 60 minutos subsiguientes.

El producto de la reacción enzimática mediada por la AChE presenta un color amarillo característico con un máximo de absorbancia a 412 nm. La intensidad del color, determinado espectrofotométricamente, es proporcional a la cantidad de trazador unido al pocillo, que es a su vez inversamente proporcional a la concentración de PGE<sub>2</sub> libre presente en la muestra. A todos los pocillos se les aplicó una corrección de la lectura de la densidad óptica al sustraerles el valor medio obtenido para las muestras blanco. La determinación de la concentración de PGE<sub>2</sub> presente en cada muestra se llevó a cabo con la ayuda de una recta patrón, para lo cual se añadieron a la placa concentraciones conocidas de PGE<sub>2</sub>. Las muestras de la recta patrón se procesaron de manera idéntica a las muestras problema.

### **3.9. CUANTIFICACIÓN DE LOS NIVELES DE AMPc INTRACELULARES**

La determinación de los niveles intracelulares de AMP cíclico (AMPc) se llevó a cabo en la línea celular MCF-7 mediante el kit comercial *Cyclic AMP [<sup>3</sup>H] Assay System* (Amersham Biosciences). El ensayo se basa en la competición entre el AMPc no marcado y una cantidad conocida de esta molécula marcada radiactivamente con tritio, que se une a una proteína con gran afinidad y especificidad. La concentración resultante del complejo tritado proteína-AMPc formado es inversamente proporcional a la cantidad de AMPc no marcado presente

en la muestra de manera que la medida de la radiactividad fijada en la proteína permite calcular la cantidad de AMPc en la muestra problema.

Las células MCF-7 se sembraron en placas de poliestireno de 60 x 15 mm (Falcon) a una densidad de  $3 \times 10^5$  células por pocillo en medio DMEM suplementado con 10% de SFB durante 3 días. Transcurrido ese tiempo, el medio se renovó por medio fresco y se añadieron los tratamientos correspondientes durante el tiempo que se indica en el apartado de resultados.

La extracción del AMPc intracelular se realizó mediante homogenización en una disolución tampón (20 mM Tris-HCl, 300 mM sucrosa, 1 mM EGTA, 5 mM EDTA, 5 mM DTT, 25  $\mu$ M leupeptina pH 7,4) para prevenir una posible degradación enzimática del AMPc. A continuación, las muestras se centrifugaron a 1700 x g durante 5 minutos a 4 °C y los sobrenadantes resultantes se incubaron a 100 °C durante 5 minutos para desnaturalizar la proteína. Tras una nueva centrifugación de 5 minutos a 1700 x g, se procedió a la cuantificación del AMPc, que se realizó por duplicado en alícuotas de 50  $\mu$ l de sobrenadante. A cada muestra se le añadieron 50  $\mu$ l de AMPc marcado y 100  $\mu$ l de la proteína de unión, los reactivos se mezclaron con el vórtex y se incubaron a 4 °C durante 2 horas. Para separar la proteína unida a AMPc del nucleótido no adherido, se añadieron 100  $\mu$ l de carbón activo a cada muestra, los reactivos se mezclaron con ayuda del vórtex y se centrifugaron a 1700 x g durante 5 minutos para sedimentar el carbón. De cada muestra se recogieron 200  $\mu$ l de sobrenadante a los que se añadieron 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 determinación de la concentración intracelular de AMPc en cada muestra se realizó mediante la elaboración de una recta de calibrado. Para ello, se ensayaron concentraciones conocidas de AMPc por duplicado. Las muestras de la recta patrón se procesaron de manera idéntica a las muestras problema. La cantidad de radiactividad medida en cada muestra se corrigió restando los valores blanco, que se obtuvieron de la incubación paralela de dos tubos de ensayo a los que se añadieron los reactivos en ausencia de AMPc. A modo de control, se incubaron dos tubos en presencia de todos los reactivos

excepto del AMPc no marcado y los valores obtenidos determinaron la cantidad de unión a la proteína en ausencia de AMPc no radiactivo.

### **3.10. 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, las células se fijaron en paraformaldehído al 4% (v/v) y la placa se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. A continuación se añadió el colorante *Oil Red O* y las células se incubaron 2 horas a temperatura ambiente. Tras 2 lavados con agua destilada, se eliminó la humedad de la placa mediante una incubación de 15 minutos a 65 °C y 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).

### **3.11. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD AROMATASA CELULAR**

#### **3.11.1. Medida directa de la actividad aromatasa**

La actividad aromatasa se evaluó en las líneas celulares 3T3-L1, HUVEC y cocultivos de 3T3-L1 y MCF-7 mediante el ensayo de liberación de agua tritiada. Este ensayo se basa en la formación de agua tritiada durante la aromatización de un sustrato androgénico marcado con <sup>3</sup>H, como es la [1β-3H(N)]-androst-4-ene-3,17-diona y es un método basado en el descrito por Ackerman y colaboradores en 1981.

El 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.

#### **3.11.1.1. Medida de la actividad aromatasa en células 3T3-L1**

Al final de los experimentos de diferenciación de adipocitos, las células 3T3-L1, tanto cultivadas en solitario como en cocultivos junto con células de la línea MCF-7, se incubaron en medio 5% DCC/DMEM en presencia del sustrato radiactivo [ $1\beta$ - $^3\text{H}(\text{N})$ ]-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 y el medio se transfirió a tubos que contenían 0,25 ml de ácido tricloroacético glacial al 30% (p/v) (Sigma-Aldrich). La muestra se mezcló con el vórtex y se centrifugó a 1700 x g durante 20 minutos. A continuación se recogió el sobrenadante y se extrajo con cloroformo (Sigma-Aldrich), se mezcló con el vórtex y se centrifugó de nuevo a 1700 x g durante 20 minutos. A la fase acuosa resultante se le añadió DCC al 10% (Sigma-Aldrich), se mezcló con el vórtex y se centrifugó a 1700 x g durante 20 minutos. 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%.

### **3.11.1.2. Medida de la actividad aromatasa en células HUVEC**

Para determinar la actividad aromatasa celular en la línea HUVEC se siguió el procedimiento mencionado anteriormente con algunas modificaciones. Al inicio del experimento, las células HUVEC se sembraron en botellas de plástico de 75 cm<sup>2</sup> (Falcon) en medio VCBM suplementado con 2% SFB. En el momento en que las células alcanzaron una confluencia del 80%, se aspiró el medio y se cambió por medio VCBM sin suero que contenía el sustrato radiactivo [ $1\beta$ -<sup>3</sup>H(N)]-androst-4-ene-3,17-diona a una concentración de 300 nM (NEN Life Sciences Products) y de 75 a 80 Ci/nM, junto con los tratamientos correspondientes.

### **3.11.2. Medida indirecta de la actividad aromatasa**

Una forma de analizar de manera indirecta la actividad aromatasa en la línea celular HUVEC consistió en la medida de la proliferación celular en medio libre de estrógenos en presencia de testosterona. Bajo estas condiciones, el crecimiento celular depende de la transformación de andrógenos en estrógenos realizada por la actividad del enzima aromatasa en las células.

Para ello, las células HUVEC se sembraron en placas de cultivo de 96 pocillos (Falcon) a una densidad de  $7 \times 10^3$  células/pocillo en medio VCBM suplementado con 2% de SFB. Una vez que las células se encontraron totalmente adheridas a la placa, el medio se reemplazó por VCBM suplementado con 2% DCC en presencia de los tratamientos correspondientes. La proliferación celular se evaluó a los 3 días de cultivo mediante el método del MTT.

### 3.12. ENSAYOS DE MIGRACIÓN CELULAR

Los ensayos para evaluar la capacidad de migración se realizaron en la línea celular HUVEC según el protocolo descrito por Sato y Rifkin (1988) con algunas modificaciones. Para ello, se sembraron células HUVEC en placas de cultivo de 60 x 15 mm (Falcon) en medio VCBM suplementado con 2% de suero. Cuando las células se encontraron adheridas formando una monocapa confluyente, se realizó una incisión longitudinal de aproximadamente 200 µm de ancho sobre la monocapa, con la ayuda de una punta de pipeta. Las células se lavaron 2 veces con PBS para eliminar los posibles restos celulares, y a continuación se añadió medio 2% SFB/VCBM junto con los tratamientos correspondientes. La migración celular se monitorizó en 4 campos seleccionados al azar a lo largo de la línea de incisión en cada placa, con ayuda de una cámara ORCA R2 (Hamamatsu Photonics) conectada a un microscopio Nikon Eclipse-Ti (Werfen Group), que tomó fotografías cada 10 minutos durante todo el curso del experimento a un aumento de 10X. El ensayo se consideró finalizado en el momento en que las células del grupo control completaron el proceso de migración y la incisión se encontró completamente cerrada, lo que ocurrió aproximadamente 8 horas después del inicio del experimento. La migración celular se cuantificó midiendo el tamaño inicial y final de la incisión con la ayuda del *software* Nis Elements v.3.8. Para determinar la distancia recorrida por las células se utilizó la fórmula siguiente:

$$\text{distancia} = (\text{tamaño inicial de la incisión (tiempo 0h)} - \text{tamaño final (tiempo 8 h)}) / 2.$$

### 3.13. ENSAYOS DE INVASIÓN

Para estudiar la capacidad de invasión de las células endoteliales HUVEC, se utilizó el kit comercial *In vitro Angiogenesis Assay Endothelial Cell Invasion* (Cultrex, Trevigen Inc), siguiendo las instrucciones del proveedor. El ensayo se basa en evaluar la capacidad de las células endoteliales para atravesar una matriz semejante a la membrana basal extracelular en respuesta a un estímulo quimiotáctico. Para ello, el kit emplea una placa de 96 pocillos con un diseño similar al de una cámara Boyden, la cual presenta una cámara superior de invasión

comunicada con la cámara inferior por una membrana de polietilén tereftalato (PET) de 8  $\mu\text{m}$  de grosor cubierta de una matriz extracelular sintética, lo que permite el paso de las células hacia la cámara inferior en respuesta a un estímulo quimiotáctico. La detección y cuantificación de la invasión se realiza mediante la lectura de la cámara en un lector de placas de fluorescencia. La adición previa de una disolución de Calceína-Acetometiléster (Calceína-AM) aporta a las células la fluorescencia necesaria para su detección. La Calceína-AM es un compuesto hidrofóbico y no fluorescente capaz de atravesar fácilmente la membrana plasmática celular. Una vez en el citoplasma, las esterasas intracelulares hidrolizan la fracción acetometiléster generando calceína libre, un compuesto hidrofílico y estable en el citoplasma, que gracias a la fluorescencia que emite, permite cuantificar el número de células que han migrado hacia la cámara inferior.

El primer paso en el desarrollo del experimento consistió en cubrir la cámara superior de invasión de la placa de 96 pocillos con una solución de extracto de membrana basal *Basement Membrane Extract* (BME) a una densidad de 80  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , que se incubó a 37  $^{\circ}\text{C}$  durante toda la noche para permitir su polimerización. La solución BME es una mezcla de compuestos presentes en la membrana basal extracelular y que incluye, entre otras proteínas, laminina I, colágeno IV, entactina y proteoglicanos. Al día siguiente, se sembraron las células HUVEC sobre la matriz BME en medio VCBM sin suero a una densidad de  $2 \times 10^4$  células por pocillo. Sobre la cámara inferior se añadió medio VCBM sin suero junto con 100 ng/ml de VEGF (R&D Systems Europe Ltd.) y los tratamientos correspondientes. Las células se incubaron 48 horas a 37  $^{\circ}\text{C}$  para permitir su migración a través de la membrana basal sintética. Transcurrido ese tiempo, se lavaron con una solución de lavado y se incubaron durante 1 hora con una disolución de 2  $\mu\text{m}$  de Calceína-AM. Finalmente, se leyó la fluorescencia de la cámara inferior en un lector de placas BioRad Personal Molecular Imager FX (BioRad Laboratories Inc) a una longitud de onda de 485 nm de excitación y 520 nm de emisión con ayuda del *software* Image Reader FLA-5000 series v. 1.0 (Fuji Photo Film CO. LTD). Los resultados se expresaron en Unidades Arbitrarias de Fluorescencia (RFU). Las lecturas se corrigieron restando los valores blanco a cada muestra, que se obtuvieron a partir de los valores de fluorescencia obtenidos en pocillos que no contenían células.

### 3.14. ENSAYOS DE TUBULOGÉNESIS

El proceso de angiogénesis, o formación de tejido vascular requiere, en un primer momento, un aumento en la proliferación de las células endoteliales, seguido de un reordenamiento y alineación posteriores para generar estructuras tubulares con una luz central, que en último término, darán lugar a los nuevos vasos sanguíneos. Los estudios de tubulogénesis se realizaron en células de la línea endotelial HUVEC utilizando el kit *In vitro Angiogenesis Assay Kit Tube Formation* (Cultrex, Trevigen Inc), siguiendo las instrucciones del proveedor. Para ello, se utilizó el extracto proteico de membrana basal RGF-BME (*Reduced Growth Factor Basement Membrane Extract*), purificado de tumor Engelbreth-Holm-Swarm murino y que mimetiza las condiciones del medio extracelular. Esta mezcla proteica solidifica a temperatura ambiente para formar una matriz compuesta principalmente por laminina, colágeno IV, entactina y heparina sulfato. El ensayo se basa en la capacidad de las células HUVEC para organizarse formando estructuras similares a túbulos cuando se encuentran en un entorno adecuado. La matriz BME proporciona todos los componentes extracelulares que las células endoteliales necesitan para desarrollar su actividad angiogénica.

Para evaluar la influencia de distintos tratamientos sobre la capacidad angiogénica de las células HUVEC, se llevaron a cabo 2 protocolos diferentes en los que se valoró la capacidad de formar y disgregar túbulos, según se describe a continuación.

#### 3.14.1. Formación de túbulos

Inicialmente, se añadió la solución de matriz BME a una placa de 24 pocillos (Falcon) y se dejó polimerizar durante 1 hora a 37 °C. Mientras tanto, se añadió una solución de Calceína-AM 2 µM a una placa de cultivo de 10 cm de diámetro (Falcon) con células HUVEC formando una monocapa preconfluyente y se incubó durante 30 minutos a 37 °C. A continuación, las células se incubaron con una solución de tripsina-EDTA durante 5 minutos para despegarlas de la superficie de la placa, se recogieron con medio 2% SFB/VCBM y se centrifugaron a 100 x g durante 5

minutos. Una vez aspirado el medio, las células se resuspendieron en medio fresco y se contaron en una cámara de Neubauer, para sembrarlas a continuación sobre la superficie de la matriz BME a una densidad de  $1 \times 10^5$  células/ pocillo en medio 2% SFB/VCBM junto con los tratamientos correspondientes. Finalmente, tras una incubación de 5 horas durante las que se formaron las estructuras tubulares, se tomaron fotografías de distintos campos escogidos al azar en cada uno de los pocillos con una cámara Nikon Sight DS-SML1 (Sendai Nikon Corporation) unida a un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse TS100 (Kurobane Nikon Co Ltd) utilizando un aumento de 4x. La longitud de la red tubular se cuantificó en cada uno de los campos con ayuda del *software* ImageJ 1.45S.

#### **3.14.2. Disgregación de túbulos**

Para los estudios de disgregación de estructuras tubulares, se sembraron las células de un modo idéntico al mencionado en el apartado de formación de túbulos en una multiplaca de 24 pocillos cubiertos con matrigel (B.D. Biosciences) y se incubaron durante 5 horas para permitir la formación de túbulos. Transcurrido este tiempo, se añadieron los tratamientos correspondientes y 4 horas después, se tomaron fotografías de los distintos campos escogidos al azar en cada pocillo con ayuda de una cámara Nikon Sight DS-SML1 (Sendai Nikon Corporation) unida a un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse TS100 (Kurobane Nikon Co Ltd) utilizando un aumento de 4x. La longitud de la red tubular en cada imagen se cuantificó con el *software* ImageJ 1.45S.

#### **3.15. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS**

Todos los estudios estadísticos fueron realizados utilizando el programa GraphPad Prisma 4.0 (GraphPad Software). Los análisis 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; o bien tests t de Student no paramétricos para analizar diferencias entre dos únicas variables 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 Y DISCUSIÓN**

---

---



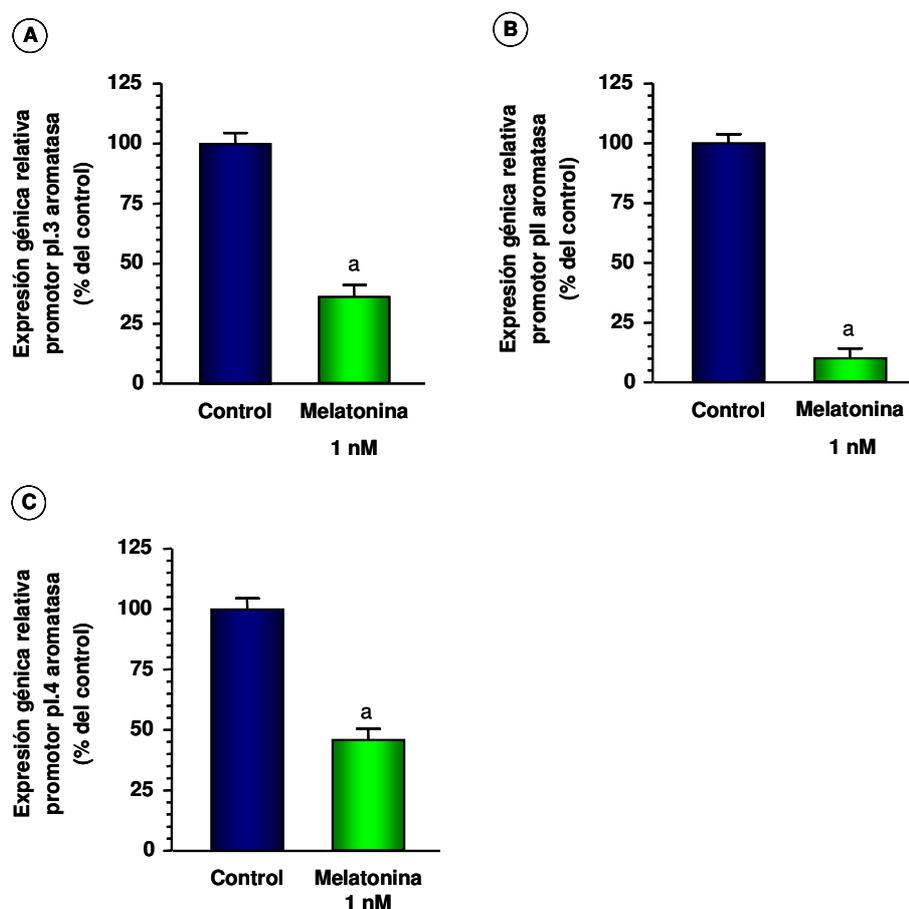
## **4.1. ESTUDIO DE LOS MECANISMOS A TRAVÉS DE LOS CUALES LA MELATONINA REGULA LA EXPRESIÓN Y ACTIVIDAD DE LA AROMATASA EN CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA**

Las acciones oncostáticas de la melatonina, especialmente su efecto inhibitor sobre la aromatasa en el tejido tumoral mamario, han sido ampliamente descritas en la literatura científica. La regulación de este enzima es compleja y su especificidad de tejido está regulada por la expresión de varios promotores alternativos. Las células de tumor mamario presentan un patrón de expresión del gen de la aromatasa diferente al de las células de la mama sana, lo que resulta en unos altos niveles del enzima. La Prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), producida por el enzima ciclooxigenasa (COX), está directamente relacionada con la regulación de la expresión génica de la aromatasa en el cáncer de mama. Como punto de partida de este trabajo, nos pareció interesante estudiar el papel de la hormona pineal en la modulación de la expresión del gen que codifica para la aromatasa a través del control directo de sus promotores específicos, así como de otros genes implicados en la regulación de este enzima. Para ello tomamos como modelo *in vitro* la línea celular MCF-7 derivada de tumor mamario.

### **RESULTADOS**

#### **4.1.1. La melatonina inhibe la expresión mediada por los promotores pl.3, pl.4 y pl.5 del gen *CYP19* en células MCF-7**

El paso inicial de este trabajo consistió en estudiar el efecto de la melatonina en la regulación de la expresión de los distintos promotores del gen de la aromatasa en células MCF-7. Con este objetivo, se realizaron experimentos de expresión génica mediante RT-PCR a tiempo real con oligonucleótidos específicos de cada uno de los promotores pl.3, pl.4 y pl.5 del gen *CYP19*. Tal como se aprecia en la **figura 4.1**, el tratamiento con melatonina, a concentración fisiológica (1 nM) supuso una inhibición de entre el 55 y el 80% de la expresión de la aromatasa específica de cada uno de los promotores estudiados.

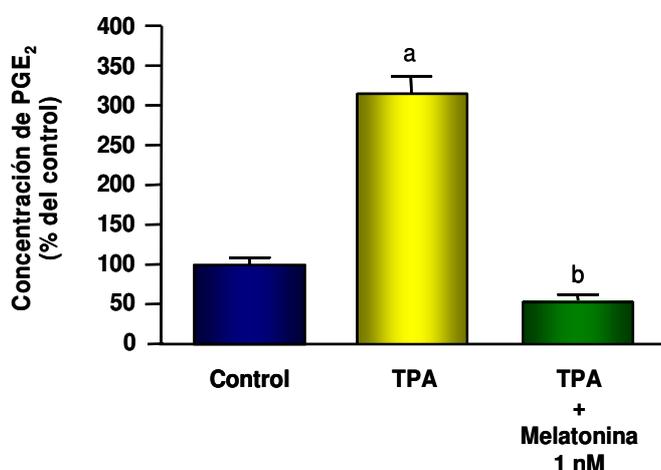


**Figura 4.1.** Efecto de la melatonina en la expresión de los promotores pl.3, pll y pl.4 del gen *CYP19* en células MCF-7. Las células se incubaron en 0,5% DCC/DMEM, en presencia de melatonina (1 nM) o etanol (vehículo) durante 2 horas. El análisis de la expresión génica de los promotores pl.3 (A), pll (B) y pl.4 (C) se realizó mediante PCR a tiempo real. Los resultados se expresaron como el porcentaje de expresión con respecto al grupo control. a,  $P < 0,001$  vs control.

#### 4.1.2. La melatonina inhibe la actividad ciclooxygenasa en células MCF-7

La producción de  $PGE_2$ , dependiente de la actividad ciclooxygenasa, juega un papel importante en la regulación de la expresión diferencial de los promotores de la aromatasa en las células tumorales mamarias. Con el objeto de evaluar el efecto de la melatonina sobre la actividad ciclooxygenasa, definida como la síntesis y liberación de  $PGE_2$  al medio, se realizó un ensayo de inmunoabsorción competitiva (EIA) con el que se determinaron los niveles de  $PGE_2$  en el medio de cultivo de células MCF-7. Los resultados obtenidos se muestran en la **figura 4.2**. Los niveles

de PGE<sub>2</sub> fueron bajos pero detectables. Tras añadir al cultivo ácido araquidónico como precursor de la síntesis de la prostaglandina, observamos que la incubación de las células con tetradecanoil forbol acetato (TPA) (10 nM), un compuesto estimulador de la actividad ciclooxigenasa, produjo un fuerte incremento en la concentración de PGE<sub>2</sub> liberada al medio. Por su parte, la adición de melatonina (1 nM) revirtió el efecto estimulador de la actividad del enzima COX inducido por la presencia de TPA.

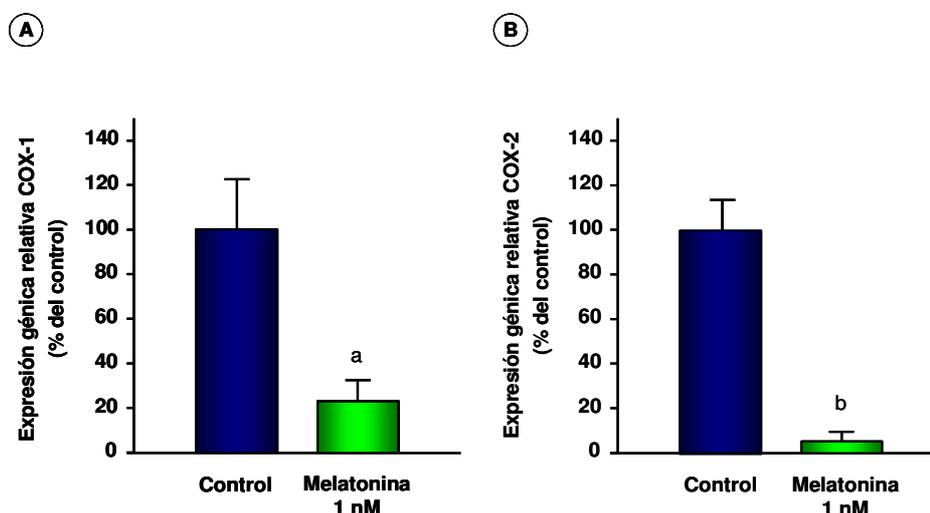


**Figura 4.2. Efecto de la melatonina sobre la actividad ciclooxigenasa en células MCF-7.** Las células MCF-7 se cultivaron en medio DMEM sin suero suplementado con araquidonato sódico (100  $\mu$ M) en presencia de TPA (10 nM), melatonina (1 nM) o una combinación de ambos compuestos. Tras 5 horas de incubación, el medio se recogió y se midió la concentración de PGE<sub>2</sub> mediante un ensayo por inmunoabsorción competitiva (EIA). a, P<0,001 vs control; b, P<0,001 vs TPA.

#### 4.1.3. La melatonina inhibe la expresión de COX-1 y COX-2 en células MCF-7

Una vez que hemos comprobado el efecto inhibitor que la melatonina ejerce sobre la actividad ciclooxigenasa celular, nuestro siguiente objetivo consistió en evaluar la expresión de los genes COX-1 y COX-2 que codifican este enzima y su posible modulación por parte de la hormona pineal. Para ello, se realizaron una serie de experimentos de RT-PCR a tiempo real con oligonucleótidos específicos para cada uno de los enzimas COX-1 y COX-2 en células MCF-7, incubadas en presencia y ausencia de melatonina (1 nM). Como puede apreciarse en la **figura**

4.3, concentraciones fisiológicas de melatonina (1 nM) inhibieron significativamente la expresión de los enzimas COX-1 y COX-2 con respecto al grupo control.

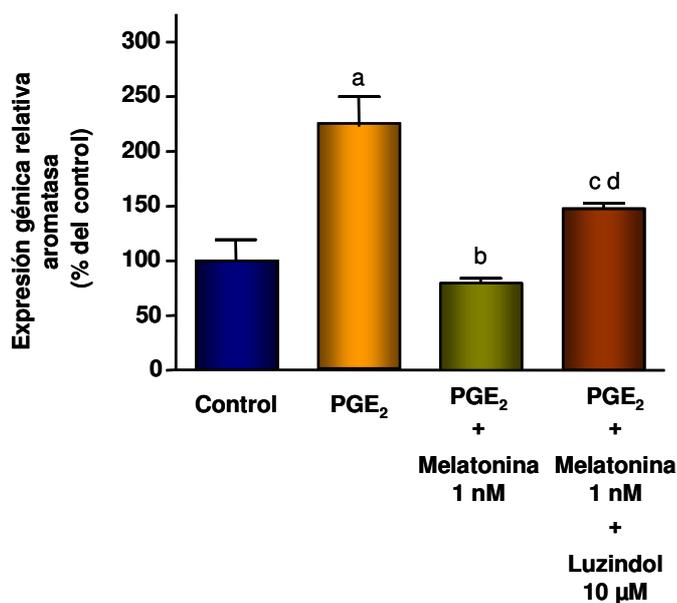


**Figura 4.3. Efecto de la melatonina en la expresión génica de COX-1 y COX-2 en células MCF-7.** Las células MCF-7 se incubaron en 0,5% DCC/DMEM en presencia o ausencia de melatonina (1 nM) durante 2 horas. La expresión génica de COX-1 (A) y COX-2 (B) se cuantificó mediante PCR a tiempo real. Los resultados se representaron como el porcentaje de expresión con respecto al grupo control. a,  $P < 0,005$  vs control; b,  $P < 0,001$  vs control.

#### 4.1.4. La melatonina inhibe la expresión del gen de la aromatasa inducida por PGE<sub>2</sub> en células MCF7

En un siguiente paso, nos planteamos valorar si la hormona pineal era capaz de revertir, en células MCF-7, el efecto estimulador de la expresión del gen de la aromatasa inducido por PGE<sub>2</sub>, un compuesto conocido por su capacidad para incrementar la expresión del gen *CYP19*. En este caso, las células se incubaron en presencia de los distintos tratamientos objeto de estudio (PGE<sub>2</sub>, melatonina y luzindol) para valorar, a continuación, la expresión del gen de la aromatasa tomando como referencia la expresión basal obtenida en el grupo control (**figura 4.4**). La adición de PGE<sub>2</sub> estimuló, como era de esperar, la expresión del gen *CYP19* de manera significativa. Sin embargo, cuando las células se incubaron simultáneamente con PGE<sub>2</sub> (10  $\mu$ M) y melatonina (1 nM), la expresión génica de la

aromatasa descendió significativamente con respecto a la obtenida en el grupo de células tratadas con PGE<sub>2</sub>, registrándose unos valores de expresión similares a los del grupo control. La adición de luzindol (10 μM), un antagonista de la melatonina que se une a su receptor de membrana, en combinación con el tratamiento de las células con PGE<sub>2</sub> (10 μM) y melatonina (1 nM), revirtió el efecto inhibitorio producido por la melatonina.



**Figura 4.4. Efecto de la melatonina sobre la expresión del gen *CYP19* inducida por PGE<sub>2</sub> en células MCF-7.** Las células se incubaron en medio DMEM suplementado con 0,5% DCC y posteriormente fueron tratadas con PGE<sub>2</sub> (10 μM) en presencia o ausencia de melatonina (1 nM) y luzindol (10 μM). La expresión génica de la aromatasa se cuantificó mediante PCR a tiempo real. Los resultados se representaron como el porcentaje de expresión con respecto al grupo control. a, P<0,001 vs control; b, P<0,001 vs PGE<sub>2</sub>; c, P<0,05 vs PGE<sub>2</sub>; d, P<0,05 vs PGE<sub>2</sub>+melatonina.

#### 4.1.5. La melatonina disminuye los niveles intracelulares de AMPc, lo que se correlaciona con la inhibición de la expresión del gen *CYP19* en células MCF-7

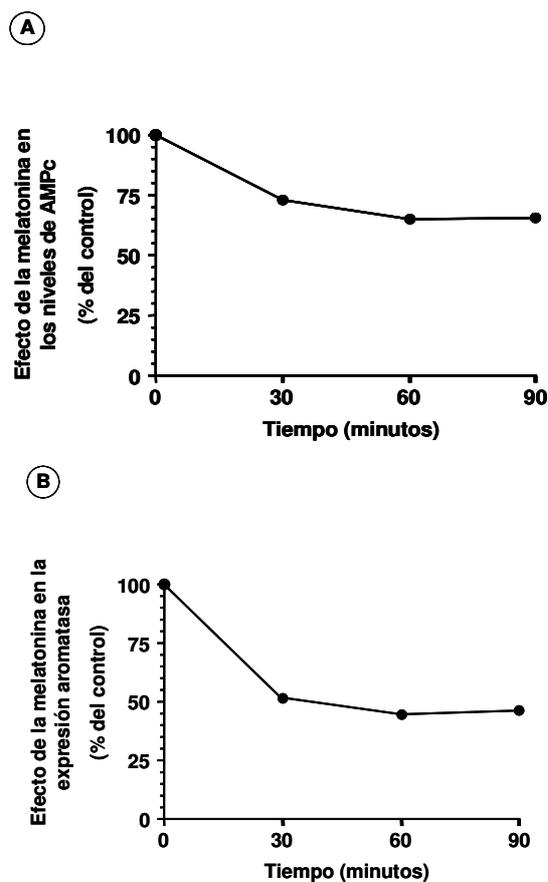
Finalizamos los experimentos correspondientes a este objetivo estudiando el posible efecto de la melatonina sobre los niveles intracelulares de AMP cíclico (AMPc) y su correlación con la expresión del gen de la aromatasa en células de la línea MCF-7. Dichas células, se incubaron durante un total de 90 minutos en

presencia de melatonina (1 nM) y se midió la concentración de AMPc intracelular cada 30 minutos según se describe en el apartado de material y métodos. Además, y de forma paralela, se realizaron experimentos de expresión del gen de la aromatasa, en los que se cuantificó dicha expresión en células MCF-7 tratadas con melatonina (1 nM) o etanol (vehículo) cada 30 minutos durante los 90 minutos en los que transcurrió el experimento. Como se muestra en la **figura 4.5 (A)**, el tratamiento con melatonina (1 nM) produjo un descenso en función del tiempo en la formación de AMPc, obteniéndose los menores valores de concentración de la molécula a los 60 minutos de tratamiento. Paralelamente, se redujo también la expresión aromatasa cuando las células fueron sometidas a un tratamiento con concentraciones fisiológicas de melatonina (1 nM), **figura 4.5 (B)**, obteniéndose el menor nivel de expresión a los 60 minutos de tratamiento, lo que coincide a su vez con la menor concentración de AMPc intracelular.

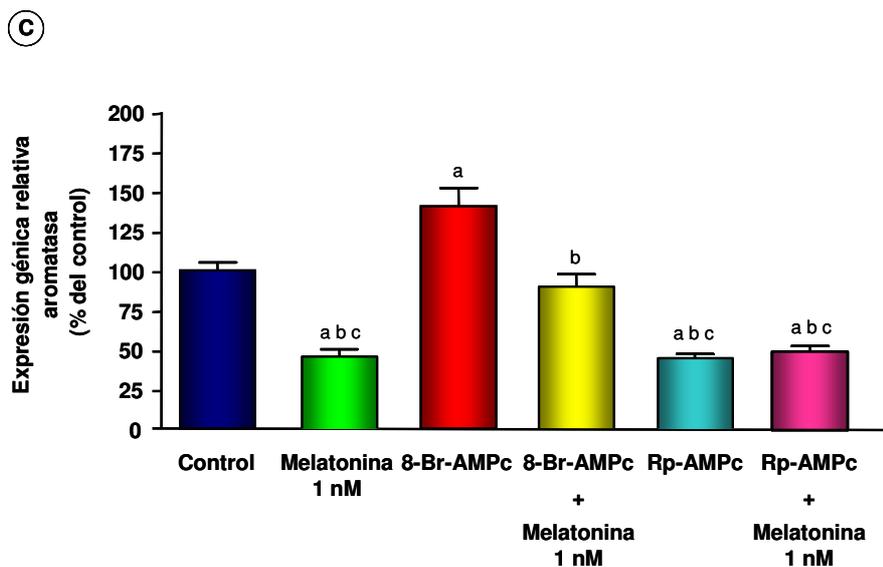
Con el fin de corroborar que el efecto de la melatonina sobre la expresión del gen de la aromatasa era dependiente de la variación de los niveles intracelulares de AMPc inducidos por esta hormona, se llevaron a cabo experimentos de expresión del gen de la aromatasa en células MCF-7 tratadas con compuestos que mimetizan el efecto de la melatonina, en el caso del RP-AMPc, o que lo antagonizan, como es el caso del 8-Br-AMPc. El RP-AMPc es un análogo del AMPc en el cual uno de los 2 átomos de oxígeno del anillo del nucleótido está reemplazado por azufre. Esto lo convierte en un inhibidor competitivo del AMPc, pues se une a las kinasas dependientes de este nucleótido impidiendo su activación, y por tanto la amplificación de la señal intracelular. Por su parte el 8-Br-AMPc es un análogo del AMPc que presenta un átomo de bromo en sustitución de un hidrógeno del anillo de fosfato. En consecuencia, esta molécula es capaz de activar de manera constitutiva a las kinasas dependientes de AMPc, y por tanto antagoniza el efecto intracelular de la melatonina.

En la **figura 4.5 (C)** se pueden observar los resultados obtenidos. El tratamiento con melatonina, en concordancia con los resultados presentados en el apartado anterior, inhibió significativamente la expresión génica de la aromatasa. La incubación de las células con 8-Br-AMPc (1  $\mu$ M) (análogo del AMPc), produjo un

aumento en la expresión del gen de la aromatasa, mientras que la adición conjunta de melatonina (1 nM) consiguió revertir el efecto estimulador de la expresión ejercido por 8-Br-AMPC. Por otro lado, cuando se trataron las células con el inhibidor de la activación por AMPC celular Rp-AMPC (1  $\mu$ M), se obtuvieron niveles de expresión similares a aquellos encontrados tras el tratamiento con melatonina (1 nM). La adición simultánea de estos dos compuestos no tuvo efectos aditivos.



**Figura 4.5. Efecto de la melatonina sobre la concentración de AMPC intracelular y correlación con la expresión del gen *CYP19* en células MCF-7.** (A) Las células se sembraron en medio 10% SFB/DMEM en presencia de melatonina (1 nM) o etanol durante 90 minutos. Durante el transcurso del experimento, se determinó la concentración de AMPC intracelular mediante un ensayo por inmunoabsorción competitiva en los tiempos indicados. Los resultados se expresaron como el porcentaje de concentración de AMPC con respecto al grupo control. (B) Las células se incubaron en medio 0,5% DCC/DMEM y se trataron con melatonina (1 nM) o etanol durante los tiempos indicados. La expresión génica de la aromatasa se cuantificó mediante PCR a tiempo real. Los datos se expresaron como el porcentaje de expresión con respecto al grupo control.



**Figura 4.5. Efecto de la melatonina sobre la concentración de AMPc intracelular y correlación con la expresión del gen *CYP19* en células MCF-7.** (C) Las células se incubaron en medio 0,5%DCC/DMEM y se trataron con melatonina (1 nM), 8 Br-AMPC (1 $\mu$ M), Rp-AMPC (1  $\mu$ M) o una combinación de ambos durante 2 horas. La expresión génica de la aromatasa se cuantificó mediante PCR a tiempo real. Los datos se representaron como el porcentaje de expresión con respecto al grupo control. a,  $P < 0,05$  vs control; b,  $P < 0,05$  vs 8-Br-AMPC; c,  $P < 0,05$  vs 8-Br-AMPC+melatonina 1 nM.

## **DISCUSIÓN**

La importancia de los estrógenos en la formación y crecimiento de los tumores mamarios está totalmente establecida en la literatura científica (Russo y Russo, 1998; Germain, 2011). La síntesis local de estrógenos adquiere una especial relevancia en el caso de las mujeres postmenopáusicas, cuyos ovarios han dejado de ser funcionales y en las que la única fuente de estrógenos proviene de la biosíntesis en los tejidos extraováricos, especialmente en el tejido mamario. Esta biosíntesis de estrógenos *in situ* depende de la actividad de una serie de enzimas capaces de transformar andrógenos en estrógenos así como compuestos de baja actividad estrogénica en formas más activas. De entre ellos, la aromatasa es el enzima clave en la síntesis de estas hormonas.

La melatonina es una hormona con la que hemos trabajado ampliamente en nuestro grupo en los últimos años y que, principalmente a través de sus efectos antiestrogénicos, ejerce acciones oncostáticas y antiproliferativas en tumores mamarios hormono-dependientes y en células ER+, como son las MCF-7 (Cos y cols., 1991; Rato y cols., 1999; Winczyck y cols., 2002; Sánchez-Barceló y cols., 2005) y en tumores mamarios inducidos por agentes químicos (Cos y cols., 2006). En este primer bloque de resultados nos propusimos profundizar en los mecanismos responsables de la actividad moduladora de la melatonina sobre la expresión génica de la aromatasa en las células tumorales mamarias. Para ello, quisimos estudiar el efecto de la melatonina sobre los diferentes promotores del gen de la aromatasa así como la influencia de esta hormona en las vías de síntesis de PGE<sub>2</sub>, una molécula implicada en la regulación de la expresión diferencial de los promotores del gen *CYP19*.

El análisis de la expresión de los promotores pl.3, pl.1 y pl.4 de la aromatasa en células MCF-7 mostró que la melatonina, a concentración fisiológica (1nM) inhibió la expresión de todas las regiones promotoras analizadas. Resultados previos de nuestro laboratorio habían puesto de manifiesto la capacidad de la melatonina para inhibir la expresión génica y la actividad del enzima aromatasa tanto en experimentos *in vitro* en células MCF-7 (Cos y cols., 2005) como *in vivo* en ratas con

tumores mamarios inducidos químicamente (Cos y cols., 2006). La regulación del gen de la aromatasa es compleja y está basada en la activación de una serie de promotores alternativos, sobre los que la melatonina parece tener un papel regulador, a la vista de los resultados que hemos obtenido. En concreto, el promotor pII fue el que manifestó una expresión más abundante en las células MCF-7, en comparación con los promotores pl.3 y pl.4, siendo el efecto inhibitor de la hormona pineal más potente precisamente sobre la región promotora pII. Durante la carcinogénesis, los promotores pII y pl.3 se encuentran activados y son responsables del notable incremento de la expresión aromatasa tanto en el epitelio del tumor como en los fibroblastos del tejido adiposo adyacente. Nuestros resultados muestran que la melatonina fue capaz de modular la expresión del gen de la aromatasa en células MCF-7 a través de la inhibición de los promotores pII y pl.3, responsables de la sobreexpresión del gen de la aromatasa en las células tumorales mamarias. A pesar de que el promotor pl.4 tiene una importancia menor en el caso de los tumores de mama, las células MCF-7 expresan dicho promotor, que se encuentra regulado mayoritariamente por la acción combinada de glucocorticoides y citoquinas de clase I y cuya expresión se vio reducida por la incubación de las células con melatonina.

Durante el proceso de carcinogénesis, el mecanismo regulador de la expresión del gen de la aromatasa se ve alterado, por lo que pasa de tener una expresión reducida y mediada por el promotor pl.4 en la mama normal a una sobreexpresión inducida por los promotores pII y pl.3. La activación de ambos promotores se encuentra regulada directamente por AMPc o bien por factores que regulan vías de señalización en las que el AMPc está implicado (Bulun y cols., 2005; Chen y cols., 2009). Uno de estos factores reguladores es el lípido bioactivo PGE<sub>2</sub>, producto de la actividad del enzima ciclooxigenasa.

A pesar de que ya era conocida la sobreexpresión de los enzimas COX en tumores mamarios humanos (Parrett y cols., 1997; Hwang y cols., 1998), no fue hasta 1999 cuando Brueggemeier y colaboradores propusieron la existencia de una relación entre ciclooxigenasas y aromatasa mediante un trabajo en el que mostraban la existencia de una asociación entre la expresión génica de ambos

enzimas en pacientes de cáncer de mama. Trabajos posteriores corroboraron esta asociación en muestras de tumores humanos (Brodie y cols., 2001).

Díaz-Cruz y colaboradores (2005) han propuesto un modelo que explicaría con más detalle el fundamento de la relación existente entre la aromatasa y los enzimas COX. En dicho modelo se sugiere que unos niveles elevados tanto de expresión como de actividad ciclooxigenasa darían lugar a una biosíntesis elevada de PGE<sub>2</sub>. Esta molécula, mediante un mecanismo autocrino, daría lugar a una cascada de señalización intracelular que incrementaría los niveles de AMPc en el citoplasma, lo que resultaría, en último término, en la activación de los promotores p11 y p1.3 de la aromatasa.

Los resultados que hemos obtenido en este estudio muestran que los niveles de PGE<sub>2</sub> detectados en el medio de las células MCF-7 se incrementaron notablemente al añadir TPA, un compuesto estimulador de la actividad ciclooxigenasa celular, mientras que la melatonina consiguió revertir el efecto estimulador producido por TPA, disminuyendo la concentración de PGE<sub>2</sub> hasta niveles similares a los encontrados en el grupo control. De forma similar, la melatonina consiguió reducir significativamente la expresión génica de los enzimas COX-1 y COX-2. Este resultado apunta a un posible papel de la melatonina en la regulación tanto de la actividad ciclooxigenasa como de la expresión de los enzimas COX-1 y COX-2, lo que coincide con estudios publicados posteriormente por otros autores (Wang y cols., 2012). Estudios recientes basados en modelos bioinformáticos han propuesto que la melatonina podría inhibir la actividad ciclooxigenasa tanto de COX-1 como de COX-2 mediante la unión al sitio activo de ambas isoformas (De la Rocha y cols., 2007). Otros autores han contribuido a corroborar las acciones antiinflamatorias de la melatonina, que se producen mediante la inhibición del enzima COX-2 en otras líneas celulares, bien en cultivos *in vitro* de células C6 de glioma (Esposito y cols., 2008) o en macrófagos (Mayo y cols., 2005).

Nuestros resultados demuestran que la melatonina fue capaz de contrarrestar el aumento de la expresión del gen de la aromatasa inducido tras la incubación con

PGE<sub>2</sub>, y este efecto inhibitor fue revertido tras la adición de luzindol, un antagonista de la melatonina que se une a su receptor de membrana. Este resultado sugiere que la melatonina ejerce su efecto inhibitor sobre la transcripción del gen de la aromatasa en un mecanismo mediado por su receptor de membrana.

Se ha demostrado en distintas líneas celulares que la unión de la melatonina a su receptor de membrana provoca la inhibición de la adenilato ciclasa, disminuyendo los niveles de AMPc en el citoplasma celular (Godson y Reppert, 1997; Kiefer y cols., 2002). Concretamente, en células MCF-7, la melatonina es capaz de revertir el aumento en la concentración de AMPc inducido por forskolina (Kiefer y cols., 2002). Dado que los principales promotores que dirigen la expresión del gen de la aromatasa en células tumorales mamarias están regulados por AMPc (Bulun y cols., 2005; Chen y cols., 2009), nos pareció interesante analizar la capacidad de la melatonina para modular los niveles de AMPc en el citoplasma de las células MCF-7, así como comprobar la relación existente entre estos niveles de AMPc y la expresión del gen de la aromatasa. Nuestros resultados indican que la acción inhibitor de la melatonina sobre los niveles de AMPc intracelulares sigue un patrón temporal, que coincide con la inhibición ejercida sobre la expresión del gen de la aromatasa. Además, el tratamiento con melatonina inhibió la expresión del gen de la aromatasa a unos niveles similares a los encontrados tras la incubación de las células con Rp-AMPc, un antagonista del AMPc, mientras que la adición de melatonina contrarrestó el efecto estimulador de la expresión del gen de la aromatasa ejercido por el análogo del AMPc 8-Br-AMPc. Estos resultados parecen indicar que la melatonina actúa, al menos en parte, mediante un mecanismo en el que está implicada la vía de señalización mediada por AMPc.

Todos estos resultados, en conjunto, ponen de manifiesto la capacidad de la melatonina para regular la producción de estrógenos en las células tumorales mamarias a través de la regulación de la expresión del gen de la aromatasa y de algunos de sus promotores. El mecanismo que proponemos se basa en que la melatonina, a través de su efecto modulador sobre la expresión y actividad de los enzimas COX, sería capaz de inhibir la producción de PGE<sub>2</sub>. Unos bajos niveles de PGE<sub>2</sub> se traducirían en una concentración moderada de AMPc intracelular, lo que a

su vez dificultaría la activación de los promotores p11 y p1.3 de la aromatasa, dando lugar, en último término, a una menor biosíntesis de estrógenos y por tanto obstaculizando crecimiento del tumor. Este efecto se conseguiría además mediante la acción directa de la melatonina sobre los niveles de AMPc intracelulares, mediada por su unión al receptor de membrana MT<sub>1</sub>, y que impediría de esta forma la activación de los promotores p11 y p1.3 de la aromatasa.



## **4.2. ESTUDIO DE LA CAPACIDAD DE LA MELATONINA PARA MODULAR LA ADIPOGÉNESIS Y LA SÍNTESIS DE ESTRÓGENOS EN FIBROBLASTOS DEL TEJIDO ADIPOSO**

El tejido adiposo es el principal responsable de la producción de estrógenos en el tejido adyacente al tumor. Los fibroblastos indiferenciados presentan una mayor expresión del enzima aromatasa, y por tanto ven aumentada su capacidad de aportar estrógenos al medio con respecto a los adipocitos diferenciados. Es por esto que las células epiteliales tumorales utilizan diversos mecanismos para inhibir la diferenciación de los preadipocitos así como para estimular su expresión y actividad aromatasa, en un fenómeno conocido como reacción desmoplásica. Las acciones antiaromatasa de la melatonina han sido ampliamente descritas en el tejido tumoral mamario. Sin embargo, las propiedades antitumorales de esta hormona son todavía desconocidas en el tejido adyacente al tumor, y es por esto que nuestro siguiente objetivo consistió en estudiar si la hormona pineal podía interferir en la reacción desmoplásica a nivel de la diferenciación del tejido adiposo peritumoral así como actuar directamente sobre la actividad aromatasa celular de los adipocitos.

### **RESULTADOS**

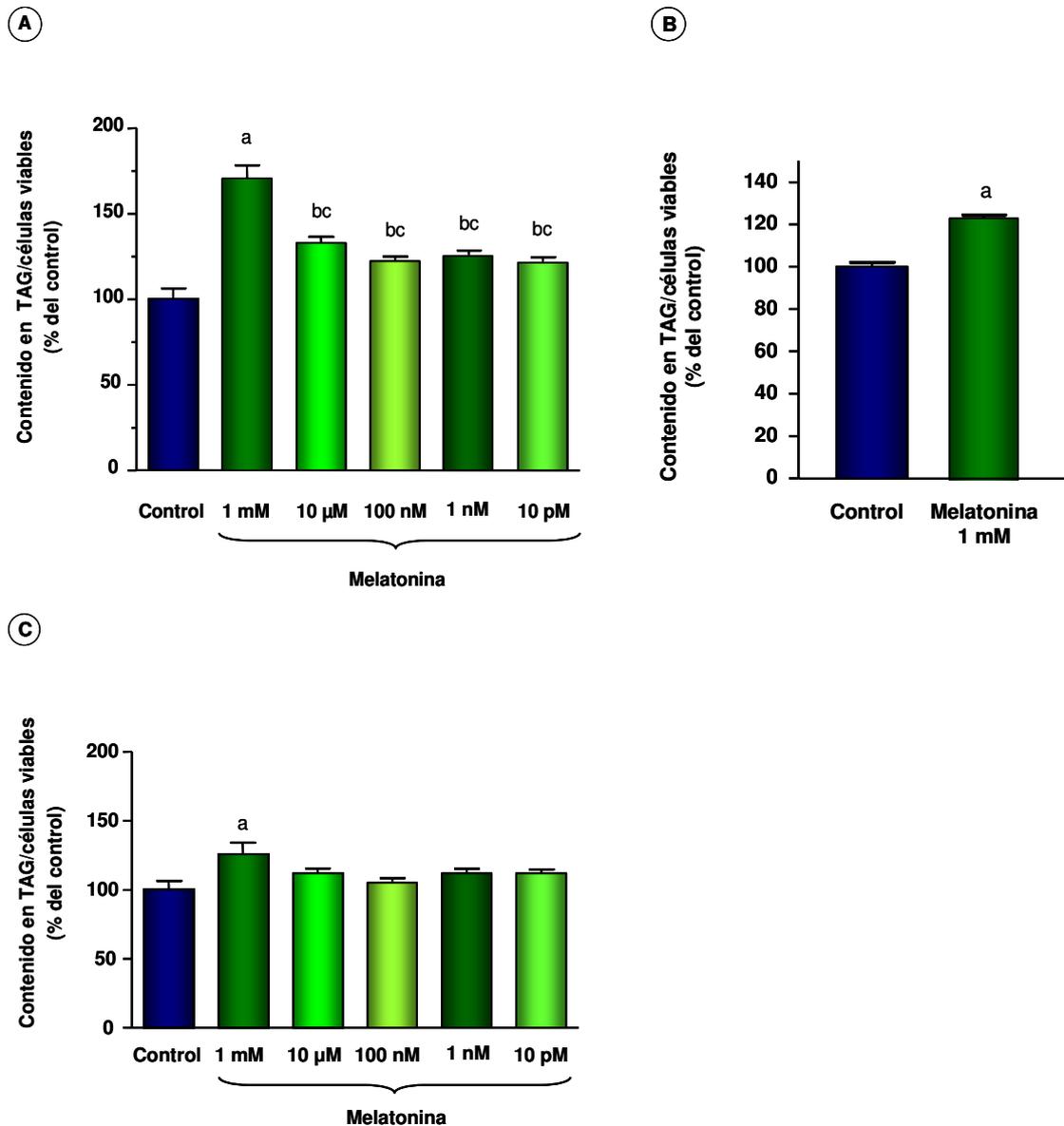
#### **4.2.1. La melatonina estimula la acumulación intracitoplasmática de triglicéridos en los preadipocitos**

El primero de los estudios pertenecientes a este capítulo, se realizó con el objetivo de determinar si la melatonina podía afectar a la diferenciación de los fibroblastos del tejido adiposo. Debido a la imposibilidad de acceder a muestras de fibroblastos asociados al tejido tumoral mamario humano, utilizamos la línea celular murina 3T3-L1 como modelo de cultivo de preadipocitos *in vitro*. En un primer abordaje experimental, los cultivos de preadipocitos se mantuvieron en medio de diferenciación, suplementado con dexametasona, IBMX e insulina tal y como se describe en el apartado de material y métodos, en presencia de distintas concentraciones de melatonina a lo largo de todo el proceso de diferenciación. El

contenido de triacilglicéridos (TAG) intracitoplasmático, que se correlaciona directamente con la diferenciación de los adipocitos, se cuantificó mediante el método de tinción con el colorante *Oil Red O*. En la **figura 4.6 (A)**, se observa que el tratamiento con todas las concentraciones de melatonina ensayadas tuvo como consecuencia un aumento significativo en la acumulación intracitoplasmática de triglicéridos, lo que se correlaciona con una mayor diferenciación de las células con respecto al grupo control de células no tratadas. Las dosis más altas de melatonina fueron las que obtuvieron el mayor grado de diferenciación de los preadipocitos y es por esto que decidimos utilizar, en los experimentos subsiguientes, concentraciones farmacológicas de melatonina (1 mM) para el tratamiento de dichas células.

Para comprobar si la melatonina era capaz de incrementar la diferenciación de los preadipocitos en ausencia de agentes inductores de la diferenciación presentes en el cultivo, las células 3T3-L1 se mantuvieron durante 6 días en medio DMEM suplementado con 10% de SFB en presencia y ausencia de melatonina (1 mM). Como puede apreciarse en la **figura 4.6 (B)**, las células tratadas con melatonina (1 mM) aumentaron la acumulación de lípidos intracitoplasmáticos con respecto a las del grupo control, lo cual indica un mayor grado de diferenciación.

Finalmente, nos propusimos estudiar el efecto de la hormona pineal sobre la acumulación de lípidos en adipocitos ya diferenciados. Para ello, se incubaron células 3T3-L1 con distintas concentraciones de melatonina durante los 3 días posteriores al proceso de diferenciación, tras lo cual se cuantificó la acumulación de triglicéridos intracitoplasmáticos mediante el método de tinción con *Oil Red O*. En la **figura 4.6 (C)** puede apreciarse el aumento de la concentración de triglicéridos en respuesta al tratamiento con melatonina (1 mM) con respecto al grupo control. El resto de dosis ensayadas no produjeron un efecto significativo.

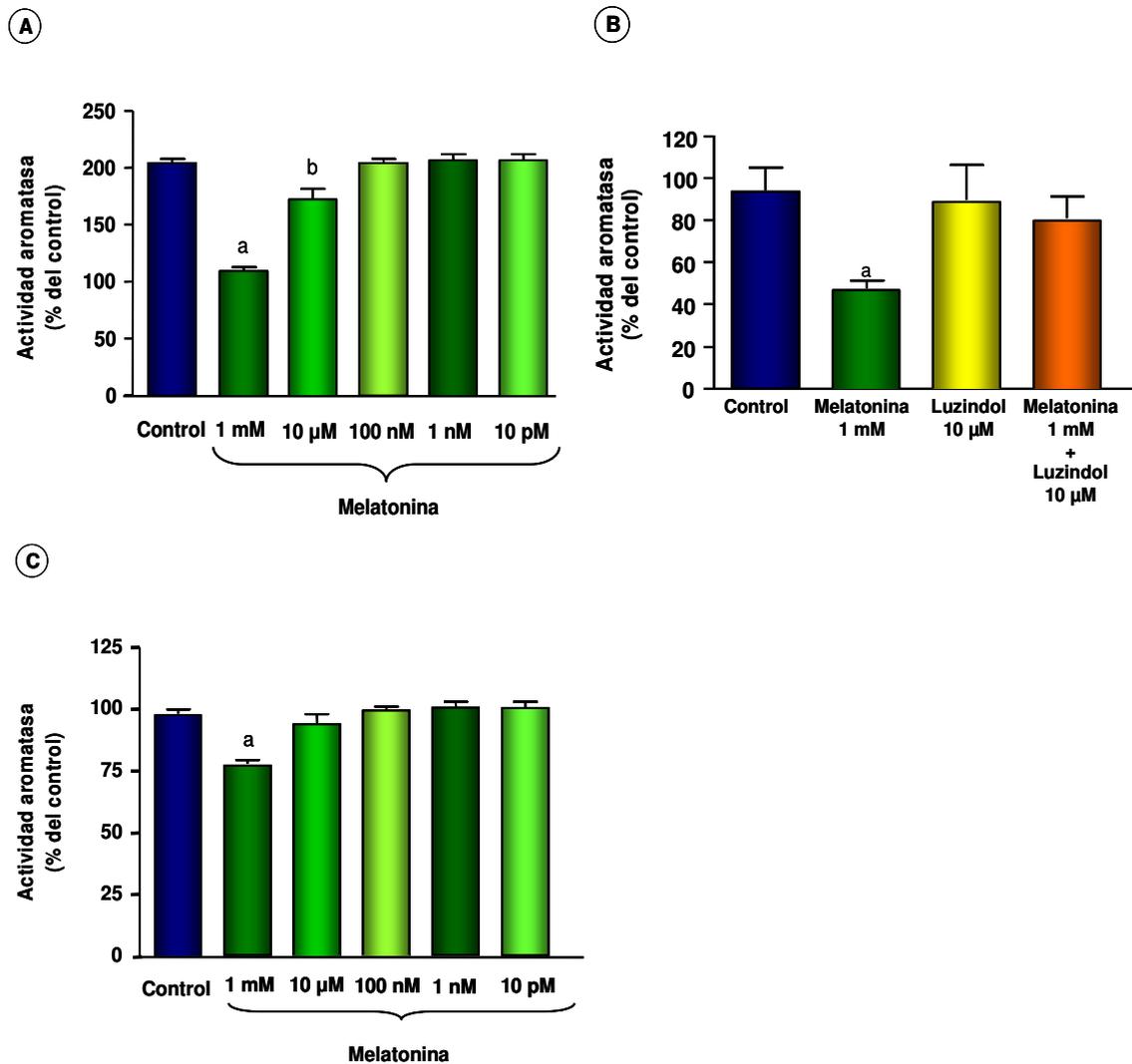


**Figura 4.6. Efecto de la melatonina en la acumulación intracitoplasmática de triglicéridos en células 3T3-L1.** (A) Las células 3T3-L1 se sembraron en medio de diferenciación y se incubaron con las concentraciones indicadas de melatonina a lo largo de todo el proceso. Al cabo de 10 días, se cuantificó la acumulación intracitoplasmática de triglicéridos (TAG) mediante el método del *Oil Red O*. a,  $P < 0,001$  vs control; b,  $P < 0,01$  vs control; c,  $P < 0,001$  vs melatonina 1 mM. (B) Las células se sembraron en 10% SFB/DMEM en ausencia de agentes adipogénicos y en presencia de melatonina (1 mM) durante 6 días. La acumulación de TAG se cuantificó mediante el método del *Oil Red O*. a,  $P < 0,001$  vs control. (C) Las células completamente diferenciadas se incubaron en presencia de las concentraciones de melatonina indicadas durante 3 días adicionales. La acumulación de TAG intracitoplasmáticos se cuantificó mediante el método del *Oil Red O*. En todos los casos, los datos se representaron como el porcentaje de acumulación de TAG en función del número de células viables con respecto al grupo control. a,  $P < 0,001$  vs control.

#### 4.2.2. La melatonina reduce la actividad aromatasa en células 3T3-L1

Las acciones antiaromatasa de la melatonina han sido descritas en varias líneas celulares. Con el objetivo de estudiar el efecto de la hormona pineal sobre la actividad aromatasa en la línea celular 3T3-L1, los preadipocitos se mantuvieron en medio de diferenciación y se incubaron con distintas concentraciones de melatonina durante el transcurso del experimento. Al cabo de 10 días, los adipocitos diferenciados se sometieron al ensayo de actividad aromatasa mediante el método de liberación de agua tritiada. Como puede observarse en la **figura 4.7 (A)** la presencia de melatonina (1 mM) durante el período de diferenciación redujo la actividad aromatasa celular en torno a un 50%. El resto de concentraciones ensayadas no tuvieron efecto sobre la actividad aromatasa, excepto el tratamiento con melatonina (10  $\mu$ M), que ejerció un ligero efecto inhibitorio sobre la actividad del enzima. Por su parte, la adición de luzindol (10  $\mu$ M) revirtió el efecto inhibitorio de la melatonina (1 mM), tal y como se muestra en la **figura 4.7 (B)** lo que sugiere una posible implicación del receptor de melatonina en las acciones antiaromatasa de esta hormona.

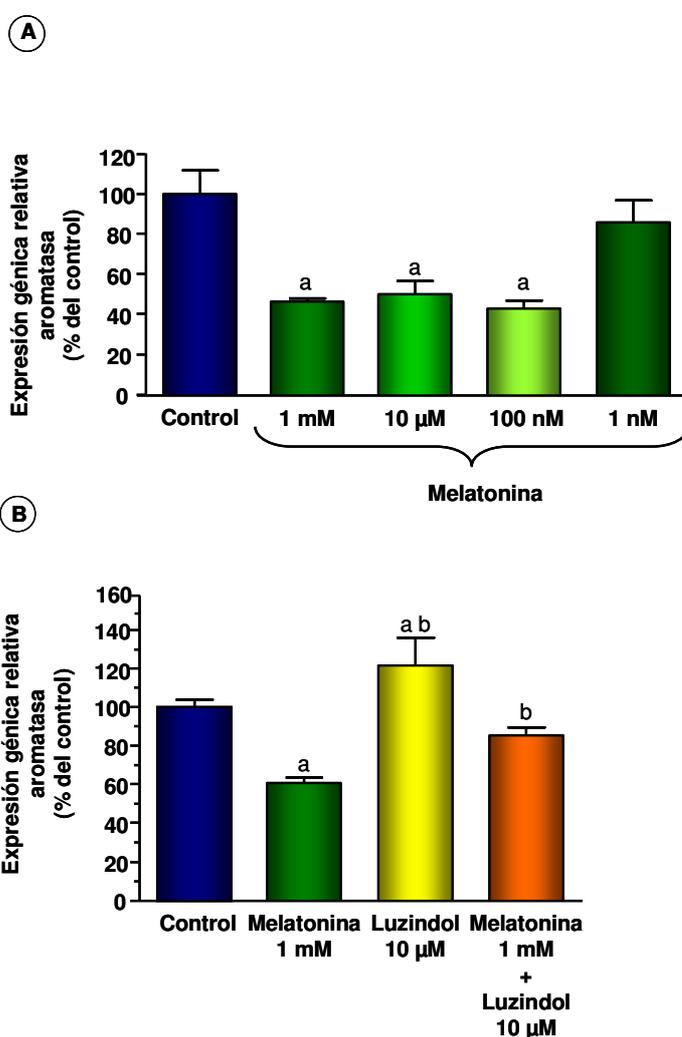
Por último, según se muestra en la **figura 4.7 (C)** el tratamiento de adipocitos previamente diferenciados con distintas concentraciones de melatonina durante 3 días produjo una disminución de la actividad aromatasa celular cuando se utilizaron dosis farmacológicas de melatonina, mientras que con el resto de concentraciones ensayadas no ocurrieron variaciones significativas en la actividad enzimática.



**Figura 4.7. Efecto de la melatonina sobre la actividad aromatasa en células 3T3-L1.** Durante el proceso de diferenciación, las células se mantuvieron en presencia de las concentraciones de melatonina indicadas (A) o en presencia de melatonina (1 mM) y/o luzindol (10 μM) (B). La actividad aromatasa se cuantificó mediante el ensayo de liberación de agua tritiada. Los datos se expresaron como el porcentaje de actividad con respecto al grupo control. a,  $P < 0,001$  vs control; b,  $P < 0,05$  vs control. (C) Los adipocitos completamente diferenciados se incubaron en presencia de las concentraciones de melatonina indicadas durante un total de 3 días. La actividad aromatasa se midió mediante el ensayo de liberación de agua tritiada. Los datos se expresaron como el porcentaje de actividad con respecto al grupo control. a,  $P < 0,001$  vs control; b,  $P < 0,05$  vs control.

#### 4.2.3. La melatonina inhibe la expresión del gen *CYP19* en células 3T3-L1

Dada la contribución del tejido peritumoral a la biosíntesis local de estrógenos y teniendo en cuenta el efecto antiaromatasa que ejerce la melatonina en otras líneas celulares, nos pareció interesante analizar la influencia de la hormona pineal en la expresión génica de la aromatasa en células de tejido adiposo. Los ensayos de expresión se realizaron mediante RT-PCR en células 3T3-L1 incubadas durante 120 minutos con los tratamientos que se detallan a continuación.



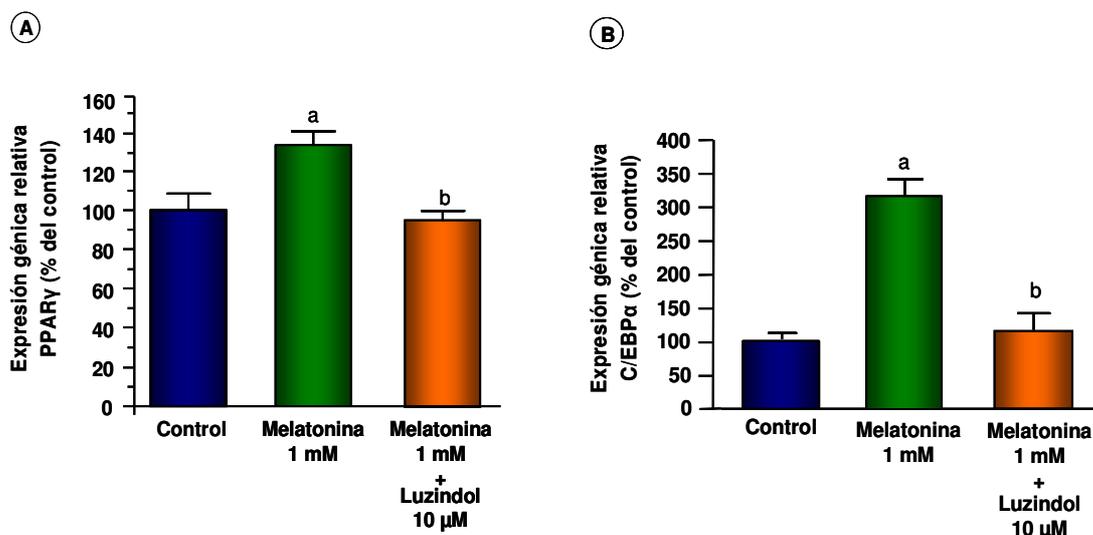
**Figura 4.8. Efecto de la melatonina sobre la expresión del gen *CYP19* en células 3T3-L1.** Las células se sembraron en 10% SFB/DMEM en presencia de los tratamientos indicados: melatonina (1 mM, 10 µM, 100 nM, 1 nM) o etanol (A), o bien melatonina (1 mM) y/o luzindol (10 µM) o etanol (B). El análisis de la expresión aromatasa se realizó mediante RT-PCR. Los resultados se representaron como el porcentaje de expresión con respecto al grupo control. a,  $P < 0,05$  vs control; b,  $P < 0,05$  vs melatonina 1 mM.

La adición de melatonina en varias de las dosis ensayadas (1 mM, 10  $\mu$ M, 100 nM) produjo un fuerte efecto inhibitor sobre la expresión aromatasas celular, siendo la concentración farmacológica (1 mM) aquella que resultó en una inhibición más potente, de casi un 60% con respecto al control, tal y como se muestra en la **figura 4.8 (A)**. La adición de luzindol (10  $\mu$ M) revirtió el efecto estimulador ejercido por la melatonina (1 mM), como puede observarse en la **figura 4.8 (B)**.

#### **4.2.4. La melatonina estimula la expresión génica de PPAR $\gamma$ y C/EBP $\alpha$ en células 3T3-L1**

Dado que el mantenimiento del adipocito en su estado diferenciado depende de la expresión de factores de transcripción específicos como PPAR $\gamma$  y C/EBP $\alpha$ , quisimos analizar el efecto de la melatonina sobre la expresión de dichos factores de transcripción una vez producido el proceso de diferenciación de las células 3T3-L1. Para ello, la melatonina se añadió al cultivo una vez finalizado el proceso de diferenciación en las concentraciones indicadas durante 2 horas, y la expresión génica de PPAR $\gamma$  y C/EBP $\alpha$  se analizó mediante RT-PCR a tiempo real. Los resultados se recogen en la **figura 4.9**.

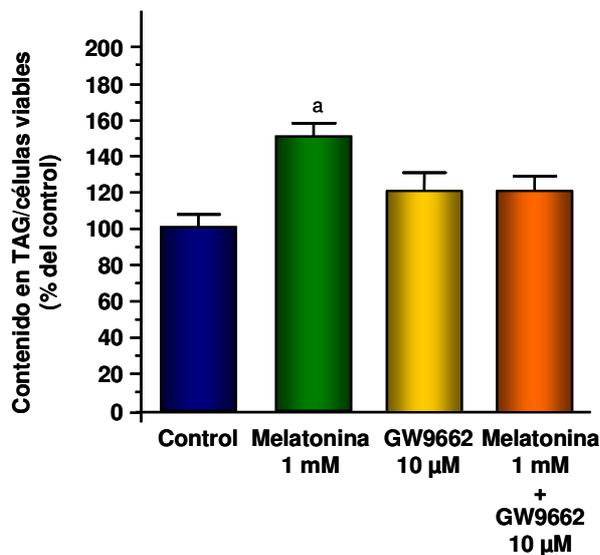
El tratamiento de las células con melatonina (1 mM) aumentó de forma significativa la expresión génica de PPAR $\gamma$  mientras que la adición simultánea de melatonina (1 mM) y luzindol (10  $\mu$ M), un antagonista de la melatonina, contrarrestó este efecto estimulador, llevando la expresión de dicho gen a niveles similares a los encontrados en las células del grupo control (**figura 4.9 A**). En lo que se refiere a los niveles de mRNA de C/EBP $\alpha$ , los resultados obtenidos son similares a los observados en el caso de PPAR $\gamma$ , de tal manera que la incubación con melatonina (1 mM) estimuló de forma significativa la expresión génica de C/EBP $\alpha$  con respecto al grupo control de células no tratadas y la adición simultánea de melatonina (1 mM) y luzindol (10  $\mu$ M) redujo la expresión a niveles similares a los obtenidos en las células del grupo control (**figura 4.9 B**).



**Figura 4.9. Efecto de la melatonina sobre la expresión génica de PPAR $\gamma$  y C/EBP $\alpha$  en células 3T3-L1 diferenciadas.** Una vez transcurrido el período de diferenciación, las células se incubaron en DMEM suplementado con 10% SFB e insulina (10  $\mu$ g/ml), en presencia de melatonina (1 mM), luzindol (10  $\mu$ M), una combinación de ambos o etanol (vehículo) durante 120 minutos. El análisis de la expresión génica de PPAR $\gamma$  (A) y C/EBP $\alpha$  (B) se realizó mediante PCR a tiempo real. Los resultados se representaron como el porcentaje de expresión con respecto al grupo control. a,  $P < 0,001$  vs control; b,  $P < 0,001$  vs melatonina.

#### 4.2.5. La melatonina aumenta la acumulación de triglicéridos intracitoplasmáticos a través de la acción de PPAR $\gamma$

Puesto que el factor de transcripción PPAR $\gamma$  es un importante regulador de la adipogénesis, nos planteamos estudiar la influencia de la melatonina sobre este factor y su efecto en la diferenciación de los fibroblastos. Para ello, se cultivaron células 3T3-L1 y se mantuvieron en presencia de melatonina (1 mM), el antagonista de PPAR $\gamma$  GW9662 o una combinación de ambos durante todo el proceso de diferenciación para, a continuación, cuantificar la concentración de triglicéridos intracitoplasmáticos. Los resultados se muestran en la **figura 4.10**. La melatonina estimuló la acumulación de lípidos en los adipocitos, mientras que el inhibidor de PPAR $\gamma$  GW9662 bloqueó el efecto estimulador de la acumulación lipídica inducido por la hormona pineal.



**Figura 4.10. Efecto de la melatonina sobre la diferenciación de las células 3T3-L1 mediada por PPAR $\gamma$ .** Las células 3T3-L1 se sembraron en medio de diferenciación y se incubaron con las concentraciones indicadas de melatonina y GW9662 (antagonista de PPAR $\gamma$ ) a lo largo de todo el proceso. Al cabo de 10 días, se cuantificó la acumulación intracitoplasmática de triglicéridos (TAG) mediante el método del *Oil Red O*. Los datos se representaron como el porcentaje de acumulación de TAG en función del número de células viables con respecto al grupo control. a,  $P < 0,001$  vs resto de grupos.

## **DISCUSIÓN**

Miller y colaboradores demostraron, en 1982, que la concentración de estradiol era mucho más alta en el tejido tumoral mamario que en la sangre, lo que puso en evidencia la importancia de la biosíntesis de estrógenos *in situ* en los procesos carcinogénicos. Esta producción local de estrógenos está, en parte, mediada por la actividad de los enzimas capaces de transformar andrógenos en estrógenos, entre los que destaca la aromatasa, que se expresa mayoritariamente en los fibroblastos del tejido adiposo peritumoral. Los fibroblastos del tejido adiposo representan el tipo celular más abundante en las inmediaciones del tumor y su contribución al crecimiento y desarrollo del mismo, a través de la producción de estrógenos, es muy importante. Los niveles de expresión y actividad aromatasa en fibroblastos aislados de tejido adiposo peritumoral mamario son entre 10 y 15 veces superiores a los encontrados en las células epiteliales malignas (Pauley y cols., 2000), lo que otorga a este tipo celular una gran relevancia en la biosíntesis local de estrógenos. Además, estudios *in vivo* realizados con ratones han demostrado que la sobreexpresión de la aromatasa en el tejido mamario es suficiente para mantener la hiperplasia en ausencia de estrógenos circulantes, mientras que la administración de inhibidores de la aromatasa revierte esta hiperplasia (Tekmal y cols., 1999).

Para nuestro estudio utilizamos como modelo la línea celular 3T3-L1, derivada de fibroblastos indiferenciados del tejido adiposo de ratón, que se caracterizan por permanecer en estado indiferenciado *in vitro* pero que, cuando se le añaden los factores adecuados, son capaces de diferenciarse en adipocitos maduros, presentando un patrón de acumulación de triglicéridos en el citoplasma muy característico (Ntambi y Kim., 2000). El primer bloque de resultados que obtuvimos demostró que la presencia de melatonina a lo largo de todo el proceso de diferenciación, consiguió aumentar el contenido intracitoplasmático de triglicéridos en los adipocitos en un amplio rango de concentraciones ensayadas, lo que pone de manifiesto la capacidad de la melatonina para inducir la diferenciación de los fibroblastos. La dosis que consiguió una mayor diferenciación de los fibroblastos fue la correspondiente a 1 mM de melatonina, por lo que decidimos utilizar de manera sistemática esta concentración en los experimentos subsiguientes. En una nueva

serie experimental, los resultados obtenidos al medir la concentración de triacilglicéridos en el citoplasma de adipocitos ya diferenciados y mantenidos durante tres días adicionales en presencia de distintas concentraciones de melatonina fueron similares a los obtenidos para las células indiferenciadas. En este caso, el tratamiento con melatonina 1 mM consiguió estimular la acumulación de lípidos intracitoplasmáticos mientras que el resto de dosis ensayadas no produjeron efecto sobre la diferenciación. La melatonina, a concentración farmacológica, produjo también un incremento en la diferenciación celular de los fibroblastos. Estos resultados, en conjunto, apuntan hacia un posible papel de la hormona pineal en la diferenciación de fibroblastos en adipocitos, y concuerdan con los resultados publicados por Maldonado y colaboradores en el año 2006, en los que describen que la melatonina, de manera dosis-dependiente, aumenta la acumulación de gotas de grasa intracitoplasmáticas en los fibroblastos al añadir ácido oleico al medio.

La diferenciación de los fibroblastos y su conversión en adipocitos maduros tiene lugar gracias a una secuencia de activación de una serie de factores de transcripción que regulan la expresión de varias proteínas responsables de otorgar a la célula el fenotipo de adipocito maduro. Los factores de transcripción PPAR $\gamma$  y C/EBP $\alpha$  son dos importantes reguladores de la adipogénesis, por lo que nos planteamos la hipótesis de que la melatonina podría ejercer su efecto regulador en la diferenciación de los adipocitos mediante la modulación de la expresión de estos factores de transcripción. Si así fuera, esperaríamos que la melatonina incrementara la expresión de dichos factores de transcripción. Nuestros resultados indican que, efectivamente, la melatonina estimuló la expresión génica tanto de PPAR $\gamma$  como de C/EBP $\alpha$ , siendo este efecto revertido por luzindol, un antagonista de la melatonina que se une al receptor de membrana MT $_1$ , lo que indica que la hormona pineal estaría actuando a través de su receptor de membrana. Además, la incubación simultánea de los fibroblastos con el inhibidor de PPAR $\gamma$  logró revertir el efecto estimulador de la melatonina sobre la acumulación de lípidos intracitoplasmáticos, lo que sugiere que esta hormona estaría estimulando la diferenciación de los fibroblastos mediante un mecanismo en el cual participaría PPAR $\gamma$ .

El efecto inductor de la melatonina en la diferenciación celular ha sido demostrado en distintos tipos celulares, tanto normales como tumorales, entre los que se encuentran las células de neuroblastoma (Cos y cols., 1996), tumor mamario humano (Crespo y cols., 1994), cáncer de próstata (Sáinz y cols., 2005) y osteosarcoma (Sánchez-Hidalgo y cols., 2007) entre otras. En la mama de ratón, la melatonina promueve la formación de estructuras epiteliales características de los estadios finales del crecimiento ductal, haciendo a la estructura mamaria más resistente a la formación de tumores en caso de exposición a carcinógenos (Mediavilla y cols., 1992).

De forma paralela a la acción estimuladora de la diferenciación de los adipocitos, la melatonina es capaz de reducir tanto la actividad como la expresión del enzima aromatasa en dichas células. Nuestros resultados indican que la melatonina, añadida al medio durante todo el proceso de diferenciación, inhibió la actividad aromatasa en las células 3T3-L1 de manera dosis dependiente, obteniéndose el mayor efecto inhibitor a concentraciones farmacológicas (1 mM). Esta inhibición fue revertida tras la adición de luzindol, indicando que el receptor de melatonina estaría implicado en este mecanismo. Observamos un efecto similar sobre la actividad aromatasa en adipocitos ya maduros que se mantuvieron en presencia de melatonina durante tres días adicionales. Sin embargo, en este caso la inhibición fue menor, siendo significativa únicamente a concentración farmacológica, lo que podría deberse al escaso tiempo de tratamiento o a la menor presencia de este enzima en los adipocitos maduros. De hecho, una elevada expresión aromatasa se considera un marcador fenotípico de los adipocitos indiferenciados (Ackerman y cols., 1981). Nuestros resultados muestran además que la incubación con melatonina inhibió la expresión del gen de la aromatasa en los fibroblastos del tejido adiposo, lo que ha sido corroborado en estudios posteriores realizados con fibroblastos asociados a la mama tumoral (Knower y cols., 2012).

De acuerdo con esto, se ha observado que algunos factores que estimulan la expresión génica de la aromatasa en el tejido adiposo, como son algunas interleuquinas (IL-6 e IL-11) o el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), también son conocidos por su capacidad de inhibir la adipogénesis (Meng y cols., 2001). A su

vez, factores que estimulan la diferenciación de los adipocitos, entre ellos algunos ligandos de PPAR $\gamma$ , producen una inhibición paralela en la expresión del gen de la aromatasa (Rubin y cols., 2000). La producción, por parte de las células epiteliales tumorales, de factores capaces de inhibir la diferenciación de los fibroblastos del tejido adiposo adyacente, con el consiguiente aumento en la expresión y actividad aromatasa celular, supone un aumento en el aporte de estrógenos al microambiente tumoral, lo que, en última instancia favorece el crecimiento del tumor. Esto nos permitió plantear el siguiente bloque de experimentos, recogidos en el objetivo 4.3 donde, entre otras cosas, se estudió la capacidad de la melatonina para regular la producción de dichos factores.

Nuestros resultados, en conjunto, ponen de manifiesto las acciones oncostáticas de la melatonina sobre el microambiente tumoral interfiriendo en el proceso de diferenciación de los fibroblastos del tejido adiposo peritumoral así como a través de un mecanismo directo de regulación tanto de la expresión como de la actividad aromatasa celular.



### 4.3. ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE LA MELATONINA EN LA REACCIÓN DESMOPLÁSICA PERITUMORAL

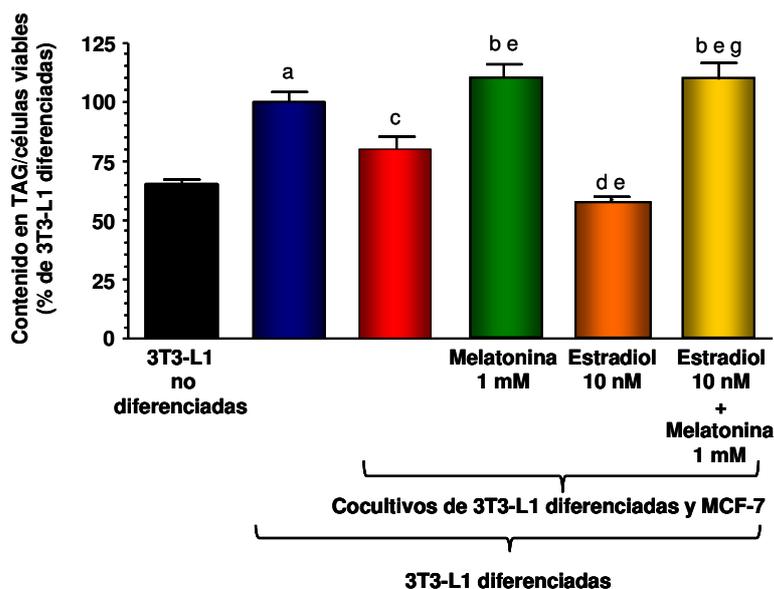
Las señales paracrinas en el tejido peritumoral mamario proporcionan una vía de comunicación fundamental entre las células epiteliales tumorales y el tejido adiposo que rodea al tumor. Dada su importancia, nos propusimos estudiar el posible papel de la melatonina en la regulación de estas señales. Con este objetivo, desarrollamos un modelo de cocultivos celulares *in vitro* que nos permitió analizar los mecanismos de comunicación paracrina que tienen lugar entre el tejido tumoral mamario y el tejido adiposo, así como su respuesta a melatonina.

#### **RESULTADOS**

##### **4.3.1. La melatonina estimula la adipogénesis de células 3T3-L1 cultivadas conjuntamente con células MCF-7**

Para poner de manifiesto la importancia de la comunicación paracrina existente entre las células tumorales mamarias y el tejido adiposo peritumoral, realizamos una serie de experimentos utilizando cocultivos de células MCF-7 y 3T3-L1. El primero de estos experimentos consistió en evaluar la capacidad de las células tumorales para inducir la diferenciación de los adipocitos adyacentes así como explorar el papel de la melatonina y el estradiol en este proceso. Para ello, se realizaron cocultivos de células 3T3-L1 y MCF-7 y se incubaron en presencia de agentes adipogénicos durante todo el proceso de diferenciación así como de los distintos tratamientos ensayados. El grado de diferenciación de los adipocitos se cuantificó mediante la medida del contenido intracitoplasmático de triglicéridos en el citoplasma celular por la técnica del *Oil Red O*, según se describe en el apartado de material y métodos. El resultado se muestra en la **figura 4.11**. La presencia de células MCF-7 en el cultivo disminuyó significativamente la diferenciación de los adipocitos con respecto al grupo control de células diferenciadas cultivadas solas. La adición de melatonina (1 mM) al medio contrarrestó el efecto inhibitorio producido por las células epiteliales tumorales, mientras que el tratamiento con estradiol (10 nM) indujo un descenso en el grado de diferenciación celular. Por su parte, la

adición simultánea de melatonina (1 mM) y estradiol (10 nM) a los cocultivos resultó en un incremento significativo en la acumulación de lípidos por parte de los adipocitos. A modo de control, se incluyó un grupo experimental de células 3T3-L1 indiferenciadas.

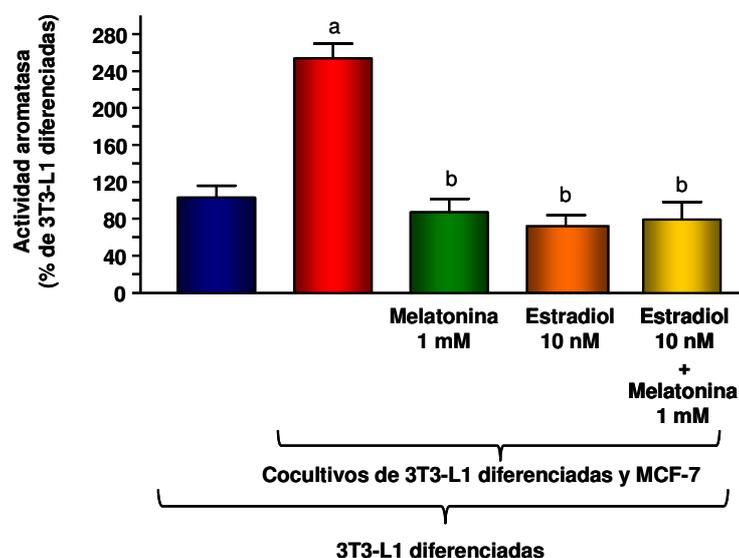


**Figura 4.11. Efecto de la melatonina sobre la adipogénesis en cocultivos de células 3T3-L1 y MCF-7.** Los cocultivos de células 3T3-L1 y MCF-7 se mantuvieron durante 10 días en medio de diferenciación en presencia de melatonina (1 mM), estradiol (10 nM), una combinación de ambos o etanol (vehículo). Como controles se incluyeron en el experimento un grupo de células 3T3-L1 no diferenciadas incubadas en 10% SFB/DMEM y un grupo control de células diferenciadas cultivadas en ausencia de MCF-7. El contenido intracelular de lípidos se cuantificó mediante la tinción con *Oil Red O*. Los datos se expresaron como el porcentaje de triacilglicéridos (TAG) intracitoplasmáticos en función del número de células viables frente al grupo de células 3T3-L1 diferenciadas cultivadas solas. a,  $P < 0,01$  vs 3T3-L1 no diferenciadas; b,  $P < 0,001$  vs 3T3-L1 no diferenciadas; c,  $P < 0,05$  vs 3T3-L1 diferenciadas; d,  $P < 0,001$  vs 3T3-L1 diferenciadas; e,  $P < 0,001$  vs 3T3-L1 diferenciadas+MCF-7; f,  $P < 0,001$  vs 3T3-L1+MCF-7+Melatonina (1 mM).

#### 4.3.2. La melatonina inhibe la actividad aromatasa de células 3T3-L1 cultivadas conjuntamente con células MCF-7

Continuando con el estudio de la comunicación paracrina entre el tejido adiposo y el epitelio mamario tumoral, el siguiente objetivo consistió en valorar el efecto ejercido por la presencia de células epiteliales tumorales sobre la actividad

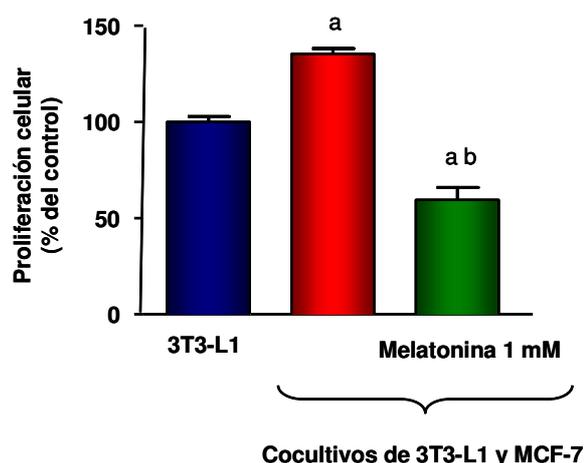
aromatasa del tejido adiposo subyacente. Con este objetivo se realizaron cocultivos celulares de las líneas 3T3-L1 y MCF-7, que se mantuvieron en medio suplementado con agentes adipogénicos y, una vez transcurrido el período de diferenciación, se evaluó la actividad aromatasa de las células 3T3-L1 mediante el método del agua tritiada. El resultado se recoge en la **figura 4.12**. La presencia de células de tumor mamario en el cocultivo produjo un aumento en la actividad aromatasa de los adipocitos, en comparación con las células control cultivadas solas. El tratamiento con melatonina (1 mM) contrarrestó de forma significativa el efecto estimulador ejercido por la presencia de células tumorales sobre la actividad aromatasa de los adipocitos. La adición de estradiol (10 nM) disminuyó la actividad aromatasa de los adipocitos en el cocultivo mientras que su incubación conjunta con melatonina (1 mM) no tuvo un efecto inhibitorio diferente al conseguido con cualquiera de los dos agentes por separado.



**Figura 4.12. Efecto de la melatonina sobre la actividad aromatasa en cocultivos de células 3T3-L1 y MCF-7.** Los cocultivos de células 3T3-L1 y MCF-7 se mantuvieron durante 10 días en medio de diferenciación en presencia de melatonina (1 mM), estradiol (10 nM), una combinación de ambos o etanol (vehículo). La actividad aromatasa se cuantificó mediante el ensayo de liberación de agua tritiada. Los resultados se expresaron como el porcentaje de actividad con respecto al grupo control de células 3T3-L1 cultivadas en ausencia de MCF-7.

### 4.3.3. Estudios de proliferación del tejido adiposo peritumoral

El siguiente paso consistió en estudiar la influencia de la presencia de células de tumor mamario sobre la proliferación de los adipocitos subyacentes. Para ello, se realizaron cocultivos de células de tejido adiposo 3T3-L1 y células MCF-7, y se evaluó la proliferación de los adipocitos mediante el método del MTT. La **figura 4.13** muestra los resultados. La presencia de células MCF-7 en el cultivo produjo un incremento significativo en la proliferación de los adipocitos con respecto a los valores de proliferación obtenidos para el cultivo de adipocitos solos. Por su parte, la adición de melatonina (1 mM) revirtió el efecto estimulador sobre la proliferación de las células 3T3-L1 inducido por la presencia de células MCF-7 en el cocultivo.

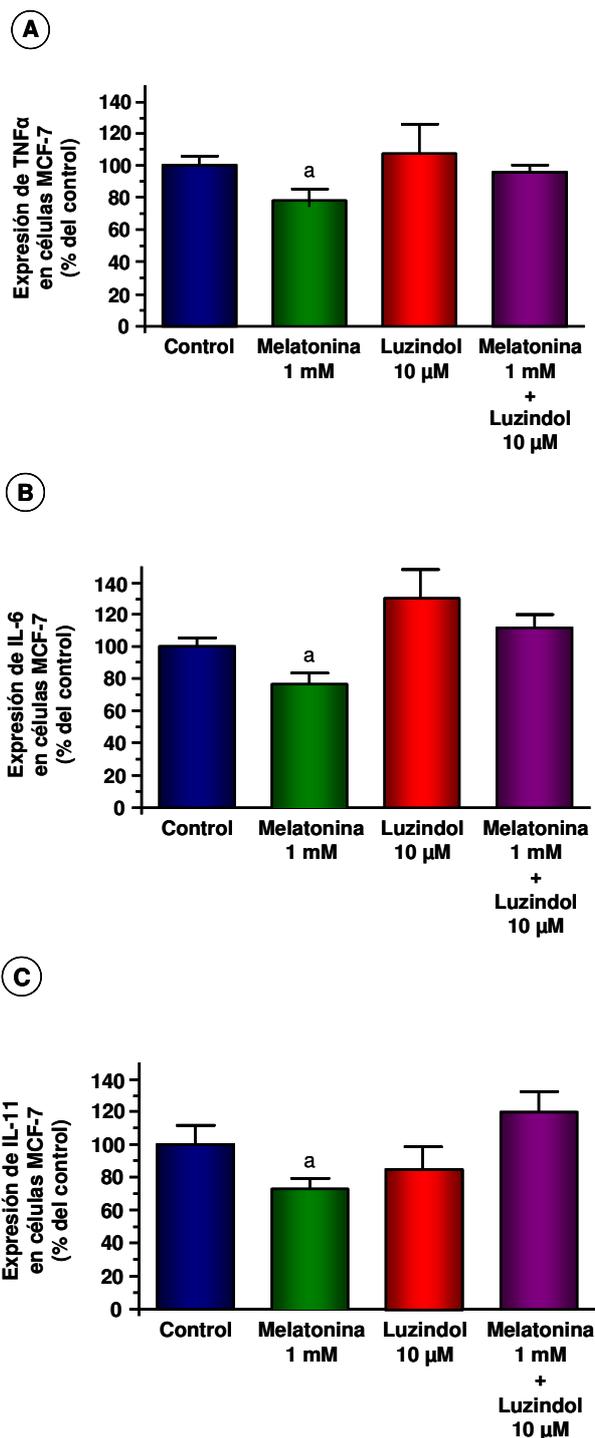


**Figura 4.13. Efecto de la presencia de células MCF-7 sobre la proliferación de células 3T3-L1.** Los cocultivos de células 3T3-L1 y MCF-7 se mantuvieron durante 10 días en medio de diferenciación de adipocitos en presencia o ausencia de melatonina (1 mM). Los resultados muestran la medida de la proliferación celular evaluada mediante el método del MTT. Los resultados se expresaron como el porcentaje de proliferación con respecto al grupo de células 3T3-L1 cultivadas solas. a,  $P < 0,001$  vs 3T3-L1; b,  $P < 0.001$  vs cocultivos 3T3-L1 y MCF-7.

#### **4.3.4. La melatonina inhibe la expresión de las citoquinas antiadipogénicas TNF $\alpha$ , IL-6 e IL-11 en células MCF-7**

Una manera de regular la diferenciación de los fibroblastos del tejido adiposo adyacente al tumor consiste en la liberación, por parte de las células tumorales mamarias, de una serie de factores de crecimiento que actúan sobre los preadipocitos impidiendo su diferenciación. Dado que hemos estudiado en capítulos anteriores la capacidad de la melatonina para inducir la diferenciación de los preadipocitos, quisimos explorar el papel de la hormona pineal en la regulación de la expresión génica de las citoquinas TNF $\alpha$ , IL-6 e IL-11, las cuales han sido descritas previamente en la literatura como citoquinas antiadipogénicas, en las células de tumor mamario. Con este fin, se incubaron células MCF-7 en presencia de los tratamientos correspondientes durante 2 horas y la expresión de mRNA de cada una de las citoquinas mencionadas anteriormente se evaluó mediante PCR a tiempo real.

Como puede observarse en la **figura 4.14**, el tratamiento con melatonina (1 mM) inhibió significativamente la expresión de cada una de las citoquinas ensayadas con respecto al grupo control. Por otra parte, la adición de luzindol (10  $\mu$ M) al medio no tuvo efecto alguno sobre la expresión de las citoquinas, mientras que la incubación conjunta de melatonina (1 mM) y luzindol (10  $\mu$ M) revirtió el efecto inhibitor ejercido por la melatonina en todos los casos.

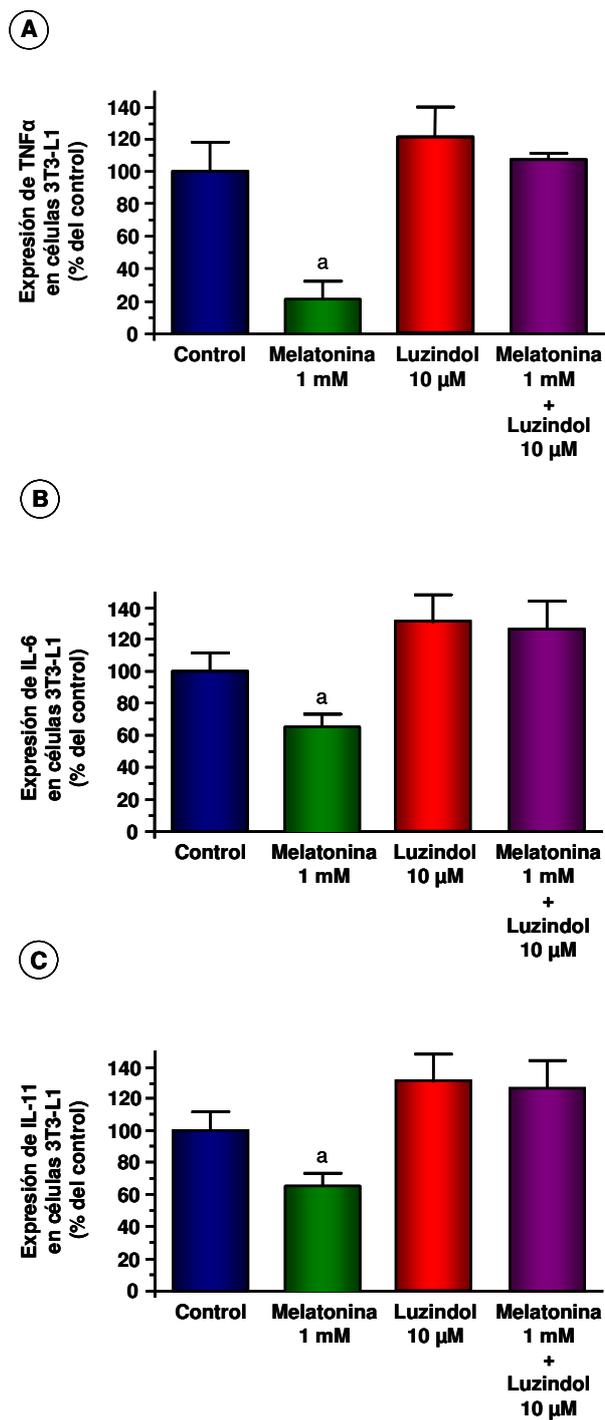


**Figura 4.14. Efecto de la melatonina sobre la expresión génica de TNF- $\alpha$  (A), IL-6 (B) e IL-11(C) en células MCF-7.** Las células MCF-7 se incubaron en 0,5% DCC/DMEM y fueron tratadas con melatonina (1 mM) y/o luzindol (10  $\mu$ M) o etanol (control) durante 2 horas. El mRNA total se aisló de las células y se sintetizó cDNA complementario, el cual fue sometido a un ensayo de PCR a tiempo real. La expresión génica se representó como el porcentaje de expresión con respecto al grupo control. a,  $P < 0,01$  vs resto de grupos.

#### **4.3.5. La melatonina inhibe la expresión de las citoquinas antiadipogénicas TNF $\alpha$ , IL-6 e IL-11 en células 3T3-L1**

Con el fin de explorar si las células del tejido adiposo son capaces de producir citoquinas antiadipogénicas que actúen de manera autocrina sobre su propia diferenciación, realizamos experimentos de expresión de génica de las citoquinas TNF $\alpha$ , IL-6 e IL-11 en células 3T3-L1. Para ello, las células se incubaron durante dos horas en presencia de los tratamientos correspondientes y, a continuación, se cuantificó la expresión de mRNA de cada una de las citoquinas mediante PCR a tiempo real.

Los resultados se muestran en la **figura 4.15**. Al igual que ocurría en las células MCF-7, la melatonina, a concentración farmacológica (1mM), inhibió la expresión de todas las citoquinas estudiadas en las células 3T3-L1. Por su parte, la incubación simultánea con luzindol contrarrestó el efecto inhibitor de la melatonina sobre la expresión de las tres citoquinas objeto de estudio.

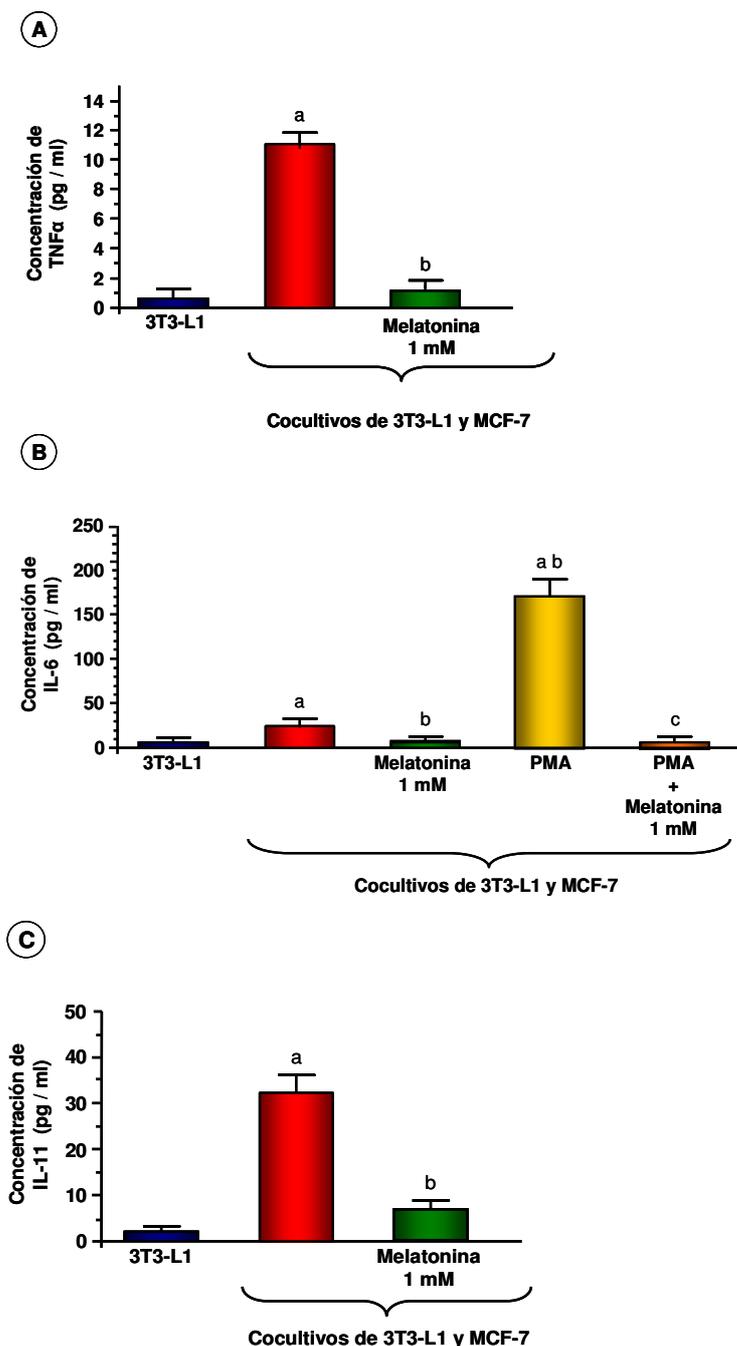


**Figura 4.15. Efecto de la melatonina sobre la expresión génica de TNF- $\alpha$  (A), IL-6 (B) e IL-11(C) en células 3T3-L1.** Las células 3T3-L1 se incubaron en 0,5% DCC/DMEM y fueron tratadas con melatonina (1 mM) y/o luzindol (10  $\mu$ M) o etanol (control) durante 2 horas. El mRNA total se aisló de las células y se sintetizó cDNA complementario, el cual fue sometido a un ensayo de PCR a tiempo real. La expresión génica se representó como el porcentaje de expresión con respecto al grupo control. a, P<0,001 vs resto de grupos.

#### **4.3.6. La melatonina inhibe los niveles proteicos de TNF $\alpha$ , IL-6 e IL-11 en el medio de cocultivos de células 3T3-L1 y MCF-7.**

Por último, una vez conocida la influencia de la melatonina sobre la expresión de las citoquinas antiadipogénicas en las células epiteliales mamarias, quisimos comprobar si ese efecto inhibitor ejercido por la hormona pineal afectaba también a los niveles de dichos factores de crecimiento en el medio extracelular. Es por esto que medimos la concentración de cada una de estas proteínas en el medio de cultivos celulares de 3T3-L1 y MCF-7 mediante un ensayo ELISA, siguiendo el protocolo que se describe en el apartado de material y métodos.

En la **figura 4.16** se observa cómo la presencia de células MCF-7 en el cocultivo aumentó de manera significativa la concentración de las tres proteínas objeto de estudio en el medio, alcanzando los niveles de TNF $\alpha$ , IL-6 e IL-11 en los cocultivos un incremento de entre 10 y 30 veces con respecto al encontrado en los cultivos únicos de 3T3-L1. La adición de melatonina (1 mM) contrarrestó el efecto estimulador sobre la producción de citoquinas inducido por la presencia de las células MCF-7 en los cocultivos. El tratamiento con forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) (1 nM), un compuesto inductor de la producción de IL-6, produjo un fuerte incremento en la producción de esta citoquina, mientras que la adición simultánea de PMA y melatonina disminuyó significativamente los niveles de IL-6 en el medio de los cocultivos.



**Figura 4.16. Medida de los niveles de citoquinas antiadipogénicas en el medio de cocultivos de células 3T3-L1 y MCF-7.** Los cocultivos se incubaron en medio de diferenciación de adipocitos junto con melatonina (1 mM) o etanol durante los 10 días del período de diferenciación. En el caso de los experimentos realizados para determinar la concentración de IL-6, se añadió a varios pocillos PMA y/o melatonina (1 mM). Tras el período de diferenciación, se recogió el medio de los cocultivos y se analizó la concentración proteica de TNF $\alpha$  (A), IL-6 (B) e IL-11 (C) mediante un ensayo ELISA. a, P<0,001 vs a 3T3-L1; b, P<0,001 vs cocultivos 3T3-L1 y MCF-7; c, P<0,001 vs cocultivos 3T3-L1 y MCF-7+PMA.

## **DISCUSIÓN**

La elevada concentración de estrógenos que aparece en los tejidos adyacentes a los tumores mamarios tiene su origen en la gran producción de estas hormonas por parte de los tejidos que se encuentran en las inmediaciones del tumor. Este incremento de la biosíntesis de estrógenos *in situ* ocurre gracias a la existencia de una serie de interacciones paracrinas que tienen lugar entre las células epiteliales malignamente transformadas y el resto de tejidos adyacentes, cobrando una especial importancia el tejido adiposo. Esta comunicación paracrina tiene como objetivo favorecer la formación de una capa densa de fibroblastos indiferenciados en el tejido adiposo que rodea al tumor proporcionando un soporte tanto estructural como bioquímico al mismo, en términos de producción de estrógenos y otras moléculas, y que da lugar al fenómeno conocido como reacción desmoplásica. Las células epiteliales malignas participan activamente en la reacción desmoplásica mediante la secreción de factores de crecimiento y citoquinas que no sólo impiden la diferenciación de los fibroblastos del tejido adiposo, sino que además, son capaces de revertirla en el caso de adipocitos maduros (Meng y cols., 2001). Los fibroblastos del tejido adiposo, en estado indiferenciado, presentan unos niveles elevados de expresión y actividad aromatasa, lo que contribuye a mantener una concentración elevada de estrógenos en las inmediaciones del tumor, favoreciendo su crecimiento y expansión.

Para el estudio de las señales paracrinas en la reacción desmoplásica, utilizamos como modelo experimental *in vitro* un sistema de cocultivos de células 3T3-L1 y MCF-7. El primero de nuestros resultados demostró que la presencia de células MCF-7 redujo la diferenciación de los fibroblastos en adipocitos, ya que éstos mostraron un menor acúmulo de lípidos intracitoplasmáticos que aquellos fibroblastos cultivados en ausencia de células epiteliales. Este resultado apoya las observaciones de Meng y colaboradores (2001), que demostraron que el tratamiento con medio condicionado procedente de distintos tipos de células de tumor mamario inhibía la conversión de células 3T3-L1 en adipocitos maduros. La adición de melatonina a los cocultivos contrarrestó la inhibición de la diferenciación de los fibroblastos inducida por la presencia de células epiteliales tumorales, pues

observamos un aumento en el contenido lipídico intracelular, lo cual es un indicador de diferenciación celular. Esta observación concuerda con los resultados discutidos en el objetivo anterior, donde se puso de manifiesto la capacidad de la hormona pineal para inducir la diferenciación de los fibroblastos del tejido adiposo. Por otro lado, la adición de estradiol al medio potenció el efecto inhibitor de la diferenciación inducido por la presencia de células epiteliales malignas en los cocultivos, mientras que el tratamiento con melatonina contrarrestó la acción inhibitor del estradiol incrementando la diferenciación celular. Las acciones antiadipogénicas de los estrógenos son bien conocidas, y tienen lugar mediante la regulación de las moléculas responsables de la comunicación paracrina en la reacción desmoplásica. En concreto, el estradiol actúa aumentando la expresión del gen de la IL-11 y del receptor del TNF $\alpha$ , estando ambas moléculas directamente implicadas en la inhibición de la diferenciación de los fibroblastos del tejido adiposo (Bulun y cols., 2007).

Experimentos referentes a la proliferación de las células 3T3-L1 muestran que ésta fue estimulada cuando se añadieron células MCF-7 al cultivo, mientras que la melatonina redujo la proliferación de los adipocitos inducida por la presencia de células MCF-7. Este resultado sugiere, de nuevo, la existencia de una comunicación paracrina entre las células epiteliales tumorales y los adipocitos, encargada de favorecer la proliferación de estos últimos.

Una elevada expresión y actividad del enzima aromatasa está considerada como un indicativo de una pobre diferenciación de los fibroblastos del tejido adiposo, de manera que los preadipocitos muestran una expresión y actividad aromatasa superior a la que presentan los adipocitos maduros (Bulun y cols., 2007). Nuestros resultados muestran que la presencia de células MCF-7 en el cultivo produjo un gran incremento en la actividad aromatasa de las células 3T3-L1, y este incremento fue abolido al añadir melatonina al medio. El estradiol también inhibió el aumento de la actividad aromatasa inducido por la presencia de células MCF-7 en los cocultivos, mientras que la adición simultánea de estradiol y melatonina provocó una disminución de la actividad aromatasa celular aunque no mostró un efecto aditivo. El efecto antiaromatasa del estradiol ya había sido descrito anteriormente y sugiere la

existencia de una regulación negativa que permitiría a esta molécula controlar su concentración intracelular mediante la inhibición del principal enzima encargado de su biosíntesis (Yue y cols., 2001; Pasqualini y Chetrite., 2006).

Estudios independientes llevados a cabo en distintos laboratorios concluyeron que los niveles de actividad y expresión aromatasa eran mucho mayores en el tejido adiposo de la mama adyacente al tumor que en la grasa distal o en la mama sana (O'Neill y cols., 1988; Reed y cols., 1993; Bulun y cols., 2007), lo que sugería la existencia de una comunicación paracrina entre el tejido epitelial tumoral y el tejido adiposo mamario. Los factores TNF $\alpha$ , IL-11 e IL-6 son los principales efectores de esta comunicación paracrina, y son producidos y secretados en grandes cantidades por el epitelio de la mama tumoral (Meng y cols., 2001). Estas moléculas son conocidas por sus propiedades antiadipogénicas e impiden la diferenciación de los adipocitos permitiendo la formación de una capa densa de fibroblastos rodeando al tumor, lo que constituye un evento clave en la reacción desmoplásica. Con estos precedentes, consideramos interesante estudiar la capacidad de la melatonina para modular la producción de estas citoquinas antiadipogénicas.

Nuestros resultados indican que los niveles de expresión de los genes que codifican para TNF $\alpha$ , IL-6 e IL-11 en las células MCF-7 disminuyeron en presencia de melatonina, mientras que este efecto fue revertido tras la adición de luzindol, un antagonista de la melatonina que bloquea su receptor de membrana. Estos resultados sugieren que la melatonina podría intervenir en la reacción desmoplásica mediante la regulación de la expresión de estas citoquinas antiadipogénicas, inhibiendo su síntesis por parte del epitelio tumoral y, por tanto, favoreciendo la diferenciación de los fibroblastos del tejido adiposo. En este mecanismo de acción de la hormona pineal estaría, además, implicado su receptor de membrana, puesto que al bloquearlo, el efecto de la hormona no tiene lugar. Para investigar si los propios fibroblastos del tejido adiposo contribuyen a la secreción de estas citoquinas, analizamos la expresión de los genes que codifican para TNF $\alpha$ , IL-6 e IL-11 en las células 3T3-L1, y comprobamos que, efectivamente, los niveles de expresión de estas citoquinas eran detectables y se inhibían en presencia de concentraciones farmacológicas de melatonina. Al igual que ocurre en el caso de las

células MCF-7, el receptor de membrana de la melatonina estaría mediando la acción inhibitoria de esta hormona. Este resultado nos llevó a suponer que los fibroblastos del tejido adiposo podrían secretar citoquinas antiadipogénicas al medio, que actuarían sobre dichas células mediante un mecanismo de acción autocrino.

Continuando con el estudio de las señales de comunicación en la reacción desmoplásica de la mama tumoral, observamos que la presencia de células MCF-7 en cocultivos con 3T3-L1 produjo un gran incremento en la concentración de TNF $\alpha$ , IL-6 e IL-11 en el medio, con respecto a los niveles encontrados en el caso de los adipocitos cultivados en solitario. Este resultado sugiere que son mayoritariamente las células MCF-7 las responsables de la producción y secreción de dichas moléculas, o bien esto podría deberse al resultado de una comunicación paracrina entre ambos tipos celulares, que resultase en la liberación de estas moléculas al medio por parte de ambos tipos celulares. En este caso tendría lugar un mecanismo de comunicación tanto paracrino, entre ambas líneas celulares, como autocrino, pues las citoquinas estarían actuando sobre la misma célula que las produce. Los resultados que hemos obtenido acerca de la expresión de citoquinas por parte de los fibroblastos del tejido adiposo apoyarían esta hipótesis. La adición de melatonina a los cocultivos redujo la concentración de citoquinas hasta unos niveles similares a los detectados en ausencia de células MCF-7. En el caso particular de la IL-6, dado que los niveles proteicos de esta citoquina fueron bajos aunque detectables, decidimos estimular su producción con el agente PMA, observando entonces que la melatonina logró revertir el efecto estimulador inducido por PMA sobre los niveles proteicos de IL-6 presentes en el medio de los cocultivos.

Se han descrito efectos inhibidores de la melatonina sobre la expresión y secreción de TNF $\alpha$ , IL-6 e IL-11 en otras líneas celulares *in vitro*, en concreto en células de la microglía y macrófagos (Tocharus y cols., 2010; Choi y cols., 2011). Estas citoquinas, junto con otros factores de crecimiento y la prostaglandina PGE<sub>2</sub>, juegan un papel muy importante en la modulación de la biosíntesis local de estrógenos en el cáncer de mama, estando TNF $\alpha$ , IL-6 e IL-11 directamente implicadas en la regulación de la actividad de todos los enzimas encargados de la

síntesis de estrógenos, incluyendo aromatasa, estrógeno sulfatasa y 17 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa (Purohit y cols., 2002). Una de las hipótesis que se ha formulado al respecto predice que tanto IL-6 como TNF $\alpha$  podrían afectar la actividad de estas enzimas gracias a su capacidad para permeabilizar la membrana plasmática, favoreciendo la disponibilidad de sustratos (Purohit y cols., 2002)

Históricamente, la IL-6 fue la primera citoquina identificada como responsable de la reacción desmoplásica en la mama tumoral. Su detección en el fluido intersticial mamario junto con otros hallazgos posteriores llevaron a definir a la IL-6 como un potente estimulador de la actividad aromatasa, cuya acción tenía lugar a través de un receptor específico soluble secretado únicamente por los fibroblastos del tejido adiposo tumoral (Singh y cols., 1992). Actualmente se conocen otras acciones de la IL-6 en el cáncer de mama. Concretamente, se ha descrito que esta citoquina tiene efectos autocrinos sobre el epitelio tumoral induciendo la transición del fenotipo epitelial al mesenquimal a través de la inhibición de la expresión de cadherina-E y vimentina, lo que promueve el desarrollo del tumor (Sullivan y cols., 2009). Trabajos previos realizados en nuestro laboratorio demostraron que la melatonina permite mantener las células MCF-7 en un estado menos invasivo a través del aumento en los niveles de cadherina-E y de la subunidad  $\beta_1$  de la integrina, promoviendo la diferenciación de las células epiteliales tumorales (Cos y cols., 1998). La inhibición de la expresión de IL-6 inducida por melatonina en las células MCF-7 contribuiría entonces a explicar parte de las acciones antiinvasivas de la hormona pineal.

En resumen, todos los resultados presentados en este capítulo, apuntan hacia un papel de la melatonina en la regulación de los factores que median en la comunicación paracrina y autocrina que ocurre durante la reacción desmoplásica en la mama tumoral y que tiene, como fin último, la formación de una masa fibrosa capaz de aportar gran cantidad de estrógenos al microambiente del tumor. La hormona pineal parece interferir en la reacción desmoplásica al reducir la formación de la capa de fibroblastos que rodea al tumor estimulando la adipogénesis, así como mediante la inhibición de la actividad aromatasa en las células del tejido adiposo. La regulación de la actividad aromatasa celular podría tener lugar mediante la inhibición

de la producción de citoquinas antiadipogénicas producidas por el epitelio tumoral mamario así como por el propio tejido adiposo. Estas acciones de la melatonina, en su conjunto, estarían encaminadas a reducir el crecimiento y desarrollo del tumor.

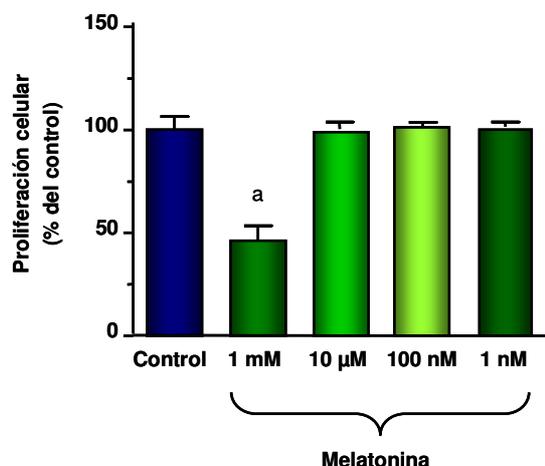
#### **4.4. EFECTO DE LA MELATONINA SOBRE LA PROLIFERACIÓN, ACTIVIDAD AROMATASA Y EXPRESIÓN DEL GEN *CYP19* EN LAS CÉLULAS DEL ENDOTELIO VASCULAR**

El tejido vascular localizado en el entorno del tumor contribuye a su crecimiento y desarrollo mediante la síntesis y secreción de estrógenos, que actuarán de manera paracrina en el entorno tumoral. El principal enzima encargado de esta biosíntesis de estrógenos *in situ* es la aromatasa, y su expresión, en el caso de las células endoteliales, está mediada en su mayor parte por el promotor pl.7. Las acciones antiaromatasa de la melatonina son bien conocidas en distintos tejidos. Puesto que se ha descrito la presencia de receptores de melatonina MT<sub>1</sub> en la membrana celular endotelial, el siguiente objetivo en nuestra investigación consistió en el estudio del posible papel ejercido por la hormona pineal sobre la capacidad del tejido vascular peritumoral para sintetizar estrógenos.

### **RESULTADOS**

#### **4.4.1. La melatonina inhibe la proliferación celular en la línea endotelial HUVEC**

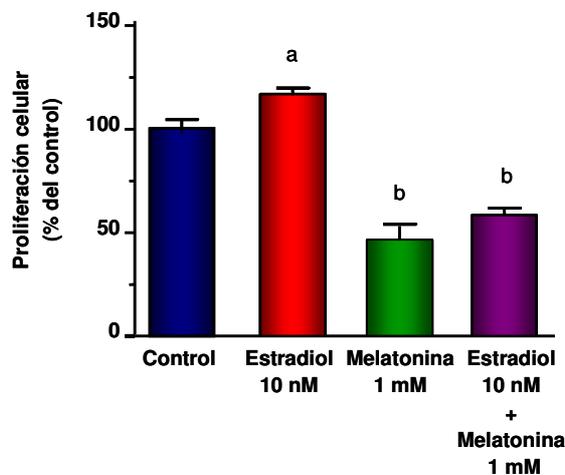
El primero de los estudios pertenecientes a este capítulo, se realizó con el objetivo de determinar el efecto de la melatonina sobre la proliferación del tejido endotelial. Para ello, se llevaron a cabo estudios de proliferación sobre la línea celular endotelial humana HUVEC en presencia de distintas concentraciones de melatonina, tal y como se detalla en el apartado de material y métodos. Como puede apreciarse en la **figura 4.17**, las células HUVEC respondieron al tratamiento con melatonina (1 mM) disminuyendo la proliferación con respecto al control de células no tratadas. La incubación de las células con concentraciones inferiores de melatonina (10 µM, 100 nM, 1 nM) no produjo cambios significativos en la proliferación celular. En vista de estos resultados, decidimos utilizar esta concentración farmacológica de melatonina en toda la serie de experimentos subsiguientes llevados a cabo en las células de la línea endotelial HUVEC.



**Figura 4.17. Efecto de la melatonina sobre la proliferación de células HUVEC.** Las células HUVEC se incubaron durante 3 días en medio VCBM suplementado con 2% SFB en presencia de las concentraciones de melatonina indicadas. La proliferación celular se evaluó mediante el método del MTT. Los resultados se expresaron como el porcentaje de proliferación con respecto al grupo control. El experimento se repitió un mínimo de 3 veces en idénticas condiciones. a,  $P < 0,001$  vs control.

#### 4.4.2. La melatonina revierte el efecto estimulador inducido por el estradiol sobre la proliferación celular en la línea HUVEC

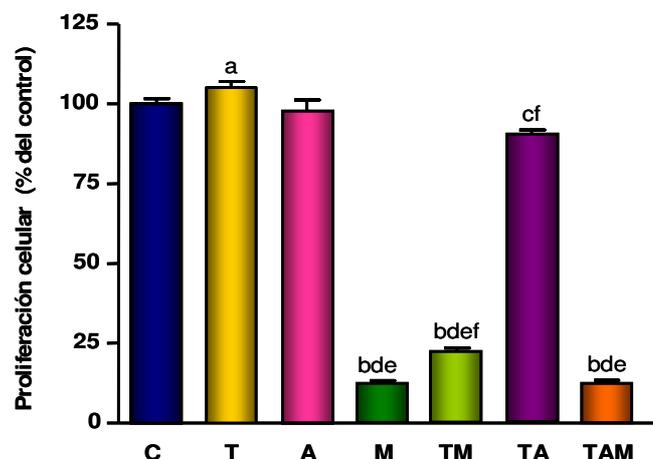
Con el objetivo de comprobar si los efectos antiproliferativos de la melatonina eran capaces de contrarrestar el conocido efecto angiogénico que los estrógenos ejercen sobre el endotelio vascular, se realizaron, de nuevo, experimentos de proliferación en células de la línea HUVEC. Para ello, se trataron las células con melatonina (1 mM) y/o  $17\beta$ -estradiol (10 nM). La **figura 4.18** muestra que, como era previsible, y de acuerdo con el efecto estimulador del estradiol encontrado en otras líneas celulares, el tratamiento de las células HUVEC con estradiol aumentó significativamente la proliferación con respecto a las células no tratadas. Sin embargo, este efecto fue contrarrestado de manera significativa por la adición simultánea de melatonina (1 mM). En concordancia con el experimento anterior, la administración de melatonina, a dosis farmacológicas, produjo una inhibición de la proliferación celular de aproximadamente un 50%.



**Figura 4.18. Efecto de la melatonina y el estradiol sobre la proliferación de células HUVEC.** Las células HUVEC se incubaron durante 3 días en medio VCBM suplementado con 5% DCC en presencia de melatonina (1 mM) y/o estradiol (10 nM). La proliferación celular se evaluó mediante el método del MTT. Los resultados se expresaron como el porcentaje de proliferación con respecto al grupo control. El experimento se repitió un mínimo de 3 veces en idénticas condiciones. a,  $P < 0,01$  vs control; b,  $P < 0,001$  vs control.

#### **4.4.3. La melatonina revierte el efecto estimulador de la testosterona sobre la proliferación de las células endoteliales. Medida indirecta de la actividad aromatasa**

Una manera de obtener una evidencia indirecta de la actividad aromatasa en la línea endotelial HUVEC se basó en evaluar la proliferación celular en medio libre de estrógenos en presencia de testosterona. Bajo estas condiciones, los efectos proliferativos de la testosterona dependen de la síntesis local de estrógenos a partir de testosterona mediada por la actividad aromatasa de las células.

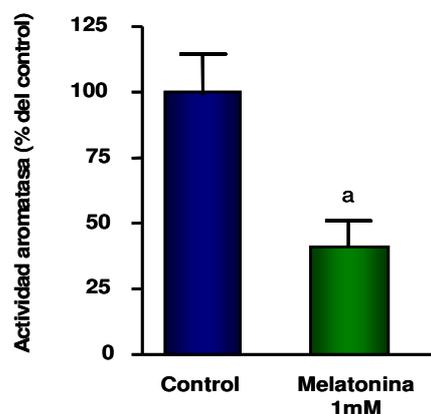


**Figura 4.19. Efecto de la melatonina sobre la proliferación de las células HUVEC dependiente de la biotransformación de testosterona en estrógenos.** Las células se sembraron en medio libre de estrógenos durante 3 días, y fueron tratadas con testosterona (T) (1  $\mu$ M), aminoglutetimida (A) (100  $\mu$ M) y melatonina (M) (1 mM) solas o combinadas o vehículo (C). La proliferación se evaluó mediante el método del MTT. Los resultados se expresaron como el porcentaje de proliferación con respecto al grupo control. El experimento se repitió un mínimo de 3 veces en idénticas condiciones. a,  $P < 0,05$  vs C; b,  $P < 0,001$  vs C; c,  $P < 0,01$  vs T; d,  $P < 0,001$  vs T; e,  $P < 0,001$  vs A; f,  $P < 0,05$  vs M.

Como puede observarse en la **figura 4.19**, el tratamiento con testosterona (1  $\mu$ M) produjo un incremento significativo en la proliferación de las células HUVEC. Sin embargo, este efecto estimulador de la testosterona se redujo al añadir aminoglutetimida (100  $\mu$ M), que es un inhibidor del enzima aromatasa. Esto indica que, al menos en parte, la proliferación celular depende de la conversión local de andrógenos en estrógenos llevada a cabo por la actividad aromatasa celular. En concordancia con los resultados expuestos anteriormente, la melatonina (1 mM) produjo un fuerte efecto antiproliferativo, además de contrarrestar el efecto estimulador de la testosterona de manera significativa cuando ambos compuestos se añadieron simultáneamente.

#### 4.4.4. La melatonina inhibe la actividad aromatasa en las células endoteliales

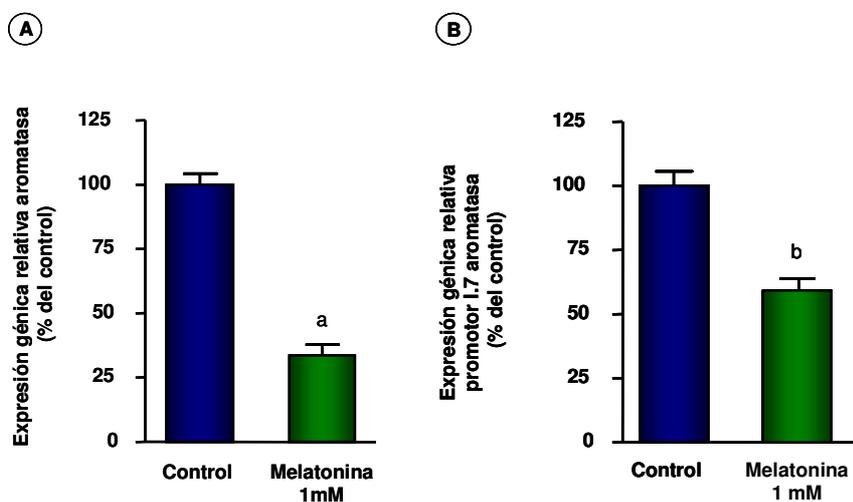
Una vez estudiado de manera indirecta el efecto de la melatonina sobre la actividad aromatasa celular en la línea endotelial HUVEC, el siguiente paso consistió en corroborar estos resultados mediante la medida directa de la actividad del enzima. Para ello, las células HUVEC se incubaron durante 24 horas en presencia del compuesto radiactivo [1 $\beta$ -3H(N)]-androst-4-ene-3,17-diona (androstenediona) (300 nM). El enzima aromatasa, presente en las células, es el encargado de realizar la transformación de androstenediona en estrona, en una reacción en la que se libera agua. De esta forma, la detección de la cantidad de agua marcada con tritio es indicativa de la actividad del enzima presente en el cultivo celular. La **figura 4.20** nos muestra que la incubación de las células con melatonina (1 mM) redujo significativamente la actividad aromatasa en las células endoteliales con una inhibición del 60% con respecto al grupo control.



**Figura 4.20. Efecto de la melatonina en la actividad aromatasa de células HUVEC.** Las células se sembraron en medio sin suero junto con androstenediona tritiada (300 nM), en presencia de melatonina (1 mM) o etanol. La actividad aromatasa se determinó tras 24 horas de incubación con el sustrato radiactivo, mediante el ensayo de liberación de agua tritiada. El experimento se realizó por triplicado en idénticas condiciones. Los datos se expresaron como el porcentaje de actividad con respecto al grupo control. a,  $P < 0,01$  vs control.

#### 4.4.5. La melatonina reduce la expresión del gen *CYP19* y del promotor pl.7 de la aromatasa en la línea celular HUVEC

El último de los estudios que conforman este objetivo se realizó con el fin de valorar el efecto de la melatonina sobre la expresión del gen de la aromatasa, así como del promotor de aromatasa pl.7, específico de las células endoteliales. Para ello, las células HUVEC se incubaron durante 4 horas en medio VCBM sin suero en presencia de melatonina (1 mM) o etanol (vehículo), y se valoró la expresión génica mediante PCR a tiempo real. Los resultados obtenidos se recogen en la **figura 4.21**.



**Figura 4.21. Efecto de la melatonina en la expresión del gen de la aromatasa y su promotor pl.7 en células HUVEC.** Las células se incubaron en medio VCBM sin suero en presencia de melatonina (1 mM) o etanol durante 4 horas. El mRNA total se extrajo de las células, se sintetizó cDNA y la expresión génica de la aromatasa (A) y del promotor pl.7 de la aromatasa (B) se cuantificó mediante PCR a tiempo real. Los datos se expresaron como el porcentaje de la expresión con respecto al grupo control. a,  $P < 0,001$  vs control; b,  $P < 0,01$  vs control.

El tratamiento con melatonina, a una concentración farmacológica (1 mM) disminuyó hasta un 65% la expresión del gen de la aromatasa con respecto a las células no tratadas (control). Por su parte, el promotor pl.7 de la aromatasa sufrió una reducción de su expresión del 40% cuando las células fueron tratadas con melatonina (1 mM).

## **DISCUSIÓN**

En los últimos tiempos, numerosos grupos científicos han dedicado sus investigaciones a estudiar la importancia del microambiente tumoral y su contribución al crecimiento y desarrollo de los tumores. El tejido adiposo peritumoral, compuesto por adipocitos maduros, fibroblastos indiferenciados y una pequeña proporción de otros tipos de células residentes, contribuye al crecimiento y desarrollo del tumor no sólo proporcionando un apoyo estructural al mismo sino también mediante el aporte de una serie de moléculas, principalmente estrógenos, destinadas a favorecer la progresión del tumor. Aproximadamente el 7% de las células que se encuentran en las inmediaciones del tumor pertenecen al endotelio vascular y su función principal consiste en la formación de una red de vasos sanguíneos que proporcionen oxígeno y nutrientes al tumor. Además de esta función estructural, las células endoteliales contribuyen al aporte de estrógenos a la masa tumoral gracias a la expresión del enzima aromatasa. Recientemente, Sebastian y colaboradores (2007) caracterizaron el promotor I.7 de la aromatasa (pI.7), descubriendo que contiene elementos reguladores de la expresión característicos de las células endoteliales y que además parece que podría ser responsable de la sobreexpresión de la aromatasa en las células del endotelio tumoral. La presencia de los receptores de melatonina  $MT_1$  y  $MT_2$  en la membrana de las células endoteliales (Cui y cols., 2008) nos hizo pensar en estas células como posible diana de acción de la melatonina.

Para la realización de los experimentos subsiguientes utilizamos como modelo experimental la línea de células endoteliales HUVEC procedente de cordón umbilical humano. Nuestros resultados muestran que el tratamiento con melatonina a concentración farmacológica inhibió la proliferación de las células HUVEC, al igual que ocurría en el caso de experimentos de proliferación realizados previamente en nuestro laboratorio en células de glioma (González y cols., 2007). De hecho, otros autores han descrito que únicamente concentraciones farmacológicas de melatonina son capaces de inhibir la proliferación de células de origen endotelial (Cui y cols., 2006). La eficacia de la melatonina en las distintas líneas celulares estudiadas no tiene lugar siempre a las mismas concentraciones. De hecho, sus acciones tanto en

cultivos de células tumorales como en otras líneas celulares dependen de distintos factores, tales como la concentración, duración del tratamiento y las características particulares de las células sobre las que se ensayan. Varios autores han demostrado la necesidad de ensayar concentraciones elevadas de melatonina para observar efectos oncostáticos en distintas líneas de células tumorales (Sainz y cols., 2005; García-Santos y cols., 2006;). En este trabajo hemos observado que en los experimentos de medida de la proliferación celular, únicamente fueron efectivas las concentraciones farmacológicas de melatonina, por lo que decidimos utilizar esta concentración en los experimentos subsiguientes.

El tratamiento con estradiol estimuló la proliferación de las células HUVEC mientras que la adición de melatonina contrarrestó este efecto. Este dato concuerda con los efectos proangiogénicos del estradiol descritos por otros autores tanto *in vivo* como *in vitro* (Morales y cols., 1995) y responde a la presencia de receptores de estrógenos en las células endoteliales, que mediarían la respuesta a esta hormona. La capacidad de los estrógenos para estimular la angiogénesis se basa principalmente en el incremento que ejercen sobre la producción del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (Concina y cols., 2000). Además, se ha descrito que los estrógenos preservan la conformación estructural de las fibras de actina presentes en el citoesqueleto de las células endoteliales en condiciones de estrés metabólico, impiden la apoptosis endotelial en condiciones de hipoxia e inducen la migración de las células endoteliales para formar estructuras vasculares (Razandi y cols., 2000).

En la siguiente batería de experimentos, nuestro objetivo fue estudiar si la melatonina era capaz de modular la síntesis de estrógenos mediada por el enzima aromatasa en las células HUVEC. Los resultados que obtuvimos se apoyan en tres evidencias experimentales. En primer lugar, la melatonina contrarrestó la proliferación de las células endoteliales inducida por testosterona. Bajo estas condiciones, la proliferación celular depende de la biosíntesis local de estrógenos a partir de testosterona mediada por la actividad aromatasa, por lo que este experimento proporciona una medida indirecta de la actividad de este enzima en las células. En un segundo abordaje experimental, observamos que el tratamiento con

melatonina inhibió la actividad aromatasa de las células HUVEC valorada mediante un método de medida directa de la actividad. Por último, la evaluación de la expresión del gen de la aromatasa demostró la acción inhibidora de la hormona pineal a nivel de expresión génica. Además, el hecho de que la melatonina también consiguió inhibir la expresión del promotor pl.7, específico de las células endoteliales, parece indicar que este promotor está efectivamente implicado en la expresión de aromatasa en esta línea celular y que además resulta sensible al tratamiento con melatonina.

Trabajos previos realizados en nuestro laboratorio han puesto de manifiesto las propiedades antiaromatasa de la melatonina en varias líneas celulares. En concreto, se había observado que el tratamiento con melatonina modula la conversión de andrógenos en estrógenos en células de tumor mamario (Cos y cols., 2005) y glioma (González y cols., 2007), así como en fibroblastos del tejido adiposo, tal y como hemos presentado en objetivos anteriores del presente trabajo.

El enzima aromatasa está codificado por un único gen y su expresión está regulada en los distintos tejidos mediante un mecanismo de *splicing* alternativo. En el tejido mamario sano, la aromatasa se expresa principalmente gracias a la activación del promotor pl.4. Sin embargo, en la mama tumoral, la expresión del gen de la aromatasa sufre un gran incremento debido a la activación de los promotores pl.3 y p.II. El reciente descubrimiento del promotor pl.7 (Sebastian y cols., 2007), que contiene un sitio de unión a GATA característico de los promotores de origen endotelial, aunque también está presente y se sobreexpresa en el epitelio de la mama tumoral, nos hizo plantearnos la hipótesis de que las células del endotelio vascular podrían contribuir al desarrollo y progresión del tumor mediante la biosíntesis *in situ* de estrógenos, mediada por la aromatasa. La sobreexpresión de la aromatasa dirigida por el promotor pl.7 en las células endoteliales vasculares adyacentes podría afectar al crecimiento del tumor mediante dos mecanismos. En primer lugar, una actividad aromatasa elevada incrementaría la concentración local de estrógenos, que mediante un mecanismo paracrino contribuirían al crecimiento del tumor. Por otro lado, los estrógenos presentan unas propiedades angiogénicas bien conocidas (Morales y cols., 1995; Soares y cols., 2003), por lo que un aumento

en la concentración local de estrógenos promovería la angiogénesis, consistente en la formación de nuevos vasos sanguíneos, lo que permitiría un mayor flujo de nutrientes y oxígeno, que, en último término favorecería la expansión del tumor. En conclusión, los resultados de este capítulo ponen de manifiesto que la melatonina, a través de sus acciones antiaromatasa, ejerce un papel regulador en la capacidad de síntesis de estrógenos por parte de las células del endotelio vascular mediante la regulación de la actividad aromatasa así como de la expresión génica de dicho enzima mediada principalmente por el promotor p1.7.

Una vez demostrado que la melatonina modula la actividad aromatasa de las células endoteliales, encargadas de producir estrógenos que favorecen el crecimiento del tumor, nos propusimos como hipótesis de partida para el siguiente objetivo tratar de determinar si las células tumorales pueden establecer señales de comunicación con las células endoteliales adyacentes y si la melatonina puede regular dichas interrelaciones. Los resultados obtenidos en esta parte del trabajo se describen en el siguiente capítulo.

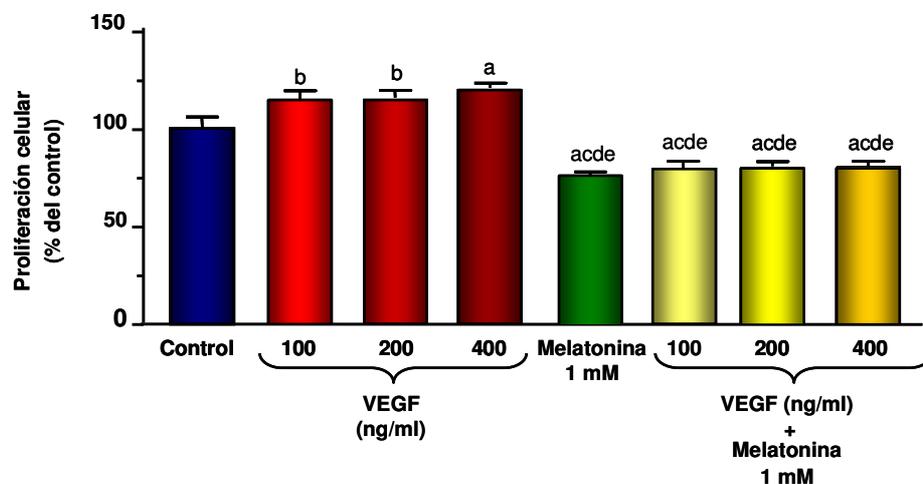
#### **4.5. ESTUDIO DEL PAPEL DE LA MELATONINA EN LA REGULACIÓN DEL FACTOR DE CRECIMIENTO ENDOTELIAL VASCULAR (VEGF) EN EL TEJIDO TUMORAL MAMARIO**

Continuando con el estudio de las señales de comunicación en el tejido peritumoral mamario, nos propusimos investigar la relación paracrina existente entre las células epiteliales tumorales y el tejido endotelial adyacente. La importancia del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) como principal efector de dicha comunicación nos hizo plantear como otro de los objetivos del presente trabajo el estudio de la liberación de este factor por parte de las células tumorales, su efecto en el endotelio vascular y la posible implicación de la melatonina como modulador de este proceso.

### **RESULTADOS**

#### **4.5.1. La melatonina revierte el incremento en la proliferación de las células endoteliales inducido por VEGF**

En primer lugar, quisimos comprobar el efecto del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) sobre la proliferación de las células endoteliales planteándonos estudiar si las conocidas acciones antiangiogénicas de la melatonina eran capaces de revertir el efecto estimulador que previsiblemente ejercería dicho factor. Para ello, cultivamos células de la línea endotelial HUVEC en medio de cultivo libre de suero, al que se añadieron distintas concentraciones de VEGF (100 ng/ml, 200 ng/ml, 400 ng/ml), melatonina (1 mM) o bien una combinación de ambos compuestos. Transcurridas 48 horas, se realizó un ensayo de proliferación mediante el método del MTT. Los resultados se muestran en la **figura 4.22**.



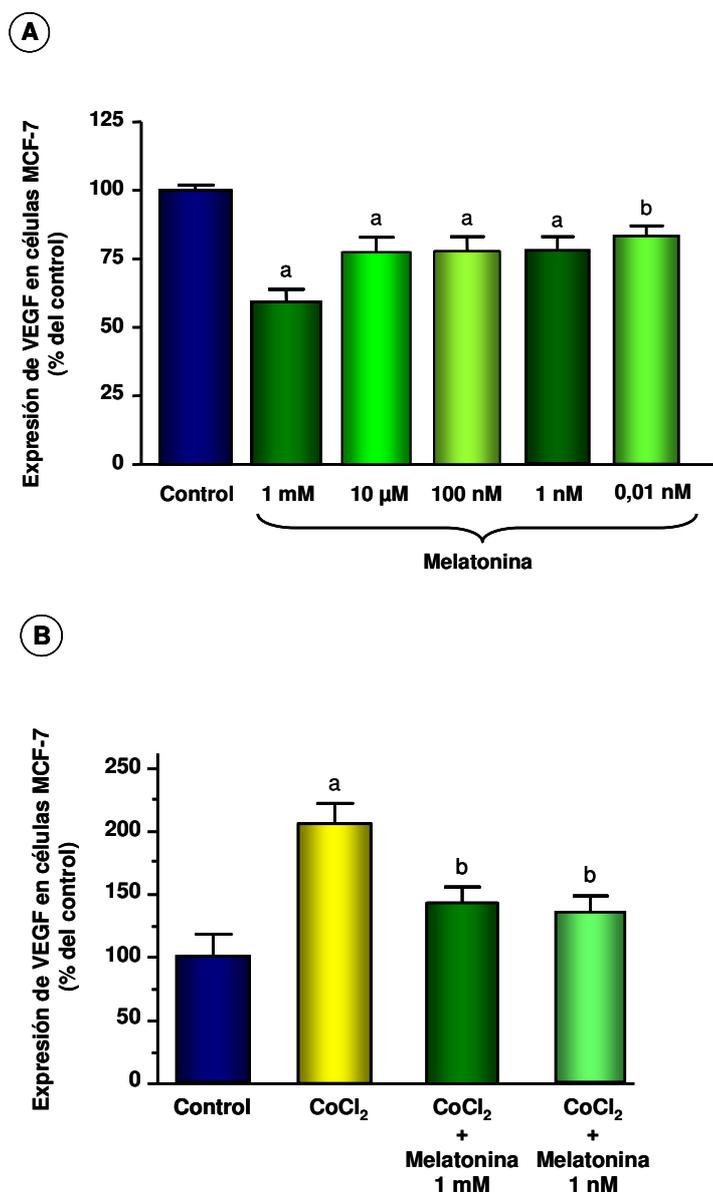
**Figura 4.22. Efecto de VEGF y melatonina sobre la proliferación de las células HUVEC.** Las células HUVEC se incubaron durante 48 horas en medio VCBM sin suero con melatonina (1mM) o bien con distintas concentraciones de VEGF recombinante (100, 200, 400 ng/ml), en presencia o ausencia de melatonina (1 mM). La proliferación celular se evaluó mediante el método del MTT. Los resultados se expresaron como el porcentaje de la proliferación con respecto al grupo control. a,  $P < 0,001$  vs control; b,  $P < 0,01$  vs control; c,  $P < 0,001$  vs 100 ng/ml VEGF; d,  $P < 0,001$  vs 200 ng/ml VEGF; e,  $P < 0,001$  vs 400 ng/ml VEGF.

La incubación de las células HUVEC con cada una de las concentraciones de VEGF recombinante ensayadas produjo un incremento significativo de la proliferación celular con respecto al control de células no tratadas. En concordancia con los resultados descritos en el objetivo anterior, el tratamiento con melatonina (1 mM) redujo significativamente la proliferación de las células HUVEC. La adición simultánea de VEGF y melatonina (1 mM) disminuyó de manera significativa la proliferación celular con respecto a las células tratadas únicamente con VEGF, así como en relación a las células control.

#### **4.5.2. La melatonina inhibe la expresión génica de VEGF inducida por CoCl<sub>2</sub> en células MCF-7**

Con el fin de explorar el efecto de la melatonina sobre la producción de VEGF en células tumorales mamarias, se incubaron células de la línea MCF-7 con distintas concentraciones de melatonina (1 mM, 10  $\mu$ M, 100 nM, 1 nM; 0,1 nM) o bien con etanol (vehículo). A las 4 horas de incubación, se midió la expresión de mRNA del factor VEGF mediante PCR a tiempo real, según se describe en el capítulo de material y métodos.

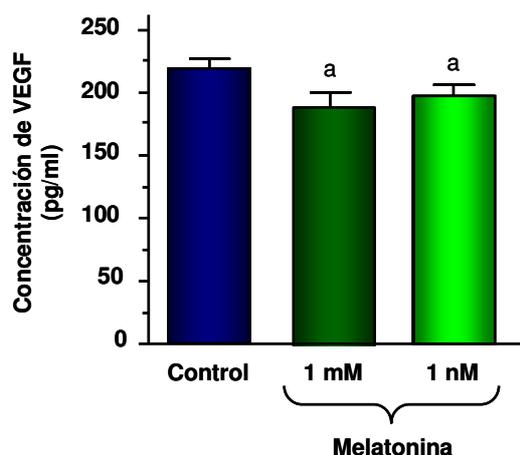
Como puede observarse en la **figura 4.23 (A)**, todas las concentraciones de melatonina ensayadas tuvieron un efecto inhibitor sobre la expresión génica de VEGF en MCF-7, siendo el tratamiento de concentración 1 mM el que produjo un efecto más potente, con un 40% de reducción de la expresión de VEGF con respecto al grupo control. En la **figura 4.23 (B)** puede apreciarse que la adición de cloruro de cobalto (CoCl<sub>2</sub>) (200  $\mu$ M), un agente capaz de mimetizar condiciones de hipoxia en el medio celular, situación conocida por inducir un aumento en la expresión de VEGF, tuvo un efecto estimulador sobre la expresión génica de VEGF, mientras que la adición de melatonina tanto a dosis farmacológicas (1 mM) como fisiológicas (1 nM) contrarrestó de forma significativa el incremento en la expresión de VEGF inducido por el tratamiento con CoCl<sub>2</sub>.



**Figura 4.23. Efecto de la melatonina sobre la expresión de VEGF en células MCF-7.** (A) Las células se incubaron con melatonina (1mM, 10 μM, 100 nM, 1 nM; 0,1 nM) o etanol, durante 4 horas. El mRNA total se aisló de las células y se sintetizó cDNA complementario, el cual fue sometido a un ensayo de PCR cuantitativa. La expresión génica se representó como el porcentaje de expresión con respecto al grupo control. a,  $P < 0,001$  vs control; b,  $P < 0,01$  vs control. (B) Las células se incubaron con CoCl<sub>2</sub> (200 μM) en presencia o ausencia de melatonina (1 mM, 1 nM) o etanol (control). La expresión génica se representó como el porcentaje de expresión con respecto al grupo control. a,  $P < 0,001$  vs control; b,  $P < 0,01$  vs CoCl<sub>2</sub>.

#### 4.5.3. La melatonina reduce la producción de VEGF en las células MCF-7

Una vez que hemos estudiado el efecto que la melatonina ejerce sobre la expresión génica de VEGF, el siguiente paso consistió en comprobar si la reducción en la expresión de VEGF mediada por melatonina se traducía en un descenso en los niveles de dicha proteína. Para ello, se midió la concentración proteica de VEGF en el medio de cultivo de células MCF-7. Las células se incubaron en medio DMEM suplementado con 0,5% DCC durante 24 horas, tras las cuales se midieron los niveles de VEGF en el medio mediante un ensayo ELISA. La **figura 4.24** muestra que, de acuerdo con los resultados obtenidos en los experimentos de expresión de VEGF, los niveles proteicos de este factor descendieron significativamente en presencia de melatonina, tanto a concentración farmacológica (1 mM) como fisiológica (1 nM), con respecto al grupo control de células no tratadas.

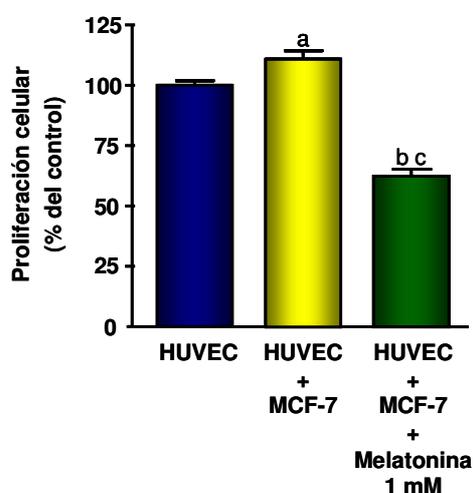


**Figura 4.24. Efecto de la melatonina sobre los niveles proteicos de VEGF en el medio de cultivo de células MCF-7.** Las células se incubaron en DMEM suplementado con 0,5% DCC y fueron tratadas con melatonina (1 mM o 1 nM) durante 24 horas. El medio de cultivo se recogió y la concentración de VEGF se midió mediante un ensayo ELISA. a,  $P < 0,01$  vs control.

#### 4.5.4. La melatonina revierte la proliferación de las células HUVEC inducida por la presencia de células MCF-7 en el cocultivo

Una vez analizados los efectos del factor VEGF y la melatonina sobre la proliferación de las células endoteliales, el siguiente de nuestros objetivos consistió en

profundizar en el estudio de la comunicación paracrina que tiene lugar entre las células epiteliales tumorales y las células endoteliales adyacentes. Nuestro primer abordaje experimental consistió en comprobar si la presencia de células epiteliales malignas podría afectar a la proliferación de las células endoteliales. Con este propósito, llevamos a cabo cocultivos de células HUVEC y MCF-7, según se detalla en el apartado de material y métodos. Los resultados obtenidos se muestran en la **figura 4.25**.

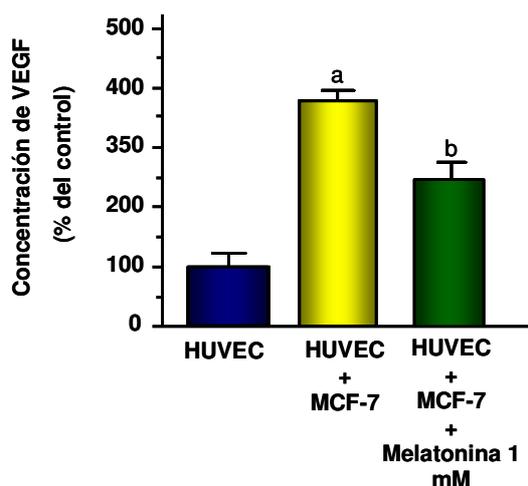


**Figura 4.25. Efecto de la presencia de células MCF-7 sobre la proliferación de las células HUVEC.** Los cocultivos de células HUVEC y MCF-7 se mantuvieron durante un total de 3 días en medio VCBM sin suero, en presencia y ausencia de melatonina (1 mM). Los resultados muestran la medida de la proliferación de las células HUVEC en los cocultivos, evaluada mediante el método del MTT. Los datos se expresaron como el porcentaje de la proliferación con respecto al grupo de células HUVEC cultivadas en solitario. El experimento se repitió 3 veces en idénticas condiciones. a,  $P < 0,01$  vs HUVEC; b,  $P < 0,001$  vs HUVEC; c,  $P < 0,001$  vs HUVEC+MCF-7.

La presencia de células MCF-7 en el cocultivo produjo un incremento significativo en la proliferación de las células endoteliales con respecto a las células HUVEC cultivadas en solitario. Por su parte, el tratamiento con melatonina (1 mM) contrarrestó el efecto estimulador de la proliferación de las células HUVEC inducido por la presencia de células MCF-7 en el cultivo.

#### 4.5.5. La melatonina disminuye los niveles proteicos de VEGF en cocultivos de células HUVEC y MCF-7

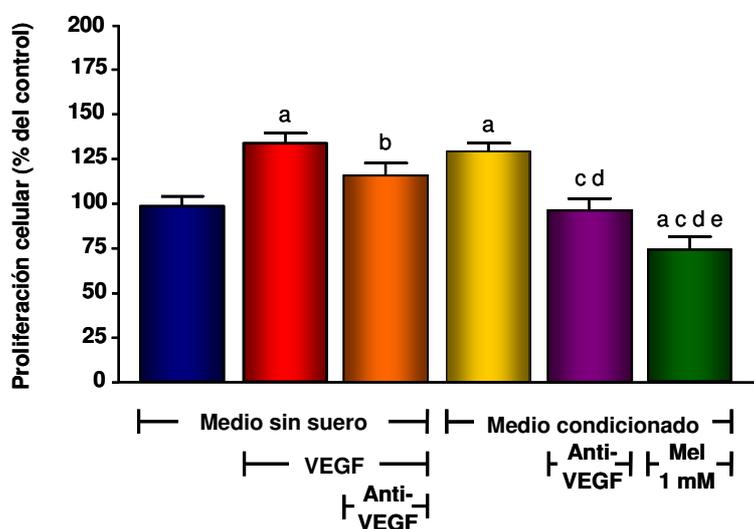
Con el fin de estudiar si el aumento en la proliferación de las células endoteliales en presencia de células epiteliales tumorales se debe a una liberación de VEGF por parte de estas últimas, se recogió el medio de los cocultivos celulares y se sometió a un ensayo ELISA, para así determinar los niveles proteicos de VEGF en el medio. Como puede apreciarse en la **figura 4.26**, la concentración de VEGF hallada en el medio de los cocultivos de células MCF-7 y HUVEC fue casi 4 veces superior a los niveles de VEGF medidos en el medio de células HUVEC cultivadas en solitario. La incubación de los cocultivos en presencia de melatonina (1 mM) redujo considerablemente la concentración proteica de VEGF en el medio.



**Figura 4.26. Efecto de la presencia de células MCF-7 sobre los niveles proteicos de VEGF en cocultivos de células HUVEC y MCF-7.** Los cocultivos de células HUVEC y MCF-7 se mantuvieron durante 3 días en medio VCBM en ausencia de suero. A continuación se recogió el medio de cultivo y se midió la concentración de VEGF en el medio mediante un ensayo ELISA. Los datos se expresaron como el porcentaje de concentración de VEGF con respecto al grupo control de células HUVEC cultivadas en solitario. a,  $P < 0,001$  vs HUVEC; b,  $P < 0,05$  vs HUVEC+MCF-7.

#### 4.5.6. El VEGF liberado por las células MCF-7 estimula la proliferación de las células HUVEC. Influencia de la melatonina

El último de los experimentos correspondientes a este capítulo tuvo como objetivo validar la hipótesis de que son mayoritariamente las células tumorales las responsables de secretar VEGF angiogénicamente activo al medio, y que este factor es capaz de estimular la proliferación de las células endoteliales. Es por ello que recogimos medio procedente de células MCF-7 y lo añadimos a un cultivo de células HUVEC con el fin de medir la respuesta proliferativa de estas células. Los resultados obtenidos se recogen en la **figura 4.27**.



**Figura 4.27. Efectos paracrinos del VEGF liberado por las células MCF-7 sobre la proliferación de las células HUVEC e influencia de la melatonina.** Las células HUVEC se cultivaron en medio VCBM sin suero junto con VEGF recombinante (100 ng/ml) en presencia o ausencia de anticuerpo anti-VEGF (300 ng/ml), o bien se les añadió medio condicionado procedente de células MCF-7 en presencia o ausencia de anticuerpo anti-VEGF (300 ng/ml) o melatonina (1 mM). La medida de la proliferación celular se realizó tras 24 horas de tratamiento mediante el método del MTT. Los resultados se expresaron como el porcentaje de la proliferación con respecto al grupo de células no tratadas. El experimento se repitió 3 veces en idénticas condiciones. a,  $P < 0,001$  vs HUVEC en medio sin suero; b,  $P < 0,05$  vs VEGF; c,  $P < 0,001$  vs VEGF; d; e,  $P < 0,001$  vs medio condicionado; e,  $P < 0,001$  vs medio condicionado+anti-VEGF.

La incubación de las células con el factor VEGF recombinante (100 ng/ml) produjo, como era de esperar, un gran incremento en la proliferación de las células HUVEC mientras que la adición del anticuerpo recombinante anti-VEGF contrarrestó el efecto proliferativo inducido por este factor. Cuando se añadió a las HUVEC medio

condicionado procedente de células tumorales MCF-7, se produjo un aumento en la capacidad proliferativa de las células, llegando hasta niveles similares a los alcanzados en presencia de VEGF. Sin embargo, la adición del anticuerpo recombinante anti-VEGF bloqueó el efecto proliferativo del medio condicionado, indicando que es el VEGF presente en el medio condicionado el causante, al menos en parte, del incremento en la proliferación celular. El tratamiento con melatonina (1 mM) tuvo también un efecto inhibitor sobre uno de los parámetros que influyen en la angiogénesis, como es la proliferación, revirtiendo así el efecto angiogénico inducido por el medio condicionado.

## **DISCUSIÓN**

La angiogénesis, o formación de nuevos vasos sanguíneos a partir del endotelio preexistente, es un evento esencial implicado en la progresión y el desarrollo del tumor y su relevancia es tal que la inhibición de la angiogénesis está considerada como una estrategia terapéutica complementaria al tratamiento del tumor a nivel del tejido epitelial maligno (Bareschino y cols., 2011). La regulación de la angiogénesis está mediada por una serie de factores, entre los que destaca el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) por su capacidad para inducir respuestas proangiogénicas en las células endoteliales que forman los vasos. El factor de crecimiento endotelial vascular juega un papel fundamental en el proceso de angiogénesis tumoral, y su expresión ha sido detectada en varios tipos de tumores humanos, incluyendo mama, cerebro, pulmón y tracto gastrointestinal (Ferrara, 1995). Su secreción por parte de las células epiteliales malignas induce, mediante un mecanismo de comunicación paracrina, la proliferación de las células endoteliales presentes en los vasos que se encuentran en las proximidades del tumor.

Entre las propiedades oncostáticas de la melatonina se encuentra la capacidad de modular el microambiente tumoral mediante la regulación de la producción de citoquinas y otros factores de crecimiento que favorecen el desarrollo del tumor, tal y como hemos expuesto en capítulos anteriores. Es por esto que nos planteamos estudiar el papel de la hormona pineal en la regulación de la producción de VEGF por parte de las células epiteliales tumorales y el efecto de este factor sobre las células del endotelio vascular.

Inicialmente quisimos analizar el efecto del tratamiento con VEGF recombinante sobre la proliferación de las células endoteliales. Tal y como ha sido descrito anteriormente, el tratamiento de las células HUVEC con distintas concentraciones de VEGF recombinante incrementó la proliferación celular (Ferrara y cols., 1992). La melatonina tuvo un efecto inhibitor sobre la proliferación de las células HUVEC contrarrestando además el efecto estimulador inducido por VEGF cuando se añadieron ambos compuestos de manera simultánea. Los efectos antiproliferativos de la melatonina han sido descritos *in vitro* en células de origen endotelial aisladas a partir

de muestras de cordón umbilical humano (Cui y cols., 2006) y pueden ser explicados de dos maneras. En primer lugar, este efecto podría responder en parte al bloqueo del ciclo celular inducido por la hormona pineal, que impide a las células entrar en la fase S, por lo que se reduce el número de células que entran en mitosis. Además, se ha propuesto que otro mecanismo implicado en el efecto antiproliferativo de la melatonina estaría basado en la capacidad de esta hormona para inducir la apoptosis celular. Esta teoría se apoya en numerosas evidencias que apuntan a la melatonina como una molécula capaz de regular la apoptosis en distintos tipos celulares. Existe gran controversia acerca del papel de la melatonina en la regulación de la apoptosis, lo que depende del tipo celular estudiado. Así, se ha visto que la hormona pineal previene la apoptosis en células del sistema inmune y neuronas, mientras que la incrementa en células tumorales (Sainz y cols., 2003).

A la vista de nuestros resultados, nos planteamos la hipótesis de un posible papel de la melatonina en la regulación de la proliferación de las células endoteliales a través del control de la producción y liberación de VEGF al microambiente tumoral por parte de las células epiteliales malignas. En primer lugar, estudiamos si la melatonina, en un amplio rango de concentraciones empleadas, podía modificar la expresión de VEGF por parte de las células MCF-7. Nuestros resultados indicaron que la melatonina redujo la expresión de VEGF en todas las concentraciones ensayadas. Además, la melatonina, tanto a concentración farmacológica como fisiológica, consiguió revertir el efecto estimulador de la expresión de VEGF inducido por  $\text{CoCl}_2$ , un compuesto capaz de desencadenar la respuesta a hipoxia en la célula, lo que se traduce en una mayor síntesis y liberación de VEGF al medio que tendrá como fin último estimular la angiogénesis en el tejido adyacente. Se ha visto que concentraciones farmacológicas de melatonina inhiben también la expresión de VEGF en células de carcinoma de páncreas (PANC-1) (Dai y cols., 2008) y en células de adenocarcinoma alveolar humano (A549) (Park y cols., 2010), mediante un mecanismo en el que está implicado el factor inducible por hipoxia HIF-1, que interviene en la transcripción génica de VEGF. La melatonina parece actuar a nivel de la transcripción de HIF-1 $\alpha$ , disminuyendo los niveles de esta proteína y reduciendo así la expresión de VEGF. Nuestros resultados indican que la inhibición de VEGF por parte de la melatonina no sólo tiene lugar a nivel de la expresión génica, sino que parece afectar también a la

síntesis y secreción proteica, pues la concentración de VEGF en el medio de cultivo se redujo tras el tratamiento de las células MCF-7 con melatonina, tanto a concentración farmacológica como fisiológica.

Como modelo *in vitro* para el estudio de la comunicación paracrina existente entre las células del epitelio tumoral mamario y del endotelio adyacente, decidimos utilizar un sistema de cocultivos celulares en el cual sembramos en la misma placa de cultivo células de las líneas HUVEC y MCF-7 separadas por un soporte semipermeable. Nuestros resultados muestran que la presencia de células MCF-7 en el cocultivo incrementó la proliferación de las células HUVEC y este efecto estimulador fue revertido por el tratamiento con melatonina. Esto sugiere la existencia de una comunicación paracrina entre ambos tipos de células, siendo el VEGF producido y liberado por las MCF-7, un buen candidato a considerar como molécula mediadora de dicha comunicación, y por tanto, el causante del incremento en la proliferación de las células HUVEC. Esta hipótesis se ve corroborada por el hecho de que la concentración proteica de VEGF encontrada en el medio de cultivo fue significativamente mayor cuando se cultivaron las dos líneas celulares juntas, mientras que el tratamiento con melatonina contrarrestó el efecto estimulador ejercido por la presencia de MCF-7 en los cocultivos sobre los niveles proteicos de VEGF.

Con el objetivo de demostrar los efectos paracrinos del VEGF secretado por las células epiteliales tumorales sobre la proliferación de las células endoteliales, recogimos medio condicionado procedente de células MCF-7 y lo añadimos a los cultivos de células HUVEC. La adición del medio condicionado estimuló la proliferación de las células HUVEC y este efecto fue bloqueado tras añadir un anticuerpo anti-VEGF al medio. Este resultado indica que efectivamente, el VEGF secretado al medio por las células MCF-7 fue responsable de la respuesta proliferativa por parte de las células endoteliales, bien por sí mismo o en combinación con algún otro factor producido por las células tumorales o endoteliales en respuesta a señales paracrinas. En cualquier caso, el VEGF presente en el medio fue angiogénicamente activo y tuvo un papel predominante en la respuesta proliferativa. La melatonina añadida al cultivo revirtió el efecto estimulador de la proliferación de las células HUVEC inducido por el tratamiento con el medio condicionado. A pesar de que las respuestas de proliferación

en las células endoteliales están mediadas por varios factores de crecimiento, se ha descrito que es el VEGF el que ejerce unos efectos angiogénicos más potentes debido a sus propiedades antiapoptóticas y como factor de supervivencia (Ferrara, 1999).

Todos estos resultados apoyan un modelo en el cual las células epiteliales tumorales secretan factores angiogénicamente activos que incrementan la proliferación de las células del endotelio vascular, siendo el VEGF el factor secretado con mayor capacidad para producir este efecto. Los resultados que hemos obtenido sugieren que la melatonina parece tener un papel en la regulación de la comunicación paracrina entre las células epiteliales tumorales y el endotelio proximal a través de una inhibición en la síntesis y secreción de VEGF por parte de las células tumorales, lo que reduce los niveles de VEGF en las inmediaciones del endotelio vascular. Debido a sus potentes efectos angiogénicos, la reducción de los niveles de VEGF afectaría a la angiogénesis tumoral provocando una disminución de la tasa de proliferación de las células endoteliales y, por tanto, del crecimiento y remodelado de los vasos sanguíneos tumorales. Además, y teniendo en cuenta que las células endoteliales constituyen una fuente de producción de estrógenos, una menor tasa de proliferación se traduciría en un menor número de células secretoras de estrógenos próximas al tumor. El efecto antiangiogénico inducido por la hormona pineal se sumaría a la inhibición de la expresión y actividad aromatasa de las células endoteliales descritos en el capítulo anterior, así como a los efectos reguladores ejercidos sobre los fibroblastos del tejido adiposo adyacentes al tumor que hemos demostrado a lo largo del presente trabajo.



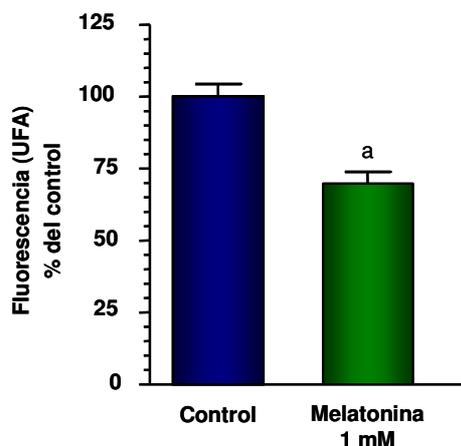
## **4.6. ACCIONES DE LA MELATONINA EN LA ANGIOGÉNESIS**

Las células endoteliales adyacentes al tejido tumoral deben crecer, proliferar, migrar y reorganizarse para formar el tejido vascular encargado de aportar oxígeno y nutrientes al tumor, permitiendo así su crecimiento y expansión. Los resultados obtenidos en los experimentos del objetivo anterior mostraron que la melatonina era capaz de modular la comunicación paracrina que existe entre las células epiteliales tumorales y las células endoteliales, la cual está mediada mayoritariamente por el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). Con el fin de analizar en profundidad las acciones directas de la melatonina sobre la angiogénesis vascular definida como el proceso de formación de nuevos vasos sanguíneos, se llevaron a cabo una serie de experimentos diseñados para evaluar las diferentes etapas del proceso angiogénico y la posible modulación de dicho proceso por parte de la melatonina.

### **RESULTADOS**

#### **4.6.1. La melatonina inhibe la capacidad de invasión de las células HUVEC**

La invasión de las células endoteliales o su capacidad para desplazarse y colonizar nuevos tejidos, es un evento esencial para la formación de los nuevos vasos sanguíneos y, por tanto, del crecimiento del tumor. Es por esto que quisimos estudiar el efecto del tratamiento con melatonina sobre las propiedades de invasión de las células de la línea endotelial HUVEC. Para ello se utilizó un kit comercial con el que se cuantificó la capacidad de las células HUVEC para atravesar una membrana basal sintética en presencia o ausencia de melatonina (1 mM), según se describe en el apartado de material y métodos. Como se observa en la **figura 4.28**, la adición de melatonina a concentración farmacológica (1 mM), inhibió de forma significativa la capacidad invasiva de las células HUVEC con respecto al grupo control.

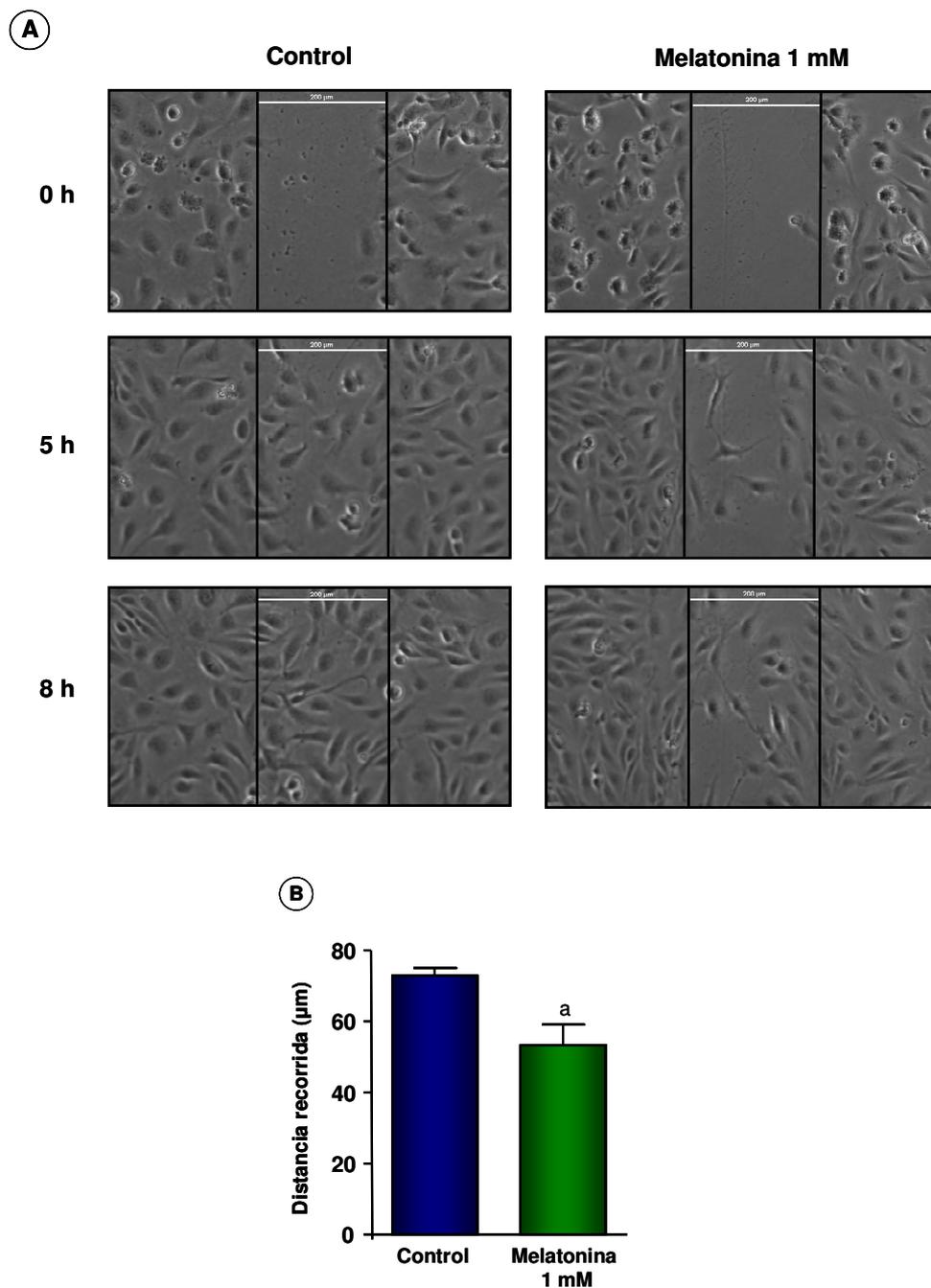


**Figura 4.28. Efecto de la melatonina sobre la capacidad invasiva de las células HUVEC.**

Las células HUVEC se sembraron en la cámara superior de invasión en medio VCBM sin suero en presencia o ausencia de melatonina (1 mM) y se incubaron durante 48 horas para permitir su migración a través de la membrana basal sintética. La invasión se cuantificó mediante la medida de la fluorescencia, procedente de la calceína intracelular, a 485 nm de excitación y 520 nm de emisión. Los resultados se expresaron como el porcentaje de fluorescencia con respecto al grupo control de células no tratadas, en Unidades de Fluorescencia Arbitrarias. a,  $P < 0,01$  vs control.

#### 4.6.2. La melatonina inhibe la migración de las células HUVEC

Una vez que las células endoteliales han colonizado un nuevo tejido, el siguiente paso consiste en desplazarse sobre él y reorganizarse con el fin de formar una red vascular que aporte oxígeno y nutrientes al tumor. Con el fin de estudiar la influencia de la melatonina sobre la capacidad de desplazamiento de las células endoteliales, se realizó un experimento de migración con células de la línea HUVEC. Para este estudio, las células se sembraron en placas de cultivo en medio VCBM suplementado con 2% de SFB. Sobre cada placa se realizó una incisión longitudinal, y tras añadir el tratamiento de melatonina (1 mM) o vehículo (etanol), se monitorizó el desplazamiento celular en varios campos seleccionados aleatoriamente sobre la línea de incisión, realizando microfotografías cada 10 minutos durante las 8 horas en las que transcurrió el experimento. El resultado puede apreciarse en la **figura 4.29**. El tratamiento con melatonina a concentración farmacológica inhibió significativamente la migración de las células HUVEC con respecto al grupo control.



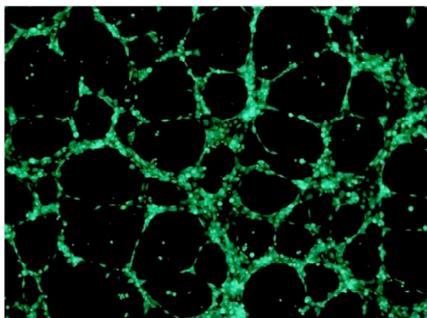
**Figura 4.29. Efecto de la melatonina sobre la migración de las células HUVEC.** (A) Las células HUVEC se sembraron en placas de cultivo en medio VCBM suplementado con 2% SFB. Sobre la monocapa de células confluentes, se realizó una incisión longitudinal y las células se incubaron durante 8 horas con melatonina (1 mM) o etanol (control). La migración celular a lo largo de la incisión se monitorizó en distintos campos escogidos al azar mediante fotografías realizadas cada 10 minutos durante todo el experimento. (B) El tamaño de la incisión en el tiempo inicial (t=0) y final (t=8) se utilizó para determinar la distancia de migración. El experimento se repitió 3 veces en idénticas condiciones. a,  $P < 0,05$  vs control.

#### 4.6.3. Estudio de la capacidad de las células HUVEC para formar estructuras tubulares

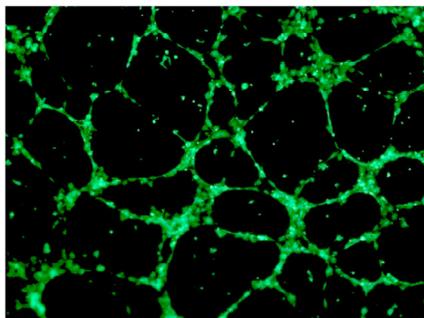
La tubulogénesis, o formación de estructuras precursoras de los vasos sanguíneos, y su ramificación para formar nuevos vasos, constituye una etapa fundamental en el proceso de vascularización del tumor. Dado que son ya conocidas las propiedades antiangiogénicas de la melatonina en otros tipos de tumores (colon, páncreas, útero o pulmón), quisimos estudiar la capacidad de esta hormona para interferir en la formación de estructuras tubulares por parte de la línea celular HUVEC inducida por las células tumorales mamarias. Con este objetivo, las células se sembraron en la superficie de una matriz extracelular sintética y las estructuras tubulares formadas tras 5 horas de incubación con los distintos tratamientos, se fotografiaron para cuantificar posteriormente la longitud de dichos túbulos. Como puede observarse en la **figura 4.30**, la incubación con VEGF recombinante (100 ng/ml) provocó la formación de estructuras tubulares de mayor tamaño que el encontrado en las células no tratadas. Por su parte, el tratamiento con melatonina (1mM) inhibió de forma significativa la formación de estructuras tubulares, de manera que los túbulos formados presentaron una longitud considerablemente menor a la del grupo control. La adición simultánea de VEGF recombinante (100 ng/ml) y melatonina (1 mM) resultó en una reducción de la longitud tubular, lo que indica que la melatonina revirtió el efecto tubulogénico del VEGF. Cuando las células HUVEC se incubaron con medio condicionado procedente de células MCF-7, se produjo un incremento significativo en el tamaño de los túbulos formados con respecto al obtenido en las células no tratadas, y este aumento se vio contrarrestado por la adición de anticuerpo recombinante anti-VEGF (300 ng/ml). Finalmente, la adición simultánea de medio condicionado procedente de células MCF-7 y melatonina (1 mM) resultó en la formación de túbulos con una longitud menor que aquellos formados en el grupo de células tratadas únicamente con medio condicionado y del grupo control.

(A)

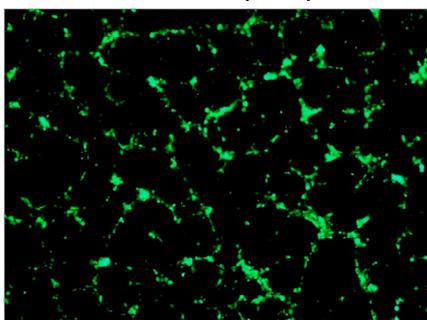
Control



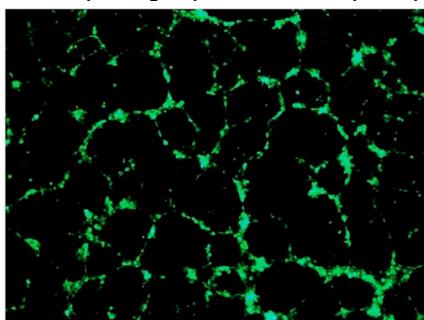
VEGF (100 ng/ml)



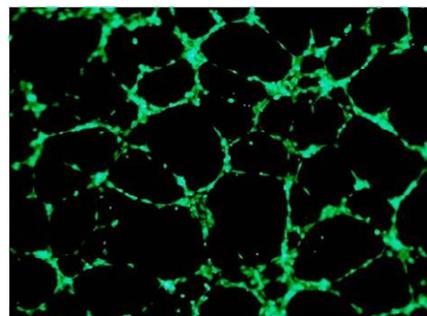
Melatonina (1 mM)



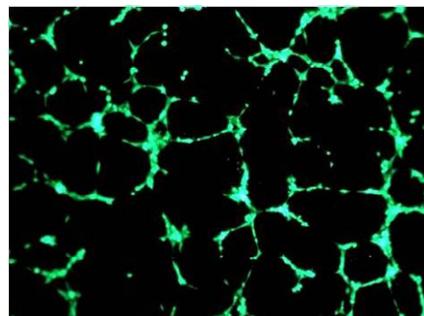
VEGF (100 ng/ml) + Melatonina (1 mM)



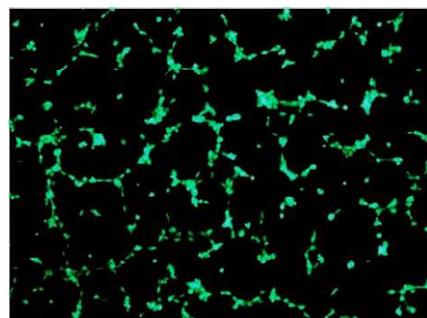
Medio condicionado

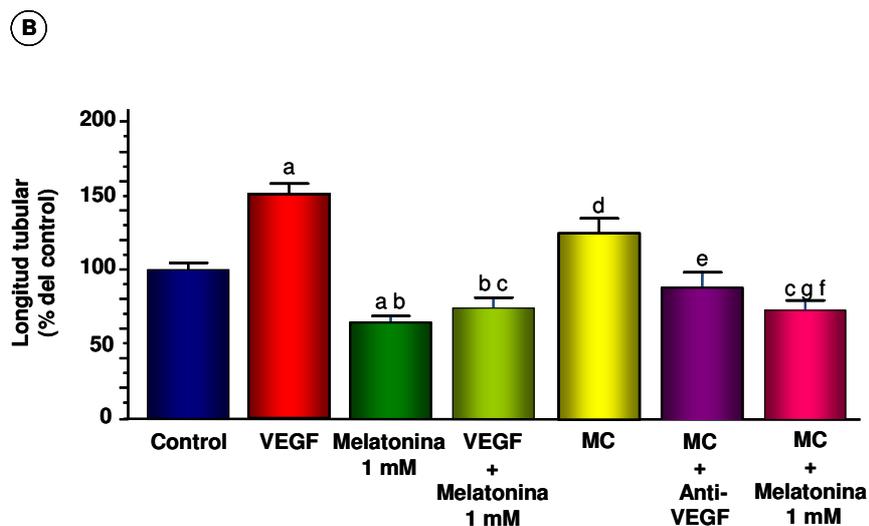


MC + Anti-VEGF



MC + Melatonina 1 mM





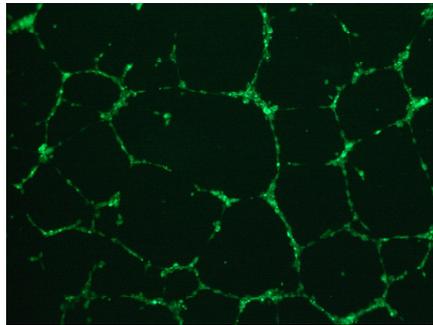
**Figura 4.30. Efecto de la melatonina sobre la formación de túbulos por parte de las células HUVEC.** (A) Las células HUVEC se sembraron sobre una matriz extracelular sintética en medio VCBM suplementado con 2% SFB y los tratamientos indicados en la figura. Al cabo de 5 horas, se fotografiaron las estructuras celulares con un microscopio de fluorescencia a un aumento de 4X. (B) La formación de estructuras tubulares se cuantificó mediante la medida de la longitud (en  $\mu\text{m}$ ) de los túbulos en las fotografías. Los resultados se expresaron como el porcentaje de longitud con respecto al grupo control de células no tratadas. a,  $P < 0,001$  vs control; b,  $P < 0,001$  vs VEGF; c,  $P < 0,01$  vs control; d,  $P < 0,05$  vs control; e,  $P < 0,05$  vs MC; f,  $P < 0,001$  vs MC; g,  $P < 0,05$  vs MC+Anti-VEGF.

#### 4.6.4. Estudio de la disgregación de las estructuras tubulares formadas por las células HUVEC

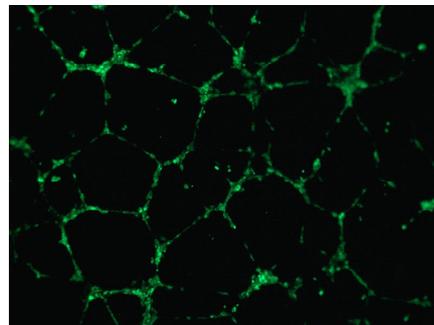
El último de los experimentos que conforman este objetivo consistió en estudiar la disgregación de las estructuras tubulares previamente formadas por las células endoteliales en presencia de distintos tratamientos. Con esta finalidad se sembraron células HUVEC sobre una matriz sintética y se permitió la formación espontánea de túbulos durante 5 horas en ausencia de tratamientos. Transcurrido este tiempo, se incubaron las células durante 4 horas adicionales en presencia de VEGF recombinante (100 ng/ml), melatonina (1 mM), medio condicionado (MC) o una combinación de VEGF (100 ng/ml) y melatonina (1 mM), medio condicionado y anti-VEGF recombinante (300 ng/ml) o medio condicionado y melatonina (1 mM). Los resultados se muestran en la **figura 4.31**.

(A)

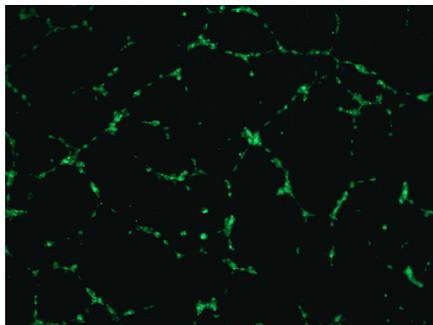
**Control**



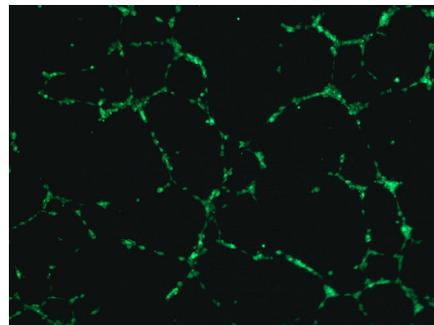
**VEGF (100 ng/ml)**



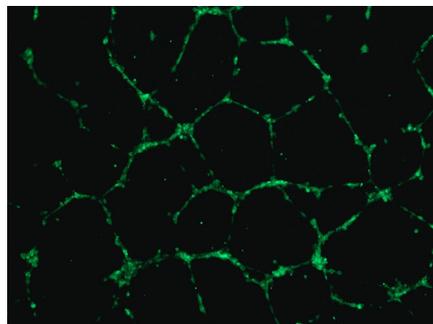
**Melatonina (1 mM)**



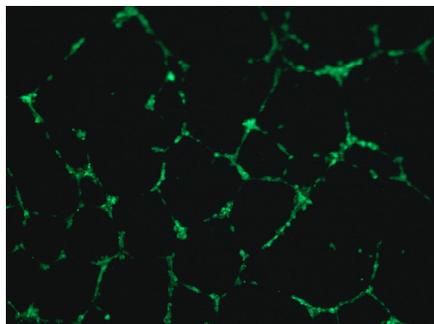
**VEGF (100 ng/ml) + Melatonina (1 mM)**



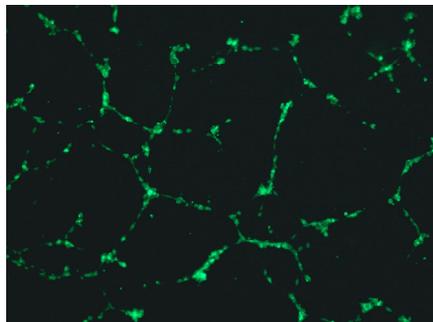
**Medio condicionado**

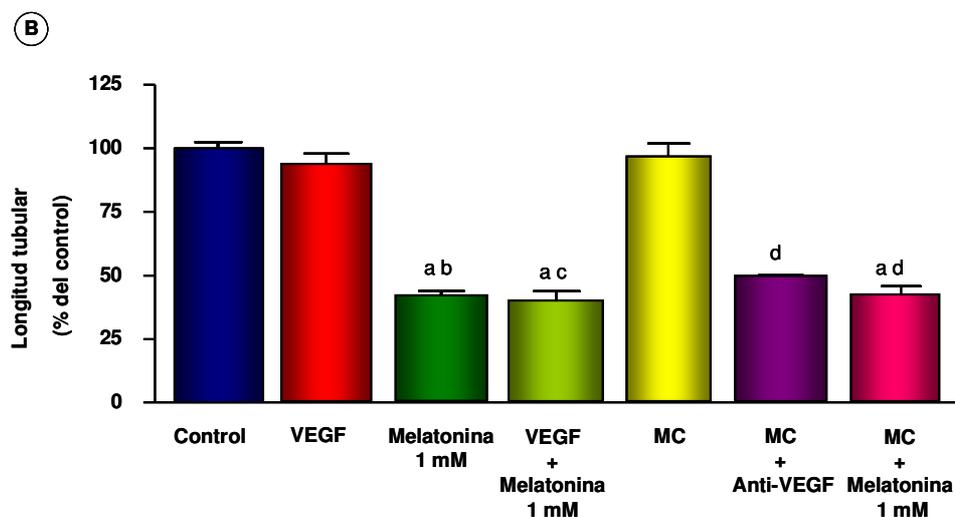


**MC + Anti-VEGF**



**MC + Melatonina 1 mM**





**Figura 4.31. Efecto de la melatonina en la disgregación de estructuras tubulares formadas por células HUVEC.** (A) Las células HUVEC se sembraron sobre una matriz extracelular sintética en medio VCBM suplementado con 2% SFB y se incubaron durante 5 horas para permitir la formación de túbulos. Transcurrido ese tiempo, las células se incubaron durante 4 horas adicionales con medio 2% SFB/VCBM en presencia de los tratamientos indicados. Las imágenes se obtuvieron con un microscopio de fluorescencia a un aumento de 4X. (B) La disgregación de estructuras tubulares se cuantificó mediante la medida de la longitud (en  $\mu\text{m}$ ) de los túbulos en las fotografías. Los resultados se expresaron como el porcentaje de longitud con respecto al grupo control de células no tratadas. a,  $P < 0,001$  vs control; b,  $P < 0,01$  vs VEGF; c,  $P < 0,001$  vs VEGF; d,  $P < 0,001$  vs MC.

Los túbulos de las células incubadas con VEGF recombinante (100 ng/ml) presentaron una longitud similar a los de las células no tratadas. Sin embargo, las estructuras tubulares presentes en las muestras tratadas con melatonina (1 mM) tuvieron una longitud significativamente menor que las del control, indicando que la presencia de melatonina en el medio promueve la disgregación de dichas estructuras.

La combinación de VEGF (100 ng/ml) y melatonina (1 mM), por su parte, resultó en un aumento significativo de la disgregación tubular. La longitud de los túbulos fue similar a la del control en el caso de las células HUVEC tratadas con medio condicionado procedente de células MCF-7, mientras que la adición simultánea de medio condicionado y anticuerpo anti-VEGF (300 ng/ml) redujo significativamente la longitud tubular con respecto al grupo de medio condicionado y al control de células no tratadas. Finalmente, la adición conjunta de medio

condicionado y melatonina (1 mM) resultó en una disgregación tubular significativamente mayor a la del grupo de células tratadas con medio condicionado y con respecto al control, ya que los túbulos formados tuvieron una longitud menor.

## **DISCUSIÓN**

El desarrollo y la progresión del cáncer dependen en gran medida de la angiogénesis, pues son los vasos sanguíneos cercanos al tumor los que aportan nutrientes y oxígeno esenciales para su crecimiento. La neoangiogénesis se considera un evento crucial para la transición de los tumores del estado latente al maligno por lo que esta característica se ha establecido, en los últimos años, como un indicador pronóstico de la enfermedad en varios tipos de tumores (Hanahan y Weinberg, 2000). La angiogénesis tumoral es un mecanismo complejo y estructurado en varios pasos, que incluyen la secreción o activación de factores angiogénicos por parte de las células tumorales, activación de enzimas proteolíticos, migración, proliferación y diferenciación de las células del endotelio vascular.

Las células endoteliales que conforman la estructura de los vasos sanguíneos juegan un papel fundamental en el control de la angiogénesis, pues son las responsables de llevar a cabo el proceso de formación de nuevos vasos en respuesta a las señales del microambiente tumoral. Las células del epitelio tumoral mamario secretan distintos tipos de factores angiogénicos, entre los que se incluyen factores de la familia de VEGF, factor de crecimiento de fibroblastos (FGF-1 y FGF-2), factor de crecimiento de la placenta, factor de crecimiento transformante  $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1), timidina fosforilasa, pleiotropina y adrenomedulina (Giovannini y cols., 2010). Muchos de estos factores se secretan mayoritariamente a lo largo de las distintas fases del desarrollo tumoral, mientras que la liberación de VEGF tiene lugar en todas las fases de la carcinogénesis, lo que unido a sus importantes propiedades angiogénicas lo convierten en un factor cuyas acciones autocrinas y paracrinas sobre el endotelio vascular resultan fundamentales para el crecimiento y expansión del tumor. Las células endoteliales y las señales del microambiente que las rodea constituyen una diana terapéutica potencial en el tratamiento de distintos tipos de tumores, pues son células que no tienden a transformarse y se consideran poco susceptibles a adquirir resistencia a fármacos (Boehm y cols., 1997).

El proceso de angiogénesis tumoral implica la disgregación de las células que forman la pared vascular, que deben adherirse a la matriz extracelular del estroma y

migrar a algún lugar alejado de la estructura vascular original, proliferar y reorganizarse para formar nuevas estructuras. Para estudiar el papel de la melatonina en la angiogénesis, diseñamos una serie de experimentos *in vitro* encaminados al análisis de los distintos aspectos del comportamiento angiogénico en la línea celular HUVEC. En primer lugar, los estudios de los efectos de la melatonina sobre la capacidad invasiva de las células endoteliales nos mostraron que esta hormona, a concentración farmacológica, redujo la invasión de estas células a través de una membrana extracelular sintética en respuesta al estímulo quimiotáctico inducido por VEGF. Además, el tratamiento con melatonina también tuvo efecto sobre la migración endotelial, reduciendo la distancia migrada por las células HUVEC en experimentos en los cuales se realizó una incisión en la placa de cultivo y a continuación se monitorizó el desplazamiento de las células sobre la misma.

Una etapa fundamental en el proceso angiogénico consiste en la migración y organización de las células endoteliales en forma de estructuras tubulares para dar lugar a la red de vasos y capilares que se formarán en las inmediaciones del tumor. Debido a su importancia, quisimos analizar el comportamiento angiogénico de las células HUVEC en respuesta a distintas condiciones experimentales. Para ello realizamos un ensayo de tubulogénesis en el cual, las células endoteliales se organizaron sobre una matriz sintética formando estructuras con forma de túbulos precursores de los vasos sanguíneos. La adición de VEGF recombinante tuvo como resultado una mayor longitud de las estructuras tubulares formadas por las células HUVEC, lo que está en concordancia con los resultados recientemente descritos por otros autores (Kajdaniuk y cols., 2011). La melatonina interfirió en la formación de túbulos y además contrarrestó el aumento de la tubulogénesis inducido por VEGF, reduciendo la longitud tubular en un 50% con respecto a las células tratadas únicamente con VEGF. El tratamiento con medio condicionado procedente de células de la línea tumoral MCF-7 aumentó la longitud de las estructuras tubulares formadas por las células HUVEC, mientras que este efecto fue bloqueado tras la adición de un anticuerpo recombinante anti-VEGF al medio. Este resultado sugiere que, entre todos los factores angiogénicamente activos que pueden estar presentes en el medio condicionado, el VEGF es uno de ellos y está implicado en la formación

de la red vascular. La melatonina contrarrestó el efecto estimulador de la angiogénesis inducido por el medio condicionado, lo que sugiere que el efecto de la hormona pineal se debe, al menos en parte, a su interferencia con la vía de señalización de VEGF.

Otra forma de analizar el comportamiento angiogénico de las células endoteliales consistió en realizar un ensayo en el cual se estudió el efecto de los distintos tratamientos experimentales sobre una red tubular de células HUVEC que había sido previamente formada. Como resultado, observamos que el tratamiento con VEGF mantuvo la conformación de las estructuras tubulares mientras que la adición de melatonina promovió la disgregación de las mismas. Por su parte, el medio condicionado procedente de células de tumor mamario mantuvo la estructura de la red tubular, pero la adición conjunta de medio condicionado y anticuerpo recombinante anti-VEGF redujo la longitud tubular provocando la disgregación de la red preformada. El tratamiento simultáneo con medio condicionado y melatonina produjo un acortamiento de los túbulos preformados. Estos resultados apuntan hacia un papel del VEGF en la angiogénesis, a la vez que señalan un efecto de la melatonina claramente antiangiogénico.

Los efectos antiangiogénicos de la melatonina a través de la inhibición de VEGF han sido descritos en varias líneas celulares tumorales, que incluyen células de carcinoma pancreático (PANC-1), adenocarcinoma alveolar (A549), cáncer de colon (HCT116), cáncer cervical (HeLa) y células epiteliales de adenocarcinoma alveolar (Dai y cols., 2008; Park y cols., 2010; Cui y cols., 2012). Del mismo modo, estudios clínicos realizados en pacientes de cáncer pusieron de manifiesto que el tratamiento con melatonina era capaz de disminuir los niveles de VEGF en sangre (Lissoni y cols., 2001), lo que sugiere una regulación de la angiogénesis por parte de la melatonina a través de la inhibición de la producción de VEGF.

El papel de VEGF en los procesos angiogénicos tumorales ha sido descrito ampliamente en la literatura y su bloqueo representa una posible estrategia terapéutica en el tratamiento de la enfermedad (Cook y Figg, 2010). Soh y colaboradores en el año 2000, pusieron de manifiesto, mediante un experimento *in*

vivo en ratones transplantados con células de tumor de tiroides, que tanto el número de vasos sanguíneos como el tamaño de los tumores eran directamente proporcionales a la concentración de VEGF inoculado. Del mismo modo, ambos parámetros disminuían tras el tratamiento con un anticuerpo anti-VEGF recombinante.

Los precedentes en la literatura nos hicieron interesarnos por el estudio de la melatonina y su interacción con el VEGF en el contexto de los tumores mamarios hormono-dependientes, donde apenas había trabajos publicados hasta el momento. Nuestros resultados, en conjunto, sugieren un modelo en el cual, las células tumorales mamarias secretarían factores de comunicación paracrina, principalmente VEGF, que actuarían sobre las células del endotelio vascular favoreciendo los procesos angiogénicos. La melatonina, posiblemente a través de un mecanismo de interferencia con la vía de señalización de VEGF en las células del endotelio vascular, así como inhibiendo de forma directa su expresión y secreción por parte del epitelio tumoral, bloquearía la angiogénesis tumoral a nivel de proliferación, invasión, migración y formación de estructuras precursoras de los vasos, reduciendo de esa manera la formación de vasos sanguíneos en el entorno tumoral y, por tanto, el aporte de oxígeno y nutrientes esenciales al tumor.



## **DISCUSIÓN GENERAL**

---

---



La incidencia del cáncer de mama ha experimentado un gran aumento en las últimas décadas, llegando a ser una de las principales causas de muerte en mujeres a nivel mundial. Etiológicamente, el origen del cáncer de mama puede deberse a una gran variedad de causas y su aparición y desarrollo responde a factores como edad, peso, estatus reproductor, estilo de vida, exposición a ciertos agentes ambientales o factores de origen genético. La mayoría de estos factores manifiestan la importancia de la exposición a estrógenos naturales o sintéticos a lo largo de la vida, lo que conlleva un mayor riesgo de aparición de tumores mamarios. La edad es un factor determinante en la aparición de la enfermedad, pues dos tercios de los tumores de mama se detectan en mujeres con una edad comprendida entre los 40 y los 50 años. Aproximadamente el 75% de estos casos son hormono-dependientes, es decir, las células tumorales expresan receptores de estrógenos, progesterona o ambos. La elevada incidencia de los tumores mamarios estrógeno-dependientes en las mujeres postmenopáusicas, en las que los ovarios han dejado de ser funcionales, resalta la importancia de la síntesis de estrógenos *in situ*. Así, durante la etapa fértil la mayoría de los estrógenos circulantes se sintetizan en los ovarios, mientras que en la menopausia, tras el cese de la función folicular y excepto por una pequeña contribución ovárica, la práctica totalidad de los estrógenos se sintetiza en los tejidos periféricos a partir de los andrógenos.

Los estrógenos ejercen una serie de efectos necesarios en el organismo, no sólo en procesos relacionados con la reproducción sino que además desempeñan una labor fundamental para el correcto funcionamiento de otros procesos fisiológicos, tales como la regulación del aparato cardiovascular, el sistema músculo-esquelético, la respuesta inmune y el sistema nervioso central. A pesar de ello, la exposición prolongada a estrógenos sostenida y acumulativa a lo largo de la vida puede tener efectos adversos sobre la salud ya que aumenta el riesgo de desarrollar cáncer de mama u otros tipos de tumores hormono-dependientes (Colditz y cols., 1995).

Las altas concentraciones de estrógenos encontradas en muchos tumores mamarios proceden en parte de la síntesis en los ovarios y llegan al tumor a través de la circulación, mientras que otra parte se produce *in situ* en el propio tejido de la

mama. El tejido tumoral mamario contiene todos los enzimas necesarios para la biosíntesis local de estrógenos. Entre ellos, la aromatasa es el principal responsable de los pasos finales de la conversión de andrógenos en estrógenos. Este enzima se expresa en la mayoría de los tipos celulares presentes tanto en el tumor como en sus alrededores, siendo destacada su presencia en las células del epitelio tumoral mamario, fibroblastos del tejido adiposo y el endotelio vascular. De esta forma, y a pesar de tener un origen embriológico diferente, todos estos tipos celulares contribuyen a la producción local de estrógenos dependiente de la acción de la aromatasa, lo que promueve el crecimiento y desarrollo del tumor.

Dado el papel carcinogénico de los estrógenos, el tratamiento del cáncer mamario hormono-dependiente siempre ha estado encaminado a neutralizar los efectos perjudiciales de los estrógenos sobre la mama. La ovariectomía fue el primer tratamiento antiestrogénico empleado, y desde entonces, la estrategia terapéutica ha ido evolucionando hasta incluir, actualmente, una combinación de tratamiento localizado sobre la región mamaria afectada (cirugía y radioterapia) y un tratamiento general, que comprende fundamentalmente quimioterapia y hormonoterapia. Las estrategias farmacológicas empleadas para neutralizar selectivamente los efectos de los estrógenos sobre la mama incluyen, por un lado, el desarrollo de fármacos que actúan a través del receptor estrogénico interfiriendo con los efectos de los estrógenos endógenos (SERMs), y por otro lado, aquellos fármacos que inhiben selectivamente la acción de los enzimas que intervienen en la síntesis de estrógenos (SEEMs).

La melatonina es el principal producto de secreción de la hormona pineal y sus acciones están relacionadas con multitud de procesos fisiológicos (Mayo y cols., 2002; Winczyck y cols., 2002; Atkinson y cols., 2005). Las principales acciones de la melatonina en mamíferos parecen estar relacionadas con la regulación de los ritmos biológicos en general, habiéndose descrito acciones de esta hormona sobre los ritmos de reproducción. La melatonina mide la duración de la noche, regulando de esta forma el control fotoperiódico de los ritmos reproductores en los mamíferos con apareamiento estacional. Además, se le ha atribuido un papel en la regulación de los ritmos termorreguladores y locomotrices en reptiles y aves. En humanos, la

melatonina es capaz de sincronizar el ritmo vigilia-sueño, la temperatura corporal y ejerce efectos beneficiosos sobre los trastornos derivados de los vuelos transmeridianos (*jet-lag*).

Nuestro grupo ha desarrollado numerosos estudios encaminados a conocer las acciones de la melatonina en tumores mamarios hormono-dependientes. En todos ellos, hemos trabajado con dos hipótesis para tratar de explicar las acciones oncostáticas de esta hormona sobre los tumores mamarios dependientes de estrógenos. Una primera hipótesis se basa en considerar la capacidad de la melatonina para interferir con la vía de señalización mediada por los receptores de estrógenos, comportándose entonces como un antiestrógeno natural (propiedades SERM) (Cos y Sánchez-Barceló, 2000a; Cos y Sánchez-Barceló, 2000b; Sánchez-Barceló y cols., 2005); mientras que la otra se centra en las acciones antiestrogénicas de la melatonina al interferir en la vía de síntesis de hormonas esteroideas (propiedades SEEM) (Cos y cols., 2008; González y cols., 2008). En concreto, las acciones de la melatonina sobre el enzima aromatasa han sido previamente descritas en nuestro laboratorio en varias líneas de células tumorales así como en tumores inducidos químicamente en roedores (Cos y cols., 2005; Cos y cols., 2006; González y cols., 2007).

Todos los datos existentes en la literatura en los que han quedado demostradas las acciones oncostáticas de la melatonina en distintos tipos de tumores, especialmente aquellos cuyo crecimiento depende de hormonas, nos sirvieron como punto de partida para plantear el presente trabajo, en el que se han estudiado varios aspectos relacionados con la producción de estrógenos y el desarrollo del tumor. En primer lugar, hemos tratado de profundizar en el estudio de las acciones antiaromatasa de la melatonina sobre el tejido tumoral mamario y ampliar este conocimiento a otros tipos celulares que se encuentran en las inmediaciones del tumor, más concretamente, el tejido adiposo y el endotelial. Nuestro interés se centró en analizar el mecanismo mediante el cual la melatonina es capaz de modular la actividad aromatasa en las células tumorales mamarias. Además, nos planteamos estudiar la influencia de la hormona pineal en la reacción desmoplásica, que tiene lugar en el tejido adiposo que rodea al tumor y que se basa

en la existencia de un mecanismo de comunicación paracrina entre las células tumorales mamarias y el tejido adiposo adyacente. Por último, quisimos valorar el papel de la melatonina en la angiogénesis tumoral. Todos los estudios realizados en este trabajo, teniendo en cuenta además la amplia información previa descrita en la literatura, se realizaron con el fin de reforzar la idea de que la melatonina es un agente de posible utilidad terapéutica en el caso de tumores hormono-dependientes.

Para desarrollar los distintos objetivos propuestos, se plantearon varios modelos experimentales *in vitro*. Inicialmente, decidimos estudiar las acciones antiaromatasa de la melatonina en células tumorales mamarias profundizando en el análisis del mecanismo por el cual este efecto tiene lugar. Como se ha comentado a lo largo de este trabajo, la expresión del gen *CYP19* es específica de tejido y está sometida al control de una serie de promotores alternativos. De esta forma, en la mama sana la expresión del gen de la aromatasa se mantiene en niveles bajos y está mediada por la acción del promotor pl.4. Sin embargo, en la mama tumoral la expresión aromatasa se encuentra alterada, produciéndose un incremento en la transcripción del gen debido a la activación de los promotores pl.3 y pll. El mecanismo por el cual se modifica la activación de los distintos promotores aún no ha sido completamente esclarecido, aunque algunos estudios apuntan hacia una regulación de la expresión de los promotores pll y pl.3 por parte del AMPc, un segundo mensajero que, a su vez, es regulado por distintos factores implicados en esta vía de señalización (Bulun y cols., 2005; Chen y cols., 2009). Nuestra hipótesis de trabajo consistió en plantear la posibilidad de que la melatonina podría actuar como posible regulador de los distintos promotores del gen de la aromatasa, modulando la expresión de este enzima posiblemente mediante un mecanismo que afectaría a alguna vía de señalización mediada por AMPc. Una posibilidad sería la implicación de las ciclooxigenasas en el control de la actividad y expresión aromatasa en las células de tumor mamario, como ya han sugerido otros autores (Díaz-Cruz y cols., 2005).

Efectivamente, nuestros resultados mostraron que la línea celular derivada de tumor mamario MCF-7 expresaba niveles detectables de los promotores de la aromatasa pl.4, pl.3 y pll, y que además la melatonina, a concentraciones

fisiológicas, inhibió significativamente la expresión de los tres promotores estudiados. Puesto que está descrito que en las células tumorales mamarias, la producción de PGE<sub>2</sub> por parte de las ciclooxigenasas tiene un papel importante en la expresión diferencial de los promotores de la aromatasa (Bulun y cols., 2005), el siguiente paso consistió en comprobar que la melatonina era capaz de reducir tanto la actividad como la expresión de las dos isoformas (constitutiva e inducible) de la ciclooxigenasa, lo que conllevaría una disminución en la producción de PGE<sub>2</sub>. En consecuencia, decidimos explorar si la melatonina era capaz de inhibir la actividad aromatasa inducida por PGE<sub>2</sub> en las células tumorales mamarias. Como era de esperar, concentraciones fisiológicas de melatonina consiguieron revertir el efecto estimulador de la expresión aromatasa inducido por PGE<sub>2</sub>. Está aceptado el hecho de que la PGE<sub>2</sub> desencadena, entre otras acciones, el incremento de la concentración del AMPc intracelular. Nuestros resultados muestran que la hormona pineal consiguió reducir los niveles intracelulares de AMPc siguiendo un patrón en el tiempo que coincidía con la expresión del gen de la aromatasa en MCF-7. Todos estos resultados, en conjunto, nos permiten confirmar la hipótesis de partida y afirmar que la melatonina actúa inhibiendo la expresión de los promotores pl.4, pll y pl.3 de la aromatasa en las células epiteliales tumorales de la mama. El mecanismo que proponemos se basa en la capacidad de la melatonina para inhibir la expresión y actividad ciclooxigenasa, reduciendo así la producción de PGE<sub>2</sub> en la célula. Esta inhibición en la producción de PGE<sub>2</sub> supondría una menor capacidad para incrementar los niveles de AMPc intracelulares, y por tanto, para conseguir la activación de los promotores de la aromatasa pll y pl.3, dando lugar a una expresión moderada de este enzima y por tanto, a una menor biosíntesis de estrógenos en el tumor, lo que en último término impediría el crecimiento del mismo. Por otra parte, la acción directa de la melatonina sobre los niveles de AMPc intracelulares, a través de su unión al receptor de membrana MT1, supondría otro mecanismo por el cual la melatonina impediría la activación de los promotores pll y pl.3.

En vista de los resultados obtenidos en los experimentos realizados en la mama tumoral, nos planteamos el segundo de los objetivos de este trabajo, en el que buscamos profundizar en el conocimiento de las propiedades oncostáticas de la melatonina en el tejido peritumoral mamario. Para ello, nos centramos en primer

lugar en el tejido adiposo mamario, donde quisimos evaluar el papel de la hormona pineal en la reacción desmoplásica. Este fenómeno consiste en la formación de una capa densa de fibroblastos indiferenciados rodeando al tumor con el fin de proporcionar un soporte estructural al mismo así como un aporte bioquímico de hormonas y factores de crecimiento. Como modelo experimental *in vitro* de preadipocitos, utilizamos células de la línea 3T3-L1 derivadas de fibroblastos del tejido adiposo de ratón. La melatonina, a concentraciones farmacológicas, estimuló la diferenciación de los fibroblastos en adipocitos. Esta acción de la melatonina podría ser importante desde un punto de vista terapéutico, puesto que es conocido que los fibroblastos indiferenciados son el tipo celular con mayor expresión y actividad aromatasa en el tumor (Bulun y cols., 2007). Por tanto, el siguiente paso consistió en comprobar que efectivamente la melatonina era capaz de inhibir tanto la actividad como la expresión aromatasa en las células 3T3-L1. Dicho efecto inhibitor de la hormona pineal tuvo lugar tanto si el tratamiento se llevaba a cabo a lo largo del proceso de diferenciación como si el tratamiento tenía lugar sobre adipocitos totalmente diferenciados.

La diferenciación de las células del tejido adiposo tiene lugar gracias a la acción de un conjunto de factores de transcripción, entre los que destacan PPAR $\gamma$  y C/EBP $\alpha$ , responsables de iniciar la transcripción de una serie de genes que otorgarán a la célula el fenotipo de adipocito maduro. Nuestros resultados indican que la melatonina, a través de su unión al receptor de membrana, fue capaz de estimular la diferenciación de los fibroblastos, lo que además se correlaciona con el incremento en la expresión de los genes PPAR $\gamma$  y C/EBP $\alpha$ . Numerosos estudios *in vitro* han puesto de manifiesto la capacidad de la hormona pineal para inducir diferenciación en distintos tipos celulares (Crespo y cols., 1994; Cos y cols., 1996; Sáinz y cols., 2005; Sánchez-Hidalgo y cols., 2007), por lo que su papel en la reacción desmoplásica promoviendo la diferenciación de los fibroblastos del tejido adiposo contribuye a reafirmar este hecho.

Una vez demostrado que la melatonina estimula la diferenciación a la vez que inhibe la actividad aromatasa de los fibroblastos, el siguiente objetivo del trabajo se encaminó a profundizar en el estudio de la comunicación paracrina existente entre el

tejido epitelial de la mama tumoral y el tejido adiposo adyacente. Para ello, utilizamos cocultivos de células 3T3-L1 y MCF-7 como modelo de tumor mamario *in vitro*, tratando de reproducir el entorno tumoral mediante el cultivo simultáneo de ambas líneas celulares utilizando para ello soportes permeables que permiten el flujo de medio y, por tanto, de señales paracrinas entre las células. Como cabía esperar, observamos que la presencia de células del epitelio tumoral en el cocultivo inhibió la diferenciación de los adipocitos a la vez que incrementó su proliferación, sugiriendo la existencia de un mecanismo de comunicación entre ambos tipos celulares que sería responsable de impedir dicha diferenciación, lo que concuerda con las observaciones realizadas por otros autores (Meng y colaboradores, 2001). La melatonina parece estar interfiriendo de algún modo en esta comunicación paracrina, puesto que es capaz de revertir tanto el efecto inhibitorio de la diferenciación inducido por la presencia de células tumorales como incluso el obtenido tras la adición de estrógenos al medio de los cocultivos mixtos.

Una elevada expresión y actividad aromatasa está considerada como un marcador que indica la falta de diferenciación de los fibroblastos del tejido adiposo, pues los preadipocitos muestran una expresión y actividad aromatasa notablemente superior a la que presentan los adipocitos maduros (Bulun y cols., 2007). Una vez demostrado que la presencia de células MCF-7 inhibe la diferenciación de los preadipocitos en nuestro modelo, el siguiente paso consistió en valorar la actividad aromatasa en las células 3T3-L1 cuando fueron cultivadas junto con células MCF-7 en presencia o ausencia de melatonina. Como esperábamos, la presencia de células tumorales mamarias en los cocultivos incrementó la actividad aromatasa de los adipocitos, mientras que la melatonina revirtió este efecto.

La hipótesis en la que nos basamos y que propone la existencia de una comunicación paracrina entre el tejido epitelial tumoral y el tejido adiposo mamario se apoya en la observación, por parte de varios grupos científicos de manera independiente, de unos niveles de actividad y expresión aromatasa muy superiores en el tejido adiposo de la mama adyacente al tumor que en la mama sana o en el tejido adiposo distal (O'Neill y cols., 1988; Reed y cols., 1993; Bulun y cols., 2007). Según esta hipótesis, los factores TNF $\alpha$ , IL-6 e IL-11, también conocidos por sus

propiedades antiadipogénicas al impedir la diferenciación de los fibroblastos del tejido adiposo, serían los principales efectores de esta comunicación paracrina (Meng y cols., 2001). Estas moléculas son producidas y secretadas al medio mayoritariamente por las células epiteliales tumorales y una de sus principales acciones sobre los fibroblastos del tejido adiposo consiste en bloquear la diferenciación disminuyendo los niveles de los factores de transcripción PPAR $\gamma$  y C/EBP $\alpha$ . Dada la capacidad de la melatonina para interferir en la reacción desmoplásica estimulando la diferenciación de los preadipocitos, nos planteamos profundizar en el conocimiento del mecanismo molecular por el cual esta interferencia tiene lugar. Optamos, por tanto, por valorar los niveles de expresión génica de los factores TNF $\alpha$ , IL-6 e IL-11 en células MCF-7 para comprobar si dicha expresión se veía alterada en presencia de melatonina. Efectivamente, la melatonina redujo la expresión de las tres citoquinas estudiadas, siendo este efecto inhibitorio dependiente del receptor de melatonina, puesto que esta inhibición no tiene lugar cuando se utiliza un agente bloqueante de dicho receptor. Del mismo modo, se produjo una reducción similar cuando se evaluó la expresión de estas citoquinas en fibroblastos del tejido adiposo en presencia de melatonina, indicando la posible existencia de un mecanismo adicional de comunicación autocrina en el propio tejido adiposo peritumoral. Además, la concentración proteica de estos tres factores en el medio se incrementó notablemente cuando se cultivaron los fibroblastos en presencia de células tumorales mamarias, lo que corrobora la existencia de un mecanismo de comunicación entre ambos tipos celulares. La melatonina redujo los niveles de estas citoquinas en el medio, y esto sugiere que esta hormona podría interferir en la reacción desmoplásica mediante la inhibición de la síntesis y secreción de estas citoquinas por parte de las células del epitelio tumoral y de los propios fibroblastos del tejido adiposo.

En resumen, los resultados que presentamos en esta parte del trabajo ponen de manifiesto la existencia de una comunicación paracrina y autocrina entre las células del epitelio tumoral mamario y el tejido adiposo adyacente, mediada, al menos en parte, por las citoquinas TNF $\alpha$ , IL-6 e IL-11, y que está encaminada a conseguir la formación de una capa de fibroblastos indiferenciados en las inmediaciones del tumor, capaz de realizar un gran aporte de estrógenos al mismo

gracias a una elevada expresión y actividad del enzima aromatasa. La melatonina, por tanto, parece tener un papel regulador en la reacción desmoplásica y esto se apoya en las siguientes evidencias. Por un lado, la hormona pineal ejerce un efecto estimulador de la diferenciación de los fibroblastos del tejido adiposo al incrementar la expresión de los factores de transcripción PPAR $\gamma$  y C/EBP $\alpha$ , mientras que reduce la actividad aromatasa en estas células. Por otro lado, la melatonina es capaz de promover la diferenciación de los fibroblastos mediante un mecanismo indirecto al reducir la síntesis y secreción de citoquinas antiadipogénicas por parte de las células epiteliales malignas y de los propios fibroblastos. Estos resultados, unidos a los datos aportados por Meng y colaboradores (2001) en los que afirman que tanto TNF $\alpha$  como IL-11 secretados por las células tumorales de la mama inhiben la expresión de PPAR $\gamma$  y C/EBP $\alpha$  en los fibroblastos del tejido adiposo, nos llevan a proponer que la melatonina podría actuar en base a los dos mecanismos descritos. Todas estas acciones de la melatonina, en conjunto, disminuyen la producción de estrógenos en los alrededores del tumor lo que, en último término, reduce la progresión del mismo.

Continuando con el estudio de la influencia de la melatonina en el tejido peritumoral mamario, quisimos centrar nuestra atención en el endotelio vascular, ya que constituye el segundo tipo celular más abundante en las inmediaciones del tumor después de los fibroblastos del tejido adiposo. El papel fundamental de las células endoteliales consiste en participar en la formación y remodelado de los vasos sanguíneos, a lo que hemos dedicado la última parte de este trabajo. Además, las células endoteliales parecen contribuir al aporte de estrógenos al tumor mediante la expresión del gen de la aromatasa. El reciente descubrimiento del promotor pl.7 de la aromatasa, que contiene elementos reguladores con secuencias de reconocimiento para factores de transcripción característicos de las células endoteliales, sugería la posibilidad de que este promotor podría ser el responsable de la sobreexpresión de la aromatasa en las células del endotelio vascular (Sebastian y cols., 2007). Este hecho, unido a la presencia de los receptores de melatonina MT $_1$  y MT $_2$  en la membrana de las células endoteliales (Cui y cols., 2008), nos llevó a pensar en estas células como posible diana de acción de la melatonina. Nuestra hipótesis de trabajo consistió, por tanto, en considerar que las

células del endotelio vascular podrían contribuir al crecimiento y desarrollo del tumor mediante la producción de estrógenos mediada por la aromatasa. Dado que las propiedades antiaromatasa de la melatonina ya habían sido demostradas anteriormente por nuestro grupo de investigación en varios tipos celulares (Cos y cols., 2005; González y cols., 2007), nos planteamos la posibilidad de que la hormona pineal podría modular la producción endotelial de estrógenos mediante la regulación de la actividad y expresión aromatasa, estando ésta última dirigida mayoritariamente por el promotor pl.7. Para corroborar esta hipótesis, utilizamos como modelo experimental *in vitro* la línea de células endoteliales HUVEC procedente de cordón umbilical humano. Inicialmente se analizó la proliferación de las células HUVEC y observamos que la melatonina, adicionada a concentraciones farmacológicas, fue capaz de inhibir la proliferación celular, tanto en las células no tratadas con estrógenos como en aquellas cuyo crecimiento fue estimulado con estradiol. Los resultados que obtuvimos a partir de la medida de la actividad aromatasa celular, tanto de forma directa como indirecta, pusieron de manifiesto que efectivamente las células endoteliales expresaron niveles detectables de aromatasa y que la melatonina, a concentración farmacológica, fue capaz de inhibir la actividad de este enzima. Una manera indirecta de determinar la actividad aromatasa en las células HUVEC consistió en evaluar la proliferación celular dependiente de la conversión de andrógenos en estrógenos. Efectivamente, las células endoteliales aumentaron su proliferación en presencia de testosterona, y este efecto, dependiente de la actividad aromatasa celular, fue revertido por melatonina. Por último, el análisis de la expresión del gen de la aromatasa así como de su promotor específico pl.7, característico de las células endoteliales, nos mostró que se produjo una reducción significativa de la expresión cuando estas células fueron tratadas con melatonina.

Los resultados descritos en este objetivo se obtuvieron con dosis farmacológicas de melatonina. Numerosos datos recogidos en la literatura corroboran la necesidad de utilizar dosis elevadas de melatonina para observar los efectos oncostáticos o antiangiogénicos de esta hormona (Sainz y cols., 2005; Cui y cols., 2006; García-Santos y cols., 2006). Las acciones de la melatonina en cultivos celulares dependen de factores como la concentración, duración del tratamiento o

las características particulares de las células sobre las que se ensaya. Dado que en los experimentos realizados hasta el momento en el presente trabajo con células endoteliales únicamente fueron efectivas concentraciones farmacológicas de melatonina, decidimos continuar nuestro estudio utilizando preferentemente ese rango de dosis.

En la parte del trabajo en la que estudiamos la capacidad de la melatonina para interferir en las relaciones paracrinas de las células tumorales y el tejido adiposo, observamos que la melatonina interfería en la producción de citoquinas por parte de las células del epitelio del tumor, mientras estimulaba algunos factores de transcripción necesarios para la diferenciación de los fibroblastos del tejido adiposo. Por esta razón, nos pareció interesante valorar la síntesis y secreción de VEGF por parte de las células epiteliales malignas, el efecto de dicho factor sobre las células del endotelio vascular y el papel de la melatonina regulando dicha interacción.

El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) es uno de los principales efectores de la comunicación paracrina que tiene lugar entre el epitelio tumoral de la mama y el endotelio vascular. Su capacidad para inducir angiogénesis y su efecto sobre la permeabilidad vascular han hecho que esta molécula haya sido considerada como uno de los factores angiogénicos más potentes que se han descrito hasta el momento (Ferrara, 1999). La secreción de VEGF por parte del epitelio tumoral está estrechamente ligada al proceso de crecimiento y desarrollo del tumor, debido a su capacidad para inducir la formación de vasos sanguíneos, lo que contribuye a su expansión mediante el aporte de oxígeno y nutrientes. La expresión de este factor se ha detectado en gran variedad de tumores humanos, que incluyen mama, cerebro, pulmón y tracto gastrointestinal (Ferrara, 1995), incluso se ha llegado a establecer una correlación entre el contenido de VEGF en el microambiente tumoral y la prognosis de la enfermedad (Salven y cols., 1997).

En el desarrollo del siguiente objetivo, observamos que la melatonina era capaz de revertir el aumento de la proliferación de las células endoteliales inducido por el tratamiento con VEGF recombinante. Este efecto antiproliferativo de la melatonina ha sido también descrito en varias líneas celulares tumorales (Cos y

cols., 1996; Cos y cols., 1998; González y cols., 2007) e incluso en células de origen endotelial aisladas de cordón umbilical humano (Cui y cols., 2006), y se ha sugerido que este efecto podría responder al bloqueo del ciclo celular mediado por la hormona pineal o bien a la inducción de apoptosis. El siguiente grupo de experimentos nos permitió observar que la melatonina inhibió la expresión génica de VEGF en las células MCF-7 e incluso logró revertir el efecto estimulador de la expresión inducido por  $\text{CoCl}_2$ , un compuesto capaz de mimetizar las condiciones de hipoxia en la célula, lo que promueve la síntesis y liberación de VEGF. Varios estudios han puesto de manifiesto la capacidad de la hormona pineal para interferir en la expresión génica de VEGF en varias líneas de células tumorales (Dai y cols., 2008; Park y cols., 2010), mediante un mecanismo en el que interviene el factor HIF-1, que dirige la transcripción génica de VEGF y cuya expresión parece estar inhibida por melatonina. Nuestros resultados, indican también que la inhibición de este factor por parte de la melatonina tiene lugar, no sólo a nivel de la expresión génica sino que también afecta a la síntesis y liberación proteica, puesto que hemos observado que el tratamiento de las células MCF-7 con esta hormona redujo la concentración de VEGF en el medio de cultivo.

Para profundizar en el estudio de la comunicación paracrina existente entre las células epiteliales malignas y el endotelio vascular, utilizamos como modelo experimental un sistema de cocultivos celulares que consistió en el cultivo simultáneo de células HUVEC y MCF-7. En esta serie de experimentos pudimos observar que la presencia de células MCF-7 en el cocultivo incrementaba la proliferación de las células HUVEC, siendo este efecto revertido por el tratamiento con melatonina. Este resultado sugiere la existencia de un mecanismo de comunicación paracrina entre ambos tipos celulares, por lo que nos pareció razonable considerar como hipótesis de partida que el VEGF podría ser una de las moléculas implicadas en este mecanismo. Efectivamente, la concentración proteica de VEGF en el medio fue muy superior cuando se cultivaron las dos líneas celulares simultáneamente en comparación con las células HUVEC cultivadas solas, mientras que la presencia de melatonina en los cocultivos redujo los niveles proteicos de VEGF en el medio. Este resultado confirmaría nuestra hipótesis, que propone la existencia de una comunicación paracrina entre ambos tipos celulares, de tal

manera que serían mayoritariamente las células del epitelio tumoral las encargadas de sintetizar y liberar VEGF al medio, el cual actuaría sobre el endotelio vascular mediante un mecanismo de acción paracrino. Otra posible interpretación de este resultado, nos llevaría a pensar que ambos tipos celulares participan en la producción y liberación de VEGF al medio, de manera que este factor actuaría sobre las células endoteliales tanto por un mecanismo de acción paracrino como autocrino. En cualquier caso, la melatonina disminuye los niveles de VEGF en el medio.

Con el fin de confirmar nuestra hipótesis de partida, que proponía a las células MCF-7 como principales productoras de VEGF en el tumor, y para estudiar además el efecto de este factor sobre el endotelio vascular, recogimos medio condicionado procedente de cultivos de células MCF-7 y lo añadimos a cultivos de células HUVEC. En el caso de que ese medio contuviera factores secretados por las células MCF-7, éstos deberían ser capaces de generar respuestas angiogénicas en el endotelio. Efectivamente, la adición de medio condicionado estimuló la proliferación de las células HUVEC, lo que nos indicó que los factores presentes en el medio eran angiogénicamente activos. Resulta interesante el hecho de que la respuesta proliferativa inducida por el medio condicionado fue revertida tras la adición de un anticuerpo anti-VEGF, lo que parece confirmar nuestra hipótesis de que sería el VEGF secretado por las MCF-7 el principal efector de esta respuesta. La melatonina añadida al cultivo también bloqueó el efecto estimulador sobre la proliferación inducido por el tratamiento con medio condicionado, lo que le otorga un papel en la regulación de las señales de comunicación entre el tejido epitelial tumoral y el endotelio vascular.

El modelo que proponemos en relación con los procesos angiogénicos en los tumores mamarios se basa en la interacción entre las células del epitelio tumoral y del endotelio vascular, mediada por una serie de moléculas señalizadoras secretadas al microambiente tumoral entre las que destaca el factor de crecimiento endotelial vascular. El VEGF producido y liberado al medio mayoritariamente por las células malignas sería capaz de actuar de forma paracrina sobre las células endoteliales presentes en los vasos que irrigan al tumor y generar en ellas una

respuesta angiogénica. La melatonina parece tener un papel regulador en esta interacción al inhibir la producción de VEGF en el epitelio tumoral, lo cual dificultaría la respuesta angiogénica en las inmediaciones del tumor.

Finalmente, nos propusimos adentrarnos en el conocimiento de la angiogénesis tumoral en el contexto del cáncer de mama e investigar las acciones de la melatonina en dicho proceso. Con esta finalidad, utilizamos de nuevo cultivos de células HUVEC como modelo de estudio y realizamos una serie de ensayos *in vitro* tratando de representar las distintas etapas que caracterizan el proceso angiogénico. La formación y remodelado de los vasos sanguíneos tiene lugar mediante una serie de procesos secuenciales y muy organizados. La angiogénesis comienza con el desprendimiento de las células endoteliales del vaso del que proceden para, a continuación, migrar e invadir nuevos espacios en la matriz extracelular. Por último, las células endoteliales proliferan y cuando han conseguido formar una población celular suficiente, adoptan una conformación estructural en forma de túbulo que sirve de soporte para dar lugar a los nuevos vasos sanguíneos. El factor de crecimiento endotelial vascular juega un papel fundamental en este proceso, siendo uno de los efectores angiogénicos más potentes cuyas acciones se suceden a lo largo de las distintas fases del proceso.

Dada la importancia de la invasión y migración de las células endoteliales en la neoangiogénesis tumoral, comenzamos por realizar un ensayo de invasión celular, en el que cuantificamos la capacidad de invasión de las células HUVEC a través de una matriz sintética, en presencia y ausencia de melatonina. El resultado que obtuvimos nos mostró que la melatonina, a concentración farmacológica, conseguía reducir la invasividad endotelial. A continuación, nos pareció interesante valorar la capacidad de la melatonina para alterar otra de las etapas del proceso angiogénico, en este caso, la migración. Observamos que la melatonina también dificultó la migración celular en la placa de cultivo, al reducir la distancia migrada por las células HUVEC con respecto al grupo control no tratado. Por último, también valoramos la capacidad de formación de estructuras con forma de túbulo, que es una de las etapas fundamentales en la angiogénesis, pues supone la base estructural de los vasos sanguíneos en formación. Nuestros resultados indicaron

que el VEGF recombinante añadido al medio tuvo un efecto estimulador de la longitud tubular cuando las células HUVEC se sembraron sobre una matriz sintética, lo que está en concordancia con los resultados descritos recientemente por Kajdaniuk y colaboradores (2012). Por su parte, la melatonina redujo la longitud de los túbulos formados y revirtió el efecto estimulador inducido por VEGF. Además, la adición de medio condicionado procedente de células MCF-7 estimuló notablemente la tubulogénesis, y este efecto fue bloqueado al añadir un anticuerpo anti-VEGF, lo que indica que al menos uno de los factores responsables de este aumento en la formación tubular es el VEGF secretado por las células tumorales. Cabe resaltar que la melatonina también contrarrestó el efecto estimulador inducido por el medio condicionado. Finalmente, en lo que concierne al estudio de la angiogénesis tumoral, otro proceso a considerar dentro de la tubulogénesis es la disgregación de las estructuras tubulares que ya se encuentran formadas. Por esta razón, decidimos llevar a cabo una serie de experimentos en los que cuantificamos la disgregación de las estructuras tubulares formadas espontáneamente por las células endoteliales al sembrarlas sobre una matriz sintética. En este caso, nuestros resultados mostraron que el tratamiento con VEGF recombinante no parece alterar la longitud tubular, manteniéndose ésta a un nivel similar al del grupo control de células no tratadas, mientras que la melatonina, sola o en combinación con VEGF promovió la disrupción de las estructuras tubulares preformadas. Además, la adición de medio condicionado obtenido a partir de células MCF-7 evitó la disgregación de los túbulos, y este efecto fue bloqueado por un anticuerpo anti-VEGF, lo que parece indicar que el VEGF es necesario para mantener la conformación de las estructuras ya formadas. La melatonina, nuevamente, contrarrestó el efecto inducido por el medio condicionado, promoviendo la disgregación de los túbulos preformados, lo que puso de manifiesto la acción de la hormona pineal contrarrestando los efectos proangiogénicos del VEGF producido por las células epiteliales tumorales.

Todos los resultados que presentamos en este trabajo, en conjunto, nos llevan a destacar la importancia del microambiente tumoral en la progresión y el crecimiento del cáncer de mama. De esta forma, hemos comprobado que varios de los tipos celulares presentes en las inmediaciones del tumor, incluyendo las células del epitelio tumoral, los adipocitos del tejido adiposo y las células endoteliales de los

vasos que irrigan al tumor, contribuyen de manera activa al desarrollo del mismo mediante el aporte continuo de estrógenos mediado por el enzima aromatasa. La melatonina, a través de acciones directas sobre la expresión dirigida por distintos promotores, y la actividad de este enzima en todos los tipos celulares que hemos estudiado, es capaz de bloquear este aporte de estrógenos inhibiendo así el crecimiento del tumor. Cabe destacar también la capacidad de la hormona pineal para regular la reacción desmoplásica, por un lado favoreciendo la diferenciación de los fibroblastos del tejido adiposo, y por otro modulando la secreción de las señales de comunicación paracrina que tienen lugar en el microambiente tumoral, que incluye la inhibición de la síntesis y liberación de citoquinas antiadipogénicas, responsables de inhibir la diferenciación de los adipocitos, además de interferir en la secreción del factor de crecimiento endotelial VEGF, uno de los principales efectores de la comunicación paracrina entre el tejido tumoral y el endotelio vascular. Todo esto, unido a las propiedades antiangiogénicas de la melatonina, y a su capacidad para interferir en las distintas etapas del proceso angiogénico, hacen de esta hormona un agente oncostático con interesantes posibilidades de ser utilizado en la prevención y el tratamiento de los tumores mamarios estrógeno-dependientes en un futuro.

## **CONCLUSIONES**

---

---



1. En células MCF-7, la melatonina, a concentración fisiológica, regula la actividad aromatasa inhibiendo la expresión génica mediada por los promotores pl.3, pll y pl.4.
2. El efecto inhibitor de la melatonina sobre la aromatasa tiene lugar mediante un descenso en los niveles de PGE<sub>2</sub>, que se produce como consecuencia de la inhibición de la actividad y expresión de las ciclooxigenasas, impidiendo el incremento en los niveles intracelulares de AMPc responsables de la activación de los promotores pll y pl.3.
3. La melatonina, a concentraciones farmacológicas, estimula la diferenciación de los fibroblastos del tejido adiposo mediante el incremento en la expresión de PPAR $\gamma$  y C/EBP $\alpha$ , dos factores de transcripción fundamentales en la adipogénesis.
4. El tratamiento con melatonina durante el proceso de diferenciación de los fibroblastos reduce tanto la actividad como la expresión del gen de la aromatasa.
5. La presencia de células MCF-7 inhibe la diferenciación y estimula la proliferación y los niveles de actividad aromatasa de los fibroblastos del tejido adiposo; el tratamiento con concentraciones farmacológicas de melatonina revierte dichos efectos.
6. La melatonina inhibe la expresión de las principales citoquinas antiadipogénicas (TNF $\alpha$ , IL-6 e IL-11) tanto en células MCF-7 como en 3T3-L1. La presencia de células MCF-7 en cocultivos con los fibroblastos induce un incremento en los niveles proteicos de dichas citoquinas en el medio, efecto que es revertido por el tratamiento con melatonina.
7. La melatonina, a concentraciones farmacológicas, inhibe la proliferación de células endoteliales HUVEC, incluso cuando dicha proliferación es estimulada por estradiol.

8. La actividad aromatasa, así como la expresión del gen *CYP19* y del promotor específico pl.7 son inhibidas por concentraciones farmacológicas de melatonina en células endoteliales.
9. El factor de crecimiento endotelial VEGF estimula la proliferación de las células endoteliales, y la melatonina, a concentraciones farmacológicas, revierte este efecto.
10. En células MCF-7, la melatonina reduce la expresión génica del VEGF así como los niveles de esta proteína liberados al medio.
11. La presencia de células MCF-7 en cocultivo con las células endoteliales estimula la proliferación de estas últimas mediante un incremento en los niveles proteicos de VEGF, siendo este efecto estimulador bloqueado por el tratamiento con melatonina.
12. La melatonina tiene propiedades antiangiogénicas, pues reduce tanto la proliferación como la capacidad de invasión, migración y formación de estructuras tubulares por parte de las células endoteliales, mientras que estimula la disgregación de dichas estructuras. Las células MCF-7, mediante la producción de VEGF, ejercen un efecto proangiogénico sobre el endotelio vascular, que es reducido en presencia de melatonina.

## **BIBLIOGRAFÍA**

---

---



- Ackerman G.E., Smith M.E., Mendelson C.R.** (1981). Aromatization of androstenedione by human adipose tissue stromal cells in monolayer culture. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **53**: 412-417.
- Allegra M., Reiter R.J., Tan D.X., Gentile C., Tesoriere L., Livrea M.A.** (2003). The chemistry of melatonin's interaction with reactive species. *J. Pineal Res.* **34**: 1-10.
- Alonso-Vale M., Peres S.B., Vernochet C., Farmer S.R., Lima F.B.** (2009). Adipocyte differentiation is inhibited by melatonin through the regulation of c/EBP $\beta$  transcriptional activity. *J. Pineal Res.* **47**: 221-227.
- Arendt J.** (1986). Role of the pineal gland and melatonin in seasonal reproductive function in mammals. *Oxf. Rev. Reprod. Biol.* **8**: 266-320.
- Arnerlov C., Emdin S.O., Cajander S., Bengtsson N.O., Tavelin B., Roos G.** (2001). Intratumoral variations in DNA ploidy and s-phase fraction in human breast cancer. *Anal. Cell Pathol.* **23**: 21–28.
- Aronica S.M., Kraus W.L., Katzenellenbogen B.S.** (1994). Estrogen action via the cAMP signalling pathway: stimulation of adenylate cyclase and cAMP-regulated gene transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**: 8517-8521.
- Atkinson G., Holder A., Robertson C., Gant N., Drust B., Reilly T., Waterhouse J.** (2005). Effects of melatonin on the thermoregulatory responses to intermittent exercise. *J. Pineal Res.* **39**: 353-359.
- Atquir-Rahman M., Toi M.** (2003). Anti-angiogenic therapy in breast cancer. *Biomed. Pharmacother.* **57**: 463-470.
- Baldwin W.S., Barrett J.C.** (1998). Melatonin: receptor-mediated events that may affect breast and other steroid hormone dependent cancers. *Mol. Carcinog.* **21**: 149–155.
- Bareschino M.A., Schettino C., Colantuoni G., Rossi E., Rossi A., Maione P., Ciardiello F., Gridelli C.** (2001). The role of antiangiogenetic agents in the treatment of breast cancer. *Curr. Med. Chem.* **18**: 5022-5032.
- Becker-Andre M., Wiesenberg I., Schaeren-Wiemers N., Andre E., Missbach M., Saurat J.H., Carlberg C.** (1994). Pineal gland hormone melatonin binds and activates an orphan of the nuclear receptor superfamily. *J. Biol. Chem.* **46**: 28531-28534.
- Benitez-King G., Huerto-Delgadillo L., Anton-Tay F.** (1993). Binding of 3H-melatonin to calmodulin. *Life Sci.* **3**: 201-217.

- Bergers G., Benjamin L.E.** (2003). Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat. Rev. Cancer.* **3**: 401-410.
- Bernstein L.** (2002). Epidemiology of Endocrine-Related Risk Factors for Breast Cancer. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia.* **7**: 3-15.
- Blask D.E., Brainard G.C., Dauchy R.T., Hanifin J.P., Davidson L.K., Krause J.A., Sauer L.A., Rivera-Bermúdez M.A., Dubocovich M.L., Jasser S.A., Lynch D.T., Rollag M.D., Zalatan F.** (2005). Melatonin-depleted blood from premenopausal women exposed to light at night stimulates growth of human breast cancer xenografts in nude rats. *Cancer Res.* **65**: 11174-11184.
- Bocchinfuso W.P., Korach K.S.** (1997). Mammary gland development and tumorigenesis in estrogen receptor knockout mice. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia.* **2**: 323-334.
- Bocchinfuso W.P., Hively W.P., Couse J.F., Varmus H.E., Korach K.S.** (1999). A mouse mammary tumour virus-Wnt1 transgene induces mammary gland hyperplasia and tumorigenesis in mice lacking estrogen receptor-alpha. *Cancer Res.* **59**: 1869-1876.
- Boehm T., Folkman J., Browder T., O'Reilly M.S.** (1997). Antiangiogenic therapy of experimental cancer does not induce acquired drug resistance. *Nature.* **390**: 404-407.
- Bonnefont-Rousselot D., Collin F.** (2010). Melatonin: action as antioxidant and potential applications in human disease and aging. *Toxicology.* **278**: 55-67.
- Botha J.L., Bray F., Sankila R., Parkin D.M.** (2003). Breast cancer incidence and mortality trends in 16 European countries. *Eur. J. Cancer.* **39**: 1718-1729.
- Breen E.C.** (2007). VEGF in biological control. *J. Cell. Biochem.* **102**: 1358-1367.
- Brodie A.M., Lu Q., Long B.J., Fulton A., Chen T., Macpherson N., DeJong D.C., Blanckstein M.A., Nortier J.W., Slee P.H., van de Ven J., van Gorp J.M., Elbers J.R., Schipper M.E., Blijham G.H., Tijssen J.H.** (2001). Aromatase and COX-2 expression in human breast cancers. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **79**: 41-47.
- Brown K.A., Simpson E.R.** (2012) Obesity and breast cancer: mechanisms and therapeutic implications. *Front. Biosci.* **4**: 2515-2524.
- Brozic P., Kocbek P., Sova M., Kristl J., Martens S., Adamsky J., Govec S., Lanisnik-Risner T.** (2009). Flavonoids and cinamic acid derivatives as inhibitors of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type1. *Mol. Cell. Endocrinol.* **301**: 229-234.

- Brozic P., Lanisnik-Risner T., Gobec S.** (2008). Inhibitors of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type1. *Curr. Med. Chem.* **15**: 137-150.
- Brueggemeier R.W., Quinn A.L., Parrett M.L., Joarder F.S., Harris R.E., Robertson F.M.** (1999). Correlation of aromatase and cyclooxygenase gene expression in human breast cancer specimens. *Cancer Lett.* **140**: 27-35.
- Bulun S.E., Chen D., Moy I., Brooks D.C., Zhao H.** (2012). Aromatase, breast cancer and obesity: a complex interaction. *Trends Endocrinol. Metab.* **23**: 83-89.
- Bulun S.E., Cheng D., Lu, M., Zhao H., Cheng Y., Demura M., Yilmaz B., Martin R., Utsunomiya H., Thung S., Su E., Marsh E., Hakim A., Yin P., Ishikawa H., Amin S., Imir G., Gurates B., Attar E., Reierstad S., Innes J., Lin Z.** (2007). Aromatase excess in cancers of breast, endometrium and ovary. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* **106**: 81-96.
- Bulun S.E., Lin Z., Imir G., Amin S., Demura M., Yilmaz B., Martin R., Utsunomiya H., Thung S., Gurates B., Tamura M., Langoi D., Deb S.** (2005). Regulation of aromatase expression in estrogen-responsive breast and uterine disease: from bench to treatment. *Pharmacol. Rev.* **57**: 359-383.
- Bulun S.E., Sebastian S., Takayama K., Suzuki T., Sasano H., Shozu M.** (2003). The human *CYP19* (aromatase P450) gene: update on physiologic roles and genomic organization of promoters. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* **86**: 219-224.
- Buscemi N., Vandermeer B., Pandya R., Hooton N., Tjosvold L., Hartling L., Baker G., Vohra S., Klassen T.** (2004). Melatonin for treatment of sleep disorders. *Evid. Rep. Technol. Asses. Summ.* **108**: 1-7.
- Buteau-Lozano H., Ancelin M., Lardeux B., Milanini J., Perrot-Appianat M.** (2002). Transcriptional regulation of vascular endothelial growth factor by estradiol and tamoxifen in breast cancer cells: a complex interplay between estrogen receptors alpha and beta. *Cancer Res.* **62**: 4977-4984.
- Cardone A., Tolino A., Zarcone R., Borruto Caracciolo G., Tartaglia E.** (1997). Prognostic value of desmoplastic reaction and lymphocytic infiltration in the management of breast cancer. *Panminerva Med.* **39**: 174-177.

- Celis J.E., Moreira J.M., Cabezón T., Gromov P., Friis E., Rank F., Gromova I.** (2005). Identification of extracellular and intracellular signaling components of the mammary adipose tissue and its interstitial fluid in high risk breast cancer patients: towards dissecting the molecular circuitry of epithelial-adipocyte stromal cell interactions. *Mol. Cell. Proteomics*. **4**: 492-522.
- Chen D., Reierstad S., Lu M., Lin Z., Ishikawa H., Bulun S.E.** (2009). Regulation of breast cancer-associated aromatase promoters. *Cancer Lett.* **273**: 15-27.
- Chetrite G.S., Cortes-Prieto J., Philippe J.C., Wright F., Pasqualini J.R.** (2000). Comparison of estrogen concentrations, estrone sulfatase and aromatase activities in normal and in cancerous human breast tissues. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* **72**: 23-27.
- Choi E.Y., Jin J.Y., Lee J.Y.** (2011). Melatonin inhibits *Prevotella intermedia* lipopolysaccharide-induced production of nitric oxide and interleukin-6 in murine macrophages by suppressing NF- $\kappa$ B and STAT1 activity. *J. Pineal Res.* **50**: 197-206.
- Chrichton M.B., Nichols J.E., Zhao Y., Bulun S.E., Simpson E.R.** (1996). Expression of transcripts of interleukin-6 and related cytokines by human breast tumors, breast cancer cells and adipose stromal cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* **118**: 215-220.
- Chung A.S., Ferrara N.** (2011). Developmental and pathological angiogenesis. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* **27**: 563-584.
- Cohen M., Lippman M., Chabner B.** (1978). Pineal gland and breast cancer. *Lancet.* **2**:814-816.
- Colditz G.A., Hankinson S.E., Hunter D.J., Willet W.C., Manson J.E., Stampfer M.J., Hennekens C., Rosner B., Speizer F.E.** (1995). The use of estrogens and progestins and the risk of breast cancer in postmenopausal women. *N. Engl. J. Med.* **24**: 1589-1593.
- Coleman M.P., Reiter R.J.** (1992). Breast cancer, blindness and melatonin. *Eur. J. Cancer.* **28**: 501-503.
- Concina P., Sordello S., Barbacanne M.A., Elhage R., Pieraggi M.T., Fournial G., Plouet J., Bayard F., Arnal J.F.** (2000). The mitogenic effect of 17 $\beta$ -estradiol on *in vitro* endothelial cell proliferation and on *in vivo* reendothelialization are both dependent on vascular endothelial growth factor. *J. Vasc. Res.* **37**: 202-208.

- Conley A.J., Walters K.W.** (1999). Aromatization. Encyclopedia of reproduction. *Academic Press*. **1**: 280-291.
- Conn G., Soderman D.D., Schaerffer M.T., Wile M., Hatcher V.B., Thomas K.A.** (1990). Purification of a glycoprotein vascular endothelial cell mitogen from a rat glioma-derived cell line. *Prot. Natl. Acad. Sci. USA*. **87**: 1323-1327.
- Connolly D.T., Heuvelman D.M., Nelson R., Olander J.V., Eppley B.L., Delfino J.J., Siegel N.R., Leimbgruber R.M., Feder J.** (1989). Tumor vascular permeability factor stimulates endothelial cell growth and angiogenesis. *J. Clin. Invest.* **84**: 1470-1478.
- Cook K.M., Figg W.D.** (2010). Angiogenesis inhibitors: current strategies and future prospects. *CA Cancer J. Clin.* **60**: 222-243.
- Cooney M.M., van Heeckeren W., Bhakta S., Ortiz J., Remick S.C.** (2006). Drug insight: vascular disrupting agents and angiogenesis-novel approaches for drug delivery. *Nat. Clin. Pract. Oncol.* **3**: 682-692.
- Cos S., González A., Martínez-Campa C., Mediavilla M. D., Alonso-González C., Sánchez-Barceló E. J.** (2008). Melatonin as a selective estrogen enzyme modulator. *Curr. Cancer Drug Targets.* **8**: 691-702.
- Cos S., González A. Güzmes A., Mediavilla M. D., Martínez-Campa C., Alonso-González C., Sánchez-Barceló E. J.** (2006). Melatonin inhibits the growth of DMBA-induced mammary tumors by decreasing the local biosynthesis of estrogens through the modulation of aromatase activity. *Int. J. Cancer.* **118**: 274-278.
- Cos S., Mediavilla MD., Martínez-Campa C., González A., Alonso-González C., Sánchez-Barceló EJ.** (2006). Exposure to light-at night increases the growth of DMBA-induced mammary adenocarcinomas in rats. *Cancer Lett.* **235**: 266-271.
- Cos S., Martínez-Campa C., Mediavilla M. D., Sánchez-Barceló E. J.** (2005). Melatonin modulates aromatase activity in MCF-7 human breast cancer cells. *J. Pineal Res.* **38**: 136-142.
- Cos S., Sánchez-Barceló E.J.** (2000a). Melatonin and mammary pathological growth. *Front. Neuroendocrinol.* **21**: 133-170.
- Cos S., Sánchez-Barceló E.J.** (2000b). Melatonin, experimental basis for a possible application in breast cancer prevention and treatment. *Histol. Histopathol.* **15**: 637-647.

- Cos S., Fernández R., Guezmes A., Sánchez-Barceló E.J.** (1998). Influence of melatonin on invasive and metastatic properties of MCF-7 human breast cancer cells. *Cancer Res.* **58**: 4383-4390.
- Cos S., Verduga R., Fernández-Viadero C., Megías M., Crespo D.** (1996). Effects of melatonin on the proliferation and differentiation of human neuroblastoma cells in culture. *Neurosci. Lett.* **216**: 113-116.
- Crespo D., Fernández-Viadero C., Verduga R., Ovejero V., Cos S.** (1994). Interaction between melatonin and estradiol on morphological and morphometric features of MCF-7 human breast cancer cells. *J. Pineal Res.* **16**: 215-222.
- Cui P., Yu M., Peng X., Dong L., Yang Z.** (2012). Melatonin prevents human pancreatic carcinoma cell PANC-1-induced human vein endothelial cell proliferation and migration by inhibiting vascular endothelial growth factor expression. *J. Pineal Res.* **52**: 236-243.
- Cui P., Yu M., Luo Z., Dai M., Han J., Xiu R., Yang Z.** (2008). Intracellular signalling pathways involved in cell growth inhibition of human umbilical vein endothelial cells by melatonin. *J. Pineal Res.* **44**: 107-114.
- Cui P., Luo Z., Zhang H., Su Y., Li A., Li H., Zhang J., Yang Z., Xiu R.** (2006). Effect and mechanism of melatonin's action on the proliferation of human umbilical vein endothelial cells. *J. Pineal Res.* **41**: 358-362.
- Dai M., Cui P., Yu M., Han J., Li H., Xiu R.** (2008). Melatonin modulates the expression of VEGF and HIF-1 $\alpha$  induced by CoCl<sub>2</sub> in cultured cancer cells. *J. Pineal Res.* **44**: 121-126.
- Dalla-Valle L., Toffolo V., Nardi A., Fiore C., Armanini D., Belvedere P., Colombo L.** (2007). The expression of the human steroid sulfatase-encoding gene is driven by alternative first exons. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **107**: 22-29.
- Davis G.E., Senger D.R.** (2005). Endothelial extracellular matrix: biosynthesis, remodelling and functions during vascular morphogenesis and neovessel stabilization. *Circ. Res.* **97**: 1093-1107.
- Davis S., Mirick D.K., Stevens R.G.** (2001). Night-shift-work, light-at-night, and the risk of breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **93**: 1557-1562.

- Day J.M., Foster P.A., Tutill H.J., Parsons M.F., Newman S.P., Chander S.K., Allan G.M., Lawrence H.R., Vicker N., Potter B.V., Reed M.J., Purohit A.** (2008). 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and not type 12, is a target for endocrine therapy of hormone-dependent breast cancer. *Int. J. Cancer*. **122**: 1931-1940.
- Deb S., Amin S., Imir A.G., Suzuki T., Sasano H., Bulun S.E.** (2004). Estrogen regulates expression of tumor necrosis factor receptors in breast adipose fibroblasts. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **89**: 4018-4024.
- De La Rocha N., Rotelli A., Aguilar C.F., Pelzer L.** (2007). Structural basis of the anti-inflammatory activity of melatonin. *Arzneimittel-Forsch.* **57**: 782-786.
- Del Río B., García Pedrero J. M., Martínez-Campa C., Zuazua P., Lazo P. S., Ramos S.** (2004). Melatonin, an endogenous-specific inhibitor of estrogen receptor alpha via calmodulin. *J. Biol. Chem.* **37**: 38294-38302.
- Deng Y., Scherer P.E.** (2010). Adipokines as novel biomarkers and regulators of the metabolic syndrome. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1226**: E1-E19.
- Denizot F., Lang R.** (1986). Rapid colorimetric assay for cell growth and survival, modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J. Immunol. Methods.* **89**: 271-277.
- Díaz-Cruz E.S., Shapiro C.L., Brueggemeier R.W.** (2005). Cyclooxygenase inhibitors suppress aromatase expression and activity in breast cancer cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **90**: 2563-2570.
- Dubois R.N.** (2000). Cyclooxygenase-2: a target for colon cancer prevention. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **14**: 64-67.
- Dumitrescu R. G., Cotarla I.** (2005). Understanding breast cancer risk – where do we stand in 2005? *J. Cell Mol. Med.* **1**: 208-221.
- Dvorak H.F., Weaver V.M., Tlsty T.D., Bergers G.** (2011). Tumor microenvironment and progression. *J. Surg. Oncol.* **103**: 468-74.
- Dvorak H.F., Brown L.F., Detmar M., Dvorak A.M.** (1995). Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability and angiogenesis. *Am. J. Pathol.* **146**: 1029-1039.

- Esposito E., Iacono A., Muiá C., Crisafulli C., Mattace Raso G., Bramanti P., Meli R., Cuzzocrea S.** (2008). Signal transduction pathways involved in protective effects of melatonin in C6 glioma cells. *J. Pineal Res.* **44**: 78-87.
- Esser S., Lampugnani M.G., Corada M., Dejana E., Risau W.** (1998). Vascular endothelial growth factor induces VE-cadherin tyrosine phosphorylation in endothelial cells. *J. Cell. Sci.* **111**: 1853-1865.
- Feldman A.L., Libutti S.K.** (2000). Progress in antiangiogenic gene therapy of cancer. *Cancer.* **89**: 1181-1194.
- Ferrara N., Gerber H.P., LeCouter J.** (2003). The biology of VEGF and its receptors. *Nat. Med.* **9**: 669-676.
- Ferrara N.** (1999). Vascular endothelial growth factor: molecular and biological aspects. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **237**: 1-30-
- Ferrara N.** (1995). The role of vascular endothelial growth factor in pathological angiogenesis. *Breast Cancer Res. Treat.* **36**:127-137.
- Ferrara N., Houck K.A., Jakeman L.B., Leung D.W.** (1992). Molecular and biological properties of the vascular endothelial growth factor family of proteins. *Endocr. Rev.* **13**: 18-32.
- Folkman J., Merler E., Abernathy C., Williams G.** (1971). Isolation of a tumor factor responsible of angiogenesis. *J. Exp. Med.* **133**: 275-288.
- Fong G.H., Rossant J., Gertsenstein M., Breitman M.L.** (1995). Role of the Flt-1 receptor kinase in regulating the assembly of the vascular endothelium. *Nature.* **376**: 66-70.
- Frantz C., Stewart K.M., Weaver V.M.** (2010). The extracellular matrix at a glance. *J. Cell. Sci.* **123**: 4195-4200.
- García-Pedrero J.M., Zuazua P., Martínez-Campa C., Lazo P.S., Ramos S.** (2003). The naturally occurring variant of estrogen receptor (ER) ERDeltaE7 suppresses estrogen-dependent transcriptional activation by both wild-type ERalpha and ERbeta. *Endocrinology.* **7**:2967-76.
- García-Pedrero J.M., del Río B., Martínez-Campa C., Muramatsu M., Lazo P.S., Ramos S.** (2002). Calmodulin is a selective modulator of estrogen receptors. *Mol. Endocrinol.* **5**:947-960.

- García-Santos G., Antolín I., Herrera F., Martín V., Rodríguez-Blanco J., Carrera P., Rodríguez C.** (2006). Melatonin induces apoptosis in human neuroblastoma cancer cells. *J. Pineal Res.* **41**: 130-135.
- Gerber H.P., McMuertrey A., Kowalsky J., Yan M., Keyt B.A., Dixit V., Ferrara N.** (1998). Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation. *J. Biol. Chem.* **273**: 30336-30343.
- Germain D.** (2011). Estrogen carcinogenesis in breast cancer. *Endocrinol. Metab. Clin. North. Am.* **40**: 473-484.
- Giovannini M., Aldrighetti D., Zucchinelli P., Belli C., Villa E.** (2010). Antiangiogenic strategies in breast cancer management. *Crit. Rev. Oncol. Hemat.* **76**: 13-35.
- Godson C., Reppert S.M.** (1997). The Mel1a melatonin receptor is coupled to parallel signal transduction pathways. *Endocrinology.* **138**: 397-404.
- González A., Martínez-Campa C., Mediavilla M.D., Alonso-González C., Alvarez-García V., Sánchez-Barceló E.J. Cos S.** (2010). Inhibitory effects of melatonin on sulfatase and 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase activity and expression in glioma cells. *Oncol. Reports.* **23**: 1173-1178.
- González A., Cos S., Martínez-Campa C., Alonso-González C., Sánchez-Mateos S., Mediavilla M.D., Sánchez-Barceló E.J.** (2008). Selective Estrogen Enzyme Modulator actions of melatonin in human breast cancer cells. *J. Pineal Res.* **45**: 86-92.
- González A., Martínez-Campa C., Mediavilla M.D., Alonso-González C., Sánchez-Barceló E.J., Cos S.** (2007). Inhibitory effects of pharmacological doses of melatonin on aromatase activity and expression in rat glioma cells. *Br. J. Cancer.* **97**: 755-760.
- Gospodarowicz D., Abraham J.A., Schilling J.** (1989). Isolation and characterization of a vascular cell mitogen produced by pituitary-derived folliculo stellate cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **86**: 7311-7315.

- Goss P.E., Ingle J.N., Martino S., Robert N.J., Muss H.B., Piccart M.J., Castiglione M., Tu D., Shepherd L.E., Pritchard K.I., Livingston R.B., Davidson N.E., Norton L., Perez E.A., Abrams J.S., Therasse P., Palmer M.J., Pater J.L.** (2003) A randomized trial of letrozole in postmenopausal women after five years of tamoxifen therapy for early-stage breast cancer. *N. Engl. J. Med.* **349**: 1793-1802.
- Guerrero J.M., Reiter R.J., Ortiz G.G., Pablos M.I., Sewerynek E., Chuang J.I.** (1997). Melatonin prevents increases in neural nitric oxide and cyclic GMP production after transient brain ischemia and reperfusion in the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). *J. Pineal Res.* **23**: 24-31.
- Gunnarsson C., Jerevall P.L., Hammar K., Olsson B., Nordenskjold B., Janson A., Stal O.** (2008). Amplification of HSD17B1 has prognostic significance in postmenopausal breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* **108**: 35-41.
- Hanahan D., Weinberg R.A.** (2000). The hallmarks of cancer. *Cell.* **100**: 57-70.
- Hanahan D., Christofori G., Naik P., Arbeit J.** (1996). Transgenic mouse models of tumor angiogenesis: the angiogenic switch, its molecular controls and prospects of preclinical therapeutic models. *Eur. J. Cancer.* **32A**: 2386-93.
- Hashizume H., Baluk P., Morikawa S., McLean J.W., Thurston G., Roberge S., Jain R.K., McDonald D.M.** (2000). Openings between defective endothelial cells explain tumor vessel leakiness. *Am. J. Pathol.* **156**: 1363-1380.
- Holash J., Maisonpierre P.C., Compton D., Boland P., Alexander C.R., Zagzag D., Yancopoulos G.D., Wiegman S.J.** (1999). Vessel cooption, regression and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF. *Science.* **284**: 1994-1998.
- Hong Y., Chen S.** (2011). Aromatase, estrone sulfatase, and 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase: structure-function studies and inhibitor development. *Mol. Cell. Endocrinol.* **340**: 120-126.
- Howell A., Clarke R.B., Anderson E.** (1997). Oestrogens, Beatson and endocrine therapy. *Endocr. Relat. Cancer.* **4**: 371-380.
- Hunter D.J., Willett W.C.** (1993). Diet, body size and breast cancer. *Epidemiol. Rev.* **15**: 110-132.
- Hwang D., Scollar D., Byrne J., Levine E.** (1998). Expression of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in human breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **90**: 455-460.

- IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans.** (2004). Tobacco smoke and involuntary smoking. *IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks Hum.* **83**:1-1438.
- Ikeda N., Nakajima Y., Sho M., Adachi M., Huang C.L., Iki K., Kanehiro H., Hisanaga M., Nakano H., Miyake M.** (2001). The association of K-ras gene mutation and vascular endothelial growth factor gene expression in pancreatic carcinoma. *Cancer.* **92**: 488-499.
- Iyengar P., Combs T.P., Shah S.J., Gouon-Evans V., Pollard J.W., Albanese C., Flanagan L., Tenniswood M.P., Guha C., Lisanti M.P., Pestell R.G., Scherer P.E.** (2003). Adipocyte-secreted factors synergistically promote mammary tumorigenesis through induction of anti-apoptotic transcriptional programs and proto-oncogene stabilization. *Oncogene.* **22**: 6408-6423.
- Jones M.P., Melan M.A., Witt-Enderby P.A.** (2000). Melatonin decreases cell proliferation and transformation in a melatonin receptor-dependent manner. *Cancer Lett.* **151**: 133–143.
- Jordan V.C., Mittal S., Gosden B., Koch R., Lieberman M.E.** (1985). Structure-activity relationships of estrogens. *Environ. Health Perspect.* **61**: 97-110.
- Kagawa N., Hori H., Waterman M.R., Yoshioka S.** (2004). Characterization of stable human aromatase expressed in *E. coli*. *Steroids.* **69**: 235-243.
- Kajdaniuk D., Marek B., Foltyn W., Kos-Kudla B.** (2011). Vascular endothelial growth factor (VEGF)-part 2: in endocrinology and oncology. *Pol. J. Endocrinol.* **62**: 456-464.
- Kaupila A., Kivela A., Pakarinen A., Vakkuri O.** (1987). Inverse seasonal relationship between melatonin and ovarian activity in humans in a region with a strong seasonal contrast in luminosity. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **5**: 823-828.
- Kessembrock K., Plaks V., Werb Z.** (2010). Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell.* **141**: 52-67.
- Kiefer T., Ram P. T., Yuan L., Hill S. M.** (2002). Melatonin inhibits estrogen receptor transactivation and cAMP levels in breast cancer cells. *Breast Cancer Res. Treat.* **71**: 37-45.

- Kimura H., Weisz A., Ogura T., Hitomi Y., Kurashima Y., Hashimoto K., D'Acquisto F., Makuuchi M., Esumi H.** (2000). Identification of hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) ancillary sequence and its function in vascular endothelial growth factor gene induction by hypoxia and nitric oxide. *J. Biol. Biochem.* **276**: 2292-2298.
- Klagsbrun M., D'Amore P.** (1991). Regulators of angiogenesis. *Annu. Rev. Physiol.* **53**: 217-239.
- Knower K.C., To S.Q., Takagi K., Miki Y., Sasano H., Simpson E.R.** (2012). Melatonin suppresses aromatase expression and activity in breast cancer associated fibroblasts. *Breast Cancer Res. Treat.* **132**: 765-771.
- Koch A.E., Polverini P.J., Kunkel S.L., Harlow L.A., DiPietro L.A., Elnor S.G., Strieter R.M.** (1992). Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis. *Science.* **258**: 1798-1801.
- Kohn S., Nagy J.A., Dvorak H.F., Dvorak A.M.** (1992). Pathways of macromolecular tracer transport across venules and small veins. Structural basis for the hyperpermeability of tumor blood vessels. *Lab. Invest.* **67**: 596-607.
- Kovacic A., Simpson E.R., Clyne C.R.** (2004). Inhibition of aromatase transcription via promoter II by short heterodimer partner in human preadipocytes. *Mol., Endocrinol.* **18**: 252-259.
- Landeghem A.A., Poortman J., Nabuurs M., Thijssen J.H.** (1985). Endogenous concentration and subcellular distribution of estrogens in normal and malignant human breast tissue. *Cancer Res.* **45**: 2900-2906.
- Lee S., Jilani S.M., Nikolova G.V., Carpizo D., Iruela-Arispe M.L.** (2005). Processing of VEGF-A by matrix metalloproteinases regulates bioavailability and vascular patterning in tumors. *J. Cell. Biol.* **169**: 681-691.
- Li J.J., Li S.A., Klicka J.K., Parsons J.A., Lam L.K.** (1983). Relative carcinogenic activity of various synthetic and natural estrogens in the Syrian hamster kidney. *Cancer Res.* **43**: 5200-5204.
- Liao D., Johnson R.S.** (2007). Hypoxia: a key regulator of angiogenesis in cancer. *Cancer Metastasis Rev.* **26**: 281-290.
- Lissoni P., Rovelli F., Malugani F., Bucovec R., Conti A., Maestroni G.J.** (2001). Antiangiogenic activity of melatonin in advanced cancer patients. *Neuro Endocrinol. Lett.* **22**: 45-47.

- Livak K., Schmittgen T.D.** (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method. *Methods*. **25**: 402-408.
- Longnecker M.P., Newcomb P.A., Mittendorf R., Greenberg E.R., Clapp R.W., Bodgan G.F., Baron J., MacMahon B., Willet W.C.** (1995). Risk of breast cancer in relation to lifetime alcohol consumption. *J. Natl. Cancer Inst.* **87**: 923-929.
- Lu P., Weaver V.M., Werb Z.** (2012). The extracellular matrix: a dynamic niche in cancer progression. *J. Cell. Biol.* **196**: 395-406.
- Luboshitzky R., Lavie P.** (1999). Melatonin and sex hormone interrelationships- a review. *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.* **12**: 355-362.
- Luca M., Huang S., Gershenwald J.E., Singh R.K., Reich R., Bar-Eli M.** (1997). Expression of interleukin-8 by human melanoma cells up-regulates MMP-2 activity and increases tumor growth and metastasis. *Am. J. Pathol.* **151**: 1105-1113.
- Lukacik P., Kavanagh K.L., Oppermann U.** (2006). Structure and function of human 17beta-hydroxysteroid dehydrogenases. *Mol. Cell. Endocrinol.* **248**: 61-71.
- Luu-The V., Tremblay P., Labric F.** (2006). Characterization of type 12 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase, an isoform of type 3 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase responsible for estradiol formation in women. *Mol. Endocrinol.* **20**: 437-443.
- MacMahon B., Cole P., Lin M.T., Lowe C.R., Mirra A. P., Ravnihar B., Salber E.J., Valaoras V.G., Yuasa S.** (1970). Age at first birth and cancer of the breast. A summary of an international study. *Bull. World Health Organ.* **43**: 209-211.
- Maldonado M.D., Siu A.W., Sánchez-Hidalgo M., Acuna-Castroviejo D., Escames G.** (2006). Melatonin and lipid uptake by murine fibroblasts: clinical implications. *Neur. Endocrinol. Lett.* **27**: 601-608.
- Martinez J., Cifuentes M.** (2011). Adipose tissue and desmoplastic response in breast cancer. Breast cancer-carcinogenesis, cell growth and signalling pathways. Mehmet Gunduz and Esra Gunduz (Ed.), ISBN: 978-953-307-714-7.
- Martínez-Campa C.M., Alonso-González C., Mediavilla M.D., Cos S., González A., Sánchez-Barceló E.J.** (2008). Melatonin downregulates hTERT expression induced by either natural estrogens (17beta-estradiol) or metalloestrogens (cadmium) in MCF-7 human breast cancer cells. *Cancer Lett.* **268**: 272-277.

- Masferrer J.L., Leahy K.M., Koki A.T., Zweifel B.S., Settle S.L., Woerner B.M., Edwards D.A., Flickinger A.G., Moore R.J., Seibert K.** (2000). Antiangiogenic and antitumor activities of cyclooxygenase-2 inhibitors. *Cancer Res.* **60**: 1306-1311.
- Mayo J.C., Sainz R.M., Tan D.X., Hardeland R., Leon J., Rodríguez C., Reiter R.J.** (2005). Anti-inflammatory actions of melatonina and its metabolites, N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine (AFMK) and N1-acetyl-5-methoxykynuramine (AMK) in macrophages. *J. Neuroimmunol.* **165**: 139-149.
- Mayo J.C., Sainz R.M., Antoli L., Herrera F., Martin V., Rodríguez C.** (2002). Melatonin regulation of antioxidant enzyme gene expression. *Cell Mol. Life Sci.* **59**: 1706-1713.
- McTernan P.G., Anderson L.A., Anwar A.J., Eggo M.C., Crocker J., Barnett A.H., Stewart P.M., Kumar S.** (2002). Glucocorticoid regulation of P450 aromatase activity in human adipose tissue: gender and site differences. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **87**: 1327-1336.
- Mediavilla M.D., Sánchez-Barceló E.J., Tan D.X., Manchester L., Reiter R.J.** (2010). Basic mechanisms involved in the anti-cancer effects of melatonin. *Curr. Med. Chem.* **17**: 4462-4481.
- Mediavilla M.D., San Martín M., Sánchez-Barcelo E.J.** (1992). Melatonin inhibits mammary gland development in female mice. *J. Pineal Res.* **13**: 13-19.
- Meng L., Zhou J., Hironobu S., Suzuki T., Zeitoun K., Bulun S.E.** (2001). TNFalpha and IL-11 secreted by malignant breast epithelial cells inhibit adipocyte differentiation by selectively downregulating C/EBPalpha and PPARgamma: mechanism of desmoplastic reaction. *Cancer Res.* **61**: 2250-2255.
- Miettinen M., Mustonen M., Poutanen M., Isomaa V., Wickman M., Söderqvist G., Vihko R., Vihko P.** (1999). 17beta-hydroxysteroid dehydrogenases in normal human mammary epithelial cells and breast tissue. *Breast Cancer Res. Treat.* **57**: 175-182.
- Miller W.R., O'Neill J.S.** (1987). The importance of local synthesis of estrogen within the breast. *Steroids.* **50**: 537-547.
- Miller W.R., Hawkings R.A., Forrest A.M.** (1982). Significance of aromatase activity in human breast cancer. *Cancer Res.* **42**: 3365-3368.

- Mizukami Y., Fujiki K., Duerr E.M., Gala M., Jo W.S., Zhang X., Chung D.C.** (2006). Hypoxic regulation of vascular endothelial growth factor through the induction of phosphatidylinositol 3-kinase/Rho/ROCK and c-Myc. *J. Biol. Chem.* **281**: 13957-13963.
- Molinari E.J., North P.C., Dubocovich M.L.** (1996). 2-[125I]iodo.5-methoxycarbonylamino-N-acetyltryptamine: a selective radioligand for the characterization of melatonin ML2 binding sites. *Eur. J. Pharmacol.* **301**: 159-168.
- Montesano R., Vassalli J.D., Baird A., Guillemin R., Orci L.** (1986). Basic fibroblast growth factor induces angiogenesis in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **83**: 7297-7301.
- Morales D.E., McGowan K.A., Grant D.S., Maheshwari S., Bhartiya D., Cid M.C., Kleinman H.K., Schanaper H.W.** (1995). Estrogen promotes angiogenic activity in human umbilical vein endothelial cells in vitro and in a murine model. *Circulation.* **3**: 755-763.
- Morris G.J., Mitchell E.P.** (2008). Higher incidence of aggressive breast cancers in African-American women: a review. *J. Natl. Med. Assoc.* **100**: 698-702.
- Mosmann T.** (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assay. *J. Immunol. Methods.* **65**: 55-63.
- Myers K.A., Applegate K.T., Danuser G., Fischer R.S., Waterman C.M.** (2011). Distinct ECM mechanosensing pathways regulate microtubule dynamics to control endothelial cell branching morphogenesis. *J. Cell. Biol.* **192**: 321-334.
- Nagasaki S., Miki Y., Akahira J., Suzuki T., Sasano H.** (2009). 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenases in human breast cancer. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1155**: 25-32.
- Nagy J.A., Chang S.H., Dvorak A.M., Dvorak H.F.** (2009). Why are tumor blood vessels abnormal and why is it important to know? *Br. J. Cancer.* **100**: 865-869.
- Newman S.P., Purohit A., Ghilchik M.W., Potter B.V.L., Reed M.J.** (2000). Regulation of steroid sulphatase expression and activity in breast cancer. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* **75**: 259-264.
- Ntambi J.M., Kim Y.C.** (2000). Adipocyte differentiation and gene expression. *J. Nutr.* **130**: 3122S-3126S.

- O'Neill J.S., Elton R.A., Miller W.R.** (1988). Aromatase activity in adipose tissue from breast quadrants: a link with tumor site. *Br. Med. J.* **296**: 741-746.
- Pages G., Pouyssegur J.** (2005). Transcriptional regulation of the vascular endothelial growth factor gene: a concert of activating factors. *Cardiovasc. Res.* **65**: 564-573.
- Papetti M., Herman I.M.** (2002). Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* **282**: 947-970.
- Park S.Y., Jang W.J., Yi E.Y., Jang J.Y., Jung Y., Jeong J.W., Kim Y.J.** (2010). Melatonin suppresses tumor angiogenesis by inhibiting HIF-1 $\alpha$  stabilization under hypoxia. *J. Pineal Res.* **48**: 178-184.
- Park J.W., Hwang M.S., Suh S.I., Baek W.K.** (2009). Melatonin downregulates HIF-1 $\alpha$  expression through inhibition of protein translation in prostate cancer cells. *J. Pineal Res.* **46**: 415-421.
- Parkin D.M., Whelan S.L., Ferlay J., Raymond L., Young J.E.** (1997). Cancer Incidence in Five Continents. *IARC Scientific Publications, International Agency for Research on Cancer* (Lyon, France). **Nº 143, Vol. 7.**
- Parrett M., Harris R., Joarder F., Ross M., Clausen K., Robertson F.** (1997). Cyclooxygenase-2 gene expression in human breast cancer. *Int. J. Oncol.* **10**: 503-507.
- Pasqualini J.R.** (2009). Estrogen sulfotransferases in breast and endometrial cancers. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1155**: 88-98.
- Pasqualini J.R.** (2004). The selective estrogen enzyme modulators in breast cancer: a review. *Biochem. Biophys. Acta.* **1654**: 123-143.
- Pasqualini J.R., Chetrite G.S.** (2001). Estradiol as an anti-aromatase agent in human breast cancer cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **98**: 12-17.
- Pauley R., Santner S., Tait L., Bright R.** (2000). Regulation of CYP19 aromatase transcription in breast stromal fibroblasts. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **85**: 837-846.
- Peters K.G., de Vries C., Williams L.T.** (1993). Vascular endothelial growth factor receptor expression during embryogenesis and tissue repair suggests a role in endothelial differentiation and blood vessel growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**: 8915-8919.

- Pozo D., Delgado M., Fernández-Santos J.M., Calvo J.R., Gomariz R.P., Martin-Lacave I., Ortiz G.G., Guerrero J.M.** (1997). Expression of the Mel 1a-melatonin receptor mRNA in T and B subsets of lymphocytes from rat thymus and spleen. *FASEB J.* **11**: 466-473.
- Preston-Martin S., Pike M.C., Ross R.K., Jones P.A., Henderson B.E.** (1990). Increased cell division as a cause of human cancer. *Cancer Res.* **50**: 7415-7421.
- Price T., Aitken J., Head J., Mahendroo M.S., Means G.D., Simpson E.R.** (1992). Determination of aromatase cytochrome P450 messenger RNA in human breast tissues by competitive polymerase chain reaction (PCR) amplification. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **74**: 1247-1252.
- Purohit A., Woo L.W., Potter B.V.** (2011). Steroid sulfatase: a pivotal player in estrogen synthesis and metabolism. *Mol. Cell. Endocrinol.* **340**:154-170.
- Purohit A., Newman S.P., Reed M.J.** (2002). The role of cytokines in regulating estrogen synthesis: implications for the etiology of breast cancer. *Breast Cancer Res.* **4**: 65-69.
- Quick E.L., Parry E.M., Parry J.M.** (2007). Do estrogens induce chromosome specific aneuploidy in vitro, similar to the pattern of aneuploidy seen in breast cancer? *Mutat. Res.* **651**: 46-55.
- Rajapakse N., Silva E., Kortenkamp A.** (2002). Combining xenoestrogens at levels below individual no-observed-effect-concentrations dramatically enhances steroid hormone action. *Environ. Health Perspect.* **110**: 917– 921.
- Ram P.T., Yuan L., Dai J., Kiefer T., Klotz D.M., Spriggs L.L., Hill S.M.** (2000). Differential responsiveness of MCF-7 human breast cancer cell line stocks to the pineal hormone, melatonin. *J. Pineal Res.* **28**: 210-218.
- Rato A.G., Pedrero J.G., Martínez M.A., del Río B., Lazo P. S., Ramos S.** (1999). Melatonin blocks the activation of estrogen receptor for DNA binding. *Faseb J.* **13**: 857-868.
- Razandi M., Pedram A., Levin E.R.** (2000). Estrogen signals to the preservation of endothelial cell form and function. *J. Biol. Chem.* **275**: 38540-38546.
- Reed M.J., Purohit A., Woo L.W., Newman S.P., Potter B.V.** (2005). Steroid sulfatase: molecular biology, regulation and inhibition. *Endocr. Rev.* **26**: 171-202.

- Reed M.J., Topping L., Coldham N.G., Purohit A., Ghilchik M.W., James V.H.T.** (1993). Control of aromatase activity in breast cancer cells: the role of cytokines and growth factors. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* **44**: 589-596.
- Reiter R.J., Tan D.X., Sánchez-Barceló E.J., Mediavilla M.D., Gitto E., Korkmaz A.** (2011). Circadian mechanisms in the regulation of melatonin synthesis: disruption with light at night and the pathophysiological consequences. *J. Exp Integr. Med.* **1**: 13-22.
- Reiter R.J., Guerrero J.M., García J.J., Acuña-Castroviejo D.** (1998). Reactive oxygen intermediates, molecular damage and aging: Relation to melatonin. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **854**: 410-424.
- Reiter R. J.** (1991). That ubiquitously acting pineal hormone. *News Physiol. Sci.* **6**: 223-227.
- Reppert S.M., Weaver D.R., Ebisawa T.** (1994). Cloning and characterization of a mammalian melatonin receptor that mediates reproductive and circadian responses. *Neuron.* **13**: 1177-1185.
- Ries L. A.G., Eisner M.P., Kosary C.L., Hankey B.F., Miller B.A., Clegg L., Edwards B.K.** (2001). SEER Cancer Statistics Review, 1973-1998. *National Cancer Institute*, Bethesda, MD.
- Romeu L.R., Da Motta E.L., Maganhin C.C., Oshima C.T., Fonseca M.C., Barrueco K.F., Simoes R.S., Pellegrino R., Baracat E.C., Soares-Junior J.M.** (2011). Effects of melatonin on histomorphology and on the expression of steroid receptors, VEGF and PCNA in ovaries of pinealectomized rats. *Fertil. Steril.* **95**: 1379-1384.
- Ross R.K., Paganini-Hill A., Wan P.C., Pike M.C.** (2000). Effect of hormone replacement therapy on breast cancer risk: estrogen versus estrogen plus progestin. *J. Natl. Cancer Inst.* **92**: 328-332.
- Rosselli C.E., Resko J.A.** (2001). Cytochrome P450 aromatase (CYP19) in the non-human primate brain: distribution, regulation and functional significance. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* **79**: 247-253.
- Rubin G.L., Zhao Y., Kalus A.M., Simpson E.R.** (2000). Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  ligands inhibit estrogen biosynthesis in human breast adipose tissue: possible implications for breast cancer therapy. *Cancer Res.* **60**: 1604-1608.

- Russo J., Fernández S.V., Russo P.A., Fernbaugh R., Sheriff F.S., Lareef H.M., Garber J., Russo I.H.** (2006). 17beta-estradiol induces transformation and tumorigenesis in human breast epithelial cells. *FASEB J.* **20**: 1-13.
- Russo J., Russo I. H.** (2006). The role of estrogen in the initiation of breast cancer. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **102**: 89-96.
- Russo I.H., Russo J.** (1998). Role of hormones in mammary cancer initiation and progression. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia.* **3**: 49-61.
- Sainz R.M., Mayo J.C., Tan D.X., Leon J., Manchester L., Reiter R.J.** (2005). Melatonin reduces prostate cancer cell growth leading to neuroendocrine differentiation via a receptor and PKA independent mechanism. *Prostate.* **63**: 29-43.
- Sainz R.M., Mayo J.C., Rodríguez C., Tan D.X., López-Burillo S., Reiter R.J.** (2003). Melatonin and cell death: differential actions on apoptosis in normal and cancer cells. *Cell Mol. Life Sci.* **60**: 1407-1426.
- Salven P., Manpaa H., Orpana A., Alitalo K., Joensuu H.** (1997). Serum vascular endothelial growth factor is often elevated in disseminated cancer. *Clin. Cancer Res.* **3**: 647-651.
- Samuels H.H., Stanley F., Casanova J.** (1979). Depletion of L-3,5,3'-triiodothyronine and L-thyroxine in euthyroid calf serum for use in cell culture studies of the action of thyroid hormone. *Endocrinology.* **1**: 80-85.
- Sánchez-Barceló E.J., Cos S., Fernández R., Mediavilla M.D.** (2003). Melatonin and mammary cancer: a short review. *Endocr. Relat. Cancer.* **10**: 153-159.
- Sánchez-Hidalgo M., Lu Z., Tan D.X., Maldonado M.D., Reiter R.J., Gregerman R.I.** (2007). Melatonin inhibits fatty acid-induced triglyceride accumulation in ROS17/2.8 cells: implications for osteoblast differentiation and osteoporosis. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **292**: R2208-R2215.
- Santen R.J., Brodie H., Simpson E.R., Siiteri P.K., Brodie A.** (2009). History of aromatase: saga of an important biological mediator and therapeutic target. *Endocr. Rev.* **4**: 343-375.
- Santen R.J.** (2002). To block estrogen's synthesis or action: that is the question. *J. Clin. Endocrinol, Metab.* **87**: 3007-3012.

- Sasano H., Frost A.R., Saitoh R., Harada N., Poutanen M., Vihko R., Bulun S.E., Silverberg S.G., Nagura H.** (1996). Aromatase and 17beta hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in human breast carcinoma. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **81**: 4042-4046.
- Sato Y., Rifkin D.B.** (1988). Autocrine activities of basic fibroblast growth factor: regulation of endothelial cell movement, plasminogen activator synthesis and DNA synthesis. *J. Cell Biol.* **107**: 1199-1205.
- Schairer C., Lubin J., Troisi R., Sturgeon S., Brinton L., Hoover R.** (2000) Estrogen-progestin replacement and risk of breast cancer. *J. A. M. A.* **284**: 691-694.
- Sebastian S., Takayama K., Shozu M., Bulun S.E.** (2002). Cloning and characterization of a novel endothelial promoter of the human *CYP19* (aromatase P450) gene that is up-regulated in breast cancer tissue. *Mol. Endocrinol.* **10**: 2243-2254.
- Senger D.R., Peruzzi C.A., Feder J., Dvorak H.F.** (1986). A highly conserved vascular permeability factor secreted by a variety of human and rodent tumor cell lines. *Cancer Res.* **46**: 5629-5632.
- Shalaby F., Rossant J., Yamaguchi T.P., Gertsenstein M., Wu X.F., Breitman M.L., Schuh A.C.** (1995). Failure of blood island formation and vasculogenesis in Flk-1 deficient mice. *Nature* **376**: 62-66.
- Shimizu Y., Yarborough C., Osawa Y.** (1993). Competitive product inhibition of aromatase by natural estrogens. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* **44**: 651-656.
- Shweiki D., Itin A., Soffer D., Keshet E.** (1992). Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-induced angiogenesis. *Nature.* **359**: 843-845.
- Silva E., Rajapakse N., Kortenkamp A.** (2002) Something from “nothing”– eight weak estrogenic chemicals combined at concentrations below NOECs produce significant mixture effects. *Environ. Sci. Technol.* **36**: 1751– 1756.
- Simpson E.R., Mahendroo M.S., Means G.D., Kilgore M.W., Hinshelwood M.M., Grahnan-Lorence S., Amarneh B., Ito Y., Fisher C.R., Michael M.D., Mendelson C.R., Bulun S.E.** (1994). Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis. *Endocr. Rev.* **15**: 342-355.

- Singh A., Purohit A., Ghilchik M.W., Reed M.J.** (1999). The regulation of aromatase activity in breast fibroblasts: the role of interleukin-6 and prostaglandin E2. *Endocr. Relat. Cancer*. **6**: 139-147.
- Singh A., Purohit A., Wang D.Y., Duncan L.J., Ghilchik M.W., Reed M.J.** (1992). IL-6sR: release from MCF-7 breast cancer cells and role in regulating peripheral oestrogen synthesis. *J. Endocrinol.* **132**:R5-R8.
- Soares J. M., Masana M. I., Ersahin C., Duvocovich M. L.** (2003). Functional melatonin receptors in rat ovaries at various stages of the estrous cycle. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **306**: 694-702.
- Soh E.Y., Eigelberger M.S., Kim K. J., Wong M. G., Ypung D.M., Clark O.H., Duh Q.Y.** (2000). Neutralizing vascular endothelial growth factor activity inhibits thyroid cancer growth in vivo. *Surgery*. **128**:1059-1066.
- Soker S., Takashima S., Miao H.Q., Neufeld G., Klagsbrun M.** (1998). Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell*. **92**: 725-735.
- Song D., Liu G, Luu-The V., Zhao D, Wang L, Zhang H, Xueling G, Li S, Désy L, Labrie F, Pelletier G.** (2006). Expression of aromatase and 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase types 1, 7 and 12 in breast cancer. An immunocytochemical study. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* **101**: 136-144.
- Spinola P.G., Marchetti B., Labrie F.** (1986). Adrenal steroids stimulate growth and progesterone receptor levels in rat uterus and DMBA-induced mammary tumors. *Breast Cancer Res. Treat.* **8**: 241-248.
- Stanway S.J., Purohit A, Woo LW, Sufi S, Vigushin D, Ward R, Wilson RH, Stanczyk FZ, Dobbs N, Kulinskaya E, Elliott M, Potter BV, Reed MJ, Coombes RC.** (2006). Phase I study of STX 64 (667 Coumate) in breast cancer patients: the first study of a steroid sulfatase inhibitor. *Clin. Cancer Res.* **5**: 1585-1592.
- Stefulj J., Hortner M., Ghosh M., Schauenstein K., Rinner I., Wölfler A., Semmler J., Liebmann P.M.** (2001). Gene expression of the key enzymes of melatonin synthesis in extrapineal tissues of the rat. *J Pineal Res.* **30**: 243-7.

- Steinkampf M. P., Mendelson C.R., Simpson E.R.** (1987). Regulation by follicle-stimulating hormone of the synthesis of aromatase cytochrome P450 in human granulosa cells. *Mol. Endocrinol.* **7**: 465-471.
- Stocco C.** (2012). Tissue physiology and pathology of aromatase. *Steroids.* **77**: 27-35.
- Sullivan N.J., Sasser A.K., Axel A.E., Vesuna F., Raman V., Ramirez N., Oberyszyn T.M., Hall B.M.** (2009). Interleukin-6 induces an epithelial-mesenchymal transition phenotype in human breast cancer cells. *Oncogene.* **28**: 2940-2947.
- Suri C., McClain J., Thruston G., McDonald D.M., Zhou H., Oldmixon E.H., Saton T.N., Yancopoulos G.D.** (1998). Increased vascularization in mice overexpressing angiopoietin-1. *Science.* **282**: 468-471.
- Suzuki T., Miki Y., Nakamura Y., Ito K., Sasano H.** (2011). Steroid sulfatase and estrogen sulfotransferase in human carcinomas. *Mol. Cell. Endocrinol.* **340**:148-53.
- Suzuki T., Miki Y., Moriya T., Akahira J., Hirakawa H., Ohuchi N., Sasano H.** (2007). In situ production of sex steroids in human breast carcinoma. *Med. Mol. Morphol.* **40**: 121-127.
- Suzuki T., Miki Y., Nakamura Y., Moriya T., Ito K., Ohuchi N., Sasano H.** (2005). Sex steroid-producing enzymes in human breast cancer. *Endocr. Relat. Cancer.* **12**: 701-720.
- Tamarkin L., Danforth D.N., Lichter A., DeMoss E., Cohen M., Chabner B., Lippman M.** (1982). Decreased nocturnal plasma melatonin peak in patients with estrogen receptor positive breast cancer. *Science.* **216**: 1003-1005.
- Tan D. X., Manchester L. C., Hardeland R., López-Burillo S., Mayo J. C., Sainz R. M., Reiter R. J.** (2003). Melatonin: a hormone, a tissue factor, an autocoid, a paracoid, and an antioxidant vitamin. *J. Pineal Res.* **34**: 75-78.
- Tchoudakova A., Kishida M., Wood E., Callard G.V.** (2001). Promoter characteristics of two *cyp19* genes differentially expressed in the brain and ovary of teleost fish. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* **78**: 427-439.

- Tekmal R.R., Kirma N., Gill K., Fowler K.** (1999). Aromatase overexpression and breast hyperplasia, an *in vivo* model – continued overexpression of aromatase is sufficient to maintain hyperplasia without circulating estrogens, and aromatase inhibitors abrogate these preneoplastic changes in mammary glands. *Endocr. Relat. Cancer*. **6**: 307-314.
- Thomas H.V., Reeves G.K., Key T.J.** (1997). Endogenous estrogen and postmenopausal breast cancer: A quantitative review. *Cancer Causes Control*. **8**: 922-928.
- Tinwell H., Ashby J.** (2004) Sensitivity of the immature rat uterotrophic assay to mixtures of estrogens. *Environ. Health Perspect.* **112**: 575– 582.
- Tochaurus J., Khontun C., Chongthammakun S.,** (2010). Melatonin attenuates methamphetamine-induced overexpression of pro-inflammatory cytokines in microglial cell lines. *J. Pineal Res.* **48**: 347-352.
- Trubiani O., Recchioni R., Moroni F., Pizzicannella J., Caputi S., Di Primio R.** (2005). Melatonin provokes cell death in human B-lymphoma cells by mitochondrial-dependent apoptotic pathway activation. *J. Pineal Res.* **39**: 425-431.
- Verkasalo P.K., Pukkala E., Stevens R.G., Ojamo M., Rudanko S.L.** (1999). Inverse association between breast cancer incidence and degree of visual impairment in Finland. *Br. J. Cancer*. **80**: 1459-1460.
- Waldhauser F., Weiszenbacher G., Tatzer E., Gisinger B., Waldhauser M., Schemper M., Frisch H.** (1988). Alterations in nocturnal serum melatonin levels in humans with growth and aging. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **66**: 648-652.
- Waltenberger J., Claesson-Welsh L., Siegbahn A., Shibuya M., Heldin C.H.** (1994). Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor. *J. Biol. Chem.* **269**: 26988-26995.
- Wang J., Xiao X., Zhang Y., Shi D., Chen W., Fu L., Liu L., Xie F., Kang T., Huang W., Deng W.** (2012). Simultaneous modulation of COX-2, p300, Akt and Apaf-1 signaling by melatonin to inhibit proliferation and induce apoptosis in breast cancer cells. *J. Pineal Res.* **53**: 77-90.
- Willis D., Mason H., Gilling-Smith C., Franks S.** (1996). Modulation by insulin of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone actions in human granulosa cells of normal and polycystic ovaries. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **81**: 302-309.

- Winczyk K., Pawlikowski M., Lawnicka H., Kunert-Radek J., Spadoni G., Tarzia G., Karasek M.** (2002). Effects of melatonin and melatonin receptors ligand N-[(4-methoxy-1H-indol-2-yl) methyl] propanamide on murine Colon 38 cancer growth in vitro and in vivo. *Neuroendocrinol. Lett.* **1**: 50-54.
- Wu A. H., Pike M. C., y Stram D. O.** (1999). Meta-analysis: dietary fat intake, serum estrogen levels, and the risk of breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **91**: 529-534.
- Yager J.D.** (2000). Endogenous estrogens as carcinogens through metabolic activation. *J. Natl. Cancer Institute Monogr.* **27**: 67-73.
- Yoshida K., Miki Y.** (2004). Role of BRCA1 and BRCA2 as regulators of DNA repair, transcription, and cell cycle in response to DNA damage. *Cancer Science.* **95**: 866-871.
- Yuan A., Yang P.C., Yu C.J., Chen W.J., Lin F.Y., Kuo S.H., Luh K.T.** (2000). Interleukin-8 messenger ribonucleic acid expression correlates with tumor progression, tumor angiogenesis, patient survival and timing of relapse in non-small-cell lung cancer. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **162**: 1957-1963.
- Yue W., Santen R. J., Wang J. P., Li Y., Verderame M. F., Bocchinfuso W. P., Korach K. S., Devanesan P., Todorovic R., Rogan E. G., Cavalieri E.L.** (2003). Genotoxic metabolites of estradiol in breast: potential mechanism of estradiol induced carcinogenesis. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **86**: 477-486.
- Yue W., Bernstein L.M., Wang J.P., Clark G.M., Hamilton C.J., Demers L.M., Santen R.J.** (2001). The potential role of estrogen in aromatase regulation in breast cancer. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **79**: 157-164.
- Yue W., Wang J. P., Hamilton C. J., Demers L. M., Santen R. J.** (1998). *In situ* aromatization enhances breast tumour estradiol levels and cellular proliferation. *Cancer Res.* **58**: 927-932.
- Zagzag D., Hooper A., Friedlander D.R., Chan W., Holash J., Wiegand S.J., Yancopoulos G.D., Grumet M.** (1999). In situ expression of angiopoietins in astrocytomas identifies angiopoietin-2 as an early marker of tumor angiogenesis. *Exp. Neurol.* **159**: 391-400.

- Zhao Y., Agarwal V.R., Mendelson C.R., Simpson E.R.** (1996). Estrogen biosynthesis proximal to a breast tumor is stimulated by PGE<sub>2</sub> via cyclic AMP, leading to activation of promoter II of the CYP19 (aromatase) gene. *Endocrinology*. **137**: 5739-5742.
- Zhao C.R., Mendelson C.R., Simpson E.R.** (1995). Characterization of the sequences of the human CYP19 (aromatase) gene that mediate regulation by glucocorticoids in adipose stromal cells and fetal hepatocytes. *Mol. Endocrinol.* **9**: 340-349.



## **ANEXOS: PUBLICACIONES**

---

---

*Melatonin inhibits aromatase promoter expression by regulating cyclooxygenases expression and activity in breast cancer cells.*

Artículo publicado y disponible en [British Journal of Cancer](#) (2009) **101**, 1613–1619.  
[doi:10.1038/sj.bjc.6605336](https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6605336)

Reproducción autorizada por Nature Publishing Group

# Melatonin inhibits aromatase promoter expression by regulating cyclooxygenases expression and activity in breast cancer cells

C Martínez-Campa<sup>1</sup>, A González<sup>1</sup>, MD Mediavilla<sup>1</sup>, C Alonso-González<sup>1</sup>, V Alvarez-García<sup>1</sup>, EJ Sánchez-Barceló<sup>1</sup> and S Cos<sup>\*,1</sup>

<sup>1</sup>Department of Physiology and Pharmacology, School of Medicine, University of Cantabria, 39011 Santander, Spain

**BACKGROUND:** Melatonin reduces the development of breast cancer interfering with oestrogen-signalling pathways, and also inhibits aromatase activity and expression. Our objective was to study the promoters through which melatonin modifies aromatase expression, evaluate the ability of melatonin to regulate cyclooxygenases and assess whether the effects of melatonin are related to its effects on intracellular cAMP, in MCF-7 cells.

**METHODS:** Total aromatase mRNA, aromatase mRNA promoter regions and cyclooxygenases mRNA expression were determined by real-time RT-PCR. PGE<sub>2</sub> and cAMP were measured by kits.

**RESULTS:** Melatonin downregulated the gene expression of the two major specific aromatase promoter regions, pl1 and pl3, and also that of the aromatase promoter region pl4. Melatonin 1 nM was able to counteract the stimulatory effect of tetradecanoyl phorbol acetate on PGE<sub>2</sub> production and inhibit COX-2 and COX-1 mRNA expression. Melatonin 1 nM elicited a parallel time-dependent decrease in both cyclic AMP formation and aromatase mRNA expression.

**CONCLUSIONS:** This study shows that melatonin inhibits aromatase activity and expression by regulating the gene expression of specific aromatase promoter regions. A possible mechanism for these effects would be the regulation by melatonin of intracellular cAMP levels, mediated by an inhibition of cyclooxygenase activity and expression.

*British Journal of Cancer* (2009) **101**, 1613–1619. doi:10.1038/sj.bjc.6605336 www.bjcancer.com

Published online 22 September 2009

© 2009 Cancer Research UK

**Keywords:** melatonin; pineal; MCF-7 cells; breast cancer; aromatase

Oestrogens are involved in the growth and differentiation of the normal mammary gland and have an important role in the genesis and growth of mammary tumours (Russo and Russo, 1998). Melatonin, the main hormone secreted by the pineal gland, has been shown to exert oncostatic properties on hormone-dependent mammary cancer (Cos and Sánchez-Barceló, 2000a,b; Blask *et al*, 2002). Evidence from *in vivo* studies on animal models and *in vitro* studies on human breast cancer cell lines support the hypothesis that melatonin oncostatic effects on hormone-dependent mammary tumours are mainly dependent on its ability to interact with the oestrogen-signalling pathway (Hill and Blask, 1988; Cos *et al*, 2006b, 2008). At the mammary tumour cell level, melatonin interferes with the oestrogen receptor and counteracts the effects of oestrogens, thus behaving as a selective oestrogen receptor modulator (Blask and Hill, 1986; Hill and Blask, 1988). Furthermore, melatonin regulates the activity of some enzymes responsible for the local synthesis of oestrogens in human breast cancer, thus behaving as a selective oestrogen enzyme modulator (Cos *et al*, 2008; González *et al*, 2008). Using MCF-7

human breast cancer cells in culture, which express aromatase (Zhou *et al*, 1993; Sonne-Hansen and Lykkesfeldt, 2005) and the membrane-bound G<sub>i</sub> protein-coupled receptor (MT<sub>1</sub>) melatonin receptor (Ram *et al*, 1998, 2002), our group has previously shown that melatonin, at physiological concentrations (1 nM), reduces aromatase activity in these cells, both under basal conditions and when aromatase activity is stimulated by cAMP or cortisol (Cos *et al*, 2005). In addition, we also demonstrated by RT-PCR that melatonin downregulates aromatase mRNA steady-state levels in MCF-7 cells (Cos *et al*, 2005). This modulator effect of melatonin on the enzyme that controls the conversion from androgenic precursors to oestrogens has also been described *in vivo* in rats bearing DMBA-induced mammary tumours (Cos *et al*, 2006a). The binding of melatonin to MT<sub>1</sub> receptors has been described as the first step in the antiaromatase action of melatonin on MCF-7 cells (González *et al*, 2007).

Mammary cancer tissue contains all the enzymes responsible for the local biosynthesis of oestrogens. One of the two major pathways involved in the synthesis of oestrogens in breast cancer cells is the aromatase pathway, which transforms androgens into oestrogens (Landeghem *et al*, 1985; Yue *et al*, 1998; Simpson, 2000). It is well known that aromatase activity and expression is much higher in breast cancer tissue than in normal mammary tissue, and this is one of the reasons why oestrogen concentration in this type of tissue is highly elevated (Landeghem *et al*, 1985; Yue *et al*, 1998). This enzyme complex consists of two components: aromatase cytochrome P-450 protein and, coupled to it,

\*Correspondence: Dr S Cos, Departamento de Fisiología y Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad de Cantabria, Cardenal Herrera Oria s/n, 39011 Santander, Spain;

E-mail: coss@unican.es

Received 29 May 2009; revised 19 August 2009; accepted 1 September 2009; published online 22 September 2009

a ubiquitous flavoprotein, NADPH-cytochrome P-450 reductase (Conley and Hinshelwood, 2001). The gene coding for the aromatase protein is the largest of the cytochrome P-450 family. Because its overall homology to other members of the P-450 superfamily is low, aromatase belongs to a separate gene family designated CYP19 (Santen and Harvey, 1999). Regulation of aromatase expression in human tissues is quite complex, involving alternative promoter sites that provide tissue-specific control (Bulun *et al*, 2005; Chen *et al*, 2009). In normal breast, the mammary adipose tissue maintains low levels of aromatase expression almost exclusively through promoter I.4, which is regulated by the combined action of a glucocorticoid and a member of the class I cytokine family (interleukin 6, 11). However, in mammary cancer, both in malignant epithelial cells and surrounding fibroblasts, the expression of aromatase is increased by the activation of promoters II and I.3 (Bulun *et al*, 2005; Chen *et al*, 2009). Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) is an important regulator of aromatase gene expression through promoters II and I.3 (Bulun *et al*, 2005). As it is known (a) that melatonin, through an MT<sub>1</sub>, downregulates the forskolin-induced increase of cAMP in MCF-7 cells (Kiefer *et al*, 2002), and (b) that the activation of the two major promoters driving aromatase expression in breast cancer is regulated by cAMP (Bulun *et al*, 2005; Chen *et al*, 2009), the objective of this study was to expand our understanding of the antiaromatase properties of melatonin and to assess whether the promoters that drive aromatase expression are regulated by melatonin and to evaluate the ability of this indolamine to directly regulate cyclooxygenases (COX) gene expression and activity, as defined by PGE<sub>2</sub> production, in MCF-7 cells. In addition, we studied whether the effects of melatonin on aromatase expression are related to the effects of this hormone on intracellular cAMP concentration.

## MATERIALS AND METHODS

### Cells and culture conditions

MCF-7 human breast cancer cells were purchased from the American Tissue Culture Collection (Rockville, MD, USA). They were maintained as monolayer cultures in 75 cm<sup>2</sup> plastic culture flasks in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Gibco, France), penicillin (20 units ml<sup>-1</sup>) and streptomycin (20 µg ml<sup>-1</sup>) (Sigma-Aldrich) at 37°C in a humid atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>. Cells were sub-cultured every 3–4 days by suspension in 5 mM Na<sub>2</sub>-EDTA in PBS (pH 7.4) at 37°C for 5 min. Before each experiment, stock sub-confluent monolayers (80%) of MCF-7 cells were incubated with 5 mM Na<sub>2</sub>-EDTA in PBS (pH 7.4) at 37°C for 5 min, resuspended in DMEM supplemented with 5% FBS and passed repeatedly through a 25-G needle to produce a single cell suspension. Cell number and viability were determined by staining a small volume of cell suspension with 0.4% trypan blue saline solution and examining the cells in a haemocytometer.

### Measurement of total aromatase mRNA and aromatase promoter regions pl.3, pII, and pl.4 gene expression

MCF-7 cells were grown in medium with phenol red and supplemented with 10% FBS. Before each experiment, cells were transferred to a phenol red-free DMEM medium containing 0.5% charcoal-stripped FBS and maintained for 3 days. Thereafter, analysis of total aromatase mRNA and aromatase mRNA promoter regions pl.3, pII, and pl.4 expression in MCF-7 cells was carried out by reverse transcription real-time RT-PCR, after an incubation of MCF-7 cells with either melatonin 1 nM (Sigma-Aldrich) or vehicle for 120 min.

Total cellular RNA was purified with the Nucleospin RNA II Kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany), following the manufacturer's instructions. Integrity of RNA was assessed by electrophoresis in ethidium bromide-stained 1.2% agarose-Tris-borate EDTA gels. The absorbance ratio A<sub>260 nm</sub>/A<sub>280 nm</sub> was greater than 1.8. For cDNA synthesis, 1 µg of total RNA was denatured at 65°C for 10 min and reverse transcribed for 50 min at 45°C with a cDNA synthesis kit (Bioline, London, UK) in a final volume of 20 µl in the presence of 500 ng of oligo (dT)12–18 primer.

Primers used for the amplification of aromatase and promoter-specific transcripts of aromatase (Sigma Genosys Ltd., Cambridge, UK), using the housekeeping gene S14, are listed in Table 1. The primers were designed so that the coding sequence between the two PCR primer sites is interrupted by at least one intron in the gene.

Real-time PCRs were performed in an MX3000 (Stratagene, La Jolla, CA, USA) using Brilliant SYBR Green PCR Master Mix (Stratagene), following the manufacturer's instructions. Amplifications were performed for 40 cycles using the following temperature profile: 58°C, 60 s (annealing); 72°C, 30 s (extension) and 95°C, 30 s (denaturation).

In some experiments, to confirm the relationship between PGE<sub>2</sub> and aromatase expression, cells were incubated for 120 min with PGE<sub>2</sub> 10 µM, melatonin 1 nM and luzindole 10 µM (all from Sigma-Aldrich) before measuring total aromatase mRNA expression. In addition, the effects of cAMP-modulating agents (8-Br-cAMP and RP-cAMP; Sigma-Aldrich) on aromatase mRNA steady-state levels were determined in cells treated with these agents (1 µM) in the presence or absence of melatonin 1 nM.

### Assay of COX enzymatic activity and PGE<sub>2</sub> measurement

To study COX enzymatic activity, as defined by PGE<sub>2</sub> synthesis in culture media, the experiments were performed in 12-well plates. MCF-7 cells (150 000 cells) were added to each well and plates were maintained overnight in DMEM supplemented with 10% FBS, penicillin (20 units ml<sup>-1</sup>) and streptomycin (20 µg ml<sup>-1</sup>), at 37°C, to allow the cells to adhere to the plates. Cells were then serum starved in defined media for 24 h. Thereafter, the media were changed for fresh ones supplemented with 100 µM sodium arachidonate (Sigma-Aldrich) and containing tetradecanoyl phorbol acetate (TPA) 10 nM (Sigma-Aldrich), melatonin 1 nM or the diluent of these drugs (ethanol, at a final concentration lower than 0.0001% per plate). After 5 h incubation at 37°C, the media were collected, centrifuged to obtain a cell-free fraction and frozen

**Table 1** Primers used for RT-PCR detection of aromatase, aromatase promoter regions pl.3, pl.4, and pII, cyclooxygenases 1 and 2 and S14 (control)

mRNA	Sequence
Aromatase (F)	5'-TATTGGAATGCTGATTGCGG
Aromatase (R)	5'-TTGGGCTTGGGAAATACTCG
pl.3 (F)	5'-GGGCTTCCTTGTTTTGACTGTAA
pl.3 (R)	5'-AGAGGGGGCAATTTAGAGTCTGT
pII (F)	5'-CTCTGAAGCAACAGGACTATAGA
pII (R)	5'-CAGGCACGATGCTGGTGATG
pl.4 (F)	5'-AACGTGACCAACTGGAGCCTG
pl.4 (R)	5'-CATCACCAGCATCGTGCCTG
COX-1 (F)	5'-ACCCGCACGGGCTATTCCGGC
COX-1 (R)	5'-AGGCGCATGAGCATCTCTCGG
COX-2 (F)	5'-ATGTATGAGTGTGGGATTTGA
COX-2 (R)	5'-TCCAAAATCCCTTGAAGTGGG
S14 (F)	5'-TCACCGCCCTACACATCAAAC
S14 (R)	5'-TCCTGCGAGTGCTGTCAGAG

(F) sense forward primer; (R) antisense (reverse) primer.

at  $-70^{\circ}\text{C}$  until assays were performed.  $\text{PGE}_2$  concentration in the supernatant of culture media was determined by ELISA (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA), according to the protocol provided by the manufacturer.

### Measurement of COX-1 and COX-2 mRNA expression

Analysis of COX-1 and COX-2 mRNA expression in MCF-7 cells was carried out by reverse transcription real-time RT-PCR after incubating MCF-7 cells with either melatonin 1 nM or vehicle for 120 min. Total cellular RNA was purified with the Nucleospin RNA II Kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany) following the manufacturer's instructions. Integrity of RNA was assessed by electrophoresis in ethidium bromide-stained 1.2% agarose-Tris-borate EDTA gels. The absorbance ratio  $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$  was greater than 1.8. For cDNA synthesis, 1  $\mu\text{g}$  of total RNA was denatured at  $65^{\circ}\text{C}$  for 10 min and was reverse transcribed for 50 min at  $45^{\circ}\text{C}$  using a cDNA Synthesis kit (Bioline, London, UK) in a final volume of 20  $\mu\text{l}$  in the presence of 500 ng of oligo (dT)12–18 primer.

PCR was performed using a set of human COX-1- and COX-2-specific primers (Sigma Genosys Ltd.) listed in Table 1. The coding sequence between the two PCR primer sites is interrupted by at least one intron in the gene. As a control quantification, S14 mRNA was also carried out by RT-PCR using a set of specific primers (Table 1).

Real-time PCRs were performed in an MX3000 (Stratagene) using Brilliant SYBR Green PCR Master Mix (Stratagene) following the manufacturer's instructions. Amplifications were performed for 40 cycles using the following temperature profile:  $58^{\circ}\text{C}$ , 60 s (annealing);  $72^{\circ}\text{C}$ , 30 s (extension); and  $95^{\circ}\text{C}$ , 30 s (denaturation).

### Measurement of cAMP levels

MCF-7 cells were grown in a medium supplemented with 10% FBS for 3 days in the presence of melatonin 1 nM or vehicle. Thereafter, cAMP was analysed using a commercial kit, the Cyclic AMP [ $^3\text{H}$ ] Assay System (Amersham Biosciences, Barcelona, Spain).

### Statistical analysis

Data are expressed as mean  $\pm$  s.e.m. Differences in aromatase mRNA promoter regions pI.3, pII, and pI.4, and COX-1 and COX-2 mRNA expression, were analysed by unpaired Student's *t*-test. Comparisons of  $\text{PGE}_2$  levels and total aromatase mRNA expression were carried out using one-way analysis of variance, followed by the Student–Newman–Keuls test. Results were considered as statistically significant at  $P < 0.05$ .

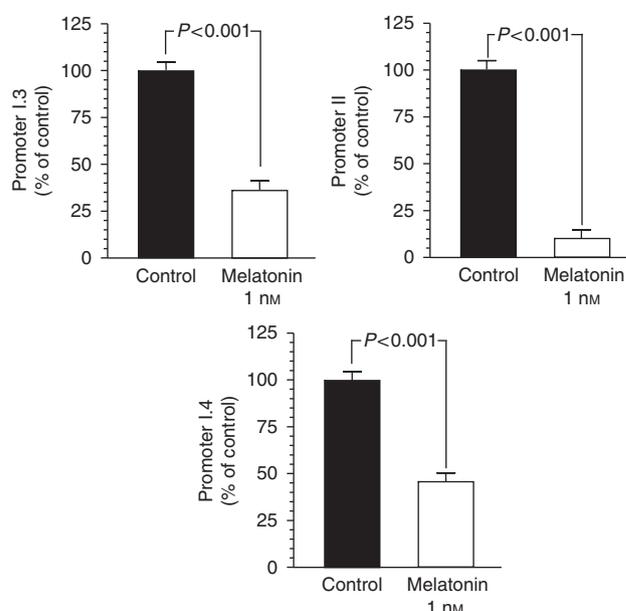
## RESULTS

### Effects of melatonin on aromatase promoter regions pI.3, pII, and pI.4 expression

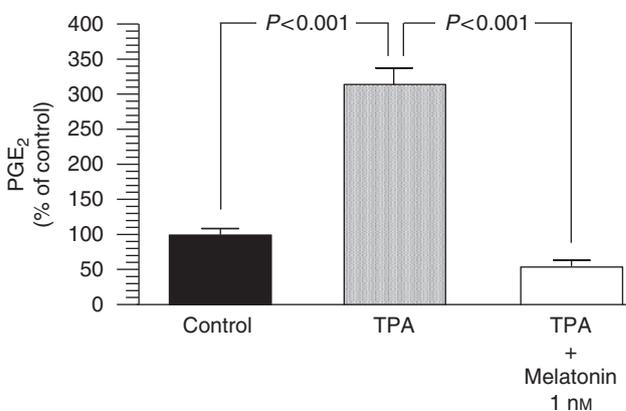
To determine the promoters involved in the melatonin control of aromatase expression, we used competitive RT-PCR to amplify each of the promoter-specific transcripts from RNA extracted from MCF-7 cells. As shown in Figure 1, melatonin 1 nM exerted a significant ( $P < 0.001$ ) and potent inhibition in aromatase expression that is specific to the aromatase promoters II, pI.3, and pI.4.

### Effect of melatonin on COX enzymatic activity and production of $\text{PGE}_2$

$\text{PGE}_2$  production by MCF-7 cells was measured by ELISA to determine whether cyclooxygenase enzyme activity was modified after treating cells with physiological concentrations of melatonin (1 nM). The levels of COX activity in MCF-7 cells were low but detectable. Tetradecanoyl phorbol acetate (TPA) is an exogenous



**Figure 1** RT-PCR analysis of the gene expression of aromatase promoter regions pI.3, pII, and pI.4 in MCF-7 cells after 120 min incubation with melatonin (1 nM) or ethanol (0.001%) (control). Data are expressed as the percentage of the control group.

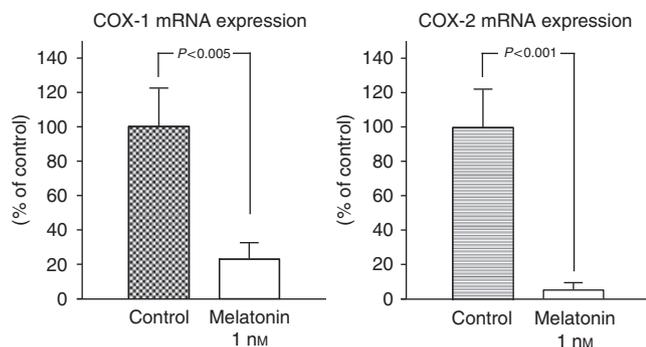


**Figure 2** Effects of melatonin (1 nM) on COX enzymatic activity as defined by  $\text{PGE}_2$  production after tetradecanoyl phorbol acetate (TPA) stimulation. Data are expressed as a percentage of the control group (mean  $\pm$  s.e.m.).

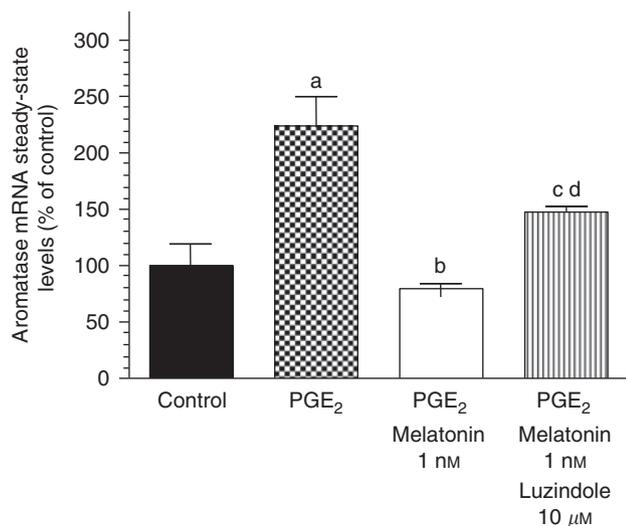
natural product showing tumour-promoting activity, which, through the stimulation of protein kinase C activity, induces COX enzymatic activity and increases the synthesis of  $\text{PGE}_2$ . Melatonin 1 nM was able to significantly counteract ( $P < 0.001$ ) the stimulatory effect of TPA on  $\text{PGE}_2$  production by decreasing the  $\text{PGE}_2$  concentration to levels similar to those found in culture media of control cells (Figure 2).

### Effects of melatonin on COX-1 and COX-2 mRNA expression

The levels of COX-1 and COX-2 expression in MCF-7 cells were studied by real-time RT-PCR. Melatonin at physiological (1 nM) doses significantly ( $P < 0.001$ ) inhibited the expression of COX-2 by as much as 10 times (Figure 3). The COX-1 mRNA expression was also significantly ( $P < 0.005$ ) reduced by melatonin by as much as four times (Figure 3).



**Figure 3** Effects of melatonin (1 nM) or the diluent (ethanol at 0.0001% final concentration) on COX-1 and COX-2 mRNA expression. Data are expressed as a percentage of the control group (mean  $\pm$  s.e.m.).



**Figure 4** Effects of melatonin (1 nM) on aromatase mRNA steady-state levels induced by prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>). Data are expressed as a percentage of the control group (mean  $\pm$  s.e.m.). a,  $P < 0.001$  vs that of control; b,  $P < 0.001$  vs that of PGE<sub>2</sub>; c,  $P < 0.05$  vs that of PGE<sub>2</sub>; d,  $P < 0.05$  vs that of PGE<sub>2</sub> + melatonin 1 nM.

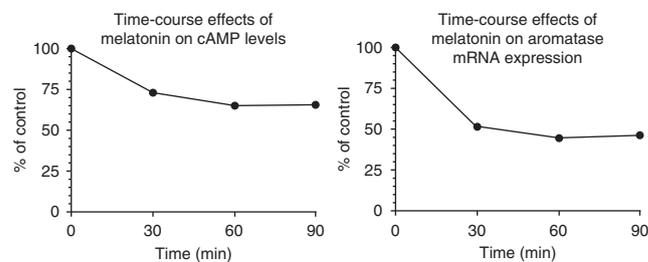
#### Effects of melatonin on aromatase mRNA expression induced by PGE<sub>2</sub>

Figure 4 shows that 1 nM melatonin also significantly ( $P < 0.001$ ) decreased the aromatase mRNA steady-state levels induced by PGE<sub>2</sub>, a well-known inducer of aromatase expression. The addition of luzindole 10  $\mu$ M, a melatonin receptor antagonist, prevented the inhibitory effect of melatonin on aromatase mRNA steady-state levels, thus suggesting a potential involvement of melatonin receptors in these effects.

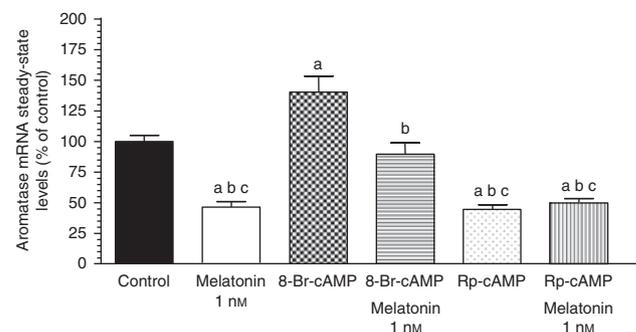
#### Effects of melatonin on aromatase mRNA expression and intracellular c-AMP levels

Figure 5 shows the correlation between time-course changes in cAMP and aromatase expression after melatonin treatment. As observed, melatonin 1 nM elicited a parallel time-dependent decrease in both cyclic AMP formation and aromatase mRNA expression.

To determine whether the effects of melatonin on aromatase mRNA steady-state levels were dependent (not only coincident) on the effects of the hormone on intracellular cAMP, we studied



**Figure 5** Time course of inhibition of cAMP levels and aromatase mRNA expression by melatonin (1 nM). Data are expressed as a percentage of the control group.



**Figure 6** Effects of melatonin on both aromatase mRNA steady-state and intracellular cAMP levels. Data are expressed as a percentage of the control group (mean  $\pm$  s.e.m.). a,  $P < 0.05$  vs that of control; b,  $P < 0.05$  vs that of 8-Br-cAMP; c,  $P < 0.05$  vs that of 8-Br-cAMP + melatonin 1 nM.

aromatase mRNA steady-state levels from cells treated with agents that should mimic (Rp-cAMP) or block (8-Br-cAMP) these effects of melatonin. Figure 6 shows that melatonin significantly ( $P < 0.05$ ) inhibited aromatase mRNA steady-state levels similar to Rp-cAMP, an inhibitor of the activation by cAMP. In contrast, 8-Br-cAMP, a membrane-permeable cAMP analogue significantly ( $P < 0.05$ ) increased aromatase mRNA steady-state levels. When cells were also grown in the presence of 1 nM melatonin, the aromatase mRNA expression was significantly ( $P < 0.05$ ) lower than in those treated only with 8-Br-cAMP.

#### DISCUSSION

The relevance of oestrogens in the genesis and progression of breast cancer is supported by important experimental and epidemiological evidence (Russo and Russo, 1998). Ovaries are the main sites of oestrogen synthesis in premenopausal non-pregnant women. However, after menopause, local synthesis of oestrogens in some tissues, including mammary tissue, acquires a special importance in mammary carcinogenesis (Ackerman *et al*, 1981; Pasqualini, 2004; Pasqualini and Chetrite, 2005; Suzuki *et al*, 2005). The local synthesis of oestrogens depends on the activity of different enzyme families (aromatase, sulfatases, etc) to transform androgens into oestrogens, as well as compounds of weak oestrogenic activity into more active forms. All these enzymes contribute to the regulation of the oestrogen availability in breast tumours and in other kinds of tumours, such as in human endometrial carcinoma (Pasqualini, 2004; Pasqualini and Chetrite, 2005; Suzuki *et al*, 2005). This is the reason why a new therapeutic strategy, based on the inhibition of oestrogen synthesis (drugs collectively known as selective oestrogen enzyme modulators), is currently being developed for breast cancer treatment (Wong and Ellis, 2004).

At present, the validity of melatonin as an oncostatic agent, especially in hormone-dependent mammary tumours, is well established (Blask *et al*, 2002; Cos *et al*, 2006b, 2008). Melatonin exerts oncostatic effects on breast cancer by interacting with oestradiol at the oestrogen receptor level (Cos and Sánchez-Barceló, 2000a, b; Del Rio *et al*, 2004; Cos *et al*, 2006b) and by regulating the activity and expression of some enzymes responsible for the local synthesis of oestrogens (Cos *et al*, 2005, 2006b, 2008). As we previously showed that melatonin inhibits aromatase activity and expression, both *in vitro* in culture of human breast cancer cells (Cos *et al*, 2005) and *in vivo* in rats bearing DMBA-induced mammary tumours (Cos *et al*, 2006a), we wanted to expand our understanding of the antiaromatase properties of melatonin; therefore, our objective now was to assess which promoters of the aromatase gene are modified by melatonin. Furthermore, as there is an association between high cyclooxygenase mRNA expression and upregulation of the gene expression of the two major specific aromatase promoter regions, pII and pI.3, in breast tumours (Díaz-Cruz *et al*, 2005; Prosperi and Robertson, 2006), we were also interested in evaluating the ability of melatonin to directly regulate cyclooxygenase gene expression and activity as a possible mechanism for the modulation of the aromatase enzyme.

In disease-free breast tissue, aromatase is primarily expressed in adipose stromal fibroblasts by the relatively weak promoter I.4. However, in breast cancer tissue, aromatase promoters I.3 and II are activated, leading to a marked increase in aromatase expression in malignant epithelial cells and adipose fibroblasts. Both promoters are considered to be the major promoters driving aromatase expression in breast cancer and surrounding adipose tissue, accounting for 80–90% of total aromatase expression (Bulun *et al*, 2005; Chen *et al*, 2009). This study shows that melatonin-dependent regulation of aromatase gene expression occurs mainly through a downregulation of gene expression of the specific aromatase promoter regions pII and pI.3 in breast cancer cells. Aromatase pII was the most abundantly expressed compared with either pI.3 or pI.4, and melatonin inhibitory action was more potent on the aromatase promoter region pII. Furthermore, melatonin also decreased the aromatase promoter region's pI.4 expression in MCF-7 cells. The switch in the regulatory mechanism of aromatase expression from normal breast tissue to cancerous tissue has been extensively investigated, and it has been described that promoters II and I.3 are both regulated by cAMP and factors that regulate cAMP pathways (Bulun *et al*, 2005; Chen *et al*, 2009). One factor that has been described to regulate the activity of the aromatase enzyme through the activation of promoter II of the aromatase gene is the bioactive lipid prostaglandin E<sub>2</sub> (Díaz-Cruz *et al*, 2005; Prosperi and Robertson, 2006). A model to explain the interrelationship between aromatase and COX enzymes has been proposed. High levels of expression of COX enzymes and increased COX activity result in higher levels of PGE<sub>2</sub>. Elevated PGE<sub>2</sub> levels increase intracellular cAMP and result in an increased aromatase expression by the activation of promoters I.3 and II. The levels of PGE<sub>2</sub> in the culture medium of MCF-7 cells were low but detectable, and TPA, which is an inducer of COX enzymatic activity through the stimulation of protein kinase C activity, increased the synthesis of PGE<sub>2</sub>. Melatonin 1 nM was able to counteract significantly the stimulatory effect of TPA on PGE<sub>2</sub> production, by decreasing PGE<sub>2</sub> concentration similar to levels found in culture media of control cells. The formation of prostaglandins occurs through the activity of cyclooxygenases, rate-limiting enzymes that catalyse the conversion of arachidonic acid to prostaglandins. There are two isoforms, COX-1 and COX-2. COX-1 is constitutively expressed in most tissues and considered to generate prostaglandins for normal functions (Liu and Rose, 1996). Although COX-1 is present at a constant level in most cells and tissues, some studies have shown that COX-1 activity and expression is also elevated in human breast cancer tumours,

prostatic tumours and in squamous cell carcinomas of the oropharynx, hypopharynx and larynx (Liu and Rose, 1996; Hwang *et al*, 1998; Erovic *et al*, 2008). COX-2 is present in breast cancer tissue but not in normal breast tissue, and can undergo rapid induction in response to a variety of stimuli, including mitogens, hormones, cytokines and growth factors (Díaz-Cruz *et al*, 2005). Prostaglandins produced by COX-2, predominantly prostaglandin E<sub>2</sub>, induce inflammation and are potent mediators of a number of signal transduction pathways that are implicated in cancer development. Melatonin at physiological (1 nM) doses inhibited the expression of COX-2 in MCF-7 cells by as much as 10 times (10% of controls). The expression of COX-1 mRNA expression was also significantly reduced by melatonin by as much as four times (20% of controls). This study shows that melatonin decreases COX enzymatic activity and this inhibitory action begins at the transcriptional level by inhibiting the expression of COX-1 and, above all, COX-2. Overexpression of COX-2 has been shown to have a key effect in inflammatory disorders, tissue injury and tumourigenesis, and several endogenous molecules and natural products, such as melatonin, salicylates or polyphenols, have been reported to inhibit COX-2 expression by targeting the transcriptional activation induced by pro-inflammatory mediators (Wu, 2005). In particular, melatonin has been shown in a carrageenan-induced inflammation rat model to protect inflammatory tissue injury, and its protective effect was reported to be correlated with the suppression of COX-2 expression and COX-2-derived prostaglandins in inflamed tissues (Wu, 2005). Recently, by using computer graphics applications, it has been described that melatonin has an excellent steric and electronic effect that is complementary with COX and, therefore, it seems possible that melatonin might bind to the active site of COX-1 and COX-2, modulating the activity of this enzyme (De la Rocha *et al*, 2007). Anti-inflammatory actions of melatonin, in which this indolamine specifically prevents the activation of the COX-2 enzyme, have also been described *in vitro* in cultures of C6 glioma cells (Esposito *et al*, 2008) and in macrophages (Mayo *et al*, 2005). Melatonin at physiological (1 nM) doses reduced aromatase mRNA steady-state levels both under basal conditions and when aromatase mRNA expression was stimulated by adding PGE<sub>2</sub>. The inhibitory effect of melatonin was reverted by luzindole and cells had levels of aromatase mRNA expression similar to control cells, indicating that melatonin acts through known melatonin receptor-mediated mechanisms.

Melatonin, through a membrane-bound Gi protein-coupled receptor (MT<sub>1</sub>), downregulates cAMP in different cell types (Godson and Reppert, 1997; Kiefer *et al*, 2002). In MCF-7 cells, it has been shown that melatonin at a nanomolar concentration reduces the forskolin-induced increase of cAMP (Kiefer *et al*, 2002) and, in murine mammary tissue, melatonin decreases cAMP and increases cGMP in both a dose- and time-dependent manner (Cardinali *et al*, 1992). Furthermore, the activation of the two major promoters driving aromatase expression in breast cancer is regulated by cAMP and by factors that regulate cAMP levels (Bulun *et al*, 2005; Chen *et al*, 2009). When we compared the time course of the action of melatonin on cyclic AMP formation with the time course of melatonin on aromatase mRNA expression, we found that melatonin 1 nM elicited a time-dependent decrease in both cyclic AMP formation and aromatase mRNA expression. Furthermore, melatonin inhibition of aromatase mRNA expression is similar to that elicited by Rp-cAMP, an inhibitor of activation by cAMP, whereas melatonin counteracted the stimulatory effect of an analogue of cAMP (8-Br-cAMP).

Although promoter I.4 is less important in breast cancer, MCF-7 cells express this promoter, and melatonin 1 nM was able to decrease its expression. Promoter I.4 is regulated by a combined action of a glucocorticoid and a member of the class I cytokine family (interleukin 6, 11) (Bulun *et al*, 2005; Chen *et al*, 2009). Because it is known that melatonin represses dexamethasone-induced

activation of the glucocorticoid receptor in MCF-7 cells (Kiefer *et al*, 2005), this melatonin regulation of glucocorticoid receptor transcriptional activity could be a link between melatonin and inactivation of aromatase promoter region pI.4 expression.

Taken together, all these results demonstrate that one of the mechanisms through which melatonin can modulate aromatase enzyme in breast tumour cells is through its downregulatory action on the expression of COX enzymes, which decrease the levels of PGE<sub>2</sub>. Lower levels of PGE<sub>2</sub> decrease intracellular levels of cAMP, which in turn decrease the activation of promoters I.3 and II and result in decreased aromatase expression. Lower levels of aromatase lead to lower levels of oestrogens, resulting in decreased growth and development of breast tumour.

## REFERENCES

- Ackerman GE, Smith ME, Mendelson CR, MacDonald PC, Simpson ER (1981) Aromatization of androstenedione by human adipose tissue stromal cells in monolayer culture. *J Clin Endocrinol Metab* **53**: 412–417
- Blask DE, Hill SM (1986) Effects of melatonin on cancer: studies on MCF-7 human breast cancer cells in culture. *J Neural Transm (Suppl)* **21**: 433–449
- Blask DE, Sauer LA, Dauchy RT (2002) Melatonin as a chronobiotic/anticancer agent: cellular, biochemical and molecular mechanisms of action and their implications for circadian-based cancer therapy. *Curr Topics Med Chem* **2**: 113–132
- Bulun SE, Lin Z, Imir G, Amin S, Demura M, Yilmaz B, Martin R, Utsunomiya H, Thung S, Gurates B, Tamura M, Langoi D, Deb S (2005) Regulation of aromatase expression in estrogen-responsive breast and uterine disease: from bench to treatment. *Pharmacol Rev* **57**: 359–383
- Cardinali DP, Bonanni Rey RA, Mediavilla MD, Sánchez-Barceló EJ (1992) Diurnal changes in cyclic nucleotide response to pineal indoles in murine mammary glands. *J Pineal Res* **13**: 111–116
- Chen D, Reierstad S, Lu M, Lin Z, Ishikawa H, Bulun SE (2009) Regulation of breast cancer-associated aromatase promoters. *Cancer Lett* **273**: 15–27
- Conley A, Hinshelwood M (2001) Mammalian aromatases. *Reproduction* **121**: 685–695
- Cos S, González A, Güezmes A, Mediavilla MD, Martínez-Campa C, Alonso-González C, Sánchez-Barceló EJ (2006a) Melatonin inhibits the growth of DMBA-induced mammary tumors by decreasing the local biosynthesis of estrogens through the modulation of aromatase activity. *Int J Cancer* **118**: 274–278
- Cos S, González A, Martínez-Campa C, Mediavilla MD, Alonso-González C, Sánchez-Barceló EJ (2006b) Estrogen-signaling pathway: a link between breast cancer and melatonin oncogenic actions. *Cancer Detect Prev* **30**: 118–128
- Cos S, González A, Martínez-Campa C, Mediavilla MD, Alonso-González C, Sánchez-Barceló EJ (2008) Melatonin as a selective estrogen enzyme modulator. *Curr Cancer Drug Tar* **8**: 691–702
- Cos S, Martínez-Campa C, Mediavilla MD, Sánchez-Barceló EJ (2005) Melatonin modulates aromatase activity in MCF-7 human breast cancer cells. *J Pineal Res* **38**: 136–142
- Cos S, Sánchez-Barceló EJ (2000a) Melatonin and mammary pathological growth. *Front Neuroendocrinol* **21**: 133–170
- Cos S, Sánchez-Barceló EJ (2000b) Melatonin, experimental basis for a possible application in breast cancer prevention and treatment. *Histol Histopathol* **15**: 637–647
- De la Rocha N, Rotelli A, Aguilar CF, Pelzer L (2007) Structural basis of the anti-inflammatory activity of melatonin. *Arzneimittel-Forsch* **57**: 782–786
- Del Rio B, García-Pedrero JM, Martínez-Campa C, Zuazua P, Lazo PS, Ramos S (2004) Melatonin: an endogenous specific inhibitor of estrogen receptor  $\alpha$  via calmodulin. *J Biol Chem* **279**: 38294–38302
- Díaz-Cruz ES, Shapiro CL, Brueggemeier RW (2005) Cyclooxygenase inhibitors suppress aromatase expression and activity in breast cancer cells. *J Clin Endocrinol Metab* **90**: 2563–2570
- Erovic BM, Woegerbauer M, Pammer J, Selzer E, Grasi MCh, Thurnher D (2008) Strong evidence for up-regulation of cyclooxygenase-1 in head and neck cancer. *Eur J Clin Invest* **38**: 61–66
- Esposito E, Iacono A, Muià C, Crisafulli C, Mattace Raso G, Bramanti P, Meli R, Cuzzocrea S (2008) Signal transduction pathways involved in protective effects of melatonin in C6 glioma cells. *J Pineal Res* **44**: 78–87
- Godson C, Reppert SM (1997) The melatonin receptor is coupled to parallel signal transduction pathways. *Endocrinology* **138**: 397–404
- González A, Cos S, Martínez-Campa C, Alonso-González C, Sánchez-Mateos S, Mediavilla MD, Sánchez-Barceló EJ (2008) Selective estrogen enzyme modulator (SEEM) actions of melatonin in human breast cancer cells. *J Pineal Res* **45**: 86–92
- González A, Martínez-Campa C, Mediavilla MD, Alonso-González C, Sánchez-Mateos S, Hill SM, Sánchez-Barceló EJ, Cos S (2007) Effects of MT<sub>1</sub> melatonin receptor overexpression on the aromatase-suppressive effect of melatonin in MCF-7 human breast cancer cells. *Oncol Rep* **17**: 947–955
- Hill SM, Blask DE (1988) Effects of the pineal hormone melatonin on the proliferation and morphological characteristics of human breast cancer cells (MCF-7) in culture. *Cancer Res* **48**: 6121–6126
- Hwang D, Scollard D, Byrne J, Levine E (1998) Expression of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in human breast cancer. *J Natl Cancer Inst* **90**: 455–460
- Kiefer T, Ram PT, Yuan L, Hill SM (2002) Melatonin inhibits estrogen receptor transactivation and cAMP levels in breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* **71**: 37–45
- Kiefer TL, Lai L, Yuan L, Dong C, Burow ME, Hill SM (2005) Differential regulation of estrogen receptor alpha, glucocorticoid receptor and retinoic acid receptor alpha transcriptional activity by melatonin is mediated via different G proteins. *J Pineal Res* **38**: 231–239
- Landeghem AA, Poortman J, Nabuurs M, Thijssen JH (1985) Endogenous concentration and subcellular distribution of estrogens in normal and malignant human breast tissue. *Cancer Res* **45**: 2900–2906
- Liu X-H, Rose DP (1996) Differential expression and regulation of cyclooxygenase-1 and -2 in two human breast cancer cell lines. *Cancer Res* **56**: 5125–5127
- Mayo JC, Sainz RM, Tan D-X, Hardeland R, Leon J, Rodríguez C, Reiter RJ (2005) Anti-inflammatory actions of melatonin and its metabolites, N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine (AFMK) and N1-acetyl-5-methoxykynuramine (AMK), in macrophages. *J Neuroimmunol* **165**: 139–149
- Pasqualini JR (2004) The selective estrogen enzyme modulators in breast cancer: a review. *Biochim Biophys Acta* **1654**: 123–143
- Pasqualini JR, Chetrite GS (2005) Recent insight on the control of enzymes involved in estrogen formation and transformation in human breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* **93**: 221–236
- Prosperi JR, Robertson FM (2006) Cyclooxygenase-2 directly regulates gene expression of P450 Cyp19 aromatase promoter regions pI1, pI3 and pI7 and estradiol production in human breast tumor cells. *Prostag Oth Lipid M* **81**: 55–70
- Ram PT, Dai J, Yuan L, Dong C, Kiefer TL, Lai L, Hill SM (2002) Involvement of the MT-1 melatonin receptor in human breast cancer. *Cancer Lett* **179**: 141–150
- Ram PT, Kiefer T, Silverman M, Song Y, Brown GM, Hill SM (1998) Estrogen receptor transactivation in MCF-7 breast cancer cells by melatonin and growth factors. *Mol Cell Endocrinol* **141**: 53–64
- Russo IH, Russo J (1998) Role of hormones in mammary cancer initiation and progression. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **3**: 49–61

- Santen RJ, Harvey HA (1999) Use of aromatase inhibitors in breast carcinoma. *Endocr Relat Cancer* **6**: 75–92
- Simpson ER (2000) Role of aromatase in sex steroid action. *J Mol Endocrinol* **25**: 149–156
- Sonne-Hansen K, Lykkesfeldt AE (2005) Endogenous aromatization of testosterone results in growth stimulation of the human MCF-7 breast cancer cell line. *J Steroid Biochem Mol Biol* **93**: 25–34
- Suzuki T, Miki Y, Nakamura Y, Moriya T, Ito K, Ohuchi N, Sasano H (2005) Sex steroid-producing enzymes in human breast cancer. *Endocr-Relat Cancer* **12**: 701–720
- Wong ZW, Ellis MJ (2004) First-line endocrine treatment of breast cancer: aromatase inhibitor or antiestrogen? *Br J Cancer* **90**: 20–25
- Wu KK (2005) Control of cyclooxygenase-2 transcriptional activation by pro-inflammatory mediators. *Prostag Leukotr Ess* **72**: 89–93
- Yue W, Wang JP, Hamilton CJ, Demers LM, Santen RJ (1998) *In situ* aromatization enhances breast tumor estradiol levels and cellular proliferation. *Cancer Res* **58**: 927–932
- Zhou D, Wang J, Chen E, Murai J, Siiteri PK, Chen S (1993) Aromatase gene is amplified in MCF-7 human breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* **46**: 147–153

Las reproducciones de los siguientes artículos están autorizadas por Wiley  
[www.wiley.com](http://www.wiley.com)

## Melatonin promotes differentiation of 3T3-L1 fibroblasts

**Abstract:** Melatonin inhibits the genesis and growth of breast cancer by interfering at different levels in the estrogen-signaling pathways. Melatonin inhibits aromatase activity and expression in human breast cancer cells, thus behaving as a selective estrogen enzyme modulator. As the adipose tissue adjacent to the tumor seems to account for most aromatase expression and enzyme activity in breast tumors and also mediates the desmoplastic reaction or accumulation of undifferentiated fibroblasts around malignant epithelial cells, in this work, we studied the effects of melatonin on the conversion of preadipocytes (3T3-L1) into adipocytes and on the capability of these cells to synthesize estrogens by regulating the expression and enzyme activity of aromatase, one of the main enzymes that participates in the synthesis of estrogens in the peritumoral adipose tissue. Thus, in both differentiating and differentiated 3T3-L1 adipocytes, high concentrations of melatonin increased intracytoplasmic triglyceride accumulation, an indicator of adipogenic differentiation. Melatonin (1 mM) significantly increased the expression of both CCAAT/enhancer-binding protein  $\alpha$  and peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ , two main regulators of terminal adipogenesis, in 3T3-L1 cells. The presence of melatonin during differentiation also induced a parallel reduction in aromatase expression and activity and expression of the cells. The effects of melatonin were reversed by luzindole, a melatonin receptor antagonist, indicating that melatonin acts through known receptor-mediated mechanisms. These findings suggest that, in human breast tumors, melatonin could stimulate the differentiation of fibroblasts and reduce the aromatase activity and expression in both fibroblasts and adipocytes, thereby reducing the number of estrogen-producing cells proximal to malignant cells.

**Alicia González, Virginia Alvarez-García, Carlos Martínez-Campa, C. Alonso-González and Samuel Cos**

Department of Physiology and Pharmacology, School of Medicine, University of Cantabria, Santander, Spain

**Key words:** 3T3-L1 cells, aromatase, breast cancer, melatonin, pineal gland

Address reprint request to Dr Samuel Cos, Departamento de Fisiología y Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad de Cantabria, Cardenal Herrera Oria s/n, 39011 Santander, Spain.  
E-mail: [coss@unican.es](mailto:coss@unican.es)

Received April 20, 2011;  
Accepted May 24, 2011.

### Introduction

Estrogens have an important role in the genesis and growth of mammary tumors [1, 2]. Some breast tumors are highly responsive to estrogens for growth and contain all the enzymes responsible for the local biosynthesis of estrogens. One of the two major pathways involved in the synthesis of estrogens in breast cancer cells is the aromatase pathway, which transforms androgens into estrogens [3–5].

Melatonin, a secretory product of the pineal gland, exerts oncostatic properties on different experimental model systems including prostatic adenocarcinoma, breast cancer, pituitary tumors, leukemia, lung carcinoma, colon carcinoma, neuroblastoma, and bladder carcinoma. Oncostatic effects of melatonin have been described particularly on tumors corresponding to the mammary gland and especially on estrogen-dependent mammary tumors [6–10]. Experimental manipulations activating the pineal gland or the administration of melatonin reduce the incidence and growth rate of chemically induced mammary tumors in rodents; conversely, pinealectomy or situations that involve a reduction in melatonin production usually stimulate mammary carcinogenesis [6, 7]. Melatonin reduces the estrogen-mediated development of breast cancer on the basis of two different mechanisms: indirect neuroendocrine

mechanisms, such as the melatonin downregulation of the neuroendocrine reproductive axis and the consequent reduction in estrogenic hormones responsible for the normal and pathological growth of the mammary gland, and on the other hand, direct melatonin actions at the tumor cell level [6, 8, 11, 12]. Evidence from *in vivo* studies on animal models and *in vitro* studies on human breast cancer cell lines supports the hypothesis that melatonin's oncostatic effects on hormone-dependent mammary tumors are mainly dependent on its ability to interact with the estrogen-signaling pathway [8, 12, 13]. At the mammary tumor cell level, melatonin, on the one hand, interferes with the estrogen receptor and counteracts the effects of estrogens, thus behaving as a selective estrogen receptor modulator. Melatonin, on the other hand, is also able to regulate the activity of some enzymes responsible for the local synthesis of estrogens in human breast cancer, thus behaving as a selective estrogen enzyme modulator [13, 14]. In MCF-7 human breast cancer cells, which express aromatase [15, 16] and the MT<sub>1</sub> melatonin receptor [17, 18], melatonin, at physiological concentrations (1 nM), reduces the aromatase activity both under basal conditions and when aromatase activity is stimulated by cAMP or cortisol [19]. In addition, melatonin downregulates aromatase mRNA steady-state levels in these cells [19]. This

melatonin-dependent regulation of aromatase gene expression occurs mainly through a downregulation of gene expression of the specific aromatase promoter regions pII and pI.3 in human breast cancer cells [20]. The modulator effect of melatonin on the aromatase enzyme has also been described *in vivo*, in rats bearing dimethylbenzanthracene (DMBA)-induced mammary tumors [21].

Aromatase overexpression in breast cancer tissue has been shown to be critical, because the use of aromatase inhibitors is clearly therapeutic in breast cancer. Paracrine interactions between malignant breast epithelial cells and proximal adipose fibroblasts are responsible for estrogen biosynthesis. Adjacent adipose tissue including the dense fibroblast layer seems to account for the majority of aromatase expression in breast tumors for three reasons. First, the quantity of adjacent adipose tissue surrounding the breast tumor is very large. Second, the most intense aromatase immunostaining is observed in the adipose tissue fibroblasts located in and around the malignant cells. Third, levels of aromatase expression and activity in fibroblasts isolated from adipose tissue surrounding tumor cells are 10–15 times higher than those found in malignant epithelial cells [22]. Malignant epithelial cells secrete cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-11, IL-6) that inhibit the differentiation of surrounding adipose fibroblasts into mature adipocytes and also stimulate aromatase expression in these undifferentiated adipose fibroblasts [23]. This biological phenomenon is commonly known as the desmoplastic reaction or accumulation of undifferentiated fibroblasts with high aromatase activity around malignant epithelial cells. Thus, large numbers of estrogen-producing cells are maintained adjacent to malignant cells. This tumor-induced block in adipocyte differentiation is mediated by the selective inhibition of expression of the essential adipogenic transcription factors peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR $\gamma$ ) and CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) $\alpha$  [23].

Because it is known that melatonin downregulates aromatase activity and expression in breast cancer cells [19, 20] and because the adipose tissue adjacent to the tumor seems to account for most aromatase activity and expression in breast tumors, in this work, we studied whether melatonin interferes with the desmoplastic reaction and modulates aromatase activity and expression, one of the main enzymes that participates in the synthesis of estrogens in the peritumoral adipose tissue. To accomplish this, we used 3T3-L1 cells, one of the best-characterized and reliable models for studying the conversion of preadipocytes into adipocytes. 3T3-L1 is a murine fibroblast cell line that is initially fibroblastic but which, under appropriate conditions, differentiates into adipocytes.

## Materials and methods

### Cells and culture conditions

3T3-L1 mouse embryo fibroblasts were purchased from the American Tissue Culture Collection (Rockville, MD, USA). They were maintained as monolayer cultures in 75 cm<sup>2</sup> plastic culture flasks in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) supple-

mented with 10% fetal bovine serum (FBS) (PAA Laboratories, Pasching, Austria), penicillin (20 units/mL), and streptomycin (20  $\mu$ g/mL) (Sigma-Aldrich) at 37°C in a humid atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>. After 2 days of confluence, the cells were differentiated into the adipocyte phenotype with culture medium (10%FBS/DMEM) containing 0.5 mM isobutylmethylxanthine (IBMX), 0.25  $\mu$ M dexamethasone, and 10  $\mu$ g/mL insulin for 48 hr, followed by insulin alone for 8 additional days. To determine the effects during the course of adipocyte differentiation, melatonin (10  $\mu$ M, 100 nM, 1 nM or 10 pM) was maintained in the cell cultures during the 10-day period. To study the effects of melatonin in differentiating 3T3-L1 cells, different melatonin concentrations were added to the cell cultures at day 10 of the differentiation period and maintained for 72 hr.

### Quantitation of triglycerides by Oil Red O staining

Intracytoplasmic triglyceride accumulation was quantified using the Oil Red O staining method [24]. At the end of the experiment, 3T3-L1 differentiated cells were washed with phosphate-buffered saline (pH 7.4) twice, fixed in 10% (v/v) *p*-formaldehyde for 1/2 hr, rinsed twice in distilled water, and then, stained with Oil Red O for 2 hr. After staining, the plates were washed twice with distilled water and photographed at low magnification (20 $\times$ ). For the determinations of intracellular lipid content, the cells were washed with PBS and total lipids were extracted with isopropyl alcohol. Lipid content was measured using the colorimetric method in the spectrophotometer at 510 nm. To obtain an estimate of lipid content/viable cells, the relative fluorescence units from the Oil Red data were divided by absorbance values from the viability data measured by the MTT method, and the resulting data were expressed as percent control.

### Measurement of cellular aromatase activity

Aromatase activity in 3T3-L1 cells was measured by the tritiated water release assay, based on the formation of tritiated water during aromatization of a labeled androgenic substrate such as [ $1\beta$ -<sup>3</sup>H(N)]-androst-4-ene-3,17-dione [25]. At the end of the experiments, the 3T3-L1 cells differentiated into mature adipocytes in the presence of melatonin (1 mM, 10  $\mu$ M, 100 nM, 1 nM or 10 pM) during the course of adipocyte differentiation or those 3T3-L1 cells completely differentiated into adipocytes and exposed for 72 hr to melatonin were cultured with fresh media supplemented with 5% charcoal-stripped FBS (sFBS) and containing 100 nM [ $1\beta$ -<sup>3</sup>H(N)]-androst-4-ene-3,17-dione] (NEN Life Science Products, Boston, MA, USA) (25–30 Ci/mM) in the presence or not of melatonin (1 mM, 10  $\mu$ M, 100 nM, 1 nM, or 10 pM), luzindole 10  $\mu$ M (Sigma-Aldrich) or the diluent (ethanol at a final concentration lower than 0.0001%). At 24 hr of incubation, the culture dishes were placed on ice for 15 min to condense any water vapor and the media were transferred to tubes containing 0.25 mL ice-cold 30% trichloroacetic acid (w/v), vortexed, and centrifuged at 1700 g for 20 min. The supernatants were extracted with chloroform, vortexed,

set at room temperature for 10 min, and then, centrifuged at 1700 g for 20 min. The resulting aqueous supernatants were adsorbed with 10% dextran-coated charcoal, vortexed, centrifuged at 1700 g for 20 min, and the supernatant was added to vials with scintillation cocktail and counted in a beta counter. The amount of radioactivity in water [ $^3\text{H}$ ] measured was corrected by subtracting the blank values from each sample, obtained by incubating dishes containing medium with the tritiated androgen but no cells. The values were also corrected by taking into account the fractional retention of tritium in medium water throughout the procedure of incubation and processing, utilizing parallel dishes containing medium plus known amounts of [ $^3\text{H}$ ] water (NEN Life Science Products) through incubation and assay. The fractional retention of tritium in medium water throughout the incubation and processing of samples was always higher than 90%.

### Measurement of aromatase, PPAR $\gamma$ , and C/EBP $\alpha$ mRNA expression

Analysis of the aromatase, PPAR $\gamma$ , and C/EBP $\alpha$  mRNA expression in 3T3-L1 cells was carried out by reverse transcription RT-PCR real time after an incubation of cells with different melatonin concentrations (1 mM, 10  $\mu\text{M}$ , 100 nM, or 1 nM), luzindole (10  $\mu\text{M}$ ), or vehicle for 120 min. The total cellular RNA was purified with the Nucleospin RNA II Kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany) following the manufacturer's instructions. Integrity of RNA was assessed by electrophoresis in ethidium bromide-stained 1.2% agarose-Tris-borate EDTA gels. The absorbance ratio  $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$  was  $>1.8$ . For cDNA synthesis, 1  $\mu\text{g}$  of total RNA was denatured at 65°C for 10 min and reverse transcribed for 50 min at 45°C with cDNA Synthesis kit (Bioline, London, UK) in a final volume of 20  $\mu\text{L}$  in the presence of 500 ng of oligo (dT)12–18 primers.

Primers used for the amplification of aromatase, PPAR $\gamma$ , and C/EBP $\alpha$  (Sigma Genosys Ltd., Cambridge, UK), using the housekeeping gen GADPH, are listed in Table 1. The primers were designed so that the coding sequence between the two PCR primer sites is interrupted by at least one intron in the gene.

Real-time PCRs were performed in a MX3000 (Stratagene, La Jolla, CA, USA) using Brilliant<sup>®</sup> SYBR<sup>®</sup> Green PCR Master Mix (Stratagene), following the manufac-

turer's instructions. Amplifications were performed for 40 cycles using the following temperature profile: 55°C, 60 s (annealing); 72°C, 30 s (extension); and 95°C, 30 s (denaturation).

### Statistical analysis

The data are expressed as the mean  $\pm$  S.E.M. from six determinations. Differences were analyzed using one-way analysis of variance (ANOVA), followed by the Student-Newman-Keuls test. Results were considered as statistically significant at  $P < 0.05$ .

### Results

To determine whether melatonin modifies adipose differentiation in 3T3-L1 cells, we firstly studied the effects of melatonin maintained in the cell cultures during the course of adipose differentiation. As shown in Fig. 1A, melatonin treatment of 3T3-L1 cells during the preadipocyte differentiation enhances adipogenesis and higher doses of melatonin induce more extensive deposits of lipid droplets ( $P < 0.001$ ), an indicator of adipogenic differentiation.

To test whether melatonin increases preadipocyte differentiation without adipogenic agents such as insulin, dexamethasone, and IBMX present in the culture, we used DMEM plus 10% FBS to induce 3T3-L1 preadipocyte differentiation. Treatment of 3T3-L1 preadipocytes with 1 mM melatonin for 6 days was also able to significantly ( $P < 0.001$ ) increase lipid accumulation (Fig. 2).

Secondly, we studied the effects of melatonin on differentiated 3T3-L1 cells. Treatment of 3T3-L1 previously differentiated with 1 mM melatonin for 3 days also induced a significant ( $P < 0.001$ ) increase in the intracytoplasmic triglyceride accumulation of the cells (Fig. 3A).

Because the maintenance of the adipose phenotype depends on the expression of specific transcription factors such as C/EBP $\alpha$  and PPAR $\gamma$ , we analyzed by real-time PCR the effects of melatonin maintained in the cultures during the course of adipose differentiation on the expression of C/EBP $\alpha$  and PPAR $\gamma$ . As Fig. 4A shows, 1 mM melatonin significantly increased the expression of PPAR $\gamma$ , and this effect was reversed by treatment with GW9662, a PPAR $\gamma$  antagonist. The addition of luzindole 10  $\mu\text{M}$ , a melatonin receptor antagonist, also prevented the stimulatory effect of melatonin on PPAR $\gamma$  mRNA expression. When 3T3-L1

Table 1. Primers used for the amplification of mRNA transcripts of aromatase, C/EBP $\alpha$ , PPAR $\gamma$ , and GADPH (control)

mRNA	Sequence	bp	nM
Aromatase FW	5'-GAAGTGCCCTGCAACTACTAC-3'	171	400
Aromatase RV	5'-GCTGCAGTGCATCGGCATGC-3'		400
C/EBP $\alpha$ FW	5'-AGGTGTTGGAGTTGACCAGT-3'	224	200
C/EBP $\alpha$ RV	5'-CAGCCTAGAGATCCAGCGAC-3'		200
PPAR $\gamma$ FW	5'-GATGCACTGCCTATGAGCACTT-3'	97	400
PPAR $\gamma$ RV	5'-AGAGGTCCACAGAGCTGATTCC-3'		400
GAPDH FW	5'-CCACTCACGGCAAATTCACGGCA-3'	149	100
GAPDH RV	5'-ACCACTAGACTCCACGACATACTC-3'		100

bp, product size (base pairs); nM, primers concentration; FW, sense (forward) primer; RV, antisense (reverse) primer; PPAR $\gamma$ , peroxisome proliferator-activated receptor; C/EBP $\alpha$ , CCAAT/enhancer-binding protein  $\alpha$ .

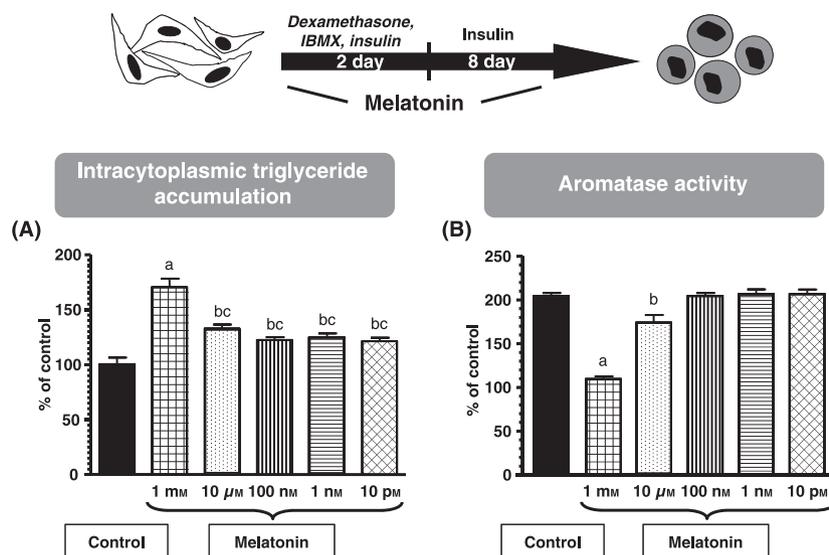


Fig. 1. Effects of melatonin (1 mM, 10 μM, 100 nM, 1 nM, or 10 pM) during the course of differentiation of 3T3-L1 cells. (A) Triglyceride accumulation was quantified using the Oil Red O staining method. Data are expressed as the percentage of the control group (mean ± S.E.M.) of six independent experiments. a,  $P < 0.001$  versus control; b,  $P < 0.01$  versus control; c,  $P < 0.001$  versus melatonin 1 mM. (B) Aromatase activity was measured by the tritiated water release assay. Data are expressed as the percentage of the control group (mean ± S.E.M.) of six independent experiments. a,  $P < 0.001$  versus control; b,  $P < 0.05$  versus control.

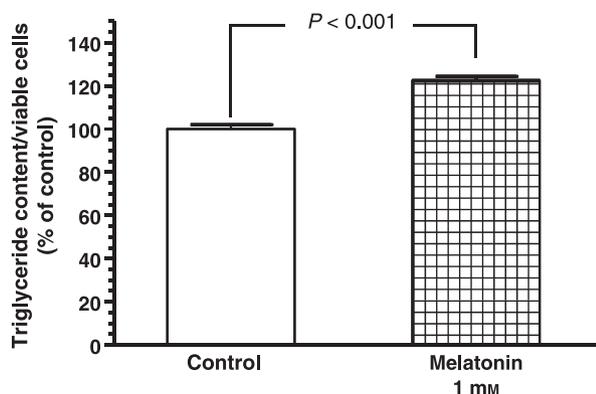


Fig. 2. Effects of melatonin (1 mM) without adipogenic agents, such as insulin, dexamethasone, and isobutylmethylxanthine, on lipid accumulation. 3T3-L1 preadipocytes were treated with 1 mM melatonin for 6 days. Data are expressed as the percentage of the control group (mean ± S.E.M.) of six independent experiments.

preadipocytes were treated with melatonin in the presence of 10 μM GW9662 during the adipose differentiation, the PPAR $\gamma$  antagonist decreased melatonin-stimulated lipid accumulation (Fig. 4B). C/EBP $\alpha$  expression was also significantly ( $P < 0.001$ ) increased by melatonin at 1 mM by 300%. However, the addition of luzindole decreased melatonin-stimulated C/EBP $\alpha$  mRNA expression (Fig. 5).

The presence of melatonin during the adipose differentiation induces a 50% reduction in the aromatase activity of the cells ( $P < 0.001$ ) at 1 mM concentration (Figs 1B and 6). The addition of 10 μM luzindole, a melatonin receptor antagonist, prevented the inhibitory effect of melatonin on aromatase activity, thus suggesting a potential involvement of melatonin receptors in these effects (Fig. 6).

Treatment of previously differentiated 3T3-L1 cells with 1 mM melatonin also showed a significant decrease ( $P < 0.001$ ) in cell aromatase activity (Fig. 3B).

Analysis of aromatase mRNA expression in 3T3-L1 cells was carried out by reverse transcription real-time RT-PCR after incubating 3T3-L1 cells with melatonin (1 mM, 10 μM, 100 nM, or 1 nM) or vehicle for 120 min. Melatonin at 1 mM, 10 μM, or 100 nM concentrations significantly reduced the aromatase mRNA expression, showing a significant 60% inhibition of the aromatase expression at 1 mM concentration (Fig. 7A). The addition of 10 μM luzindole also prevented the inhibitory effect of melatonin on aromatase mRNA expression (Fig. 7B).

## Discussion

Experimental and epidemiologic studies have pointed to a major role of estrogens in the pathogenesis of human breast cancer [1, 2, 26]. Ovaries are the main site of estrogen synthesis in premenopausal nonpregnant women. However, after menopause, local synthesis of estrogens in some tissues, including mammary tissue, acquires a special importance in mammary carcinogenesis [25]. Thus, despite the low levels of circulating estrogens in the postmenopausal period, the tissue concentrations of estrone, estradiol, and their sulfates (estrone sulfate and estradiol sulfate) in breast tumor tissue are several folds higher than those found in the plasma or in the normal mammary tissue [27–29]. The local synthesis of estrogens depends on the activity of different enzyme families (aromatase, sulfatases, etc) able to transform androgens into estrogens as well as compounds of weak estrogenic activity into more active forms [27–32].

Melatonin displays pleiotropic physiological functions including inhibition of a variety of cancer cell types [33–36].

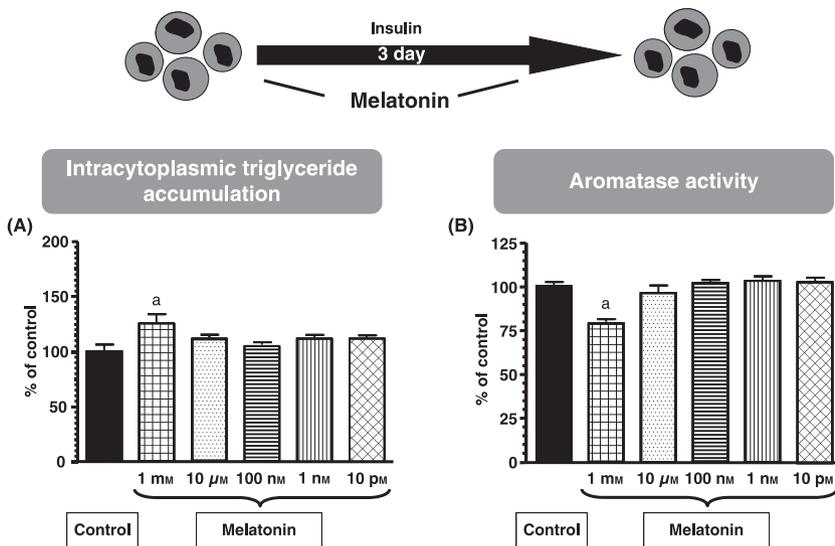


Fig. 3. Effects of melatonin on differentiating 3T3-L1 cells. (A) 3T3-L1 cells completely differentiated into adipocytes were treated with melatonin (1 mM, 10 μM, 100 nM, 1 nM, or 10 pM) for 3 days, and intracytoplasmic triglyceride accumulation was quantified. (B) Effects of melatonin on aromatase activity in differentiated 3T3-L1 cells. Data are expressed as the percentage of the control group (mean ± S.E.M.) of six independent experiments. a,  $P < 0.001$  versus control.

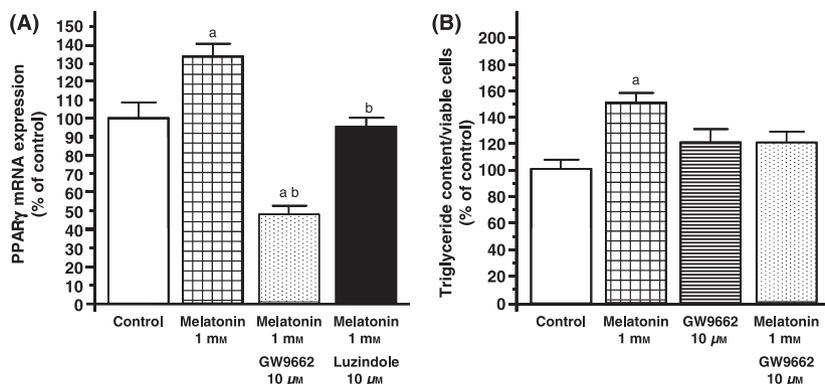


Fig. 4. (A) Effects of melatonin (1 mM), GW9662 (10 μM), a proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) antagonist, luzindole (10 μM), a melatonin receptor antagonist, and the diluent (ethanol at 0.0001% final concentration) (control) on PPAR $\gamma$  mRNA expression. Data are expressed as the percentage of control group (mean ± S.E.M.) of six independent experiments. a,  $P < 0.001$  versus control; b,  $P < 0.001$  versus melatonin 1 mM. (B) Effects of GW9662 on melatonin-induced lipid accumulation. Data are expressed as the percentage of control group (mean ± S.E.M.) of six independent experiments. a,  $P < 0.001$  versus other groups.

At present, the validity of melatonin as an oncostatic agent, more especially in hormone-dependent mammary tumors, is well established [6, 8–10, 13]. Melatonin exerts oncostatic effects on breast cancer by interacting with estradiol at the estrogen receptor level [6–8, 37–39] and by regulating the activity and the expression of some enzymes responsible for the local synthesis of estrogens [13, 19–21]. Most of the studies that have demonstrated the direct effects of melatonin on the control of the enzymes involved in the biosynthesis and transformation of estrogens were carried out on a MCF-7 human breast cancer cell line and were centered on melatonin actions on aromatase, one of the key enzymes in the local synthesis of estrogens from androgenic precursors [13, 19, 20, 40].

As we previously demonstrated that melatonin inhibits aromatase activity and expression, both in vitro in human breast cancer cells cultures [19] and in vivo in rats bearing DMBA-induced mammary tumors [21], we wanted to expand our understanding of the anti-aromatase properties

of melatonin and to assess whether melatonin also regulate the aromatase in the peritumoral tissue, particularly in the fibroblast layer surrounding malignant epithelial cells. As it is known that malignant epithelial cells secrete factors that selectively downregulate essential adipogenic factors, which inhibit the differentiation of surrounding adipose fibroblasts into mature adipocytes and also stimulate aromatase expression in these undifferentiated adipose fibroblasts increasing the number of estrogen-producing cells proximal to malignant cells [23, 31], we investigated the effects of melatonin on the conversion of preadipocytes into adipocytes and on the capability of these cells to synthesize estrogens by regulating the activity and expression of the aromatase. To accomplish this, we used 3T3-L1 cells that are initially fibroblastic but which, under appropriate conditions, differentiate into adipocytes [41] and express aromatase [42].

The present study demonstrates that melatonin may interfere in the conversion of preadipocytes into adipocytes

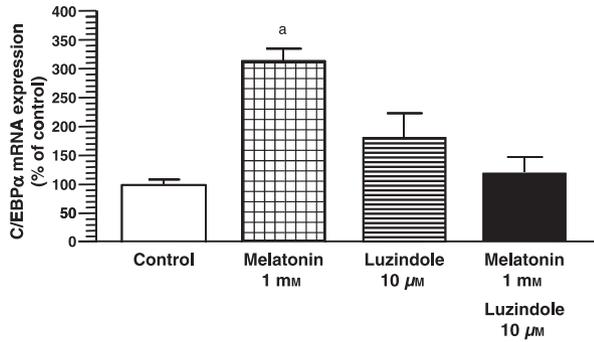


Fig. 5. Combined effects of melatonin and luzindole on CCAAT/enhancer-binding protein  $\alpha$  (c/EBP $\alpha$ ) mRNA expression. Cells were incubated with melatonin (1 mM) and/or luzindole (10  $\mu$ M) for 120 min. Total mRNA was isolated from cells and reverse transcribed. cDNA was subjected to PCR using specific primers for c/EBP $\alpha$  or GADPH. Data are expressed as the percentage of control group (mean  $\pm$  S.E.M.) of six independent experiments. a,  $P < 0.001$  versus other groups.

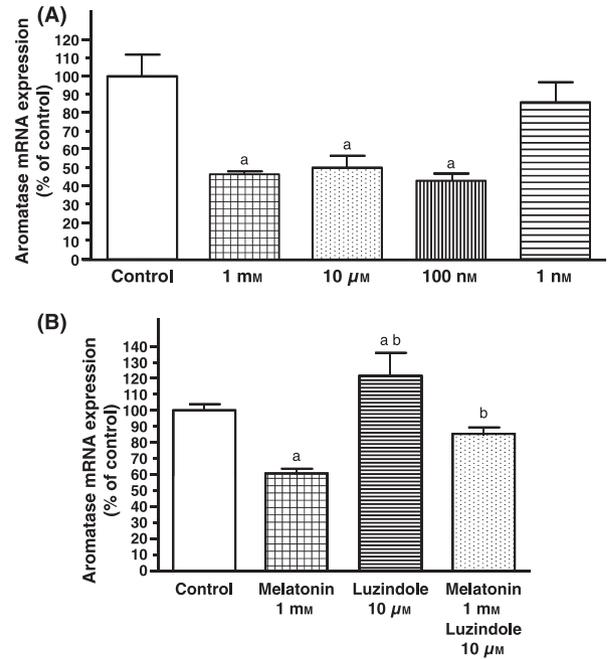


Fig. 7. (A) Effects of melatonin on the expression of aromatase mRNA in 3T3-L1 cells. Cells were incubated with melatonin (1 mM, 10  $\mu$ M, 100 nM, or 1 nM) or ethanol (control) for 120 min. Total mRNA was isolated from cells and reverse transcribed. cDNA was subjected to PCR using specific primers for P450 aromatase or GADPH. Data are expressed as the percentage of control group (mean  $\pm$  S.E.M.) of six independent experiments. a,  $P < 0.05$  versus control. (B) Effects of 1 mM melatonin, 10  $\mu$ M luzindole, or ethanol (control) on aromatase mRNA expression of 3T3-L1 cells. Data are expressed as the percentage of control group (mean  $\pm$  S.E.M.) of six independent experiments. a,  $P < 0.05$  versus control; b,  $P < 0.05$  versus melatonin 1 mM.

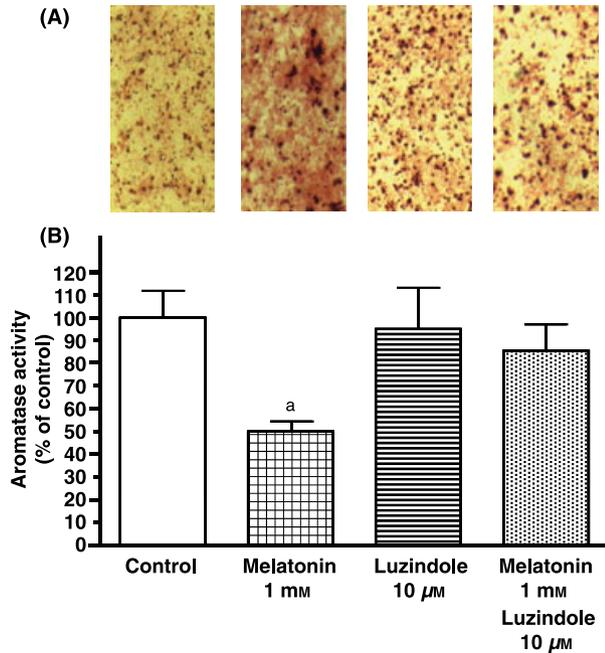


Fig. 6. (A) Oil Red O staining of 3T3-L1 cells treated with 1 mM melatonin, 10  $\mu$ M luzindole, or the diluent (ethanol at 0.0001% final concentration) (control). (B) Effects of 1 mM melatonin, 10  $\mu$ M luzindole, or the diluent (ethanol at 0.0001% final concentration) (control) on aromatase activity of 3T3-L1 cells. Data are expressed as the percentage of control group (mean  $\pm$  S.E.M.) of six independent experiments. a,  $P < 0.001$  versus other groups.

and in their aromatase activity and expression. Thus, in both differentiating and differentiated 3T3-L1 adipocytes, high concentrations of melatonin increased intracytoplasmic triglyceride accumulation, an indicator of adipogenic differentiation. Melatonin (1 mM) stimulated the adipogenesis even in the absence of adipogenic agents in the culture. Up to date, there are very few works on melatonin and adipogenesis, and they are contradictory. Maldonado et al.

[43] also describe a dose-dependent stimulatory action of melatonin in lipid droplet formation in murine fibroblasts. However, Alonso-Vale et al. [44] suggest that melatonin works as a negative regulator of adipogenesis acting in part by inhibiting the activity of a critical adipogenic transcription factor C/EBP $\beta$ . Raloxifene, a selective estrogen receptor modulator like melatonin, also promotes adipocyte differentiation of 3T3-L1 cells [45]. The conversion of fibroblasts into mature adipocytes occurs in a sequence of activation of transcription factors that regulates the expression of many proteins responsible for establishing the mature fat cell phenotype. PPAR $\gamma$  and C/EBP $\alpha$  are the two main regulators of terminal adipogenesis, and they induce the transcription of many adipocyte genes encoding proteins and enzymes involved in creating and maintaining the adipocyte phenotype [41, 46]. Here, we show that melatonin significantly increased the expression of both C/EBP $\alpha$  and PPAR $\gamma$  in 3T3-L1 cells, and the effect on PPAR $\gamma$  expression was reversed by treatment with GW9662, a PPAR $\gamma$  antagonist. The stimulatory effect of melatonin was also reverted by luzindole, a melatonin receptor antagonist, and cells had levels of C/EBP $\alpha$  and PPAR $\gamma$  mRNA expression similar to those of the control cells, indicating that melatonin acts through known melatonin receptor-mediated mechanisms.

Melatonin induces cell differentiation in different kinds of normal and tumor cells, including neuroblastoma cells [47], human breast cancer cells [8, 47–49], prostate cancer cells [50], human adult mesenchymal stem cells [51, 52], and neural stem cells [53]. In a rat osteosarcoma cell line, melatonin promotes osteoblastic differentiation and reduces oleic acid-induced triglyceride accumulation [54]. In the mammary gland, the role of melatonin as an agent that promotes differentiation has also been described in normal mammary cells that are sensitive to initiating a breast cancer [55]. In rodents, melatonin treatment decreases the development and the number of epithelial structures linked to sites of growth: terminal, lateral, and alveolar buds, highly sensitive to tumor initiation by chemical carcinogens, and in contrast, it increases the number of the epithelial structures representing the final stage of ductal growth and which are more resistant to cancer initiation by exposure to carcinogens [55].

Together with this melatonin stimulatory action on adipose differentiation, in these same cells, the presence of melatonin during differentiation also induced a parallel reduction in the aromatase activity and expression of the cells. In addition, in 3T3-L1 cells completely differentiated into adipocytes, melatonin also stimulated the accumulation of triglycerides and reduced the aromatase activity and expression.

Aromatase expression in adipose tissue is considered a marker of the undifferentiated preadipocyte phenotype [25, 56]. Consistent with this, factors known to stimulate aromatase expression in adipose tissue, such as the class I cytokines interleukin 6 and interleukin 11, as well as tumor necrosis factor- $\alpha$ , also inhibit adipocyte differentiation [23, 57, 58]. Conversely, factors that stimulate adipocyte differentiation and increase the expression of differentiation markers inhibit aromatase expression in adipose mesenchymal cells [59]. Such factors include ligands of PPAR $\gamma$  [59]. The results presented here show that this is indeed the case that melatonin stimulates the differentiation into adipocytes and adipogenesis and decreases the aromatase activity and expression of the cells. We could, then, speculate that melatonin in human breast tumors could also stimulate the differentiation of fibroblast into mature adipocytes and reduce the aromatase activity of the fibroblasts and adipocytes, which have low levels of aromatase activity in human breast tumors, thereby reducing the number of estrogen-producing cells proximal to malignant cells.

In conclusion, melatonin modulation of aromatase in peritumoral adipose tissue suggests that melatonin may play a role in the desmoplastic reaction in breast cancer. We are currently studying whether melatonin is able to regulate factors secreted by malignant epithelial cells that inhibit the differentiation of surrounding adipose fibroblasts into mature adipocytes and also stimulate aromatase activity and expression in these undifferentiated adipose fibroblasts.

## Acknowledgements

This work was supported by a grant from the Spanish MICINN (SAF2010-19579).

## References

1. RUSSO IH, RUSSO J. Role of hormones in mammary cancer initiation and progression. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 1998; **3**:49–61.
2. ORLANDO L, SCHIAVONE P, FEDELE P et al. Molecularly targeted endocrine therapies for breast cancer. *Cancer Treat Rev* 2010; **36S**:S67–S71.
3. LANDEGHEM AA, POORTMAN J, NABUURS M et al. Endogenous concentration and subcellular distribution of estrogens in normal and malignant human breast tissue. *Cancer Res* 1985; **45**:2900–2906.
4. YUE W, WANG JP, HAMILTON CJ et al. *In situ* aromatization enhances breast tumor estradiol levels and cellular proliferation. *Cancer Res* 1998; **58**:927–932.
5. SIMPSON ER. Role of aromatase in sex steroid action. *J Mol Endocrinol* 2000; **25**:149–156.
6. COS S, SÁNCHEZ-BARCELÓ EJ. Melatonin and mammary pathological growth. *Front Neuroendocrinol* 2000; **21**:133–170.
7. COS S, SÁNCHEZ-BARCELÓ EJ. Melatonin, experimental basis for a possible application in breast cancer prevention and treatment. *Histol Histopathol* 2000; **15**:637–647.
8. COS S, GONZÁLEZ A, MARTÍNEZ-CAMPA C et al. Estrogen-signaling pathway: a link between breast cancer and melatonin oncostatic actions. *Cancer Detect Prev* 2006; **30**:118–128.
9. BLASK DE, SAUER LA, DAUCHY RT. Melatonin as chronobiotic/anticancer agent: cellular, biochemical and molecular mechanisms of action and their implications for circadian-based cancer therapy. *Curr Top Med Chem* 2002; **2**:113–132.
10. HILL SM, BLASK DE. Effects of the pineal hormone melatonin on the proliferation and morphological characteristics of human breast cancer cells (MCF-7) in culture. *Cancer Res* 1988; **48**:6121–6126.
11. SÁNCHEZ-BARCELÓ EJ, COS S, FERNÁNDEZ R et al. Melatonin and mammary cancer: a short review. *Endocr Relat Cancer* 2003; **10**:153–159.
12. SÁNCHEZ-BARCELÓ EJ, COS S, MEDIIVILLA MD et al. Melatonin-estrogen interactions in breast cancer. *J Pineal Res* 2005; **38**:217–222.
13. COS S, GONZÁLEZ A, MARTÍNEZ-CAMPA C et al. Melatonin as a selective estrogen enzyme modulator. *Curr Cancer Drug Tar* 2008; **8**:691–702.
14. GONZÁLEZ A, COS S, MARTÍNEZ-CAMPA C et al. Selective estrogen enzyme modulator (SEEM) actions of melatonin in human breast cancer cells. *J Pineal Res* 2008; **45**:86–92.
15. ZHOU D, WANG J, CHEN E et al. Aromatase gene is amplified in MCF-7 human breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1993; **46**:147–153.
16. SONNE-HANSEN K, LYKKESFELDT AE. Endogenous aromatization of testosterone results in growth stimulation of the human MCF-7 breast cancer cell line. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2005; **93**:25–34.
17. RAM PT, KIEFER T, SILVERMAN M et al. Estrogen receptor transactivation in MCF-7 breast cancer cells by melatonin and growth factors. *Mol Cell Endocrinol* 1998; **141**:53–64.
18. RAM PT, DAI J, YUAN L et al. Involvement of the MT-1 melatonin receptor in human breast cancer. *Cancer Lett* 2002; **179**:141–150.
19. COS S, MARTÍNEZ-CAMPA C, MEDIIVILLA MD et al. Melatonin modulates aromatase activity in MCF-7 human breast cancer cells. *J Pineal Res* 2005; **38**:136–142.

20. MARTÍNEZ-CAMPA C, GONZÁLEZ A, MEDIAVILLA MD et al. Melatonin inhibits aromatase promoter expression by regulating cyclooxygenases expression and activity in breast cancer cells. *Br J Cancer* 2009; **101**:1613–1619.
21. COS S, GONZÁLEZ A, GÜEZMES A et al. Melatonin inhibits the growth of DMBA-induced mammary tumors by decreasing the local biosynthesis of estrogens through the modulation of aromatase activity. *Int J Cancer* 2006; **118**:274–278.
22. BULUN SE, LIN Z, IMIR G et al. Regulation of aromatase expression in estrogen-responsive breast and uterine disease: from bench to treatment. *Pharmacol Rev* 2005; **57**:359–383.
23. MENG LI, ZHOU J, SASANO H et al. Tumor necrosis factor  $\alpha$  and interleukin 11 secreted by malignant breast epithelial cells inhibit adipocyte differentiation by selectively down-regulating CCAAT/enhancer binding protein  $\alpha$  and peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ : mechanism of desmoplastic reaction. *Cancer Res* 2001; **61**:2250–2255.
24. RAMÍREZ-ZACARIAS JL, CASTRO-MUÑOZLEDO F, KURI-HARCUCH W. Quantitation of adipose conversion and triglycerides by staining intracytoplasmic lipids with oil red O. *Histochemistry* 1992; **97**:493–497.
25. ACKERMAN GE, SMITH ME, MENDELSON CR et al. Aromatization of androstenedione by human adipose tissue stromal cells in monolayer culture. *J Clin Endocrinol Metab* 1981; **53**:412–417.
26. RUSSO J, RUSSO IH. The role of estrogen in the initiation of breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2006; **102**:89–96.
27. PASQUALINI JR. The selective estrogen enzyme modulators in breast cancer: a review. *Biochim Biophys Acta* 2004; **1654**:123–143.
28. PASQUALINI JR, CHETRITTE GS. Recent insight on the control of enzymes involved in estrogen formation and transformation in human breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2005; **93**:221–236.
29. SUZUKI T, MIKI Y, NAKAMURA Y et al. Sex steroid-producing enzymes in human breast cancer. *Endocr Relat Cancer* 2005; **12**:701–720.
30. WONG ZW, ELLIS MJ. First-line endocrine treatment of breast cancer: aromatase inhibitor or antiestrogen? *Br J Cancer* 2004; **90**:20–25.
31. BULUN SE, CHEN D, LU M et al. Aromatase excess in cancers of breast, endometrium and ovary. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2007; **106**:81–96.
32. GUERRERO J, TOBAR N, CACERES M et al. Soluble factors derived from tumor mammary cell lines induce a stromal mammary adipose reversion in human and mice adipose cells. Possible role of TGF- $\beta$ 1 and TNF- $\alpha$ . *Breast Cancer Res Treat* 2010; **119**:497–508.
33. CASADO-ZAPICO S, RODRIGUEZ-BLANCO J, GARCIA-SANTOS G et al. Synergistic antitumor effect of melatonin with several chemotherapeutic drugs on human Ewing sarcoma cancer cells: potentiation of the extrinsic apoptotic pathway. *J Pineal Res* 2010; **48**:72–80.
34. PARK SY, JANG WJ, YI EY et al. Melatonin suppresses tumor angiogenesis by inhibiting HIF-1 $\alpha$  stabilization under hypoxia. *J Pineal Res* 2010; **48**:178–184.
35. CABRERA J, NEGRIN G, ESTEVEZ F et al. Melatonin decreases cell proliferation and induces melanogenesis in human melanoma SK-MEL-1 cells. *J Pineal Res* 2010; **49**:45–54.
36. JUNG-HYNES B, HUANG W, REITER RJ et al. Melatonin resynchronizes dysregulated circadian rhythm activity in human prostate cancer cells. *J Pineal Res* 2010; **49**:60–68.
37. MOLIS TM, SPRIGGS LL, HILL SM. Modulation of estrogen receptor mRNA expression by melatonin in MCF-7 human breast cancer cells. *Mol Endocrinol* 1994; **8**:1681–1690.
38. HILL SM, SPRIGGS LL, SIMON MA et al. The growth inhibitory action of melatonin on human breast cancer cells is linked to the estrogen response system. *Cancer Lett* 1992; **64**:249–256.
39. DEL RIO B, GARCÍA-PEDRERO JM, MARTÍNEZ-CAMPA C et al. Melatonin: an endogenous specific inhibitor of estrogen receptor  $\alpha$  via calmodulin. *J Biol Chem* 2004; **279**:38294–38302.
40. CHEN D, REIERSTAD S, LU M et al. Regulation of breast cancer-associated aromatase promoters. *Cancer Lett* 2009; **273**:15–27.
41. NTAMBI JM, KIM YC. Adipocyte differentiation and gene expression. *J Nutr* 2000; **130**:3122S–3126S.
42. YAMADA K, HARADA N. Expression of estrogen synthetase (P-450 aromatase) during adipose differentiation of 3T3-L1 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; **169**:531–536.
43. MALDONADO MD, SIU AW, SÁNCHEZ-HIDALGO M et al. Melatonin and lipid uptake by murine fibroblasts: clinical implications. *Neuro Endocrinol Lett* 2006; **27**:601–608.
44. ALONSO-VALE MIC, PERES SB, VERNOCHE C et al. Adipocyte differentiation is inhibited by melatonin through the regulation of c/EBP $\beta$  transcriptional activity. *J Pineal Res* 2009; **47**:221–227.
45. MURASE Y, KOBAYASHI J, NOHARA A et al. Raloxifene promotes adipocyte differentiation of 3T3-L1 cells. *Eur J Pharmacol* 2006; **538**:1–4.
46. LANE MD, TANG QQ. From multipotent stem cell to adipocyte. *Birth Defects Res A* 2005; **73**:476–477.
47. COS S, VERDUGA R, FERNÁNDEZ-VIADERO C et al. Effects of melatonin on the proliferation and differentiation of human neuroblastoma cells in culture. *Neurosci Lett* 1996; **216**:113–116.
48. CRESPO D, FERNÁNDEZ-VIADERO C, VERDUGA R et al. Interaction between melatonin and estradiol on morphological and morphometric features of MCF-7 human breast cancer cells. *J Pineal Res* 1994; **16**:215–222.
49. COS S, FERNÁNDEZ R. Melatonin effects on intercellular junctional communication in MCF-7 human breast cancer cells. *J Pineal Res* 2000; **29**:166–171.
50. SAINZ RM, MAYO JC, TAN DX et al. Melatonin reduces prostate cancer cell growth leading to neuroendocrine differentiation via a receptor and PKA independent mechanism. *Prostate* 2005; **63**:29–43.
51. RADIO NM, DOCTOR JS, WITT-ENDERBY PA. Melatonin enhances alkaline phosphatase activity in differentiating human adult mesenchymal stem cells grown in osteogenic medium via MT2 melatonin receptors and the MEK/ERK (1/2) signaling cascade. *J Pineal Res* 2006; **42**:332–342.
52. ZHANG L, SU P, XU C et al. Melatonin inhibits adipogenesis and enhances osteogenesis of human mesenchymal stem cells by suppressing PPAR $\gamma$  expression and enhancing Runx2 expression. *J Pineal Res* 2010; **49**:364–372.
53. MORIYA Y, HORIE N, MITOME M et al. Melatonin influences the proliferative and differentiative activity of neural stem cells. *J Pineal Res* 2007; **42**:411–418.
54. SANCHEZ-HIDALGO M, LU Z, TAN DX et al. Melatonin inhibits fatty acid-induced triglyceride accumulation in ROS17/2.8 cells: implications for osteoblast differentiation and osteoporosis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2007; **292**:R2208–R2215.

55. MEDIAVILLA MD, SAN MARTÍN M, SÁNCHEZ-BARCELÓ EJ. Melatonin inhibits mammary gland development in female mice. *J Pineal Res* 1992; **13**:13–19.
56. SIMPSON ER, ZHAO Y, AGARWAL VR et al. Aromatase expression in health and disease. *Rec Prog Horm Res* 1997; **52**:185–213.
57. TORTI FM, TORTI SV, LARRICK JW et al. Modulation of adipocyte differentiation by tumor necrosis factor and transforming growth factor  $\beta$ . *J Cell Biol* 1989; **108**:1105–1113.
58. KELLER DC, DU XX, SROUR EF et al. Interleukin-11 inhibits adipogenesis and stimulates myelopoiesis in human long-term marrow cultures. *Blood* 1993; **82**:1428–1435.
59. RUBIN GL, ZHAO Y, KALUS AM et al. Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  ligands inhibit estrogen biosynthesis in human breast adipose tissue: possible implications for breast cancer therapy. *Cancer Res* 2000; **60**:1604–1608.



## Melatonin interferes in the desmoplastic reaction in breast cancer by regulating cytokine production

**Abstract:** Melatonin exerts oncostatic effects on breast cancer by interfering with the estrogen signaling pathways. Melatonin inhibits aromatase enzyme in breast cancer cells and fibroblasts. In addition, melatonin stimulates the adipogenic differentiation of fibroblasts. Our objective was to study whether melatonin interferes in the desmoplastic reaction by regulating some factors secreted by malignant cells, tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , interleukin (IL)-11, and interleukin (IL)-6. To accomplish this, we co-cultured 3T3-L1 cells with MCF-7 cells. The addition of breast cancer cells to the co-cultures inhibited the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes to mature adipocytes, by reducing the intracytoplasmic triglyceride accumulation, an indicator of adipogenic differentiation, and also stimulated their aromatase activity. Melatonin counteracted the inhibitory effect on adipocyte differentiation and aromatase activity induced by MCF-7 cells in 3T3-L1 cells. The levels of cytokines in the co-culture media were 10 times those found in culture of 3T3-L1 cells alone. Melatonin decreased the concentrations of cytokines in the media and counteracted the stimulatory effect induced by MCF-7 cells on the cytokine levels. One millimolar melatonin induced a reduction in TNF- $\alpha$ , IL-6, and IL-11 mRNA expression in MCF-7 and 3T3-L1 cells. The findings suggest that melatonin may play a role in the desmoplastic reaction in breast cancer through a downregulatory action on the expression of antiadipogenic cytokines, which decrease the levels of these cytokines. Lower levels of cytokines stimulate the differentiation of fibroblasts and decrease both aromatase activity and expression, thereby reducing the number of estrogen-producing cells proximal to malignant cells.

### Introduction

Estrogens contribute to the pathogenesis of breast cancer [1–3]. The high estradiol concentrations found in some breast tumors could arise because of uptake from the circulation or from in situ synthesis. Some breast tumors are highly responsive to estrogens for growth and contain all the enzymes responsible for the local biosynthesis of estrogens. One of the two major pathways involved in the synthesis of estrogens in breast tumors is the aromatase pathway, which transforms androgens into estrogens [4–6].

Melatonin, the main secretory product of the pineal gland, has oncostatic properties in a wide variety of tumors [7–15]. Oncostatic effects of melatonin have been described in estrogen-dependent breast cancer, by interfering at different levels in the estrogen signaling pathways [9, 16, 17]. Melatonin regulates the activity of some enzymes responsible for the synthesis of estrogens in human breast cancer [18, 19]. In breast cancer cells, which express aromatase [20, 21] and the MT<sub>1</sub> melatonin receptor [22, 23], melatonin reduces the aromatase activity and down-regulates aromatase mRNA steady state levels [24, 25]. The modulator effect of melatonin on the aromatase enzyme has also been described in vivo, in rats bearing DMBA-induced mammary tumors [26]. Recently, our group demonstrated that melatonin promotes adipocyte differentiation and

induces a parallel reduction in cell aromatase activity and expression in preadipocytes [27].

Aromatase overexpression in breast cancer is critical, and the use of aromatase inhibitors is clearly therapeutic in breast cancer. Paracrine interactions between malignant epithelial cells and proximal adipose fibroblasts are responsible for local estrogen biosynthesis. Adjacent adipose tissue surrounding malignant cells seems to account for the majority of aromatase expression in breast tumors [28]. Malignant epithelial cells secrete cytokines (tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin (IL)-11, or IL-6) that inhibit the differentiation of surrounding fibroblasts into mature adipocytes and also stimulate aromatase expression in these undifferentiated fibroblasts [29]. This biological phenomenon is commonly known as the desmoplastic reaction or accumulation of undifferentiated fibroblasts with high aromatase activity around malignant epithelial cells. Thus, large numbers of estrogen-producing cells are maintained adjacent to malignant cells.

As malignant cells secrete cytokines that prevent the differentiation of fibroblasts to adipocytes and also up-regulate aromatase activity and expression in these undifferentiated fibroblasts and because melatonin stimulates the differentiation and reduces the aromatase activity and expression in fibroblasts, the focus of our study is whether melatonin interferes in the desmoplastic reaction by regulating some of

**Virginia Alvarez-García\*, Alicia González\*, Carolina Alonso-González, Carlos Martínez-Campa and Samuel Cos**

Department of Physiology and Pharmacology, School of Medicine, University of Cantabria, Santander, Spain

**Key words:** melatonin, pineal gland, breast cancer, aromatase, 3T3-L1 cells, tumor necrosis factor- $\alpha$ , interleukins

Address reprint requests to Samuel Cos, Departamento de Fisiología y Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad de Cantabria, Cardenal Herrera Oria s/n, 39011 Santander, Spain.  
E-mail: coss@unican.es

\*These authors contributed equally to the development of this work.

Received October 3, 2011;  
Accepted November 2, 2011.

these cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-11, or IL-6) secreted by malignant epithelial cells.

## Materials and methods

### Cells and culture conditions

MCF-7 human breast cancer cells were purchased from the American Tissue Culture Collection (Rockville, MD, USA). They were maintained as monolayer cultures in 75-cm<sup>2</sup> plastic culture flasks in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (PAA Laboratories, Pasching, Austria), penicillin (20 units/mL), and streptomycin (20  $\mu$ g/mL) (Sigma-Aldrich) at 37°C in a humid atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>. 3T3-L1 mouse embryo fibroblasts were purchased from the American Tissue Culture Collection (Rockville). They were maintained as monolayer cultures in 75-cm<sup>2</sup> plastic culture flasks in DMEM supplemented with 10% FBS, penicillin (20 units/mL), and streptomycin (20  $\mu$ g/mL) at 37°C in a humid atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>. After 2 days of confluence, the cells were differentiated to the adipocyte phenotype with culture medium (10% FBS/DMEM) containing 0.5 mM isobutylmethylxanthine, 0.25  $\mu$ M dexamethasone, and 10  $\mu$ g/mL insulin for 48 hr, followed by insulin alone for eight additional days.

### Co-culture of 3T3-L1 fibroblasts and MCF-7 cells as an in vitro breast cancer model

3T3-L1 cells were co-cultured together with MCF-7 cells using Falcon 24-multiwell plates and Falcon cell culture inserts (Fig. 1A). Preadipocytes were plated ( $12 \times 10^3$  cells/well) on the bottom wells. MCF-7 cells were seeded ( $5 \times 10^3$  cells) on the permeable membrane (0.45  $\mu$ m) tissue-culture inserts. 3T3-L1 cells were cultured in DMEM supplemented with 10% FBS for 24 hr. At this time, inserts containing MCF-7 cells were introduced and the medium was changed to the appropriate differentiation medium for 48 hr with melatonin (1 mM) and/or estradiol (10 nM) or vehicle. Then, the medium was switched back to DMEM plus 10% FBS and insulin for 8 days with melatonin (1 mM) and/or estradiol (10 nM) or vehicle. At the end of the experiments, 3T3-L1 differentiated cells in the bottom plate were evaluated for differentiation to mature adipocytes (quantitation of triglycerides by Oil Red O staining method), for proliferative indices (MTT method) or for aromatase activity.

### Quantitation of triglycerides by oil red O staining

Intracytoplasmic triglyceride accumulation was quantified using the Oil Red O staining method [30]. At the end of the experiment, the differentiated 3T3-L1 cells were washed with phosphate-buffered saline (pH 7.4) twice, fixed in 10% (vol/vol) p-formaldehyde for 1/2 hr, rinsed two times in distilled water, and then stained with Oil Red O for 2 hr. After staining, the plates were washed twice with distilled water and photographed at low magnification (20 $\times$ ). For determinations of intracellular lipid content, the cells were washed with PBS and total lipids were extracted with isopropyl alcohol.

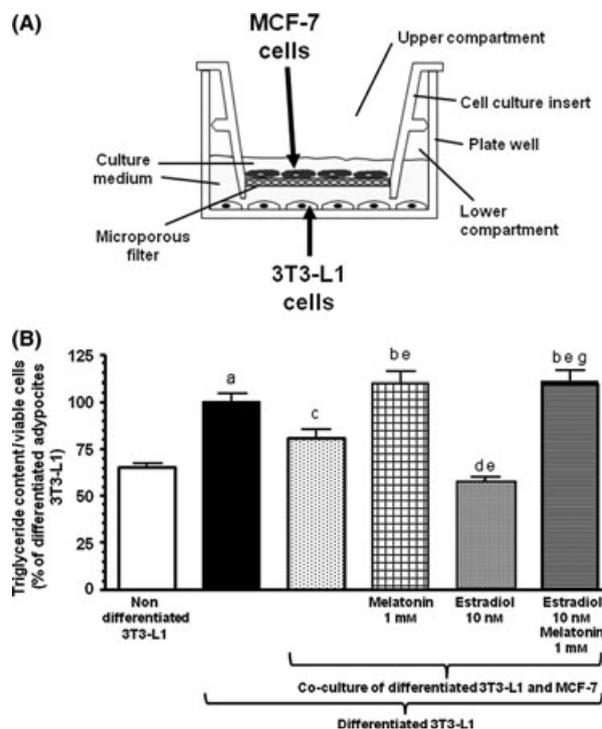


Fig. 1. (A) Schematic representation of the Falcon 24-multiwell plates and Falcon cell culture inserts used in the co-cultures. (B) Effects of melatonin (1 mM) and estradiol (10 nM) on intracytoplasmic triglyceride accumulation in 3T3-L1 cells during the course of differentiation, in the presence or not of breast cancer cells (MCF-7). Data are expressed as the percentage of the differentiated 3T3-L1 cells (mean  $\pm$  S.E.M.). a,  $P < 0.01$  versus nondifferentiated cells; b,  $P < 0.001$  versus nondifferentiated cells; c,  $P < 0.05$  versus differentiated 3T3-L1 cells; d,  $P < 0.001$  versus differentiated 3T3-L1 cells; e,  $P < 0.001$  versus differentiated 3T3-L1 cells co-cultured with MCF-7 cells; f,  $P < 0.001$  versus differentiated 3T3-L1 cells co-cultured with MCF-7 cells and melatonin; g,  $P < 0.001$  versus differentiated 3T3-L1 cells co-cultured with MCF-7 cells and estradiol.

Lipid content was measured using colorimetric method in a fluorescence microplate reader FLX800 (Biotek, Bad Friedrichshall, Germany) at 510 nm. To obtain an estimate of lipid content/viable cells, the relative fluorescence units from the Oil Red data were divided by absorbance values from the viability data measured by the MTT method, and the resulting data were expressed as percent control.

### Measurement of cellular proliferation

Cell proliferation was measured by the MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] method [31], reading absorbance at 570 nm in a microplate reader (Labsystems Multiskan RC 351; Vienna, VA, USA). MTT was obtained from Molecular Probes Inc. (Eugene, OR, USA).

### Measurement of cellular aromatase activity

Aromatase activity in 3T3-L1 cells was measured by the tritiated water release assay, based on the formation of tritiated water during aromatization of a labeled androgenic

substrate such as [ $1\beta$ - $^3\text{H}$ (N)]-androst-4-ene-3,17-dione [32]. At the end of the experiments, 3T3-L1 cells differentiated into mature adipocytes and co-cultured with breast cancer cells in the presence of melatonin (1 mM) and/or estradiol (10 nM), during the adipocyte differentiation, were cultured with fresh media supplemented with 5% charcoal-stripped FBS and containing 100 nM [ $1\beta$ - $^3\text{H}$ (N)]-androst-4-ene-3,17-dione] (NEN Life Science Products, Boston, MA, USA) (25-30 Ci/mM) in the presence of melatonin (1 mM) and/or estradiol (10 nM) or the diluent (ethanol < 0.0001%). At 24 hr of incubation, the dishes were placed on ice for 15 min to condense any water vapor, and the media were transferred to tubes containing 0.25 mL ice-cold 30% trichloroacetic acid (wt/vol), vortexed, and centrifuged at 1700× g for 20 min. The supernatants were extracted with chloroform, vortexed, set at room temperature for 10 min, and then centrifuged at 1700× g for 20 min. The resulting aqueous supernatants were adsorbed with 10% dextran-coated charcoal, vortexed, centrifuged at 1700× g for 20 min., and the supernatant added to vials with scintillation cocktail and counted in a beta counter Beckman LS 6000 C (Fulleton, CA, USA). The amount of radioactivity in the water [ $^3\text{H}$ ] measured was corrected by subtracting the blank values from each sample, obtained by incubating dishes containing medium with the tritiated androgen but no cells. The values were also corrected by taking into account the fractional retention of tritium in medium water throughout the procedure of incubation and processing, utilizing parallel dishes containing medium plus known amounts ( $1 \times 10^5$  dpm) of [ $^3\text{H}$ ] water (NEN Life Science Products, Boston, MA, USA) through incubation and assay. The fractional retention of tritium in medium water throughout the incubation and processing of samples was always higher than 90%.

### Measurement of TNF- $\alpha$ , IL-6, and IL-11 mRNA expression

Analysis of the TNF- $\alpha$ , IL-6, and IL-11 mRNA expression in MCF-7 and 3T3-L1 cells was carried out by real-time

RT-PCR after an incubation of cells with melatonin (1 mM), luzindole (10  $\mu\text{M}$ ), or vehicle for 120 min. The total cellular RNA was purified with the Nucleospin RNA II Kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany) following the manufacturer's instructions. Integrity of RNA was assessed by electrophoresis in ethidium bromide-stained 1.2% agarose-Tris-borate EDTA gels. The absorbance ratio  $A_{260 \text{ nm}}/A_{280 \text{ nm}}$  was > 1.8. For cDNA synthesis, 1  $\mu\text{g}$  of total RNA was denatured at 65°C for 10 min and reverse transcribed 50 min at 45°C with cDNA Synthesis Kit (Biolone, London, UK) in a final volume of 20  $\mu\text{L}$  in the presence of 500 ng of oligo (dT)12–18 primer.

Primers used for amplification of TNF- $\alpha$ , IL-6, and IL-11 (Sigma Genosys Ltd, Cambridge, UK), using the house-keeping genes GAPDH (3T3-L1 cells) and S14 (MCF-7 cells), are listed in Table 1. The primers were designed so that the coding sequence between the two PCR primer sites is interrupted by at least one intron in the gene.

Real-time PCRs were performed in a MX3000 (Stratagene, La Jolla, CA, USA) using Brilliant<sup>®</sup> SYBR<sup>®</sup> Green PCR Master Mix (Stratagene) following the manufacturer's instructions. Amplifications were performed for 40 cycles using the following temperature profile: 55°C, 45 s (annealing); 72°C, 30 s (extension); and 95°C, 30 s (denaturation).

### Measurement of TNF- $\alpha$ , IL-6, and IL-11 levels

For the determination of TNF- $\alpha$ , IL-6, and IL-11 concentrations in cell co-culture media, TNF- $\alpha$ , IL-6, and IL-11 ELISA Immunoassay Kits (R&D Systems Europe Ltd, Abingdon, UK) were used. The samples (in triplicate) were processed according to the supplier's instructions. In some experiments, 1 nM phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) was added to the co-culture to induce the production of IL-6 [33]. Then, media (six plates per group) were collected, centrifuged to remove particulates, and processed immediately according to the supplier's instructions. At the end of the procedure, absorbance was immediately determined at a wavelength of 450 nm, with corrections at 540 nm.

Table 1. Primers used for amplification of mRNA transcripts of mouse TNF- $\alpha$ , interleukin-6, interleukin-11, GAPDH (control) and human TNF- $\alpha$ , interleukin-6, interleukin-11, s14 (control)

mRNA	Sequence	bp	nM
mTNF $\alpha$ FW	5'-CCTCCCTCTCATCAGTTCTA-3'	102	200
mTNF $\alpha$ RV	5'-ACTTGGTGGTTTGTCTACGAC-3'		200
mIL-6 FW	5'-ACAACCACGGCCTTCCCTACTT-3'	129	200
mIL-6 RV	5'-CAGGATTTCCAGCGAACATGTG-3'		200
mIL-11 FW	5'-GAAGTCTAGCTCGCCAACC-3'	170	200
mIL-11 RV	5'-CAGCTATCGTCAACATCATGG-3'		200
mGAPDH FW	5'-CCACTCACGGCAAATTC AACCGG-3'	149	100
mGAPDH RV	5'-ACCAGTAGACTCCACGACATACTC-3'		100
hTNF $\alpha$ FW	5'-TGGGGTTTGTGAAACTGTGA-3'	121	50
hTNF $\alpha$ RV	5'-GTTCTGCACATTCCTCTC-3'		50
hIL-6 FW	5'-AGGAGACTTGCTGGTGGAAA-3'	180	200
hIL-6 RV	5'-CAGGGGTGGTTATTGCATCT-3'		200
hIL-11 FW	5'-GCTGGTTTCGAACTCCTGAC-3'	137	200
hIL-11 RV	5'-CAGGGTGA CTTGTGG AACCT-3'		200
hs14 FW	5'-TCCTGCGAGTGTCTGTCAGAG-3'	159	200
hs14 RV	5'-TCACCGCCCTACACATCAAAC-3'		200

bp, product size (base pairs); nM, primers concentration; FW, sense (forward) primer; RV, antisense (reverse) primer; TNF- $\alpha$ ; tumor necrosis factor- $\alpha$ .

## Statistical analysis

The data are expressed as the mean  $\pm$  standard errors of the mean (S.E.M.). Differences were analyzed by using one-way analysis of variance (ANOVA), followed by the Student–Newman–Keuls test. Results were considered as statistically significant at  $P < 0.05$ .

## Results

To study the effects of melatonin on adipogenesis and aromatase activity in 3T3-L1 cells co-cultured with breast cancer cells, we first determined whether the presence of malignant epithelial cells in the culture affects the adipocyte differentiation of 3T3-L1 cells. Indeed, we observed that breast cancer cells induce a significant inhibition of differentiation of 3T3-L1 preadipocytes (Fig. 1B). The presence of MCF-7 cells in the co-culture reduced by 20% the triglyceride content of 3T3-L1 cells, an indicator of adipogenic differentiation. The addition of 1 mM melatonin significantly counteracted the inhibitory effect of MCF-7 cells on adipocyte differentiation, and 3T3-L1 cells had an intracytoplasmic triglyceride content similar to control differentiated cells. 10 nM estradiol significantly ( $P < 0.001$ ) increased the inhibition of differentiation of 3T3-L1 cells induced by the presence of malignant cells. 1 mM of melatonin counteracted the inhibitory effect induced by breast cancer cells and estradiol on 3T3-L1 differentiation, and the simultaneous administration of melatonin and estradiol resulted in a significantly ( $P < 0.001$ ) higher triglyceride content than that of the only estradiol-treated cells and that of 3T3-L1 cells co-cultured with MCF-7 cells and similar to control differentiated 3T3-L1 cells (Fig. 1B).

The presence of breast cancer cells in the cultures also induced a significant ( $P < 0.001$ ) stimulation of aromatase activity of 3T3-L1 cells. 1 mM of melatonin significantly ( $P < 0.001$ ) counteracted the stimulatory effect of the presence of malignant epithelial cells on adipocyte aromatase activity (Fig. 2). 10 nM of estradiol alone or with 1 mM of melatonin also decreased the stimulatory effect of MCF-7 cells on aromatase activity of 3T3-L1 cells.

Secondly, we studied the effects of melatonin on the expression of TNF- $\alpha$ , IL-6, and IL-11. Melatonin at a concentration of 1 mM significantly ( $P < 0.01$ ) induced a reduction in the TNF- $\alpha$ , IL-6, and IL-11 mRNA expression in MCF-7 (Fig. 3) and 3T3-L1 (Fig. 4) cells. Luzindole at a concentration of 10  $\mu$ M, a melatonin receptor antagonist, prevented this inhibitory effect of melatonin on cytokine expression.

Finally, we studied the effects of melatonin on TNF- $\alpha$ , IL-6, and IL-11 concentrations in cell culture media. The levels of TNF- $\alpha$ , IL-6, and IL-11 in culture media of only fibroblasts were low. However, TNF- $\alpha$ , IL-6, and IL-11 concentrations in co-culture media of 3T3-L1 and MCF-7 cells were 10 times those found in the culture of only 3T3-L1 cells. In all the cytokines studied, the addition of 1 mM melatonin to the co-cultures significantly ( $P < 0.001$ ) decreased the concentrations of TNF- $\alpha$ , IL-6, and IL-11 in the media and counteracted the stimulatory effect induced by the presence of the breast cancer cells on the

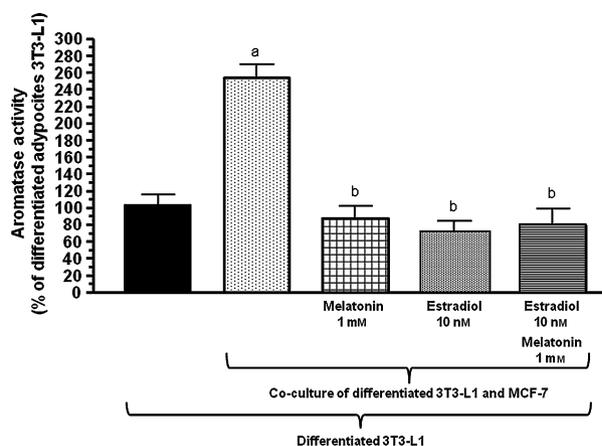


Fig. 2. Effects of melatonin (1 mM) and estradiol (10 nM) on aromatase activity of 3T3-L1 cells during the course of differentiation, in the presence or not of breast cancer cells (MCF-7). Data are expressed as the percentage of the differentiated 3T3-L1 cells (mean  $\pm$  S.E.M.). a,  $P < 0.001$  versus differentiated 3T3-L1 cells; b,  $P < 0.001$  versus differentiated 3T3-L1 cells co-cultured with MCF-7 cells.

cytokine levels (Fig. 5). PMA strongly increased IL-6 levels. 1 mM melatonin was able to significantly counteract ( $P < 0.001$ ) the stimulatory effect of PMA on IL-6 production by decreasing the IL-6 concentration to levels similar to those found in culture media of fibroblasts (Fig. 5).

## Discussion

The local synthesis of estrogens in breast cancer depends on paracrine interactions between malignant breast epithelial cells and proximal fibroblasts [28, 34–39]. At present, the role of melatonin in the regulation of cancer cell growth, more especially in estrogen-dependent mammary tumors, is well established [7–16, 40–42]. Melatonin inhibits aromatase activity and expression in breast cancer cells and fibroblasts [24, 27]. On the other hand, melatonin stimulates the adipogenic differentiation of fibroblasts [27]. Thus, our objective was to study whether melatonin interferes in the desmoplastic reaction by regulating some of the factors secreted by malignant epithelial cells that inhibit the differentiation of fibroblasts and regulate the aromatase enzyme in fibroblasts and malignant epithelial cells. To accomplish this, we co-cultured 3T3-L1 cells, a fibroblast cell line that is initially fibroblastic but which, under appropriate conditions, differentiates into adipocytes [43] and they express aromatase [44] with MCF-7 cells.

The addition of MCF-7 cells to the co-cultures induced a significant inhibition of differentiation of preadipocytes to adipocytes and reduced the intracytoplasmic triglyceride accumulation, an indicator of adipogenic differentiation. The presence of MCF-7 cells also stimulated the aromatase activity in 3T3-L1 cells. These findings are consistent with other authors who reported that conditioned medium of breast cancer cells strongly inhibits differentiation of 3T3-L1 preadipocytes into adipocytes and induces aromatase expression [28, 29, 37]. Melatonin counteracted the inhib-

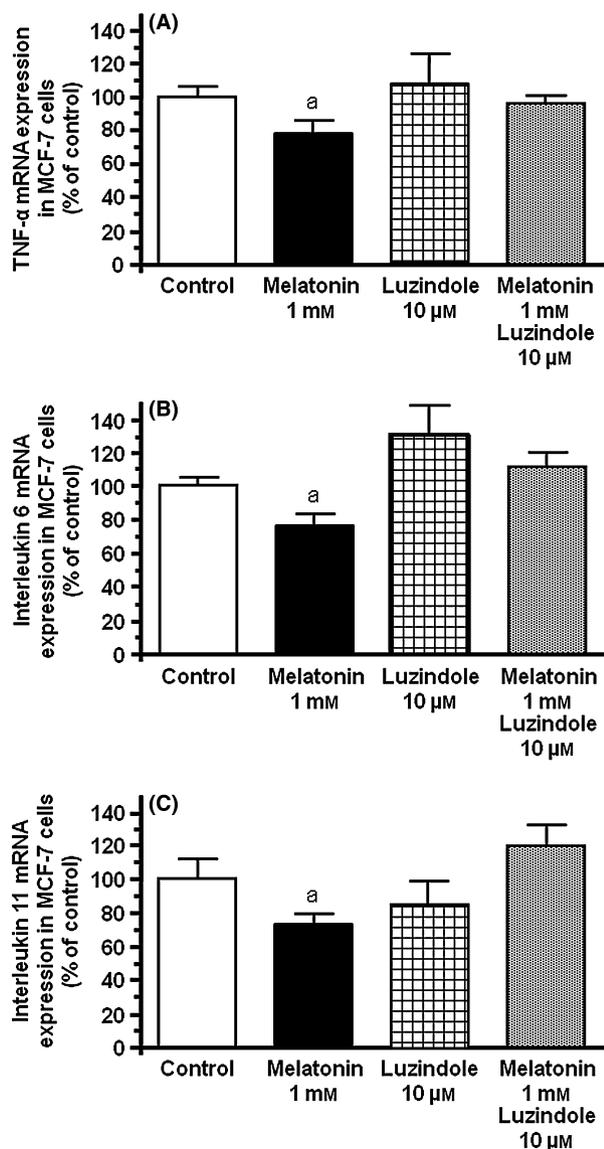


Fig. 3. Effects of melatonin, luzindole, or ethanol (control) on TNF- $\alpha$  (A), IL-6 (B), and IL-11 (C) mRNA expression in MCF-7 cells. Cells were incubated with melatonin (1 mM), luzindole (10  $\mu$ M), or ethanol (control) for 120 min. Total mRNA was isolated from cells and reverse transcribed. cDNA was subjected to PCR using specific primers for TNF- $\alpha$ , IL-6, and IL-11 or S14. Data are expressed as the percentage of the control group (mean  $\pm$  S.E.M.). a,  $P < 0.01$  versus other groups.

itory effect on adipocyte differentiation induced by MCF-7 cells, and 3T3-L1 cells had a triglyceride content similar to control differentiated cells and also counteracted the stimulatory effect of the presence of breast cancer cells on aromatase activity in 3T3-L1 cells. Melatonin induction of cell differentiation has been demonstrated in different normal and tumor cells including neuroblastoma [45], human breast cancer [11, 46, 47], prostate cancer [48], human adult mesenchymal stem [49, 50], neural stem [51], osteosarcoma [52], and adipose fibroblasts [27]. In addition, our group has recently demonstrated that the expression of PPAR $\gamma$  and C/EBP $\alpha$ , the two main regulators of terminal

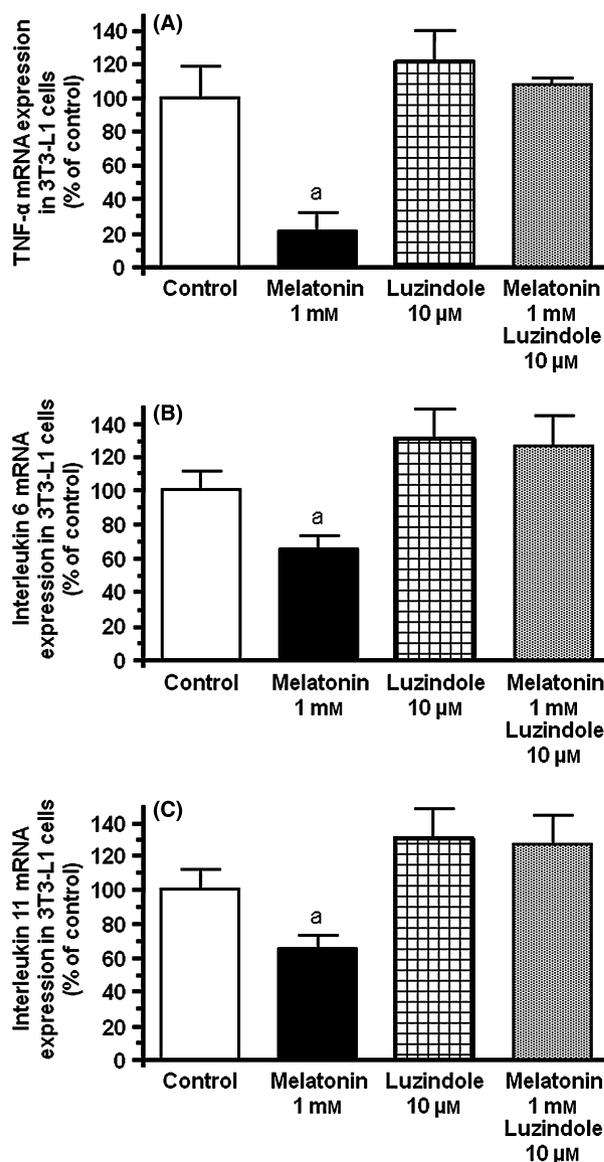


Fig. 4. Effects of melatonin, luzindole, or ethanol (control) on TNF- $\alpha$  (A), IL-6 (B), and IL-11 (C) mRNA expression in 3T3-L1 cells. Cells were incubated with melatonin (1 mM), luzindole (10  $\mu$ M), or ethanol (control) for 120 min. Total mRNA was isolated from cells and reverse transcribed. cDNA was subjected to PCR using specific primers for TNF- $\alpha$ , IL-6, and IL-11 or GAPDH. Data are expressed as the percentage of the control group (mean  $\pm$  S.E.M.). a,  $P < 0.001$  versus other groups.

adipogenesis [43, 53], is also increased by melatonin in 3T3-L1 cells [27]. The addition of estradiol to the co-cultures increased the inhibition of differentiation of 3T3-L1 cells induced by the presence of MCF-7 cells. It is known that estrogens potentiate this antiadipogenic action by increasing mRNA levels of IL-11 and inducing TNFR1 levels in fibroblasts, the receptor responsible for inhibition of adipocyte differentiation in breast cancer induced by TNF- $\alpha$  [37]. Estradiol also decreased the stimulatory effect of MCF-7 cells on aromatase activity of 3T3-L1 cells. The antiaromatase effect of estradiol has been previously described and suggests a negative feedback of estradiol for the control of its intracellular concentration [54, 55].

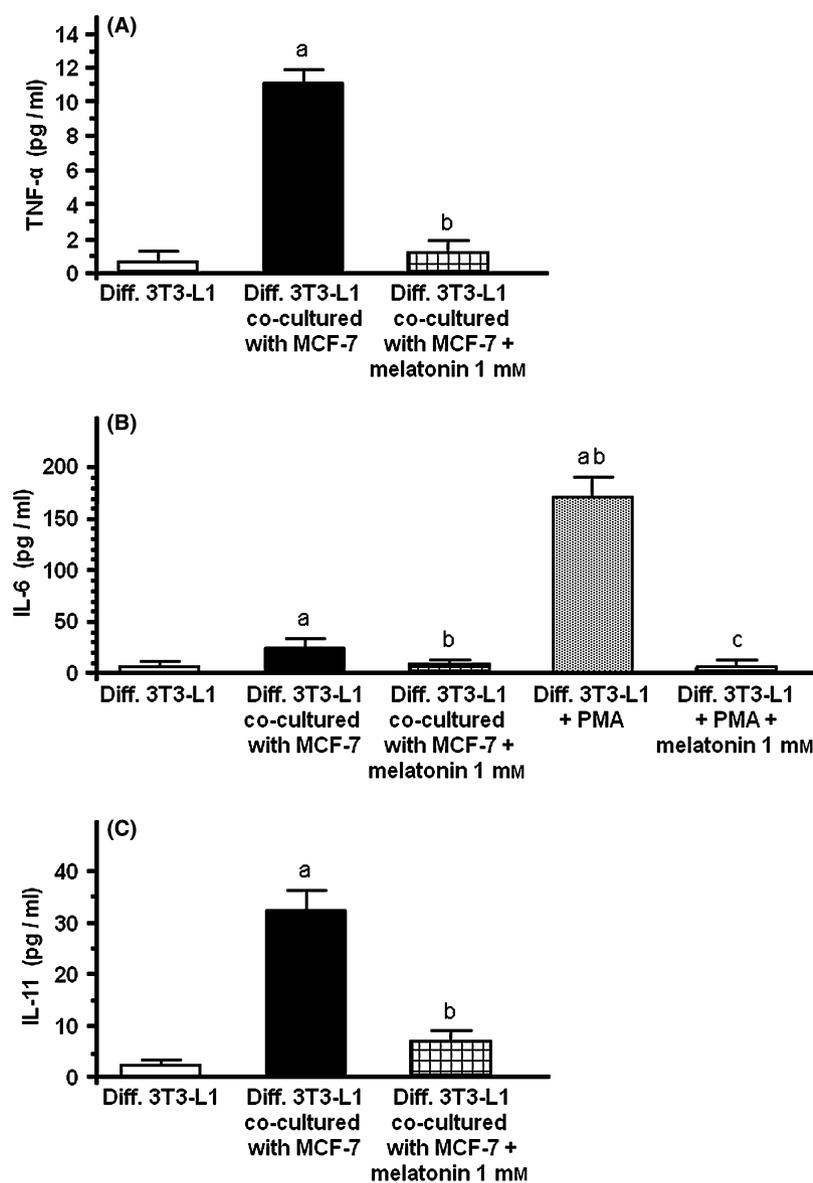


Fig. 5. Levels of TNF- $\alpha$  (A), IL-6 (B), and IL-11 (C) in cell co-culture media determined by ELISA Immunoassay Kits. Preadipocytes 3T3-L1 cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) for 24 hr on Falcon 24-multiwell plates. Then, Falcon cell culture inserts containing MCF-7 cells were introduced, and the medium was changed to the appropriate differentiation medium for 48 hr in the presence of melatonin (1 mM) or vehicle. Then the medium was switched back to DMEM plus 10% FBS and insulin for 8 days in the presence of melatonin (1 mM) or vehicle. In IL-6 experiments, 1 nM phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) was also added to some plates during the 10-day period. Then, the cell culture media were collected, centrifuged, and processed immediately according to the supplier's instructions. a,  $P < 0.001$  versus differentiated 3T3-L1 cells; b,  $P < 0.001$  versus differentiated 3T3-L1 cells co-cultured with MCF-7 cells; c,  $P < 0.001$  versus differentiated 3T3-L1 cells and PMA.

It is known that cytokines secreted by malignant cells inhibit the differentiation of fibroblasts to adipocytes and stimulate their aromatase expression [28, 29, 37, 56–58]. The levels of TNF- $\alpha$ , IL-6, and IL-11 in the co-culture media were 10 times those found in cultures of 3T3-L1 alone. The addition of melatonin to the co-cultures decreased the concentrations of TNF- $\alpha$ , IL-6, and IL-11 in the media and counteracted the stimulatory effect induced by the presence of malignant cells on the cytokine levels. Melatonin also induced a reduction in the TNF- $\alpha$ , IL-6, and IL-11 mRNA expression in MCF-7 and 3T3-L1

cells. The addition of luzindole, a melatonin receptor antagonist, prevented this inhibitory effect of melatonin on cytokine expression, indicating that melatonin acts through known melatonin receptor-mediated mechanisms.

Interleukin-6 is an inducer of an epithelial–mesenchymal transition phenotype in breast cancer cells, such as impaired E-cadherin expression or aberrant vimentin induction, and implicates its potential to promote breast cancer [59]. Our group previously observed [60] that melatonin shifts MCF-7 cells to a lower invasive status by increasing the  $\beta_1$  integrin subunit and E-cadherin expression and promoting

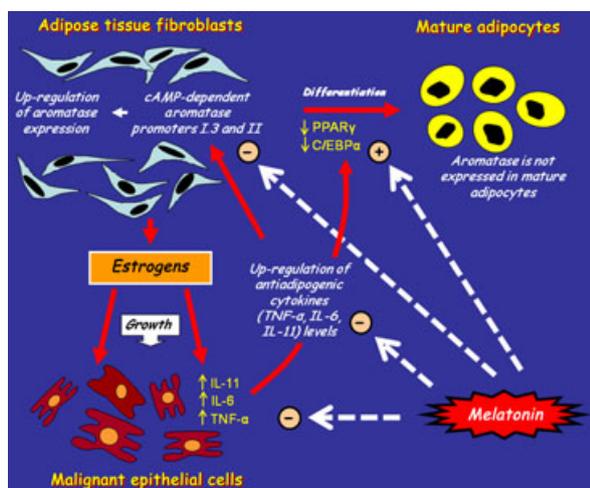


Fig. 6. Epithelial-stromal interactions in breast tumors inhibit adipogenic differentiation and enhance estrogen formation by increasing the aromatase activity of the undifferentiated fibroblasts. All these actions are mediated by cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-6, and IL-11) produced by breast cancer cells. Melatonin interferes in the desmoplastic reaction by decreasing the formation of the undifferentiated fibroblasts, by stimulating the differentiation of fibroblasts to mature adipocytes and adipogenesis, and by decreasing the aromatase activity of the fibroblasts and adipocytes through a downregulatory action on the expression of antiadipogenic cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-6, and IL-11).

the differentiation of tumor cells. The reduction of IL-6 production by epithelial malignant cells induced by melatonin may also contribute toward explaining these melatonin anti-invasive actions. Inhibitory effects of melatonin on the production and expression of TNF- $\alpha$ , IL-6, and IL-11 have also been recently described in other kinds of cells, such as microglial cell lines [61] and macrophages [62, 63].

Cytokines, growth factors, and PGE<sub>2</sub> also have crucial roles in regulating estrogen synthesis in breast tumors. IL-6, IL-11, and TNF- $\alpha$  stimulate the activities of all the enzymes involved in estrogen synthesis [34, 38]. Alternatively, it has been postulated that IL-6 and/or TNF- $\alpha$  may affect membrane permeability, thereby increasing substrate availability and hence enzyme activity [38]. Macrophages and lymphocytes, which invade many breast tumors, are thought to be an important source of factors that can stimulate estrogen synthesis in malignant breast tissue. As melatonin modulates cytokine production in immunocompetent cells [64] and adipose cells, as shown in this work, the actions of melatonin on cytokine production in breast tumors may also be a mechanism that possibly modulates the activity and expression of the enzymes involved in tumor estrogen synthesis.

To our knowledge, the present findings are the first to establish the role of melatonin in the desmoplastic reaction in breast cancer. Fig. 6 depicts the epithelial-stromal interaction via estrogen and cytokines in breast cancer and the possible mechanisms through which melatonin interferes in the desmoplastic reaction. In summary, melatonin reduces the formation of the undifferentiated fibroblast layer surrounding malignant epithelial cells by stimulating the differentiation of fibroblasts to mature adipocytes and adipogenesis and by decreasing the aroma-

tase activity of the fibroblasts and adipocytes through a downregulatory action on the expression of antiadipogenic cytokines, which decreases the levels of these cytokines. Lower levels of TNF- $\alpha$ , IL-6, and IL-11 stimulate the differentiation of fibroblasts and decrease the aromatase activity and expression. Lower levels of aromatase lead to lower levels of estrogens, resulting in decreased growth and development of breast tumors.

## Acknowledgements

This work was supported by a grant from the Spanish MICINN (SAF2010-19579).

## Author contributions

Virginia Alvarez-García conceived and carried out co-culture experiments, measurement of cytokine levels in culture media, and measurement of TNF- $\alpha$ , IL-6, and IL-11 in MCF-7 cells. Alicia González conceived and carried out experiments on the expression of TNF- $\alpha$ , IL-6, and IL-11 in 3T3-L1 cells. Carlos Martínez-Campa and Carolina Alonso-González conceived experiments and analyzed data. Samuel Cos conceived experiments and was involved in the study design and in writing the paper. All authors gave final approval to the submitted and published versions.

## References

1. RUSSO IH, RUSSO J. Role of hormones in mammary cancer initiation and progression. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 1998; **3**:49–61.
2. RUSSO J, RUSSO IH. The role of estrogen in the initiation of breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2006; **102**:89–96.
3. ORLANDO L, SCHIAVONE P, FEDELE P et al. Molecularly targeted endocrine therapies for breast cancer. *Cancer Treat Rev* 2010; **36S**(3):S67–S71.
4. LANDEGHEM AA, POORTMAN J, NABUURS M et al. Endogenous concentration and subcellular distribution of estrogens in normal and malignant human breast tissue. *Cancer Res* 1985; **45**:2900–2906.
5. YUE W, WANG JP, HAMILTON CJ et al. In situ aromatization enhances breast tumor estradiol levels and cellular proliferation. *Cancer Res* 1998; **58**:927–932.
6. SIMPSON ER. Role of aromatase in sex steroid action. *J Mol Endocrinol* 2000; **25**:149–156.
7. COS S, SÁNCHEZ-BARCELÓ EJ. Melatonin and mammary pathological growth. *Front Neuroendocrinol* 2000; **21**:133–170.
8. COS S, SÁNCHEZ-BARCELÓ EJ. Melatonin, experimental basis for a possible application in breast cancer prevention and treatment. *Histol Histopathol* 2000; **15**:637.
9. COS S, GONZÁLEZ A, MARTÍNEZ-CAMPA C et al. Estrogen-signaling pathway: a link between breast cancer and melatonin oncogenic actions. *Cancer Detect Prev* 2006; **30**:118–128.
10. BLASK DE, SAUER LA, DAUCHY RT. Melatonin as a chronobiotic/anticancer agent: cellular, biochemical and molecular mechanisms of action and their implications for circadian-based cancer therapy. *Curr Topics Med Chem* 2002; **2**:113–132.
11. HILL SM, BLASK DE. Effects of the pineal hormone melatonin on the proliferation and morphological characteristics of

- human breast cancer cells (MCF-7) in culture. *Cancer Res* 1988; **48**:6121–6126.
12. MEDIIVILLA MD, SÁNCHEZ-BARCELÓ EJ, TAN DX et al. Basic mechanisms involved in the anti-cancer effects of melatonin. *Curr Med Chem* 2010; **17**:4462–4481.
  13. JUNG-HYNES B, HUANG W, REITER RJ et al. Melatonin resynchronizes dysregulated circadian rhythm circuitry in human prostate cancer cells. *J Pineal Res* 2010; **49**:60–68.
  14. LEJA-SZPAK A, JAWOREK J, PIERZCHALSKI P et al. Melatonin induces pro-apoptotic signaling pathway in human pancreatic carcinoma cells (PANC-1). *J Pineal Res* 2010; **99**:248–255.
  15. CASADO-ZAPICO S, MARTÍN V, GARCÍA-SANTOS G et al. Regulation of the expression of death receptors and their ligands by melatonin in haematological cancer cell lines and in leukaemia cells from patients. *J Pineal Res* 2011; **50**:345–355.
  16. SÁNCHEZ-BARCELÓ EJ, COS S, FERNÁNDEZ R et al. Melatonin and mammary cancer: a short review. *Endocr Relat Cancer* 2003; **10**:153–159.
  17. SÁNCHEZ-BARCELÓ EJ, COS S, MEDIIVILLA MD et al. Melatonin-estrogen interactions in breast cancer. *J Pineal Res* 2005; **38**:217–222.
  18. COS S, GONZÁLEZ A, MARTÍNEZ-CAMPA C et al. Melatonin as a selective estrogen enzyme modulator. *Curr Cancer Drug Tar* 2008; **8**:691–702.
  19. GONZÁLEZ A, COS S, MARTÍNEZ-CAMPA C et al. Selective estrogen enzyme modulator (SEEM) actions of melatonin in human breast cancer cells. *J Pineal Res* 2008; **45**:86–92.
  20. ZHOU D, WANG J, CHEN E et al. Aromatase gene is amplified in MCF-7 human breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1993; **46**:147–153.
  21. SONNE-HANSEN K, LYKKESFELDT AE. Endogenous aromatization of testosterone results in growth stimulation of the human MCF-7 breast cancer cell line. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2005; **93**:25–34.
  22. RAM PT, KIEFER T, SILVERMAN M et al. Estrogen receptor transactivation in MCF-7 breast cancer cells by melatonin and growth factors. *Mol Cell Endocrinol* 1998; **141**:53–64.
  23. RAM PT, DAI J, YUAN L et al. Involvement of the MT-1 melatonin receptor in human breast cancer. *Cancer Lett* 2002; **179**:141–150.
  24. COS S, MARTÍNEZ-CAMPA C, MEDIIVILLA MD et al. Melatonin modulates aromatase activity in MCF-7 human breast cancer cells. *J Pineal Res* 2005; **38**:136–142.
  25. MARTÍNEZ-CAMPA C, GONZÁLEZ A, MEDIIVILLA MD et al. Melatonin inhibits aromatase promoter expression by regulating cyclooxygenases expression and activity in breast cancer cells. *Br J Cancer* 2009; **101**:1613–1619.
  26. COS S, GONZÁLEZ A, GÜEZMES A et al. Melatonin inhibits the growth of DMBA-induced mammary tumors by decreasing the local biosynthesis of estrogens through the modulation of aromatase activity. *Int J Cancer* 2006; **118**:274–278.
  27. GONZÁLEZ A, ALVAREZ-GARCÍA V, MARTÍNEZ-CAMPA C et al. Melatonin promotes differentiation of 3T3-L1 fibroblasts. *J Pineal Res* 2011; **52**:12–20.
  28. BULUN SE, LIN Z, IMIR G et al. Regulation of aromatase expression in estrogen-responsive breast and uterine disease: from bench to treatment. *Pharmacol Rev* 2005; **57**:359–383.
  29. MENG LI, ZHOU J, SASANO H et al. Tumor necrosis factor  $\alpha$  and interleukin 11 secreted by malignant breast epithelial cells inhibit adipocyte differentiation by selectively down-regulating CCAAT/enhancer binding protein  $\alpha$  and peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ : mechanism of desmoplastic reaction. *Cancer Res* 2001; **61**:2250–2255.
  30. RAMÍREZ-ZACARIAS JL, CASTRO-MUÑOZLEDO F, KURI-HARCUCH W. Quantitation of adipose conversion and triglycerides by staining intracytoplasmic lipids with Oil red O. *Histochemistry* 1992; **97**:493–497.
  31. MOSMANN T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983; **65**:55–63.
  32. ACKERMAN GE, SMITH ME, MENDELSON CR et al. Aromatization of androstenedione by human adipose tissue stromal cells in monolayer culture. *J Clin Endocrinol Metab* 1981; **53**:412–417.
  33. HOLLINGSHEAD BD, BEISCHLAG TV, DINATALE BC et al. Inflammatory signaling and aryl hydrocarbon receptor mediate synergistic induction of interleukin 6 in MCF-7 cells. *Cancer Res* 2008; **68**:3609–3617.
  34. PASQUALINI JR. The selective estrogen enzyme modulators in breast cancer: a review. *Biochim Biophys Acta* 2004; **1654**:123–143.
  35. PASQUALINI JR, CHETRITTE GS. Recent insight on the control of enzymes involved in estrogen formation and transformation in human breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2005; **93**:221–236.
  36. SUZUKI T, MIKI Y, NAKAMURA Y et al. Sex steroid-producing enzymes in human breast cancer. *Endocr Relat Cancer* 2005; **12**:701–720.
  37. BULUN SE, CHEN D, LU M et al. Aromatase excess in cancers of breast, endometrium and ovary. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2007; **106**:81–96.
  38. PUROHIT A, NEWMAN SP, REED MJ. The role of cytokines in regulating estrogen synthesis: implications for the etiology of breast cancer. *Breast Cancer Res* 2002; **4**:65–69.
  39. GUERRERO J, TOBAR N, CACERES M et al. Soluble factors derived from tumor mammary cell lines induce a stromal mammary adipose reversion in human and mice adipose cells. Possible role of TGF- $\beta$ 1 and TNF- $\alpha$ . *Breast Cancer Res Treat* 2010; **119**:497–508.
  40. MOLIS TM, SPRIGGS LI, HILL SM. Modulation of estrogen receptor mRNA expression by melatonin in MCF-7 human breast cancer cells. *Mol Endocrinol* 1994; **8**:1681–1690.
  41. HILL SM, SPRIGGS LL, SIMON MA et al. The growth inhibitory action of melatonin on human breast cancer cells is linked to the estrogen response system. *Cancer Lett* 1992; **64**:249–256.
  42. DELRIO B, GARCÍA-PEDRERO JM, MARTÍNEZ-CAMPA C et al. Melatonin: an endogenous specific inhibitor of estrogen receptor  $\alpha$  via calmodulin. *J Biol Chem* 2004; **279**:38294–38302.
  43. NTAMBI JM, KIM YC. Adipocyte differentiation and gene expression. *J Nutr* 2000; **130**:3122S–3126S.
  44. YAMADA K, HARADA N. Expression of estrogen synthetase (P-450 aromatase) during adipose differentiation of 3T3-L1 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; **169**:531–536.
  45. COS S, VERDUGA R, FERNÁNDEZ-VIADERO C et al. Effects of melatonin on the proliferation and differentiation of human neuroblastoma cells in culture. *Neurosci Lett* 1996; **216**:113–116.
  46. CRESPO D, FERNÁNDEZ-VIADERO C, VERDUGA R et al. Interaction between melatonin and estradiol on morphological and morphometric features of MCF-7 human breast cancer cells. *J Pineal Res* 1994; **16**:215–222.

47. COS S, FERNÁNDEZ R. Melatonin effects on intercellular junctional communication in MCF-7 human breast cancer cells. *J Pineal Res* 2000; **29**:166–171.
48. SAINZ RM, MAYO JC, TAN DX et al. Melatonin reduces prostate cancer cell growth leading to neuroendocrine differentiation via a receptor and PKA independent mechanism. *Prostate* 2005; **63**:29–43.
49. RADIO NM, DOCTOR JS, WITT-ENDERBY PA. Melatonin enhances alkaline phosphatase activity in differentiating human adult mesenchymal stem cells grown in osteogenic medium via MT2 melatonin receptors and the MEK/ERK (1/2) signaling cascade. *J Pineal Res* 2006; **42**:332–342.
50. ZHANG L, SU P, XU C et al. Melatonin inhibits adipogenesis and enhances osteogenesis of human mesenchymal stem cells by suppressing PPAR $\gamma$  expression and enhancing Runx2 expression. *J Pineal Res* 2010; **49**:364–372.
51. MORIYA Y, HORIE N, MITOME M et al. Melatonin influences the proliferative and differentiative activity of neural stem cells. *J Pineal Res* 2007; **42**:411–418.
52. SANCHEZ-HIDALGO M, LU Z, TAN DX et al. Melatonin inhibits fatty acid-induced triglyceride accumulation in ROS17/2.8 cells: implications for osteoblast differentiation and osteoporosis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2007; **292**:R2208–R2215.
53. LANE MD, TANG QQ. From multipotent stem cell to adipocyte. *Birth Defects Res A* 2005; **73**:476–477.
54. PASQUALINI JR, CHETRITTE GS. Estradiol as an anti-aromatase agent in human breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2006; **98**:12–17.
55. YUE W, BERSTEIN LM, WANG JP et al. The potential role of estrogen in aromatase regulation in the breast. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2001; **79**:157–164.
56. TORTI FM, TORTI SV, LARRICK JW et al. Modulation of adipocyte differentiation by tumor necrosis factor and transforming growth factor  $\beta$ . *J Cell Biol* 1989; **108**:1105–1113.
57. KELLER DC, DU XX, SROUR EF et al. Interleukin-11 inhibits adipogenesis and stimulates myelopoiesis in human long-term marrow cultures. *Blood* 1993; **82**:1428–1435.
58. RUBIN GL, ZHAO Y, KALUS AM et al. Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  ligands inhibit estrogen biosynthesis in human breast adipose tissue: possible implications for breast cancer therapy. *Cancer Res* 2000; **60**:1604–1608.
59. SULLIVAN NJ, SASSER AK, AXEL AE et al. Interleukin-6 induces an epithelial-mesenchymal transition phenotype in human breast cancer cells. *Oncogene* 2009; **28**:2940–2947.
60. COS S, FERNÁNDEZ R, GÜEZMES A et al. Influence of melatonin on invasive and metastatic properties of MCF-7 human breast cancer cells. *Cancer Res* 1998; **58**:4383–4390.
61. TOCHARUS J, KHONTUN C, CHONGTHAMMAKUN S et al. Melatonin attenuates methamphetamine-induced overexpression of pro-inflammatory cytokines in microglial cell lines. *J Pineal Res* 2010; **48**:347–352.
62. CHOI EY, JIN JY, LEE JY et al. Melatonin inhibits prevotella intermedia lipopolysaccharide-induced production of nitric oxide and interleukin-6 in murine macrophages by suppressing NF-B and STAT1 activity. *J Pineal Res* 2011; **50**:197–206.
63. TAI SH, HUNG YC, LEE EJ et al. Melatonin protects against transient focal cerebral ischemia in both reproductively active and estrogen-deficient female rats: the impact of circulating estrogen on its hermetic dose-response. *J Pineal Res* 2011; **50**:292–303.
64. FRASCHINI F, DEMARTINI G, ESPOSTI D et al. Melatonin involvement in immunity and cancer. *Biol Signals Recept* 1998; **7**:61–72.



# Regulation of vascular endothelial growth factor by melatonin in human breast cancer cells

**Abstract:** Melatonin exerts oncostatic effects on breast cancer by interfering with the estrogen-signaling pathways. Melatonin reduces estrogen biosynthesis in human breast cancer cells, surrounding fibroblasts and peritumoral endothelial cells by regulating cytokines that influence tumor microenvironment. This hormone also exerts antiangiogenic activity in tumoral tissue. In this work, our objective was to study the role of melatonin on the regulation of the vascular endothelial growth factor (VEGF) in breast cancer cells. To accomplish this, we cocultured human breast cancer cells (MCF-7) with human umbilical vein endothelial cells (HUVECs). VEGF added to the cultures stimulated the proliferation of HUVECs and melatonin (1 mM) counteracted this effect. Melatonin reduced VEGF production and VEGF mRNA expression in MCF-7 cells. MCF-7 cells cocultured with HUVECs stimulated the endothelial cells proliferation and increased VEGF levels in the culture media. Melatonin counteracted both stimulatory effects on HUVECs proliferation and on VEGF protein levels in the coculture media. Conditioned media from MCF-7 cells increased HUVECs proliferation, and this effect was significantly counteracted by anti-VEGF and 1 mM melatonin. All these findings suggest that melatonin may play a role in the paracrine interactions between malignant epithelial cells and proximal endothelial cells through a downregulatory action on VEGF expression in human breast cancer cells, which decrease the levels of VEGF around endothelial cells. Lower levels of VEGF could be important in reducing the number of estrogen-producing cells proximal to malignant cells as well as decreasing tumoral angiogenesis.

**Virginia Alvarez-García,  
Alicia González,  
Carolina Alonso-González,  
Carlos Martínez-Campa and  
Samuel Cos**

Department of Physiology and Pharmacology,  
School of Medicine, University of Cantabria,  
Santander, Spain

**Key words:** breast cancer, endothelial cells,  
MCF-7 cells, melatonin, pineal gland, vascular  
endothelial growth factor

Address reprint request to Dr. Samuel Cos,  
Departamento de Fisiología y Farmacología,  
Facultad de Medicina, Universidad de  
Cantabria, Cardenal Herrera Oria s/n, 39011  
Santander, Spain. E-mail: coss@unican.es

Received July 24, 2012;  
Accepted August 10, 2012.

## Introduction

Angiogenesis, which consists on the formation of new blood vessels from existing endothelium, is an essential event involved in tumor's progression and development [1]. The role of angiogenic growth factors as molecular targets in tumor pathology has become relevant because the inhibition of angiogenesis has been included as another cancer treatment strategy [2]. Vascular endothelial growth factor (VEGF) is the most active endogenous pro-angiogenic factor, which can induce angiogenesis by acting directly on the endothelium *in vivo* as well as increasing the microvascular permeability [3]. VEGF is widely known to play an important role in tumor biology and more specifically, in the process of tumor angiogenesis, as VEGF expression has been detected in a large variety of malignant human tumors, including tumors of the breast, brain, lung and gastrointestinal tract [4]. It has been clearly established that the VEGF content of the tumor correlates with the prognosis of patients with breast cancer [5, 6].

Melatonin, the main secretory product of the pineal gland is widely known to reduce the growth and development of estrogen-responsive breast cancers [7–9]. Melatonin exerts its oncostatic properties in hormone-dependent breast cancer by interfering at different levels with estro-

gen-signaling pathways [10, 11]. One of the mechanisms, through which this occurs, is based on the regulation by melatonin of both the expression and activity of several enzymes, specially the aromatase, involved in the biosynthesis of estrogens in peripheral tissues, thus melatonin behaving as a selective estrogen enzyme modulator [12, 13]. In breast cancer cells, melatonin inhibits aromatase activity and also downregulates aromatase expression at the transcriptional level [14]. This modulator effect of melatonin on the aromatase enzyme has also been described *in vivo*, in rats bearing DMBA-induced mammary tumors [15].

Several lines of evidence highlight the contribution of the tumor microenvironment to its growth and maintenance. Peritumoral tissues such as adjacent adipose fibroblasts and vascular endothelial cells provide structural and biochemical support for tumor growth, mainly by increasing their estrogen biosynthesis in response to paracrine signals secreted by malignant breast epithelial cells in a phenomenon known as the desmoplastic reaction [16, 17]. Recently, our group demonstrated that melatonin reduces the formation of the undifferentiated fibroblast layer surrounding malignant epithelial cells by stimulating adipogenesis and the differentiation of fibroblasts to mature adipocytes and by decreasing the aromatase activity of the fibroblasts and adipocytes through a downregulatory

action on the expression of antiadipogenic cytokines, which decreases the levels of these cytokines. Lower levels of TNF- $\alpha$ , IL-6, and IL-11 allowed the differentiation of fibroblasts and decrease both the aromatase activity and expression in these cells, thereby reducing the number of estrogen-producing cells proximal to malignant cells. Lower levels of aromatase lead to lower levels of estrogens, resulting in decreased growth and development of breast tumors [18, 19]. Endothelial cells surrounding tumor cells, are another source of estrogens because they also express aromatase [20, 21]. Melatonin inhibits the growth of endothelial cells and also reduces in them the local biosynthesis of estrogens through a downregulation of aromatase activity and expression by regulating gene expression of specific aromatase promoter region 1.7 [22].

VEGF secreted by breast cancer cells interacts with VEGF receptors in endothelial cells and stimulates downstream signaling molecules to promote the proliferation, growth, survival and migration of endothelial cells [23–25]. Therefore, inhibition of VEGF secretion by tumor cells as well as VEGF regulated signaling in endothelial cells could be important in targeting tumor angiogenesis and growth. As melatonin regulates tumor microenvironment by decreasing the secretion of cytokines by breast cancer cells, which regulate the differentiation and the aromatase enzyme of fibroblasts surrounding malignant cells [18, 19] and also regulates aromatase activity and expression in endothelial cells [22], in this study, we explored the role of melatonin on the regulation of VEGF in human breast cancer cells that could be important in reducing the number of estrogen-producing cells proximal to malignant cells and the tumoral angiogenesis. To accomplish this, we used cultures of human breast cancer cells (MCF-7) and cocultures of MCF-7 cells with human umbilical vein endothelial cells (HUVECs).

## Materials and methods

### Cells and culture conditions

Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were purchased from the American Tissue Culture Collection (Rockville, MD, USA). They were maintained as monolayer cultures in 75-cm<sup>2</sup> plastic culture flasks in Vascular Cell Basal Medium (VCBM) (ATCC, Rockville) supplemented with endothelial cell growth kit-BBE (ATCC, Rockville) which consisted on 2% fetal bovine serum (FBS), 0.2% Bovine Brain Extract, 5 ng/mL rhEGF, 10 mM L-glutamine, 0.75 units/mL heparin sulfate, 1  $\mu$ g/mL hydrocortisone hemisuccinate, 50  $\mu$ g/mL ascorbic acid, penicillin (20 units/mL) and streptomycin (20  $\mu$ g/mL) (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) at 37°C in a humid atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>. To avoid genetic mutation and low viability, no more than six passages of HUVECs were used for the following experiments.

MCF-7 human breast cancer cells were purchased from the American Tissue Culture Collection (Rockville). They were maintained as monolayer cultures in 75-cm<sup>2</sup> plastic culture flasks in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Sigma-Aldrich) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (PAA Laboratories, Pasching,

Austria), penicillin (20 units/mL), and streptomycin (20  $\mu$ g/mL) at 37°C in a humid atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>.

### Measurement of cellular proliferation

Human umbilical vein endothelial cells were seeded into 96-multiwell plates at a density of  $8 \times 10^3$  cells per well in VCBM supplemented with 2% FBS and incubated at 37°C. After 24 hr of incubation, serum-free media were renewed containing either 100, 200, or 400 ng/mL recombinant human vascular endothelial growth factor 165 (rhVEGF) (R&D Systems Europe Ltd, Abingdon, UK) and/or 1 mM melatonin (Sigma-Aldrich) and/or vehicle (ethanol at a final concentration lower than 0.0001%). Cells were cultured for 48 hr. Cell proliferation was measured by the MTT [3(4,5 dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] method, reading absorbance at 570 nm in a microplate reader (Labsystems Multiskan RC 351, Vienna, VA, USA). MTT was obtained from Molecular Probes Inc. (Eugene, OR, USA).

### Measurement of VEGF mRNA expression

Analysis of the vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in MCF-7 cells was carried out by real-time reverse transcription RT-PCR after incubation of cells with either 1 mM, 10  $\mu$ M, 100 nM, 1 nM, 0.01 nM melatonin and/or 200  $\mu$ M CoCl<sub>2</sub> (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) and/or vehicle (ethanol) for 4 hr. The total cellular RNA was isolated from MCF-7 cells and purified with the Nucleospin RNA II Kit (Machery-Nagel, Düren, Germany) following the manufacturer's instructions. Integrity of RNA was assessed by electrophoresis in ethidium bromide-stained 1% agarose-Tris-borate EDTA gels. The absorbance ratio  $A_{260 \text{ nm}}/A_{280 \text{ nm}}$  was  $> 1.8$ . For cDNA synthesis, 0.5  $\mu$ g of total RNA was denatured at 65°C for 10 min and reverse transcribed for 50 min at 45°C with cDNA Synthesis kit (Bioline, London, UK) in a final volume of 20  $\mu$ L in the presence of 500 ng of oligo (dT) 12–18 primers. Quantitative real-time PCRs were performed using the following set of human VEGF 165 specific primers [5'-ACCAAGGCCAGCACATAGG-3' (forward) and 5'-ACGCTCCAGGACTTATACCG-3' (reverse)] (Sigma Genosys Ltd., Cambridge, UK). As a control quantification, s14 mRNA was also subjected to real-time RT-PCR using a set of specific primers [5'-TCCTGCGAGTGCTGTGTCAGAG-3' (forward) and 5'-TCACCGCCCTACACATCAAA-3' (reverse)] (Sigma Genosys Ltd.). Real-time PCRs were performed in a MX3000 (Stratagene, La Jolla, CA, USA) using Brilliant<sup>®</sup> SYBR<sup>®</sup> Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Madrid, Spain) following the manufacturer's instructions. Amplifications were performed for 40 cycles using the following temperature profile: 55°C, 45 s (annealing); 72°C, 30 s (extension) and 95°C, 30 s (denaturation).

### Coculture of HUVECs and MCF-7 cells

Human umbilical vein endothelial cells were cocultured together with MCF-7 cells using Falcon 24-multiwell

plates, and Falcon cell culture inserts (Fig. 1). HUVECs were plated ( $24 \times 10^3$  cells/well) on the bottom wells in VCBM supplemented with 2% FBS and incubated overnight. At this time, MCF-7 cells were seeded ( $12 \times 10^3$  cells) on the permeable membrane ( $0.45 \mu\text{m}$ ) of the tissue culture inserts in VCBM supplemented with 2% FBS for 24 hr. Media was then changed to serum-free VCBM for 72 hr containing melatonin (1 mM) or vehicle (ethanol). At the end of the experiment, media were collected, centrifuged to remove particulates and subjected to measurement of VEGF protein levels. Cells in the bottom plate were evaluated for proliferative indices by the MTT method.

### Measurement of VEGF protein levels

For the determination of VEGF concentration in MCF-7 cell culture and HUVEC/MCF-7 cells coculture media, a human VEGF Immunoassay Kit (R&D Systems Europe Ltd) was used. The samples (in triplicate) were processed according to the supplier's instructions. Briefly, MCF-7 cells were seeded into 96-multiwell plates at a density of  $8 \times 10^3$  cells per well in DMEM supplemented with 10% FBS and incubated at  $37^\circ\text{C}$  for 24 hr. At that time, media were aspirated and replaced by fresh media supplemented with 0.5% charcoal-stripped FBS (sFBS) and containing either 1 mM, 1 nM melatonin or vehicle (ethanol). After 24 hr of incubation, media were collected, centrifuged to remove particulates and subjected to ELISA according to the supplier's instructions. For the determination of VEGF protein levels in cell coculture media, samples were collected, centrifuged and processed immediately. At the end of the procedure, absorbance was determined at a wavelength of 450 nm, with corrections at 540 nm.

### Paracrine effects of MCF-7-conditioned medium on endothelial cell proliferation

MCF-7 cells were seeded into 24-multiwell plates in DMEM supplemented with 10% FBS and incubated at  $37^\circ\text{C}$ . When a homogeneous monolayer of pre-confluent MCF7 cells was reached, cells were washed twice with PBS and placed in serum-free VCBM. After 24 hr of incubation, conditioned medium was collected, filtered through a  $0.2\text{-}\mu\text{m}$  pore size membrane, diluted (25%) and stored at  $-80^\circ\text{C}$ .

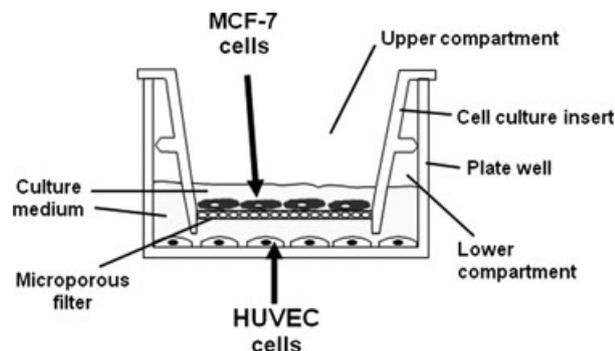


Fig. 1. Schematic representation of the Falcon 24-multiwell plates and Falcon cell culture inserts used in the cocultures.

Human umbilical vein endothelial cells were seeded at  $8 \times 10^3$  cells/well in a 96-well multiplate in VCBM supplemented with 2% FBS overnight. Cells were washed twice with PBS, and media were changed to serum-free VCBM containing either rhVEGF (100 ng/mL) with and without the anti-human VEGF antibody (300 ng/mL) (R&D Systems Europe Ltd) and conditioned media containing either 300 ng/mL anti-human VEGF antibody with and without 1 mM melatonin. Cells were cultured for 24 hr, and cellular proliferation was assessed by the MTT method.

### Statistical analysis

The data are expressed as the mean  $\pm$  standard errors of the mean (S.E.M.). Statistical differences between groups were analyzed by using one-way analysis of variance (ANOVA), followed by the Student–Newman–Keuls test. Results were considered as statistically significant at  $P < 0.05$ .

### Results

To investigate the effect of melatonin on VEGF-induced proliferation in HUVECs, we first determined whether the presence of different concentrations of human recombinant VEGF affects the proliferation of HUVECs cultured in serum-free VCBM. As expected, incubation with VEGF alone (100, 200 and 400 ng/mL) significantly stimulated the proliferation of HUVECs. Melatonin (1 mM) had an inhibitory effect on cell growth and counteracted the stimulatory effect on HUVECs proliferation induced by VEGF. The simultaneous addition of VEGF and melatonin (1 mM) resulted in a significantly lower cell proliferation than that of the only VEGF-treated cells and control untreated cells (Fig. 2).

Secondly, we studied the effect of melatonin on VEGF synthesis by MCF-7 cells and, to this purpose, we measured VEGF concentration in MCF-7 cells culture media. The levels of VEGF were significantly decreased by the addition of melatonin both at 1 mM and 1 nM concentration (Fig. 3).

With the aim of determining whether this inhibitory effect of melatonin on VEGF production was because of a downregulation of VEGF mRNA expression, we incubated MCF-7 cells with melatonin (1 mM, 10  $\mu\text{M}$ , 100 nM, 1 nM and 0.01 nM) or vehicle for 4 hr, and total RNA was isolated to perform real-time PCR with specific primers for human VEGF or the housekeeping gene s14. Melatonin at different concentrations reduced VEGF mRNA expression, being the treatment with 1 mM concentration the most effective in downregulating VEGF mRNA expression in MCF-7 cells, showing a 40% reduction in VEGF transcriptional activity. Lower melatonin concentrations (10  $\mu\text{M}$ , 100 nM, 1 nM) also exhibited a significant inhibition of VEGF mRNA expression ( $P < 0.001$ ) and 0.01 nM melatonin had the slightest inhibitory effect ( $P < 0.01$ ) (Fig. 4A). To mimic hypoxia, a well-known inducer of VEGF mRNA expression, MCF-7 cells were also exposed to 200  $\mu\text{M}$   $\text{CoCl}_2$  and the addition of melatonin both at pharmacological (1 mM) and at physiological (1 nM) concentrations also significantly counteracted the

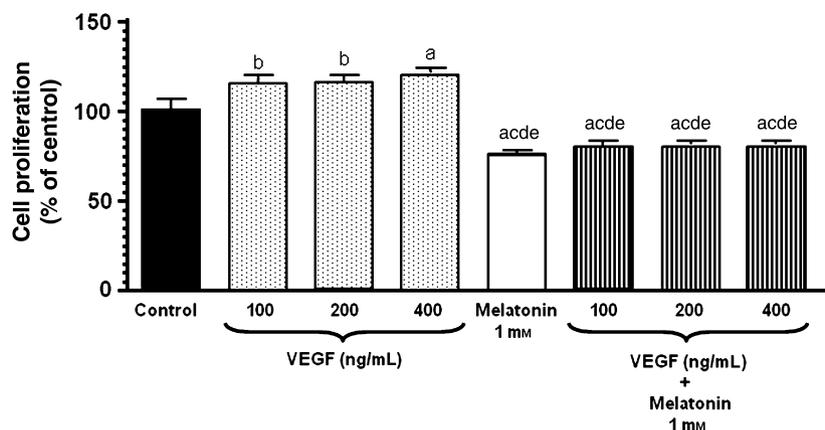


Fig. 2. Effects of VEGF (100, 200 or 400 ng/mL) and/or melatonin (1 mM) on cell proliferation of HUVECs. HUVECs were cultured into 96-multiwell plates in VCBM supplemented with 2% FBS and incubated at 37°C for 24 hr. Then, serum-free media were renewed containing either 100, 200 or 400 ng/mL recombinant human vascular endothelial growth factor 165 and/or 1 mM melatonin and/or vehicle (control). After 48 hr, cell proliferation was measured by the MTT method. Data are expressed as the percentage of the control group (mean ± S.E.M.). a,  $P < 0.001$  versus control; b,  $P < 0.01$  versus control; c,  $P < 0.001$  versus 100 ng/mL VEGF; d,  $P < 0.001$  versus 200 ng/mL VEGF; e,  $P < 0.001$  versus 400 ng/mL VEGF.

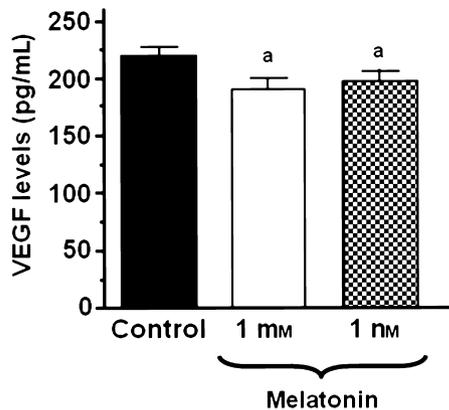


Fig. 3. Effects of melatonin (1 mM and 1 nM) on VEGF protein levels in cell culture media of MCF-7 cells determined by ELISA kits. MCF-7 cells were cultured into 96-multiwell plates at a density of  $8 \times 10^3$  cells per well in DMEM supplemented with 10% FBS and incubated at 37°C for 24 hr. Then, media were aspirated and replaced by fresh media supplemented with 0.5% sFBS and containing either 1 mM, 1 nM melatonin or vehicle (control). After 24 hr of incubation, media were collected, centrifuged to remove particulates and subjected to ELISA. a,  $P < 0.01$  versus control.

stimulatory effect of  $\text{CoCl}_2$  on VEGF mRNA gene expression ( $P < 0.01$ ) (Fig. 4B).

We developed cocultures of HUVECs and MCF-7 cells to investigate whether the presence of malignant epithelial cells in the cultures affects the growth of the endothelial cells. Indeed, we observed that the presence of breast cancer cells in the cocultures promoted an increase in HUVECs proliferation ( $P < 0.01$ ) and 1 mM melatonin prevented this stimulatory effect (Fig. 5A). To study whether the increase in HUVECs proliferation could be due to the release of VEGF by breast malignant epithelial cells, cocultures media were subjected to ELISA to determine VEGF protein levels. The presence of MCF-7 cells significantly increased VEGF protein levels in cell coculture media ( $P < 0.001$ ) and the addition of 1 mM melatonin decreased the concentration of VEGF levels and

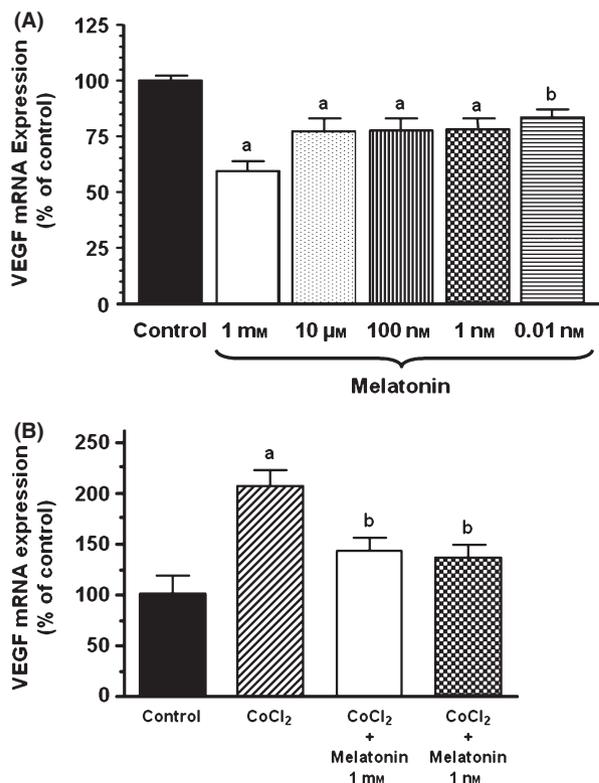


Fig. 4. Effects of melatonin on VEGF mRNA expression in MCF-7 cells. (A) Cells were incubated with melatonin (1 mM, 10 μM, 100 nM, 1 nM and 0.01 nM) or ethanol (control) for 4 hr. Total mRNA was isolated from cells and reverse transcribed. cDNA was subjected to PCR using specific primers for VEGF 165 or s14. Data are expressed as the percentage of the control group (mean ± S.E.M.). a,  $P < 0.001$  versus control; b,  $P < 0.01$  versus control. (B) Cells were incubated with melatonin (1 mM or 1 nM) and/or 200 μM  $\text{CoCl}_2$  or ethanol (control) for 4 hr. Data are expressed as the percentage of the control group (mean ± S.E.M.). a,  $P < 0.001$  versus control; b,  $P < 0.01$  versus  $\text{CoCl}_2$ .

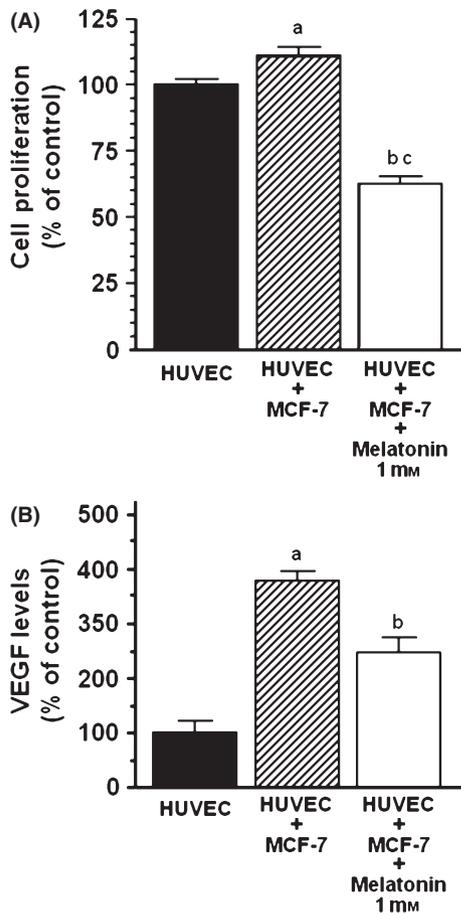


Fig. 5. HUVECs were plated ( $24 \times 10^3$  cells/well) on the bottom wells in VCBM supplemented with 2% FBS and incubated overnight. Then, MCF-7 cells were seeded ( $12 \times 10^3$  cells) on the permeable membrane ( $0.45 \mu\text{m}$ ) of the tissue culture inserts in VCBM supplemented with 2% FBS for 24 hr. Media were then changed to serum-free VCBM for 72 hr containing melatonin (1 mM) or vehicle (ethanol). At the end of the experiment, cells in the bottom plate were evaluated for proliferative indices by the MTT method and media were collected, centrifuged and subjected to measurement of VEGF protein levels. (A) Effects of melatonin (1 mM) on HUVECs proliferation, in the presence of breast cancer cells (MCF-7) in the culture. Data are expressed as the percentage of the control group, cultures of only HUVECs (mean  $\pm$  S.E.M.). a,  $P < 0.01$  versus HUVEC; b,  $P < 0.001$  versus HUVEC; c,  $P < 0.001$  versus HUVEC + MCF-7. (B) Effects of melatonin (1 mM) on VEGF protein levels in co-culture of HUVECs and MCF-7 cells. Data are expressed as the percentage of the control group, cultures of only HUVECs (mean  $\pm$  S.E.M.). a,  $P < 0.001$  versus HUVEC; b,  $P < 0.05$  versus HUVEC + MCF-7.

counteracted the stimulatory effect induced by the presence of malignant epithelial cells ( $P < 0.05$ ) (Fig. 5B).

Finally, to demonstrate that VEGF produced by tumor cells is angiogenically active and stimulates endothelial cell proliferation, serum-free conditioned media from MCF-7 cells were collected and subsequently added to HUVECs to measure their proliferative response. Under serum-free conditions, recombinant human VEGF (100 ng/mL) stimulated HUVECs growth. Addition of an anti-VEGF antibody (300 ng/mL) counteracted this effect. When conditioned media from MCF-7 cells were added to the cultures, HUVECs growth was markedly stimulated

( $P < 0.001$ ) and this effect was significantly counteracted by the addition of either anti-VEGF antibody (300 ng/mL) or 1 mM melatonin (Fig. 6).

## Discussion

The local biosynthesis of estrogens in breast cancer depends on paracrine interactions between malignant breast epithelial cells, proximal fibroblasts and vascular endothelial cells [17, 26–31]. Malignant epithelial cells secrete factors that inhibit the differentiation of surrounding adipose fibroblasts to mature adipocytes and also enhance aromatase expression in these undifferentiated adipose fibroblasts and endothelial cells [27]. Therefore, drugs that regulate the enzymes responsible for the synthesis of estrogens at mammary tumor level have an important therapeutic potential [28, 32]. At present, the role of melatonin in the regulation of cancer cell growth, more especially in estrogen-dependent mammary tumors, is well established [8–15, 33–41]. One of the oncogenic effects of melatonin is the regulation of the tumor microenvironment by decreasing the secretion of cytokines by breast cancer cells, which influence the differentiation and also regulate the aromatase activity and expression of fibroblasts surrounding malignant cells [18, 19] and endothelial cells [22]. Our objective was to explore the role of melatonin on the regulation of VEGF in human breast cancer cells and its possible role in reducing the number of estrogen-producing cells proximal to malignant cells and the tumoral angiogenesis.

Cancer progression is dependent on angiogenesis. New blood vessel formation that supplies vital nutrients to the growing tumor is regulated by different growth factors, being VEGF one of the most effective. It has been demonstrated that VEGF produced from tumor cells is essential

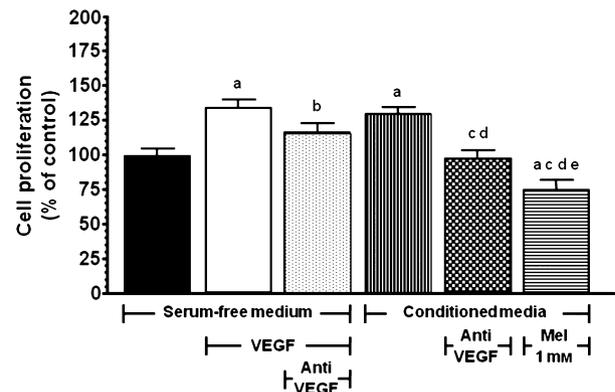


Fig. 6. Effects of melatonin on paracrine actions of VEGF produced by MCF-7 cells on HUVECs proliferation. HUVECs were cultured in 96-well multiplates in VCBM supplemented with 2% FBS overnight. Cells were washed twice with PBS and media were changed to serum-free VCBM containing either VEGF (100 ng/mL) with and without the anti-human VEGF antibody (300 ng/mL) and conditioned media (CM) from MCF-7 cells containing either 300 ng/mL anti-human VEGF antibody or 1 mM melatonin. Cells were cultured for 24 hr, and cellular proliferation was assessed by the MTT method. Data are expressed as the percentage of the control group, cultures of only HUVECs (mean  $\pm$  S.E.M.). a,  $P < 0.001$  versus control; b,  $P < 0.05$  versus VEGF; c,  $P < 0.001$  versus VEGF; d,  $P < 0.001$  versus CM; e,  $P < 0.001$  versus CM + anti-VEGF.

for the expansion of breast cancer, presumably by increasing proliferation of endothelial cells from neighboring blood vessels. Tumor-induced VEGF secretion may function in both paracrine and autocrine manners to allow tumor expansion and growth [42]. We first determined and confirmed that the presence of different concentrations of human recombinant VEGF significantly stimulated the proliferation of HUVECs cultured in serum-free medium. Melatonin had an inhibitory effect on cell growth and counteracted the stimulatory effect on HUVECs proliferation induced by VEGF. The simultaneous addition of VEGF and melatonin (1 mM) resulted in a significantly lower cell proliferation than that of the cells treated with only VEGF and control untreated cells. Antiproliferative effects of melatonin have been described in cultures of primary human umbilical vein endothelial cells isolated from fresh human umbilical veins [43]. These antiproliferative effects of melatonin in endothelial cells have been explained by two different pathways, one is the blockade of the cell cycle while the other is the induction of cellular apoptosis [43]. Then, we considered a third possibility that melatonin, in addition to regulate the cell cycle length and to induce apoptosis, could also reduce the proliferation of endothelial cells by regulating the production of VEGF by mammary tumor cells. We found that the same concentration of melatonin that inhibits proliferation of HUVECs also reduces VEGF levels in MCF-7 cells culture media. Previous reports have described a decrease in the production of VEGF protein induced by melatonin in human pancreatic carcinoma cells (PANC-1) and human alveolar adenocarcinoma cells (A549) [44, 45]. With the aim of determining whether this inhibitory effect of melatonin on VEGF production was owing to a downregulation of the VEGF mRNA expression in breast cancer cells, we then incubated MCF-7 cells with different melatonin concentrations. Melatonin reduced VEGF mRNA expression and 1 mM concentration resulted in the strongest downregulation of VEGF mRNA expression in these cells, showing a 40% reduction in VEGF transcriptional activity. MCF-7 cells were also exposed to 200  $\mu$ M CoCl<sub>2</sub> to mimic hypoxia, a well-known inducer of VEGF mRNA expression, and the addition of melatonin both at pharmacological (1 mM) or physiological (1 nM) concentrations also significantly counteracted the stimulatory effect of CoCl<sub>2</sub> on VEGF mRNA gene expression. Pharmacologic concentrations of melatonin also suppressed the VEGF mRNA expression induced by hypoxia mimetic cobalt chloride in human pancreatic carcinoma cells (PANC-1) and human alveolar adenocarcinoma cells (A549) [44, 45]. In these tumor cells, melatonin also decreases hypoxia-inducible factor (HIF)-1 $\alpha$  protein levels, suggesting a role for transcription factor HIF-1 $\alpha$  in the suppression of VEGF expression [44, 46]. In addition, it has also been reported in rats injected with melatonin while exposed to hypoxia, an inducer of angiogenesis, that serum VEGF levels decreased, which suggests that melatonin can suppress tumor cellular hypoxic adaptation by inhibiting angiogenesis [47].

In the present study, we developed a coculture system of HUVECs and MCF-7 cells to investigate whether human breast cancer cells affect the growth of the endothelial cells. We found that HUVECs exhibited an increased cell

proliferation when they were cocultured with breast cancer cells, and this process was prevented when melatonin was added to the culture medium. These results suggested that the local VEGF produced by tumor cells could be responsible for causing a proliferative response of endothelial cells. Indeed, the presence of breast cancer cells increased VEGF protein levels in cell coculture media and the addition of melatonin decreased the concentration of VEGF levels and counteracted the stimulatory effect induced by the presence of malignant epithelial cells. In addition, as another way to demonstrate the paracrine effects of breast cancer cells-secreted VEGF on HUVECs growth, we studied whether VEGF within conditioned medium collected from breast cancer cell cultures was able to increase the proliferation of HUVECs. When conditioned medium was added to HUVECs in culture, their growth was stimulated. The proliferative response of HUVECs was abolished in the presence of an anti-VEGF antibody, indicating that VEGF produced by breast cancer cells was the major factor that induces cellular proliferation in endothelial cells. When melatonin was added to HUVECs cultures in the presence of conditioned medium collected from breast cancer cells, the stimulatory effect of conditioned medium was counteracted by this indoleamine.

All these findings support a model in which breast cancer cells produce VEGF that may function in a paracrine manner to increase the proliferation of endothelial cells. Melatonin may play a role in the paracrine interactions between malignant epithelial cells and proximal endothelial cells through a downregulatory action on VEGF expression in human breast cancer cells, which decrease the levels of VEGF around endothelial cells. Lower levels of VEGF could be important in reducing the number of estrogen-producing cells proximal to malignant cells. This effect, together with the inhibitory effect exerted by melatonin on aromatase activity and expression, by regulating the gene expression of specific aromatase promoter regions in endothelial cells [22], and together with the regulatory effects of melatonin on fibroblasts adjacent to tumor cells [18, 19], could be important in reducing the synthesis of estrogens proximal to malignant cells. The actions of melatonin described here may be also involved in anti-angiogenic effects of melatonin in breast cancer with possible future clinical applications.

## Acknowledgements

This work was supported by a grant from the Spanish MICINN (SAF2010-19579).

## Author contributions

VA conceived and carried out coculture experiments, measurement of cellular proliferation, VEGF mRNA expression in MCF-7 cells and VEGF protein levels. AG carried out experiments on the expression of VEGF in human breast cancer cells. CM and CA conceived experiments and analyzed data. SC conceived experiments and was involved in the study design and in writing the manuscript. All authors gave final approval to the submitted and published versions.

## References

1. BERGERS G, BENJAMIN LE. Tumorigenesis and the antiangiogenic switch. *Nat Rev Cancer* 2003; **3**:401–410.
2. BARESCCHINO MA, SCETTINO C, COLANTUONI G et al. The role of antiangiogenic agents in the treatment of breast cancer. *Curr Med Chem* 2011; **18**:5022–5032.
3. COOK KM, FIGG WD. Angiogenesis inhibitors: current strategies and future prospects. *CA Cancer J Clin* 2010; **60**:222–243.
4. SENGER DR, VAN DE WATER L, BROWN LF et al. Vascular permeability factor (VPF, VEGF) in tumor biology. *Cancer Metastasis Rev* 1993; **12**:303–324.
5. HANAHAH D, CHRISTOFORI G, NAIK P, ARBEIT J. Transgenic mouse models of tumor angiogenesis: the angiogenic switch, its molecular controls, and prospects of preclinical therapeutic models. *Eur J Cancer* 1996; **32A**:2386–2393.
6. SALVEN P, MÄNPÄÄ H, ORPANA A et al. Serum endothelial growth factor is often elevated in disseminated cancer. *Clin Cancer Res* 1997; **3**:647–651.
7. HILL SM, BLASK DE. Effects of the pineal hormone melatonin on the proliferation and morphological characteristics of human breast cancer cells (MCF-7) in culture. *Cancer Res* 1988; **48**:6121–6126.
8. COS S, SÁNCHEZ-BARCELÓ EJ. Melatonin and mammary pathological growth. *Front Neuroendocrinol* 2000; **21**:133–170.
9. BLASK DE, SAUER LA, DAUCHY RT. Melatonin as a chronobiotic/anticancer agent: cellular, biochemical and molecular mechanisms of action and their implications for circadian-based cancer therapy. *Curr Topics Med Chem* 2002; **2**:113–132.
10. SÁNCHEZ-BARCELÓ EJ, COS S, FERNÁNDEZ R et al. Melatonin and mammary cancer: a short review. *Endocr Relat Cancer* 2003; **10**:153–159.
11. COS S, GONZÁLEZ A, MARTÍNEZ-CAMPA C et al. Estrogen-signaling pathway: a link between breast cancer and melatonin oncogenic actions. *Cancer Detect Prev* 2006; **30**:118–128.
12. COS S, GONZÁLEZ A, MARTÍNEZ-CAMPA C et al. Melatonin as a selective estrogen enzyme modulator. *Curr Cancer Drug Tar* 2008; **8**:691–702.
13. GONZÁLEZ A, COS S, MARTÍNEZ-CAMPA C et al. Selective estrogen enzyme modulator (SEEM) actions of melatonin in human breast cancer cells. *J Pineal Res* 2008; **45**:86–92.
14. COS S, MARTÍNEZ-CAMPA C, MEDIIVILLA MD, ALONSO-GONZÁLEZ C, SÁNCHEZ-BARCELÓ EJ. Melatonin modulates aromatase activity in MCF-7 human breast cancer cells. *J Pineal Res* 2005; **38**:136–142.
15. COS S, GONZÁLEZ A, GÜEZMES A et al. Melatonin inhibits the growth of DMBA-induced mammary tumors by decreasing the local biosynthesis of estrogens through the modulation of aromatase activity. *Int J Cancer* 2006; **118**:274–278.
16. MENG L, ZHOU J, SASANO H et al. Tumor necrosis factor  $\alpha$  and interleukin 11 secreted by malignant breast epithelial cells inhibit adipocyte differentiation by selectively down-regulating CCAAT/enhancer binding protein  $\alpha$  and peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ : mechanism of desmoplastic reaction. *Cancer Res* 2001; **61**:2250–2255.
17. BULUN SE, CHEN D, LU M et al. Aromatase excess in cancers of breast, endometrium and ovary. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2007; **106**:81–96.
18. GONZÁLEZ A, ALVAREZ-GARCÍA V, MARTÍNEZ-CAMPA C et al. Melatonin promotes differentiation of 3T3-L1 fibroblasts. *J Pineal Res* 2012; **52**:12–20.
19. ALVAREZ-GARCÍA V, GONZÁLEZ A, ALONSO-GONZÁLEZ C et al. Melatonin interferes in the desmoplastic reaction in breast cancer by regulating cytokine production. *J Pineal Res* 2012; **52**:282–290.
20. HARADA N, SASANO H, MURAKAMI H et al. Localized expression of aromatase in human vascular tissues. *Circ Res* 1999; **84**:1285–1291.
21. MUKHERJEE TK, DINH H, CHAUDHURI G et al. Testosterone attenuates expression of vascular cell adhesion molecule-1 by conversion to estradiol by aromatase in endothelial cells: implications in atherosclerosis. *Proc Nat Acad Sci USA* 2002; **6**:4055–4060.
22. COS S, GONZÁLEZ A, ALVAREZ-GARCÍA V et al. Melatonin and breast cancer: selective estrogen enzyme modulator actions. In: *Advances in Cancer Drug Targets*, Atta-ur-Rahman ed., Bentham Science Publishers, Sharjah, U.A.E, 2012; **1**:in press.
23. GU Q, WANG D, WANG X et al. Basic fibroblast growth factor inhibits radiation-induced apoptosis of HUVECs. 1. The PI3k/AKT pathway and induction of phosphorylation of BAD. *Radiat Res* 2004; **161**:692–702.
24. GINGIS-VELITSKI S, ZETSER A, FLUGELMAN MY et al. Heparanase induces endothelial cell migration via protein kinase B/Akt activation. *J Biol Chem* 2004; **279**:23536–23541.
25. GERBER HP, McMURTREY A, KOWALSKI J et al. Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation. *J Biol Chem* 1998; **273**:30336–30343.
26. PASQUALINI JR. The selective estrogen enzyme modulators in breast cancer: a review. *Biochim Biophys Acta* 2004; **1654**:123–143.
27. BULUN SE, LIN Z, IMIR G et al. Regulation of aromatase expression in estrogen-responsive breast and uterine disease: from bench to treatment. *Pharmacol Rev* 2005; **57**:359–383.
28. PASQUALINI JR, CHETRITTE GS. Recent insight on the control of enzymes involved in estrogen formation and transformation in human breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2005; **93**:221–236.
29. SUZUKI T, MIKI Y, NAKAMURA Y et al. Sex steroid-producing enzymes in human breast cancer. *Endocr Relat Cancer* 2005; **12**:701–720.
30. PUROHIT A, NEWMAN SP, REED MJ. The role of cytokines in regulating estrogen synthesis: implications for the etiology of breast cancer. *Breast Cancer Res* 2002; **4**:65–69.
31. GUERRERO J, TOBAR N, CÁCERES M et al. Soluble factors derived from tumor mammary cell lines induce a stromal mammary adipose reversion in human and mice adipose cells. Possible role of TGF- $\beta$ 1 and TNF- $\alpha$ . *Breast Cancer Res Treat* 2010; **119**:497–508.
32. BRODIE AM, NJAR VC. Aromatase inhibitors and their application in breast cancer treatment. *Steroids* 2000; **65**:171–179.
33. COS S, SÁNCHEZ-BARCELÓ EJ. Melatonin, experimental basis for a possible application in breast cancer prevention and treatment. *Histol Histopathol* 2000; **15**:637–647.
34. SÁNCHEZ-BARCELÓ EJ, COS S, MEDIIVILLA MD et al. Melatonin-estrogen interactions in breast cancer. *J Pineal Res* 2005; **38**:217–222.
35. MARTÍNEZ-CAMPA C, GONZÁLEZ A, MEDIIVILLA MD et al. Melatonin inhibits aromatase promoter expression by regulating cyclooxygenases expression and activity in breast cancer cells. *Br J Cancer* 2009; **101**:1613–1619.

36. MOLIS TM, SPRIGGS LL, HILL SM. Modulation of estrogen receptor mRNA expression by melatonin in MCF-7 human breast cancer cells. *Mol Endocrinol* 1994; **8**:1681–1690.
37. HILL SM, SPRIGGS LL, SIMON MA et al. The growth inhibitory action of melatonin on human breast cancer cells is linked to the estrogen response system. *Cancer Lett* 1992; **64**:249–256.
38. DEL RÍO B, GARCÍA-PEDRERO JM, MARTÍNEZ-CAMPA C, ZUAZUA P, LAZO PS, RAMOS S. Melatonin: an endogenous specific inhibitor of estrogen receptor  $\alpha$  via calmodulin. *J Biol Chem* 2004; **279**:38294–38302.
39. CRESPO D, FERNÁNDEZ-VIADERO C, VERDUGA R et al. Interaction between melatonin and estradiol on morphological and morphometric features of MCF-7 human breast cancer cells. *J Pineal Res* 1994; **16**:215–222.
40. COS S, FERNÁNDEZ R. Melatonin effects on intercellular junctional communication in MCF-7 human breast cancer cells. *J Pineal Res* 2000; **29**:166–171.
41. COS S, FERNÁNDEZ R, GÚEZMES A et al. Influence of melatonin on invasive and metastatic properties of MCF-7 human breast cancer cells. *Cancer Res* 1998; **58**:4383–4390.
42. LIANG Y, HYDER SM. Proliferation of endothelial and tumor epithelial cells by progestin-induced vascular endothelial growth factor from human breast cancer cells: paracrine and autocrine effects. *Endocrinology* 2005; **146**:3632–3641.
43. CUI P, LUO Z, ZHANG H et al. Effect and mechanism of melatonin's action on the proliferation of human umbilical vein endothelial cells. *J Pineal Res* 2006; **41**:358–362.
44. DAI M, CUI P, YU M et al. Melatonin modulates the expression of VEGF and HIF-1 $\alpha$  induced by CoCl<sub>2</sub> in cultured cancer cells. *J Pineal Res* 2008; **44**:121–126.
45. CUI P, YU M, PENG X et al. Melatonin prevents human pancreatic carcinoma cell PANC-1-induced human vein endothelial cell proliferation and migration by inhibiting vascular endothelial growth factor expression. *J Pineal Res* 2012; **52**:236–243.
46. PARK SY, JANG WJ, YI EY et al. Melatonin suppresses tumor angiogenesis by inhibiting HIF-1 $\alpha$  stabilization under hypoxia. *J Pineal Res* 2010; **48**:178–184.
47. KAUR C, SIVAKUMAR V, LU J et al. Increased vascular permeability and nitric oxide production in response to hypoxia in the pineal gland. *J Pineal Res* 2007; **42**:338–349.