

GRADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

TRABAJO FIN DE GRADO

Caracterización del papel de la melatonina para modular los cambios inducidos por las células adiposas estromales en la progresión de células tumorales mamarias

Characterization of the role of melatonin in modulating changes induced by stromal adipose cells in the progression of mammary tumor cells

Autor/a: María Menéndez Llamedo

Director/es: Carolina Alonso González

Santander, Junio de 2024

Índice

Resumen	2
Abstract	2
Palabras Clave.....	2
Resumen Gráfico	3
Introducción	4
Resultados	6
Efectos de la melatonina sobre las células ASC	6
Influencia de las células ASC sobre la proliferación de las MCF -7.....	7
Efectos de las ASC sobre la expresión génica de las MCF-7.....	7
Efectos del medio condicionado ASC sobre la migración de las MCF-7...	9
Discusión	9
Metodología	12
Agradecimientos	18
Bibliografía	18
Pies de Figuras	21
Pies de Figuras de la Información Suplementaria	22

Caracterización del papel de la melatonina para modular los cambios inducidos por las células adiposas estromales en la progresión de células tumorales mamarias

María Menéndez Llamedo ¹, Carolina Alonso González^{1,*}

¹ Departamento de Fisiología y Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad de Cantabria e Instituto de Investigación Valdecilla (IDIVAL), 39011 Santander, España.

* Autor para la correspondencia

Correo electrónico: alonsogc@unican.es

Resumen

En 2022 más de 2,3 millones de mujeres fueron diagnosticadas con cáncer de mama siendo más del 80% hormono-dependientes, lo que significa que los estrógenos ejercen un papel crucial en la progresión tumoral. El microambiente tumoral es de gran importancia en la diseminación del tumor al liberar una serie de factores paracrinos que promueven el desarrollo y la migración de las células cancerígenas. La melatonina, principal producto de secreción de la glándula pineal, es una hormona pleiotrópica con propiedades antiestrógenicas y oncostáticas a través de mecanismos como la inducción de apoptosis, inhibición de la angiogénesis o de la transición epitelio-mesénquima, disminuyendo la expresión de factores clave como TWIST1. Dado que la presencia de las células estromales puede modificar el comportamiento migratorio y proliferativo de las células mamarias tumorales, en este trabajo se pretende evaluar la capacidad de la melatonina para modular estos procesos empleando una línea celular derivada de adenocarcinoma mamario humano (MCF-7) y células adiposas estromales (ASC).

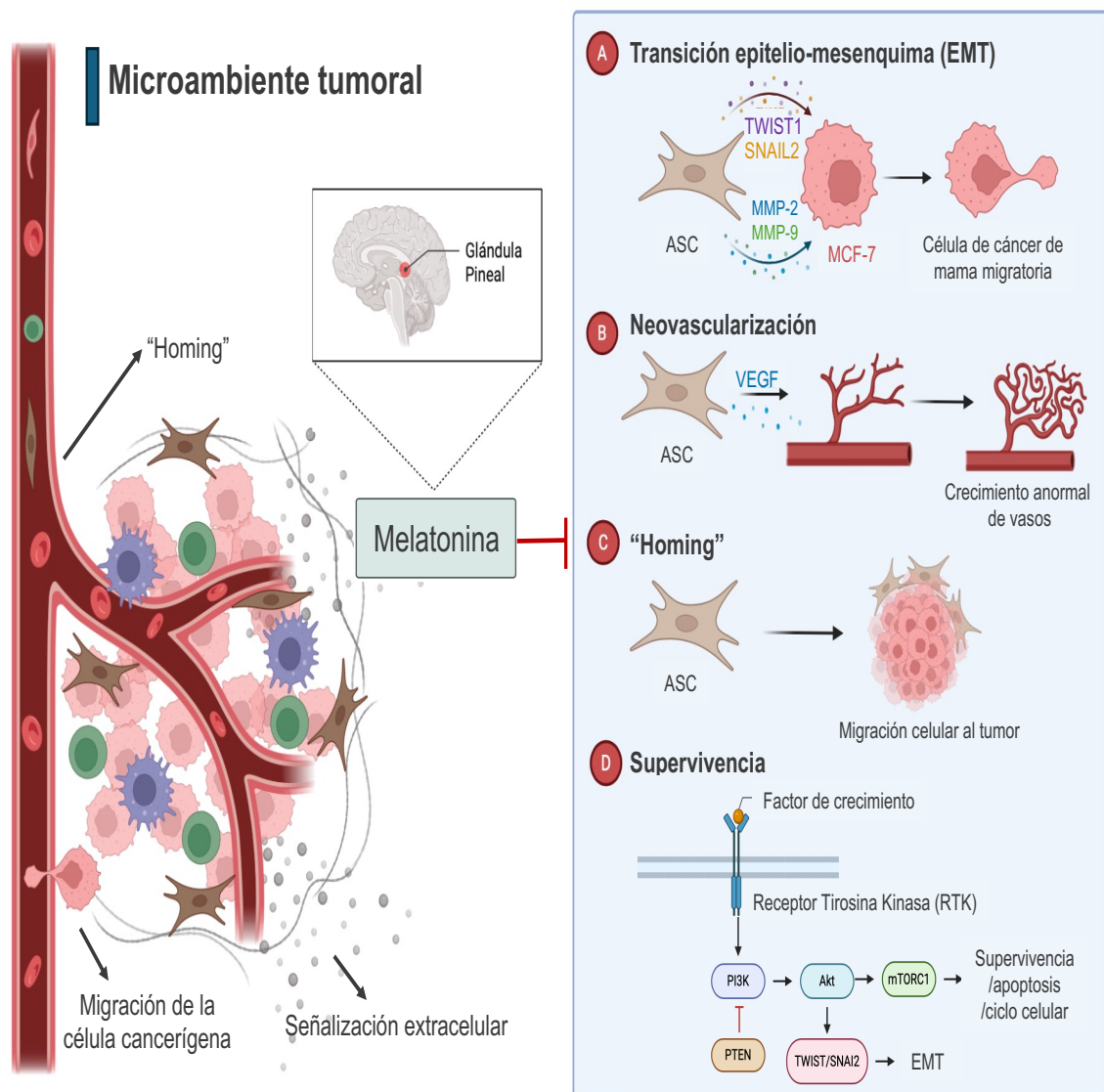
Abstract

In 2022, more than 2.3 million women were diagnosed with breast cancer, with over 80% being hormone-dependent, indicating the crucial role of estrogen in tumor progression. The tumor microenvironment significantly contributes to tumor dissemination by releasing various paracrine factors that promote the development and migration of cancer cells. Melatonin, the primary secretion product of the pineal gland, is a pleiotropic hormone with antiestrogenic and oncostatic properties through mechanisms such as apoptosis induction, angiogenesis inhibition, or epithelial-mesenchymal transition suppression, thereby reducing the expression of key factors like TWIST1. Considering that the presence of stromal cells can regulate the migratory and proliferative behavior of breast tumor cells, this study aims to evaluate melatonin's ability to modulate these processes using a cell line derived from human mammary adenocarcinoma (MCF-7) and adipose stromal cells (ASC).

Palabras clave

Cáncer de mama ER+, microambiente tumoral, transición epitelio-mesénquima, Twist1, melatonina, angiogénesis, migración, células MCF-7, células ASC.

53 Resumen Gráfico



Introducción

En 2022 más de 2,3 millones de mujeres fueron diagnosticadas con cáncer de mama, siendo la mayor parte positivas para receptores hormonales (receptor de estrógeno positivo (ER+) y/o receptor de progesterona positivo (PR+)). Es por ello que el abordaje terapéutico en estos casos está basado en terapias endocrinas para contrarrestar los efectos proliferativos de los estrógenos sobre la célula tumoral (moduladores *SERM* y *SEEM*). No obstante, y pese a la eficacia de dichos tratamientos, uno de los principales problemas en el uso de estas terapias son los fenómenos de resistencia que llevan a recidivas.¹ Por tanto, no cesa la búsqueda de sustancias adyuvantes que permitan mejorar la respuesta a estos tratamientos. Una de estas moléculas podría ser la melatonina, principal producto de secreción de la glándula pineal, a la que se le han atribuido múltiples funciones tales como sincronizador de ritmos circadianos, antioxidante o agente oncostático. Más concretamente, hay numerosos datos en la literatura que demuestran su capacidad para regular el inicio, progresión y metástasis de muchos tipos de tumores, especialmente de aquellos considerados hormono-dependientes como el cáncer de mama. Asimismo, en este tipo de tumores la melatonina actúa como un agente antiestrogénico, comportándose tanto como un inhibidor selectivo del receptor de estrógenos, (*Selective Estrogen Receptor Modulator SERM*) como inhibiendo la síntesis local de los mismos (*Selective Estrogen Enzyme Modulator, SEEM*).²

La transición epitelio-mesénquima (EMT) es un proceso morfogenético fundamental en el cáncer, mediante el cual las células epiteliales pierden su polaridad y adherencia y se transforman en células mesenquimales, adquiriendo propiedades migratorias e invasivas. La inducción de este proceso depende de múltiples factores producidos por el estroma que rodea al tumor, que actúan de manera paracrina induciendo la expresión de factores transcripcionales clave en la adquisición del fenotipo mesenquimal, como pueden ser Twist1 (*Twist-related protein 1*) o Snail. La melatonina ha demostrado ser capaz de inhibir la transición epitelio-mesénquima a través de la modulación de la vía de la PI3K/Akt implicada en fenómenos de división, crecimiento y supervivencia celular y comúnmente alterada en cáncer de mama. Más concretamente, la melatonina inhibe la activación de la proteína Akt, lo cual lleva a la inhibición de Twist1. A su vez, es capaz de estimular al supresor tumoral PTEN, que por medio de la defosforilación de PI3P (Fosfatidilinositol-3,4,5-Trifosfato), inhibe la puesta en marcha de la vía.³

Las células adiposas estromales multipotenciales (*Adipose-Derived Stem Cells, ASC*), que residen en el nicho perivascular y forman parte de la fracción estromal, tienen la capacidad de modificar este entorno y, por consiguiente, el comportamiento del tumor.⁴ Entre las características de estas células ASC se establece su aptitud para secretar factores solubles como interleucinas (IL-6 e IL-8), citoquinas o factores de crecimiento, entre ellos *PDGF* (*Platelet-Derived Growth Factor*) y *VEGF* (*Vascular Endothelial Growth Factor*), implicados ambos en efectos angiogénicos y antiapoptóticos. Además, su habilidad de diferenciación a células endoteliales les permite la formación de nuevos vasos sanguíneos.

Por último, también secretan factores como las metaloproteasas (MMP-2 y MMP-9), que facilitan la degradación de la membrana basal vascular promoviendo la migración de las células epiteliales.⁴ A su vez, las células ASC son capaces de alterar la transición epitelio mesénquima a través de la modulación de la vía PI3K/Akt.⁵

No obstante, hay datos en la literatura que también describen efectos inhibidores de las ASC sobre la progresión del tumor. Más concretamente, estos efectos parecen estar mediados por la liberación de exosomas, vesículas intraluminales de menos de 100 nm que contienen moléculas como microARNs, capaces de modificar las acciones paracrinas de dichas células estromales. Así, por ejemplo, se comprobó como el miR-503-3p contenido en medio condicionado de células ASC podría disminuir la proliferación de células de cáncer de mama. Sin embargo, otros autores sustentaron la idea de que los exosomas promueven la invasión de células tumorales por medio de la vía Wnt.⁶

Por todo ello, la influencia de estas células sobre el crecimiento y progresión tumoral sigue siendo un punto de controversia, puesto que existen datos en la literatura que señalan tanto su potencial oncogénico, como lo contrario. Asimismo, se ha visto como las propias células tumorales serían capaces de determinar el fenotipo de las células ASC, promoviendo la migración hacia el propio tumor (*homing*) a través de la circulación sistémica de estas células madre y su transdiferenciación a adipocitos y fibroblastos asociados con el tumor (CAAs, CAFs, respectivamente).

Por tanto, en este trabajo se pretende caracterizar en primer lugar la capacidad de la melatonina para modular el comportamiento de las células adiposas estromales. En segundo lugar, se busca evaluar la capacidad de las células ASC para modificar la proliferación, migración y expresión de genes implicados en la transición epitelio-mesénquima en una línea celular de adenocarcinoma mamario humano (MCF-7), así como el papel modulador de la melatonina sobre dichos procesos.

Resultados

Efectos de la melatonina sobre las células adiposas estromales (ASC)

En primer lugar, se realizó una curva de crecimiento en las células ASC durante cuatro días con diferente número de células (**figura 1A**) para dilucidar el número óptimo de células en los experimentos posteriores, asegurándonos que las células alcanzasen una confluencia adecuada en el pocillo. Tras analizar los resultados, se decidió que el número inicial de células sería de 4.000 células/pocillo y se procedió a valorar el efecto de la melatonina sobre el crecimiento de esta línea celular tanto a dosis farmacológica (1 mM) como fisiológica (1 nM). Como se muestra en la **figura 1B**, el crecimiento de las células ASC se redujo de manera significativa (en torno al 10%) con respecto al crecimiento de las células control tanto para la dosis fisiológica como la farmacológica durante las primeras 72 horas de cultivo, no habiendo en ningún caso diferencias significativas con respecto a la dosis de melatonina empleada. No obstante, tras cuatro días de cultivo, no se observaron efectos antiproliferativos de esta indolamina en comparación con las células control.

El siguiente grupo de experimentos que se decidió llevar a cabo consistió en determinar los cambios inducidos por el tratamiento con melatonina en la expresión de genes de interés relacionados con proliferación y muerte celular en las células ASC. Para ello las células fueron tratadas con melatonina a dosis fisiológicas (1 nM) o farmacológicas (1 mM) y se valoró los cambios en la expresión génica mediante PCR a tiempo real. Los resultados obtenidos se muestran en la **figura 2**. Se puede observar como el tratamiento con ambas dosis de melatonina aumentó de manera significativa la expresión de los genes *CDKN1A* (inhibidor de la quinasa dependiente de ciclina 1A, cuyo producto es conocido como p21) y *PTEN* (fosfatasa y homólogo de tensina). Ambos genes pueden ser considerados como supresores de tumores y actúan como factores de control sobre la proliferación celular excesiva. Por otra parte, la melatonina inhibió de manera significativa la expresión de *AKT1* (serina/treonina proteína quinasa que forma parte de la vía de señalización PI3K/AKT/mTOR) que participa en la regulación del ciclo celular y cuya activación está directamente relacionada con mayor proliferación. El último grupo de genes objeto de estudio fueron dos relacionados con apoptosis: *BAX2* (proteína 4 similar a Bcl-2) y *BCL-2* (célula B de linfoma 2). El tratamiento con melatonina potenció el efecto proapoptótico mediante el aumento significativo de la expresión de *BAX2* y al mismo tiempo redujo la expresión del antiapoptótico *BCL-2* con respecto a las células control.

Influencia de las células ASC sobre la proliferación de células tumorales mamarias (MCF-7)

Dado que el intercambio de factores de crecimiento entre las células tumorales y las células del microambiente tumoral puede modificar el comportamiento de las primeras, se decidió emplear medio condicionado procedente de células ASC para valorar si la liberación de este tipo de factores en dicho medio podría influir sobre la proliferación de las células MCF-7 (**figura 3A**). En primer lugar, se puede ver que el tratamiento de las células tumorales con el medio condicionado (CM) inhibió de manera significativa la proliferación de las células tumorales con respecto a las células control. La melatonina a dosis fisiológicas inhibió el crecimiento de las células tumorales, aunque este efecto no fue observado a dosis farmacológicas. No obstante, cuando esta indolamina fue añadida al medio condicionado fue capaz de potenciar el efecto inhibitor del propio medio sobre la proliferación de las células MCF-7, tanto a dosis fisiológicas como farmacológicas.

En segundo lugar, se quiso comprobar si los efectos observados con el medio condicionado eran reproducibles en un modelo de cocultivo donde directamente ambos tipos celulares estaban en contacto durante todo el experimento permitiendo valorar si la presencia de las células ASC modificaba el crecimiento de la célula tumoral. Tal y como se puede observar en la **figura 3B** la presencia de las células ASC en el *insert* colocado sobre las células tumorales en cultivo indujo una inhibición significativa de la proliferación de las células MCF-7 en comparación con las células control. En este caso, y tal y como estaba descrito en la literatura, la melatonina inhibió el crecimiento de las células tumorales, tanto a dosis 1 nM como 1 mM. Por último, cuando la melatonina fue añadida al medio de los cocultivos, también se observó una reducción significativa del crecimiento con respecto al grupo experimental en el que sólo estaban presentes las células ASC (*insert*) con el diluyente de la melatonina.

Efectos de las células adiposas mesenquimales sobre la expresión génica en células MCF-7: Papel de la melatonina

El siguiente paso consistió en determinar si los resultados obtenidos en los experimentos de proliferación con el medio condicionado en células MCF-7 se veían de alguna manera reflejados en cambios en la expresión de genes implicados en vías de progresión tumoral y/o migración. Para ello, las células MCF-7 fueron incubadas con medio condicionado procedente de cultivos de células ASC que previsiblemente tendrán factores de crecimiento y/o diferenciación que pudieran modificar la actividad transcripcional de las células tumorales.

Uno de los genes objeto de estudio fue *TWIST1* (proteína 1 relacionada con la torsión) que es uno de los factores de transcripción clave en la transición epitelio-mesénquima. Tal y como ya estaba descrito en la literatura, la melatonina a dosis

fisiológicas inhibió de manera significativa su expresión con respecto a las células control. Cuando las células fueron incubadas con medio procedente del cultivo de células ASC, éste aumentó la expresión de *TWIST1*, mientras que la melatonina revirtió parcialmente el efecto estimulador del medio condicionado sobre la expresión de *TWIST1* (**figura 4**). Otro de los genes implicados en la transición mesenquimal fue *SNAI2* (el gen correspondiente al represor 2 - slug - de la transcripción de la familia de SNAIL). Una vez más el medio condicionado indujo un aumento significativo de la expresión de este gen, y dicho efecto fue revertido por la adición de melatonina, tanto a dosis fisiológicas como farmacológicas. Por último, se estudió la expresión de un gen implicado en la adhesión celular que actúa promoviendo la degradación de la membrana extracelular, *PLAU* (uroquinasa, activador del plasminógeno, promotor de metástasis). Tal y como puede observarse el medio condicionado aumentó su expresión de manera significativa y la melatonina ejerció un efecto inhibitor, tanto por sí misma como añadida al medio condicionado.

De los factores implicados en la progresión celular, el medio condicionado aumentó de manera significativa la expresión de *AKT1* (participante en vías de señalización que conducen a la activación transcripcional de *TWIST1*) pero no tuvo un efecto significativo sobre la expresión de *PTEN* (fosfatasa y homólogo de tensina). Cuando las células fueron tratadas con melatonina, esta indolamina fue capaz de revertir el efecto estimulador del medio condicionado sobre *AKT1*, siendo la mayor inhibición a dosis fisiológicas (1 nM). En el caso de *PTEN*, la hormona pineal aumento su expresión tal y como ya estaba descrito, pero no indujo grandes cambios cuando las células tumorales fueron cultivadas en medio condicionado.

Además, se decidió realizar un modelo de cocultivos donde las células ASC sembradas en un *insert* se colocaban sobre las células MCF-7, permitiendo su interacción a través del medio de cultivo. Con respecto a la expresión de *TWIST1*, la simple presencia de las células ASC estimuló de manera significativa su expresión (hasta 7 veces) y este efecto fue fuertemente abolido por la melatonina, tanto a dosis fisiológicas como farmacológicas (**figura 5**). De una manera similar, la presencia de las células ASC aumentó también la actividad transcripcional de los genes *SNAI2* y *PLAU* y el tratamiento con la indolamina inhibió estos efectos.

Al igual que sucedió con el medio condicionado, la expresión de *AKT1* se vio estimulada de manera significativa por la presencia de las células estromales en el cultivo y la melatonina por su parte inhibió este efecto. Por último, la expresión de *PTEN* sí se vio estimulada por la hormona pineal, tal y como ya estaba descrito, pero en este caso la presencia de las células ASC no indujo cambios significativos.

Efectos del medio condicionado ASC sobre la migración de las células MCF-7

Para investigar los efectos del medio condicionado y la melatonina en la capacidad migratoria de las células MCF-7 se empleó el ensayo de cicatrización de heridas (*wound healing assay*). La migración de las células tras permanecer 28 horas sometidas a los tratamientos se puede observar en la **figura 6A** y la cuantificación se recoge en la **figura 6B**. La incubación de las células tumorales con el medio condicionado resultó en un aumento de la distancia migrada en comparación con las células control, mientras que la adición de melatonina produjo una disminución significativa de la migración de las células MCF-7, tanto por sí sola como añadida al medio condicionado.

Discusión

En los últimos tiempos se ha dado una gran importancia al microambiente tumoral y su contribución al crecimiento y desarrollo de los tumores a través de diferentes mecanismos tales como el aumento del potencial invasivo y metastásico, inducción de la transición epitelio-mesénquima o liberación de mediadores paracrinós o exosomas que contengan moléculas con propiedades oncogénicas.⁴ Dentro de este microambiente existen mayoritariamente dos tipos celulares, adipocitos (*Cancer Associated Adipocytes*, CAAs) y fibroblastos (*Cancer Associated Fibroblasts*, CAFs), cuyos precursores directos son las células adiposas estromales multipotenciales (Adipose-Derived Stem Cells, ASC).⁷

La melatonina, principal producto de secreción de la glándula pineal, es una hormona pleiotrópica con propiedades antioxidantes, oncostáticas y antiangiogénicas entre otras, de especial relevancia en tumores hormono-dependientes.² Además, también se ha descrito su capacidad de modular la actividad del tejido peritumoral (fibroblastos y células endoteliales), contribuyendo a reducir su potencial oncogénico a través de distintos mecanismos que incluyen una mayor diferenciación, menor liberación de factores de crecimiento y proangiogénicos (como VEGF) o disminución de la producción de estrógenos a nivel local.⁸

Por tanto, en primer lugar, se quiso caracterizar el papel que la indolamina podría ejercer sobre las células ASC, ya que está descrito que expresan receptores para esta hormona (MT₁, MT₂).⁹ La eficacia de la melatonina en las distintas líneas celulares estudiadas no tiene lugar siempre a las mismas concentraciones y por lo tanto en este trabajo se decidió emplear dos concentraciones, la considerada farmacológica (1 mM) y la fisiológica (1 nM). Los resultados obtenidos indican que la melatonina inhibió de manera significativa la proliferación en esta línea celular durante los tres primeros días de tratamiento. Estos datos coinciden con resultados previos publicados en células ASC derivadas de rata.¹⁰ No obstante, en otros trabajos más recientes se describe que el efecto de la indolamina sobre las células ASC fue proliferativo, si bien las dosis empleadas fueron menores, lo que podría justificar estas diferencias.⁹

Una vez determinado que la melatonina inhibe la proliferación de las células ASC, se procedió a examinar los cambios en expresión transcripcional de algunos genes relacionados con proliferación y muerte celular. La melatonina estimuló la expresión de *CDKN1A* (inhibidor de la quinasa dependiente de ciclina 1A, cuyo producto es conocido como p21) y de *PTEN* (fosfatasa y homólogo de tensina), que actúan ambos como factores de control sobre la proliferación celular excesiva. Asimismo, la melatonina inhibió de manera significativa la expresión de *AKT1* (serina/treonina proteína quinasa, parte de la vía de señalización PI3K/AKT/mTOR) que participa en la regulación del ciclo celular y cuya activación está directamente relacionada con mayor proliferación. *BAX2* es un gen proapoptótico que la melatonina estimula y *BCL-2* es un factor antiapoptótico cuya expresión se ve inhibida por la hormona pineal. Nuestros resultados en conjunto sugieren que los efectos antiproliferativos de la melatonina sobre las células ASC pueden ser explicados, al menos en parte, porque potencia los efectos antiproliferativos y proapoptóticos.

La contribución de las células adiposas estromales al crecimiento tumoral ha generado cierta controversia en los estudios publicados hasta la fecha, habiéndose encontrado tanto asociaciones positivas como negativas en diversos estudios tanto *in vitro* como *in vivo*.^{11,12} Así, por ejemplo, algunos estudios postulan un aumento de la capacidad proliferativa de las células MCF-7 debido a la influencia de las células ASC¹³, mientras otros sostienen lo contrario. Las causas de estas diferencias se han atribuido a distintos factores como el contexto celular y las condiciones de cultivo, el microambiente en el que se encuentra el tumor¹⁴ o incluso el origen de las células ASC.⁴ Por último, también algunos autores señalan que el efecto inhibidor pueda ser debido a la presencia de productos tóxicos de desecho si bien se demostró que diluyendo dicho medio condicionado se obtenían igualmente resultados similares en cuanto a la viabilidad celular.¹⁵

Por lo tanto, el siguiente objetivo de este trabajo fue comprobar como las células ASC podrían influir sobre la actividad proliferativa de las células tumorales mamarias (MCF-7). Para ello se recogió medio condicionado procedente de células ASC en cultivo que fue añadido a las células tumorales mamarias. La adición del medio condicionado disminuyó la proliferación de las células MCF-7, y la melatonina añadida al cultivo potenció el efecto inhibitorio inducido por el medio condicionado. De una manera similar cuando se realizaron cocultivos de células ASC con las células MCF-7 se han observado los mismos efectos que con el medio condicionado. Estos resultados en conjunto indicarían que la presencia de factores paracrinós secretados al medio de cultivo por las ASC podrían ser los mediadores de estos efectos antiproliferativos.

La transición epitelio-mesénquima (EMT) es un proceso mediante el cual las células epiteliales pierden algunas de sus propiedades como son la polaridad o la adherencia a la membrana y se transforman en células mesenquimales, con una mayor capacidad migratoria e invasiva. A pesar de ser un proceso fisiológico y reversible, la EMT ocurre frecuentemente en cáncer y es una de las razones por la que lesiones de tipo carcinoma *in situ* terminan por convertirse en tumores altamente invasivos. En este contexto, las células ASC pueden interactuar con

las células tumorales a través de uniones GAP que les permitan intercambiar factores de crecimiento y citoquinas, contribuyendo por tanto a la adquisición de un fenotipo más metastásico.¹⁶ Algunos de los factores secretados serían el TGF β (*Transforming Growth Factor beta*) o el VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) que actúan de manera paracrina induciendo la activación de factores de transcripción clave como Twist1 o Snail.

Para valorar como la interacción entre las células ASC y las células tumorales podría afectar a la transición epitelio-mesénquima y el posible papel de la melatonina sobre este proceso, se planteó estudiar los cambios en la expresión de genes que codifican para dos de los factores clave en la EMT como son *TWIST1* y *SNAI2*. El tratamiento de las células MCF-7 con el medio condicionado estimuló la expresión de ambos genes con respecto a las células tumorales control, siendo este efecto todavía más llamativo cuando los experimentos se llevaron a cabo empleando el modelo de cocultivos. En ambos casos, la melatonina a cualquiera de las dosis ensayadas redujo este efecto. Se estudió también la expresión génica de *PLAU*, que actúa promoviendo la degradación de la membrana y por tanto promoviendo la metástasis. Al igual que ocurría en los casos anteriores, la presencia de las células ASC o la incubación con medio condicionado indujo un aumento significativo de su expresión y dicho efecto fue parcialmente inhibido por la hormona pineal.

En el caso de *PTEN*, la hormona pineal aumento su expresión tal y como ya estaba descrito, pero no indujo grandes cambios cuando las células tumorales fueron cultivadas en medio condicionado o en presencia de células ASC.

Por último, se estudió la expresión del gen *AKT1*, comúnmente sobreexpresado en muchos tipos de cáncer, incluido el mamario. En los resultados obtenidos, las células ASC o bien el medio condicionado indujeron un aumento significativo de la expresión de este gen en las células tumorales, y una vez más la melatonina fue capaz de contrarrestar dicho aumento. Es sabido que las células ASC inducen la transición epitelio-mesénquima a través de la activación de vías como PI3K/AKT o la vía de Wnt que llevan a la activación transcripcional de factores como Twist1, clave en toda la transformación a células mesenquimales.⁶ Por ello, estos resultados sugieren que la melatonina podría actuar como un factor protector frente a la contribución de las células estromales a la transición mesenquimal, reduciendo por tanto la capacidad migratoria de las células tumorales mamarias.

Por otra parte, las células ASC también se han relacionado con un mayor potencial angiogénico e invasivo al liberar al medio de cultivo factores pro-angiogénicos como VEGF o PDGF e inducen el remodelado de la matriz extracelular por las metaloproteinasas (MMP-2 y MMP-9). Por lo tanto, aumentan la capacidad invasiva dentro del microambiente tumoral.⁶ Asimismo, hay numerosos datos en la literatura que demuestran que la melatonina posee acciones en muchos de los mecanismos implicados en procesos angiogénicos y metastásicos dentro del microambiente tumoral.

Por todo ello, el último objetivo de este trabajo ha sido estudiar los cambios en la capacidad migratoria de las células MCF-7 cuando fueron tratadas con medio condicionado obtenido de las células ASC, valorando una vez más el papel que

la melatonina podría ejercer en dicho proceso. Los resultados indican que el tratamiento con medio condicionado aumentó el área migrada con respecto a las células tumorales control, y este efecto fue revertido por la melatonina añadida junto con el medio condicionado.

En conjunto los resultados obtenidos en este trabajo indican que la presencia de las células ASC modifica el potencial migratorio de las células mamarias tumorales, induce cambios en la expresión de genes que codifican para factores implicados en la transición epitelio-mesénquima y reduce su actividad proliferativa. Estos resultados podrían parecer contradictorios a priori si bien es cierto que como ya se ha señalado en esta memoria existe cierta controversia sobre los efectos globales de las células adiposas sobre el comportamiento de la célula tumoral. Sumado a esto, se ha descrito la presencia de exosomas liberados por parte de las células ASC conteniendo micro-ARNs, entre otros, que pueden actuar como represores tumorales, lo cual podría también explicar estas diferencias.⁶ Lo que sí que queda claro en este trabajo es el papel protector de la hormona pineal, disminuyendo la actividad proliferativa de las células tumorales, la expresión de genes implicados en EMT, así como la capacidad migratoria inducida por el medio condicionado.

En conclusión, los resultados que hemos presentado en ese trabajo apoyan la hipótesis de que la melatonina podría ejercer una serie de efectos protectores ya no solo sobre la célula tumoral sino también sobre las células que forman parte del microambiente como las células adiposas estromales.

Metodología

Reactivos químicos

El stock de melatonina (Sigma-Aldrich) utilizado se preparó disolviéndola en etanol 100% a una concentración de 100mM y se almacenó en alícuotas a -20°C. En el momento de proceder al tratamiento de las células se realizaron diluciones en el medio de cultivo, de manera que la concentración final de etanol fue de 0,1% (v/v).

Cultivos celulares

Para llevar a cabo este trabajo se han utilizado dos líneas celulares, ambas obtenidas a través de la ATCC (*American Type Culture Collection*). En primer lugar, las células MCF-7 (*Michigan Cancer Foundation-7*), que son células epiteliales inmortalizadas procedentes de un adenocarcinoma mamario humano positivo para el receptor de estrógeno (ER+). En segundo lugar, las células ASC52telo, células madre mesenquimales inmortalizadas derivadas de tejido adiposo. Para conservar las células se almacenaron stocks de cada una de las líneas celulares a -70°C junto con un 10% de DMSO (dimetil-sulfóxido).

El medio utilizado para cultivar las células MCF-7 ha sido medio DMEM (Medio *Eagle* modificado de Dulbecco), suplementado con 10% de SFB (suero fetal bovino) y con los antibióticos penicilina (100 U/mL) y estreptomicina (100 µg/ml).

En el caso de la línea celular ASC se cultivaron en medio basal CTS™ StemPro™ MSC SFM (Gibco) + 5 % de GlutaMAX™+ MesenPRO RS Growth Supplement (Gibco) + G418 0,2 mg/ml + 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina. Para la preparación del medio se utilizaron alícuotas de 48mL del medio basal.

Ambas líneas celulares permanecieron como cultivos adherentes en placas de cultivo de 10 cm de diámetro y se mantuvieron en estufas en condiciones de 37°C y atmósfera húmeda de un 5% de CO₂.

Las células MCF-7 se dividieron cuando alcanzaron alrededor del 70-80% de confluencia. Para ello, se retiró el medio de la placa y se lavó con PBS (tampón fosfato salino). A continuación, se aspiró este y se procedió a añadir una solución de 0,25% de tripsina-EDTA (0,25% de tripsina (p/v), 0,2 g/L EDTA) incubándose durante alrededor de 3-5 minutos a 37°C para despegar las células de la superficie de la placa. Después se recogieron las células en el medio de cultivo correspondiente, actuando el suero que incluye el propio medio como inactivador de la tripsina. A continuación, se centrifugó a 100 x g durante 5 minutos. Finalmente, el pellet de células resultante se resuspendió en medio de cultivo, repartiéndolo en las placas correspondientes.

Por otra parte, las células ASC requieren condiciones más específicas para su cultivo. En primer lugar, se lavaron con 10 mL de PBS. A continuación, se añadieron 1,5 mL de acutasa, se incubaron durante 3 minutos y en este caso se recogen con 9 mL de medio correspondiente desde la placa. Por último, se centrifugaron a 100 x g durante 5 minutos y se resuspendieron en medio de cultivo.

De la suspensión celular resultante de haber centrifugado se tomaron 100µL para el conteo celular en la cámara de Neubauer con un microscopio óptico utilizando el aumento 10x y seleccionando los cuadrantes de las esquinas como referencia.

Cocultivos de células MCF-7 y ASC

Para valorar si la presencia de las células ASC modifica el comportamiento de las células MCF-7 se utilizó un modelo de cocultivo. Para ello se utilizaron placas de 6 pocillos (Falcon) en las que se sembraron las células MCF-7 a una densidad de 5x10⁵ células/pocillo (**figura S1**). En paralelo, las células ASC fueron sembradas en un *insert* o soporte (Falcon) que cuenta con una membrana permeable con poros de 0,45 µm de diámetro a una densidad de 3x10⁵ células/*insert*. Tras 48 h de incubación por separado en sus medios de cultivo correspondientes, los *inserts* con las células ASC se colocaron sobre las placas con células MCF-7 y se añadieron los tratamientos correspondientes (melatonina

y/o su diluyente) en el medio de las células ASC. Esto nos permitió analizar las relaciones paracrinias que ocurren entre las células de ambos compartimentos. Las placas se mantuvieron en incubación durante tres días para los estudios de proliferación celular o durante 4 horas para los estudios de cambios sobre la expresión génica. En ambos casos, los estudios se realizaron sobre las células MCF-7.

Obtención de medio condicionado de células ASC

Para determinar si las células ASC liberaban algún tipo de sustancia al medio de cultivo que fuera capaz de modificar el comportamiento de las células MCF-7 se usó medio condicionado. En este caso, se sembraron células ASC a una densidad de 4×10^4 células/pocillo en placas de 24 pocillos (Falcon). Tras una incubación de 24 horas para permitir la adherencia de las células a la placa, se añadieron los tratamientos correspondientes (melatonina y/o su diluyente) y a las 48 horas, tras alcanzar una confluencia del 80-90%, se recogió el medio y se filtró mediante filtros de 0,22 mm de poro. Dicho medio se almacenó a -70°C hasta su posterior utilización.

Medida de la proliferación celular: Método MTT

Los estudios de proliferación celular se llevaron a cabo en las líneas MCF-7 y ASC. En el caso de las células MCF-7 las células se sembraron en placas de 96 pocillos a una densidad de 3×10^3 células/pocillo en medio DMEM suplementado con 10% SFB y/o medio condicionado (según experimento). Las células ASC fueron sembradas en su propio medio de cultivo a una densidad de 4×10^3 células/pocillo. Tras 24 horas para permitir la correcta adherencia de las células a la placa de cultivo, se realizaron dos lavados con PBS y se añadieron los tratamientos correspondientes.

La proliferación celular se evaluó mediante el método del MTT (reducción de sales de tetrazolio). Es una técnica colorimétrica que mide la actividad metabólica de las células y se fundamenta en la reducción de una sal de tetrazolio amarilla (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio o MTT) en cristales de formazán (color morado) llevada a cabo por las deshidrogenasas mitocondriales. Concretamente, se mezcló 1 ml de una solución madre de MTT (12 nM) disuelta en PBS, con 10 ml de medio de cultivo. Tras retirar el medio de cultivo de la placa, se añadieron 110 μl a cada pocillo. A las cuatro horas de incubación de las placas a 37°C , se solubilizaron los cristales de formazán añadiendo 100 μl por pocillo de una solución de SDS-HCl (0,01 N) (conteniendo 1 gramo de SDS, laurilsulfato sódico) y tras 24 horas se procedió a la lectura en un espectrofotómetro de placas a una longitud de onda de 570 nm. La cantidad de formazán producida es directamente proporcional al número de células metabólicamente activas por lo que la proliferación celular se representó como la medida de la absorbancia directamente. Cada experimento se realizó al menos tres veces y los resultados se indicaron como la media $\pm$ el error estándar de la media (SEM).¹⁷

Extracción de ARN total de las células en cultivo

Para llevar a cabo los estudios de expresión génica, en primer lugar, se debe extraer el ARN total de las células. Las células fueron sembradas en placas de 6 pocillos en sus correspondientes medios de cultivo y tras 24 horas de incubación se añadieron los correspondientes tratamientos (melatonina y/o su diluyente, medios condicionados). Posteriormente transcurridas 4 horas se procedió a realizar la extracción de ARN total siguiendo el protocolo de la casa comercial *Nzytech* (**figura S2**), que utiliza un buffer de lisis que contiene tiocinato de guanidina, capaz de inactivar las ARNasas. Una vez se obtuvo el lisado se colocó en una columna de homogenización y se centrifugó a 11.000 x g durante 1 minuto. A continuación, se guardó el flujo que atravesó la membrana y se le añadió etanol al 70%. En un paso posterior, el lisado resultante se traspasó a una columna de unión, donde se incubó junto con ADNasa reconstituida. Finalmente, tras varios lavados, el ARN se eluyó en 40 μL de agua libre de ARNasas.

Una vez extraído el ARN se cuantificó la cantidad y se analizó su pureza. Se utilizó el espectrofotómetro (*Implen*) para evaluar la cantidad y pureza del ARN extraído. Se determinó la cantidad de ARN midiendo su absorbancia a 260 nm. La pureza del ARN se evaluó mediante el cociente entre la absorbancia a 260 nm y la absorbancia a 280 nm, que indica la presencia de proteínas en la muestra. Un cociente de 2,0 sugiere un ARN puro, es decir, con ausencia de contaminantes.

Síntesis de ADN complementario (ADNc)

A partir del ARN obtenido, se llevó a cabo la síntesis de ADN complementario (ADNc). La síntesis se realizó utilizando el kit comercial de *Nzytech* a partir de 1 μg de ARN, siendo el volumen final de la reacción de 20 μL . Los componentes por incluir en la reacción son los que se muestran en la **tabla S1**.

Se mezclaron todos estos componentes y se incubaron en el termociclador en una serie de tiempos. En primer lugar 10 minutos a 25°C. a continuación, 30 minutos a 50°C y por último se inactivó la reacción calentando durante 5 minutos a 85°C. Después se sacó durante un breve momento y se introdujo en hielo para posteriormente añadir 1 μL de NZY ARNasa H, que permite degradar el ARN restante después de la síntesis de ADNc. Por último, se introdujo de nuevo en el termociclador y se mantuvo durante 20 minutos a 37°C. El ADNc resultante se utilizó directamente para RT-PCR o se almacenó a -20°C para su posterior uso.

Detección de la expresión génica mediante PCR a tiempo real (RT-PCR)

Para estudiar los cambios en la expresión de genes de interés se realizó una PCR a tiempo real (RT-PCR). Se sembraron las células (MCF-7 o ASC) a una densidad de 8×10^5 células/pocillo en placas de 6 pocillos (Falcon) y tras 24 horas de incubación se añadieron los tratamientos correspondientes. El ARN total de

estas células fue extraído según el protocolo arriba descrito y posteriormente se procedió a la síntesis del ADNc.

Los cebadores que fueron utilizados para esta amplificación se describen en la **tabla S2**. El cebador “*housekeeping*” utilizado fue la unidad ribosomal S14, que presenta una expresión constitutiva y, por tanto, sirve como control.

La reacción de PCR a tiempo real depende de la cantidad de ADNc que se encuentra en cada muestra y para monitorizar el avance de la reacción se emplea un marcador fluorescente (*Syber Green*), el cual se une al ADN bicatenario formado durante la reacción de amplificación, permitiendo por tanto detectar la formación de los productos de la PCR. Por ello, la intensidad de la fluorescencia aumenta de manera proporcional a la cantidad de productos generados. Se establece un umbral de fluorescencia en fase exponencial (*threshold*) y el ciclo en el cual la reacción de amplificación atraviesa este umbral de fluorescencia se denomina C_T (*threshold cycle*).¹⁸

Para preparar cada reacción de amplificación se utilizaron reactivos del kit comercial Nzytech. Se añadieron 10 μ L de NZYSpeedy qPCR Green Master Mix (2x), ROX, 0,8 μ L de cada cebador, 2 μ L de ADNc y agua libre de ARNasas hasta completar un volumen total de 20 μ L. La RT-PCR se llevó a cabo en un termociclador (Bio-rad CFX Connect TM) con las siguientes condiciones térmicas: un ciclo de activación de la polimerasa a 95°C durante 2 minutos; 40 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 10 segundos; anillamiento a 60°C durante 30 segundos. Para comprobar la especificidad de la reacción se introdujo un ciclo adicional, la curva de disociación, en el cual las muestras se calentaron lentamente desde 60°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 directamente 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 su T_m específica.

Los resultados se analizaron gracias al programa de análisis *Biorad CFX Maestro software versión 2.1* en el cual se normalizó el resultado obtenido en las muestras frente al gen de referencia (14S ARNr), utilizando el método de comparación de valores C_T (ΔC_T), el cual se resume en el siguiente esquema:¹⁹

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

$$\Delta \Delta C_t = \Delta C_t \text{ Condición problema} - \Delta C_t \text{ Condición control}$$

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

Ensayo de Migración Celular: Wound-Healing Assay

Se llevó a cabo este experimento para estudiar la migración de las células tumorales MCF-7 y la influencia que tienen las células ASC en este proceso. Esta prueba implica generar una "brecha" artificial de 500 μm en un cultivo monocapa (*ibidi culture-insert 2 well*, 35 mm), mediante la cual las células se desplazarán hasta establecer un nuevo contacto célula-célula.

En primer lugar, se sembraron células MCF-7 hasta alcanzar una confluencia de 3×10^5 células/mL. Se añadieron 70 μL de la suspensión celular a cada pocillo y se dejaron incubar las células durante 24 horas. Una vez transcurrido el tiempo, se revisó al microscopio la presencia de la cantidad de células adecuadas y se procedió a retirar el *insert* con pinzas esterilizadas. Posteriormente, se lavó la placa con PBS para eliminar restos celulares y se añadieron 2 mL del medio y tratamiento a las placas.

La migración celular se monitorizó en tres campos seleccionados al azar a lo largo de la brecha en cada *insert*, utilizando una cámara ORCA R2 (Hamamatsu Photonics) vinculada a un microscopio Nikon Eclipse-Ti (Werfen Group), que realizó fotografías cada quince minutos durante el transcurso del experimento, a un aumento de 10X. El ensayo se consideró finalizado una vez que las células del grupo control concluyeron con el proceso de migración, en este caso una vez transcurridas alrededor de 28 horas después del inicio del experimento. La migración celular se cuantificó midiendo el área inicial y final de la incisión con el software Nis-Elements c.3.8 y para establecer la distancia recorrida por las células se utilizó la siguiente fórmula: ²⁰

$$\text{Migración celular} = (\text{área inicial de la brecha} - \text{área final de la brecha}) / 2$$

Análisis estadístico de los datos

Los análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando el software *GraphPad Prism 5.0* (*Graph-pad Software*). Se realizaron estudios paramétricos en todos los casos, aplicados a variables que se ajustaban a una distribución normal. Específicamente, se realizaron análisis de varianza paramétricos (ANOVA), seguidos, en caso de encontrar valores significativos, del test de Student-Newman-Keuls para determinar las diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes grupos experimentales. En el caso de comparaciones entre dos variables experimentales únicas, se emplearon pruebas t de Student no paramétricas. Se consideraron los resultados como estadísticamente significativos para valores de $p < 0,05$. Salvo que se indique lo contrario, todos los ensayos se realizaron en al menos tres ocasiones bajo las mismas condiciones, y los resultados se presentaron como la media $\pm$ el error estándar de la media (SEM).

Agradecimientos

En primer lugar, quiero agradecer a mi tutora Carolina y a la técnico Gema, por dedicarme su tiempo, estar dispuestas a ayudarme y guiarme en todo momento durante el desarrollo del *Practicum* y del trabajo.

Por último, me gustaría dar las gracias a mi familia y amigos, por acompañarme en esta etapa, por ser de gran apoyo siempre que lo he necesitado y por animarme durante todo este proceso.

Bibliografía

1. Haines, C.N., Wardell, S.E., and McDonnell, D.P. (2021). Current and emerging estrogen receptor-targeted therapies for the treatment of breast cancer. *Essays Biochem* 65, 985–1001. <https://doi.org/10.1042/EBC20200174>.
2. Menéndez-Menéndez, J., Hermida-Prado, F., Granda-Díaz, R., González, A., García-Pedrero, J.M., Del-Río-Ibáñez, N., González-González, A., Cos, S., Alonso-González, C., and Martínez-Campa, C. (2019). Deciphering the molecular basis of melatonin protective effects on breast cells treated with doxorubicin: Twist1 a transcription factor involved in emt and metastasis, a novel target of melatonin. *Cancers (Basel)* 11. <https://doi.org/10.3390/cancers11071011>.
3. Martínez-Campa, C., Álvarez-García, V., Alonso-González, C., González, A., and Cos, S. (2024). Melatonin and Its Role in the Epithelial-to-Mesenchymal Transition (EMT) in Cancer. Preprint, <https://doi.org/10.3390/cancers16050956>.
4. Guillaume, V.G.J., Ruhl, T., Boos, A.M., and Beier, J.P. (2022). The Crosstalk between Adipose-Derived Stem or Stromal Cells (ASC) and Cancer Cells and ASC-Mediated Effects on Cancer Formation and Progression - ASCs: Safety Hazard or Harmless Source of Tropism? Preprint at Oxford University Press, <https://doi.org/10.1093/stcltm/szac002>.
5. Ritter, A., Friemel, A., Fornoff, F., Adjan, M., Solbach, C., Yuan, J., and Louwen, F. Characterization of adipose-derived stem cells from subcutaneous and visceral adipose tissues and their function in breast cancer cells.
6. Scioli, M.G., Storti, G., D'amico, F., Gentile, P., Kim, B.S., Cervelli, V., and Orlandi, A. (2019). Adipose-derived stem cells in cancer progression: New perspectives and opportunities. Preprint at MDPI AG, <https://doi.org/10.3390/ijms20133296>.
7. Zhao, C., Wu, M., Zeng, N., Xiong, M., Hu, W., Lv, W., Yi, Y., Zhang, Q., and Wu, Y. (2020). Cancer-associated adipocytes: Emerging supporters in breast cancer. Preprint at BioMed Central Ltd, <https://doi.org/10.1186/s13046-020-01666-z>.

8. González-González, A., Nieto, E.G., González, A., Sánchez-Fernández, C., Alonso-González, C., Menéndez-Menéndez, J., Gómez-Arozamena, J., Cos, S., and Martínez-Campa, C. (2019). Melatonin modulation of radiation and chemotherapeutics-induced changes on differentiation of breast fibroblasts. *Int J Mol Sci* 20. <https://doi.org/10.3390/ijms20163935>.
9. Romano, I.R., D'Angeli, F., Gili, E., Fruciano, M., Lombardo, G.A.G., Mannino, G., Vicario, N., Russo, C., Parenti, R., Vancheri, C., et al. (2024). Melatonin Enhances Neural Differentiation of Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Int J Mol Sci* 25. <https://doi.org/10.3390/ijms25094891>.
10. Zaminy, A., Kashani, R., Barbarestani, M., Hedayatpour, A., Mahmoudi, R., Vardasbi, S., and Shokrgozar, M.A. Effects of melatonin on the proliferation and differentiation of rat adipose-derived stem cells <https://doi.org/10.1055/s-0039-1699220>.
11. Nyström, M., Lauvrud, A.T., Pérez-Díaz, S., Kingham, P.J., and Wiberg, R. (2023). Interaction of adipose-derived stem cells with active and dormant breast cancer cells. *Journal of Plastic, Reconstructive and Aesthetic Surgery* 83, 69–76. <https://doi.org/10.1016/j.bjps.2023.05.006>.
12. Freese, K.E., Kokai, L., Edwards, R.P., Philips, B.J., Sheikh, M.A., Kelley, J., Comerici, J., Marra, K.G., Rubin, J.P., and Linkov, F. (2015). Adipose-derived stems cells and their role in human cancer development, growth, progression, and metastasis: A systematic review. Preprint at American Association for Cancer Research Inc., <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-2744>.
13. de Miranda, M.C., Ferreira, A. da F., de Melo, M.I.A., Kunrath-Lima, M., Goes, A.M. de, Rodrigues, M.A., Gomes, D.A., and Faria, J.A.Q.A. (2021). Adipose-derived stem/stromal cell secretome modulates breast cancer cell proliferation and differentiation state towards aggressiveness. *Biochimie* 191, 69–77. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2021.08.010>.
14. Trivanović, D., Nikolić, S., Krstić, J., Jauković, A., Mojsilović, S., Ilić, V., Okić-Djordjević, I., Santibanez, J.F., Jovčić, G., and Bugarski, D. (2014). Characteristics of human adipose mesenchymal stem cells isolated from healthy and cancer affected people and their interactions with human breast cancer cell line MCF-7 in vitro. *Cell Biol Int* 38, 254–265. <https://doi.org/10.1002/cbin.10198>.
15. Wu, Y.C., Wang, W.T., Huang, L.J., Cheng, R.Y., Kuo, Y.R., Hou, M.F., Lai, C.S., and Yu, J. (2019). Differential response of non-cancerous and malignant breast cancer cells to conditioned medium of adipose tissue-derived stromal cells (Ascs). *Int J Med Sci* 16, 893–901. <https://doi.org/10.7150/ijms.27125>.
16. Mandel, K., Yang, Y., Schambach, A., Glage, S., Otte, A., and Hass, R. (2013). Mesenchymal Stem Cells Directly Interact with Breast Cancer Cells and Promote Tumor Cell Growth In Vitro and In Vivo. *Stem Cells Dev* 22, 3114–3127. <https://doi.org/10.1089/scd.2013.0249>.

17. Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4).
18. González González, A. (2019). Efectos sensibilizadores de la melatonina a la quimioterapia y a la radioterapia en el cáncer de mama : acciones antiangiogénicas y adipogénicas.
19. Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta CT$ method. *Methods* 25, 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.
20. Jonkman, J.E.N., Cathcart, J.A., Xu, F., Bartolini, M.E., Amon, J.E., Stevens, K.M., and Colarusso, P. (2014). An introduction to the wound healing assay using live-cell microscopy. Preprint at Landes Bioscience, <https://doi.org/10.4161/cam.36224>.

Pies de Figuras

Figura 1. Proliferación de las células ASC. (A) Curva de crecimiento de las células ASC durante 4 días con diferente número de células por pocillo. **(B)** Efectos inhibidores del tratamiento con melatonina (1 mM y 1 nM) sobre el crecimiento de las células ASC. En ambos casos la proliferación celular se midió mediante el método del MTT durante cuatro días de cultivo. C: Control; Mel: Melatonina. a, $p < 0,01$ vs. control 24 horas; b, $p < 0,001$ vs. control 48 horas; c, $p < 0,001$ vs. control 72 horas.

Figura 2. Efectos de la melatonina sobre la transcripción de genes en células ASC. Las células ASC fueron tratadas con melatonina (1 mM y 1 nM) durante cuatro horas y posteriormente se realizó el análisis por RT-PCR de los genes *PTEN*, *CDKN1A* (*p21*), *AKT1*, *BAX2* y *BCL-2*. Todos los datos están expresados como el cambio relativo a las células control (media $\pm$ SEM) a partir de tres experimentos independientes. C: control; Mel: Melatonina. a, $p < 0,05$ vs. C; b, $p < 0,01$ vs. C; c, $p < 0,001$ vs. C.

Figura 3. Efectos de la melatonina sobre la proliferación de células MCF-7 en presencia de (A) medio condicionado procedente de las células ASC cultivadas durante 48 horas; **(B)** cocultivos de células ASC (*insert* arriba) y células MCF-7 (abajo). En ambos casos la proliferación celular se midió a los tres días de cultivo mediante el método del MTT. Los datos se expresan como el porcentaje de la proliferación con respecto al grupo control de células MCF-7 (media $\pm$ SEM). C: Control; CM: medio condicionado; Mel: Melatonina. a, $p < 0,01$ vs. C; b, $p < 0,001$ vs. C; c, $p < 0,001$ vs. CM. d, $p < 0,001$ vs. MCF-7; e, $p < 0,001$ vs. MCF-7+ASC.

Figura 4. Efectos del medio condicionado y la melatonina sobre la expresión génica en células MCF-7. Las células MCF-7 fueron tratadas durante cuatro horas con medio condicionado procedente de células ASC y/o melatonina (1 mM y 1 nM). El análisis de los cambios en la expresión de los genes *TWIST1*, *SNAI2*, *PLAU*, *PTEN* y *AKT1* se realizó a las 4 horas mediante RT-PCR. Todos los datos están expresados como el cambio relativo a las células control (media $\pm$ SEM) a partir de tres experimentos independientes. C: control. CM: medio condicionado. Mel: Melatonina. a, $p < 0,001$ vs. C; b, $p < 0,05$ vs. CM; c, $p < 0,001$ vs. CM.

Figura 5. Cambios en la expresión génica en células tumorales en un modelo de cocultivos de ASC y MCF-7. Las células MCF-7 fueron incubadas con *inserts* que contenían células ASC y/o tratadas con melatonina (1 mM y 1 nM). El análisis de los cambios en la expresión de los genes *TWIST1*, *SNAI2*, *PLAU*, *PTEN* y *AKT1* se realizó a las 4 horas de añadir el tratamiento mediante RT-PCR. Todos los datos están expresados como el cambio relativo a las células control (media $\pm$ SEM) a partir de tres experimentos independientes. Mel: Melatonina. a, $p < 0,05$ vs. MCF-7; b, $p < 0,01$ vs. MCF-7; c, $p < 0,001$ vs. MCF-7; d, $p < 0,01$ vs. MCF-7+ASC; e, $p < 0,001$ vs. MCF-7+ASC.

Figura 6. Efecto del medio condicionado y la melatonina sobre la migración de las células MCF-7 (A) Microfotografías representativas iniciales (0 h) y finales (28 h) del ensayo de migración de células tratadas con melatonina (1 mM, 1 nM) y/o medio condicionado procedente del cultivo de células ASC. Escala 500 μ m. **(B)** Cuantificación del área migrada por las células MCF-7 con las mismas condiciones. CM: Medio condicionado. Mel: melatonina. a, $p < 0,001$ vs. C; b, $p < 0,001$ vs. CM.

Pies de Figuras de la Información Suplementaria

Figura S1. Modelo de cocultivo ASC-MCF-7. Pocillo e insert utilizados en el modelo de cocultivos para los ensayos de proliferación (método MTT) y expresión génica (RT-PCR). Las células MCF-7 (5×10^5 células) se sembraron en placas de 6 pocillos sobre los que se pusieron los *inserts* de células ASC (3×10^5 células). El *insert* presenta una membrana con microporos (0,45 μ m). Imagen modificada de Biorender.com

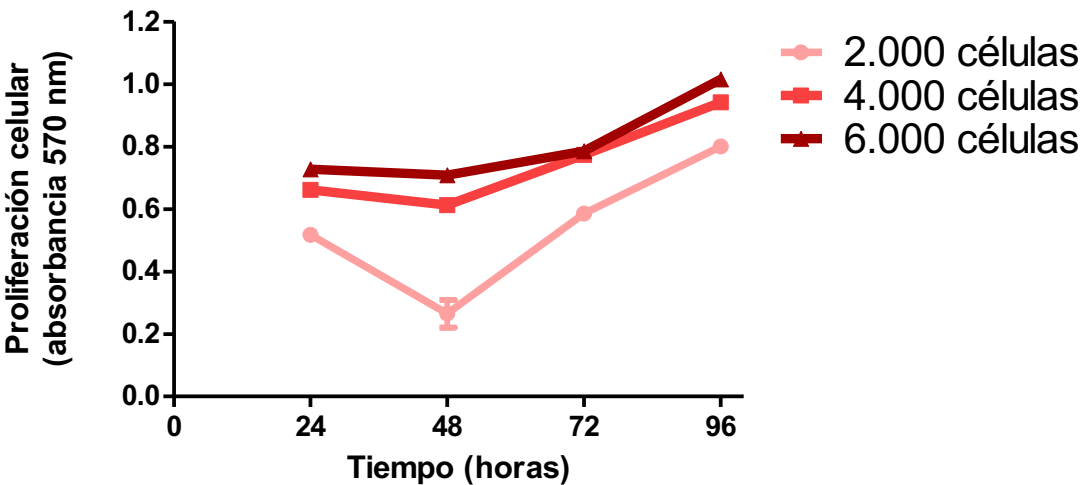
Figura S2. Procedimiento de extracción de ARN total. Proceso de lisado, fijación y purificación del ARN total mediante posteriores lavados. Kit de aislamiento de ARN total de la marca comercial *NZYtech*. Imagen modificada de Biorender.com

Tabla S1. Componentes de la reacción de síntesis de ADNc. Protocolo de *NZYtech*, Se debe calcular los μ L equivalentes a 1 μ g de ARN. La cantidad de DEPC-H₂O se adecuará para obtener un total de 20 μ L de reacción. Se procede a la incubación de la muestra en el termociclador durante los tiempos y temperaturas indicadas.

Tabla S2. Cebadores empleados en los estudios de expresión génica, en sentido 5'-3'. Los genes utilizados se encuentran implicados en el cáncer de mama, la transición epitelio-mesénquima, supervivencia y progresión del ciclo celular.

Figura 1

A)



B)

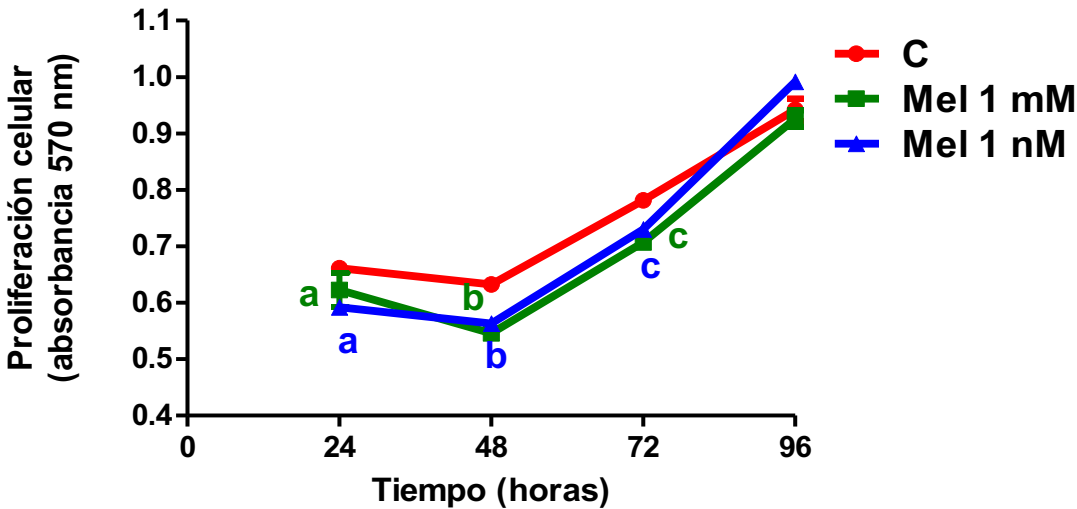


Figura 2

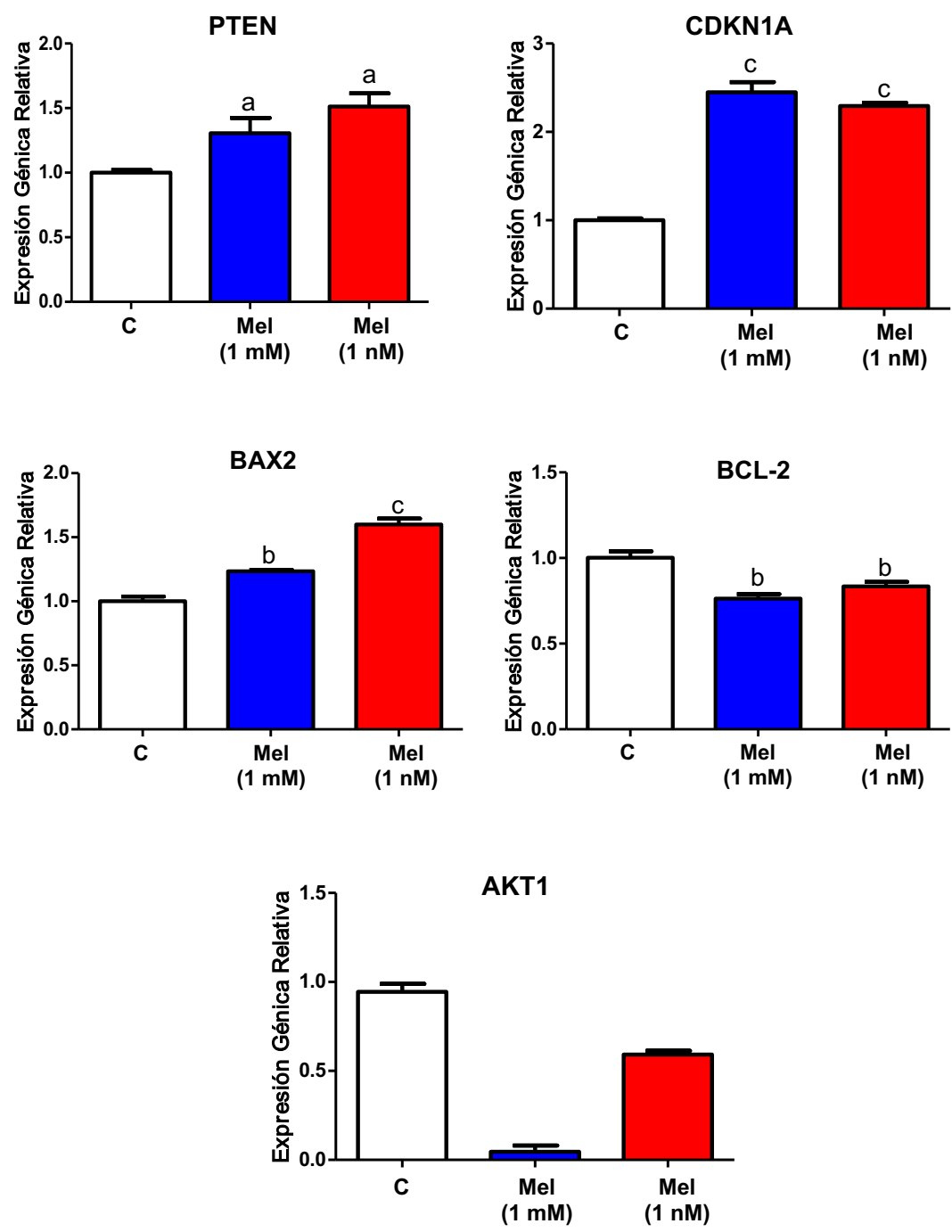
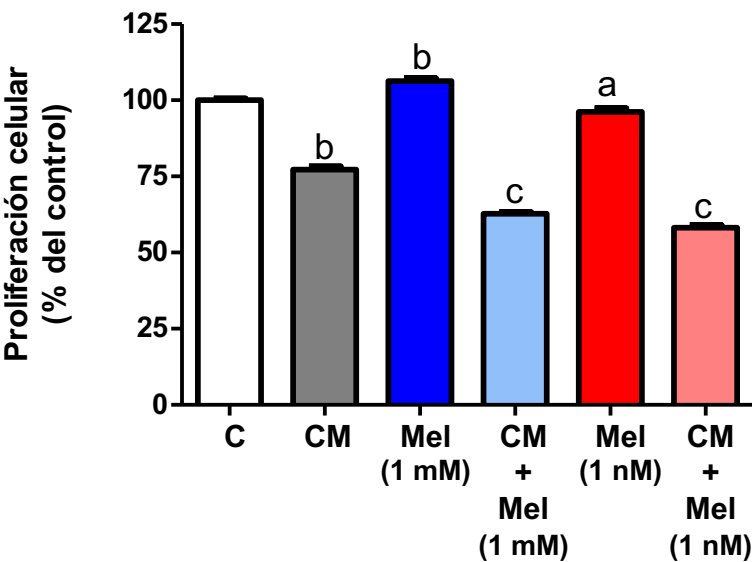


Figura 3

A)



B)

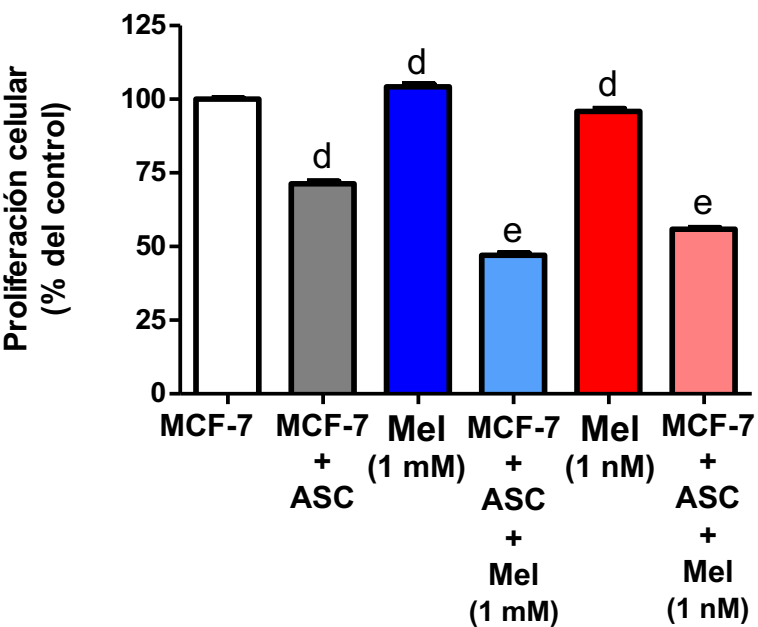


Figura 4

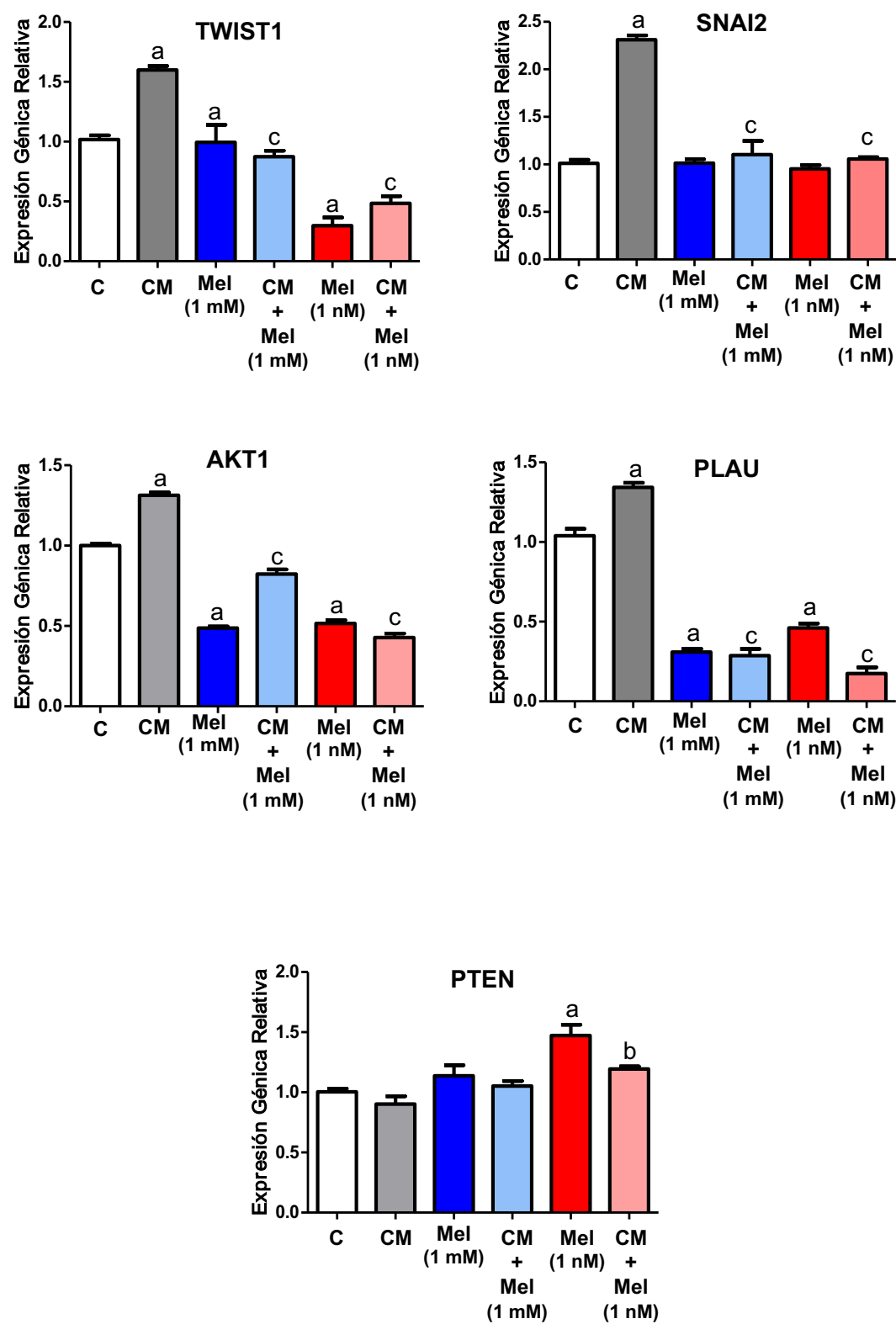


Figura 5

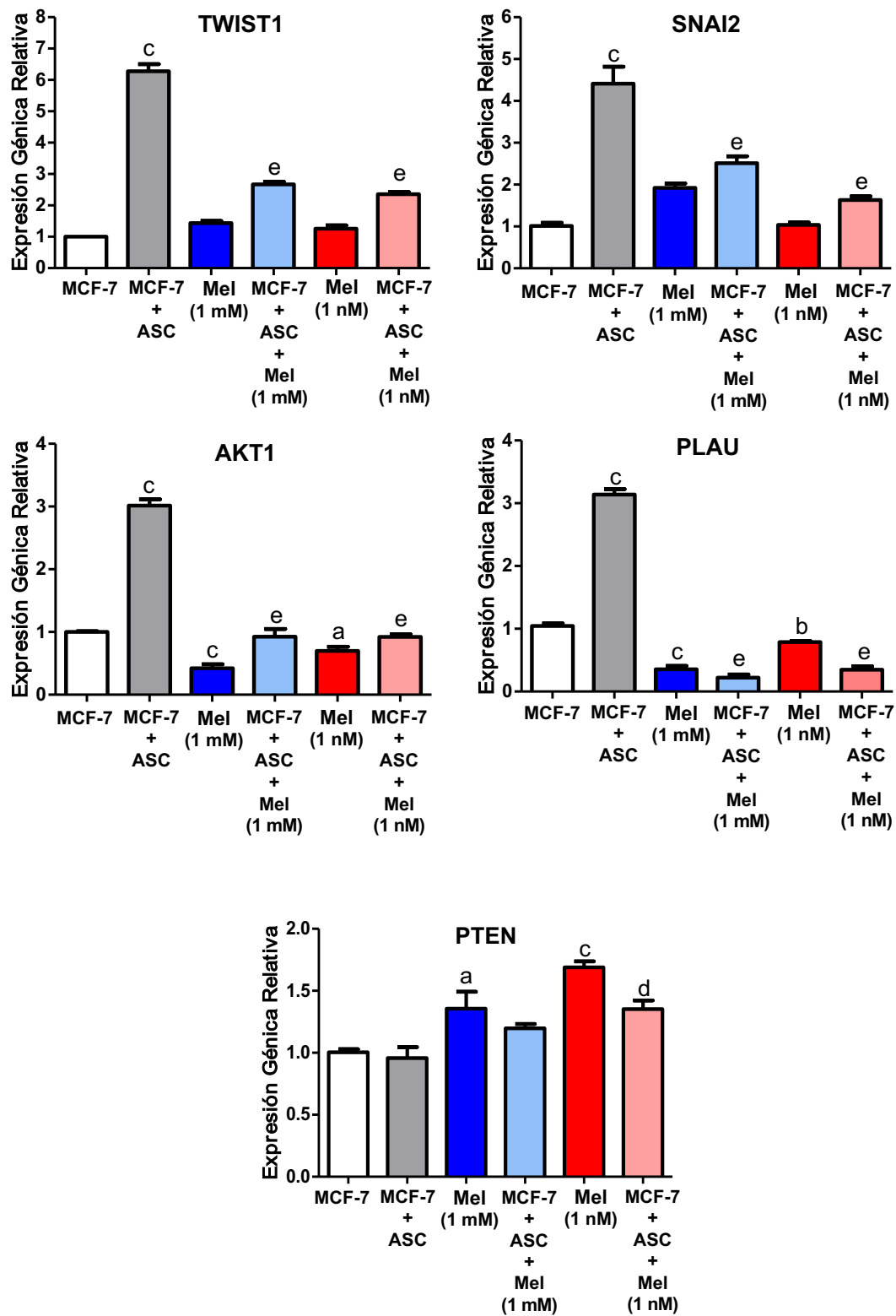


Figura 6

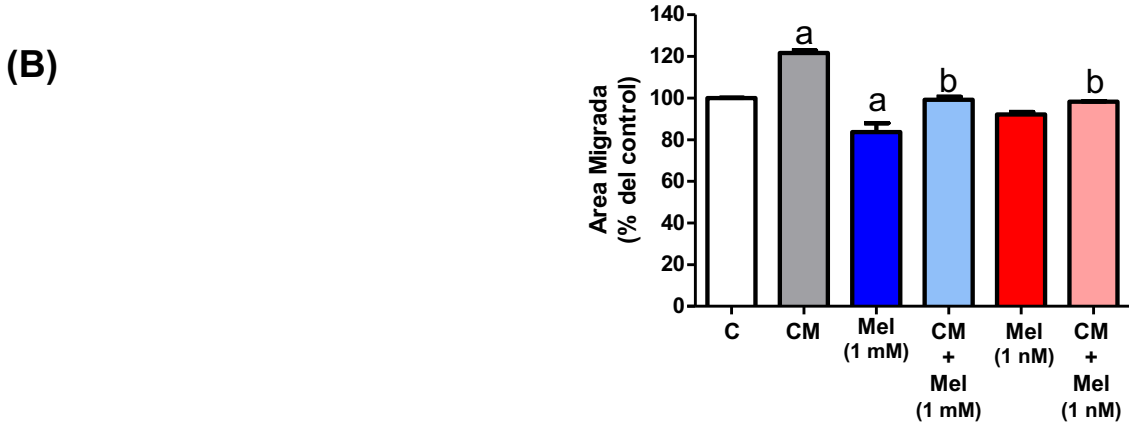
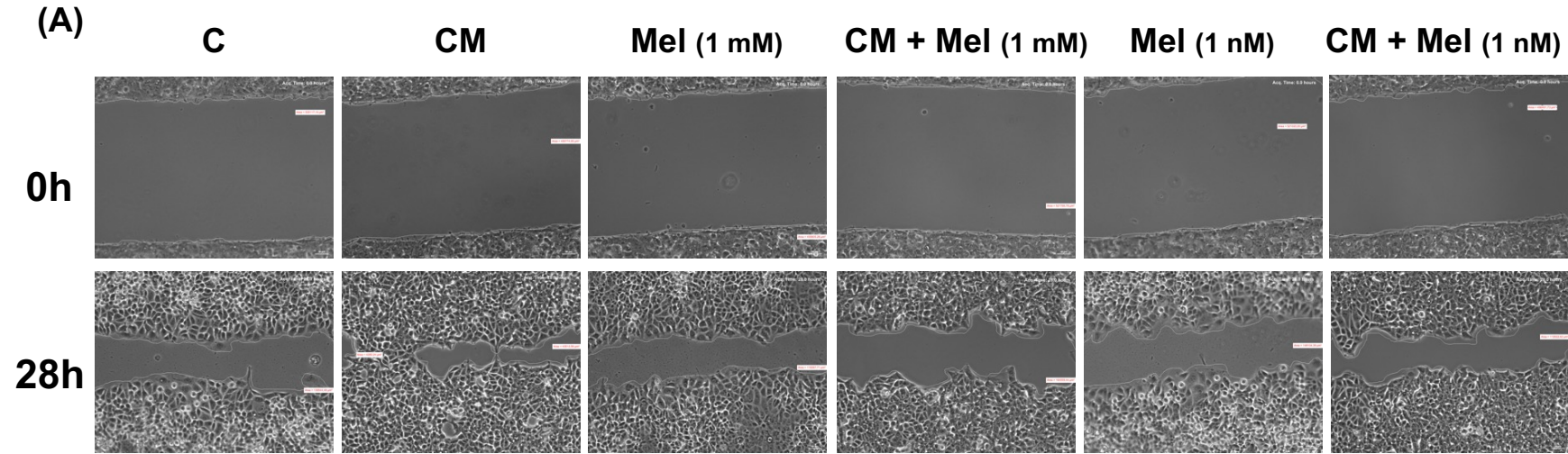


Figura Suplementaria 1

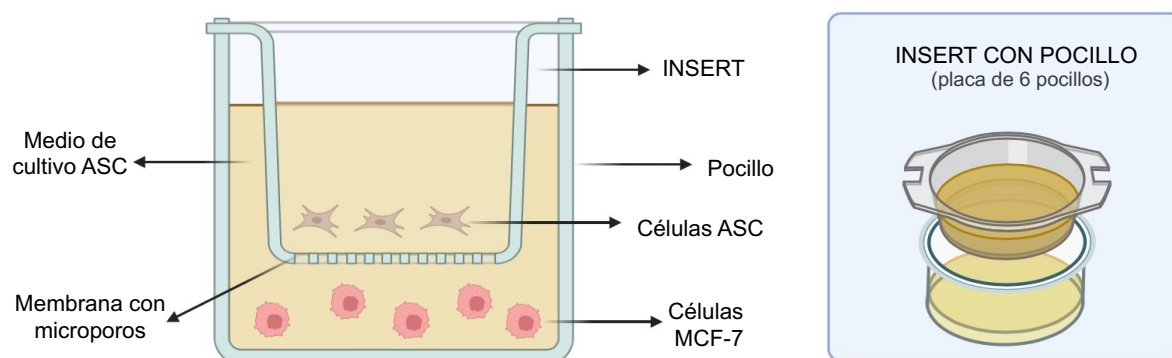


Figura suplementaria 2

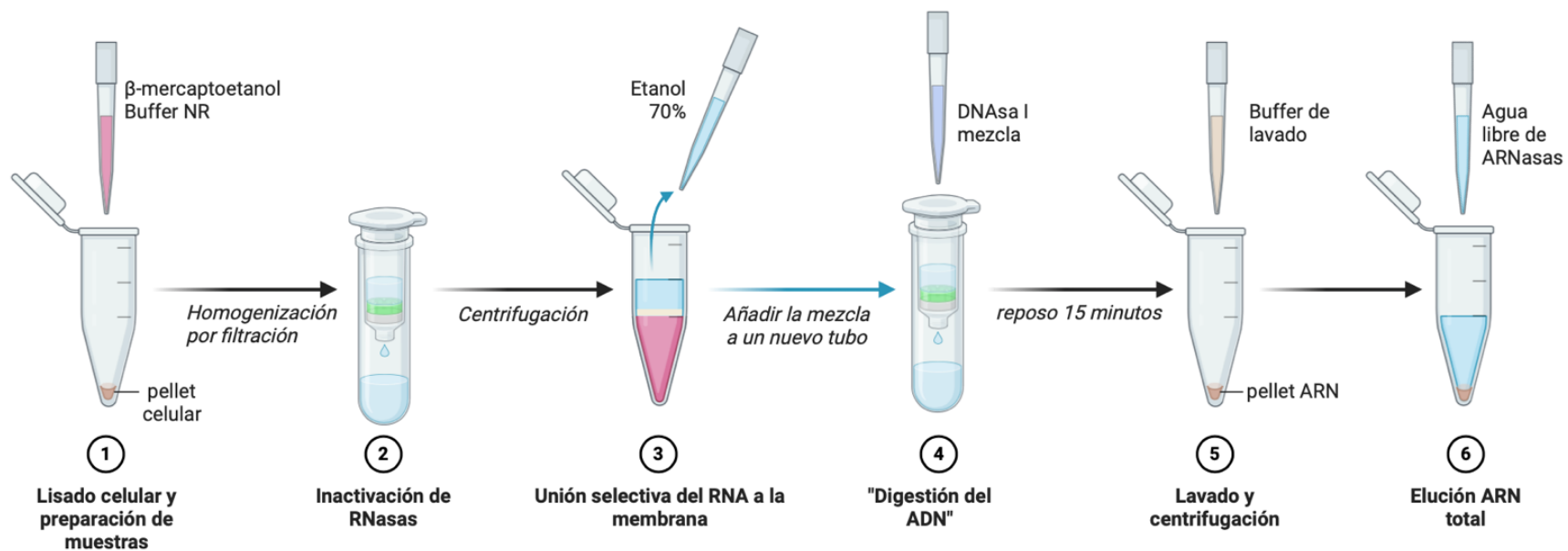


Tabla suplementaria 1

COMPONENTE	CANTIDAD
ARN	1 μg
NZYRT 2x Master Mix	10 μL
NZYRT Enzyme Mix	2 μL
DEPC-H ₂ O	Hasta 20 μL

Tabla suplementaria 2

GEN	SECUENCIA FORWARD	SECUENCIA REVERSE
AKT1	AAGTACTCTTTCCAGACCC	TTCTCCAGCTTGAGGTC
BAX2	AACTGGAAAGTAACATGGAG	TTGCTGGCAAAGTAGAAAAG
BCL-2	CCTTTGAATGGAAGCTTAG	GAGGGAATGTTTTCTCCTTG
CDKN1A	CAGCATGACAGATTTCTACC	CAGGGTATGTACATGAGGAG
PLAU	GCTTTAAGATTATTGGGGGAG	ATGTAGTCCTCCCTCTTTGG
PTEN	GGCTAAGTGAAGATGACAATC	GTTACTCCCTTTTTGTCTCTG
S14	TCCTGCGAGTGCTGTCAGAG	TCACCGCCCTACACATCAAAC
SNAI2	CAGTGATTATTTCCCCGTATC	CCCCAAAGATGAGGAGTATC
TWIST1	CTAGATGTCATTGTTTCCAGAG	CCCTGTTTCTTTGAATTTGG