

GRADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

TRABAJO FIN DE GRADO

Modulación del microambiente tumoral mamario por melatonina: Interacción con la radiación y la diferenciación celular.

Melatonin-Mediated Modulation of the Breast Tumor Microenvironment: Interactions with Radiation and Cellular Differentiation

Autora:

Directora:

Santander,

2025

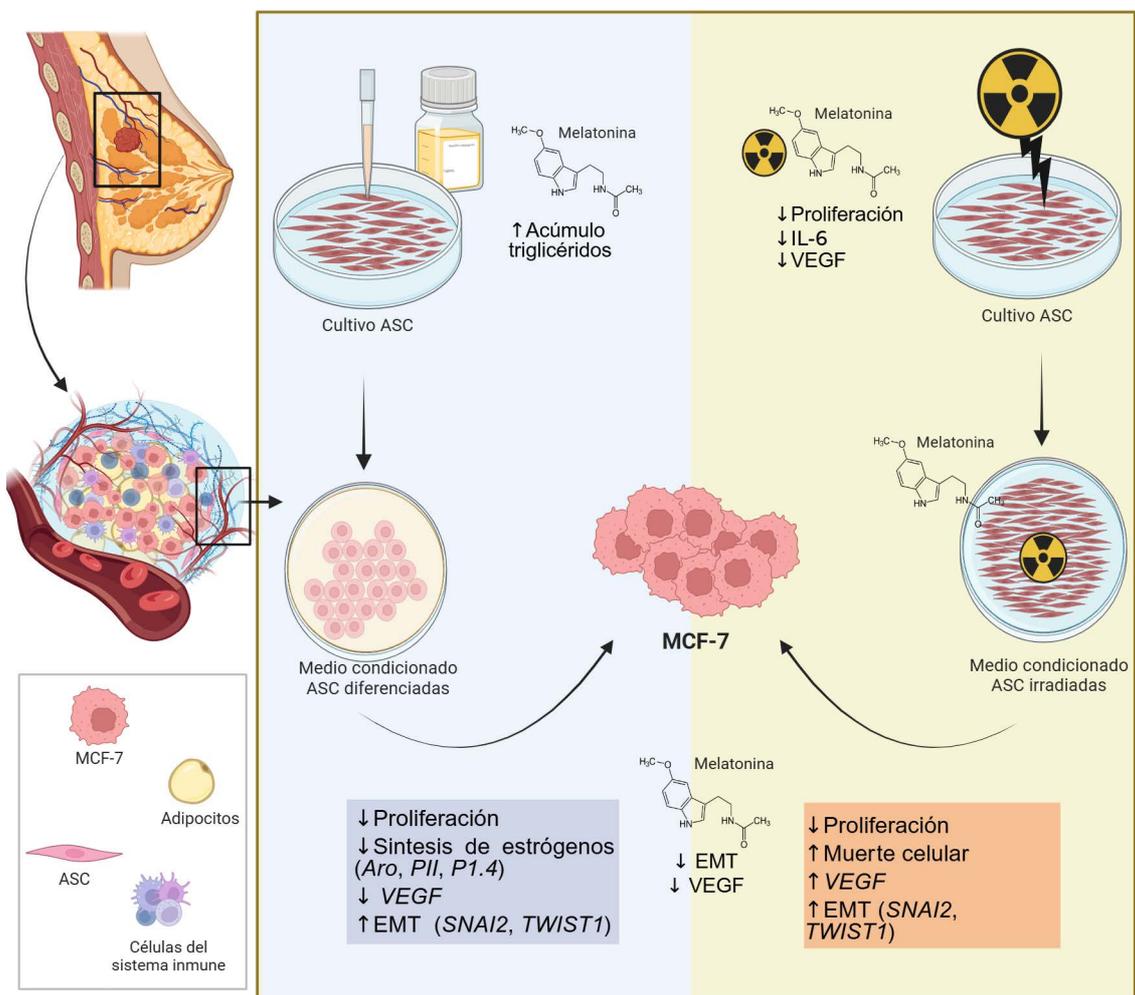
Índice

Título	1
Resumen Gráfico	1
Autores	1
Resumen	2
Abstract	3
Palabras Clave.....	3
Introducción	4
Resultados	6
Papel de la melatonina sobre la diferenciación de células adiposas estromales (ASC).....	6
Influencia de las células ASC diferenciadas sobre las células tumorales mamarias (MCF-7)	7
Evaluación del rol de la melatonina frente a los efectos de la radiación ionizante en células ASC.....	8
Influencia de las células ASC expuestas a radiación ionizante y melatonina sobre las células mamarias tumorales MCF-7.....	10
Discusión	15
Metodología	20
Agradecimientos	28
Bibliografía	29
Información Suplementaria	34

Modulación del microambiente tumoral mamario por melatonina: Interacción con la radiación y la diferenciación celular

RESUMEN GRÁFICO

Modulación del microambiente tumoral mamario



AUTORES

Victoria Álvarez Méndez, Carolina Alonso González

Correspondencia: carolina.alonso@unican.es

Modulación del microambiente tumoral mamario por melatonina: interacción con la radiación y la diferenciación celular

Victoria Álvarez Méndez^{1,2}, Carolina Alonso González^{1,2}

¹ Departamento de Fisiología y Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad de Cantabria

² Instituto de Investigación de Valdecilla (IDIVAL)

* Correspondencia: carolina.alonso@unican.es

RESUMEN

El microambiente tumoral (TME) es un regulador clave en la progresión del cáncer, modulando procesos como proliferación, invasión, angiogénesis y evasión inmune. Dentro del TME, las células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo (ASC) destacan por sus propiedades inmunomoduladoras, la capacidad migratoria y la secreción de factores bioactivos. No obstante, su impacto es dual, con efectos pro- o antitumorales según el contexto.

La inducción de la diferenciación adipocítica de las ASC representa una estrategia relevante para limitar su potencial protumoral. Este proceso reduce su agresividad fenotípica y disminuye la expresión de aromatasa en células tumorales, implicada en la síntesis local de estrógenos. La melatonina potencia dicha diferenciación, contribuyendo a un microambiente menos favorable al crecimiento tumoral.

En paralelo, los efectos de la radiación en células ASC afectan a las células tumorales reduciendo su viabilidad, inhibiendo la proliferación y atenuando la transición epitelio-mesenquimal (EMT), lo que limita su capacidad invasiva. La melatonina amplifica estos efectos, actuando como radiosensibilizante y reforzando la respuesta antitumoral.

Estos hallazgos, obtenidos en un modelo celular de cáncer de mama, subrayan el valor terapéutico potencial de combinar la diferenciación inducida y la melatonina con radiación para modular el TME y frenar la progresión tumoral.

ABSTRACT

The tumor microenvironment (TME) plays a central role in cancer progression, orchestrating key processes such as proliferation, invasion, angiogenesis, and immune evasion. Among the stromal components of the TME, adipose-derived mesenchymal stem cells (ASCs) are notable for their immunomodulatory properties, migratory capacity, and secretion of bioactive factors. However, their role in oncology remains controversial, exhibiting both pro- and antitumor effects depending on the physiological context.

Inducing adipogenic differentiation of ASCs emerges as a relevant strategy to mitigate their protumorigenic potential. Differentiated ASCs adopt a less aggressive phenotype and reduce aromatase expression in tumor cells, limiting local estrogen synthesis. Melatonin enhances this differentiation process, contributing to a microenvironment less conducive to tumor progression.

Concurrently, ionizing radiation applied to tumor cells decreases viability, inhibits proliferation, and attenuates the epithelial-to-mesenchymal transition (EMT), thereby reducing invasive capacity. Melatonin further enhances these effects, acting as a radiosensitizer and reinforcing the antitumor response.

These findings, derived from a breast cancer cell model, highlight the therapeutic potential of combining ASC differentiation and melatonin with radiotherapy to modulate the TME and impede tumor progression.

PALABRAS CLAVE

Microambiente tumoral (TME); células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo (ASC); células tumorales mamarias (MCF-7); diferenciación adipogénica; aromatasa; melatonina; cáncer de mama; radiación ionizante; transición epitelio-mesénquima (EMT); supervivencia celular.

INTRODUCCIÓN

El cáncer de mama es la neoplasia más común entre las mujeres a nivel global y una de las principales causas de mortalidad por cáncer femenino¹. Su comportamiento clínico y biológico es altamente heterogéneo, influenciado no solo por las alteraciones genéticas de las células tumorales, sino también por el microambiente tumoral (TME)². Este entorno dinámico, compuesto por células estromales, inmunes, endoteliales, matriz extracelular y mediadores solubles, desempeña un papel crucial en la progresión tumoral, la resistencia terapéutica y la diseminación metastásica².

En los últimos años, ha aumentado el interés por comprender cómo el microambiente regula distintos aspectos del comportamiento tumoral mediante la liberación de citoquinas y factores de crecimiento (TGF- β , TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8 o VEGF) que favorecen la evasión inmune y la transición epitelio-mesénquima (EMT), contribuyendo a crear un entorno inflamatorio y pro-angiogénico que facilita la progresión tumoral y condiciona la respuesta a la quimioterapia o la radioterapia^{3,4}. Más concretamente, entre los diferentes componentes del TME destacan las células madre mesenquimales derivadas del tejido adiposo (ASC). Se ha descrito que estas células tienen capacidad de migrar al tumor en respuesta a señales quimiotácticas y secretar citoquinas proinflamatorias, factores de crecimiento y enzimas remodeladoras de la matriz extracelular⁵⁻⁷. Dichas moléculas activan vías de señalización clave en las células tumorales tales como PI3K/AKT, STAT3, NF- κ B o MAPK, promoviendo un fenotipo más agresivo.

Por otro lado, las señales paracrinas entre las células tumorales y las células del TME afectan a la producción local de estrógenos y a la diferenciación hacia células adiposas, lo cual contribuye a la alteración del entorno tisular y al desarrollo del tumor. Se ha demostrado que la expresión de la aromatasa, principal enzima implicada en la formación de estrógenos, es mucho más elevada en las células ASC que en los adipocitos maduros⁸. Este proceso ocurre debido a la activación de varios promotores del gen *CYP19* de la aromatasa. Más concretamente al promotor *I.4*; específico de tejido adiposo; y al promotor *II*, sobreexpresado en cáncer de mama.

Por último, numerosos datos en la literatura postulan el uso de las células ASC en las cirugías de reconstrucción mamaria o tras la radioterapia, por su potencial regenerativo⁹. Sin embargo, diversos estudios han demostrado que la radioterapia puede modificar el comportamiento de las ASC al alterar su secretoma¹⁰, aumentando la liberación de factores proangiogénicos e inflamatorios que contribuyen a un entorno más resistente y favorecedor de la progresión tumoral¹¹.

Por todo ello, múltiples estrategias dirigidas a modificar el microambiente tumoral se han centrado en la inhibición de citoquinas inflamatorias y factores angiogénicos, así como en la regulación del secretoma, con el fin de contrarrestar la progresión tumoral y mejorar la respuesta a los tratamientos convencionales^{11,12}. La diferenciación de las ASC hacia adipocitos maduros representa también una vía prometedora, ya que disminuye la secreción de IL-6, TNF- α y VEGF, y atenúa la activación de vías como NF- κ B y STAT3, reduciendo así la EMT y la progresión tumoral.

La melatonina ha emergido como un modulador potencial del microambiente. Esta indolamina, sintetizada por la glándula pineal, posee propiedades antitumorales, antiinflamatorias y antiangiogénicas. Se ha demostrado que puede reducir la secreción de IL-6 y TNF- α , disminuir la producción de factores pro-angiogénicos como el VEGF o inhibir la EMT¹³. Aunque su capacidad para inducir la diferenciación de las ASC hacia

adipocitos maduros es controvertida^{14,15}, sí se ha descrito que inhibe la expresión de aromatasa en el tejido mamario y en el tejido peritumoral, reduciendo la producción local de estrógenos¹⁶. Además, en presencia de radiación, la melatonina contrarresta efectos adversos como el aumento de la permeabilidad endotelial y la activación de rutas proangiogénicas, potenciando así el efecto terapéutico de la misma¹⁷.

El presente trabajo tiene como objetivo general profundizar en el papel del microambiente tumoral en la progresión del cáncer de mama, con especial atención a la contribución de las células madre mesenquimales derivadas del tejido adiposo (ASC). De forma específica, se plantean dos objetivos principales: por un lado, analizar el efecto de la melatonina sobre la diferenciación de las células ASC y el papel que dicha diferenciación podría tener en un contexto tumoral; y por otro, evaluar la capacidad de esta indolamina para modular los efectos de la radiación sobre las células ASC y su impacto en el comportamiento de las células tumorales mamarias. Estas aproximaciones permitirán valorar el potencial de la melatonina como agente modulador del entorno tumoral en el cáncer de mama.

RESULTADOS

Papel de la melatonina sobre la diferenciación de células adiposas estromales (ASC)

Con el propósito de evaluar el efecto de la melatonina sobre la diferenciación de las células adiposas estromales (ASC), se llevó a cabo un experimento de inducción adipogénica durante un período de 8 días. Se establecieron tres grupos experimentales: un grupo control y dos grupos tratados con melatonina a dosis fisiológica (1 nM) y farmacológica (1 mM), respectivamente. En la **Figura 1A** se muestran imágenes representativas de la tinción con Oil Red O, donde se puede comprobar que todos los grupos experimentales exhibieron cambios morfológicos característicos de la diferenciación adipogénica, evidenciándose una transición de un fenotipo alargado, típico de las ASC, a una morfología más redondeada (propia de adipocitos) con tinción de las gotas lipídicas localizadas alrededor del núcleo celular. Se observó una mayor acumulación lipídica en los grupos tratados con melatonina en comparación con las células control. Sin embargo, la intensidad y cantidad de lípidos acumulados fue menor a la esperada para una diferenciación adipogénica completa, en comparación con otras líneas celulares como 3T3L-1.

La cuantificación del acúmulo de lípidos se presenta en la **Figura 1B**. Tal y como puede observarse, los grupos tratados con melatonina mostraron un incremento significativo en la acumulación de triglicéridos en comparación con el grupo control, siendo este efecto más pronunciado a la concentración farmacológica de la indolamina.

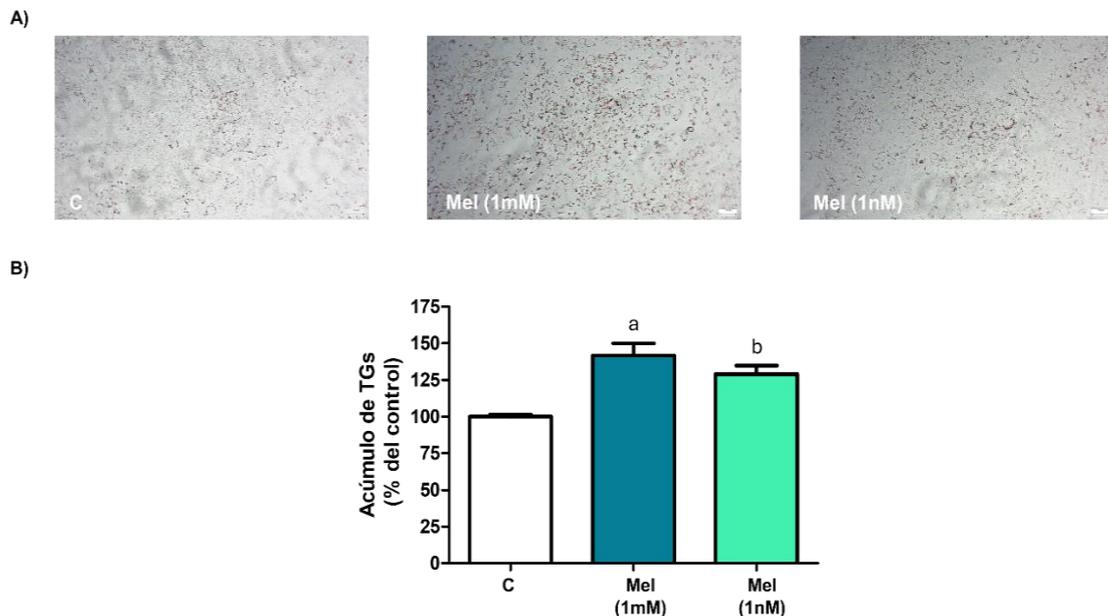


Figura 1. Efectos de la melatonina sobre la diferenciación adipogénica de las células ASC.

(A) Fotografías tomadas al microscopio de un campo representativo de cada grupo experimental teñido mediante Oil Red O. (B) Cuantificación del acúmulo de triglicéridos, expresado en porcentaje del control. C: Control; Mel: Melatonina. a, $p < 0,001$ vs Control; b, $p < 0,01$ vs Control.

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

Con el fin de analizar si la diferenciación adipogénica de las células ASC tenía algún efecto sobre las células tumorales de mama (MCF-7), se realizó un estudio de proliferación en estas células, empleando medio condicionado procedente de ASC diferenciadas. Como se observa en la [Figura 2A](#), la incubación de las células MCF-7 con medio de diferenciación de ASC inhibió de manera significativa su crecimiento en comparación con las células incubadas con medio no condicionado. Del mismo modo, la melatonina a concentración farmacológica (1 mM) potenció aún más este efecto inhibitorio sobre el crecimiento celular.

Asimismo, considerando el papel clave de la síntesis de estrógenos a nivel del microambiente tumoral mamario y sus efectos sobre la proliferación, se decidió evaluar los cambios que el medio condicionado inducía sobre la expresión génica de la principal enzima convertidora, la *aromatasa*, así como de dos de sus promotores: *P11* y *P1.4*. Como se muestra en la [Figura 2B](#), la incubación con medio condicionado obtenido durante la diferenciación de células ASC indujo una disminución significativa en la expresión de los tres genes mencionados. De manera similar, la presencia de melatonina en dicho medio generó un efecto inhibitorio adicional sobre dicha expresión, a ambas concentraciones evaluadas.

Por último, dado que la diferenciación de las ASC hacia un fenotipo adipocítico conlleva la pérdida de características mesenquimales asociadas a su perfil pro-tumorogénico, se planteó analizar cómo este cambio afectaría a la expresión de genes relacionados con la transición epitelio-mesénquima (EMT) y procesos angiogénicos en las células MCF-7. Por ello, se llevó a cabo el análisis de los cambios en la expresión de los genes *VEGF* (factor de crecimiento endotelial vascular); *SNAI2* (gen correspondiente al represor 2 - slug - de la transcripción de la familia de SNAIL); y *TWIST1* (proteína 1 relacionada con la torsión), ambos factores de transcripción clave en la adquisición del fenotipo mesenquimal. Los resultados se muestran también en la [Figura 2B](#). En el caso del factor de crecimiento *VEGF*, la incubación con medio procedente del cultivo de ASC redujo su expresión significativamente en comparación con el medio no condicionado. Por el contrario, la expresión de los genes relacionados con la EMT, *SNAI2* y *TWIST1*, se vio aumentada en presencia del medio condicionado. Por último, en los tres casos el tratamiento con melatonina redujo significativamente la expresión relativa de estos genes, tanto a concentración fisiológica como farmacológica.

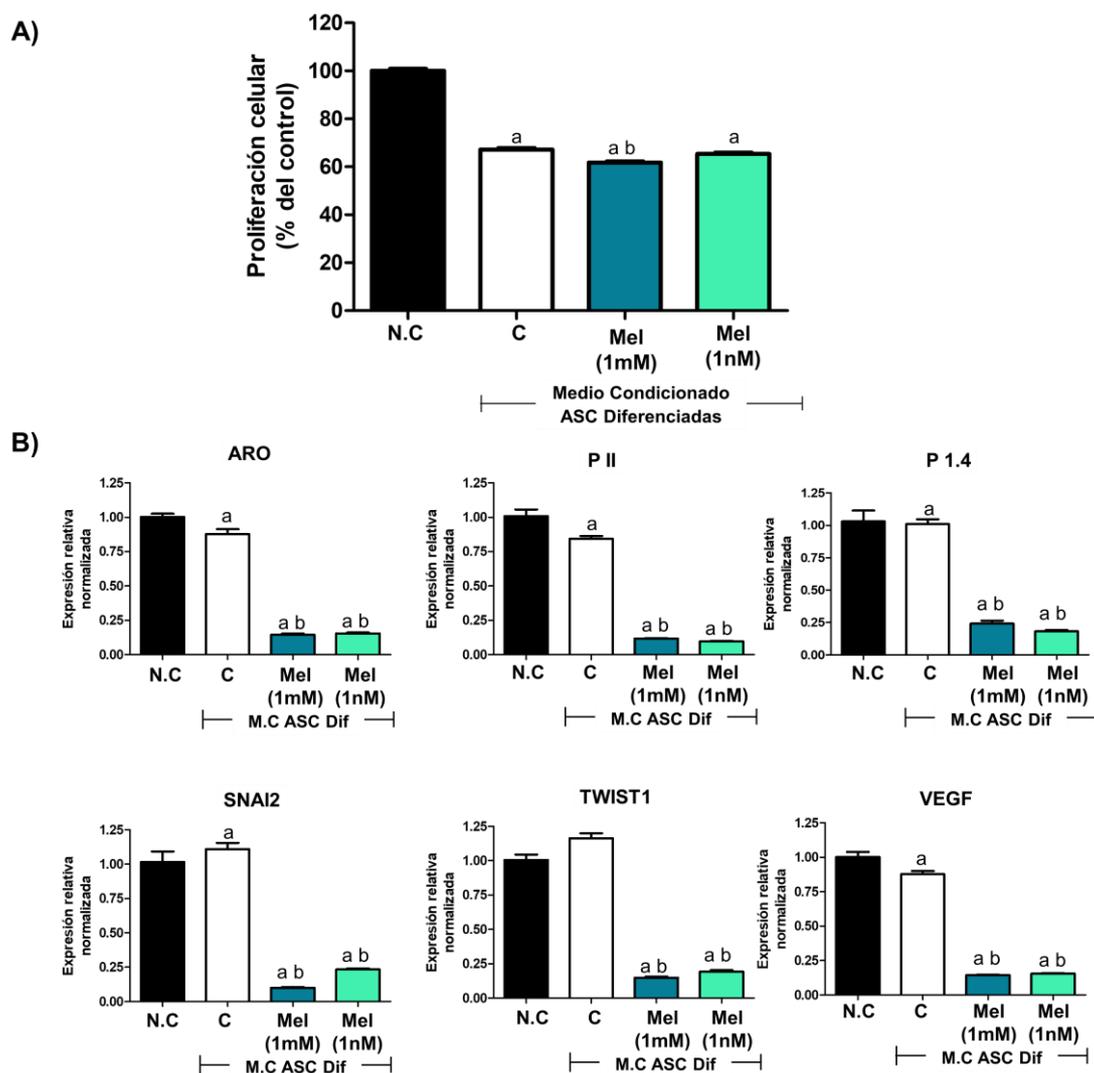


Figura 2. Influencia del medio condicionado obtenido de ASC diferenciadas sobre las células tumorales MCF-7.

(A) Proliferación de células MCF-7 tras 5 días de incubación en medio condicionado obtenido de células ASC durante su diferenciación. Los resultados se expresan en porcentaje de las células control (N.C). (B) Cambios en la expresión relativa normalizada de los genes *Aro* (Aromatasa), *P11* (*promotor II*), *P1.4* (*promotor 1.4.*), *VEGF*, *SNAI2* y *TWIST1*. N.C: Medio no Condicionado; C: Control; Mel: Melatonina. a, $p < 0,001$ vs medio no condicionado; b, $< 0,001$ vs control.

Evaluación del rol de la melatonina frente a los efectos de la radiación ionizante en células ASC

En primer lugar, se realizó un estudio de proliferación en las células ASC expuestas a distintas dosis de radiación para decidir la dosis más adecuada (Figura S1), escogiéndose la dosis de 8 Gy al ser la que mostraba un efecto inhibitor más significativo sobre las células control. A continuación, se decidió profundizar en el papel modulador de la melatonina frente a los efectos inducidos por la radiación ionizante en esta línea celular. Tal y como se muestra en la Figura 3A, la radiación inhibió de manera

significativa el crecimiento celular en el grupo control a los cinco días. Por su parte, la melatonina fue capaz de potenciar el efecto inhibitor de la radiación ionizante, tanto a dosis fisiológica (1 nM) como farmacológica (1 mM).

En segundo lugar, se estudiaron los cambios en la expresión de diversos genes en respuesta a la radiación ionizante sola o en presencia de melatonina en el medio de cultivo. Además de los genes ya descritos en el apartado anterior (*VEGF*, *SNAI2* y *TWIST1*) se incluyó el gen que codifica para la IL-6, una citoquina de perfil proinflamatorio liberada por las células ASC y relacionada también con el inicio de la transición epitelio-mesénquima. Los resultados se muestran en la **Figura 3B**.

Respecto a *VEGF*, la radiación ionizante inhibió de manera significativa la expresión de este factor angiogénico y dicho efecto fue potenciado por la adición de melatonina al medio de cultivo.

En el caso de *IL-6*, no se encontraron cambios significativos en su expresión ni en las células radiadas ni con el tratamiento con melatonina a dosis 1 mM. Sorprendentemente, sí se evidenció una reducción significativa de su expresión en aquellas células irradiadas y tratadas con melatonina a dosis fisiológica (1 nM).

Por último, en relación con los genes relacionados con la transición epitelio-mesénquima, la radiación aumentó de manera significativa la expresión de *SNAI2* pero no indujo ningún cambio significativo sobre la expresión de *TWIST1*. No obstante, en ambos genes la melatonina indujo una disminución significativa de su expresión con respecto a las células radiadas, a ambas dosis ensayadas.

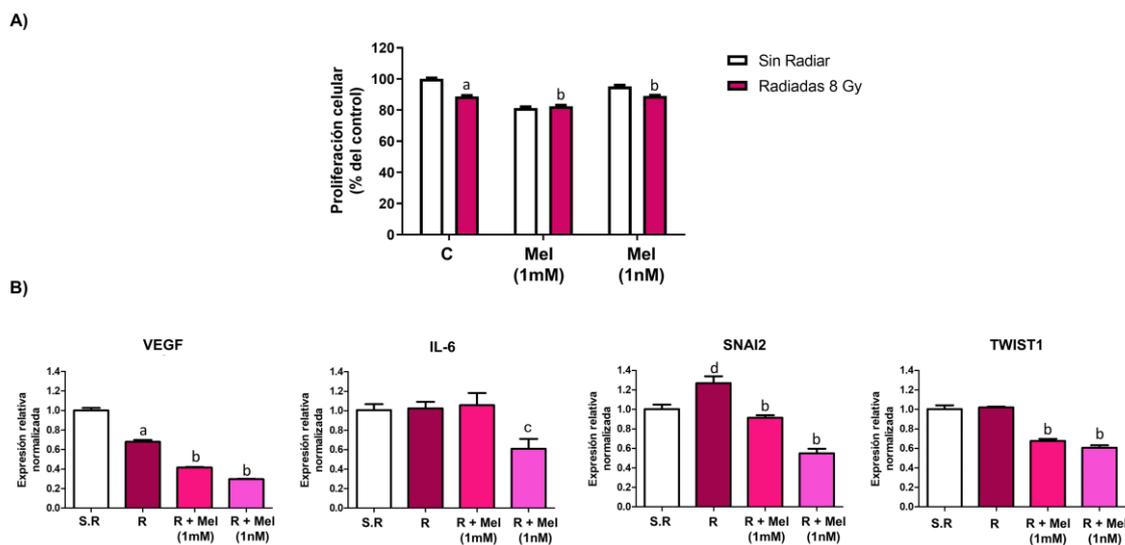


Figura 3. Efectos moduladores de la melatonina sobre la radiación en células ASC.

(A) Proliferación de células ASC expuestas a radiación ionizante (8 Gy) sola o en presencia de melatonina (1 mM, 1 nM) en el medio de cultivo. La proliferación se valoró cinco días después de la irradiación y los resultados fueron expresados en porcentaje del control. **(B)** Cambios en la expresión de los genes *VEGF*, *IL-6*, *SNAI2* y *TWIST1* en respuesta a radiación ionizante, sola o combinada con melatonina. C: Control; Mel: Melatonina; S.R: Sin radiar; R: Radiadas. a, $p < 0,001$ vs S.R.; b, $p < 0,001$ vs R; c, $p < 0,05$ vs R; d, $p < 0,01$ S.R

Influencia de las células ASC expuestas a radiación ionizante y melatonina sobre las células mamarias tumorales MCF-7

Dado que los cambios inducidos por la radiación ionizante y la melatonina sobre las células ASC podrían modificar su comportamiento secretor, el siguiente objetivo de este trabajo consistió en emplear medio condicionado de las células ASC tras su exposición a radiación (8Gy), con o sin tratamiento de melatonina a dosis fisiológica (1 nM) o farmacológica (1 mM), y valorar sus efectos sobre las células tumorales MCF-7.

En primer lugar, se estudiaron los efectos de este medio condicionado sobre la proliferación de las células MCF-7. Tal y como se observa en la [Figura 4A](#), el medio condicionado procedente de las células ASC inhibió significativamente el crecimiento de las células MCF-7 y no se observaron diferencias significativas cuando el medio procedía de células que habían sido irradiadas. Este efecto inhibitorio fue potenciado de manera significativa por la melatonina a dosis farmacológica (1 mM).

A continuación, se decidió estudiar las interacciones paracrinae que existían entre ambos tipos celulares, empleando para ello un modelo de cocultivo. Como se aprecia en la [Figura 4B](#), los resultados fueron muy similares a los obtenidos con el medio condicionado ya que nuevamente la presencia de las células mesenquimales redujo de forma significativa el crecimiento de las células MCF-7 y este efecto inhibitorio fue potenciado cuando el cocultivo fue sometido a radiación ionizante. No obstante, en este modelo experimental la adición de melatonina al medio de cultivo no potenció el efecto inhibitorio obtenido con la radiación ionizante.

Por último, para valorar la capacidad de las células MCF-7 de formar colonias en presencia de los diferentes medios condicionados se realizó un ensayo de clonogenicidad cuyos resultados se presentan en la [Figura 4C y 4D](#). La capacidad de formar colonias no se vio afectada por la incubación con medio condicionado procedente de células ASC sin radiar. Sin embargo, sí se redujo de manera muy significativa cuando las células tumorales fueron incubadas con medio condicionado de células ASC irradiadas. En cuanto a los medios condicionados que contenían melatonina, el número de colonias fue significativamente mayor que en el caso del control radiado, no habiéndose demostrado por tanto el papel inhibitorio de esta indolamina sobre la formación de colonias.

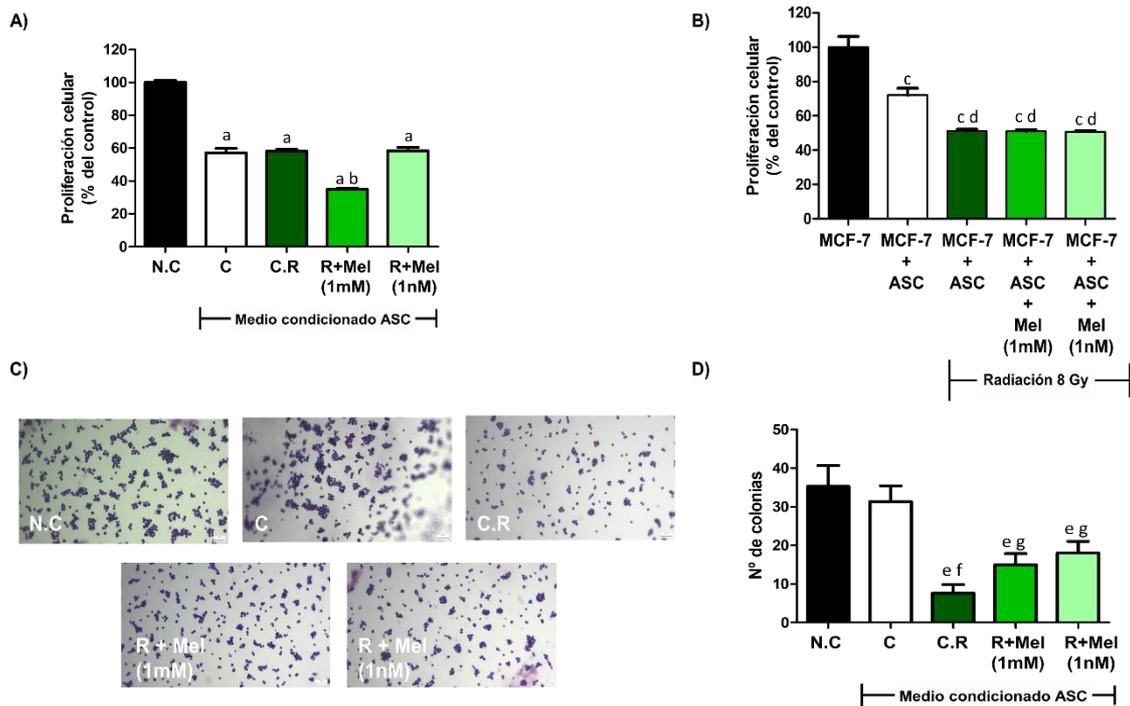


Figura 4. Efectos de las células ASC expuestas a melatonina y radiación sobre el crecimiento de las células MCF-7.

(A) Proliferación de células MCF-7 tras cinco días de incubación en presencia de medio condicionado de ASC expuestas a radiación ionizante (8 Gy) sola o en presencia de melatonina (1 mM, 1 nM). Los resultados se expresan en función del porcentaje del control no condicionado (NC). **(B)** Cocultivos de células ASC y MCF-7 radiados (8 Gy), en presencia o ausencia de melatonina. La proliferación se midió sobre las células tumorales tras cinco días y los resultados se expresan en función de las células MCF-7. **(C)** Imágenes representativas del ensayo clonogénico de células MCF-7 expuestas a los diferentes medios condicionados durante 8 días. **(D)** Cuantificación del número de colonias teñidas con cristal violeta bajo cada condición experimental. N.C: Medio no condicionado. C: Control. C.R: Control irradiado. R: Radiación. Mel: Melatonina. a, $p < 0,001$ vs N.C; b $p < 0,001$ vs CR; c, $p < 0,001$ vs MCF-7; d, $p < 0,01$ vs MCF-7+ASC; e, $p < 0,01$ vs NC; f, $p < 0,01$ vs C; g, $p < 0,05$ vs C.

Dado que se observó una menor tasa de proliferación en las células tumorales que habían estado en contacto directa o indirectamente (a través del medio condicionado) con las células ASC, en el siguiente grupo de experimentos se decidió valorar los posibles cambios en la expresión de genes relacionados con el ciclo celular y la apoptosis (*AKT1*, *CDKN1A* y *BAX2*) como se muestra en la [Figura 5A](#). Tanto en el caso de *AKT1* como de *CDKN1A* (p21), dos genes relacionados con el control del ciclo celular, la expresión génica se vio inhibida de manera significativa con el medio condicionado, siendo este efecto incrementado por la radiación ionizante. Sin embargo, la melatonina sólo fue capaz de potenciar de manera significativa el efecto inhibitor de la radiación cuando fue añadida a dosis fisiológicas (1 nM). El último de los genes analizados fue *BAX2* (proteína 4 similar a Bcl-2), relacionado con la apoptosis. Como en los casos anteriores, la presencia de las células ASC inhibió de manera significativa su expresión con respecto a las células incubadas con medio no condicionado. En este caso la radiación no potenció este efecto, aumentando su expresión de manera

significativa con respecto al grupo de células incubadas con medio condicionado procedente de células no radiadas. Este efecto de la radiación ionizante fue disminuido de manera significativa por la adición de melatonina al medio de cultivo, a ambas dosis empleadas.

Con el fin de estudiar el porcentaje de viabilidad de las células se realizó la de determinación de apoptosis con Anexina V, obteniendo los datos representados en la **Figura 5B y 5C**. Los resultados no mostraron una activación de la apoptosis en ninguna de las condiciones ensayadas. Sólo el grupo tratado con melatonina a dosis fisiológica exhibió una disminución significativa de la viabilidad celular y un aumento de la necrosis.

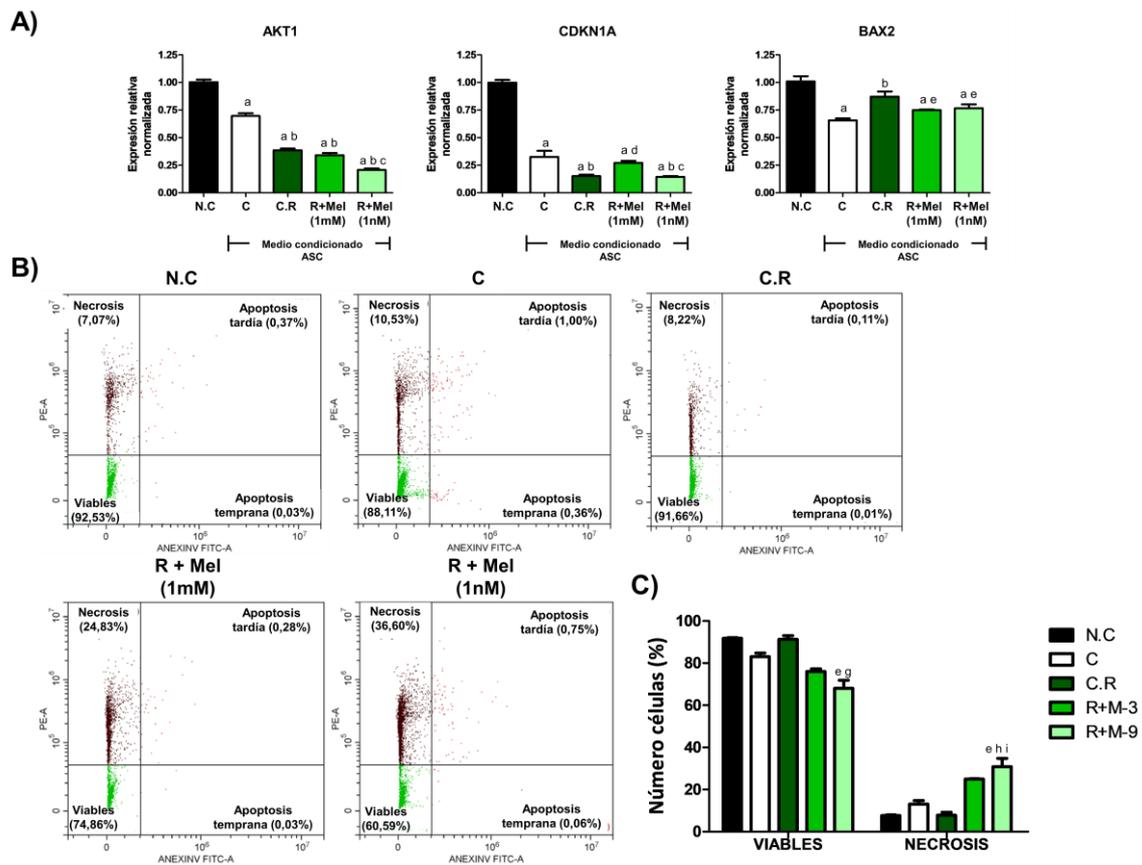


Figura 5. Papel de la melatonina en el efecto del medio condicionado de células ASC radiadas sobre la supervivencia de células MCF7.

(A) Cambios en la expresión de los genes *AKT1*, *CDKN1A* y *BAX2* en células MCF-7 tratadas con medios condicionados procedentes de células ASC expuestas a radiación ionizante, sola o combinada con melatonina. **(B)** Ensayo de muerte celular mediante marcaje con anexina V y yoduro de propidio (IP). N.C: Medio no condicionado. C: Control. C.R: Control irradiado. R: Radiación. Mel: Melatonina. a, $p < 0,001$ vs N.C; b, $p < 0,001$ vs C; c, $p < 0,001$ vs C.R; d, $p < 0,01$ vs C.R; e, $p < 0,05$ vs C.R; g, $p < 0,01$ vs N.C; h, $p < 0,05$ vs N.C; i, $p < 0,05$ vs C.

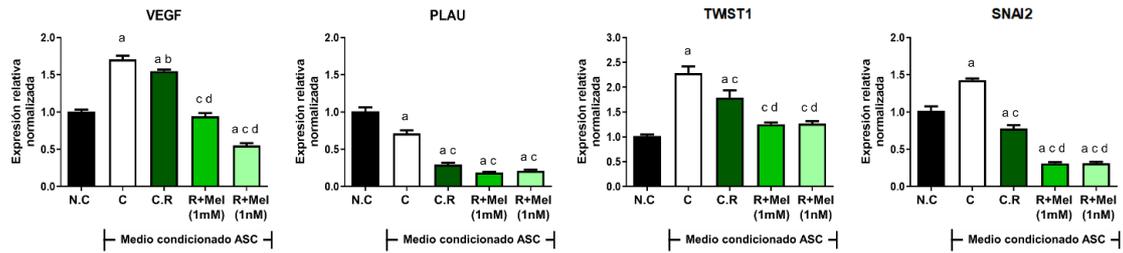
Por último, dado que la transición epitelio-mesénquima se correlaciona con una menor actividad proliferativa de las células tumorales, se decidió valorar la influencia del medio condicionado sobre procesos clave en la progresión tumoral como son la migración o la transición EMT. Para ello en primer lugar se estudiaron los cambios en la expresión de diversos genes relacionados con estas vías (*VEGF*, *PLAU*, *SNAI2* y *TWIST1*).

Como se muestra en la **Figura 6A**, la expresión de *VEGF* aumentó de manera significativa con el medio condicionado de ASC y este efecto fue revertido parcialmente por la radiación ionizante. La adición de melatonina al medio de cultivo potenció el efecto de la radiación a ambas dosis empleadas.

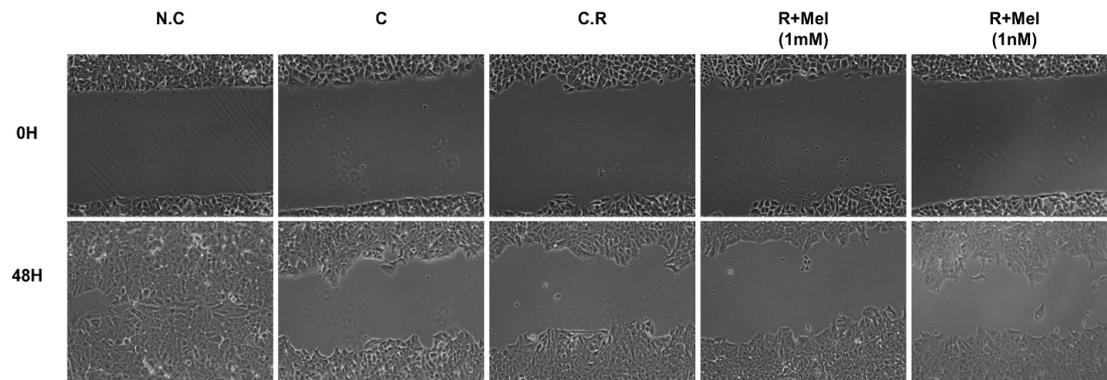
En relación con los genes implicados en la transición epitelio-mesénquima, *SNAI2* y *TWIST1*, los resultados son muy similares a los descritos para el factor *VEGF*. Sin embargo, en el caso de *PLAU*, un gen implicado en adhesión que promueve la degradación de la membrana extracelular, el medio condicionado inhibió de manera significativa su expresión y dicho efecto fue potenciado por la radiación ionizante.

Para complementar estos resultados se decidió investigar los efectos de los diferentes medios condicionados sobre la capacidad migratoria de las células MCF-7, empleando para ello un ensayo de cicatrización de heridas (Wound Healing). Como se aprecia en las imágenes de la **Figura 6B**, la herida se cerró completamente tras 48 horas de observación en aquellas células incubadas con medio no condicionado. Sin embargo, la incubación con medio condicionado de células ASC resultó en una disminución significativa de la distancia migrada en comparación con las células control. No se observaron diferencias ni con la radiación ni con la adición de melatonina al medio de cultivo (**Figura 6C**).

A)



B)



C)

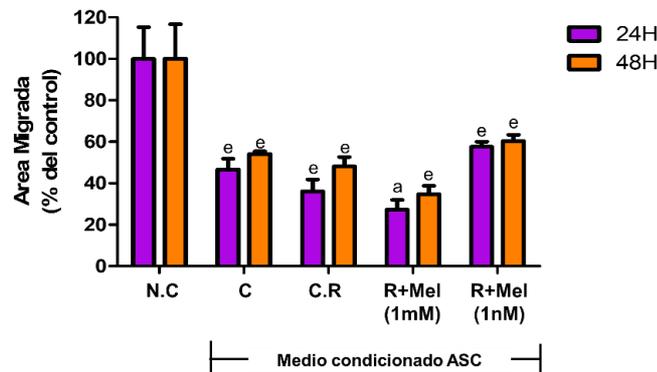


Figura 6. Efectos de la melatonina y del medio condicionado de células ASC radiadas sobre la migración de células MCF7.

(A) Cambios en la expresión de los genes *VEGF*, *PLAU*, *TWIST1* y *SNAIL2* en células MCF-7 tratadas con medios condicionados procedentes de células ASC expuestas a radiación ionizante, sola o combinada con melatonina. (B) Imágenes representativas iniciales (0 h) y finales (48 horas) del ensayo de migración de células MCF-7 en presencia de los diferentes medios condicionados. Escala 500 μm. (C) Cuantificación del área migrada a las 24 h y 48 h con respecto a las células control. N.C.: Medio no condicionado. C.: Control. C.R.: Control irradiado. R: Radiación. Mel: Melatonina. a, p < 0,001 vs N.C.; b, p < 0,01 vs C; c, p < 0,001 vs C; d, p < 0,001 vs C.R.; e, p < 0,01 vs N.C.

DISCUSIÓN

Las células adiposas estromales (ASC) representan un componente fundamental del microambiente tumoral mamario debido a su capacidad multipotencial y a su participación en procesos como la remodelación tisular, la angiogénesis y la inmunomodulación¹⁸. Si bien no son consideradas tumorigénicas *per se*, su interacción bidireccional con las células tumorales puede favorecer un microambiente protumoral, promoviendo fenómenos como la transición epitelio-mesenquimal (EMT), la inflamación y la progresión neoplásica¹⁹.

La capacidad de estas células ASC para diferenciarse hacia distintos linajes adquiere un papel crítico en el contexto tumoral. Bajo la influencia de señales derivadas del tumor, estas células pueden diferenciarse en fibroblastos asociados a cáncer (CAF), caracterizados por un perfil secretor proinflamatorio, proangiogénico y facilitador de la progresión tumoral²⁰. En contraposición, su diferenciación hacia adipocitos parece representar una vía menos tumorigénica, asociada a la pérdida de características mesenquimales y a una menor expresión de enzimas como la aromatasa, clave en la síntesis de estrógenos a nivel local y sobreexpresada en tumores mamarios dependientes de hormonas²¹. Se ha descrito en la literatura que esta enzima disminuye significativamente cuando las ASC adquieren un fenotipo adipocítico, lo que sugiere un posible efecto modulador del microambiente tumoral a través de la inducción de su diferenciación²².

La melatonina, hormona secretada por la glándula pineal, ha demostrado un papel relevante en el cáncer de mama hormono-dependiente debido a su capacidad para modular la síntesis local de estrógenos. Específicamente, inhibe la expresión y actividad de la enzima aromatasa tanto en células tumorales como del microambiente tumoral, reduciendo por tanto la actividad proliferativa del tumor²³. Asimismo, esta indolamina ha sido ampliamente estudiada por su capacidad para inducir o favorecer la diferenciación en diversos tipos celulares, incluidos osteoblastos, neuronas o células tumorales, a través de mecanismos que involucran rutas de señalización específicas y regulación génica^{24,25}.

Por todo ello, en este trabajo se decidió investigar en primer lugar la capacidad de la melatonina sobre la diferenciación adipocítica de las células estromales adiposas (ASC), dado que la adquisición de este fenotipo puede modificar su papel en el microambiente tumoral, volviéndolas menos protumorigénicas. Aunque algunos estudios cuestionan la capacidad de las ASC para diferenciarse eficientemente a adipocitos bajo ciertas condiciones *in vitro*²⁶, en nuestro trabajo se evidenciaron cambios morfológicos compatibles con dicha diferenciación, en especial tras el tratamiento con melatonina. Así, las células adoptaron una morfología redondeada con acumulación de gotas lipídicas, características típicas de adipocitos, aunque con menor intensidad de lo esperado en comparación con otras líneas celulares²⁷. Cabe destacar que existe bibliografía que describe un efecto inhibitorio de la melatonina sobre la diferenciación adipogénica²⁸. Sin embargo, en nuestro modelo experimental se evidenció un aumento significativo en la acumulación de triglicéridos en los grupos tratados con melatonina.

Con el objetivo de evaluar el impacto de las ASC diferenciadas sobre las células tumorales mamarias (MCF-7), se decidió valorar el efecto del medio condicionado procedente de células ASC durante su proceso de diferenciación sobre dichas células. En nuestro caso, la presencia del medio condicionado inhibió significativamente el crecimiento de las células tumorales y la melatonina a dosis altas fue capaz de potenciar

Trabajo de Fin de Grado

Grado en Ciencias Biomédicas · Facultad de Medicina
2024 – 2025

dicho efecto inhibitorio. Estos efectos podrían atribuirse a un cambio en el perfil secretor de las células mesenquimales tras su diferenciación, generando un microambiente menos propicio para la proliferación tumoral ²⁹.

Para complementar estos hallazgos, se examinó cómo el cambio fenotípico de las ASC influía a nivel molecular en las células MCF-7, evaluando la expresión de genes implicados en la síntesis de estrógenos y en procesos relacionados con la progresión tumoral. La presencia de medio condicionado de ASC diferenciadas indujo una disminución en la expresión del gen *CYP19A1* (aromatasa), así como en dos de sus promotores: *P11*, sobreexpresado en cáncer de mama; y *P1.4*. Este efecto se vio reforzado en presencia de melatonina, tanto a concentraciones fisiológicas como farmacológicas, lo que apoya el papel de esta indolamina en la modulación de la síntesis de estrógenos a nivel del microambiente tumoral.

Asimismo, el análisis de la expresión de *VEGF*, marcador clave de la angiogénesis tumoral, mostró una reducción significativa en presencia de medio condicionado de ASC diferenciadas. Este efecto antiangiogénico fue igualmente potenciado por el tratamiento con melatonina a ambas dosis, indicando una pérdida de capacidad angiogénica por parte de las células tumorales en este contexto.

Por otro lado, la expresión de genes relacionados con la transición epitelio-mesenquimal (EMT), como *SNAI2* y *TWIST1*, se encontró aumentada en presencia de ASC diferenciadas, lo cual podría interpretarse como una señal de potenciación de la migración celular, en aparente contradicción con la descripción de un fenotipo menos agresivo ³⁰. Sin embargo, este efecto fue contrarrestado de forma significativa por la melatonina, que redujo notablemente la expresión de ambos factores, posicionándose como una potencial herramienta terapéutica para limitar la capacidad metastásica de las células tumorales.

Estos resultados en conjunto destacan la posibilidad de combinar ASC diferenciadas y melatonina como estrategia para modular el microambiente tumoral y reducir el potencial proliferativo, angiogénico y metastásico del cáncer de mama.

El uso de células estromales derivadas del tejido adiposo (ASC) en procedimientos de reconstrucción mamaria ha generado un creciente interés por comprender su comportamiento en contextos oncológicos, dado su potencial impacto en la evolución del microambiente tumoral ³¹. En estos entornos, las ASC pueden verse expuestas a terapias antineoplásicas como la radioterapia, lo que podría modificar tanto su funcionalidad como su perfil secretor ³². Por ello, el segundo gran objetivo de este trabajo consistió en estudiar cómo la irradiación influye en el crecimiento de estas células, así como el posible papel modulador de la melatonina.

Tal y como era de esperar la radiación ionizante indujo una disminución significativa de la actividad proliferativa de las células ASC. En este trabajo se seleccionó la dosis de 8 Gy, dado que resultaba más adecuada a las empleadas con anterioridad en el laboratorio en la línea celular MCF-7 ³³. Este efecto inhibitorio de la radiación fue potenciado por la melatonina en ambas dosis ensayadas, tal y como había sido descrito anteriormente por el grupo en células MCF-7 ³⁴.

Asimismo, también se evaluó la expresión de genes relacionados con el secretoma característico de las ASC³⁵, con el fin de explorar si la combinación de radiación y melatonina influye en su perfil secretor y, por ende, en su potencial interacción con el

microambiente tumoral. En relación con el factor proangiogénico *VEGF*, la exposición a radiación indujo una disminución significativa en su expresión, efecto que fue potenciado por la melatonina tal y como ya se había descrito para otras líneas celulares ³⁶. Estos resultados coinciden con lo ya recogido en la literatura, que señala que la inhibición del factor *VEGF* en esta línea celular se ha relacionado con una menor capacidad proliferativa y proangiogénica ³⁷.

Por otro lado, la expresión de *IL-6*, una citoquina proinflamatoria secretada por las ASC, no se vio significativamente modificada por la radiación. Sin embargo, la melatonina a dosis fisiológica (1 nM) indujo una reducción apreciable en sus niveles. Dado que la secreción paracrina de *IL-6* por parte de las células ASC se ha relacionado con una inducción de la EMT en células tumorales³⁸, este efecto de la melatonina resultaría beneficioso al reducir la capacidad de estas células de inducir una mayor migración tumoral.

Respecto a los genes implicados en la transición epitelio-mesénquima (EMT), se observó que la radiación incrementó la expresión de *SNAI2*, un factor de transcripción clave en la pérdida de E-cadherina y por tanto de la adhesión; sin embargo, no se observaron cambios significativos en la expresión de *TWIST1*, otro factor de transcripción que activa el fenotipo migratorio. Dado que *SNAI2* es un regulador temprano de la EMT, este patrón podría indicar una activación parcial de este proceso en respuesta a la radiación. No obstante, el tratamiento combinado con melatonina y radiación redujo significativamente la expresión de ambos genes, lo que apoyaría el potencial de esta hormona como modulador negativo de procesos asociados a la diseminación tumoral, como ya se ha descrito anteriormente ³⁹.

Para poder profundizar en los efectos que las células ASC sometidas a radiación ionizante podrían tener sobre las células MCF-7, así como el papel modulador de la melatonina en este proceso, se realizaron experimentos con medio condicionado de ASC o cocultivos, que permitían valorar de manera directa las interacciones paracrinas entre ambos tipos celulares.

Los resultados obtenidos en este trabajo mostraron que la presencia de las células ASC inhibió de manera significativa la proliferación de las células tumorales, tanto empleando medio condicionado como en un modelo de cocultivo. Los datos recogidos en la literatura son contradictorios, habiéndose encontrado tanto efectos similares ⁴⁰ como contrarios ⁴¹. En relación con la radiación, no se observaron cambios significativos en el caso del medio condicionado, si bien en el modelo de cocultivos ésta potenció el efecto inhibitor de las ASC sobre el crecimiento de las células tumorales. Por último, la combinación de radiación con melatonina potenció el efecto de la radiación en el medio condicionado, aunque sólo a dosis elevadas. Este resultado es coherente con estudios previos que señalan que esta indolamina mejora la sensibilidad de las células MCF-7 a la radiación ^{42,43}. Estos resultados en conjunto sugieren que las células ASC tienen un efecto inhibitor sobre el crecimiento tumoral y que la radiación y la melatonina modulan este efecto, especialmente en condiciones de contacto directo como en los cocultivos.

A continuación, se decidió realizar una prueba más funcional para valorar la actividad proliferativa a largo plazo, como es la capacidad para formar colonias en células MCF-7 incubadas con diferentes medios condicionados. La irradiación de las ASC sí generó un efecto significativo cuando se emplearon como medio condicionado en la formación de colonias en células MCF-7. Estos resultados sugieren una alteración del secretoma

Trabajo de Fin de Grado

Grado en Ciencias Biomédicas · Facultad de Medicina
2024 – 2025

de las ASC irradiadas que conllevaría un impacto antiproliferativo sobre las células MCF-7, un fenómeno ya descrito en otros contextos celulares ⁴⁴. Sin embargo, en este caso la adición de melatonina al medio no potenció el efecto de la radiación, lo que contrasta con los resultados observados en otras condiciones de este trabajo.

Para profundizar en el impacto del medio condicionado procedente de ASC irradiadas sobre la supervivencia de las células tumorales, se analizó la expresión de algunos genes relacionados con apoptosis y ciclo celular (*AKT1*, *p21* y *BAX*). La expresión de *AKT1*, un regulador clave de la proliferación y supervivencia celular, se redujo significativamente tras la exposición al medio condicionado de ASC, efecto que se acentuó cuando estas células habían sido irradiadas. La melatonina a dosis fisiológicas actuó de manera sinérgica con la radiación, intensificando la reducción de la expresión génica observada. En referencia a la expresión de *p21*, reconocido por su papel como inhibidor del ciclo celular promoviendo la detención en respuesta al daño, su aparente inhibición podría interpretarse considerando su función dual. En situaciones de estrés celular, como la irradiación, la reducción de *p21* ha sido asociada con una transición desde una respuesta de parada de ciclo hacia rutas apoptóticas ⁴⁵. En cuanto a *BAX*, un gen proapoptótico, se observó una disminución de su expresión cuando las células fueron incubadas con los diferentes medios condicionados. Nuestros resultados difieren de otros publicados en la literatura en los que se indica que el medio condicionado⁴⁶ y los exosomas⁴⁷ derivados de ASC inducen la apoptosis y reducen la viabilidad celular.

A continuación, se decidió hacer un ensayo funcional de determinación de apoptosis mediante marcaje con anexina V. Los resultados no mostraron una activación marcada de la apoptosis en ninguna de las condiciones ensayadas, si bien hubo una reducción del porcentaje de células viables en los grupos tratados con medio condicionado que contenía melatonina y un aumento del número de células necróticas. Estos resultados en su conjunto podrían indicar que el medio condicionado contendría factores proinflamatorios y/o radicales libres que generasen un daño celular directo sobre las células tumorales.

Por último, se decidió valorar la contribución del medio condicionado de células ASC expuestas a radiación y/o melatonina sobre la transición epitelio-mesénquima ya que estudios previos han señalado que la adquisición de un fenotipo migratorio suele estar asociada a una reducción de la proliferación celular ⁴⁸.

Para ello se planteó estudiar en primer lugar los cambios en la expresión de genes clave en el fenómeno angiogénico (*VEGF*) y en la activación de la EMT (*SNAI2*, *TWIST1* y *PLAU*). Respecto a *VEGF*, nuestros resultados muestran que su expresión aumenta con el medio condicionado de ASC, lo cual concuerda con datos previos de la literatura que describen la capacidad de estas células de promover la angiogénesis, motivo por el cual se emplean en contextos clínicos para facilitar la cicatrización ⁴⁹. Sin embargo, la radiación de las células ASC indujo una reducción significativa de su expresión y este efecto fue potenciado por la melatonina tal y como ya había sido demostrado en el laboratorio previamente en otras líneas celulares ⁵⁰.

En cuanto a los genes *TWIST1* y *SNAI2*, factores de transcripción tempranos en la activación de la EMT y el incremento de la plasticidad celular ⁵¹, se observó un aumento en su expresión ante el tratamiento con medio condicionado de ASC, lo que indicaría un posible cambio hacia un fenotipo más invasivo. De forma análoga a lo observado con *VEGF*, tanto la radiación como el tratamiento con melatonina revirtieron este efecto estimulador. Sin embargo, *PLAU* (activador del plasminógeno tipo uroquinasa),

fundamental en la parte final del proceso migratorio mediante la degradación de la matriz extracelular⁵², mostró una expresión reducida en estas mismas condiciones.

Pese al aumento en la expresión de *TWIST1* y *SNAI2*, los ensayos de migración mostraron una reducción clara en la capacidad migratoria de las células tumorales expuestas al medio condicionado. Esta aparente contradicción podría deberse a que, si bien se activa parcialmente el proceso EMT, la inhibición de *PLAU* —y posiblemente de otros mediadores tempranos de la migración— limitaría la capacidad de las células para llevar a cabo un proceso migratorio eficaz. Esto sugiere que la transición fenotípica podría estar incompleta o no ser funcional, afectando más a la proliferación o viabilidad celular que a la migración real.

En conclusión, el uso de células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo (ASC) en terapias de reconstrucción mamaria continúa generando incertidumbre, especialmente debido a su potencial influencia en la progresión tumoral. Los resultados obtenidos en este trabajo evidencian que la exposición de las ASC a radiación afecta a su funcionalidad y modifica su interacción con las células tumorales. Una posible estrategia para mitigar este efecto consiste en inducir su diferenciación hacia un fenotipo adipocítico, considerado menos pro-tumoral.

Asimismo, los datos presentados respaldan el papel relevante de la melatonina como modulador del microambiente tumoral mamario, al mostrar su capacidad para reducir la actividad de las ASC, así como limitar procesos asociados a la progresión tumoral como la transición epitelio-mesénquima (EMT) y la angiogénesis.

No obstante, será necesario profundizar en estudios adicionales que consideren un entorno más complejo y representativo del contexto fisiopatológico real, incorporando otros componentes celulares y factores del microambiente tumoral. Dado el papel clave de este nicho celular en la evolución de los tumores, su estudio representa una vía prometedora para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas en el cáncer de mama.

Trabajo de Fin de Grado

Grado en Ciencias Biomédicas · Facultad de Medicina
2024 – 2025

METODOLOGÍA

Reactivos químicos

La melatonina empleada en los distintos procedimientos experimentales fue adquirida en Sigma-Aldrich. La solución madre (stock) se preparó disolviendo el compuesto en etanol absoluto (100 %) hasta alcanzar una concentración final de 100 mM. Posteriormente, la solución fue dividida en alícuotas y conservada a -20 °C hasta su utilización. Para su aplicación en cultivos celulares, se realizaron diluciones directamente en el medio de cultivo, garantizando que la concentración final de etanol no superara el 0,1 % (v/v), con el objetivo de evitar efectos inespecíficos derivados del disolvente.

En los ensayos de migración celular, específicamente en los análisis de cierre de herida (wound healing), se utilizó factor de crecimiento epidérmico humano (hEGF) (Sigma-Aldrich), que fue disuelto y alícuoteado en tampón fosfato salino (PBS) a una concentración de 100 µg/ml, y conservado a -20 °C hasta su empleo en los ensayos correspondientes.

Radiación

Los cultivos celulares se expusieron a radiación X usando un tubo modelo YXLON SMART 200 (Yxlon International, Hamburgo, Alemania) a temperatura ambiente. Basándonos en resultados previos del laboratorio (**Figura S1**) utilizamos radiación de 8 Gy como dosis de radiación óptima. Éste equipo proporciona una tasa de dosis de 1Gy/min a 27cm de punto de generación del haz de rayos X con la configuración de 160kV y 4,5mA con un campo de irradiación circular de 19,7 cm de diámetro. Las células de los grupos control se retiraron de la incubadora y se colocaron durante el mismo período de tiempo en el irradiador, pero sin radiación.

Cultivos celulares

Para el desarrollo de este trabajo se emplearon dos líneas celulares. La primera corresponde a la línea MCF-7, adquirida de la American Type Culture Collection (ATCC), que deriva de un adenocarcinoma mamario y se caracteriza por la expresión de receptores hormonales (ER+, PR+). La segunda línea utilizada fue ASC52telo, compuesta por células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo e inmortalizadas. Ambas líneas se conservaron mediante la preparación de stocks celulares, almacenados a -70 °C en presencia de un 10 % de dimetilsulfóxido (DMSO) como agente crioprotector.

El mantenimiento de las células MCF-7 se realizó en medio de cultivo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), suplementado con un 10 % de suero fetal bovino (SFB) y antibióticos penicilina (100 U/ml) y estreptomina (100 µg/ml). Por su parte, las células ASC52telo se cultivaron en un medio específico compuesto por CTS™ StemPro™ MSC SFM (Gibco), suplementado con un 5 % de GlutaMAX™, el suplemento MesenPRO RS Growth Supplement (Gibco), antibiótico G418 (0,2 mg/ml), y las mismas concentraciones de penicilina y estreptomina que en el caso anterior.

Ambas líneas celulares se mantuvieron como cultivos adherentes en placas de 10 cm de diámetro, incubadas a 37 °C en una atmósfera húmeda con un 5 % de CO₂.

Las células MCF-7 fueron subcultivadas al alcanzar una confluencia del 70–80 %. El procedimiento consistió en retirar el medio de cultivo, realizar un lavado con tampón

salino fosfatado (PBS) y añadir una solución de tripsina-EDTA al 0,25 %. Tras una incubación de 3 a 5 minutos a 37 °C, las células fueron recogidas con medio de cultivo, que actúa como inhibidor de la tripsina. Posteriormente, se centrifugaron a baja velocidad y se redistribuyeron en nuevas placas.

El subcultivo de las células ASC52telo requirió un protocolo adaptado a sus características. Se realizó un lavado inicial con PBS, seguido de una incubación con acutasa (1X) durante 3 minutos para facilitar la disociación celular de la placa. Las células fueron recolectadas añadiendo el medio correspondiente, centrifugadas en condiciones similares a las descritas previamente y resuspendidas para continuar su cultivo.

Para el recuento celular de ambas líneas, se tomó una alícuota de la suspensión celular post-centrifugación, la cual se introdujo en una cámara de Neubauer. El conteo se realizó mediante microscopía óptica con un aumento de 10x, utilizando los cuatro cuadrantes de las esquinas como referencia.

Cocultivos de células MCF-7 y ASC

Con el objetivo de evaluar si la presencia de células ASC influye en el comportamiento de las células MCF-7, se empleó un modelo de cocultivo. Para ello, se utilizaron placas de 6 pocillos (Falcon), en las que se sembraron células MCF-7 por duplicado a una densidad de 4×10^3 células por pocillo. Paralelamente, las células ASC se sembraron también por duplicado en inserts (Falcon) con membranas permeables de poros de $0,45\mu\text{m}$ de diámetro, a una densidad de $1,2 \times 10^4$ células por insert.

Tras 24 horas de incubación independiente en sus respectivos medios de cultivo, los inserts con células ASC se colocaron sobre las placas que contenían las células MCF-7. En ese momento, se añadieron los tratamientos correspondientes (melatonina y/o su diluyente) y ambos grupos celulares se incubaron desde ese momento con medio de cultivo de las células ASC. En total, se prepararon dos placas de 6 pocillos. A las 24 horas, una de las placas —que contenía tanto células sin tratar como células tratadas con melatonina— fue irradiada con una dosis de 8 Gy y la otra se dejó sin radiar pero fuera de la estufa el mismo tiempo, generando así cinco grupos experimentales: solo células MCF-7 (sin insert); control sin radiar; control radiado; células radiadas en presencia de melatonina 1 mM en el medio de cultivo; y células radiadas con tratamiento de melatonina 1 nM.

Este diseño experimental permitió analizar las interacciones paracrinias entre ambos tipos celulares, así como la influencia de la radiación sobre los cocultivos. Las placas se mantuvieron en incubación durante cinco días tras la irradiación para llevar a cabo los estudios de proliferación sobre las células MCF-7.

Obtención de medio condicionado de células ASC

Para investigar si las células ASC liberaban al medio de cultivo alguna sustancia capaz de influir en el comportamiento de las células MCF-7, se utilizó medio condicionado. Para ello, se sembraron células ASC en placas de 10 cm (Falcon) con una densidad alta. Una vez que las células alcanzaron una confluencia del 80–90 %, se aplicaron los tratamientos correspondientes. Se prepararon un total de cuatro placas: dos correspondientes a controles (sin tratamiento con melatonina) y dos tratadas con melatonina a concentraciones de 1 mM y 1 nM, respectivamente. A las 24 horas, se

Trabajo de Fin de Grado

Grado en Ciencias Biomédicas · Facultad de Medicina
2024 – 2025

irradiaron con una dosis de 8 Gy tanto las placas tratadas con melatonina como una de las placas control. La otra placa control no se irradió, pero se mantuvo fuera de la estufa durante el mismo periodo de tiempo, con el fin de asegurar que el tiempo fuera de las condiciones de cultivo no influyera en los resultados.

Tras la irradiación, todas las placas se mantuvieron en incubación durante 72 horas. Finalizado este tiempo, se recogió el medio de cultivo de cada condición experimental, se filtró mediante filtros con poro de 0,22 μm para eliminar residuos celulares, y se almacenó a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ en alícuotas hasta su uso en experimentos posteriores.

Diferenciación Adipogénica

Para el estudio de la diferenciación adipogénica, se empleó el kit comercial StemPro® Adipogenesis Differentiation Kit (Gibco). Las células ASC52Telo fueron sembradas en placas a una densidad de 1×10^4 células/ cm^2 . Tras 72 horas de cultivo en medio estándar (MesenPRO RS™), éste se sustituyó por el medio de diferenciación que contenía 90 ml de StemPro® Adipocyte Differentiation Basal Medium, 10 ml de StemPro® Adipocyte Supplement y 50 μL de gentamicina (10 mg/ml).

Las células se mantuvieron en condiciones de diferenciación durante 8 días, realizando un cambio de medio al cuarto día. Durante este periodo, se llevó a cabo un seguimiento diario mediante observación microscópica para monitorizar los cambios morfológicos asociados a la diferenciación, prestando especial atención a la formación de vesículas lipídicas, características del fenotipo adipogénico. Al finalizar el periodo de diferenciación, el medio de cultivo fue recogido y filtrado mediante filtros con poro de 0,22 μm para eliminar residuos celulares, y se almacenó a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ en alícuotas con el fin de ser utilizado posteriormente como medio condicionado en otros ensayos celulares.

Finalmente, las células diferenciadas fueron teñidas mediante el método Oil Red, una técnica específica para la detección de lípidos neutros acumulados en las vesículas intracelulares, lo que permitió confirmar visualmente la adquisición del fenotipo adipogénico.

Determinación de la diferenciación mediante tinción con Oil Red O

Para la evaluación de la diferenciación adipogénica, se empleó la tinción con Oil Red O, un colorante lipofílico que permite visualizar y cuantificar la acumulación de lípidos neutros en el interior celular.

La solución de tinción se preparó disolviendo 75 mg de Oil Red en 5 ml de alcohol isopropílico. La mezcla se agitó durante 15 minutos y posteriormente se dejó reposar otros 15 minutos, obteniéndose una disolución altamente saturada. Esta solución fue filtrada dos veces para eliminar posibles partículas no disueltas, y se le añadieron 10 ml de agua destilada. La solución resultante es estable durante un periodo máximo de 2 horas.

Para la tinción, las células previamente diferenciadas fueron lavadas con PBS y posteriormente fijadas con paraformaldehído al 4 % durante 20 minutos a temperatura ambiente. Finalizada la fijación, se realizaron dos lavados con agua destilada para eliminar los restos de fijador. A continuación, se añadió la solución de Oil Red O y se incubó entre 2 y 4 horas a oscuras, dependiendo del grado de diferenciación observado. Una vez se confirmó la tinción de las células mediante observación microscópica, se realizaron tres lavados con agua destilada para eliminar el exceso de colorante, y las

placas se dejaron secar en estufa. Posteriormente, las células teñidas fueron observadas al microscopio (Zeiss Axiovert) para documentar la presencia de vesículas lipídicas.

Para la cuantificación de la tinción, se añadió 500 μL de alcohol isopropílico a cada pocillo con el fin de solubilizar el colorante retenido en las células. La solución resultante se transfirió a una placa de 96 pocillos (Falcon), y se midió su absorbancia a 540 nm mediante espectrofotometría. La intensidad de la absorbancia es directamente proporcional a la cantidad de lípidos acumulados, y, por tanto, al grado de diferenciación adipogénica alcanzado por las células.

Medida de la proliferación celular: Método MTT

Los estudios de proliferación celular se llevaron a cabo utilizando las líneas MCF-7 y ASC. En el caso de las células MCF-7, estas se sembraron en placas de 96 pocillos (Falcon) a una densidad de 3×10^3 células por pocillo, empleando medio DMEM suplementado con un 10 % de suero fetal bovino (SFB) o con medio condicionado, dependiendo del experimento. Por su parte, las células ASC se cultivaron en su medio específico a una densidad de 4×10^3 células por pocillo. Tras un periodo de 24 horas para permitir una correcta adherencia al fondo de la placa, se añadieron los tratamientos correspondientes y se mantuvieron durante tres o cinco días, dependiendo de los experimentos.

En los estudios diseñados para evaluar el efecto de la radiación sobre las células ASC, se aplicaba primero el tratamiento (melatonina o control), y transcurridas 4 horas, se procedió a irradiar las placas.

La proliferación celular se evaluó mediante el ensayo colorimétrico del MTT, una técnica basada en la actividad metabólica de las células. Esta prueba mide la reducción de una sal de tetrazolio amarilla, el bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT), en cristales de formazán de color morado, reacción catalizada por enzimas mitocondriales activas. Para preparar la solución de trabajo, se diluyó 1 ml de una solución madre de MTT (12 nM en PBS) en 10 ml de medio de cultivo. Una vez retirado el medio de las placas, se añadieron 100 μl de esta solución a cada pocillo en las placas de 96. Tras 4 horas de incubación, los cristales formados se solubilizaron añadiendo 110 μL de la misma solución de SDS en HCl 0,01 N.

En el caso de los experimentos de cocultivos, realizados en placas de 6 pocillos, se ajustaron los volúmenes a la superficie de la placa, añadiendo inicialmente 600 μL de la solución de MTT a cada pocillo y posteriormente 660 μL de una solución de SDS en HCl 0,01 N para la solubilización.

En ambos formatos, las placas se incubaron durante 24 horas adicionales antes de realizar la lectura de la absorbancia a una longitud de onda de 570 nm mediante un espectrofotómetro de placas. La cantidad de formazán generado es proporcional al número de células metabólicamente activas, por lo que los resultados obtenidos se interpretaron como una medida directa de la proliferación celular. Cada experimento se repitió al menos tres veces y los datos se expresaron como media \pm error estándar de la media (SEM).

Trabajo de Fin de Grado

Grado en Ciencias Biomédicas · Facultad de Medicina
2024 – 2025

Ensayo de Clonogenicidad

Para estudiar la influencia del medio condicionado procedente de células ASC irradiadas, con o sin tratamiento con melatonina, sobre las células MCF-7, se llevó a cabo un ensayo clonogénico. Este ensayo permite evaluar la capacidad de una sola célula para sobrevivir y formar una colonia, lo que lo convierte en una herramienta fundamental para analizar el efecto de los medios condicionados en términos de viabilidad y proliferación celular a largo plazo.

Para su realización, se utilizó agarosa de bajo punto de fusión (UltraPure LMP Agarose, Invitrogen). Inicialmente, se sembraron 2×10^5 células por pocillo en placas de seis pocillos (Falcon) y se incubaron durante 24 horas en medio DMEM. Posteriormente, las células se lavaron con PBS y se añadió el medio condicionado, generando cinco condiciones experimentales: un control negativo (medio MesemPro sin presencia de ASC) y cuatro medios condicionados correspondientes a los grupos: control sin radiar, control radiado, radiado con melatonina 1 mM y radiado con melatonina 1 nM.

Tras 24 horas de incubación en estos medios, se procedió a realizar el ensayo clonogénico. Para ello, se preparó una primera capa de agar al 3 % mezclado con el medio condicionado correspondiente, obteniendo una concentración final de agar del 0,5 %. Una vez solidificada esta capa, se añadió una suspensión de 0,5 ml que contenía $1,45 \times 10^5$ células en su medio condicionado y 0,5 ml de medio condicionado con agar (40°C) alcanzando una concentración final al 0,5 %. Las placas se incubaron durante una semana, realizando un seguimiento diario mediante microscopía.

Finalizado el periodo de incubación, se aspiró el medio y se realizaron dos lavados con PBS. Las células se tiñeron con 500 µl de cristal violeta (Sigma-Aldrich), lo que permitió identificar las células viables. Tras 45 minutos de incubación, las placas se lavaron con agua y se dejaron secar a temperatura ambiente. Finalmente, se procedió al recuento de colonias utilizando el software ImageJ (versión 1.54v), mediante la herramienta "Análisis de Partículas" en cuatro campos representativos de cada grupo experimental. Cada colonia se definió con un tamaño entre 9000 y 50000 píxeles y una circularidad entre 0,1 y 1,00.

Determinación de la muerte celular

Con el objetivo de analizar la muerte celular inducida en células MCF-7 por el medio condicionado de células ASC radiadas, así como el posible efecto modulador de la melatonina, se llevó a cabo un ensayo de anexina V-FITC, utilizando Annexin V-FITC Kit (Miltenyi Biotec). Esta técnica permite diferenciar entre células viables, apoptóticas y necróticas mediante la detección de la externalización de fosfatidilserina y la pérdida de integridad de membrana plasmática.

Se sembraron triplicados de cada condición experimental con una densidad de 5×10^5 células por pocillo, junto con tres controles adicionales: uno sin tinción (control de autofluorescencia); uno con anexina V-FITC únicamente; y otro con yoduro de propidio (IP) únicamente. Tras 24 horas de incubación en medio DMEM, las células fueron lavadas con PBS y tratadas con los respectivos medios condicionados: control negativo (MesemPro sin presencia de ASC), medio condicionado de ASC no irradiadas, medio condicionado de ASC irradiadas, y medios condicionados de ASC irradiadas suplementados con melatonina a concentraciones de 1 mM y 1 nM. Después de 24 horas de tratamiento, las células fueron recogidas y centrifugadas.

Para la tinción, las células se lavaron con tampón de unión (1× Binding Buffer), se resuspendieron en 100 µL del mismo tampón y se añadieron 10 µL de anexina V-FITC. La mezcla se incubó durante 15 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. Posteriormente, se realizó un nuevo lavado, se resuspendieron las células en 500 µL del tampón de unión y se añadieron 5 µL de PI inmediatamente antes del análisis por citometría de flujo (Becton Dickinson FACS CANTO II analyzer). Al menos 10.000 eventos fueron analizados usando los detectores FL-1 de 515 nm (verde) para la detección de la fluoresceína (Anexina V-FITC) y un filtro FL-3 de 600 nm (rojo) para la detección del yoduro de propidio. Los resultados se analizaron comparando el porcentaje de células en cada cuadrante.

Extracción de ARN total de las células en cultivo

Para los estudios de expresión génica, se sembraron aproximadamente 8×10^5 células por pocillo en placas de 6 pocillos (Falcon), utilizando los medios de cultivo específicos para cada línea celular. Tras un periodo de incubación de 24 horas, se aplicaron los tratamientos establecidos según el diseño experimental.

En el caso de los análisis en células ASC, cuyo objetivo era valorar el efecto de la radiación ionizante, se plantearon cuatro condiciones experimentales: tratamiento con melatonina a concentraciones de 1 mM y 1 nM, control radiado y un control sin tratamiento ni irradiación. Las células tratadas fueron irradiadas a 8Gy bajo condiciones controladas, y tras un intervalo de 4 horas desde la irradiación, se procedió a la lisis celular para la posterior extracción de ARN total.

Por otro lado, las células MCF-7 se emplearon para evaluar los cambios en la expresión génica tras incubación con el medio condicionado procedente de las células ASC. En este caso, las células fueron expuestas al medio correspondiente, y la lisis celular se llevó a cabo 24 horas después de los tratamientos.

La extracción de ARN total se realizó utilizando un kit comercial de Nzytech, que incluye un tampón de lisis con tiocianato de guanidina, eficaz en la inactivación de ARNasa. Tras la lisis, el contenido de cada pocillo se transfirió a una columna de homogeneización y se centrifugó a $11.000 \times g$ durante 1 minuto. El eluido se mezcló con etanol al 70 % y se transfirió a una columna de unión, donde se incubó con ADNasa reconstituida para eliminar posibles restos de ADN genómico. Después de varios lavados con los tampones incluidos en el kit, el ARN purificado fue eluido en 40 µL de agua libre de ARNasa.

Finalmente, la cantidad y calidad del ARN extraído se evaluó mediante espectrofotometría (Implen). La concentración se determinó a través de la absorbancia a 260 nm, mientras que la pureza de las muestras se valoró mediante la relación A260/A280. Un cociente cercano a 2,0 indicó una muestra de ARN de alta calidad, libre de contaminación por proteínas.

Síntesis de ADN complementario (ADNc)

A partir del ARN total previamente extraído, se llevó a cabo la síntesis de ADN complementario (ADNc) utilizando un kit comercial proporcionado por Nzytech. Para cada reacción se empleó una cantidad de 1 o 2 µg de ARN, dependiendo de la expresión de los genes, con un volumen final de 20 µL.

Trabajo de Fin de Grado

Grado en Ciencias Biomédicas · Facultad de Medicina
2024 – 2025

La mezcla fue incubada en un termociclador siguiendo un programa que incluyó una primera fase de incubación a 25 °C, seguida de una segunda etapa a 50 °C, y finalizando con una fase de inactivación enzimática a 85 °C. Una vez completado este proceso, las muestras fueron enfriadas brevemente en hielo y se añadió NZY RNasa H con el objetivo de eliminar el ARN residual tras la retrotranscripción. Posteriormente, se realizó una nueva incubación a 37 °C para completar la degradación del ARN. El ADNc obtenido fue empleado directamente en los ensayos de RT-PCR o conservado a -20 °C para su utilización en análisis posteriores.

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

Con el objetivo de evaluar posibles cambios en la expresión de genes de interés, se llevó a cabo la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-qPCR). Para ello, se sembraron células MCF-7 y ASC a una densidad de 8×10^5 células por pocillo en placas de 6 pocillos (Falcon). Tras 24 horas de incubación, se aplicaron los tratamientos correspondientes. Tras 4 horas de tratamientos, se extrajo el ARN total siguiendo el protocolo previamente descrito y se procedió a la síntesis del ADNc.

Los cebadores utilizados para la amplificación se detallan en la **Tabla S1**. Como gen de referencia se empleó la subunidad ribosomal S14, debido a su expresión constitutiva, lo que permite su uso como control interno para la normalización de los datos.

La técnica de RT-qPCR se basa en la detección de la fluorescencia emitida por el marcador SYBR Green, que se une al ADN bicatenario generado durante la amplificación. A medida que avanza la reacción, la fluorescencia aumenta de forma proporcional a la cantidad de producto amplificado. El ciclo en el que la fluorescencia supera un umbral predefinido se denomina Ct (threshold cycle) y se utiliza como referencia para comparar los niveles de expresión entre muestras.

Las reacciones se prepararon utilizando reactivos del kit comercial de Nzytech. Cada mezcla contenía 10 µL de NZYSpeedy qPCR Green Master Mix (2x), 0,8 µL de cada cebador, 2 µL de ADNc y agua libre de RNasa hasta completar un volumen final de 20 µL. Las amplificaciones se realizaron en un termociclador Bio-Rad CFX Connect™, con un programa térmico que incluía una activación inicial a 95 °C durante 2 minutos, seguida de 40 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 10 segundos y alineamiento a 60 °C durante 30 segundos.

Para comprobar la especificidad de la amplificación, se añadió una curva de disociación al final del protocolo. En esta fase, las muestras se calentaron progresivamente desde 60 °C hasta 95 °C, registrando la fluorescencia en tiempo real. El análisis de la derivada de la fluorescencia en función de la temperatura permitió identificar la temperatura de fusión (Tm) de los productos amplificados. La presencia de un único pico indicó una amplificación específica, mientras que la aparición de varios picos reflejó la existencia de productos inespecíficos.

El análisis de los resultados se realizó mediante el software Bio-Rad CFX Maestro (versión 2.1). Los valores de expresión se normalizaron frente al gen de referencia utilizando el método ΔC_t , y se calcularon los cambios relativos mediante el método $\Delta\Delta C_t$, según el siguiente esquema:

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

Ensayo de Migración Celular: Wound-Healing Assay

Se llevó a cabo un ensayo de migración celular para estudiar el desplazamiento de las células tumorales MCF-7 y la posible influencia del medio condicionado de células ASC en este proceso. El ensayo se basó en la creación de una brecha artificial de 500 μm en un cultivo en monocapa utilizando inserts específicos (Ibidi Culture-Insert 2 Well, 35 mm), a través de la cual las células migran hasta restablecer el contacto célula-célula.

Las células MCF-7 se sembraron a una densidad de $2,5 \times 10^5$ células/mL, añadiendo 70 μL de la suspensión celular en cada compartimento del insert. Tras 24 horas de incubación, se comprobó la confluencia celular al microscopio y se retiraron cuidadosamente los inserts con pinzas estériles. A continuación, se realizaron dos lavados con PBS para eliminar restos celulares, y se añadieron 2,5 mL de los distintos medios condicionados a los que se suplementó con hEGF a una concentración final de 5 ng/mL.

La migración celular se monitorizó en tres campos seleccionados al azar a lo largo de la brecha, utilizando una cámara ORCA R2 (Hamamatsu Photonics) acoplada a un microscopio Nikon Eclipse-Ti (Werfen Group). Se tomaron imágenes cada 24 horas con un aumento de 10X. El experimento se dio por finalizado una vez que las células del grupo control (DMEM) completaron el cierre de la brecha, lo cual ocurrió aproximadamente 48 horas después del inicio del ensayo.

La cuantificación de la migración se realizó midiendo el área inicial y final de la brecha mediante el software ImageJ (versión 1.54p). La distancia recorrida por las células se calculó aplicando la siguiente fórmula:

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

Análisis estadístico de los datos

Los análisis estadísticos fueron realizados utilizando el software GraphPad Prism versión 5.0 (GraphPad Software). En todos los casos se aplicaron pruebas paramétricas, dado que las variables analizadas se ajustaban a una distribución normal. En particular, se efectuaron análisis de varianza de tipo paramétrico (ANOVA) y, en aquellos casos en los que se detectaron diferencias significativas, se aplicó la prueba de Student-Newman-Keuls con el fin de identificar diferencias estadísticamente significativas entre los distintos grupos experimentales. Para comparaciones entre dos grupos experimentales, se utilizaron pruebas t de Student no paramétricas.

Se consideraron resultados estadísticamente significativos aquellos con un valor de $p < 0,05$. Salvo indicación expresa en contrario, todos los ensayos fueron repetidos al menos en tres ocasiones bajo condiciones experimentales equivalentes. Los resultados se presentan como la media \pm el error estándar de la media (SEM).

Trabajo de Fin de Grado

Grado en Ciencias Biomédicas · Facultad de Medicina
2024 – 2025

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a todos los miembros del Departamento de Fisiología de la Universidad de Cantabria por estar siempre atentos y dispuestos a ayudar ante mis dudas e intensidades. En especial, gracias a Carolina, mi tutora, y a Gema, la técnica, por su implicación y cercanía.

Del mismo modo, me gustaría expresar mi gratitud a otros grupos de la Facultad. Al grupo de Física Médica, con Daniel Rábago, por su participación en el apartado de radiación; al grupo de Flor Pérez Campo, por permitirme utilizar su microscopio y por su apoyo ante mis dudas sobre protocolos y tinciones; y al grupo de Alfonso Bolado, por su orientación en experimentos y tipos celulares.

Tampoco puedo olvidar a mis compañeros de carrera, que han sido mi colchón durante estos cuatro años, que serán nuestros para siempre. En particular, a Laura e Ismael, por acompañarme en los meses de prácticas, escuchando mis inquietudes y celebrando mis alegrías.

También agradezco a mis amigas, que han recibido más fotos de células de las que imaginaron y han estado presentes, con cariño y ánimo, en los altibajos que, ahora se, conlleva la investigación.

Gracias a mi familia y en especial a mis padres, porque yo soy parte de vosotros y de todo lo que me habéis enseñado. Esto es tan vuestro como mío.

Y gracias a mí, por mantenerme serena, agradecida y con ganas de más, algo que no siempre he podido asumir.

*I just wanted you to know
that this is me trying,
at least I'm trying.*

-this is me trying, Taylor Swift

BIBLIOGRAFÍA

1. Łukasiewicz, S., Czezelewski, M., Forma, A., Baj, J., Sitarz, R., and Stanisławek, A. (2021). Breast Cancer—Epidemiology, Risk Factors, Classification, Prognostic Markers, and Current Treatment Strategies—An Updated Review. *Cancers (Basel)* *13*, 4287. <https://doi.org/10.3390/cancers13174287>.
2. Peng, X., Dong, H., Zhang, L., and Liu, S. (2024). Role of cancer stem cell ecosystem on breast cancer metastasis and related mouse models. *Zool Res* *45*, 506–517. <https://doi.org/10.24272/j.issn.2095-8137.2023.411>.
2. Quail, D.F., and Joyce, J.A. (2013). Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat Med* *19*, 1423–1437. <https://doi.org/10.1038/nm.3394>.
4. Masjedi, A., Hashemi, V., Hojjat-Farsangi, M., Ghalamfarsa, G., Azizi, G., Yousefi, M., and Jadidi-Niaragh, F. (2018). The significant role of interleukin-6 and its signaling pathway in the immunopathogenesis and treatment of breast cancer. *Biomedicine & Pharmacotherapy* *108*, 1415–1424. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.09.177>.
5. Senst, C., Nazari-Shafti, T., Kruger, S., Bentrup, K.H.Z., Dupin, C.L., Chaffin, A.E., Srivastav, S.K., Wörner, P.M., Abdel-Mageed, A.B., Alt, E.U., et al. (2013). Prospective dual role of mesenchymal stem cells in breast tumor microenvironment. *Breast Cancer Res Treat* *137*, 69–79. <https://doi.org/10.1007/s10549-012-2321-0>.
6. 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? *Stem Cells Transl Med* *11*, 394–406. <https://doi.org/10.1093/stcltm/szac002>.
7. Quail, D.F., and Joyce, J.A. (2013). Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat Med* *19*, 1423–1437. <https://doi.org/10.1038/nm.3394>.
8. Ghosh, S., Hu, Y., and Li, R. (2010). Cell density is a critical determinant of aromatase expression in adipose stromal cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* *118*, 231–236. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2009.12.001>.
9. Platoff, R., Villalobos, M.A., Hagaman, A.R., Liu, Y., Matthews, M., DiSanto, M.E., Carpenter, J.P., and Zhang, P. (2021). Effects of radiation and chemotherapy on adipose stem cells: Implications for use in fat grafting in cancer patients. *World J Stem Cells* *13*, 1084–1093. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v13.i8.1084>.
10. 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. *Int J Mol Sci* *20*, 3296. <https://doi.org/10.3390/ijms20133296>.
11. Eulberg, D., Frömring, A., Lapid, K., Mangasarian, A., and Barak, A. (2022). The prospect of tumor microenvironment-modulating therapeutical strategies. *Front Oncol* *12*. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.1070243>.
12. Yi, M., Li, T., Niu, M., Zhang, H., Wu, Y., Wu, K., and Dai, Z. (2024). Targeting cytokine and chemokine signaling pathways for cancer therapy. *Signal Transduct Target Ther* *9*, 176. <https://doi.org/10.1038/s41392-024-01868-3>.
13. Alvarez-García, V., González, A., Alonso-González, C., Martínez-Campa, C., and Cos, S. (2012). Melatonin interferes in the desmoplastic reaction in breast cancer by regulating cytokine production. *J Pineal Res* *52*, 282–290. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2011.00940.x>.

Trabajo de Fin de Grado

Grado en Ciencias Biomédicas · Facultad de Medicina
2024 – 2025

14. Heo, J., Pyo, S., Lim, J., Yoon, D., Kim, B., Kim, J., Kim, G., Lee, S., and Kim, J. (2019). Biological effects of melatonin on human adipose-derived mesenchymal stem cells. *Int J Mol Med*. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2019.4356>.
15. Li, Y., Li, S., Zhou, Y., Meng, X., Zhang, J.-J., Xu, D.-P., and Li, H.-B. (2017). Melatonin for the prevention and treatment of cancer. *Oncotarget* 8, 39896–39921. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.16379>.
16. Hill, S.M., Belancio, V.P., Dauchy, R.T., Xiang, S., Brimer, S., Mao, L., Hauch, A., Lundberg, P.W., Summers, W., Yuan, L., et al. (2015). Melatonin: an inhibitor of breast cancer. *Endocr Relat Cancer* 22, R183–R204. <https://doi.org/10.1530/ERC-15-0030>.
17. González-González, A., González, A., Rueda, N., Alonso-González, C., Menéndez-Menéndez, J., Gómez-Arozamena, J., Martínez-Campa, C., and Cos, S. (2019). Melatonin Enhances the Usefulness of Ionizing Radiation: Involving the Regulation of Different Steps of the Angiogenic Process. *Front Physiol* 10. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00879>.
18. Sabol, R.A., Giacomelli, P., Beighley, A., and Bunnell, B.A. (2019). Adipose Stem Cells and Cancer: Concise Review. *Stem Cells* 37, 1261–1266. <https://doi.org/10.1002/stem.3050>.
19. Eterno, V., Zambelli, A., Pavesi, L., Villani, L., Zanini, V., Petrolo, G., Manera, S., Tuscano, A., and Amato, A. (2014). Adipose-derived mesenchymal stem cells (ASCs) may favour breast cancer recurrence via HGF/c-Met signaling. *Oncotarget* 5, 613–633. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.1359>.
20. Jotzu, C., Alt, E., Welte, G., Li, J., Hennessy, B.T., Devarajan, E., Krishnappa, S., Pinilla, S., Droll, L., and Song, Y.-H. (2011). Adipose tissue derived stem cells differentiate into carcinoma-associated fibroblast-like cells under the influence of tumor derived factors. *Cellular Oncology* 34, 55–67. <https://doi.org/10.1007/s13402-011-0012-1>.
21. Bulun, S.E., Chen, D., Moy, I., Brooks, D.C., and Zhao, H. (2012). Aromatase, breast cancer and obesity: a complex interaction. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 23, 83–89. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2011.10.003>.
22. Zhao, Y., Shen, M., Wu, L., Yang, H., Yao, Y., Yang, Q., Du, J., Liu, L., Li, Y., and Bai, Y. (2023). Stromal cells in the tumor microenvironment: accomplices of tumor progression? *Cell Death Dis* 14, 587. <https://doi.org/10.1038/s41419-023-06110-6>.
23. ALVAREZ-GARCÍA, V., GONZÁLEZ, A., MARTÍNEZ-CAMPA, C., ALONSO-GONZÁLEZ, C., and COS, S. (2013). Melatonin modulates aromatase activity and expression in endothelial cells. *Oncol Rep* 29, 2058–2064. <https://doi.org/10.3892/or.2013.2314>.
24. Shu, T., Wu, T., Pang, M., Liu, C., Wang, X., Wang, J., Liu, B., and Rong, L. (2016). Effects and mechanisms of melatonin on neural differentiation of induced pluripotent stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 474, 566–571. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.04.108>.
25. Han, Y., Kim, Y.-M., Kim, H.S., and Lee, K.Y. (2017). Melatonin promotes osteoblast differentiation by regulating Osterix protein stability and expression. *Sci Rep* 7, 5716. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-06304-x>.
26. Masnikov, D., Stafeev, I., Michurina, S., Zubkova, E., Mamontova, E., Ratner, E., Menshikov, M., and Parfyonova, Y. (2021). hTERT-immortalized adipose-derived stem cell line ASC52Telo demonstrates limited potential for adipose biology research. *Anal Biochem* 628, 114268. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2021.114268>.

27. González, A., Alvarez-García, V., Martínez-Campa, C., Alonso-González, C., and Cos, S. (2012). Melatonin promotes differentiation of 3T3-L1 fibroblasts. *J Pineal Res* 52, 12–20. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2011.00911.x>.
28. Basoli, V., Santaniello, S., Cruciani, S., Ginesu, G., Cossu, M., Delitala, A., Serra, P., Ventura, C., and Maioli, M. (2017). Melatonin and Vitamin D Interfere with the Adipogenic Fate of Adipose-Derived Stem Cells. *Int J Mol Sci* 18, 981. <https://doi.org/10.3390/ijms18050981>.
29. Zhao, Y., Zhang, X., Zhao, H., Wang, J., and Zhang, Q. (2017). CXCL5 secreted from adipose tissue-derived stem cells promotes cancer cell proliferation. *Oncol Lett* 15, 1403–1410. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.7522>.
30. Wu, S., Wang, Y., Yuan, Z., Wang, S., Du, H., Liu, X., Wang, Q., and Zhu, X. (2018). Human adipose-derived mesenchymal stem cells promote breast cancer MCF7 cell epithelial-mesenchymal transition by cross interacting with the TGF- β /Smad and PI3K/AKT signaling pathways. *Mol Med Rep*. <https://doi.org/10.3892/mmr.2018.9664>.
31. Platoff, R., Villalobos, M.A., Hagaman, A.R., Liu, Y., Matthews, M., DiSanto, M.E., Carpenter, J.P., and Zhang, P. (2021). Effects of radiation and chemotherapy on adipose stem cells: Implications for use in fat grafting in cancer patients. *World J Stem Cells* 13, 1084–1093. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v13.i8.1084>.
32. Berg, T.J., and Pietras, A. (2022). Radiotherapy-induced remodeling of the tumor microenvironment by stromal cells. *Semin Cancer Biol* 86, 846–856. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2022.02.011>.
33. Alonso-González, C., González, A., Martínez-Campa, C., Menéndez-Menéndez, J., Gómez-Arozamena, J., García-Vidal, A., and Cos, S. (2016). Melatonin enhancement of the radiosensitivity of human breast cancer cells is associated with the modulation of proteins involved in estrogen biosynthesis. *Cancer Lett* 370, 145–152. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2015.10.015>.
34. Alonso-González, C., González, A., Martínez-Campa, C., Gómez-Arozamena, J., and Cos, S. (2015). Melatonin sensitizes human breast cancer cells to ionizing radiation by downregulating proteins involved in double-strand DNA break repair. *J Pineal Res* 58, 189–197. <https://doi.org/10.1111/jpi.12205>.
35. Zhou, X., Zhang, J., Lv, W., Zhao, C., Xia, Y., Wu, Y., and Zhang, Q. (2022). The pleiotropic roles of adipocyte secretome in remodeling breast cancer. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 41, 203. <https://doi.org/10.1186/s13046-022-02408-z>.
36. González-González, A., González, A., Alonso-González, C., Menéndez-Menéndez, J., Martínez-Campa, C., and Cos, S. (2017). Complementary actions of melatonin on angiogenic factors, the angiopoietin/Tie2 axis and VEGF, in co-cultures of human endothelial and breast cancer cells. *Oncol Rep*. <https://doi.org/10.3892/or.2017.6070>.
37. Chen, G., Shi, X., Sun, C., Li, M., Zhou, Q., Zhang, C., Huang, J., Qiu, Y., Wen, X., Zhang, Y., et al. (2013). VEGF-Mediated Proliferation of Human Adipose Tissue-Derived Stem Cells. *PLoS One* 8, e73673. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073673>.
38. Sharaf, K., Eggersmann, T.K., Haider, S.P., Schwenk-Zieger, S., Zhou, J., Gires, O., Lechner, A., Canis, M., and Haubner, F. (2021). Human Adipose-Derived Stem/Stromal Cells Promote Proliferation and Migration in Head and Neck Cancer Cells. *Cancers (Basel)* 13, 2751. <https://doi.org/10.3390/cancers13112751>.

Trabajo de Fin de Grado

Grado en Ciencias Biomédicas · Facultad de Medicina
2024 – 2025

39. 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. *Cancers (Basel)* 16, 956. <https://doi.org/10.3390/cancers16050956>.
40. Kucerova, L., Skolekova, S., Matuskova, M., Bohac, M., and Kozovska, Z. (2013). Altered features and increased chemosensitivity of human breast cancer cells mediated by adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells. *BMC Cancer* 13, 535. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-13-535>.
41. 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>.
42. Michaelidesová, A., Vachelová, J., Cupal, L., Konířová, J., Brabcová, K.P., Bačáková, L., Vandrovcová, M., and Davidková, M. (2019). COMPARISON OF THE RADIATION SENSITIVITY OF THE BREAST CANCER CELL LINE MCF7 AND HUMAN ADIPOSE-DERIVED STEM CELLS. *Radiat Prot Dosimetry* 186, 155–158. <https://doi.org/10.1093/rpd/ncz193>.
43. González, A., Martínez-Campa, C., Mediavilla, M., Alonso-González, C., Sánchez-Mateos, S., Hill, S., Sánchez-Barceló, E., and Cos, S. (2007). Effects of MT1 melatonin receptor overexpression on the aromatase-suppressive effect of melatonin in MCF-7 human breast cancer cells. *Oncol Rep.* <https://doi.org/10.3892/or.17.4.947>.
44. Vedoya, G.M., López Nigro, M.M., and Martín, G.A. (2021). The secretome of non-tumorigenic mammary cells MCF-10A elicits DNA damage in MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cells. *Toxicology in Vitro* 70, 105018. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2020.105018>.
45. Jung, Y.-S., Qian, Y., and Chen, X. (2010). Examination of the expanding pathways for the regulation of p21 expression and activity. *Cell Signal* 22, 1003–1012. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2010.01.013>.
46. 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>.
47. Felthaus, O., Vedlin, S., Eigenberger, A., Klein, S.M., and Prantl, L. (2024). Exosomes from Adipose-Tissue-Derived Stem Cells Induce Proapoptotic Gene Expression in Breast Tumor Cell Line. *Int J Mol Sci* 25, 2190. <https://doi.org/10.3390/ijms25042190>.
48. Evdokimova, V., Tognon, C., Ng, T., and Sorensen, P.H.B. (2009). Reduced proliferation and enhanced migration: Two sides of the same coin? Molecular mechanisms of metastatic progression by YB-1. *Cell Cycle* 8, 2901–2906. <https://doi.org/10.4161/cc.8.18.9537>.
49. Jiang, A., Li, M., Duan, W., Dong, Y., and Wang, Y. (2015). Improvement of the Survival of Human Autologous Fat Transplantation by Adipose-Derived Stem-Cells-Assisted Lipotransfer Combined with bFGF. *The Scientific World Journal* 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/968057>.
50. González-González, A., González, A., Rueda, N., Alonso-González, C., Menéndez-Menéndez, J., Gómez-Arozamena, J., Martínez-Campa, C., and Cos, S. (2019). Melatonin Enhances the Usefulness of Ionizing Radiation: Involving the Regulation of Different Steps of the Angiogenic Process. *Front Physiol* 10. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00879>.

Trabajo de Fin de Grado

Grado en Ciencias Biomédicas · Facultad de Medicina
2024 – 2025

51. Buehler, D., Hardin, H., Shan, W., Montemayor-Garcia, C., Rush, P.S., Asioli, S., Chen, H., and Lloyd, R. V (2013). Expression of epithelial-mesenchymal transition regulators SNAI2 and TWIST1 in thyroid carcinomas. *Modern Pathology* 26, 54–61. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2012.137>.
52. Mekkawy, A.H., Pourgholami, M.H., and Morris, D.L. (2014). Involvement of Urokinase-Type Plasminogen Activator System in Cancer: An Overview. *Med Res Rev* 34, 918–956. <https://doi.org/10.1002/med.21308>.

Trabajo de Fin de Grado

Grado en Ciencias Biomédicas · Facultad de Medicina
2024 – 2025

Información Suplementaria

Modulación del microambiente tumoral mamario por melatonina: interacción con la radiación y la diferenciación celular

Victoria Álvarez Méndez (alumna)^{1,2}, Carolina Alonso González (directora)^{1,2*}

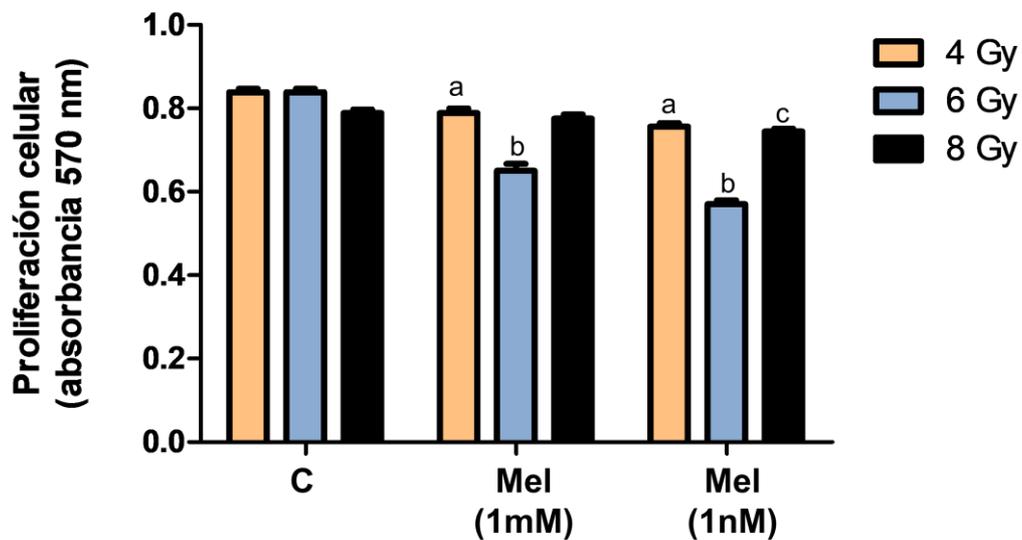


Figura S1. Efectos de la radiación ionizante y la melatonina sobre las células ASC

Cuantificación de la proliferación de células ASC expuestas a distintas dosis de radiación (4, 6, 8 Gy) y melatonina. La proliferación celular se valoró mediante el método del MTT a los tres días de incubación tras la exposición a la radiación y/o melatonina. C: Control. Mel: Melatonina. a, $p < 0,001$ vs C 4 Gy; b, $p < 0,001$ vs C 6 Gy; c, $p < 0,01$ vs C 8 Gy;

Trabajo de Fin de Grado

Grado en Ciencias Biomédicas · Facultad de Medicina
2024 – 2025

GEN		SECUENCIA
AKT1	Fw	AAGTACTCTTTCCAGACCC
	Rv	TTCTCCAGCTTGAGGTC
AROMATASA (Aro)	Fw	GTCGTGGACTTGGTCATGC
	Rv	CGAGTCTGTGCATCCTTCC
BAX	Fw	AACTGGACAGTAACATGGAG
	Rv	TTGCTGGCAAAGTAGAAAAG
P21	Fw	CAGCATGACAGATTTCTACC
	Rv	CAGGGTATGTACATGAGGAG
14S	Fw	TCACCGCCCTACACATCAAAC
	Rv	TCCTGCGACTGCTGTCAGAG
SNAI2	Fw	CAGTGATTATTTCCCCGTATC
	Rv	CCCCAAAGATGAGGAGTATC
TWIST1	Fw	CTAGATGTCATTGTTTCCAGAG
	Rv	CCCTGTTTCTTTGAATTTGG
VEGF	Fw	ACCAAGGCCAGCACATAGG
	Rv	ACGCTCCAGGACTTATACCG
PII Aro	Fw	CTCTGAAGCAACAGGAGCTATAGA
	Rv	CAGGCACGATGCTGGTGATG
hPI.4 Aro	Fw	AACGTGACCAACTGGAGCCTG
	Rv	CATCACCAGCATCGTGCCTG
PLAU	Fw	GCTTTAAGATTATTGGGGGAG
	Rv	ATGTAGTCCTCCTTCTTTGG
hIL6	Fw	AGGAGACTTGCCTGGTGAAA
	Rv	CAGGGGTGGTTATTGCATCT

Tabla S1. 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.