



Melatonina como  
modulador de la  
expresión de  
angiopoyetinas en  
células HUVEC Y  
MCF-7

---

Ángela García Vidal

Alicia Verónica González Cabeza

Máster Biología Molecular y Biomedicina

Facultad de Medicina

2015

# Índice

<b>1. Abstract</b> .....	1
<b>2. Antecedentes</b> .....	2
<b>Angiogénesis</b> .....	2
<b>Estrógenos y formación de nuevos capilares sanguíneos</b> .....	4
<b>Expresión y estructura de Tie1 y Tie2</b> .....	5
<b>Angiopoyetinas</b> .....	6
<b>Melatonina</b> .....	8
<b>Mecanismo de acción de la melatonina</b> .....	8
<b>Melatonina en cáncer de mama y tejido peritumoral</b> .....	9
<b>La melatonina como antiestrógeno: propiedades SEEM y SERM</b> .....	10
<b>Papel de la melatonina en la angiogénesis tumoral</b> .....	11
<b>3. Objetivo</b> .....	11
<b>4. Metodología</b> .....	12
<b>Cultivos celulares</b> .....	12
<b>Recuentos celulares para siembras. Viabilidad tumoral</b> .....	13
<b>Tratamiento del suero para la eliminación de los estrógenos</b> .....	13
<b>Tratamientos y compuestos químicos</b> .....	14
<b>Experimentos de cocultivo celular</b> .....	14
<b>Estudios de expresión génica</b> .....	16
<b>Determinación de la cantidad y pureza del RNA</b> .....	17
<b>Síntesis de DNA complementario (cDNA)</b> .....	17
<b>Diseño de oligonucleótidos cebadores para RT-PCR</b> .....	18
<b>Detección de la expresión génica mediante PCR a tiempo real</b> .....	18
<b>Cuantificación y análisis de la expresión génica relativa (Valores Ct)</b> ...	19
<b>Análisis estadístico de los datos</b> .....	19

<b>5. Resultados</b> .....	20
<b>6. Discusión</b> .....	25
<b>7. Conclusiones</b> .....	28
<b>8. Investigaciones futuras</b> .....	28
<b>9. Agradecimientos</b> .....	29
<b>10. Referencias</b> .....	29

# **Abstract**

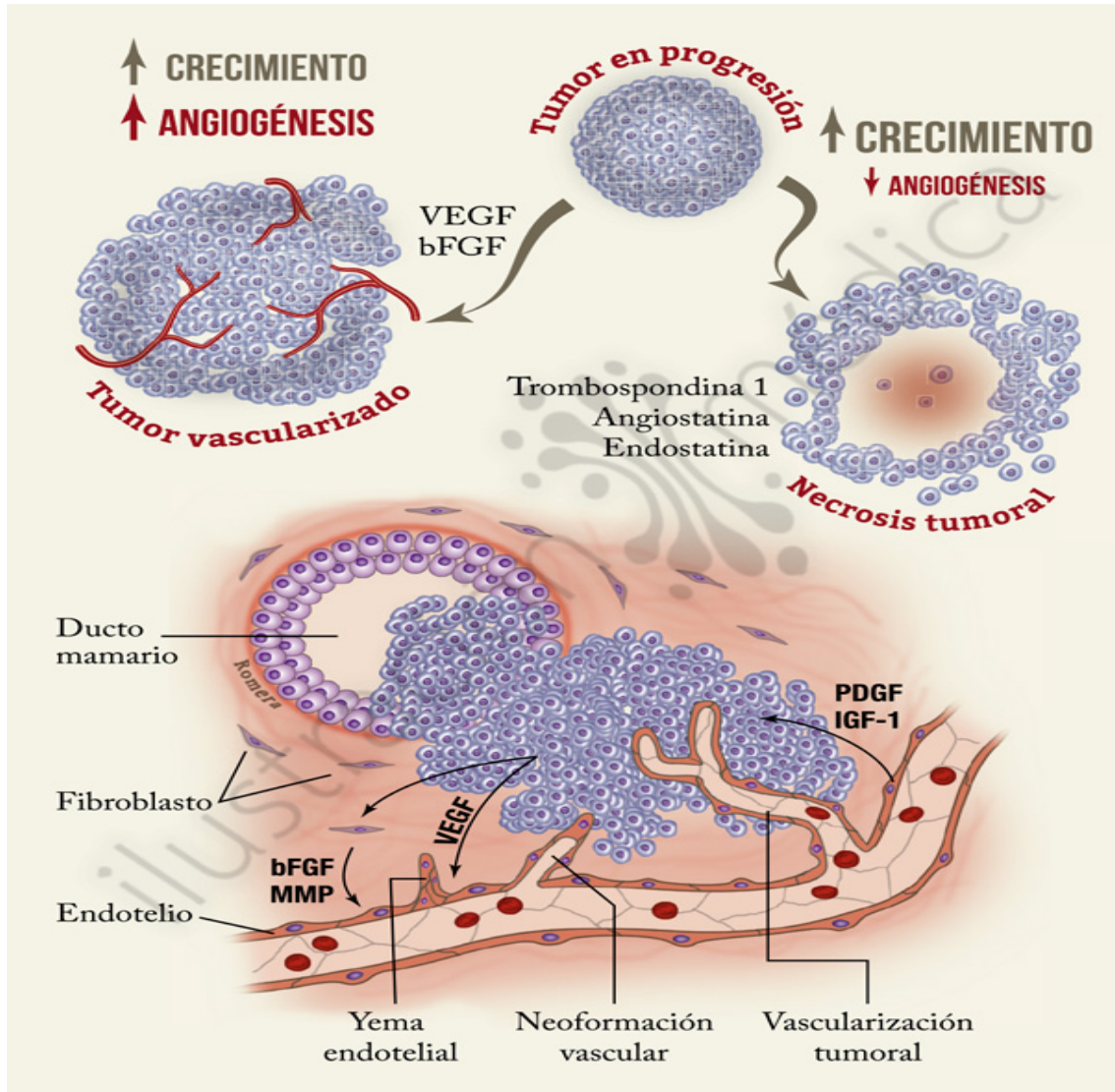
## **Melatonin as modulator of angiopoietins expression in HUVEC and MCF-7 cells**

Melatonin exerts oncostatic actions on human breast cancer cells. Angiopoietins are cytokines that regulate angiogenesis and the angiopoietin/tie system is a vascular specific ligand/receptor system that play a critical role in endothelial cell differentiation and blood vessel morphogenesis by regulating angiogenic-remodeling processes such as vessel stabilization/destabilization and pericyte recruitment or loss. Since it is known that melatonin has antiangiogenic actions, the aim of the present study was to investigate the regulatory effects of melatonin on angiopoietins 1 and 2 expression and Tie receptor in endothelial and human breast cancer cells. To accomplish this, we cocultured human breast cancer cells (MCF-7) with human umbilical vein endothelial cells (HUVECs). Melatonin increased *Ang1* and *Ang2* mRNA expression in MCF-7 cells and HUVEC at physiological and pharmacological concentrations. When HUVEC were incubated without the presence of MCF-7 both concentrations increased the *Tie2* expression. However, the *Tie2* expression in coculture was stimulated by melatonin only at  $10^{-9}$  M. Since it is known that melatonin inhibits VEGF expression in MCF-7 cells and that an increase in angiopoietins expression in the absence of VEGF lead to vessel regression, our findings suggest the melatonin could inhibit angiogenesis through an up-regulation on angiopoietins expression and a down-regulation on VEGF expression.

# Antecedentes

## Angiogénesis

El desarrollo de enfermedades como el cáncer se ve favorecido por la generación de vasos sanguíneos que crecen junto con el tumor; este proceso es conocido como angiogénesis tumoral.



**Figura 1.** Esquema de la Angiogénesis tumoral (Romera M. 2014) Porfolio de Ilustración Médica: Miniatlases de cáncer de mama

En el cáncer, la proliferación descontrolada de células tumorales requiere del suministro de oxígeno y nutrientes. El crecimiento tumoral favorece la generación de vasos sanguíneos que a su vez contribuyen al crecimiento del tumor y al establecimiento de metástasis. Por lo tanto, se considera la angiogénesis tumoral como un proceso susceptible a inhibición con fines terapéuticos. Además, se ha postulado que células progenitoras residentes en la médula ósea pueden responder a factores angiogénicos de origen tumoral y contribuir, de mayor a menor grado, a la angiogénesis tumoral y, en particular, al establecimiento de nichos metastásicos, de tal modo que células de la médula ósea han sido postuladas como vehículos terapéuticos para el tratamiento del cáncer.

Ante la premisa de que el crecimiento tumoral y establecimiento de metástasis requieren de la formación de capilares sanguíneos y linfáticos, destaca el potencial terapéutico de inhibir a la angiogénesis tumoral. Con esta idea, la identificación de proteínas que contribuyen a la formación de vasos sanguíneos tumorales como por ejemplo angiopoyetina-1(Ang-1) y angiopoyetina-2 (Ang-2), sirve de base para diseñar terapias que combatan el cáncer de manera específica. Las estrategias en desarrollo consisten en inhibir a las proteínas proangiogénicas mediante un diseño inteligente de fármacos, aprovechando el conocimiento básico generado de la caracterización de tales proteínas, siendo particularmente importantes aquellas relacionadas con la detección y transducción de señales angiogénicas. La investigación básica en este campo se ha enfocado tanto a la caracterización de moléculas y procesos implicados en el reconocimiento de factores angiogénicos de origen tumoral por parte de células endoteliales (como las utilizadas en nuestro estudio: tipo HUVEC, células de origen endotelial aisladas a partir de muestras de cordón umbilical humano) y progenitoras, como en el estudio de cascadas de señalización intracelulares que contribuyen a la angiogénesis tumoral. Estas redes de interacciones bioquímicas controlan diversos procesos celulares necesarios para la formación de un nuevo capilar, entre los que se incluyen el movimiento, proliferación y remodelado de células endoteliales. Estos procesos dependen de cambios en el citoesqueleto, de la expresión de genes y de la secreción de proteasas que remodelan a la matriz extracelular y liberan factores, quimiotácticos y de crecimiento atrapados en ella.

Las células líderes de la migración endotelial interpretan una serie de señales quimioatrayentes y repulsivas que determinan de forma muy precisa las rutas de extensión del capilar en formación. Estas células responden a gradientes de vascular endothelial growth factor (VEGF) y de otras moléculas que marcan los caminos de migración celular y aquellos en que se establecen barreras que limitan el desplazamiento celular. Tales sistemas de señales, incluyendo ligandos, receptores (como Tie2) y proteínas intracelulares de transducción de señales, participan en el remodelado embrionario del sistema vascular y en procesos de angiogénesis tumoral.

Actualmente, el VEGF es una de las más potentes citoquinas angiogénicas, que actúa directamente sobre el endotelio, induciendo la mitosis de células endoteliales y aumentando la permeabilidad de los vasos sanguíneos, que media tanto la angiogénesis fisiológica como patológica. En el cáncer mamario la expresión de VEGF intratumoral está significativamente elevada en los carcinomas ductuales, pero no en los lobulares. Estudios experimentales han demostrado que la inoculación de células tumorales a animales tratados con anticuerpos anti-VEGF se acompaña de una inhibición tanto del desarrollo tumoral como de la aparición de metástasis (Bracho I. y Vázquez J., 2014).

## **Estrógenos y formación de nuevos capilares sanguíneos**

Los estrógenos, además de comportarse como agentes estimuladores de la proliferación tumoral, son considerados también potentes factores estimuladores de la angiogénesis de los tumores hormonodependientes mamarios y, concretamente, han sido descritos elementos de respuesta estrogénicos funcionales asociados al gen del factor de desarrollo endotelial. Estos hallazgos apoyan la hipótesis de que los estrógenos regulan la expresión de VEGF al menos en parte a través de mecanismos transcripcionales implicando al receptor estrogénico e identifica a los estrógenos como potentes factores angiogénicos en los tumores mamarios estrógeno-dependientes. Se han descrito aumentos de la expresión génica de VEGF por los estrógenos en líneas celulares de tumores endoteliales y mamarios humanos y de útero de rata. Por el contrario, el tamoxifeno, antiestrógeno de síntesis, ha sido descrito como inhibidor del desarrollo del endotelio en tumores mamarios in vivo e induce hipoxia en MCF-7. Esta hipoxia puede llevar a cambios moleculares en las células, incluyendo cambios que pueden conferir un fenotipo de mayor malignidad, al cual puede acompañar la sobreexpresión del factor de desarrollo endotelial. Así, el tamoxifeno y otros antiestrógenos han sido descritos que tienen un efecto inhibitorio sobre la angiogénesis estimulada por el estradiol en cultivos de células tumorales mamarias cuando se usa a concentraciones entre 10 nM y 1  $\mu$ M. El tamoxifeno inhibe también el desarrollo de tumores mamarios de células MCF-7 transfectadas con el gen VEGF. Los niveles séricos de VEGF también se han correlacionado con la presencia de receptores estrogénicos.

Hasta el momento, pocos investigadores han estudiado el posible efecto de la melatonina sobre la angiogénesis tumoral *in vitro* en tumores mamarios. Álvarez García V. y cols. (2013), son unos de esos pocos y demostraron con su estudio que la adición de melatonina a concentración farmacológica (1 mM), inhibe de forma significativa la capacidad invasiva de las células HUVEC con respecto al grupo control y que el tratamiento con melatonina a esa misma concentración reduce significativamente la migración de las células HUVEC con respecto también al grupo control utilizado. En la literatura se encuentra un estudio *in vivo* del grupo de Lissoni en el que tras administrar melatonina a pacientes con tumores cancerosos avanzados describen un descenso en los niveles séricos de VEGF, sugiriendo que la melatonina pineal pueda estar involucrada en la regulación de los procesos angiogénicos. Se trata pues de una hipótesis original basada en datos indirectos, especialmente en la capacidad de la melatonina para contrarrestar acciones estrogénicas. Hay numerosas evidencias de que la melatonina se comporta como un antiestrógeno, por lo que no sería descartable que, al menos indirectamente, fuera capaz de modular la formación de nuevos capilares sanguíneos controlada por los estrógenos (Cos S. y cols., 2013).

## **Expresión y estructura de Tie1 y Tie2**

Tie1 y Tie2 son receptores específicos de las angiopoyetinas en las células endoteliales con peso molecular similar de aproximadamente 135 y 150 kDa, respectivamente. Originalmente fueron a principios de los años noventa, identificados como receptores huérfanos que se expresan en las células endoteliales vasculares y linfáticos. Ambos receptores son estructuralmente similares en la región citoplásmica (76% de identidad de secuencia), pero muestran sólo el 33% de similitud en la parte extracelular. Tie1 y Tie2 son tirosina quinasas con dominios de homología Ig y EGF. El dominio extracelular consiste en tres inmunoglobulinas (Ig). Los dominios intracelulares más pequeños de ambos receptores consisten en un dominio quinasa de división que se puede unir a diferentes moléculas después de la autofosforilación. Mediante análisis de estructuras cristalinas se pudo demostrar que los ligandos Ang-1 y Ang-2 se unen con una afinidad casi similar al mismo sitio del receptor Tie2 (Thurston G. y Daly C. 2012).

Ang-1 y Ang-2 se unen ambos a Tie2, pero sólo Ang-1 induce su autofosforilación y con ello la activación del receptor. Como ligando antagonista, Ang-2 no induce la autofosforilación del receptor, pero compite con Ang-1 para actuar como un inhibidor de la señalización de Ang-1 / Tie2. Sin embargo, algunos estudios también identificaron Ang-2 como un antagonista de Tie2. Ang-1 en unión a Tie2 conduce a una activación de vías de señalización dentro de la célula mediante el reclutamiento de diferentes proteínas adaptadoras al receptor.



El Sistema de señalización angiopoyetina-Tie ha sido identificado como un receptor específico vascular de la vía TyrosinKinasa que es esencial para el desarrollo de los vasos. Este sistema de señalización es muy importante también para llegar a comprender el sistema VEGF.

Por ejemplo, los receptores Tie (Tie1, Tie2 o Tek) son expresados selectivamente por células endoteliales como HUVEC, similar a lo que se ha encontrado con los receptores de VEGF.

La señalización por receptores Tie complementa la vía VEGF contribuyendo en etapas posteriores del desarrollo vascular. Mientras las señales VEGF promueven la iniciación de eventos en angiogénesis tales como la germinación de las células endoteliales, las señales angiopoyetina-Tie parecen promover la supervivencia de las células endoteliales y la formación vascular, la estabilidad y la maduración (Thurston G. y Daly C. 2012).

## **Angiopoyetinas**

Las Angiopoyetinas se componen de un dominio amino-terminal que sirve para promover la agrupación del origen superior de las moléculas, seguido por un dominio que promueve la multimerización y un dominio homólogo al fibrinógeno carboxi-terminal que contiene los sitios de enlaces para Tie2. Estas forman multímeros homoméricos de orden superior que contienen de 3 a 6 (o más) proteínas individuales. En general son proteínas adhesivas, particularmente Ang-1, con interacciones con la matriz extracelular. Por esto, se ha hecho mucho esfuerzo para generar formas recombinantes artificiales de Ang-1.

La Angiopoyetina 1 fue identificada inicialmente como un ligando activador para Tie2, que se expresa en las células perivasculares. La delección genética de Ang1 da como resultado letalidad embrionaria, debido a graves defectos vasculares y en el corazón, muy similares en el fenotipo de ratones Tie2 nulos. Los vasos sanguíneos de ratones nulos se forman en presencia de Ang1, pero carecen de fijación adecuada de los pericitos y no maduran. Ang1 se expresa fuertemente en el corazón en el estado medio del desarrollo embrionario y se expresa moderadamente por pericitos y células perivasculares en vasos normales. Curiosamente, Ang1 se almacena a altos niveles en gránulos de las plaquetas.

La Angiopoyetina 2, en un principio, fue identificada por homología con Ang-1. Se descubrió que Ang-2 se unía a Tie2 con una afinidad similar a la de Ang1. Sin embargo, a diferencia de Ang-1, Ang-2 (exógena) proporciona una activación muy débil de Tie2 en las células endoteliales. Al añadir Ang-2 exógena junto a Ang-1, los niveles de fosforilación de Tie2 se redujeron en comparación con la adición de Ang1 sólo. Este y otros resultados llevaron a pensar que Ang2 era un antagonista de Tie2 (Thurston G. y Daly C. 2012).

Las angiopoyetinas son secretadas como glicoproteínas diméricas con un peso molecular de aproximadamente 75 KDa. Ang-1 tiene 498 aa y se encuentra en el cromosoma 8q23. Ambas moléculas muestran una homología de secuencia de aproximadamente 60%. Ang-1 se expresa en las células musculares lisas y otras células perivasculares. Como Ang-2, se une a Tie2 con una afinidad de aproximadamente 3 nM en el dominio IgG-like y dominio de tipo EGF de Tie2, en Ang1 se produce como cuatro variantes de empalme diferentes. Variantes de empalme con 1,5 kb (larga duración Ang-1) y 1,3 kb se unen al receptor e inducen su autofosforilación. Las proteínas codificadas por los 0,9 kb y 0,7 kb también se unen a Tie2, pero no inducen autofosforilación. Una variante de Ang-2 debido a un empalme distinto es Ang-2B, con un dominio amino-terminal truncado, esta se ha detectado en pollos. Otra variante de empalme adicional (Ang-2 (443)) carece de partes del dominio enrollado de la bobina y no puede estimular la fosforilación de Tie2. Ang-1 actúa como un agonista del receptor Tie2, mientras que Ang-2 es el antagonista. Sin embargo, se sabe que Ang-2 también induce la fosforilación dependiente del receptor. La base molecular de la agonística frente a funciones antagónicas de Ang-2 no se ha descifrado todavía pero sí se conoce la implicación de los tipos celulares, efectos específicos, el grado de confluencia endotelial, la duración de la estimulación de Ang-2, los efectos dependientes de la concentración, así como la presencia de co-receptores tales como Tie1 en el control de las funciones antagónicas de Ang-2 (Thomas M. y Augustin H.G. 2009).

Ang-2 se expresa predominantemente en las células endoteliales donde se almacena en los cuerpos de Weibel-Palade (WPB) y algunas células del músculo liso. Después de la activación de citoquinas del endotelio, Ang-2 se libera rápidamente de WPB. Actúa en un Menner autocrino en el receptor Tie2 por la unión como homodímeros o multímeros (Thomas M. y Augustin H.G. 2009). A diferencia de Ang-1, la expresión de Ang-2 está fuertemente regulada: su expresión en vasos maduros y en reposo es normalmente baja pero se incrementa en muchos entornos inflamatorios y angiogénicos. Por ejemplo, la expresión de Ang-2 en células endoteliales cultivadas se incrementa por TNF, VEGF y la hipoxia.

Estudios recientes han demostrado que Ang-2 endógeno puede actuar a través de un mecanismo autocrino de vascularización interna. Este concepto se basa en experimentos celulares que muestran que la liberación endógena de Ang-2 no puede ser inhibida por receptor Tie2 exógeno.

Los niveles de Ang-2 son regulados por la hipoxia. En condiciones fisiológicas, Ang-2 se expresa en las regiones de la remodelación vascular, por ejemplo durante la vascularización de la retina o durante la regresión vascular en el cuerpo lúteo ovárico cíclico. La expresión de Ang-2 también está regulada positivamente en la condición patológica, por ejemplo, en el endotelio de los tumores y en las propias células tumorales. Por otra parte, las neuronas de la retina y las células de Müller son una fuente de Ang-2 (Thomas M. y Augustin H.G. 2009).

En contraste con Ang-2, Ang-1 se expresa principalmente en células mesenquimales y actúa de manera paracrina sobre el endotelio. Se expresa en el miocardio durante el desarrollo temprano y en las células perivasculares más tarde durante el desarrollo y en tejidos adultos. Ang-1 también se expresa en células tumorales y las células neuronales del cerebro.

## Melatonina

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

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

Una vez sintetizada, la melatonina no se almacena en la glándula pineal sino que difunde directamente a la sangre, donde circula mayoritariamente unida a albúmina o bien se libera hacia el líquido cefalorraquídeo, donde se encuentran niveles de melatonina muy superiores a los circulantes (Tan y cols., 2003).

## Mecanismo de acción de la melatonina

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

- Unión a receptores de membrana: hasta el momento se han clonado y caracterizado dos tipos de receptores de melatonina de alta afinidad en mamíferos: MT1 y MT2
- Unión a receptores nucleares: algunos de los efectos de la melatonina no pueden explicarse debido a su unión a receptores de membrana. Estos receptores son factores de transcripción que pertenecen a la superfamilia de receptores del ácido retinoico, y su naturaleza como receptores nucleares de melatonina resulta aún controvertida.
- Interacción con la calmodulina (CaM): la melatonina es capaz de interactuar con proteínas intracelulares, como la calmodulina (CaM). Éste constituye un mecanismo de acción de la melatonina independiente de su unión a receptores (Benítez-King y cols. 1993).

- Neutralización de radicales libres: la melatonina es un potente neutralizador de radicales libres debido a su capacidad para transferir electrones a radicales hidroxilo, aniones superóxido, peróxido de hidrógeno, ácido hipocloroso, óxido nítrico y aniones peroxidonítricos (Allegra y cols., 2003)

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

## **Melatonina en cáncer de mama y tejido peritumoral**

El cáncer de mama es el tumor maligno más frecuente entre las mujeres de todo el mundo (a excepción de los tumores de piel no melanomas).

La incidencia del cáncer de mama aumentó un 20% entre 2008 y 2012, con 1,67 millones de nuevos casos diagnosticados el año pasado, lo que lo convierte en el segundo tipo de cáncer más común en el mundo y, con diferencia, el más frecuente entre mujeres, tanto en el mundo desarrollado como en desarrollo (Organización Mundial de la Salud (OMS) 2014).

En España se diagnostican unos 26.000 casos al año, lo que representa casi el 30% de todos los tumores del sexo femenino en nuestro país. La mayoría de los casos se diagnostican entre los 35 y los 80 años, con un máximo entre los 45 y los 65 (asociación española contra el cáncer., aecc., 2014).

La mayoría de los cánceres de seno son carcinomas, a menudo un tipo de carcinoma llamado adenocarcinoma, que es el carcinoma que comienza en el tejido glandular.

El cáncer de pecho también se puede clasificar en función de las proteínas que se encuentran sobre la superficie de las células cancerosas o dentro de ellas, en grupos como “receptor hormonal positivo” o “triple negativo”.

Los efectos directos antiestrogénicos de la melatonina en las células de cáncer de mama se ponen de manifiesto en estudios in vitro e in vivo. Muchos de estos se llevaron a cabo en líneas celulares de cáncer de mama MCF-7, utilizadas también en este proyecto. Las células MCF-7 son células obtenidas del derrame pleural de una mujer con carcinoma metastásico de mama. Esta línea celular de tumor de mama representa un buen modelo para el estudio de los mecanismos moleculares de acción de los estrógenos en cáncer de mama ya que el contenido de

los receptores de estrógenos,  $ER_{\alpha}$  y  $ER_{\beta}$ , crecen dependiendo de la presencia de estrógenos en los medios de cultivo. Los niveles de algunos RNAs y proteínas en estas células también son controladas por estrógenos. La melatonina ejerce un efecto directo anti proliferativo, incluyendo una disminución en el número de células, contenido de DNA y la incorporación de Timidina (American Cancer Society 2015).

Las señales paracrinas en el tejido peritumoral mamario proporcionan una vía de comunicación fundamental entre las células epiteliales tumorales y el tejido adiposo que rodea al tumor. Dada su importancia, ha sido estudiado el posible papel de la melatonina en la regulación de estas señales. Álvarez García V. y cols. (2013) desarrollaron un modelo de cocultivos celulares in vitro que permitió analizar los mecanismos de comunicación paracrina que tienen lugar entre el tejido tumoral mamario y el tejido adiposo, así como su respuesta a melatonina. Consistió en evaluar la capacidad de las células tumorales para inducir la diferenciación de los adipocitos adyacentes así como explorar el papel de la melatonina. La presencia de células MCF-7 en el cultivo disminuyó significativamente la diferenciación de los adipocitos con respecto al grupo control de células diferenciadas cultivadas solas. La adición de melatonina (1 mM) al medio contrarrestó el efecto inhibitor producido por las células epiteliales tumorales.

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

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

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

## **Papel de la melatonina en la angiogénesis tumoral**

Los efectos antiproliferativos de la melatonina han sido descritos *in vitro* en células HUVEC (Cui y cols., 2006) y pueden ser explicados de dos maneras. En primer lugar, este efecto podría responder en parte al bloqueo del ciclo celular inducido por la hormona pineal, que impide a las células entrar en la fase S, por lo que se reduce el número de células que entran en mitosis. Además, se ha propuesto que otro mecanismo implicado en el efecto antiproliferativo de la melatonina estaría basado en la capacidad de esta hormona para inducir la apoptosis celular. Esta teoría se apoya en numerosas evidencias que apuntan a la melatonina como una molécula capaz de regular la apoptosis en distintos tipos celulares. Así, se ha visto que la hormona pineal previene la apoptosis en células del sistema inmune y neuronas, mientras que la incrementa en células tumorales (Sainz y cols., 2003).

Las propiedades oncostáticas de la melatonina pueden explicarse a partir de distintos mecanismos y uno de ellos se basa en su capacidad para inhibir la creación de nuevos vasos sanguíneos que aporten oxígeno y nutrientes al tumor. La correlación entre melatonina y algunos factores angiogénicos ha sido demostrada a partir de varias evidencias experimentales. En concreto, se ha comprobado el efecto inhibitorio de la melatonina sobre la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) tanto en ensayos *in vitro* realizados en varias líneas celulares humanas (Dai y cols., 2008) como *in vivo* en ovario de ratas (Romeu y cols., 2011). Álvarez García V. y cols. (2013) trataron células MCF-7 a diferentes concentraciones de melatonina provocando todas ellas un efecto inhibitorio sobre la expresión génica de VEGF. El tratamiento más potente fue 1 mM de melatonina reduciendo con un 40% la expresión de VEGF con respecto al control utilizado.

La actividad antiangiogénica de la melatonina también ha sido estudiada en pacientes terminales de cáncer, en los que se observó que el tratamiento con melatonina estaba asociado a una disminución de los niveles de VEGF en sangre, lo cual sugiere que esta hormona es capaz de controlar el crecimiento tumoral, al menos en parte, gracias a sus propiedades antiangiogénicas (Lissoni y cols., 2001).

### **Objetivo:**

El objetivo del presente estudio fue investigar los efectos reguladores de la melatonina sobre angiopoyetinas 1 y 2 y la expresión del receptor Tie2 en las células de cáncer de mama y endoteliales humanas. Para lograr esto, se realizaron cocultivos de células de cáncer de mama humano (MCF-7) con las células endoteliales de la vena umbilical humanas (HUVEC), además de cultivos en solitario de ambos tipos.

# Metodología

## Cultivos celulares

### Líneas celulares utilizadas en el estudio.

Para la realización de los experimentos descritos en este trabajo se han utilizado las líneas celulares siguientes: MCF-7 y HUVEC

Línea celular	Denominación ATCC	Origen de la línea	Medio de cultivo
MCF-7	HTB-22	Célula epitelial de adenocarcinoma mamario humano	DMEM + 10% SFB
HUVEC	PCS-100-010	Célula endotelial de cordón umbilical humano	VCBM + 2% SFB

**Tabla 1. Resumen de las líneas celulares utilizadas en este trabajo.** Abreviaturas: HUVEC: *Human Umbilical Vein Endothelial Cells*; ATCC: *American Type Culture Collection*; DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*; VCBM: *Vascular Cell Basal Medium*; SFB: *Suero Fetal Bovino*.

### Condiciones de cultivo.

#### Comunes a todas las líneas celulares

- Tipo de cultivo: células adherentes en monocapa.
- Mantenimiento rutinario en placas de plástico de 10 cm de diámetro (Falcon).
- En todos los casos, a los medios de cultivo se les añadió una protección antibiótica consistente en 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina (Sigma-Aldrich).
- Los cultivos celulares se mantuvieron a 37°C en una atmósfera saturada de agua y con 5% de CO<sub>2</sub>.
- Un stock de cada una de las líneas celulares empleadas en este trabajo fue mantenido a -150 °C, en una preparación crioprotectora que contiene 90% (v/v) de SFB (PAA) y 10% de dimetil-sulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich).

### Específicas de cada línea celular

- Las células MCF-7 se cultivaron usando como nutriente el medio DMEM con rojo fenol (Cambrex, BioWhittaker), suplementado con 10% (v/v) de SFB.
- Para las células HUVEC se usó el medio VCBM (ATCC) suplementado con 2% de SFB (ATCC) y con el kit de crecimiento celular endotelial-BBE (ATCC) que contiene 0,2 % de extracto de cerebro bovino (BBE), 5 ng/ml rhEGF, 10 mM L-glutamina, 0,75 U/ml heparina sulfato, 1 µg/ml hidrocortisona hemisuccinato y 50 µg/ml ácido ascórbico.
- Para evitar mutación genética y un descenso en la viabilidad celular, no se utilizaron HUVECs de pases posteriores al 5.

### **Condiciones de subcultivo**

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

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

De la suspensión celular obtenida en cada subcultivo, se tomaron 100 µl para llevar a cabo el recuento celular en una cámara de Neubauer (Marienfeld, GmbH) mediante un microscopio óptico de fluorescencia invertido (Nikon TMS) utilizando un aumento de 10X. En todos los casos se realizó la tinción de la muestra con el colorante *trypan blue* 0,4%v/v (Sigma-Aldrich), que permitió valorar la proporción de células viables (las que excluyen el colorante), frente a las no viables.

### **Tratamiento del suero para la eliminación de los estrógenos**

Las células en cultivo requieren, para su crecimiento, la presencia en el medio de numerosos factores de crecimiento y hormonas como el estradiol. Muchas de estas moléculas son aportadas por el suero. En algunos experimentos de expresión génica, en los que se añaden tratamientos para evaluar la acción de distintos factores de crecimiento, fue necesario reducir, en la medida



de lo posible, los niveles de los mismos en el medio de cultivo sin que se viera comprometida la viabilidad celular. Para ello, las células se sembraron en medios sin rojo fenol, un colorante utilizado como indicador de pH que posee actividad estrogénica (Berthois y cols, 1986), y con suero libre de estrógenos.

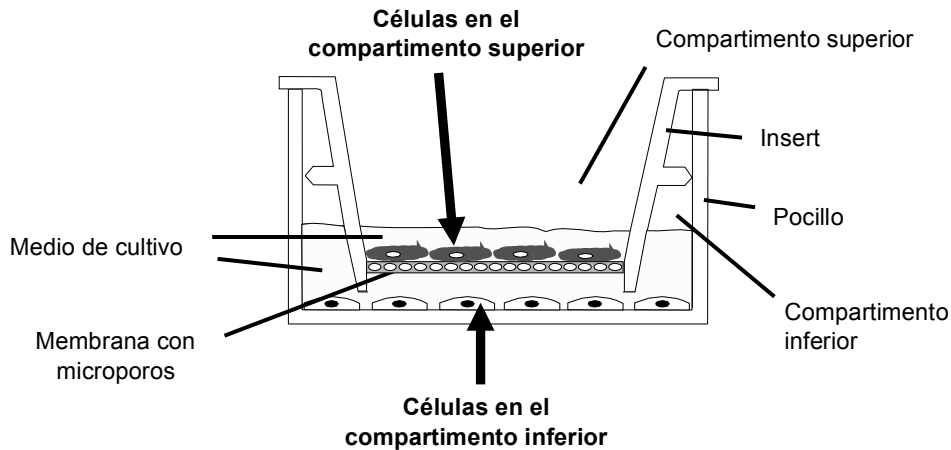
La eliminación de las hormonas esteroideas y factores de crecimiento del suero se realizó adaptando el protocolo descrito por Samuels y cols., (1979). Éste consiste en una incubación del suero con 1% (p/v) de carbón activado (Sigma-Aldrich) y 0,1% (p/v) de dextrano T-70 (Sigma-Aldrich), a 56°C durante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

## Tratamientos y compuestos químicos

El stock de melatonina se preparó disolviéndolo en etanol 100% a una concentración de 100 mM, almacenándose este a -20°C en forma de alícuotas. En el momento de proceder al tratamiento de las células se realizó una dilución de 1000 veces en el medio de cultivo, de manera que la concentración de etanol en el medio fue de 0,1% (v/v) por el compuesto utilizado. El reactivo se obtuvo en Sigma-Aldrich. Las concentraciones utilizadas fueron melatonina  $M^{-3}$  equivalente a las concentraciones fisiológicas y melatonina  $M^{-9}$  que se corresponde con una concentración farmacológica.

## Experimentos de cocultivos celulares

Los experimentos de cocultivos celulares se realizaron con el objetivo de simular un modelo de cáncer de mama *in vitro*. Para ello, se utilizaron placas de cultivo de 24 pocillos (Falcon) en las que se sembraron células procedentes de las líneas celulares estudiadas. En cada pocillo se colocó un insert (Falcon) provisto de una membrana permeable de 0,45 µm de tamaño de poro, sobre el que se sembraron células de una línea celular distinta a la que se encontraba en el compartimento inferior. El uso de este dispositivo permitió analizar las relaciones paracrinias que ocurrieron entre células pertenecientes a líneas diferentes. La **figura** muestra una representación esquemática del mecanismo utilizado en los experimentos de cocultivos, compuesto por un pocillo perteneciente a una multiplaca de 24 y su insertcorrespondiente.



**Figura 2.** Representación esquemática de un pocillo y un inserto utilizados en los experimentos de cocultivos celulares.

### **Cocultivos de MCF-7 y HUVEC**

Las células MCF-7 se sembraron en placas de 24 pocillos (Falcon) a una concentración de  $30 \times 10^3$  células/pocillo en medio DEMEM suplementado con 10% SFB. Las células HUVEC se sembraron a su vez en los insert a una densidad de  $15 \times 10^3$  células/insert en medio 2% SFB/VCBM; al día siguiente se introdujeron los insert (que sobre su membrana permeable portaban células HUVEC) en los pocillos y se cambió el medio a los dos tipos celulares poniéndolos a cada uno su medio correspondiente pero esta vez retirando el suero y con una concentración de 0,5% DCC; 24h más tarde, se lavó la placa 2 veces con PBS y se añadió a las células HUVEC medio VCBM sin suero 0,5% DCC con las concentraciones melatonina  $M^{-3}$ , melatonina  $M^{-9}$  y un control haciendo exactamente lo mismo con las células MCF-7 en su medio DEMEM sin suero 0,5% DCC. Al cabo de 4 horas se recogieron los medios con el fin de determinar la concentración de Angiopoyetina-1, Angiopoyetina-2 y VEGF mediante ELISA.

### **Cocultivos de HUVEC y MCF-7**

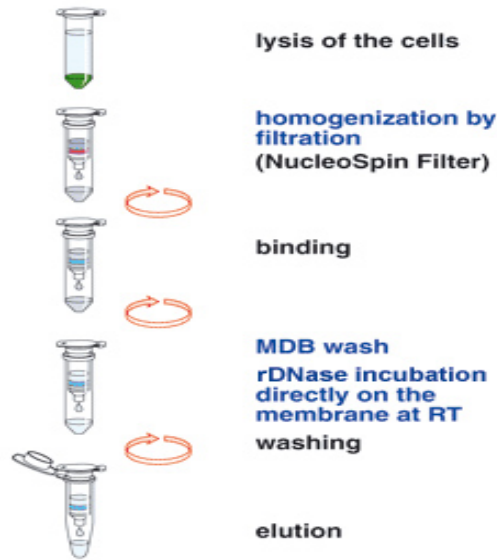
Las células HUVEC se sembraron en placas de 6 pocillos (Falcon) a una densidad de  $5 \times 10^5$  células/pocillo en medio VCBM suplementado con 2% SFB y en los insert (Falcon) provistos de una membrana permeable de  $0,45 \mu\text{m}$  de tamaño de poro se sembraron las células MCF-7 con densidad igual a  $4 \times 10^5$  en medio DEMEM suplementado con 10% SFB; al día siguiente se introdujeron los insert en los pocillos cambiando los medios exactamente igual que en los cocultivos MCF-7 y HUVEC, es decir, retirando el suero y añadiendo 0,5% DCC a los medios. 24 horas más tarde se absorbió el medio, se lavaron los compartimentos 2 veces con PBS y se añadió medio VCBM sin suero DCC 0,5% con concentraciones melatonina  $M^{-3}$ , melatonina  $M^{-9}$  y un control a las células HUVEC y lo mismo para las células MCF-7 con su medio DEMEM sin suero DCC 0,5%. Al cabo de 4 horas se recogió el medio para determinar la concentración de las Angiopoyetinas-, Angiopoyetina-2 y VEGF mediante ELISA.

## Estudios de expresión génica

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

El método utilizado para la extracción de RNA total de las células fue el del kit comercial NucleoSpin II (Macherey-Nagel), el cual se resume en el siguiente esquema

#### NucleoSpin® RNA Plant procedure



**Figura 3.** Etapas del método de extracción de RNA mediante el kit comercial NucleoSpin RNA II (Macherey-Nagel).

Las células se lavaron con PBS y se homogeneizaron sobre la placa de cultivo, utilizando un tampón de lisis con un alto contenido en tiocinato de guanidina, que inactiva las RNasas. El lisado se dispuso en una columna de filtración (*NucleospinFilterUnits*) para reducir la viscosidad de la muestra y aumentar su pureza. Una vez centrifugada, se le añadió etanol al 70 % (v/v) para ajustar las condiciones óptimas de unión, y se transfirió el lisado a una nueva columna (*Nucleospin RNA II*), en la que el RNA total se unió a la membrana de sílica gel de la misma. El DNA contaminante, que también se une a la membrana, se eliminó mediante tratamiento con una DNasa reconstituida. Después de 3 lavados sucesivos para eliminar los restos de sales y componentes celulares no deseados, se eluyó el RNA en 40 µl de agua libre de RNasas.

## Determinación de la cantidad y pureza del RNA.

La cuantificación de las muestras se realizó mediante la lectura de su absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro (Nanodrop 1000 V 3.6). La pureza se midió mediante el cociente entre absorbancia a 260 nm y a 280 nm, el cual hace referencia a la cantidad de proteínas presentes en la muestra. Un resultado de 2,0 indica un RNA puro, sin contaminantes. En todos los experimentos, este cociente fue siempre superior a 1,8.

## Síntesis de DNA complementario (cDNA).

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

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

**Tabla 1. Componentes empleados en la reacción de retrotranscripción.**

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

## Diseño de los oligonucleótidos cebadores para RT-PCR

En el diseño de los oligonucleótidos cebadores para la RT-PCR se utilizaron los programas informáticos *SequenceAnalysis 1.6* y *DNAMAN* (LynnonCorporation) así como la página web *TheSequenceManipulation Suite*. Se consideraron adecuadas las parejas de oligonucleótidos cuya longitud estuviera en torno a 20-25 bases, su porcentaje de G+C fuera de aproximadamente el 50%, su T<sub>m</sub> estuviera en torno a 60°C y su composición no favoreciese la aparición de estructuras secundarias.

Al inicio de todos los experimentos, se optimizó el ensayo con una matriz de diferentes concentraciones de los distintos oligonucleótidos cebadores (Sigma-Genosys), para identificar la concentración que obtuviera un menor valor de C<sub>T</sub> y una mayor fluorescencia. La ausencia de dímeros y productos de amplificación indeseados se analizó sometiendo los productos de amplificación a electroforesis en gel de agarosa-Tris-Borato EDTA al 1% (p/v). La longitud fragmentos de DNA amplificados osciló entre 100 y 180 pares de bases. A modo de control interno de cada reacción, se diseñó una pareja de oligonucleótidos específicos del gen codificante de la subunidad 14S del RNA ribosomal humano (rRNA).

Todos los oligonucleótidos empleados en los estudios de expresión génica se detallan en la tabla

Gen	Secuencia	Longitud amplión (pb)	Concentración (nM)
<b>S14 fw</b>	5'-TCCTGCGAGTGCTGTCAGAG-3'	159	100
<b>S14 rv</b>	5'-TCACCGCCCTACACATCAAAC-3'		100
<b>ANG1 fw</b>	5'-GAAGGGAACCGAGCCTATTC-3'	182	100
<b>ANG1 rv</b>	5'-AGGGCACATTTGCACATACA-3'		100
<b>ANGPT2 fw</b>	5'-AAGAGAAAGATCAGCTACAGG-3'	174	200
<b>ANGPT2 rv</b>	5'-CCTTAGAGTTTGATGTGGAC-3'		200
<b>TEK fw</b>	5'-AAGACCTACGTGAATACCAC -3'	123	200
<b>TEK rv</b>	5'-GAAACAGAGGGTATACAGATG -3'		200

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

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

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

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

La reacción tuvo lugar en un termociclador de tiempo real MX3000P Real-Time PCR (Stratagene) usando tubos de 0,2 ml (CmbBioline, Cultek). En cada reacción se añadieron 6,25  $\mu$ l de mezcla de Brilliant® SYBR® Green PCR Master Mix (Stratagene), entre 0,63 (50 nM) y 2,5  $\mu$ l (200 nM) de cada oligonucleótido, 1  $\mu$ l de cDNA, y agua libre de RNAsas hasta completar un volumen final de reacción de 12,5  $\mu$ l. Cada muestra se analizó por triplicado, y el experimento se repitió un mínimo de 3 veces en idénticas condiciones.

Las condiciones de amplificación fueron una modificación de las establecidas por el programa: desnaturalización inicial de 10 minutos a 95°C seguida de 45 ciclos de 95°C durante 30 segundos, anillamiento a 55°C durante 45 segundos y extensión a 72°C durante 30 segundos. Para verificar la especificidad de la reacción se añadió un paso adicional, la curva de disociación, donde las muestras se calientan lentamente desde 55 hasta 95°C, monitorizándose continuamente la fluorescencia emitida. La temperatura a la cual el DNA se desnaturaliza se observa como una drástica caída de la fluorescencia debido a la disociación del SYBR Green, apareciendo un pico cuando se representa la derivada de la fluorescencia frente a la temperatura.

### **Cuantificación y análisis de la expresión génica relativa (valores de $C_T$ )**

Los resultados fueron analizados con un programa específico de análisis, StratageneMXPro software versión 3.0 (Stratagene), donde se normalizó el resultado obtenido en las muestras de los genes problema con respecto al gen de referencia (14S, rRNA), utilizando un método de comparación de los valores de  $C_T$  ( $\Delta C_T$ ) (Livak y Schmittgen, 2001), que se resume en el siguiente esquema:

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

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

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

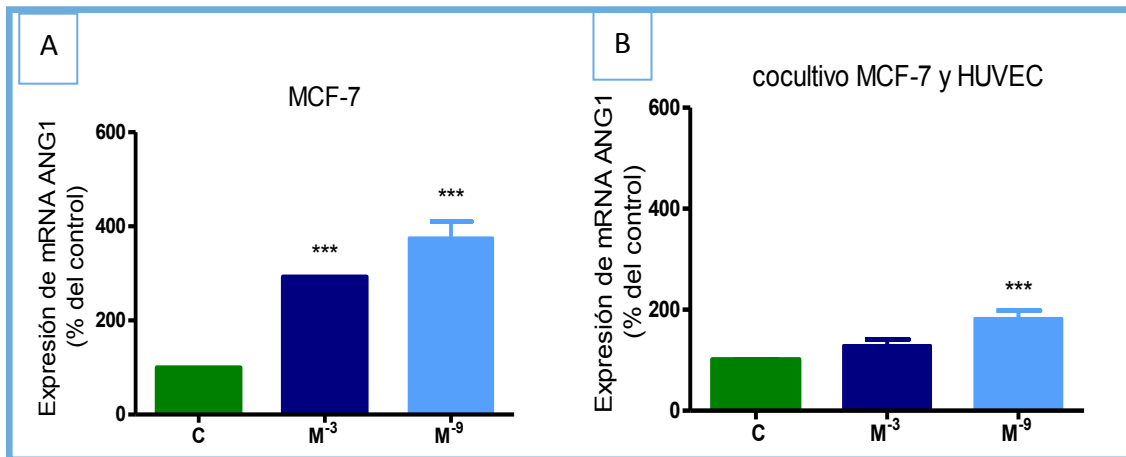
### **Análisis estadístico de los datos**

Todos los estudios estadísticos fueron realizados utilizando el programa GraphPad Prisma 4.0 (GraphPad Software). Los análisis estadísticos realizados fueron en todos los casos estudios paramétricos, aplicados a variables ajustadas a una distribución normal. En estos casos se realizaron análisis paramétricos de la varianza (ANOVA) seguidos, en caso de valores significativos del mismo, del test de Student-Newman-Keuls, para calcular las diferencias

estadísticamente significativas existentes entre los distintos grupos experimentales. Los resultados se consideraron estadísticamente significativos para valores de  $P < 0.05$ .

## Resultados

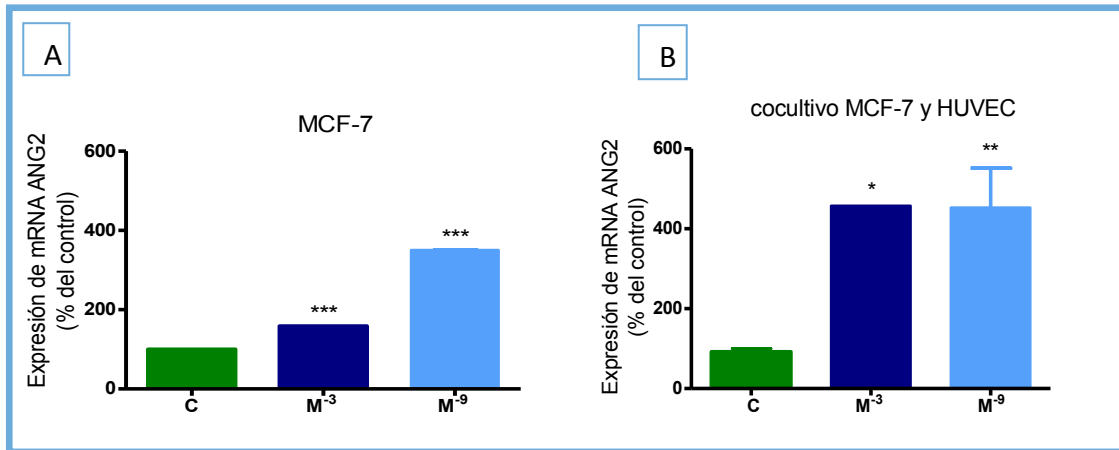
Siguiendo las indicaciones explicadas en el apartado de metodología se obtuvieron los resultados representados en las gráficas expuestas a continuación, poniendo de manifiesto la capacidad de la melatonina para aumentar tanto la expresión génica de las angiopoyetinas utilizadas, Ang-1 y Ang-2, como la expresión del receptor Tie2 de las células endoteliales HUVEC.



**Figura 4.** A) Efectos de la melatonina en la expresión del gen de Ang-1 en cultivos de MCF-7. Estos se realizaron en placas de 24 pocillos durante 24 h con medio suplementado con 10% FBS y a continuación las células se mantuvieron 24h con medio y suero 0,5% DCC. Se añadió el tratamiento de melatonina consistente en concentraciones  $M^{-3}$  y  $M^{-9}$  y transcurridas 4h se recogieron las células para la extracción de RNA, la subsecuente transformación a DNAc y posterior Q-PCR. B). Los cocultivos de HUVEC y MCF-7 se hicieron en las mismas condiciones descritas excepto que las HUVEC fueron cultivadas en insert que se colocaron sobre las placas que contenían células MCF-7. El proceso experimental fue exactamente idéntico al utilizado con las placas de MCF-7 solas con la excepción de que cada tipo celular llevaba su medio. Los resultados han sido expresados en porcentaje con respecto al control: media (de cinco experimentos independientes en la gráfica a y cinco en la b) +/- desviación estándar de la media \*\*\*,  $P < 0,001$

En cuanto a los cultivos de las células tumorales (MCF-7), en placas de 24 pocillos (Falcon) en solitario, (sin la presencia de los insert conteniendo las células endoteliales), los resultados obtenidos de la extracción de RNA resultaron menos eficientes en comparación con la cantidad de RNA que se extrajo de los cocultivos de células MCF-7 en la base con células HUVEC en los insert. Las relaciones paracrinias entre estos dos tipos celulares se vieron reflejadas en el proceso de cuantificación del RNA. Al observar los datos obtenidos tras realizar las PCRs correspondientes, vimos con claridad como la melatonina estimulaba la expresión de la

Angiopoyetina -1 tanto en los cultivos de MCF-7 como en los cocultivos de ambos tipos celulares. En solitario, la melatonina tanto a concentraciones fisiológicas como farmacológicas consiguió más que triplicar la expresión del gen. En el caso de la Ang-1 en cocultivo con MCF-7 en la base de la placa e insert con HUVEC sobre ellas, la expresión aumenta en ambas concentraciones  $M^{-3}$  y  $M^{-9}$  pero sólo se encontraron diferencias significativas en el caso de la concentración fisiológica (**Fig.4**).



**Figura 5.-A)** Efectos de la melatonina en la expresión del gen de Ang-2 en cultivos de MCF-7. Estos se realizaron en placas de 24 pocillos (Falcon) al igual que el experimento de la figura 4 y exactamente en las mismas condiciones y con un tratamiento de melatonina a concentraciones  $M^{-3}$  y  $M^{-9}$ . En este caso también se recogieron los medios de cultivo y las células para la extracción de RNA, la subsecuente transformación a DNAc y posterior Q-PCR. **B)** Los cocultivos de HUVEC y MCF-7 se hicieron en las mismas condiciones descritas excepto que las HUVEC fueron cultivadas en insert que se colocaron sobre las placas que contenían células MCF-7. El proceso experimental fue exactamente idéntico al utilizado con las placas de MCF-7 solas con la excepción de que cada tipo celular llevaba su medio. Los resultados han sido expresados en porcentaje con respecto al control: media (de cuatro experimentos independientes en la gráfica a y cinco en la b) +/- desviación estándar de la media \*,  $P < 0,05$ ; \*\*,  $P < 0,01$  y \*\*\*,  $P < 0,001$

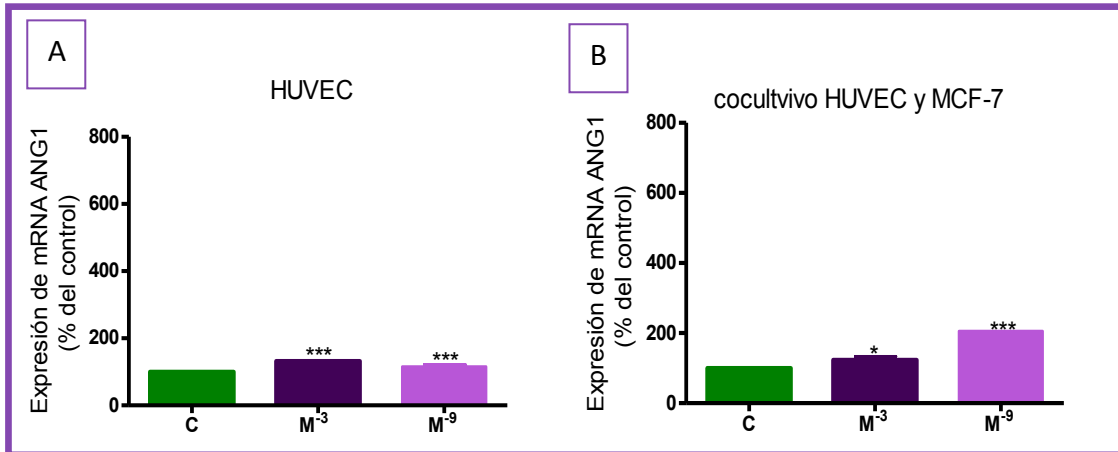
Estudiando la expresión de Ang2 en los cultivos de MCF-7 sin insert pudimos comprobar que la melatonina suministrada a concentración  $M^{-3}$  produjo un aumento significativo en la expresión pero la concentración de  $M^{-9}$  duplicó el aumento.

Sin embargo, al revisar los valores de la expresión de la Ang-2 en cocultivos con estas mismas condiciones, nos encontramos con un aumento similar para ambas concentraciones y muy superior al encontrado en las células en solitario (**Fig.5**).

Se realizaron de igual modo al descrito anteriormente cocultivos de células HUVEC en la base de las placas con insert sobre ellas que contenían células MCF-7. En este caso el mantenimiento de las células fue más tedioso ya que las células endoteliales utilizadas (HUVEC) eran más

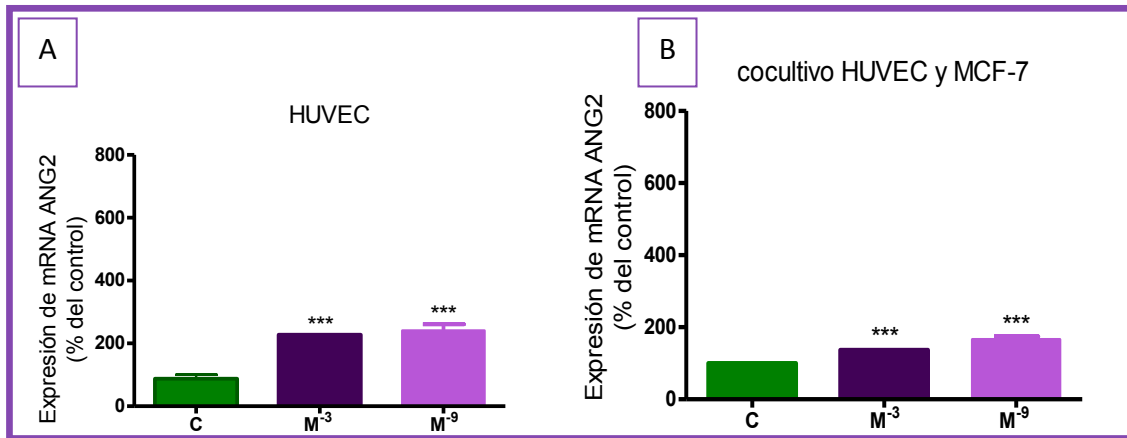


delicadas y a la hora de extraer el RNA de ellas se perdía una cantidad considerable. Al estudiar los datos de las múltiples PCRs que se realizaron para ver la regulación de la melatonina sobre la expresión génica de las angiopoyetinas -1 y -2 y del receptor Tie2 de las células HUVEC, vimos como tenían lugar diferentes situaciones.



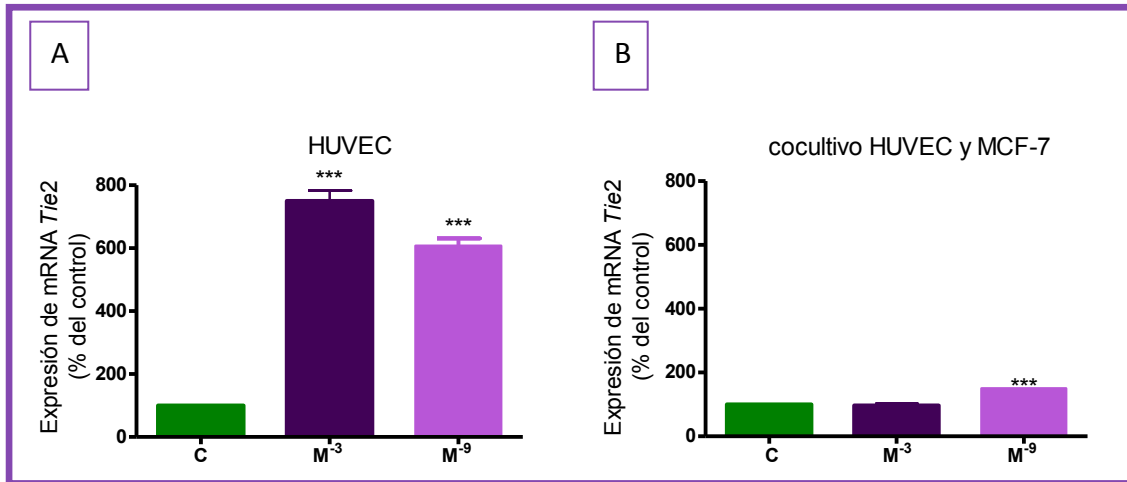
**Figura 6.-A)** Efectos de la melatonina en la expresión del gen de Ang-1 en cultivos de HUVEC. Estos se realizaron en placas de 6 pocillos durante 24 h con medio suplementado con 2% FBS y a continuación las células se mantuvieron 24h con medio y suero 0,5% DCC. Se añadió el tratamiento de melatonina consistente en concentraciones fisiológicas y farmacológicas y transcurridas 4h se recogieron las células para la extracción de RNA, la subsecuente transformación a DNAc y posterior Q-PCR. B). Los cocultivos de HUVEC y MCF-7 se hicieron en las mismas condiciones descritas excepto que las MCF-7 fueron cultivadas en insert que se colocaron sobre las placas que contenían células HUVEC. El proceso experimental fue exactamente idéntico al utilizado con las placas de HUVEC solas con la excepción de que cada tipo celular llevaba su medio. Los resultados han sido expresados en porcentaje con respecto al control: media (de ocho experimentos independientes en la gráfica a y cinco en la b) +/- desviación estándar de la media \*, P< 0,05 y \*\*\*, P< 0,001

En primer lugar, analizamos las gráficas correspondientes a las células HUVEC cultivadas solas, sin la presencia de insert ni posibles sustancias liberadas por las células tumorales que puedan afectar o alterar los resultados, y se observó en la expresión de Ang-1 como la dosis farmacológica de melatonina actúa provocando un aumento poco mayor que la concentración fisiológica de esta hormona, al contrario de lo que ha ocurrido en el resto de situaciones. En segundo lugar, en los cocultivos de células HUVEC, la expresión de la Ang-1 sufre un aumento bajo la concentración M<sup>-9</sup> notable en comparación a la concentración M<sup>-3</sup> la cual apenas va a lograr que se eleven los valores de la expresión génica con respecto al control. Aun así, con ambas concentraciones se encontraron diferencias estadísticas con respecto al control (**Fig.6**).



**Figura 7.-**A) Efectos de la melatonina en la expresión del gen de Ang-2 en cultivos de HUVEC. Estos se realizaron en placas de 6 pocillos (Falcon) tal y como se describe en el apartado de metodología. Se añadió el tratamiento de melatonina consistente en concentraciones fisiológicas y farmacológicas y transcurridas 4h se recogieron las células para la extracción de RNA, la subsecuente transformación a DNAc y posterior QPCR, los medios de cultivo también fueron recogidos para hacer un estudio sobre las relaciones paracrinias entre estos dos tipos celulares. B) Los cocultivos de HUVEC y MCF-7 se hicieron en las mismas condiciones descritas excepto que las MCF-7 fueron cultivadas en insert que se colocaron sobre las placas que contenían células HUVEC. El proceso experimental fue exactamente idéntico al utilizado con las placas de HUVEC solas con la excepción de que cada tipo celular llevaba su medio. Los resultados han sido expresados en porcentaje con respecto al control: media (de ocho experimentos independientes en la gráfica a y cinco en la b) +/- desviación estándar de la media,\*\*\*,  $P < 0,001$ .

En la expresión de Ang-2 ocurría algo similar a lo encontrado en Ang-1, que el aumento es similar para ambas concentraciones tanto en células HUVEC en solitario como en cocultivo. En solitario la expresión se vió duplicada con ambas concentraciones y en cocultivo a pesar de encontrar diferencias significativas tanto a concentraciones fisiológicas como farmacológicas el incremento no llegó a ser el doble de los valores del control (Fig.7).



**Figura 8.-** A) Efectos de la melatonina en la expresión del receptor Tie2 de células endoteliales en cultivos de HUVEC. Estos se realizaron en placas de 6 pocillos (Falcon) del mismo modo que en los experimentos anteriores con células HUVEC ya que éstas necesitan más superficie para adherirse a la placa con mayor facilidad. Se añadió el tratamiento de melatonina consistente en concentraciones M<sup>-9</sup> y M<sup>-3</sup> y transcurridas 4h se recogieron las células para la extracción de RNA, la subsecuente transformación a DNAc y posterior PCR además de recoger los medios de cultivo para estudiar las posibles relaciones paracrinias entre los dos tipos celulares en investigaciones futuras. B) Los cocultivos de HUVEC y MCF-7 se hicieron en las mismas condiciones descritas en el apartado de metodología para los cultivos y cocultivos con la diferencia de que las MCF-7 fueron cultivadas en insert que se colocaron sobre las placas que contenían células HUVEC. El proceso experimental fue el mismo al utilizado con las placas de HUVEC solas con la excepción de que cada tipo celular llevaba su medio. Los resultados han sido expresados en porcentaje con respecto al control: media (de ocho experimentos independientes en la gráfica a y cinco en la b) +/- desviación estándar de la media; \*\*\*, P< 0,001

Y en segundo lugar, nos encontramos con la peculiaridad de que la expresión del receptor Tie2 de las células endoteliales cultivadas en solitario únicamente aumenta bajo concentraciones fisiológicas de melatonina. La concentración M<sup>-3</sup> no provoca alteraciones de ningún tipo en la expresión génica de Tie2 en las células endoteliales bajo condiciones de cocultivo. Tie2 volvió a sorprendernos al expresarse de forma elevada comparándolo con el control en concentraciones iguales a M<sup>-3</sup> con una diferencia significativa con respecto a la concentración fisiológica (**Fig.8**).

## Discusión:

El papel modulador de la melatonina en la expresión génica de VEGF ha sido demostrado en diferentes tipos de células tumorales. Esta hormona tanto a concentración farmacológica como fisiológica, consigue inhibir la expresión de VEGF lo que se traduce en una menor síntesis y liberación de VEGF al medio, que tendrá como fin último reducir la angiogénesis en el tejido adyacente. Algunas de las líneas celulares tumorales donde se han demostrado los efectos antiangiogénicos de la melatonina a través del VEGF son: células de cáncer de mama (MCF-7) (Álvarez García y cols. 2013), células de carcinoma de páncreas (PANC-1) (Dai y cols., 2008) y células de adenocarcinoma alveolar humano (A549) (Park y cols., 2010), mediante un mecanismo en el que está implicado el factor inducible por hipoxia HIF-1, que interviene en la transcripción génica de VEGF.

Una de las capacidades de la melatonina en la angiogénesis es la modulación a la baja de la comunicación paracrina que existe entre las células epiteliales tumorales y las células endoteliales, la cual está mediada mayoritariamente por el factor de crecimiento endotelial vascular.

La melatonina inhibe la capacidad de invasión de las células HUVEC. Dicha invasión o su capacidad para desplazarse y colonizar nuevos tejidos, es un evento esencial para la formación de los nuevos vasos sanguíneos y, por tanto, del crecimiento del tumor.

Los estudios de los efectos de la melatonina sobre la capacidad invasiva de las células endoteliales muestran que esta hormona, a concentración farmacológica, reduce la invasión de estas células a través de una membrana extracelular sintética en respuesta al estímulo quimiotáctico inducido por VEGF.

Del mismo modo, estudios clínicos realizados en pacientes de cáncer pusieron de manifiesto que el tratamiento con melatonina era capaz de disminuir los niveles de VEGF en sangre (Lissoni y cols., 2001), lo que sugiere una regulación de la angiogénesis por parte de la melatonina a través de la inhibición de la producción de VEGF. El papel de VEGF en los procesos angiogénicos tumorales ha sido descrito ampliamente en la literatura y su bloqueo representa una posible estrategia terapéutica en el tratamiento de la enfermedad (Cook y Figg, 2010).

Resultados previos sugieren un modelo en el cual, las células tumorales mamarias secretarían factores de comunicación paracrina, principalmente VEGF, que actuarían sobre las células del endotelio vascular favoreciendo los procesos angiogénicos. La melatonina, posiblemente a

través de un mecanismo de interferencia con la vía de señalización de VEGF en las células del endotelio vascular, así como inhibiendo de forma directa su expresión y secreción por parte del epitelio tumoral, bloquearía la angiogénesis tumoral a nivel de proliferación, invasión, migración y formación de estructuras precursoras de los vasos, reduciendo de esa manera la formación de vasos sanguíneos en el entorno tumoral y, por tanto, el aporte de oxígeno y nutrientes esenciales al tumor. Todo esto nos llevó a pensar cómo actuarían las angiopoyetinas (Ang-1 y Ang-2) y el receptor Tie2 de las células endoteliales en presencia de la melatonina en la angiogénesis tumoral y el efecto de las angiopoyetinas en las células MCF-7. Se ha llevado a cabo por primera vez en MCF-7 y HUVEC experimentos in vitro para estudiar el papel de la melatonina como modulador de la expresión de los genes de dos de las proteínas más importantes involucradas en la angiogénesis (Ang-1 y Ang-2) y de su receptor (Tie2).

Ang-1 juega un papel crítico en la maduración de los vasos sanguíneos y en la adhesión, migración y supervivencia de las células endoteliales, pero en el cáncer de mama se ha demostrado que no puede funcionar como un promotor de la angiogénesis, pero sí con una capacidad inhibidora en este modelo. La sobreexpresión de Ang-1 en la angiogénesis tumoral no mejora el crecimiento del tumor, pero causa un retraso de hasta 3 veces de crecimiento tumoral ( $P = 0,003$ ). Angiopoyetina-1 (Ang1) es un factor de crecimiento cuyo objetivo son células endoteliales, porque la expresión del receptor, Tie2 (al que se une y provoca su consecuente fosforilación), se limita esencialmente a las células endoteliales (Hayes AJ. Y cols., 2000).

In vitro, Ang1 protege contra la apoptosis de células endoteliales, estabiliza túbulos endoteliales e induce la germinación vascular y la formación de túbulos en el colágeno. En conjunto, estos hallazgos sugieren que todos los Ang1 actúan fisiológicamente como un promotor angiogénico en el sistema vascular en desarrollo, en un proceso coordinado que implica otros factores angiogénicos como el VEGF (Hayes y cols., 2000).

De ahí, que los resultados obtenidos tanto en MCF-7 como en HUVEC se correspondan con un papel antiangiogénico de la melatonina al ser capaz de aumentar la expresión de Ang-1 tanto en cultivos en solitario como en cocultivos en las dos concentraciones utilizadas.

Sin embargo, algunos estudios informan de un aumento de expresión de Ang-2 tanto en las células endoteliales (como HUVEC) como en las células tumorales (como MCF-7), mientras que otros estudios han demostrado que la expresión de Ang-2 está limitada a la vasculatura y no aparece en las células tumorales. Además, estudios utilizando la hibridación in situ y análisis de ARN de tejido completo han demostrado una mayor presencia de Ang2 en los tumores frente al tejido normal correspondiente (Thurson G. y Daly C 2012).

Ang-2 interrumpe las conexiones entre el endotelio y las células perivasculares y promueve la muerte de células y la regresión vascular. También se sabe que Ang-2 en presencia de VEGF es capaz de promover la neovascularización.

En estudios anteriores se ha sugerido una posible asociación entre niveles elevados en la expresión de Ang-2 en ausencia de VEGF con muerte de células tumorales (Stratmann y cols. 1998 y Holash y cols. 1999). La sobreexpresión de Ang-2 en células tumorales inhibe la angiogénesis tumoral y puede inducir apoptosis de las células endoteliales vecinas a las que se adhieren las células tumorales (Yu Q y Stamenkovic I., 2001). Estos autores también han corroborado que la sobre expresión de Ang-2 se correlaciona con la regresión vascular y por lo tanto cumple un papel antiangiogénico en tumores.

Así pues, nuestros resultados demuestran por primera vez que la melatonina tiene un efecto antiangiogénico este lo consigue elevando los niveles de expresión del gen Ang-2, además de la Ang-1 mencionada y el Tie2 que describiremos a continuación. Por lo tanto se sobreentiende que también consiga como consecuencia retrasar el desarrollo del tumor.

Los estudios iniciales destinados a definir un papel funcional para la vía de Tie2 en los tumores utilizaron una proteína de fusión Tie2 dominio extracelular, lo que impide la unión de Ang1 y Ang2 a Tie2. Estudios llevados a cabo en tumores mamarios y melanoma en ratones, sugieren que se requiere la señalización activa a través de Tie2 para el crecimiento del tumor (Peters K. y cols. 2004)

Una prueba de la actividad agonista de Ang2 proviene de otros estudios que examinaron el efecto del tratamiento combinado con bloqueadores-Ang-1 específicos y Ang-2 específico. El bloqueador Ang-2 específico causa un aumento significativo en la cobertura de pericitos, estos efectos fueron observados por el bloqueador Ang-1 específico, lo que sugiere que en este caso los efectos de bloqueo Ang-2 dieron como resultado un aumento en la actividad de Tie2. Uno podría imaginar que los diferentes subconjuntos de los vasos del tumor se exponen a diferentes concentraciones locales de Ang2 / Ang1 y que esto determina el efecto neto de bloqueo Ang-2 en la fosforilación de Tie2. Por ejemplo, si la mayoría de la actividad agonista de Tie2 en la brotación de vasos está mediada por Ang2, entonces se esperaría el bloqueo de Ang2 para disminuir la fosforilación de Tie2 en estas células, a pesar de que Ang2 es un agonista relativamente débil. Si, por otro lado, hay niveles algo más altos de Ang1 en los vasos que se normalizan tras el bloqueo Ang-2, a continuación, la inhibición Ang2 aumentaría la fosforilación de Tie2.

Es necesario destacar el carácter esencial del receptor Tie2 para la maduración vascular, pero no su requerimiento para la formación vasculogénica de las células endoteliales. A pesar de ello, si es requerido para la proliferación y el mantenimiento de este tipo celular.

Debido a estos efectos contradictorios de la función del Tie2 en la angiogénesis podríamos deducir que el papel de la melatonina como inductor de la expresión del gen del Tie2 sería interesante en las HUVEC para el mantenimiento de este tipo celular. Y en el caso de las MCF-7 el aumento de la expresión vendría justificada por la sobreexpresión de Ang2 en mayor medida que la de la Ang-1 actuando en este caso como competidor de Ang1 para unirse a Tie2 impidiendo su fosforilación.

## **Conclusiones:**

Dado que se sabe que la melatonina inhibe la expresión del VEGF en las células MCF-7 y que un aumento en la expresión de angiopoyetinas en la ausencia de VEGF va a llevar a la regresión de la vasculatura, nuestros hallazgos sugieren que la melatonina podría inhibir la angiogénesis a través de una regulación en la expresión de angiopoyetinas y una baja regulación de la expresión del VEGF.

Por un lado Ang-1 en el cáncer de mama se une al receptor Tie2 actuando con capacidad inhibidora en el proceso de angiogénesis y por otro, Ang-2 se encarga de promover la muerte de las células tumorales y la regresión vascular.

Los resultados obtenidos nos llevan a contemplar la hormona melatonina como un cotratamiento para el cáncer de mama estrógeno-dependiente, pudiendo complementarlo con la radiación celular.

## **Investigaciones futuras:**

Determinar las concentraciones de Ang-1 y Ang-2 en los medios de cultivo recogidos tras los tratamientos empleados en kit ELISA.

Experimentar en las mismas condiciones y los mismos tipos celulares combinando el tratamiento a concentraciones  $M^{-3}$  y  $M^{-9}$  de melatonina con la terapia de radiación celular.

Medir las diferencias de expresión génica de Ang-1, Ang-2 y Tie2 en cocultivos de MCF-7 y HUVEC y viceversa para comparar con cultivos en solitario y poder estudiar el efecto paracrino.

## Agradecimientos:

Me gustaría agradecer a todo el departamento de Fisiología esta oportunidad que me han brindado para introducirme en el mundo de la investigación, en particular a mi directora de trabajo fin de máster Dra. Alicia González Cabeza y a Jose Antonio y Gema (técnicos del departamento) por enseñarme todas las técnicas que he tenido que realizar para este estudio. A mi compañera de máster Itziar Chaparrategui por aguantarme todo este tiempo y por supuesto a mi madre y a mi hermana ya que sin su apoyo y su ánimo no podría haberlo llevado a cabo.

## Referencias:

- 1.- **Allegra M., Reiter R.J., Tan D.X., Gentile C., Tesoriere L., Livrea M.A.** (2003). The chemistry of melatonin's interaction with reactive species. *J. Pineal Res.* **34**: 1-10.
- 2.- **ACS: American Cancer Society: Cancer Facts and figures** (Internet). Atlanta:ACS;2015 (citado 26/2/15) Disponible en:  
<http://www.cancer.org/espanol/cancer/cancerdeseno/guiadetallada/cancer-de-seno-what-is-breast-cancer-types>
- 3.- **Benitez-King G., Huerto-Delgado L., Anton-Tay F.** (1993). Binding of 3H-melatonin to calmodulin. *Life Sci.* **3**: 201-217.
- 4.- **Bracho Valdés I y Vázquez Prado J.** (2014) Avance y perspectiva. Volumen 6 No.4
- 5.-**Cook K.M., Figg W.D.** (2010). Angiogenesis inhibitors: current strategies and future prospects. *CA Cancer J. Clin.* **60**: 222-243.
- 6.- **Cos S., González A., Martínez-Campa C., Mediavilla M.D., Alonso González C., Sánchez-Barceló E.**(2006). Estrogen-signaling pathway: A link between breast cancer and melatonin oncostatic actions. *Cancer Detection and Prevention* **30**: 118-128.
- 7.- **Cui P., Luo Z., Zhang H., Su Y., Li A., Li H., Zhang J., Yang Z., Xiu R.** (2006). Effect and mechanism of melatonin's action on the proliferation of human umbilical vein endothelial cells. *J. Pineal Res.* **41**: 358-362.
- 8.- **Dai M., Cui P., Yu M., Han J., Li H., Xiu R.** (2008). Melatonin modulates the expression of VEGF and HIF-1<sub>α</sub> induced by CoCl<sub>2</sub> in cultured cancer cells. *J. Pineal Res.* **44**:121-



126.

- 9.- **Del Río B., García Pedrero J. M., Martínez-Campa C., Zuazua P., Lazo P. S., Ramos S.** (2004). Melatonin, an endogenous-specific inhibitor of estrogen receptor alpha via calmodulin. *J. Biol. Chem.* **37**: 38294-38302.
- 10.- **Hayes AJ., Huang W-Q., Yu J., Maisonpierre PC., Liu A., Kern FG., Lippman ME., McLeskey SW and Li L-Y.** (2000) Expression and function of angiopoietin-1 in breast cancer. *British Journal of Cancer* **83**: 1154-1160
- 11.- **Holash J., Maisonpierre P.C., Compton D., Boland P., Alexander C.R., Zagzag D., Yancopoulos G.D., Wiegman S.J.** (1999). Vessel cooption, regression and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF. *Science.* **284**: 1994-1998.
- 12.- **Lissoni P., Rovelli F., Malugani F., Bucovec R., Conti A., Maestroni G.J.** (2001). Antiangiogenic activity of melatonin in advanced cancer patients. *Neuro Endocrinol.Lett.* **22**: 45-47.
- 13.- **OMS:** Organización Mundial de la Salud. (Internet). (citado Febrero 2015) Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>
- 14.- **Park S.Y., Jang W.J., Yi E.Y., Jang J.Y., Jung Y., Jeong J.W., Kim Y.J.** (2010). Melatonin suppresses tumor angiogenesis by inhibiting HIF-1<sub>α</sub> stabilization under hypoxia. *J. Pineal Res.* **48**: 178-184.
- 15.- **Romera M.** (2014) Porfolio de Ilustración Médica: Miniatlas de cáncer de mama.
- 16.- **Romeu L.R., Da Motta E.L., Maganhin C.C., Oshima C.T., Fonseca M.C., Barrueco K.F., Simoes R.S., Pellegrino R., Baracat E.C., Soares-Junior J.M.** (2011). Effects of melatonin on histomorphology and on the expression of steroid receptors, VEGF and PCNA in ovaries of pinealectomized rats. *Fertil. Steril.* **95**: 1379-1384.
- 17.- **Sainz R.M., Mayo J.C., Rodríguez C., Tan D.X., López-Burillo S., Reiter R.J.** (2003). Melatonin and cell death: differential actions on apoptosis in normal and cancer cells. *Cell Mol. Life Sci.* **60**: 1407-1426.
- 18.- **Stefulj J., Hortner M., Ghosh M., Schauenstein K., Rinner I., Wölfler A., Semmler J., Liebmann P.M.** (2001). Gene expression of the key enzymes of melatonin synthesis in extrapineal tissues of the rat. *J Pineal Res.* **30**: 243-7.
- 19.- **Stratmann A, Risau W, Plate KH** (1998): Cell type specific expression of angiopoietin-1 and angiopoietin-2 suggests a role in glioblastoma angiogenesis. *Am J Pathol*, 153: 1459-1466.
- 20.- **Tan D. X., Manchester L. C., Hardeland R., López-Burillo S., Mayo J. C., Sainz R. M., Reiter R. J.** (2003). Melatonin: a hormone, a tissue factor, an autocoid, a paracoid, and an antioxidant vitamin. *J. Pineal Res.* **34**: 75-78.
- 21.- **Thurson G. y Daly C.** (2012). The complex Role of Angiopoietin-2 in the Angiopoietin-Tie Signaling Pathway. *Cold Spring Harb Perspect Med.* **2**:a006650
- 22.- **Thomas M. y Augustin H.** (2009) The role of the Angiopoietins in vascular morphogenesis. *Angiogenesis Springer Science+Business Media B.V* **12**: 125-137
- 23.- **Yu Q. y Stamenkovic I.** (2001) Angiopoietin-2 is Implicated in the Regulation of Tumor Angiogenesis. *American Journal of Pathology*, **Vol. 158**, No. 2

24.- **Peters K., Kontos C., Lin C., Wong A. Rao P., Huang L. Dewhirst M. and Sankar S.**  
(2004)Functional Significance of Tie2 Signaling in the Adult Vasculature. The Endocrine Society. 51-71

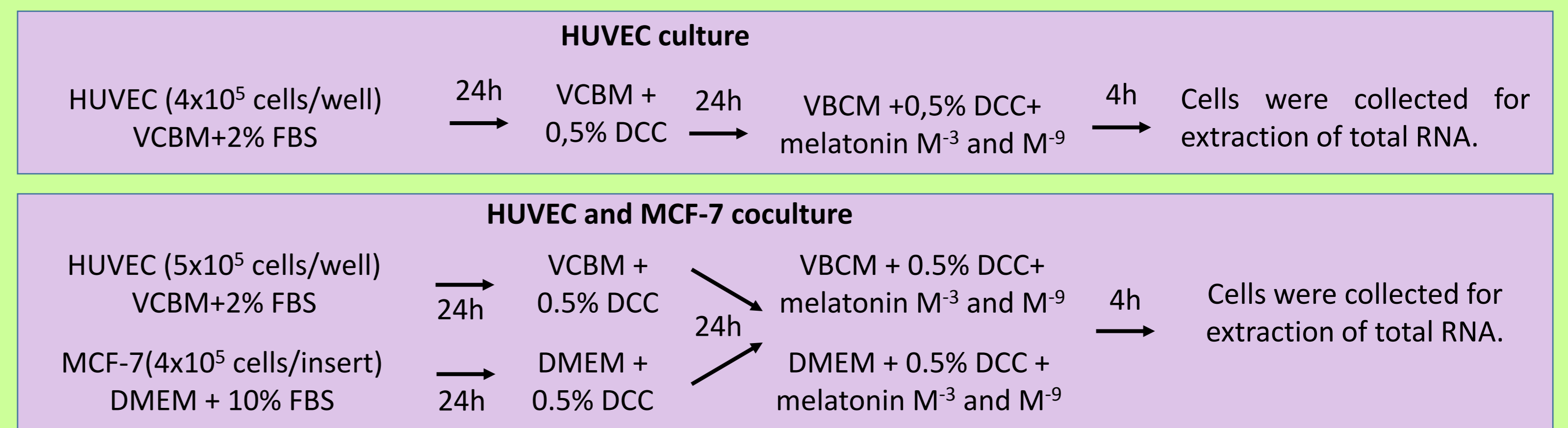
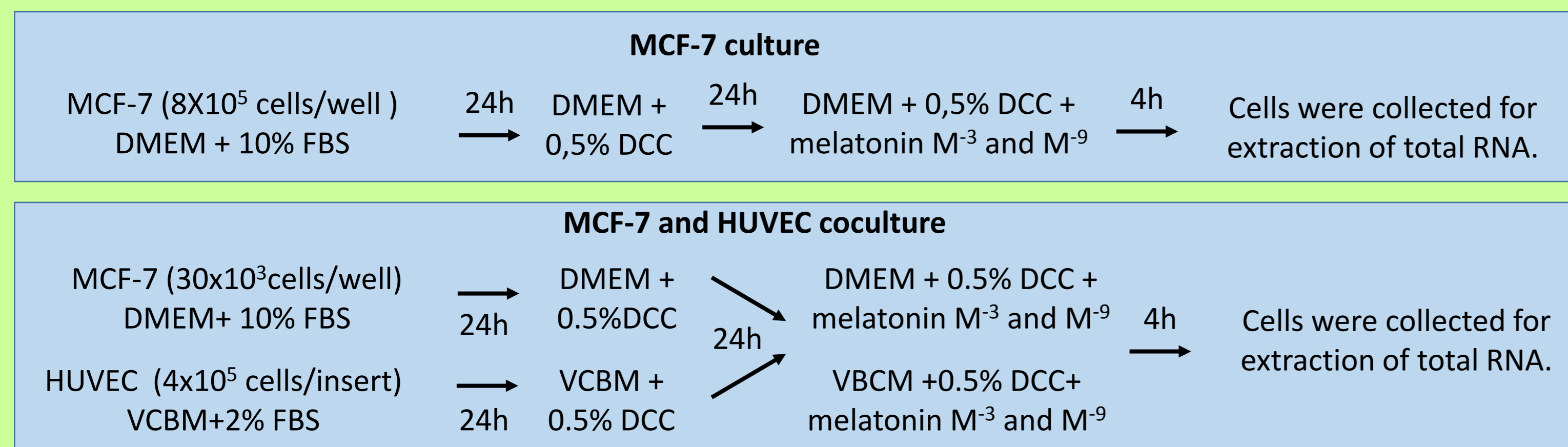
Ángela García Vidal \* & Alicia Verónica González Cabeza  
 Departamento de Fisiología y Farmacología de la Facultad de Medicina de UC  
 \*angela\_g\_v@hotmail.com

## INTRODUCTION

- Melatonin, the main secretory product of the pineal gland, exerts oncostatic effects on breast cancer by interfering with the estrogen-signaling pathways. Melatonin reduces estrogen biosynthesis in human breast cancer cells, as well as surrounding fibroblasts and peritumoral endothelial cells by regulating cytokines secretion that influence tumor microenvironment. This hormone also exerts antiangiogenic activity in tumoral tissues.
- Angiogenesis is the formation of new blood vessel from existing endothelium. This process is involved in tumor's progression and development. The role of angiogenic growth factors as molecular targets in tumor pathology has become relevant because since the inhibition of angiogenesis has been included as another cancer treatment strategy.
- Angiopoietins are cytokines that regulate angiogenesis and the Angiopoietin/Tie2 system is a vascular specific ligand/receptor system that play a critical role in endothelial cell differentiation and blood vessel morphogenesis by regulating angiogenic-remodeling processes such as vessel stabilization/destabilization and pericyte recruitment or loss.
- Since it is known that melatonin has antiangiogenic actions the aim of the present study was to investigate the regulatory effects of melatonin on angiopoietins 1 and 2 expression and *Tie2* receptor in human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) and human breast cancer cells (MCF-7).

## MATERIALS AND METHODS

### MCF-7 and HUVEC cells cultures and cocultures



## GENE EXPRESSION STUDIES

### Detection of gene expression by real time PCR

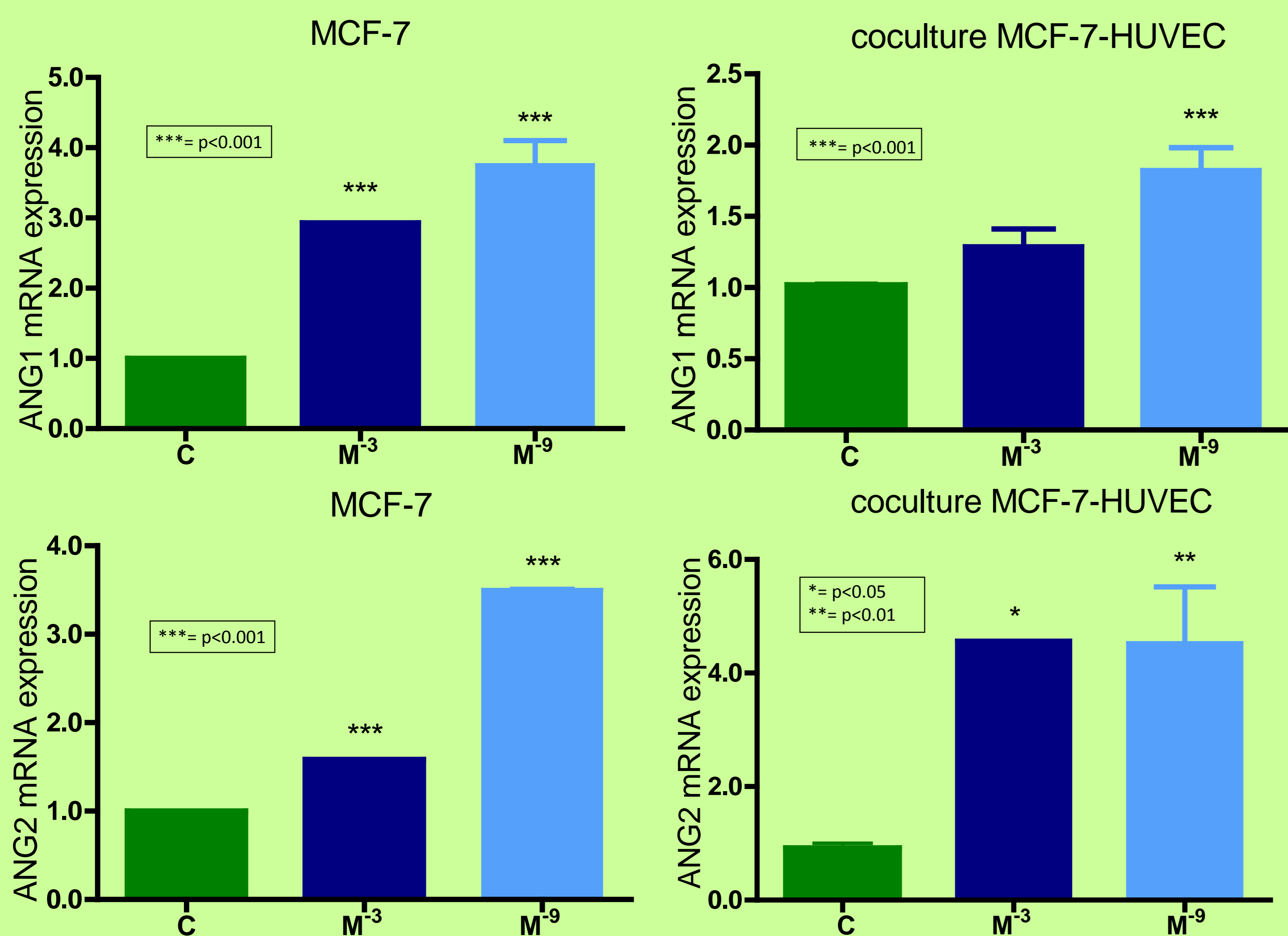
Expression of the mRNA from different gens was carried out by real time polymerase chain reaction (QPCR) in HUVEC and MCF-7 cells. The total cellular RNA was purified using NucleoSpin II (Macherey-Nagel) commercial kit and its integrity was assessed by electrophoresis in ethidium bromide-stained 1.2% agarose-Tris-borate EDTA gels. The absorbance ratio A260/A280 nm was >1.8. For cDNA synthesis, 1 µg of total RNA was denaturated at 65C for 10 min and reverse-transcribed 50 min at 45C with the cDNA synthesis Kit in a final volume of 20 µl in the presence of 500 ng of oligo (dT)12–18 primer. Real time PCRs were performed using Brilliant SYBR Green PCR Master Mix following the manufacturer's instructions. The sets of human oligonucleotides used as primers were designed with the Beacon designer program. S14 mRNA gene expression was used as reference gene. PCRs were performed for 45 cycles for quantitative analysis using 60° as annealing during 45 s, the extension being carried out at 72C for 30 s and the denaturation at 95C for 30 s. Melting curves were performed by using dissociation curve to verify that only a single product was amplified.

### Statistical analysis

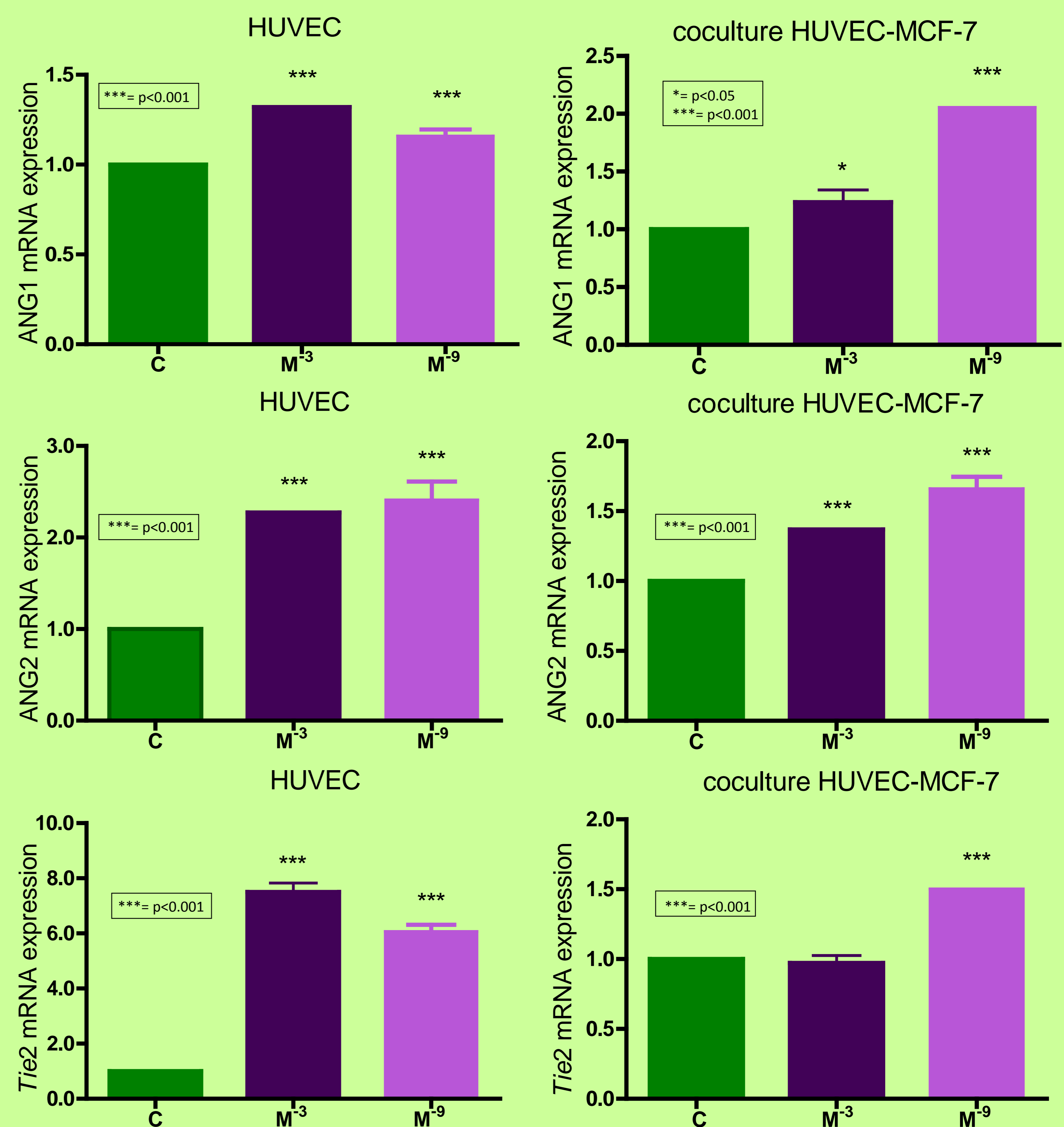
The data of mRNA gene expression are expressed as the mean ± standard errors of the mean (SEM). Statistical differences between groups were processed by one way analysis of variance (ANOVA) followed by the Student-Newman-Keuls test. Results were considered as statistically significant at p<0.05.

## RESULTS

### Effects of melatonin on the expression of Ang-1, Ang-2 and Tie2 receptor in MCF-7



### Effects of melatonin on the expression of Ang-1, Ang-2 and Tie2 receptor in HUVEC



Melatonin at physiological doses (1 nM) increased both Ang1 and Ang2 gene expression in MCF-7. Pharmacological concentrations (1 mM) were also effective to increase Ang1 and Ang2 expression. In addition, physiological and pharmacological concentrations of melatonin increased *Ang 1* and *Ang2* in HUVEC. *Tie2* expression in HUVEC was also enhanced by melatonin at 1 nM and 1 mM but in coculture with MCF-7 only pharmacological doses of melatonin was able to increase mRNA expression.

## DISCUSSION

Ang-1 is a critical player in vessel maturation and it mediates migration, adhesion and survival of endothelial cells, but in breast cancer, it may not function as a promoter of angiogenesis, although it may act retarding tumor growth. Furthermore, Ang-1 and VEGF regulate angiogenesis at different levels, with VEGF inducing vessel sprouting and growth and Ang-1 mediating vessel remodeling and maturation. Ang1 acts in an agonistic manner inducing Tie2 phosphorylation and subsequent vessel stabilization. On the other hand, Ang-2 could antagonize the Ang1-mediated Tie2 activation. This angiopoietin induces tumor growth and invasiveness, but also reduces angiogenesis, promotes cell death and vascular regression. In addition to VEGF, Ang-2 promotes neo-vascularization. The receptor Tie 2 is essential for vascular maturation, but it is not required for the vasculogenic formation of endothelial cells. However, it is required for the proliferation and maintenance of these cells.

Since it is known that melatonin inhibits VEGF expression in MCF-7 cells and that an increase in angiopoietins expression in the absence of VEGF lead to vessel regression, our findings suggest the melatonin could inhibit angiogenesis through an up-regulation on angiopoietins expression and a down-regulation on VEGF expression.

**ACKNOWLEDGEMENTS:** This work was supported by a grant from the Spanish MEC (SAF2013-42012-P).

## CONCLUSION

**Melatonin behaves as an anti-angiogenesis molecule by increasing angiopoietins 1 and 2 mRNA expression and decreasing VEGF expression.**

**Thus, melatonin could be an effective therapeutic strategy to block tumor angiogenesis.**

## REFERENCES

- Cos S. et al. Estrogen signaling pathway: A link between breast cancer and melatonin oncostatic actions. *Cancer Detection and Prevention*. 2006. 30:118-128.
- Fagiani E. and Christofori G. Angiopoietins in angiogenesis. *Cancer letters*. 2013. 328: 18-26.
- Hayes AJ et al. Expression and function of angiopoietin-1 in breast cancer. *British Journal of Cancer*. 2000. 83:1154-1160.
- Thomas M. and Agustin H.G. The role of the Angiopoietins in vascular morphogenesis. *Angiogenesis*. 2009. 12:125-137.
- Thurston G. and Daly C. The Complex Role of Angiopoietin-2 in the Angiopoietin-Tie signaling pathway. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 2012. 2:a006650.