

## Regulación de la expresión de angiopoyetinas y TIE2 por la melatonina en células HUVEC y MCF-7

A. González-González<sup>1</sup>, A. González<sup>1</sup>, S. Cos<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Fisiología y Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad de Cantabria e Instituto de Investigación Valdecilla (IDIVAL), Av. Cardenal Herrera Oria s/n, 39011 Santander, Cantabria, alicia.gonzalezg@alumnos.unican.es

### INTRODUCCIÓN

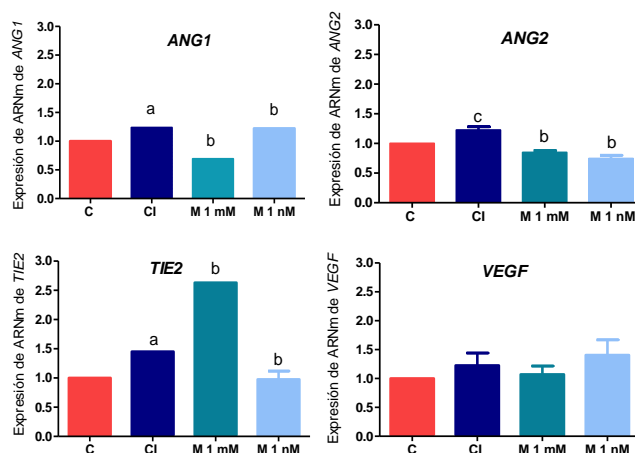
El cáncer de mama es el tumor maligno más frecuente en las mujeres. Más del 80% de los casos diagnosticados son inicialmente dependientes de estrógenos, por lo que se deduce que el estradiol tiene un papel fundamental en la génesis y desarrollo de este tipo de tumores. La melatonina, principal producto de secreción de la glándula pineal, ejerce efectos oncostáticos en el cáncer mamario, interfiriendo con la ruta de señalización de los estrógenos [1]. La melatonina puede modular las interacciones paracrinas entre las células epiteliales malignas y las células endoteliales y fibroblastos cercanos, a través de una acción reguladora sobre citoquinas y factores de desarrollo producidos por las células malignas [2]. Además, posee acciones antiangiogénicas, es decir, inhibe la creación de nuevos vasos sanguíneos a partir de capilares preexistentes, que aporten oxígeno y nutrientes al tumor, interviniendo en la regulación del microambiente tumoral [3]. En respuesta a los estrógenos, las células epiteliales mamarias malignas liberan la citoquina angiogénica VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular), que promueve la proliferación, invasión y migración de las células endoteliales [2]. Esto favorecerá la angiogénesis y un aumento de la permeabilidad del vaso, causando extravasación de macromoléculas, proporcionando una red extraluminal sobre la cual se disponen las células endoteliales y migran las tumorales [4, 5]. La melatonina inhibe la angiogénesis a través de inhibir la expresión y la síntesis de VEGF a nivel de las células tumorales [5]. Las angiopoyetinas (ANG) son citoquinas que juegan un papel importante en el mantenimiento de la estabilidad vascular. El sistema angiopoyetina/TIE es un sistema vascular específico de ligando/receptor que juega un papel crítico en la diferenciación celular endotelial y la morfogénesis de los vasos sanguíneos por la regulación de procesos angiogénicos y de remodelación como de estabilización y de desestabilización y pérdida o reclutamiento de pericitos [6, 7]. Los receptores tirosín quinasa TIE1 y TIE2 se expresan en células endoteliales vasculares y en ciertos macrófagos implicados en angiogénesis [6, 7]. En concreto, TIE2 se expresa en los vasos de muchos tumores [8]. La ANG1 producida por las células epiteliales tumorales y endoteliales es el principal ligando agonista que activa al receptor TIE2. La ANG2, en cambio, bloquea la fosforilación de TIE2 inducida por ANG1, antagonizando su función previniendo su unión con TIE2. En la angiogenesis fisiológica, en presencia de VEGF, ANG1 actúa de forma paracrina sobre el endotelio [8] y promueve maduración y estabilidad de los vasos [4, 9]. En presencia de VEGF, ANG2 actúa de forma autocrina sobre el endotelio [8] e interrumpe las conexiones del endotelio con las células perivasculares, promoviendo así la desestabilización del vaso preexistente por regresión y muerte vascular y posterior neovascularización [4, 6]. En ausencia de VEGF, promueve la muerte de las células endoteliales y regresión vascular [4, 6]. En el cáncer de mama, varias evidencias experimentales han demostrado que la sobreexpresión de ANG2 está relacionada con un aumento de angiogénesis, malignidad y crecimiento agresivo tumoral [7]. Dado que la melatonina tiene acciones antiangiogénicas, el objetivo de este estudio fue investigar los efectos de la melatonina en la expresión de las angiopoyetinas, su receptor TIE2 y VEGF en células epiteliales mamarias malignas humanas (MCF-7) y en células endoteliales humanas (HUVEC).

### MATERIAL Y MÉTODOS

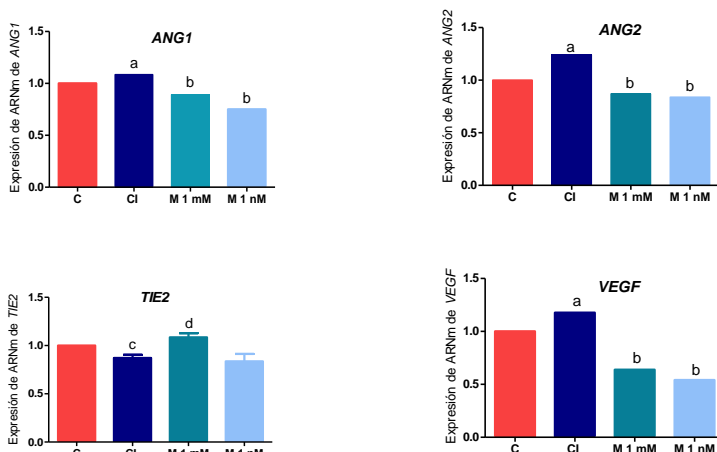
Con este fin, se realizaron cocultivos de células MCF-7 y HUVEC. Se sembraron células MCF-7 en placas de 6 pocillos (Falcon) a una concentración de  $30 \times 10^3$  células/pocillo en medio DMEM suplementado con 10% SFB (suero fetal bovino). Las células HUVEC se sembraron a su vez en los *insert* o soportes a una densidad de  $15 \times 10^3$  células/*insert* en medio 2% SFB/VCBM. Al día siguiente se introdujeron los *insert* 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 (*dextran-coated charcoal*); 24 horas más tarde, se lavó la placa 2 veces con PBS y se añadió a las células HUVEC medio VCBM con 0,5% DCC con las concentraciones de melatonina 1 mM, melatonina 1 nM y un control haciendo exactamente lo mismo con las células MCF-7 en su medio DMEM con 0,5% DCC. Al cabo de 4 horas, para detectar la expresión de cada uno de los genes se realizaron PCRs a tiempo real (RT-PCRs). Primero se extrajo el ARN total de las células con el kit comercial NucleoSpin II (Macherey-Nagel), con su posterior determinación de la cantidad y pureza con el Nanodrop 1000 V 3.6. A continuación se realizó la síntesis de ADN complementario utilizando como molde 1  $\mu$ g de ARN total, en un volumen final de 20  $\mu$ l, utilizando el cDNASynthesis Kit (Bioline) y finalmente para detectar la expresión génica se llevó a cabo una reacción de RT-PCR. Por último, los datos de la expresión génica fueron expresados como media  $\pm$  error estándar de la media (SEM). Las diferencias estadísticamente significativas entre los grupos fueron procesadas por análisis paramétricos de la varianza (ANOVA) seguidos, en caso de valores significativos del mismo, del test de Student-Newman-Keuls. Los resultados se consideran estadísticamente significativos para valores de P inferiores a 0,05. En algunos experimentos se realizaron cocultivos invirtiendo el orden de las células, colocando las células endoteliales en el fondo de los pocillos y las tumorales en los *insert*. Además se realizaron cocultivos de células endoteliales con células epiteliales no malignas (MCF-10A) en los *insert*. Paralelamente en una placa de 24 pocillos se sembraron células HUVEC en cocultivo con células MCF-7, y al cabo de 72 horas se recogió el medio con el fin de determinar la concentración de ANG1, ANG2, TIE2 y VEGF mediante ELISA y se evaluó la proliferación de las células HUVEC con el método del MTT.

## RESULTADOS

En cocultivos MCF-7/HUVEC, la presencia de la célula endotelial estimuló significativamente la expresión de las angiopoyetinas, *TIE2* y *VEGF* en las células tumorales. La melatonina a concentraciones farmacológicas (1 mM) redujo de forma significativa la expresión del ARNm de las angiopoyetinas y aumentó la expresión de *TIE2* (Figura1).

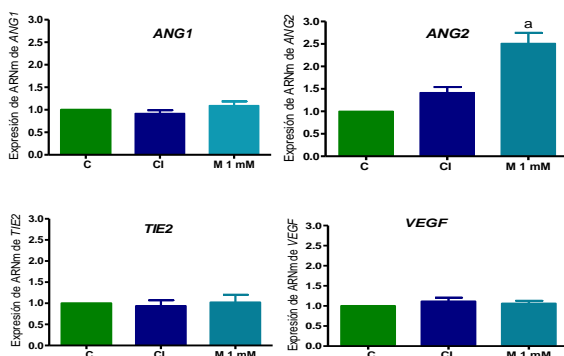


**Figura 1.** Efectos de la melatonina sobre la expresión de *ANG1*, *ANG2*, *TIE2* y *VEGF* en células epiteliales malignas mamarias cocultivadas con células endoteliales. a,  $P < 0,001$  vs C; b,  $P < 0,001$  vs CI; c,  $P < 0,01$  vs C. C: control; CI: control+*insert*; M 1 mM: concentración farmacológica de melatonina; M 1 nM: concentración fisiológica de melatonina. Como se muestra en la Figura 2, en cocultivos HUVEC/MCF-7, la presencia de la célula tumoral estimuló de forma significativa la expresión de las angiopoyetinas y *VEGF*, y redujo la expresión de *TIE2* en las células endoteliales. La melatonina a concentraciones farmacológicas (1 mM) redujo significativamente la expresión del ARNm de las angiopoyetinas y *VEGF* y aumentó la expresión de *TIE2*.



**Figura 2.** Efectos de la melatonina sobre la expresión de *ANG1*, *ANG2*, *TIE2* y *VEGF* en células endoteliales, en cocultivos con células tumorales. a,  $P < 0,001$  vs C; b,  $P < 0,001$  vs CI; c,  $P < 0,05$  vs C; d,  $P < 0,01$  vs CI. C: control; CI: control+*insert*; M 1 mM: concentración farmacológica de melatonina; M 1 nM: concentración fisiológica de melatonina.

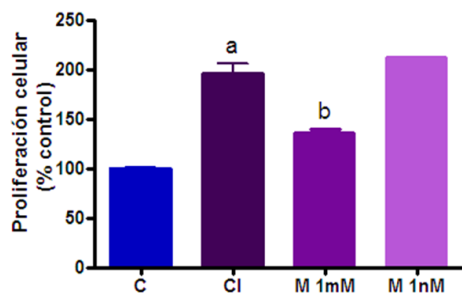
En cocultivos de HUVEC con células epiteliales mamarias no malignas (MCF-10A), se observó ausencia de actividad angiogénica. La melatonina a concentraciones farmacológicas (1 mM) no tuvo ningún efecto, excepto en *ANG2* (Figura 3).



**Figura 3.** Efectos de la melatonina en la expresión de *ANG1*, *ANG2*, *TIE2* y *VEGF* en células endoteliales cocultivadas con células MCF-10A. a,  $P < 0,001$  vs CI. C: control; CI: control+*insert*; M 1 mM: concentración farmacológica de melatonina.

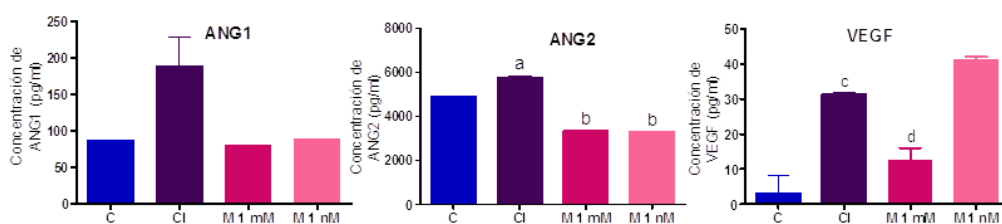
Por otro lado, se retiraron los medios de cultivo tras los tratamientos y se midió la proliferación con MTT de las células HUVEC sembradas en los pocillos. La presencia de la célula tumoral estimuló la proliferación de las células endoteliales. La melatonina a

concentraciones farmacológicas (1 mM) contrarrestó este efecto estimulante sobre la proliferación, tal como se muestra en la Figura 4.



**Figura 4.** Efectos de la melatonina sobre la proliferación de las células endoteliales inducida por la presencia de las células tumorales. a,  $P < 0,001$  vs C; b,  $P < 0,001$  vs CI; c, C: control; CI: control+insert; M 1 mM: concentración farmacológica de melatonina; M 1 nM: concentración fisiológica de melatonina.

A continuación, se determinaron las concentraciones de las proteínas ANG1, ANG2, y VEGF en los medios de cultivo recogidos empleando un *kit* ELISA. La presencia de la célula tumoral provocó un aumento en los niveles de ANG1, ANG2 y



VEGF. La melatonina (1 mM) disminuyó la concentración de las proteínas ANG1, ANG2 y VEGF por la célula tumoral (Figura 5).

**Figura 5.** Efectos de la melatonina sobre la concentración de ANG1, ANG2, TIE2 y VEGF por las células endoteliales en cocultivos con células tumorales. a,  $P < 0,001$  vs C; b,  $P < 0,001$  vs CI; c,  $P < 0,01$  vs C; d,  $P < 0,05$  vs CI. C: control; CI: control+insert; M 1 mM: concentración farmacológica de melatonina; M 1 nM: concentración fisiológica de melatonina.

## DISCUSIÓN

La correlación entre melatonina y algunos factores angiogénicos ha sido demostrada a partir de varias evidencias experimentales. En concreto, se ha descrito el efecto inhibitor de la melatonina al igual que los anticuerpos anti-VEGF, sobre la expresión de VEGF, tanto en ensayos *in vitro* realizados en varias líneas celulares humanas [10], como *in vivo* en ovario de ratas [11]. Según Álvarez-García y colaboradores (2013), en cocultivos, la melatonina inhibe tanto la expresión como la producción de VEGF por parte de las células MCF-7, lo que provoca una disminución de la concentración de VEGF alrededor de las HUVEC, provocando así la disminución de la proliferación, invasión, migración y formación de vasos [5]. Esto corrobora los resultados obtenidos en este trabajo, ya que se podría justificar la mayor proliferación de las células endoteliales en presencia de MCF-7 debido a la liberación de VEGF por parte de las células tumorales (Figura 4 y Figura 5). La presencia de receptores de melatonina  $MT_1$  y  $MT_2$  en las células endoteliales, sugieren que estas células podrían ser una posible diana de acción de la hormona pineal [12]. Además, se ha propuesto que su actividad antiangiogénica tiene lugar mediante una serie de mecanismos indirectos. Uno de ellos se basa en la inhibición de algunos factores de crecimiento (IGF, EGF y ET-1), que además de funcionar como mitógenos, también tienen propiedades proangiogénicas [10]. Esto es debido a que la melatonina por su capacidad antioxidante, inhibe la formación de radicales libres, provocando la desestabilización del factor HIF-1 $\alpha$ , induciendo una inhibición de la expresión de VEGF, impidiendo así la transcripción de este gen en condiciones de hipoxia [10]. Quizá a través del mecanismo explicado, la melatonina inhibe la liberación de VEGF por parte de las células tumorales, reduciendo así la proliferación de las células endoteliales. Además, y teniendo en cuenta que las células endoteliales constituyen una

fuentes de producción de estrógenos, una menor tasa de proliferación significaría una reducción del número de células secretoras de estrógenos próximas a las células malignas. Según los experimentos realizados por Buchanan et al. 2012, en cocultivos de HUVEC/MCF-7, las células endoteliales mostraban un aumento de la expresión de *ANG2* en la célula endotelial, relacionado con un aumento de angiogénesis y malignidad. A su vez, realizaron cocultivos de MCF-7/HUVEC, observando que la presencia de las células endoteliales inducía un aumento de *ANG2* y *VEGF* en la célula tumoral. Finalmente en cocultivos de células epiteliales mamarias no malignas y células endoteliales no se observó ninguna actividad angiogénica [4]. Todos estos resultados corroboran los obtenidos en este trabajo, ya que la presencia de la célula tumoral induce un aumento de *ANG2*, que coincide con un aumento de proteína en los medios recogidos en las células endoteliales y a su vez la melatonina contrarresta este efecto (Figura 2). Este hecho es interesante por el beneficio que le proporciona a la célula endotelial evitando la angiogénesis y malignidad. Del mismo modo, la presencia de la célula endotelial induce un aumento de *VEGF* y *ANG2* en la célula tumoral, y además la melatonina reduce ambas expresiones (Figura 1). Por último, la presencia de las MCF-10A, como era de esperar, no induce ningún efecto angiogénico en las células HUVEC salvo el caso de *ANG2*, que se deberá seguir investigando (Figura 3). Por lo tanto, la melatonina podría jugar un papel antiangiogénico en las interacciones paracrinas entre las células epiteliales malignas y las células endoteliales proximales a través de una acción inhibitoria sobre la expresión de *VEGF* y las angiopoyetinas en las células de cáncer de mama humanas, lo que reduce los niveles de *VEGF* y angiopoyetinas en las inmediaciones del endotelio vascular.

## Referencias

- [1] Cos, S. Y Sánchez-Barceló, E.J. (2000). Melatonin and Mammary Pathological Growth. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 21, 133-170. doi: 10.1006/frne.1999.0194.
- [2] Cos, S., Alvarez-García, V., González, A., Alonso-González, C. y Martínez-Campa, C. (2014). Melatonin modulation of crosstalk among malignant epithelial, endothelial and adipose cells in breast cancer. *Oncol. Lett.* 8:487-492.
- [3] Álvarez-García, V., González, A., Alonso-González, C., Martínez-Campa, C. y Cos, S. (2013). Antiangiogenic effects of melatonin in endothelial cell cultures. *Microvasc Res*, 87:25-33. doi: 10.1016/j.mvr.2013.02.008.
- [4] Buchanan, C.F., Szot, C.S., Wilson, T.D., Akman, S., Metheny-Barlow, L.J., Robertson, J.L., Freeman, J.W. y Rylander, M.N. (2012). Cross-talk between endothelial and breast cancer cells regulates reciprocal expression of angiogenic factors in vitro. *J. Cell Biochem.* 113(4):1142-51.
- [5] Alvarez-García, V., González, A., Alonso-González, C., Martínez-Campa, C. y Cos, S. (2012). Regulation of vascular endothelial growth factor by melatonin in human breast cancer cells. *J Pineal Res*, 54(4):373-80. doi: 10.1111/jpi.12007.
- [6] Fagiani, E. y Christofori, G. (2013). Angiopoietins in angiogenesis. *Cancer Lett.* 328(1):18-26.
- [7] 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.
- [8] Thomas, M. y Augustin, H. (2009). The role of the Angiopoietins in vascular morphogenesis. *Angiogenesis Springer Science+Business Media B.V.*, 12: 125-137.
- [9] Hayes, A.J., Huang, W.Q., Yu, J., Maisonnier, P.C., Liu, A., Kern, F.G., ... Li, L.Y. (2000). Expression and function of angiopoietin-1 in breast cancer. *Br. J.Cancer*, 83(9):1154-60.
- [10] Dai, M., Cui, P., Yu, M., Han, J., Li, H. y Xiu, R. (2008). Melatonin modulates the expression of VEGF and HIF-1 $\alpha$  induced by CoCl<sub>2</sub> in cocultured cancer cells. *J. Pineal Res*, 44:121-126.
- [11] Romeu, L.R., Da Motta, E.L., Maganhin, C.C., Oshima, C.T., Fonseca, M.C., Barrueco, K.F., ... Soares-Junior, J.M. (2011). Effects of melatonin on histomorphology and on the expression of steroid receptors, VEGF, and PCNA in ovaries of pinealectomized female rats. *Fertil. Steril.* 95(4):1379-84.
- [12] Cui, P., Luo, Z., Zhang, H., Su, Y., Li, A., Li, H., ... Xiu, R. (2006). Effect and mechanism of melatonin's action on the proliferation of human umbilical vein endothelial cells. *J. Pineal Res*, 41:3588-362.