



Universidad de Oviedo  
*Universidá d'Uviéu*  
*University of Oviedo*

**Programa de doctorado**  
**“Biomedicina y Oncología Molecular”**

*“Descifrando el papel de la grasa parda/beige en el  
microambiente tumoral de la próstata”*

**TESIS DOCTORAL**

**Alejandro Álvarez Artime**

30 de mayo de 2022



Universidad de Oviedo  
*Universidá d'Uviéu*  
*University of Oviedo*

**Programa de doctorado**  
**“Biomedicina y Oncología Molecular”**

**TESIS DOCTORAL**

*“Descifrando el papel de la grasa parda/beige en el  
microambiente tumoral de la próstata”*

**Autor:**  
**Alejandro Álvarez Artime**

**Directores:**  
**Dra. Rosa María Sainz Menéndez**  
**Dr. Juan Carlos Mayo Barrallo**





## RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL

1.- Título de la Tesis	
Español/Otro Idioma:	Inglés:
Descifrando el papel de la grasa parda/beige en el microambiente tumoral de la próstata	Decoding the role of brown/beige adipose tissue in the prostate tumor microenvironment

2.- Autor	
Nombre:	DNI/Pasaporte/NIE:
Alejandro Álvarez Artime	
Programa de Doctorado: Biomedicina y Oncología Molecular	
Órgano responsable: Centro Internacional de Postgrado	

### RESUMEN (en español)

El cáncer de próstata es uno de los tumores que mayor incidencia presenta en los varones adultos. Aunque en muchos pacientes es indolente, en otros, esta neoplasia presenta elevadas tasas de morbilidad y mortalidad. A este nivel, el tejido adiposo se ha reportado como uno de los componentes mayoritarios del microambiente tumoral. Dentro del tejido adiposo se pueden distinguir dos especializaciones. El tejido adiposo blanco, con un claro papel negativo en la progresión tumoral, favoreciendo mecanismos de proliferación y supervivencia celular, y el tejido adiposo pardo, del cual se conocen efectos beneficiosos en el tratamiento de otras patologías, pero sus efectos en cáncer no se conocen con claridad.

En este contexto, el objetivo principal de esta tesis doctoral consistió en estudiar el papel de los andrógenos en los mecanismos de diferenciación adipogénica del tejido adiposo pardo/beige, así como su papel durante la progresión tumoral en la próstata.

Para llevar a cabo la consecución de este objetivo se utilizaron modelos animales y celulares. Para los experimentos con animales se utilizó la colonia transgénica TRAMP (de las siglas en inglés "Transgenic Adenocarcinoma of the Mouse Prostate"). Mediante la utilización de este modelo se estudió el papel de la privación androgénica sobre los mecanismos de diferenciación del tejido adiposo periprostático (TAPP). Para los estudios con células se utilizaron 4 líneas celulares diferentes (3T3-L1, TRAMP-C1, LNCaP y PC3). Con el empleo de las células 3T3-L1, se analizó el papel del receptor de andrógenos (RA) como regulador de la expresión del marcador de tejido adiposo



pardo/beige *Ucp1*. Además, se examinó la implicación del secretoma sobre la proliferación de las células tumorales TRAMP-C1, LNCaP y PC3.

En modelos animales, los resultados mostraron que el proceso de diferenciación adipogénica estaba alterado por la ausencia de andrógenos. En esta tesis se describe por primera vez, que la eliminación de andrógenos circulantes por castración, provocaron un aumento en el contenido de grasa parda/beige en el TAPP. Además, se estudió el efecto de la aparición de esta grasa en el microambiente tumoral de la próstata, estableciendo una relación con células inmunes implicadas en procesos inflamatorios. Así, se obtuvo una clara reducción del nivel de macrófagos residentes en los animales con grasa parda/beige con respecto a los animales control. Se observó también una alteración del metabolismo de los animales, reflejando cambios estrechamente relacionados con el proceso termogénico, como aumento de la temperatura corporal, tasa de intercambio respiratorio y gasto energético. En el caso de los modelos celulares, se comprobó como en células 3T3-L1 diferenciadas, el RA estaba implicado en la regulación de *Ucp1*, actuando a nivel de su promotor como un represor directo de la expresión. Por último, se analizó el efecto de estos adipocitos sobre la proliferación de las líneas celulares de cáncer de próstata, confirmando el conocido papel negativo de los adipocitos blancos, pero describiendo un posible papel beneficioso de los adipocitos pardos/beige, relacionado con el control de la proliferación y los mecanismos de muerte celular, mediado en parte por la secreción de vesículas extracelulares.

Por tanto, se puede concluir que los andrógenos cumplen un papel clave en los mecanismos de diferenciación adipogénica del TAPP, favoreciendo la aparición de adipocitos multiloculares. Además, la presencia de estos adipocitos cumple *in vitro* el efecto contrario a los adipocitos blancos, regulando procesos que gobiernan los mecanismos de proliferación y muerte celular.

### RESUMEN (en Inglés)

Prostate cancer is one of the tumors with the highest incidence in adult men. Despite being indolent in many patients, it may present high rates of morbidity and mortality. At this level, adipose tissue has been reported as one of the main components of tumors microenvironment. Within the adipose tissue, two main specializations can be distinguished. White adipose tissue, which has a negative role in tumor progression by promoting proliferation and cell survival mechanisms, and brown adipose tissue, whose beneficial effects have been described in the treatment of other pathologies, but its role in cancer is yet to be clarify.

In this context, the aim of this doctoral thesis was to study the role of androgens in adipogenic differentiation of brown/beige adipose tissue, as well as its role along the prostate tumor progression.



To achieve this objective, animal and cellular models were employed. To study the role of androgen deprivation on the differentiation of periprostatic adipose tissue (PPAT), the Transgenic Adenocarcinoma of Mouse Prostate (TRAMP) was used. Four different cell lines (3T3-L1, TRAMP-C1, LNCaP and PC3) were used for cell culture studies. The role of the androgen receptor (AR) as a regulator of the brown/beige adipose tissue marker *Ucp1* expression was studied by using 3T3-L1 cells. In addition, the involvement of the secretome in the proliferation of TRAMP-C1, LNCaP and PC3 tumor cells was analyzed.

In animal models, the results showed a clear involvement of androgen signaling on the adipogenic differentiation pathway. Here it is shown for the first time that castration increases brown/beige fat in PPAT. The effect of brown adipocytes on the prostate tumor microenvironment was also analyzed. It was found that immune cells involved in inflammatory processes were related to brown adipose tissue. Thereby, a reduction in the level of resident macrophages was observed in animals with brown/beige fat in comparison to the control group. After castration, a dysregulation in the metabolism was also found, displaying changes closely related to the thermogenic process, such as an increase in body temperature, respiratory exchange ratio and energy expenditure. In differentiated 3T3-L1 cells, it was confirmed that the AR was involved in the regulation of *Ucp1*, acting as a direct repressor of the expression. Finally, the effect of these adipocytes on the prostate cancer cells proliferation was assayed. It was confirmed that white adipocytes increase proliferation while brown adipocytes reduce cell proliferation and promote cell death of cancer cells, through the secretion of extracellular vesicles.

Finally, it can be concluded that androgens play a key role in the adipogenic differentiation mechanisms of PPAT, favoring the appearance of multilocular adipocytes. Moreover, brown adipocytes have *in vitro* the opposite effect that white adipocytes in the regulation of cell proliferation. Brown adipocytes reduce cell proliferation and increase cell death of cancer cells.



## Agradecimientos

*Antes de comenzar con la lectura de esta tesis doctoral, y de introducirnos de lleno en el apasionante mundo microscópico que compone a la Biología Celular, me he permitido hacer una reflexión previa de las experiencias vividas durante el viaje que ha sido llegar hasta aquí, además de dedicar unos agradecimientos a todas las personas que me han acompañado durante el camino.*

*Aquí, sentado en el escritorio, estoy poniendo el punto final a mi etapa predoctoral, pero como ya dije cuando acabé otras etapas de mi vida, cerramos una puerta, pero abrimos otra, que espero sea igual o mejor que esta que dejo atrás. Pienso y recuerdo el camino que recorrí hasta aquí, me parece increíble que vaya a defender ya la tesis doctoral de la que tan orgulloso me siento. Que nervios, y que ganas a la vez. Me acuerdo del momento en el que la Biología empezó a calar en mí, hace ya unos cuantos años. Estaba en tercero de la ESO. Ahí descubrí una pequeña unidad estructural llamada célula, que a pesar de su pequeño tamaño era capaz de realizar todos los procesos que nos dan vida ¡Era increíble! Con el paso de los cursos la Biología se tornó cada vez más interesante, hasta el punto de que ya no solo tenía curiosidad, sino necesidad por saber y conocer más y más sobre ese mundo microscópico, por lo que decidí matricularme en el grado en Biología, y para mí, una de las mejores decisiones que tomé en mi vida. Aquí, ya desde el principio de la carrera, fue cuando de verdad me di cuenta de que esto era lo que me gustaba, escuchar a profesores hablar de los científicos y sus trabajos de investigación hizo que me fijara en el trabajo de laboratorio, yo también quería descubrir mecanismos celulares, quería investigar. Aquí tuvo mucho que ver una profesora, alguien especial a la que ahora, después de casi 10 años desde que me diera clase tengo muchísimo que agradecer, ya que es la que me ha permitido que ahora esté escribiendo estas palabras.*

*Rosa, y como no, Mayo, mis dos directores. Para vosotros no tengo más que palabras de agradecimiento y orgullo. Gracias por abrirme las puertas de vuestro laboratorio cuando aún era un estudiante de grado, permitiéndome descubrir lo que realmente es investigar. Gracias por inculcarme esa pasión y dedicación que sentís por el conocimiento y la investigación. De vosotros me llevo muy buenas experiencias, y allá donde vaya no dudéis que solo tendré palabras de orgullo y admiración hacia vosotros. Sois un gran referente para mí, y ojalá algún día poder llegar a ser como vosotros. Gracias también por vuestras ideas, siempre sorprendiendo, y sin las cuales tesis y trabajos tan bonitos como los que hacemos en el laboratorio no serían posibles. Tengo que agradecer también por estar siempre disponibles para ayudarme, y sacar tiempo de donde no había para solucionar dudas y problemas. Aunque aún me queda mucho trabajo por delante para intentar ser menos caótico y más disciplinado, durante estos años en vuestro laboratorio he aprendido y mejorado mucho, y todo ha sido gracias a vuestros consejos. En definitiva ¡GRACIAS! Siempre estaréis presentes en mi vida, y me llevo más que una relación de trabajo con vosotros, me llevo unos amigos que sé que van a estar ahí para ayudarme en cualquier problema que me surja en el futuro, y espero que nos quede un camino juntos en el futuro.*

*Tengo mucho que agradecer a Isa. Gracias a ti, y a tus charlas constructivas en el despacho, ha cambiado mucho la forma de pensar y reflexionar que tenía, ahora soy más calmado y capaz de ver fallos que antes ni siquiera pensaba en ellos. Gracias por aconsejarme con los experimentos, y orientarme en muchas situaciones donde yo ya lo daba por perdido, llegabas tú, y con dos simples consejos, problema resuelto. No me puedo olvidar de David, a ti tengo que agradecerte el apoyo a lo largo de estos años, aunque ahora estás menos presente en el día a día del*



laboratorio, fuiste el primero que me guio en los pasos por el laboratorio, dirigiendo mi trabajo fin de grado, y seguro que con quebraderos de cabeza por el desastre que era. Como digo ahora refiriéndome a las liadas que hacía, nunca te fíes de un estudiante de TFG para experimentos... De ti me llevo el valor de la perseverancia y el esfuerzo, y que con trabajo y dedicación puedes conseguir lo que te propongas. Eres un claro ejemplo de que quien quiere puede, y de que el que algo quiere algo le cuesta. Al siguiente en cuestión no sabía muy bien donde incluirlo, en principio lo ponía como un compañero de laboratorio, pero es algo más. Pedro, o como yo le llamo, el señor de los western, ya llegó el momento... Quien te iba lo iba a decir eh, yo que hacía  $CxV=CxV$  y no tenía incógnita... y estoy a punto de defender la tesis. Gracias por dejarme aprender a tu lado, por tus historias científicas de metabolismo en el cuarto de revelar cuando aún estaba empezando. Me enseñabas los western, y aunque no me enteraba de nada, veía tu alegría, ilusión y esfuerzo. Gracias ayudarme y resolverme mis dudas existenciales, incluso por teléfono, aun cuando estás en otro país trabajando. Gracias por todos esos momentos de que pasamos tanto en el laboratorio, como en el animalario, y en los viajes en autobús en los que no te dejaba dormir contándote historias. Eres más que un compañero, eres un buen amigo, y siempre podrás contar conmigo para lo que necesites. Y recuerda... siempre me voy a enterar de las cosas que haces... Yo tampoco entiendo como lo consigo, pero así es. Gracias también a Rafa, por toda tu ayuda con la puesta a punto de las inmunofluorescencias que hay en esta tesis. Por enseñarme técnicas de microscopía y cuantificación, y por tener siempre un momento para asesorarme y ayudarme.

Como no, tengo que recordar y agradecer a todos mis compañeros del grupo de Biología Redox, con los que pasé la mayor parte de la tesis. A lo largo de estos cinco años, pase más tiempo con ellos que con mi familia, por lo que sois como mis hermanos científicos. Tengo que empezar por Vanesa, la eterna compañera, contigo pasé los primeros años de rodadura por el laboratorio cuando yo todavía era estudiante de grado, y tú de máster. Ahora ya eres doctora, y en nada voy yo. Primero tengo que agradecerte todo lo que me aguantaste, porque anda que no me metí contigo... Gracias también por lo ordenada y minuciosa que eres, aunque poco, algo se me pegó, así que supongo que es de agradecer. Gracias por los momentos de risa que pasamos con cotilleos en los que sacabas tu risa maléfica que tanto me hacía reír a mí. De los compañeros del día a día la primera a la que tengo que agradecer es a Sheila. Gracias por toda tu ayuda, sobre todo con los animales, mucho del trabajo experimental de esta tesis lleva tu ayuda, y eso es de valorar. Porque siempre estás disponible para ayudarme con todo. Por ser tan graciosa, por tus dudas, a veces de Perogrullo que siempre me preguntas, y por darme la chapa preguntándome cosas. Aunque me vaya y digas que me vas a echar de menos porque no sabes o no encuentras cosas, no te preocupes, que siempre que tengas dudas me escribes y te contestaré. A Fran, solo te puedo decir que la clave está en la forma de pensar, no podré ser químico, pero siempre estarás ahí tú para solucionararme las dudas químicas de reactivos, y con experimentos mentales que solo eres capaz de ver tú. Gracias porque, aunque siempre que te pido una cosa de mano te da pereza, cuando se te necesita ahí estás. A Alba, por todas las historias que nos cuentas, y que a veces a mí me abruman, por las charlas de viernes tarde, porque siempre intentas mejorar y aprender, seguro que te va a salir todo bien. A Sergio, por ser participe en las charlas de viernes tarde, por intentar mejorar y aprender, porque siempre estás dispuesto a ayudar y colaborar, te deseo también lo mejor, y mucho ánimo. Lucas, a ti te deseo mucho ánimo con el trabajo fin de master, a la vez que yo acabo esta tesis, tú te pones con tu trabajo, seguro que te queda muy bonito, además tienes unos directores que son unos cracks en esto, así que mucho ánimo. Belén, mi joven padawan a ti te dejé para el final. A ti te dejo lo más importante, te dejo esta tesis que hicimos con esfuerzo, y que aún es un bebé, ahora te toca hacerla crecer, te queda un trabajo

*muy bonito por delante, y espero que venga cargado de buenos resultados, andaré pendiente, que como dije al principio tengo mucha curiosidad.*

*Tengo que agradecer también a diferentes técnicos que han contribuido a esta tesis. Gracias en primer lugar a Fran, Rebeca, Arantxa, Teresa y Agustín, miembros del bioterio de la Universidad de Oviedo. Sin vosotros todo el trabajo con los modelos animales no podría haber sido posible. Gracias también a Marta y Ángel, del servicio de microscopía, por su ayuda y consejos con las imágenes de las inmunofluorescencia, y macros utilizadas durante esta tesis. Gracias a Maite, Vanesa, Mamen, Marta y María, del servicio de histopatología, por su ayuda en la inclusión corte y diagnóstico de las muestras de los animales. Gracias a Silvia, de la secretaria del IUOPA, sin tu ayuda todo el papeleo burocrático que tan poco me gusta hubiera sido un desastre, pero ahí estás tu para resolvernos dudas y problemas, tanto a mí como a otros doctorandos. Por último, tengo que agradecer a diferentes miembros de otros grupos que de alguna manera han contribuido a esta tesis con intercambios o prestamos de reactivos.*

*No puedo olvidarme en esta tesis de mis compañeros de grado y master que me acompañaron desde el principio de la etapa universitaria hasta ahora. Algunos de ellos doctores ya, otros en la misma etapa que yo. Alex, Diana, Quique, Andrea, Beltrán, Bea, Mauro, Laura, Pablin, Mayoral, Isaac, y muchos más. Gracias por todos los momentos que vivimos durante estos años, por los momentos en clase y prácticas, y en algunos casos incluso de fiesta, como no recordar al monstruo del campillin entre otros momentos...*

*Agradecer también a mis amigos de Avilés. Mario y Jorge, sois más que amigos, sois como unos hermanos. Incluyo también a Silvia, aunque no eres miembro fundador, eres una más ya. Gracias a los tres por aguantarme, porque, aunque no entendéis el sacrificio que es investigar, pero siempre me apoyáis y dais ánimos. Gracias por todos los momentos de risa, aventura y locura que vivimos. Siempre podréis contar conmigo para lo que necesitéis.*

*Un hueco especial en estos agradecimientos es para Rebeca. Gracias por formar parte de esta etapa final de la tesis, y más importante, de mi vida, por quererme, apoyarme, por estar siempre ahí para lo que necesite. Gracias por haberte convertido en una persona tan especial para mí, porque contigo estoy haciendo casi otra tesis, pero de la vida. Gracias por preocuparte por mí, por tu sinceridad, por quererme como lo haces. Siempre tendrás un hueco en mi corazón, y espero que sea por mucho tiempo. Te quiero.*

*Por último, quisiera agradecer también a mi familia. En primer lugar, a mis padres por todo el sacrificio que han hecho para que yo llegara hasta aquí. Gracias por todo este apoyo durante todos estos años, por educarme de la manera que lo habéis hecho, por escucharme y ayudarme cuando tenía problemas, y por mostrar interés por las cosas científicas que os contaba y que vosotros no entendíais, pero intentabais aprender. A mi hermana, porque tú también formaste parte de esta tesis, que me ayudaste alguna vez en la sombra. Gracias por querer aprender cosas de la Biología que tanto me gusta, por preguntarme dudas de las cosas que ves en clase, que sé que te cuento más de lo que necesitas, pero seguro que algo se te queda para el futuro, y el conocimiento es una cosa que nunca viene mal. A mis abuelos, porque ellos lo que me cuidaron de pequeño, y ahora van a llegar a ver este momento tan importante para mí. Gracias por preocuparos siempre por mí y por mi hermana, por preguntarme y escucharme que tal por el laboratorio, aunque no entendáis nada de lo que os digo. Agradecer también a mis primos y tíos, porque de alguna que otra forma también son parte de este largo camino, por esas reuniones, rutinas y comidas familiares entre risas y alegrías.*

*“La duda es la semilla del conocimiento”*

Francis Bacon

*“Lo que conocemos es una gota, lo que no  
conocemos un océano”*

Isaac Newton

*“Solo una cosa convierte en imposible un  
sueño: el miedo a fracasar”*

Paulo Coelho



## Índice de abreviaturas

### A

**ADN:** ácido desoxirribonucleico

**ADNc:** ácido desoxirribonucleico complementario

**ADP:** adenosin difosfato

**AKT:** AKT serina/treonina 1

**AMP:** adenosin monofosfato

**AMPc:** adenosin monofosfato cíclico

**AREs:** de las siglas en inglés “androgen response elements”

**ARN:** ácido ribonucleico

**ARNm:** ácido ribonucleico mensajero

**ARSI:** de las siglas en inglés “androgen receptor signaling inhibitor”

**ASCs:** de las siglas en inglés “adipose stromal cells”

**ATCC:** de las siglas en inglés “american type of culture collection”

**ATGL:** de las siglas en inglés “adipose triglyceride lipase”

**ATP:** adenosin trifosfato

**AUC:** de las siglas en inglés “area under de curve”

### B

**BAT:** de las siglas en inglés “brown adipose tissue”

**BAX:** de las siglas en inglés “BCL1 associated X protein”

**BCA:** de las siglas en inglés “bicinchoninic acid”

**BCL2:** de las siglas en inglés “B-cell lymphoma 2”

**BD:** bien diferenciado

**BMCP:** de las siglas en inglés “brain mitochondrial carrier protein”

**BMP:** de las siglas en inglés “bone morphogenetic protein”

**bmWAT:** de las siglas en inglés “bone marrow white adipose tissue”

**BSA:** de las siglas en inglés “bovine serum albumin”

### C

**C/EBP:** de las siglas en inglés “CCAAT enhancer binding protein”

**CAAs:** de las siglas en inglés “cancer associated adipocytes”

**CaP:** cáncer de próstata

**CAST:** castrado

**CD:** clúster de diferenciación

**Cdh:** cadherina

**CDX:** casodex/bicalautamida

**CF:** contraste de fases

**Ch:** charcoal

**ChIP:** de las siglas en inglés “chromatin immunoprecipitation”

**CIDEA:** de las siglas en inglés “cell death inducing DFFA like effector A”

**CO<sub>2</sub>:** dióxido de carbono

**CON:** control

**CREB:** de las siglas en inglés “cAMP response element-binding”

**CRPC:** de las siglas en inglés “castration resistant prostate cancer”

**CSPC:** de las siglas en inglés “castration sensitive prostate cancer”

**CXCL:** de las siglas en inglés “C-X-C motif chemokine ligand”

**Cyp17:** citocromo P450

**Cyt C:** ce las siglas en inglés “cytochrome C”

## D

**DAPI:** 4-6-diamino-2-fenilindol

**DBD:** de las siglas en inglés “DNA binding domain”

**DHEA:** dehidroepiandrosterona

**DHT:** dihidrotestosterona

**DLS:** de las siglas en inglés “dynamic light scattering”

**DMEM:** de las siglas en inglés “dulbecco’s modified eagle’s médium”

**DMSO:** dimetilsulfóxido

## E

**e<sup>-</sup>:** electrón

**EDTA:** de las siglas en inglés “ethylenediaminetetraacetic acid”

**EdU:** 5’ ethynyl-2-deoxiuridine

**EE:** de las siglas en inglés “energy expenditure”

**EEM:** error estándar de la media

**En:** de las siglas en inglés “engrailed”

**EST:** estrógenos

**EVs:** de las siglas en inglés “extracellular vesicles”

**eWAT:** de las siglas en inglés “epididimal WAT”

## F

**FABP:** de las siglas en inglés “fatty acid binding protein”

**FBS:** de las siglas en inglés “fetal bovine serum”

**FBSch:** FBS charcoal/dextrano tratado

**FDA:** de las siglas en inglés “food and drug administration”

**FFA:** de las siglas en inglés “free fatty acids”

**FFAO:** de las siglas en inglés “free fatty acids oxidation”

**FGF:** de las siglas en inglés “Fibroblast growth factor”

**FITC:** de las siglas en inglés “fluorescein isothiocyanate”

## G

**GF:** de las siglas en inglés “growth factor”

**GLOBOCAN:** de las siglas en inglés “global cancer observatory”

**GR:** de las siglas en inglés “Glucocorticoid receptor”

**GS:** de las siglas en inglés “goat serum”

**GTP:** Guanosín trifosfato

**GU:** genitourinario

## H

**H<sup>+</sup>:** protón

**H<sub>2</sub>O:** agua

**HBP:** hiperplasia benigna de próstata

**HCl:** ácido clorhídrico

**HEPES:** ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfónico

**HIF:** de las siglas en inglés “hypoxia-inducible factor”

**HSL:** de las siglas en inglés “hormone sensitive lipase”

**HSP:** de las siglas en inglés “heat shock protein”

## I

**iBAT:** de las siglas en inglés “intraescapular BAT”

**IBMX:** 3-isobutil-1-metilxantina

**IFN:** interferón

**IGF:** de las siglas en inglés “insulin growth factor”

**IGF1R:** de las siglas en inglés “insulin growth factor receptor”

**IKK:** de las siglas en inglés “I $\kappa$ B kinase”

**IL:** interleucina

**imWAT:** de las siglas en inglés “intramuscular white adipose tissue”

**INS:** insulina

**IP:** inmunoprecipitación

**IRS:** de las siglas en inglés “insulin receptor substrate”

**IS:** de las siglas en inglés “input sample”

**IUOPA:** Instituto Universitario de Oncología del Principado de Asturias

## J

**JAK:** de las siglas en inglés “jannus kinase”

## K

**KDa:** kilo Dalton

**KLF:** de las siglas en inglés “kruppel-like factor”

**KLK:** de las siglas en inglés “kalikrein”

**KMCP:** de las siglas en inglés “kidney mitochondrial carrier protein”

**Krt:** de las siglas en inglés “keratin”

## L

**LBD:** de las siglas en inglés “ligand binding domain”

**LEP:** leptina

**Lpl:** lipoproteína lipasa

**Luc:** luciferasa

## M

**MAPK:** de las siglas en inglés “mitogen activated protein kinase”

**mCSPC:** de las siglas en inglés “metastatic castration sensitive prostate cancer”

**MD:** moderadamente diferenciado

**MDif.:** medio de diferenciación

**MEL:** melatonina

**MHC:** de las siglas en inglés “major histocompatibility complex”

**MMPs:** metaloproteinasas

**MP:** medio de proliferación

**MT:** de las siglas en inglés “melatonin transporter”

**mTOR:** de las siglas en inglés “mechanistic target of rapamycin”

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

**Myf:** de las siglas en inglés “myogenic factor”

**MyoD:** de las siglas en inglés “myogenic differentiation protein”

## N

**NAD<sup>+</sup>:** nicotinamida adenina dinucleótido

**NADH:** nicotinamida adenina dinucleótido reducido

**NaOH:** hidróxido de sodio

**NBCS:** de las siglas en inglés “new born calf serum”

**NF- $\kappa$ B**: de las siglas en inglés “nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells”

**nmCRPC**: de las siglas en inglés “non metastatic castration resistant prostate cancer”

**NOS**: de las siglas en inglés “nitric oxide synthase”

**NTD**: de las siglas en inglés “N-terminal domain”

## O

**O<sub>2</sub>**: oxígeno

**O<sub>2</sub><sup>-</sup>**: anión superóxido

**OB-R**: receptor de leptina

**OPER**: operado

**ORO**: de las siglas en inglés “oil Red O”

## P

**PARP**: poli ADP ribosa polimerasa

**PAX**: de las siglas en inglés “paired box”

**PB**: de las siglas en inglés “phosphate buffer”

**pb**: pares de bases

**PBS**: de las siglas en inglés “phosphate buffer saline”

**PCR**: de las siglas en inglés “polymerase chain reaction”

**PD**: pobremente diferenciado

**PD1**: de las siglas en inglés “programmed cell death 1”

**Pdgfr**: de las siglas en inglés “platelet derived growth factor receptor”

**PDL1**: de las siglas en inglés “programmed death-ligand 1”

**PET**: de las siglas en inglés “positron emission tomography”

**PFA**: paraformaldehído

**PGC1 $\alpha$** : de las siglas en inglés “peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivador 1 $\alpha$ ”

**Pi**: fosfato inorgánico

**PI3K**: de las siglas en inglés “phosphoinositide 3 kinase”

**PIN**: de las siglas en inglés “prostatic intrepithelial neoplasia”

**PKA**: de las siglas en inglés “protein kinase A”

**Plin1**: perilipina 1

**PPAR**: de las siglas en inglés “peroxisome proliferator-activated receptor”

**PPREs**: de las siglas en inglés “PPAR response elements”

**PRDM**: de las siglas en inglés “PR domain”

**PREF**: de las siglas en inglés “preadipocyte factor”

**PRO**: progesterona

**PSA**: de las siglas en inglés “prostatic specific antigen”

**PVDF**: de las siglas en inglés “polyvinylidene fluoride”

**Px**: píxeles

## Q

**Q**: coenzima Q10

**qPCR**: de las siglas en inglés “quantitative PCR”

## R

**RA**: receptor de andrógenos

**RAS**: de las siglas en inglés “rat sarcoma virus”



**RAF:** de las siglas en inglés “rapidly accelerated fibrosarcoma”

**RBP:** de las siglas en inglés “retinol binding protein”

**REC:** receptor

**RER:** de las siglas en inglés “respiratory exchange ratio”

**RET:** retinol

**RPMI:** Rosswell Park memorial institute

**RSGZ:** rosiglitazona

**RXR:** receptor X retinoide

## S

**Sca1:** de las siglas en inglés “stem cell antigen 1”

**Scl2a4:** de las siglas en inglés “solute carrier family 2 member 4”

**scWAT:** de las siglas en inglés “subcutaneous white adipose tissue”

**SPARC:** de las siglas en inglés “secreted protein acidic and cysteine rich”

**SREBP:** de las siglas en inglés “sterol regulatory element-binding protein”

**STAT:** Signal transducer and activator of transcription

**STR:** de las siglas en inglés “short tandem repeats”

**STRA:** de las siglas en inglés “signaling receptor and transporter of retinol”

**SV40:** de las siglas en inglés “simian virus 40”

## T

**T3:** triiodotironina

**TA:** temperatura ambiente

**TAC:** tomografía axial computerizada

**TAPP:** tejido adiposo periprostático

**TCR:** de las siglas en inglés “T-cell receptor”

**TDZ:** tiazolidineodionas

**TEST:** testosterona

**TGF:** de las siglas en inglés “transforming growth factor”

**TNF $\alpha$ :** de las siglas en inglés “tumor necrosis factor  $\alpha$ ”

**TNM:** Tumor/nódulo/metástasis

**TP:** de las siglas en inglés “tumor protein”

**TRAF:** de las siglas en inglés “TNF receptor associated factor”

**TRAMP:** de las siglas en inglés “transgenic adenocarcinoma of the mouse prostate”

**TRIS:** tris (hidroximetil) aminometano

## U

**u.a:** unidades arbitrarias

**ub:** ubiquitina

**UCP:** de las siglas en inglés “Uncoupling protein”

## V

**VEGF:** de las siglas en inglés “vascular endothelial growth factor”

**VO<sub>2</sub>:** volumen de dióxido de carbono

**VO<sub>2</sub>:** volumen de oxígeno

**vWAT:** de las siglas en inglés “visceral white adipose tissue”

## W

**WAT:** de las siglas en inglés “white adipose tissue”

**WNT:** de las siglas en inglés “wingless and INT-1”



# Índice de contenidos

<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>1. EL TEJIDO ADIPOSO</b> .....	3
1.1 Tejido adiposo blanco (WAT) .....	4
1.2 Tejido adiposo pardo (BAT) .....	6
1.3 BAT y termogénesis. El papel de las proteínas desacoplantes (UCPs) .....	8
<b>2. MECANISMO DE DIFERENCIACIÓN ADIPOGÉNICA</b> .....	11
2.1 Generalidades del proceso de diferenciación adipogénica .....	11
2.2 Adipogénesis del tejido adiposo blanco .....	12
2.3 Adipogénesis de tejido adiposo pardo .....	13
2.4 Adipogénesis del tejido adiposo beige .....	15
<b>3. EL CÁNCER DE PRÓSTATA</b> .....	19
3.1 Características morfológicas de la próstata normal y tumoral .....	20
3.2 Señalización hormonal: el receptor de andrógenos .....	22
3.3 Cribado y tratamiento del cáncer de próstata .....	25
<b>4. SEÑALIZACIÓN DEL TEJIDO ADIPOSO Y EL MICROAMBIENTE TUMORAL</b> .....	30
4.1 Efecto inmunomodulador del tejido adiposo en el microambiente tumoral. ....	32
4.2 Migración de células del estroma y tumorigénesis .....	34
4.3 Comunicación en el microambiente tumoral: papel del ‘secretoma’ .....	35
4.4 Papel emergente de las vesículas extracelulares en la comunicación del microambiente tumoral .....	37
<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b> .....	40
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	44
<b>1. MATERIALES</b> .....	46
1.1 Líneas celulares .....	46
1.2 Animales .....	48
1.3 Reactivos químicos .....	49
<b>2. METODOLOGÍA</b> .....	53
2.1 TÉCNICAS DE BIOLOGÍA CELULAR .....	53
2.1.1 Diferenciación adipogénica blanca .....	53
2.1.2 Preparación de suero fetal bovino libre de esteroides .....	53
2.1.3 Tinción de las células con Oil Red ‘O’ .....	54
2.1.4 Ensayo de proliferación .....	55
2.1.5 Co-cultivo de células tumorales de próstata y fibroblastos 3T3-L1 .....	55
2.1.6 Aislamiento de vesículas extracelulares de células en cultivo .....	56
2.1.7 Sobreexpresión de luciferasa en células TRAMP-C1 .....	57

2.2	TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR .....	58
2.2.1	Aislamiento de ARN y PCR cuantitativa.....	58
2.2.2	Inmunoprecipitación de cromatina (“ChIP”).....	59
2.3	EXPERIMENTACIÓN ANIMAL.....	61
2.3.1	Genotipado.....	61
2.3.2	CIRUGÍA .....	62
2.4	ANÁLISIS MORFOMÉTRICOS Y MORFOLÓGICOS.....	62
2.4.1	Diagnóstico histopatológico de los tractos genitourinarios.....	62
2.4.2	Morfometría del tejido adiposo blanco y pardo/beige en el microambiente tumoral. .	63
2.4.3	Tinción con azul de toluidina.....	64
2.4.4	Inmunohistoquímica .....	65
2.4.5	Marcaje de células proliferativas <i>in vivo</i> .....	66
<b>3.</b>	<b>DISEÑO EXPERIMENTAL</b> .....	<b>68</b>
3.1	Diferenciación adipogénica beige en cultivo 2D .....	68
3.2	Diferenciación adipogénica beige en cultivo organotípico .....	68
3.3	Experimento de castración.....	69
3.4	Experimento de tratamiento con rosiglitazona .....	70
3.5	Inducción de diabetes tipo I .....	71
3.6	Tratamiento con melatonina.....	72
3.7	Generación de tumores subcutáneos mediante aloinjertos.....	73
<b>4.</b>	<b>ANÁLISIS ESTADÍSTICO</b> .....	<b>74</b>
	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>76</b>
<b>5.</b>	<b>Castración y microambiente tumoral en la próstata</b> .....	<b>78</b>
5.1	La castración provoca un aumento de la grasa parda/beige en el microambiente tumoral, a la vez que una reversión del fenotipo tumoral.....	78
5.2	La retirada del tejido adiposo epididimario, reduce el peso del tracto genitourinario, sin afectar al contenido del tejido adiposo periprostático .....	91
5.3	La castración altera el metabolismo energético en los animales TRAMP .....	97
5.4	La castración aumenta el número de mastocitos y reduce el de macrófagos en el microambiente prostático .....	98
5.5	La castración aumenta los niveles de UCP1 .....	101
5.6	Los niveles y la localización del receptor de andrógenos están alterados en el tejido adiposo periprostático tras la castración .....	103
<b>6.</b>	<b>Tratamiento con rosiglitazona durante 10 días</b> .....	<b>106</b>
6.1	El tratamiento con rosiglitazona aumenta la grasa parda escapular, pero no induce diferencias en el tejido adiposo periprostático. ....	106

6.2	El tratamiento con RSGZ no altera el número de mastocitos y reduce los macrófagos en el microambiente de la próstata tumoral .....	107
6.3	El tratamiento con RSGZ no altera el crecimiento tumoral en la próstata .....	110
<b>7.</b>	<b>Tratamiento con rosiglitazona durante 6 semanas</b> .....	<b>112</b>
7.1	EL tratamiento con rosiglitazona aumenta la grasa parda interescapular en ratones control y TRAMP .....	112
7.2	El tratamiento con RSGZ aumenta la termogénesis, pero no altera el metabolismo energético basal en animales control y TRAMP. ....	113
7.3	El tratamiento con RSGZ no altera la población de mastocitos, pero disminuye la de macrófagos en el microambiente tumoral de la próstata.....	115
7.4	El tratamiento con RSGZ durante 6 semanas aumenta el crecimiento tumoral en la próstata .....	118
<b>8.</b>	<b>Otras estrategias endocrinas que regulan la progresión tumoral en ratones TRAMP, no alteran el contenido en grasa parda</b> .....	<b>120</b>
<b>9.</b>	<b>La retirada de andrógenos in vitro aumenta los niveles de UCP1 en células 3T3-L1</b> .....	<b>124</b>
<b>10.</b>	<b>El receptor de andrógenos se une específicamente al promotor de <i>Ucp1</i> y actúa como un represor de la expresión génica</b> .....	<b>129</b>
<b>11.</b>	<b>El secretoma liberado por células 3T3-L1 diferenciadas a adipocitos altera la proliferación de células tumorales de cáncer de próstata</b> .....	<b>132</b>
	<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>142</b>
	<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>165</b>
	<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>169</b>
	<b>PUBLICACIONES</b> .....	<b>186</b>



# Índice de figuras

## Introducción

---

FIGURA 1. DISTRIBUCIÓN DE LOS DEPÓSITOS DE TEJIDO ADIPOSO EN HUMANOS Y RATONES.	7
FIGURA 2. MECANISMO DE ACCIÓN DE UCP1.	9
FIGURA 3. ORIGEN Y REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DEL TEJIDO ADIPOSO.	14
FIGURA 4. MECANISMOS DE ACCIÓN DE LAS TIAZOLIDINEDIONAS (TZD).	18
FIGURA 5. DISTRIBUCIÓN POR PAÍSES DE INCIDENCIA Y MORTALIDAD EN HOMBRES DE DIFERENTES TUMORES EN 2020.	19
FIGURA 6. ANATOMÍA DE LA PRÓSTATA HUMANA Y MURINA.	21
FIGURA 7. LOCALIZACIÓN CROMOSÓMICA Y ESTRUCTURA DEL RECEPTOR DE ANDRÓGENOS.	22
FIGURA 8. RUTA CANÓNICA DE SEÑALIZACIÓN DEL RECEPTOR DE ANDRÓGENOS.	23
FIGURA 9. MECANISMOS DE ACTIVACIÓN ALTERNATIVOS DEL RECEPTOR DE ANDRÓGENOS.	25
FIGURA 10. PROTOCOLO PARA LA DETECCIÓN Y TRATAMIENTO DEL CÁNCER DE PRÓSTATA PRESTANDO ESPECIAL ATENCIÓN A LAS POSIBLES TERAPIAS APLICABLES EN CADA ETAPA.	28
FIGURA 11. ESCALA TEMPORAL DE LA EVOLUCIÓN EN EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER DE PRÓSTATA, PRESTANDO ESPECIAL ATENCIÓN AL EMPLEO DE LOS FÁRMACOS INHIBIDORES DE LA SEÑALIZACIÓN ANDROGÉNICA.	29
FIGURA 12. PAPEL DEL TEJIDO ADIPOSO LOS DIFERENTES SELLOS IDENTIFICATIVOS DEL CÁNCER.	32
FIGURA 13. EL TEJIDO ADIPOSO COMO MODULADOR DE DIFERENTES POBLACIONES CELULARES DEL MICROAMBIENTE TUMORAL.	35
FIGURA 14. PRINCIPALES RUTAS QUE IMPULSAN LA INFLUENCIA DEL TEJIDO ADIPOSO EN LA PROGRESIÓN TUMORAL.	38

## Matrerial y métodos

---

FIGURA 15. IMÁGENES DE LAS DIFERENTES LÍNEAS CELULARES UTILIZADAS EN EL ESTUDIO.	47
FIGURA 16. PROCESO DE TUMORAL EN EL MODELO ANIMAL TRAMP.	48
FIGURA 17. PROTOCOLO DE DIFERENCIACIÓN ADIPOGÉNICA BLANCA A PARTIR DESDE FIBROBLASTOS 3T3-L1 HASTA ADIPOCITOS MADUROS.	53
FIGURA 18. CONSTRUCCIÓN PLASMÍDICA DEL PCDNA 3-1-PLIVE-LUCT2A.	57
FIGURA 19. DIAGRAMA DE CICLOS Y TEMPERATURAS DE LA PCR CUANTITATIVA.	59
FIGURA 20. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DEL PROTOCOLO DE INMUNOPRECIPITACIÓN DE CROMATINA.	60
FIGURA 21. CONDICIONES Y RESULTADO DEL GENOTIPADO DE RATONES DE LA COLONIA TRAMP.	61
FIGURA 22. IMÁGENES DEL PROCEDIMIENTO DE CUANTIFICACIÓN MORFOMÉTRICA.	64
FIGURA 23. MARCAJE DE LA PROLIFERACIÓN MEDIANTE EDU.	67
FIGURA 24. PROTOCOLO DE DIFERENCIACIÓN ADIPOGÉNICA A PARTIR DE ADIPOCITOS BLANCOS MADUROS HASTA ADIPOCITOS BEIGE MADUROS.	68
FIGURA 25. PROTOCOLO DE DIFERENCIACIÓN ADIPOGÉNICA DESDE TEJIDO ADIPOSO BLANCO MADURO HACIA TEJIDO ADIPOSO BEIGE.	69
FIGURA 26. DISEÑO EXPERIMENTAL DE LOS EXPERIMENTOS DE CASTRACIÓN QUIRÚRGICA EN ANIMALES CON Y TRAMP.	70
FIGURA 27. DISEÑO EXPERIMENTAL DE LOS EXPERIMENTOS DE TRATAMIENTO CON RSGZ EN CON Y TRAMP.	71
FIGURA 28. DISEÑO EXPERIMENTAL DE LA INDUCCIÓN DE DIABETES TIPO I EN ANIMALES TRAMP.	71
FIGURA 29. DISEÑO EXPERIMENTAL DE LA ADMINISTRACIÓN DE MELATONINA IN VIVO EN ANIMALES TRAMP.	72
FIGURA 30. DISEÑO EXPERIMENTAL DEL MODELO DE ALOINJERTO DE TUMORES PROSTÁTICOS SUBCUTÁNEOS EN ANIMALES CONTROL.	73

FIGURA 31. EFECTO DE LA CASTRACIÓN SOBRE EL PESO DE LOS ANIMALES CONTROL (CON) Y TRANSGÉNICOS (TRAMP).	<b>79</b>
FIGURA 32. EFECTO DE LA CASTRACIÓN SOBRE EL EPITELIO PROSTÁTICO.	<b>80</b>

## **Resultados**

---

FIGURA 33. EFECTO DE LA CASTRACIÓN SOBRE LA PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS EPITELIALES PROSTÁTICAS DE ANIMALES CONTROL (CON) Y TRANSGÉNICOS (TRAMP).	<b>82</b>
FIGURA 34. EFECTO DE LA CASTRACIÓN SOBRE EL TEJIDO ADIPOSO PERIRPOSTÁTICO.	<b>83</b>
FIGURA 35. ANÁLISIS MORFOMÉTRICO DEL TEJIDO ADIPOSO PERIPROSTÁTICO DE ANIMALES CONTROL (CON) Y TRANSGÉNICOS (TRAMP).	<b>84</b>
FIGURA 36. EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE TESTOSTERONA SOBRE LA HISTOLOGÍA DE LA PRÓSTATA TUMORAL.	<b>86</b>
FIGURA 37. EFECTO DE LA CASTRACIÓN Y POSTERIOR ADMINISTRACIÓN DE TESTOSTERONA SOBRE EL PESO CORPORAL Y DEL TRACTO DE ANIMALES TRAMP.	<b>87</b>
FIGURA 38. EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE TESTOSTERONA SOBRE EL TEJIDO ADIPOSO PERIRPOSTÁTICO.	<b>88</b>
FIGURA 39. ANÁLISIS MORFOMÉTRICO DEL TEJIDO ADIPOSO PERIPROSTÁTICO TRAS LA CASTRACIÓN Y POSTERIOR ADMINISTRACIÓN DE TESTOSTERONA.	<b>89</b>
FIGURA 40. IDENTIFICACIÓN DE ADIPOCITOS INTRA TUMORALES CON LA PROGRESIÓN TUMORAL EN ANIMALES TRAMP DE 24 SEMANAS.	<b>90</b>
FIGURA 41. ANÁLISIS MORFOMÉTRICO DE LOS ADIPOCITOS INTRA TUMORALES.	<b>91</b>
FIGURA 42. EFECTO DE LA RETIRADA DE TEJIDO ADIPOSO EPIDIDIMARIO EN EL EPITELIO PROSTÁTICO	<b>92</b>
FIGURA 43. EFECTO LA RETIRADA DE GRASA EPIDIDIMARIA SOBRE EL PESO CORPORAL Y DEL TRACTO DE ANIMALES TRAMP.	<b>93</b>
FIGURA 44. EFECTO DE LA RETIRADA DE GRASA EPIDIDIMARIA SOBRE LOS NIVELES DE KI67 EN LA PRÓSTATA.	<b>94</b>
FIGURA 45. EFECTO DE LA RETIRADA DE TEJIDO ADIPOSO EPIDIDIMARIO SOBRE EL TEJIDO ADIPOSO PERIRPOSTÁTICO.	<b>95</b>
FIGURA 46. ANÁLISIS MORFOMÉTRICO DEL TEJIDO ADIPOSO PERIPROSTÁTICO DE ANIMALES TRAMP TRAS LA RETIRADA DE GRASA EPIDIDIMARIA.	<b>96</b>
FIGURA 47. TEMPERATURA CORPORAL REGISTRADA EN ANIMALES DE 24 SEMANAS CONTROL (CON) O TRANSGÉNICOS (TRAMP), CASTRADOS (CAST) Y TRAS EL TRATAMIENTO CON TESTOSTERONA (CAST+TEST).	<b>97</b>
FIGURA 48. PARÁMETROS METABÓLICOS EN ANIMALES DE 24 SEMANAS CONTROL (CON) Y TRANSGÉNICOS (TRAMP) TRAS LA CASTRACIÓN Y TRATAMIENTO CON TESTOSTERONA.	<b>98</b>
FIGURA 49. MASTOCITOS PRESENTES EN EL MICROAMBIENTE PROSTÁTICO DE ANIMALES CONTROL (CON) Y TRANSGÉNICOS (TRAMP) DE 24 SEMANAS.	<b>99</b>
FIGURA 50. CUANTIFICACIÓN DE MASTOCITOS EN EL MICROAMBIENTE PROSTÁTICO DE ANIMALES DE 24 SEMANAS TRAS 12 SEMANAS DE CASTRACIÓN, EN ANIMALES CONTROL (CON) Y TRANSGÉNICOS (TRAMP), CON CIRUGÍA SIMULADA (SHAM) O CASTRADOS (CAST).	<b>99</b>
FIGURA 51. LOCALIZACIÓN DE MACRÓFAGOS EN EL ESTROMA DE LA PRÓSTATA DE ANIMALES DE 24 SEMANAS CONTROL (CON) Y TRANSGÉNICOS (TRAMP) TRAS 12 SEMANAS DE CASTRACIÓN.	<b>100</b>
FIGURA 52. CUANTIFICACIÓN DE MACRÓFAGOS EL MICROAMBIENTE PROSTÁTICO DE ANIMALES CONTROL (CON) Y TRANSGÉNICOS (TRAMP) DE 24 SEMANAS.	<b>101</b>
FIGURA 53. CUANTIFICACIONES DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE UCP1.	<b>101</b>
FIGURA 54. PRODUCCIÓN DE UCP1 EN EL TEJIDO ADIPOSO PERIPROSTÁTICO DE ANIMALES CONTROL (CON) Y TRANSGÉNICOS (TRAMP) EN RESPUESTA A LA CASTRACIÓN (CAST).	<b>102</b>
FIGURA 55. PRODUCCIÓN DE UCP1 EN EL TEJIDO ADIPOSO BLANCO PERIPROSTÁTICO DE ANIMALES CONTROL (CON) Y TRANSGÉNICOS (TRAMP) EN RESPUESTA A LA CASTRACIÓN (CAST).	<b>103</b>
FIGURA 56. PRODUCCIÓN DE RA EN EL TEJIDO PROSTÁTICO DE ANIMALES TRAMP.	<b>104</b>
FIGURA 57. PRODUCCIÓN DE RECEPTOR DE ANDRÓGENOS EN EL TEJIDO ADIPOSO PERIPROSTÁTICO DE ANIMALES TRAMP EN RESPUESTA A LA CASTRACIÓN (CAST).	<b>105</b>



FIGURA 58. ALTERACIONES EN EL CONTENIDO DE GRASA PARDA INTERESCAPULAR (IBAT) DE ANIMALES CONTROL TRAMP TRATADOS CON ROSIGLITAZONA (RSGZ) DURANTE 10 DÍAS.	106
FIGURA 59. ANÁLISIS MORFOMÉTRICO DEL TEJIDO ADIPOSO PERIPROSTÁTICO DE ANIMALES TRATADOS CON RSGZ DURANTE 10 DÍAS EN ANIMALES CONTROL (CON) O TRANSGÉNICOS (TRAMP), TRATADOS CON VEHÍCULO (VEH) O CON LA TIAZOLIDINEODIONA ROSIGLITAZONA (RSGZ).	107
FIGURA 60. MASTOCITOS PRESENTES EN EL MICROAMBIENTE PROSTÁTICO DE ANIMALES CONTROL (CON) Y TRANSGÉNICOS (TRAMP) TRAS 10 DÍAS DE TRATAMIENTO CON RSGZ.	108
FIGURA 61. CUANTIFICACIÓN DE MASTOCITOS EN EL MICROAMBIENTE PROSTÁTICO DE ANIMALES DE ANIMALES CONTROL (CON) Y TRANSGÉNICOS (TRAMP) TRAS 10 DÍAS DE TRATAMIENTO CON RSGZ.	108
FIGURA 62. MACRÓFAGOS PRESENTES EN EL ESTROMA PROSTÁTICO DE ANIMALES CONTROL (CON) Y TRANSGÉNICOS (TRAMP) TRAS 10 DÍAS DE TRATAMIENTO CON RSGZ.	109
FIGURA 63. CUANTIFICACIÓN DE MACRÓFAGOS EN EL MICROAMBIENTE PROSTÁTICO DE ANIMALES DE ANIMALES CONTROL (CON) Y TRANSGÉNICOS (TRAMP) TRAS 10 DÍAS DE TRATAMIENTO CON RSGZ.	110
FIGURA 64. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON ROSIGLITAZONA (RSGZ) SOBRE EL PESO CORPORAL Y DEL TRACTO UROGENITAL EN ANIMALES CONTROL (CON) Y TRANSGÉNICOS (TRAMP).	110
FIGURA 65. EFECTO DEL TRATAMIENTO DURANTE 10 DÍAS CON ROSIGLITAZONA (RSGZ) SOBRE LA PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS EPITELIALES GLANDULARES DE LA PRÓSTATA DE ANIMALES CONTROL (CON) TRAMP.	111
FIGURA 66. EFECTO DEL TRATAMIENTO DURANTE 10 DÍAS CON ROSIGLITAZONA (RSGZ) SOBRE LA PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS EPITELIALES GLANDULARES DE LA PRÓSTATA DE ANIMALES CONTROL TRAMP.	112
FIGURA 67. ALTERACIONES EN EL CONTENIDO DE GRASA PARDA INTERESCAPULAR (IBAT) DE ANIMALES CONTROL (CON) Y TRANSGÉNICOS (TRAMP) TRATADOS CON ROSIGLITAZONA (RSGZ) DURANTE 6 SEMANAS.	112
FIGURA 68. ANÁLISIS MORFOMÉTRICO DEL TEJIDO ADIPOSO PERIPROSTÁTICO DE ANIMALES TRATADOS CON RSGZ DURANTE 6 SEMANAS EN ANIMALES CONTROL (CON) O TRANSGÉNICOS (TRAMP), TRATADOS CON VEHÍCULO (VEH) O CON LA TIAZOLIDINEODIONA ROSIGLITAZONA (RSGZ).	113
FIGURA 69. TEMPERATURA CORPORAL TRAS EL TRATAMIENTO DURANTE 6 SEMANAS CON ROSIGLITAZONA (RSGZ) EN ANIMALES CONTROL (CON) Y TRANSGÉNICOS (TRAMP).	114
FIGURA 70. FIGURA 70. PARÁMETROS METABÓLICOS EN ANIMALES CONTROL (CON) Y TRANSGÉNICOS (TRAMP) TRATADOS CON ROSIGLITAZONA (RSGZ) DURANTE 6 SEMANAS.	115
FIGURA 71. MASTOCITOS PRESENTES EN EL MICROAMBIENTE PROSTÁTICO DE ANIMALES CONTROL (CON) Y TRANSGÉNICOS (TRAMP) TRAS 6 SEMANAS DE TRATAMIENTO CON ROSIGLITAZONA (RSGZ).	116
FIGURA 72. CUANTIFICACIÓN DE MASTOCITOS EN EL MICROAMBIENTE PROSTÁTICO DE ANIMALES DE ANIMALES CONTROL (CON) Y TRANSGÉNICOS (TRAMP) TRAS 6 SEMANAS DE TRATAMIENTO CON ROSIGLITAZONA (RSGZ).	116
FIGURA 73. MACRÓFAGOS PRESENTES EN EL ESTROMA PROSTÁTICO DE ANIMALES CONTROL (CON) Y TRANSGÉNICOS (TRAMP) TRAS 6 SEMANAS DE TRATAMIENTO CON ROSIGLITAZONA (RSGZ).	117
FIGURA 74. CUANTIFICACIÓN DE MACRÓFAGOS EN EL MICROAMBIENTE PROSTÁTICO DE ANIMALES DE ANIMALES CONTROL (CON) Y TRANSGÉNICOS (TRAMP) TRAS 6 SEMANAS DE TRATAMIENTO CON ROSIGLITAZONA (RSGZ).	118
FIGURA 75. EFECTO DEL TRATAMIENTO DURANTE 6 SEMANAS CON ROSIGLITAZONA (RSGZ) SOBRE EL PESO CORPORAL Y DEL TRACTO DE ANIMALES CONTROL (CON) Y TRANSGÉNICOS (TRAMP).	118
FIGURA 76. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON ROSIGLITAZONA (RSGZ) DURANTE 6 SEMANAS SOBRE LA PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS EPITELIALES EN LA PRÓSTATA DE ANIMALES CONTROL (CON) TRAMP.	119
FIGURA 77. EFECTO DE LA INDUCCIÓN DE DIABETES TIPO I SOBRE EL TEJIDO ADIPOSO PERIPROSTÁTICO DE ANIMALES DE 24 SEMANAS.	121
FIGURA 78. ANÁLISIS MORFOMÉTRICO DEL TEJIDO ADIPOSO PERIPROSTÁTICO DE ANIMALES DIABÉTICOS DE 24 SEMANAS.	122
FIGURA 79. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON MELATONINA EN ANIMALES TRANSGÉNICOS (TRAMP) SOBRE EL TEJIDO ADIPOSO PERIPROSTÁTICO	123
FIGURA 80. ANÁLISIS MORFOMÉTRICO DEL TEJIDO ADIPOSO PERIPROSTÁTICO DE ANIMALES TRANSGÉNICOS (TRAMP) TRAS EL TRATAMIENTO CON MELATONINA (MEL)..	123

FIGURA 81. DIFERENCIACIÓN ADIPOGÉNICA EN CÉLULAS 3T3-L1.	<b>125</b>
FIGURA 82. ANÁLISIS MORFOMÉTRICO DEL CONTENIDO LIPÍDICO DE CÉLULAS 3T3-L1 SIN DIFERENCIAR O DIFERENCIADAS, EN PRESENCIA DE FBS REGULAR O SIN ESTEROIDES (FBSCH).	<b>126</b>
FIGURA 83. VARIACIÓN IN VITRO DE LOS NIVELES DE UCP1 EN CÉLULAS 3T3-L1 DIFERENCIADAS A ADIPOCITOS.	<b>128</b>
FIGURA 84. EFECTO DE LA RETIRADA DE BICALUTAMIDA SOBRE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE UCP1 EN CÉLULAS 3T3-L1 DIFERENCIADAS A ADIPOCITOS.	<b>129</b>
FIGURA 85. GEL DE AGAROSA AL 2% CON LOS PRODUCTOS DE PCR GENERADOS TRAS LA INMUNOPRECIPITACIÓN DE CROMATINA SIN (DMSO) Y CON BLOQUEO (CDX) DEL RECEPTOR DE ANDRÓGENOS.	<b>130</b>
FIGURA 86. REPRESENTACIÓN GRÁFICA DE LA CALIDAD DE LA SECUENCIACIÓN PARA CADA UNA DE LAS MUESTRAS ENSAYADAS.	<b>130</b>
FIGURA 87. REPRESENTACIÓN DE ALINEAMIENTOS DE MÚLTIPLES SECUENCIAS MEDIANTE WEBLOGO DE LAS SECUENCIAS OBTENIDAS DE LA SECUENCIACIÓN ENFRENTADAS CONTRA LA SECUENCIA COMPLETA DEL GEN DE UCP1.	<b>131</b>
FIGURA 88. NIVELES DE EXPRESIÓN DEL PROMOTOR DE UCP1 EN FIBROBLASTOS 3T3-L1 INCUBADOS CON VEHÍCULO (3T3-L1DMSO) O CON BICALUTAMIDA (3T3-L1CDX) TRAS LA INMUNOPRECIPITACIÓN DE CROMATINA.	<b>132</b>
FIGURA 89. ANÁLISIS DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR EN CÉLULAS TRAMP-C1 INCUBADAS CON MEDIOS CONDICIONADOS DE CÉLULAS 3T3-L1 Y CÉLULAS 3T3-L1 DIFERENCIADAS A ADIPOCITOS.	<b>133</b>
FIGURA 90. ANÁLISIS DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR MEDIANTE ENSAYO TRANSWELL DE CÉLULAS TRAMP-C1 TRAS EL MARCAJE CON EDU.	<b>134</b>
FIGURA 91. NIVELES DE EXPRESIÓN DE UCP1 EN CÉLULAS 3T3-L1 INDIFERENCIADAS (3T3-L1'NAIVE'), Y DIFERENCIADAS EN PRESENCIA DE VEHÍCULO (3T3-L1DMSO) O BICALUTAMIDA (3T3-L1CDX).	<b>135</b>
FIGURA 92. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE LOS EXTRACTOS DE VESÍCULAS EXTRACELULARES.	<b>136</b>
FIGURA 93. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON EVS AISLADAS DE CÉLULAS 3T3-L1 DIFERENCIADAS Y SIN DIFERENCIAR SOBRE LA PROLIFERACIÓN CELULAR DE TRAMP-C1, LNCAP, PC3.	<b>138</b>
FIGURA 94. DIFERENCIACIÓN DE FRAGMENTOS DE TEJIDO ADIPOSO EPIDIDIMARIO MEDIANTE CULTIVO ORGANOTÍPICO.	<b>139</b>
FIGURA 95. MODELO IN VIVO DE ALOINJERTO ENTRE TEJIDO ADIPOSO Y CÉLULAS TUMORALES DE PRÓSTATA.	<b>140</b>

## **Discusión**

---

FIGURA 96. EFECTO DE LA CASTRACIÓN SOBRE LA REGULACIÓN DEL MICROAMBIENTE INFLAMATORIO EN LA PRÓSTATA DE LOS ANIMALES TRAMP.	<b>153</b>
FIGURA 97. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON ROSIGLITAZONA SOBRE LA REGULACIÓN DEL MICROAMBIENTE INFLAMATORIO EN LA PRÓSTATA DE LOS ANIMALES TRAMP.	<b>156</b>
FIGURA 98. MECANISMO DE REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD TERMOGÉNICA DE UCP1 EN EL TEJIDO ADIPOSO PARDO MEDIADA POR LA ACTIVIDAD DE LA MELATONINA.	<b>158</b>
FIGURA 99. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DEL MECANISMO DE INHIBICIÓN DEL RECEPTOR DE ANDRÓGENOS SOBRE LA EXPRESIÓN DE UCP-1.	<b>160</b>



## Índice de tablas

### Introducción

---

TABLA 1. DIFERENCIAS MORFOLÓGICAS ENTRE LOS 2 TIPOS PRINCIPALES DE TEJIDO ADIPOSO	4
---	---

### Material y Métodos

---

TABLA 2 CARACTERÍSTICAS DE LAS LÍNEAS CELULARES EMPLEADAS EN ESTE PROYECTO.	48
TABLA 3. COMPAÑÍAS Y REFERENCIAS DE TODOS LOS REACTIVOS USADOS EN ESTE PROYECTO.	49
TABLA 4 LOCALIZACIÓN DE LA SEDE DE TODAS LAS COMPAÑÍAS SUMINISTRADORAS DE TODOS LOS REACTIVOS UTILIZADOS EN ESTE PROYECTO	52
TABLA 5. SECUENCIAS DE LOS CEBADORES EMPLEADOS EN LA DETECCIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA	59
TABLA 6. REACTIVOS Y CONCENTRACIONES UTILIZADOS PARA LA REALIZACIÓN DE LA PCR CUANTITATIVA	59
TABLA 7. SECUENCIAS DE LOS CEBADORES UTILIZADOS PARA LA REALIZACIÓN DE PCR CONVENCIONAL Y SECUENCIACIÓN	60
TABLA 8. SECUENCIAS DE LOS CEBADORES UTILIZADOS PARA EL GENOTIPADO DE LOS ANIMALES DE LA COLONIA TRAMP.	62
TABLA 9. REACTIVOS Y CONCENTRACIONES UTILIZADOS EN EL GENOTIPADO DE LA COLONIA TRAMP.	62
TABLA 10. ANTICUERPOS EMPLEADOS PARA LAS INMUNOHISTOQUÍMICAS	66



# INTRODUCCIÓN




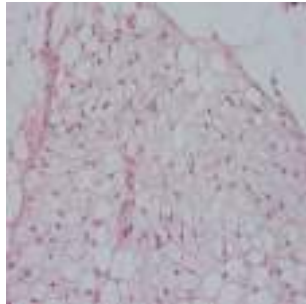
## 1. EL TEJIDO ADIPOSO

El tejido adiposo es una especialización del tejido conjuntivo formado por células con una morfología muy característica que acumulan en su citosol gotas lipídicas y que se denominan adipocitos. Dichas gotas no están dentro de una vesícula convencional, rodeada de una bicapa, sino que están rodeadas por una monocapa de fosfolípidos (1). Una de las características más importantes del tejido adiposo es su elevada plasticidad, pudiendo variar en contenido y localización en función de diferentes estímulos. En el organismo, el contenido de tejido adiposo está finamente regulado, dependiendo en gran medida de factores externos como la dieta, el ambiente, o diferentes tratamientos farmacológicos. A este nivel, el tejido adiposo controla su actividad mediante mecanismos de lipólisis y lipogénesis, aumentando o reduciendo su contenido lipídico, o mediante mecanismos de diferenciación, desdiferenciación, o muerte celular que se encargan de controlar el número de células con capacidad de almacenamiento (2). Las funciones clásicas del tejido adiposo son la protección de los órganos vitales frente a traumas por su capacidad amortiguadora, la función como barrera frente a la pérdida de calor, favorecida por su capacidad como aislante térmico, o la capacidad de servir de reservorio energético a largo plazo, puesto que la oxidación completa de los ácidos grasos que almacena proporciona más del doble de energía que el catabolismo de proteínas o carbohidratos (3). Sin embargo, recientemente el tejido adiposo se considera como uno de los principales tejidos endocrinos del organismo. Esto es debido a su capacidad para producir y liberar moléculas de señalización denominados adipocinas, tanto de forma paracrina, actuando sobre células y tejidos próximos, como endocrina mediante su liberación a circulación (4).

En la mayoría de los mamíferos se encuentran principalmente dos tipos de tejido adiposo fácilmente diferenciables morfológicamente: el tejido adiposo blanco (WAT) y el tejido adiposo pardo (BAT). Tanto los adipocitos blancos como los pardos proceden de un linaje de precursores mesenquimales que se diferencian previamente a preadipocitos y posteriormente a adipocitos maduros (Tabla 1) (5).



Tabla 1. Diferencias morfológicas entre los 2 tipos principales de tejido adiposo

Características	Tejido adiposo blanco	Tejido adiposo pardo
Morfología	Esférica	Poligonal
Núcleo	Periférico y alargado	Central y redondeado
Tamaño celular	Grande (>100 $\mu\text{m}$ )	Pequeño (<50 $\mu\text{m}$ )
Gota lipídica	Única y grande	Múltiples y pequeñas
Mitocondrias	+	+++
Origen	Precursor <i>Myf5</i> <sup>-</sup>	Precursor <i>Myf5</i> <sup>+</sup>
Localización	Subcutáneo, visceral, médula ósea, intramuscular	Cervical, supraclavicular, axilar, paravertebral, perivascular, perirrenal
Función	Reservorio energético	Producción de calor
Vascularización	+	+++
Contenido lipídico	Triglicéridos	Triglicéridos y fosfolípidos
Niveles de UCP1	Indetectable	+++
Histología		

### 1.1 Tejido adiposo blanco (WAT)

El tejido adiposo blanco (WAT) se caracteriza por presentar adipocitos de gran tamaño, que pueden llegar a superar los 100  $\mu\text{m}$  de diámetro, y llamados comúnmente como adipocitos uniloculares. Estos adipocitos presentan una gran gota lipídica en su interior (95 % volumen), cargada fundamentalmente de triglicéridos, la cual se encuentra rodeada por una monocapa de fosfolípidos, que restringe el núcleo y el citoplasma a la periferia de la célula dejando únicamente un espacio no superior a los 2  $\mu\text{m}$  entre la gota y la membrana plasmática (6). Este tejido está ampliamente distribuido por el organismo pudiendo ser clasificado en función de su localización. En los humanos se distribuye esa localización en 4 tipos principales de tejido adiposo con numerosas diferencias anatómicas, celulares y moleculares [Fig.1] (7).

**(i) Tejido adiposo blanco subcutáneo (scWAT).** Se corresponde con el depósito mayoritario de tejido adiposo blanco en individuos sanos, llegando a representar hasta el 80 % del total de WAT. Este subtipo funciona como almacén de triglicéridos en momentos de abundancia de nutrientes, así como de aislante frente a la pérdida de calor (8). En humanos, podemos dividirla en dos subgrupos, scWAT superior y scWAT inferior (7). En los roedores, esta se clasifica a su vez en dos subtipos scWAT anterior y scWAT posterior (9). A nivel metabólico, el scWAT presenta una menor actividad que otros tipos de tejido adiposo blanco. Sin embargo, a nivel endocrino este depósito es el encargado de la producción de la mayoría de la leptina circulante en el organismo (10).

**(ii) Tejido adiposo blanco visceral (vWAT).** Este subtipo está constituido por todos los depósitos de WAT repartidos entre los diferentes órganos del organismo, pudiendo diferenciarse varios depósitos mayoritarios como son la grasa mesentérica, retroperitoneal o gonadal (7). Este tejido adiposo tiene una función protectora y se caracteriza por tener una alta actividad metabólica, mostrando elevados niveles de expresión y producción de diferentes enzimas lipolíticas como la lipasa sensible a hormonas (HSL), o la lipasa adipocítica de triglicéridos (ATGL), lo que se relaciona con una mayor actividad de lipólisis, lipogénesis y oxidación de ácidos grasos, generando así una respuesta más rápida en la movilización de lípidos en caso de ayuno (10).

**(iii) Tejido adiposo blanco de médula ósea (bmWAT).** Se localiza en la zona medular del hueso y llega a suponer un 10 % del total del tejido adiposo del adulto. El origen de este tipo de tejido adiposo deriva de la diferenciación de los precursores mesenquimales del hueso. Sus niveles van incrementándose con la edad, llegando a representar un 70 % del total de médula ósea en un individuo de avanzada edad, conociéndose a esta médula ósea como “médula ósea amarilla”. Al igual que sucede con el vWAT, este también tiene una alta actividad metabólica y secretora, liberando adipoquinas como la leptina o la adiponectina, entre otras, así como factores proinflamatorios como interleucina (IL) 6 o el factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) (11). Sin embargo, hay estudios que sugieren la incapacidad de este tejido adiposo para proporcionar energía ante periodos de ayuno, puesto que se ha observado como en periodos de malnutrición su contenido en ácidos grasos no disminuye (12).

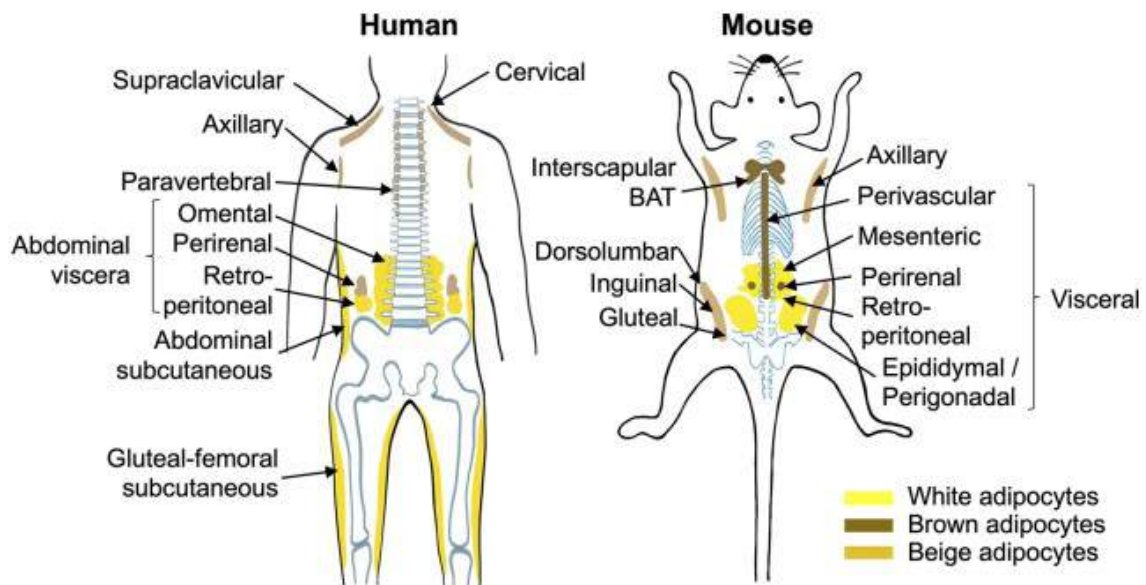
**(iv) Tejido adiposo blanco intramuscular (imWAT).** Se refiere a la infiltración de adipocitos entre las fibras del músculo esquelético. Este imWAT es otro almacén energético cuya función es la movilización rápida de los lípidos durante el ejercicio físico. Es frecuente encontrarlo en animales, siendo conocido en la industria cárnica como “grasa marmoleada”. Sin embargo, en humanos su presencia está relacionada con el envejecimiento, o alguna circunstancia patológica como pueden ser alteraciones metabólicas como el síndrome metabólico o la diabetes (13).

## 1.2 Tejido adiposo pardo (BAT)

El tejido adiposo pardo (BAT) es la otra gran especialización del tejido adiposo. Al contrario que el blanco, su función principal es la producción de calor (termogénesis). En los mamíferos, el BAT también está ampliamente distribuido, pero se limita principalmente a las primeras etapas del desarrollo, tendiendo estos depósitos a desaparecer con la edad (3). Sin embargo, esto no ocurre así en todas las especies, ya que muchos heterotermos necesitan de grandes cantidades de esta especialización del tejido adiposo para resistir las caídas de temperatura corporal sufridas durante la hibernación (14). Desde su descubrimiento en el año 1551 en la escápula de una marmota, por el naturalista suizo Konrad Gessner, el estudio del tejido adiposo pardo en el humano adulto no ha tenido una gran relevancia (15). Sin embargo, la optimización de técnicas de imagen como la tomografía por emisión de positrones (PET), o el desarrollo de nuevas técnicas no invasivas basadas en el uso de gases inertes como el xenón, han permitido estudiar con más profundidad la biología de este tejido en el humano adulto (16). Durante la última década, el estudio de la BAT en el humano ha generado un gran interés científico debido principalmente a su relevancia clínica en diferentes patologías como el cáncer o las enfermedades cardiovasculares y metabólicas, convirtiéndose en una posible diana terapéutica para el tratamiento de estas afecciones (17,18).

En los humanos se localizan diferentes depósitos de BAT claramente establecidos en el individuo adulto. Se puede encontrar tejido adiposo pardo en las regiones cervical, supraclavicular, axilar, peri-aórtica, paravertebral y suprarrenal (19). Del mismo modo, en ratón (*Mus musculus*), es frecuente encontrar grasa parda en localizaciones similares

al humano, siendo estas la zona interescapular, axilar, perirrenal, y con el envejecimiento también en el tejido conjuntivo de la cápsula del timo (20). Esta distribución de la grasa parda no es casual, sino que la localización específica de estos depósitos cumple funciones clave en el mantenimiento de la temperatura en órganos vitales, o en el calentamiento de la sangre que circula desde la periferia hasta el tronco [Fig.1] (21,22).



**Figura 1.** Distribución de los principales depósitos de tejido adiposo en humanos y ratones. En amarillo se representan los depósitos de tejido adiposo blanco, en marrón oscuro los depósitos de tejido adiposo pardo y en marrón claro los depósitos de tejido adiposo beige. Imagen obtenida de LY. Cheong (2021) (22).

Los adipocitos del BAT, al contrario que los del tejido adiposo blanco, se caracterizan por tener un menor tamaño, no llegando a superar los 50  $\mu\text{m}$  de diámetro. Presentan un núcleo central y un citoplasma con numerosos depósitos lipídicos cargados principalmente de triglicéridos y fosfolípidos, conociéndose comúnmente a estos como adipocitos multiloculares (23). Más recientemente se ha demostrado que, al igual que el tejido adiposo blanco, estos adipocitos tienen una elevada actividad secretora, compartiendo muchas de las moléculas secretadas por los adipocitos blancos, pero también liberando moléculas exclusivas de este tejido, conocidas comúnmente como ‘batoquinas’ (24). Su actividad termogénica está relacionada con el gran contenido de mitocondrias que contienen, y que les confieren el característico color marrón.

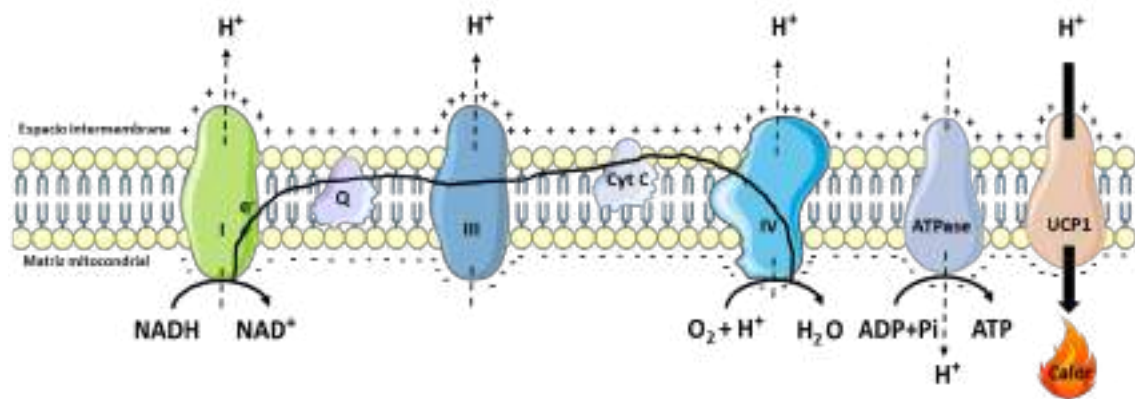
### 1.3 BAT y termogéneis. El papel de las proteínas desacoplantes (UCPs)

La actividad termogénica de los adipocitos de BAT está mediada por la presencia en la membrana mitocondrial interna de la proteína desacoplante de la cadena de transporte de electrones 1 (UCP1) (25). Esta proteína es exclusiva del tejido pardo, pero no es la única isoforma, puesto que hay descritos otros 5 homólogos dentro de la familia de las proteínas desacoplantes, de los cuales la UCP2 y la UCP3 están estrechamente relacionados con esta (26). Estas dos isoformas son de expresión más ubicua encontrándose en diversos tejidos del organismo (27). Además, también se incluyen en esta familia otros dos homólogos de expresión mayoritaria en el sistema nervioso, y que divergen más estructuralmente, UCP4, y la proteína transportadora mitocondrial 1 del cerebro (BMCP1) (28). El último de los homólogos es la proteína transportadora mitocondrial 1 del riñón (KMCP1), el cual se expresa mayoritariamente en el riñón de mamíferos (29). En términos generales estas otras UCPs no presentan actividad termogénica, sino que están más implicadas en la movilización de ácidos grasos libres, y el control de la homeostasis redox. No obstante, bajo diferentes tratamientos farmacológicos pueden tener cierta actividad termogénica adaptativa (30). En cualquier caso, el papel exacto de estas otras proteínas desacoplantes no está del todo claro (31–33).

La primera aproximación hacia la descripción de la UCP1 se dio a finales de la década de los 70, cuando se observó que, en las mitocondrias de BAT de hámster sirio (*Mesocricetus auratus*), la adición de nucleótidos de purina era capaz de modificar el flujo de protones *in vitro* (34). Sin embargo, no fue hasta finales de los años 80 cuando se describió por primera vez tanto la secuencia génica como la estructura de la proteína UCP1 en el tejido adiposo (35).

La UCP1 es una proteína transmembrana monomérica localizada en la membrana interna de la mitocondria. Su estructura primaria está constituida por 307 aminoácidos, que se organizan en una estructura secundaria que da lugar a 6 pasos transmembrana compuestos por 6 hélices alfa, y 3 dominios de matriz mitocondrial, dejando los extremos amino y carboxilo terminal hacia el espacio intermembrana de la mitocondria (36). La función clásica de esta proteína, como su propio nombre indica, consiste en

catalizar una fuga de protones ( $H^+$ ) desde el espacio intermembrana a través de la membrana interna de la mitocondria disipando así el gradiente electroquímico de protones generado por los complejos I, III y IV de la cadena de transporte de electrones durante la fosforilación oxidativa. Estos protones normalmente son bombeados a través de la adenosín trifosfato sintasa (ATP sintasa) de nuevo a la matriz mitocondrial provocando, durante ese flujo, la fosforilación del adenosín difosfato (ADP) a adenosín trifosfato (ATP) [Fig.2] (37).



**Figura 2. Mecanismo de acción de UCP1.** La oxidación del nicotinamida adenina dinucleótido reducido (NADH) a su forma oxidada (NAD<sup>+</sup>) en el complejo I genera un flujo de electrones ( $e^-$ ) a través de la cadena que en última instancia se cede al oxígeno molecular ( $O_2$ ) en el complejo IV para la formación de agua. Durante el proceso se produce un bombeo de protones ( $H^+$ ) en contra de gradiente desde la matriz hacia el espacio intermembrana que, en última instancia, pasan de nuevo a la matriz a través de las proteínas ATP sintasa generando durante este proceso enlaces de alta energía, o bien a través de UCP1 generándose calor durante el proceso. ) a su forma oxidada (NAD<sup>+</sup>) en el complejo I genera un flujo de electrones ( $e^-$ ) a través de la cadena que en última instancia se cede al oxígeno molecular ( $O_2$ ) en el complejo IV para la formación de agua. Durante el proceso se produce un bombeo de protones ( $H^+$ ) en contra de gradiente desde la matriz hacia el espacio intermembrana que, en última instancia, pasan de nuevo a la matriz a través de las proteínas ATP sintasa generando durante este proceso enlaces de alta energía, o bien a través de UCP1 generándose calor durante el proceso.

La actividad de UCP1 está finamente regulada en los adipocitos pardos mediante señalización  $\beta$ -adrenérgica, en respuesta a diferentes estímulos, siendo el más clásico la exposición al frío. Esto genera un fenómeno denominado termogénesis independiente de temblor ("nonshivering thermogenesis"). Este tipo de estímulos generan una respuesta cerebral mediada por catecolaminas como la noradrenalina que, a través del sistema nervioso simpático que inerva a los adipocitos pardos, es capaz de activar receptores  $\beta_3$  adrenérgicos, desencadenando una cascada dependiente de adenosín monofosfato cíclico (AMPc). Este AMPc activa a la proteína quinasa A (PKA) que a su vez tiene diferentes dianas dentro del adipocito. El resultado es la lipólisis de los triglicéridos almacenados en las múltiples gotas de grasa liberando ácidos grasos libres al citosol que actúan como combustible para la oxidación mitocondrial, siendo esto uno de los

principales activadores de UCP1 y favoreciendo, por tanto, el proceso termogénico (38,39).

La presencia de otras UCPs, aparentemente sin capacidad termogénica, en otros tejidos ha llevado a muchos investigadores a hipotetizar sobre el posible origen y función primitiva de estas proteínas. A pesar de que se creía que eran exclusivas de la grasa parda, tejido exclusivo de los mamíferos encontrado en placentarios, marsupiales y monotremas, los estudios de genética comparativa han demostrado la presencia de las UCPs en otros organismos tales como peces teleósteos y anfibios. Así mismo, se ha comprobado su ausencia en el grupo de los saurópsidos, lo que excluye los reptiles y las aves (40). Establecer esta línea temporal ha permitido demostrar la presencia de estas proteínas en el reino animal desde hace aproximadamente 420 millones de años.

Estudios más recientes en plantas han descrito proteínas con función similar a las UCPs, pero que presentan una baja homología con las de origen animal. Al igual que estas, son activadas por ácidos grasos libres e inhibidas por nucleótidos de purina (41). Así mismo, estas proteínas se han observado en eucariotas unicelulares (*Acanthamoeba castellanii*), con una homología muy similar a la de las plantas, lo que permite plantear la posibilidad de un origen anterior a la división entre el reino animal y vegetal. En estos organismos unicelulares, la presencia de estas bombas de protones no está asociada a una función termogénica debido a su pequeño tamaño, pero sí que se ha observado como estas proteínas son capaces de regular la actividad de la cadena de transporte de electrones, aumentando su actividad en presencia de ácidos grasos libres o del anión superóxido exógeno ( $O_2^{\cdot-}$ ), lo que podría implicar un posible papel de las UCPs y su actividad no termogénica en otros tejidos en la homeostasis redox, adquiriéndose la capacidad termogénica más adelante en la evolución para contrarrestar periodos de bajas temperaturas como las glaciaciones (42).

## 2. MECANISMO DE DIFERENCIACIÓN ADIPOGÉNICA

### 2.1 Generalidades del proceso de diferenciación adipogénica

El proceso de diferenciación adipogénica, desde el precursor mesenquimal hasta el adipocito maduro, implica la participación de una compleja red de factores de transcripción responsables de la expresión de genes, y producción de proteínas inductoras de la diferenciación hacia adipocitos (5). Durante el proceso de diferenciación podemos distinguir tres etapas claramente definidas, (i) Parada del crecimiento, (ii) Expansión clonal mitótica, (iii) Diferenciación terminal (43).

**(i) Parada del crecimiento.** Las células madre mesenquimales multipotentes, capaces de generar diferentes linajes celulares (osteogénico, miogénico, adipogénico etc.), mediante un proceso de diferenciación celular determinan su linaje para convertirse en células mesenquimales unipotentes con capacidad para generar un único linaje (preadipocitos). Durante este proceso, las señales de rutas que involucran la participación de factores como las proteínas morfogenéticas del hueso (BMPs), o las rutas de wingless/INT-1 (WNT) y Hedgehog ejercen una influencia muy fuerte sobre los reguladores principales de los procesos de diferenciación. En el caso de la adipogénesis, el regulador principal es el receptor gamma activado por proliferación del peroxisoma (PPAR $\gamma$ ). Cuando éste se activa, favorece la diferenciación hacia el linaje adipogénico y bloquea el resto (44). En fibroblastos embrionarios 3T3-L1, que presentan una elevada capacidad para diferenciarse hacia células similares a adipocitos blancos, se conoce con claridad su mecanismo de diferenciación. Está descrito que, durante la primera etapa, estas células bloquean su crecimiento provocando una parada en la fase G1 del ciclo celular, asociado con la presencia de niveles elevados de expresión de los inhibidores de las quinasas dependientes de ciclina P21<sup>CIP</sup> y P27<sup>KIP1</sup>, bloqueando así la progresión en ciclo celular desde la fase G1 a la de síntesis (S) y induciendo la parada de este (45).

**(ii) Expansión clonal mitótica.** En esta fase las células entran de nuevo en ciclo celular para completar una o dos rondas de división celular. Durante esta fase en los preadipocitos disminuyen los niveles de proteínas implicadas en la parada en G1 y aumentan proteínas implicadas en el avance del ciclo como las ciclinas D y E, y las quinasas dependientes de ciclina 2 y 4. Durante esta fase de expansión clonal los



preadipocitos mantienen elevada la expresión de marcadores mesenquimales como el factor de preadipocitos 1 (PREF-1), la proteína de unión a la secuencia CAAT (C/EBP), o WNT (45,46).

**(iii) Diferenciación terminal.** En esta última etapa en los preadipocitos se reducen la expresión de todos los genes mesenquimales, y se expresan todos aquellos genes implicados en la acumulación de lípidos. Mientras que durante las dos primeras etapas los preadipocitos presentan una morfología fusiforme, similar a la de las células madre de las que proceden, no es hasta esta etapa de diferenciación terminal cuando comienzan a adquirir la morfología redondeada característica del adipocito. Además, es en esta fase cuando adquieren sensibilidad a insulina, lo que les permite empezar a acumular triglicéridos y aumentan su capacidad secretora (47). Durante la diferenciación terminal podemos distinguir ya entre la adipogénesis de adipocitos blancos y pardos en función de los factores que se expresen en el precursor mesenquimal, existiendo dos linajes diferentes, por un lado, el linaje adipoblástico, característico por ser negativo para el factor miogénico 5 (Myf5) el linaje miogénico característico por ser positivo para Myf5. Las células derivadas de un precursor Myf5 negativo darán lugar a adipocitos blancos maduros, mientras que las células que provengan de un precursor Myf5 positivo darán lugar a adipocitos pardos y a células musculares esqueléticas [Fig.3] (48,49).

## 2.2 Adipogénesis del tejido adiposo blanco

Durante la adipogénesis de los adipocitos blancos hay una gran variedad de factores de transcripción implicados, entre los que se encuentran miembros de la familia C/EBP (50). Durante las primeras etapas de la diferenciación tiene lugar la expresión y activación de C/EBP $\beta$  y C/EBP $\delta$ . La unión entre ambas proteínas induce la expresión y producción de C/EBP $\alpha$  y PPAR $\gamma$ , siendo estos dos los principales reguladores positivos de la adipogénesis blanca. C/EBP $\alpha$  está involucrado principalmente en la adquisición de la sensibilidad a insulina en el preadipocito, mientras que PPAR $\gamma$  cumple un papel importante en la acumulación de lípidos y como inductor de la expresión de otros genes implicados en la cascada de diferenciación.

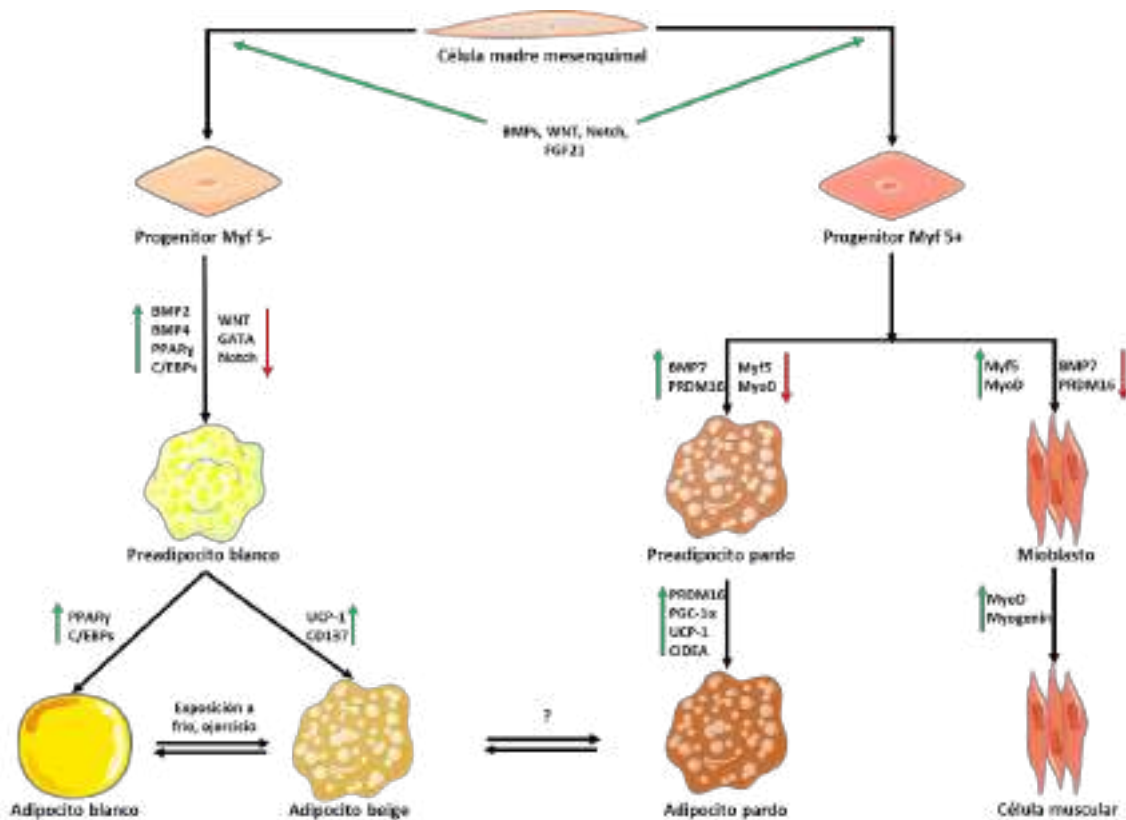
Dado que PPAR $\gamma$  está involucrado en la expresión de otros genes relacionados con la adipogénesis, se le considera como el principal regulador de este proceso, y su

expresión es esencial para que se induzca la diferenciación del preadipocito al adipocito maduro. Se ha demostrado que preadipocitos deficientes en este factor son incapaces de diferenciarse (51). Sin embargo, C/EBP $\alpha$  es necesario -pero no indispensable- para la diferenciación, ya que células carentes en este factor son capaces de llevar a cabo el proceso de diferenciación, aunque de una forma menos eficiente, acumulando estas células un menor número de depósitos lipídicos (52).

Además de estos reguladores, existe una gran variedad de factores que actúan activando y reprimiendo la expresión de estos genes principales. Los factores de tipo Kruppel (KLFs) y los elementos de respuesta de unión a AMP (CREB) están todos ellos involucrados en la activación de C/EBP $\beta$  durante la transición entre la fase (i) de parada del ciclo y la fase (ii) de expansión clonal mitótica. También la proteína reguladora de unión a esterol 1 (SREBP1) es capaz de inducir, a través de la señalización mediada por insulina, la expresión de PPAR $\gamma$  durante la etapa (iii) de diferenciación terminal [Fig.3] (53).

### 2.3 Adipogénesis de tejido adiposo pardo

Tal y como se ha mencionado en la sección anterior, el tejido adiposo pardo se origina a partir de un precursor mesenquimal diferente al del tejido adiposo blanco, que exhibe marcadores diferentes tales como Myf5, 'engrailed 1' (En1), o la proteína de caja emparejada 7 (PAX7) (54). Este precursor, a diferencia del de los adipocitos blancos, tiene la capacidad para diferenciarse hacia dos linajes diferentes en función de los marcadores específicos que exprese al momento de la determinación, pudiendo dar lugar a la generación de músculo esquelético, o tejido adiposo pardo [Fig.3] (55).



**Figura 3. Origen y regulación transcripcional del tejido adiposo.** A partir de un precursor mesenquimal pluripotente tiene lugar la diferenciación hacia los dos linajes principales de tejido adiposo, determinado por los marcadores expresados durante cada etapa. Los progenitores positivos para Myf 5 darán lugar a los linajes de tejido adiposo pardo y músculo esquelético. Por otro lado, los precursores negativos para Myf 5 formarán el linaje de los adipocitos blancos.

Durante la adipogénesis parda también se encuentran implicados los reguladores principales de la diferenciación, PPAR $\gamma$  y C/EBP $\alpha$ . Sin embargo, al contrario de lo que ocurría con el tejido adiposo blanco, ninguno de estos dos factores es capaz de inducir y completar el proceso de adipogénesis parda por sí solo, siendo necesaria la intervención de otros factores de transcripción para completar el proceso (56). Otros marcadores como BMPs, o el dominio PR 16 (PRDM16), son fundamentales en las primeras etapas de diferenciación adipogénica parda (57). Ambos factores favorecen la expresión tanto de PPAR $\gamma$  y de C/EBP $\alpha$  durante la etapa de diferenciación terminal (58). Además, puesto que el precursor mesenquimal positivo para Myf 5 puede diferenciarse tanto hacia adipocitos pardos como hacia células musculares esqueléticas, la expresión tanto de BMP7 como de PRDM16 en este precursor mesenquimal determinan necesariamente la diferenciación hacia la adipogénesis parda, bloqueando los mecanismos de diferenciación miogénica (54,59). Del mismo modo que los marcadores involucrados en la adipogénesis parda bloquean la diferenciación miogénica, aquellos

marcadores involucrados en la diferenciación del tejido adiposo blanco tales como WNT o PPRE-1 actúan como supresores en la adipogénesis parda (55).

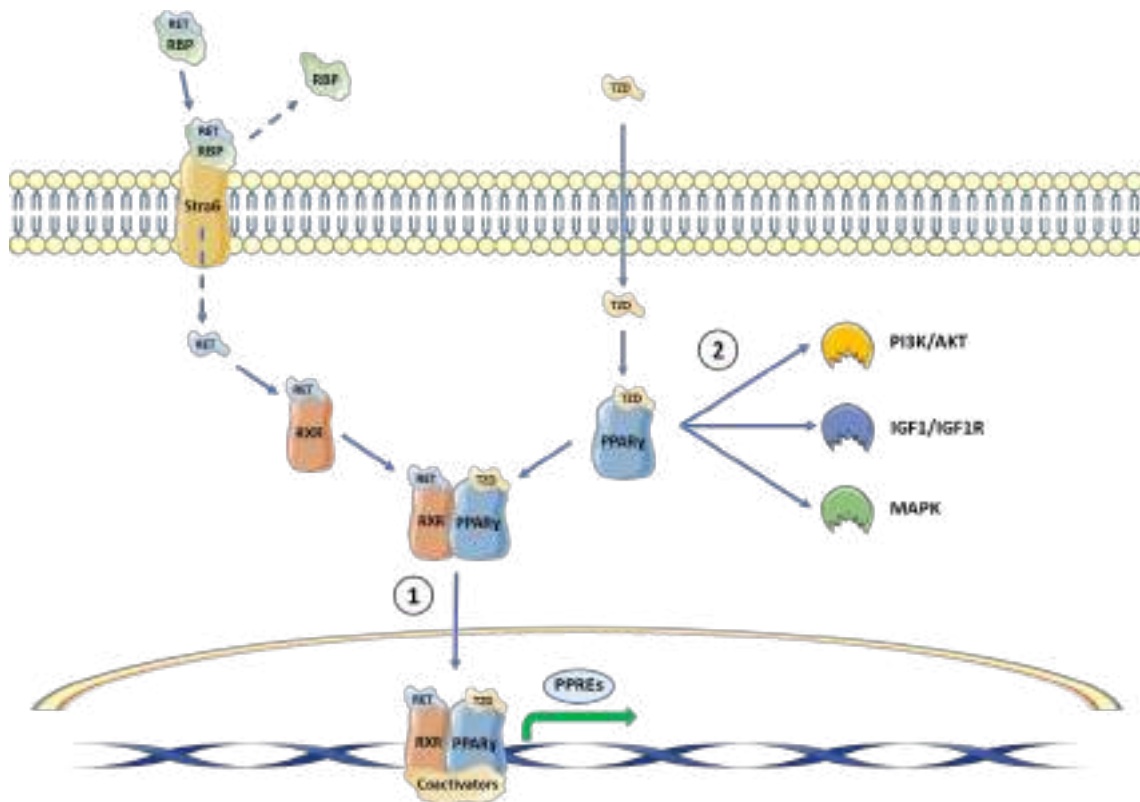
Por último, y puesto que la función del tejido adiposo está estrechamente regulada por diferentes condiciones externas como la exposición al frío, encontramos otros factores importantes en las etapas finales de la diferenciación. Es el caso del coactivador del receptor gamma 1-alfa activado por el proliferador de peroxisomas (PGC1 $\alpha$ ). PGC1 $\alpha$  actúa como un sensor ante diferentes estímulos externos. Así, en primera instancia se describió como un sensor ante la exposición al frío, activando el mecanismo termogénico en los adipocitos mediante la estimulación de la biogénesis mitocondrial (56). Sin embargo, actualmente se sabe que PGC1 $\alpha$  no solo es capaz de estimular la biogénesis mitocondrial, sino que además regula procesos metabólicos del adipocito pardo tanto catabólicos, como la oxidación de ácidos grasos para favorecer la termogénesis, como anabólicos favoreciendo la lipogénesis, la captación de glucosa y la gluconeogénesis (60).

## 2.4 Adipogénesis del tejido adiposo beige

En las últimas décadas se ha consolidado un concepto inicialmente denominado “pardeamiento” del tejido adiposo blanco, y que fue descrito por primera vez por Young y cols. en 1984 (61). Este proceso está desencadenado por la expresión y activación de diferentes factores de transcripción específicos de tejido adiposo pardo en los propios adipocitos blancos. El incremento en la expresión de estos factores provoca la aparición de adipocitos multiloculares con morfología muy similar a la de los adipocitos pardos, en localizaciones anatómicas clásicas de grasa blanca (62). Numerosos datos corroboran que el origen de estos adipocitos es diferente al de los adipocitos pardos propiamente dichos, ya que por su linaje son similares a un adipocito blanco. Además, varios estudios han determinado que esta adquisición del fenotipo pardo ocurre mediante un mecanismo de transdiferenciación a partir de adipocitos blancos. No obstante, esta afirmación es controvertida puesto que otros grupos aseguran que se trata de una diferenciación *de novo* desde el precursor mesenquimal (63,64). Parece ser que ambos mecanismos podrían ser complementarios, controlando en los dos casos el contenido de tejido adiposo beige. Sin embargo, los estímulos ambientales a los que responden

son distintos. En relación con la diferenciación *de novo* a partir de los precursores mesenquimales, en el año 2015 Lee y cols. describieron este proceso en el tejido adiposo de la ingle y del epidídimo de ratones. Este grupo identificó un papel dual de los precursores mesenquimales residentes en el tejido adiposo blanco, que bajo los estímulos apropiados presentaban capacidad para diferenciarse hacia adipocitos blancos o adipocitos pardos. Estos autores observaron que una parte de las células proliferativas residentes en el tejido adiposo presentaba marcadores característicos de células mesenquimales como el receptor alfa del factor de crecimiento derivado de plaquetas (*Pdgfra*), el antígeno 1 de células madre (*Sc $\alpha$ -1*), o el clúster de diferenciación 34 (*Cd34*). En estas células la estimulación de la respuesta  $\beta$ 3-adrenérgica provocaba aumentos en la expresión de marcadores característicos del tejido adiposo pardo (*Ppar $\gamma$* , *Pgc1 $\alpha$* , *Ucp1*). Además, morfológicamente estas células sufrían un cambio, pasando de presentar una morfología característica del fenotipo mesenquimal, a presentar una morfología multilocular con diferentes acúmulos lipídicos, característica de adipocitos pardos diferenciados. En cambio, en ausencia de estimulación  $\beta$ -adrenérgica, y bajo la estimulación con insulina, estas células adquirirían una morfología unilocular característica de adipocitos blancos, acompañada de aumentos en la expresión de genes característicos de este tipo celular como la lipoproteína lipasa (*Lpl*), o la perilipina 1 (*Plin1*) (65). Por otro lado, hay datos publicados que muestran la posibilidad de que haya fenómenos de transdiferenciación. Así, tanto en muestras de roedores, como en biopsias de pacientes con feocromocitoma, un tumor originado en las glándulas suprarrenales se ha observado como tras la estimulación adrenérgica mediada por catecolaminas, el número de adipocitos multiloculares en el tejido adiposo blanco aumenta. Además, se observó mediante microscopía electrónica de transmisión que estos adipocitos blancos presentaban una mayor densidad mitocondrial y mostraban aumentos en la producción de marcadores del tejido adiposo pardo como UCP1, PRDM16 o el receptor adrenérgico  $\beta$ 3, lo que sugiere un mecanismo directo de diferenciación del adipocito blanco (64). Lo que parece claro es que ambos tipos de tejido adiposo, pardo o beige producen factores tales como PRDM16, PPAR $\gamma$ , o BMP7 que actúan incrementando el gasto energético, la biogénesis mitocondrial, la sensibilidad a la insulina y la movilización lipídica en estos adipocitos (66).

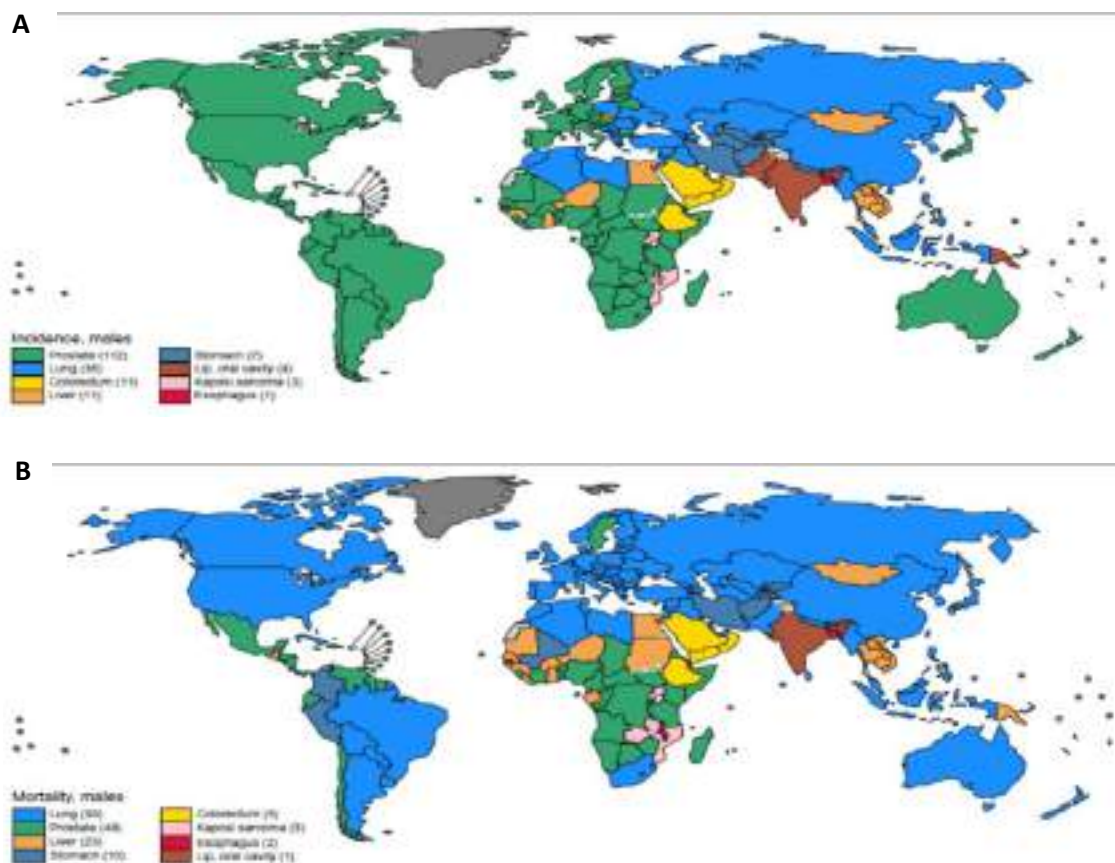
El denominado “pardeamiento” ocurre principalmente debido a la acción de activadores no farmacológicos externos tales como la exposición a bajas temperaturas, el ejercicio físico o la dieta. No obstante, existen también activadores farmacológicos tales como las tiazolidinedionas (rosiglitazona, pioglitazona, etc.), moléculas agonistas del PPAR $\gamma$  y que se utilizan como antidiabéticos (67,68). Por su naturaleza lipofílica, las tiazolidinedionas atraviesan la membrana plasmática y una vez en el citoplasma se unen a PPAR $\gamma$ . Dicha unión con este factor de transcripción desencadena dos mecanismos de señalización celular diferentes, uno basado en acciones genómicas, y otro en acciones no genómicas. Las acciones genómicas del PPAR $\gamma$  están mediadas por la formación de un heterodímero entre este y el receptor X retinoide (RXR). Cuando las tiazolidinedionas interaccionan con PPAR $\gamma$  provocan un cambio conformacional de la proteína que deja accesible un sitio de unión al RXR. Este heterodímero se transloca al núcleo donde modifica la expresión de los elementos de respuesta a PPAR $\gamma$ . Estos genes están involucrados principalmente en la regulación del metabolismo lipídico, balance energético y sensibilidad a insulina. Por otro lado, en cuanto a las acciones no genómicas, la unión de las tiazolidinedionas con el PPAR $\gamma$  desencadena la actividad de este como segundo mensajero sobre otras rutas de señalización intracelular involucradas en diferentes procesos de la diferenciación adipogénica, como puede ser la adquisición de sensibilidad a insulina, regulando el eje formado por el factor de crecimiento semejante a la insulina tipo I (IGF1) y el receptor de IGF1 (IGF1R) , o relacionadas con el metabolismo de la glucosa y los lípidos como las vías de PI3K/AKT/mTOR o la vía de las quinasas activadas por mitógeno (MAPK) (69,70) [Fig.4].



**Figura 4. Mecanismos de acción de las tiazolidinedionas (TZD).** (1) Acciones genómicas mediadas por la actividad transcripcional del heterodímero formado entre PPARγ y RXR. (2) Acciones no genómicas mediadas por la actividad como segundo mensajero del PPARγ en diferentes vías de señalización intracelulares.

### 3. EI CÁNCER DE PRÓSTATA

Fue en el año 1853 cuando J. Adams registró el primer caso de cáncer de próstata, considerándose inicialmente como una enfermedad rara debido a su agresividad y mala detección en pacientes. Actualmente, de los más de 200 tumores diferentes conocidos, el cáncer de próstata es uno de los que presenta mayor incidencia. Según los datos publicados periódicamente por GLOBOCAN (“Global Cancer Observatory”), en el año 2020, el cáncer de próstata se ha manifestado como el tercero en número de casos a nivel global, solo por detrás del de mama y pulmón. Sin embargo, en hombres es el tumor con mayor incidencia, y el segundo en mortalidad solo por detrás del cáncer de pulmón [Fig.5]. En Europa es el tumor más diagnosticado en hombres, con una incidencia acumulada de 80.5 individuos por cada 100.000 habitantes y una mortalidad que alcanza los 11.4 individuos por cada 100.000 habitantes (71).



**Figura 5. Distribución por países de incidencia y mortalidad en hombres de diferentes tumores en 2020. (A) Datos de incidencia por cada 100.000 habitantes. En color verde se representan los países con una mayor incidencia para el cáncer de próstata (B) Datos de mortalidad por cada 100.000 habitantes. En verde se representan los países con una mayor mortalidad por cáncer de próstata. Datos obtenidos de GLOBOCAN 2020 (71)**



Sin embargo, a pesar de su alta incidencia, muchos cánceres de próstata crecen lentamente y permanecen limitados a la glándula prostática, mientras que otros se vuelven pronto insensibles a los tratamientos, tanto hormonales como de quimioterapia, y evolucionan con el tiempo hacia un fenotipo altamente invasivo y metastásico.

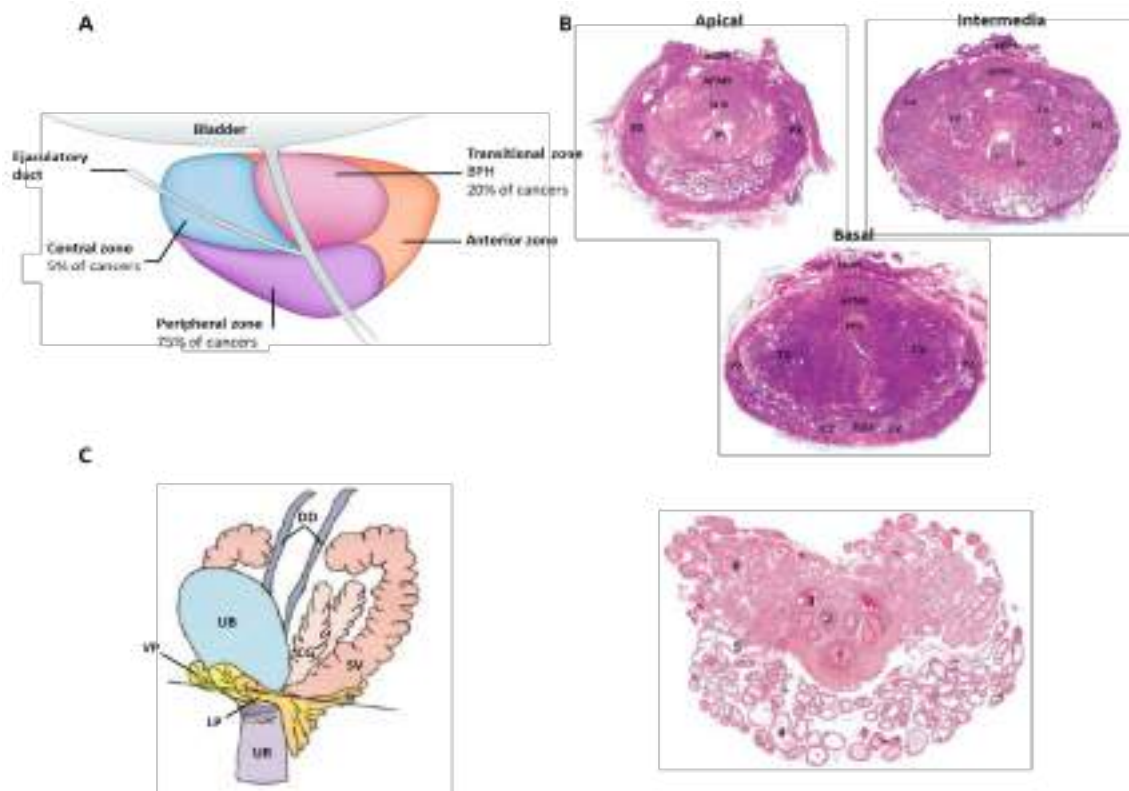
### 3.1 Características morfológicas de la próstata normal y tumoral

La próstata es una glándula exocrina presente en el aparato reproductor masculino de los mamíferos. Está compuesta por un epitelio pseudoestratificado cilíndrico con células basales y células lumbinales con capacidad secretora. La función principal de esta glándula es la producción de líquido prostático, uno de los componentes principales del semen. El fluido prostático tiene carácter alcalino y su función principal es aumentar la supervivencia de los espermatozoides en el medio ácido de la vagina (72). Tanto en el humano como en el ratón, la próstata se encuentra rodeando a la uretra, y aunque entre las diferentes especies de mamíferos esta glándula estructuralmente es diferente en el humano podemos distinguir cuatro zonas claramente diferenciadas [Fig.6] (73–75).

- **Zona central.** Se encuentra rodeando a los conductos eyaculadores y es muy poco frecuente encontrar tumores que se desarrollan en esta región.
- **Zona anterior.** Esta región se compone principalmente de una capa fibromuscular.
- **Zona de transición.** Se encuentra rodeando a la uretra proximal y presenta un crecimiento continuo, siendo el lugar más frecuente donde detectar la hiperplasia benigna de próstata.
- **Zona periférica.** Se encuentra rodeando a la uretra distal y es la zona más frecuente donde se encuentran las lesiones de adenocarcinoma prostático.

A nivel anatómico, la próstata humana y murina difieren estructuralmente. Mientras que la próstata humana se presenta como una glándula de estructura compacta, la próstata murina está dividida en 4 lóbulos diferentes (anterior, dorsal, lateral y ventral). A pesar de estas diferencias anatómicas entre las glándulas de ambas especies, a nivel histológico podemos encontrar ciertas similitudes. A este nivel, la próstata murina

presenta una zona fibro-muscular menos desarrollada en la próstata anterior, y es la próstata ventral la más similar a la zona periférica humana, y donde con más frecuencia se desarrollan los tumores [Fig.6] (76).



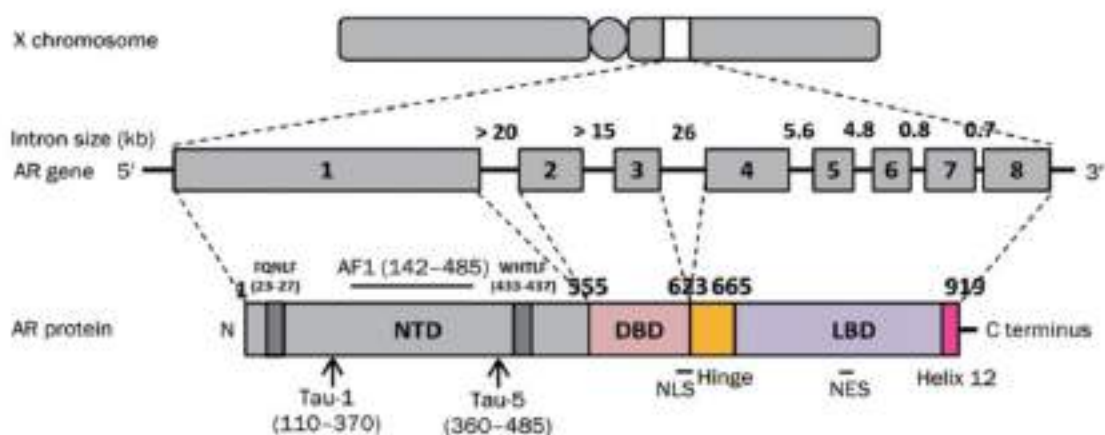
**Figura 6. Anatomía de la próstata humana y murina.** (A) Representación esquemática de la próstata humana separada por regiones. (B) Histología de la próstata humana dividida por sectores (apical, intermedia y basal) con sus correspondientes partes. P=Uretra; PZ= Zona periférica; SCS= Esfínter semicircular; AFMS= Estroma fibromuscular; AEPS= Espacio extraprostático anterior; CA= Nódulo canceroso; TZ= Zona de transición; V= Verumontanum o colículo seminal; D= Ducto elongado; CZ= Zona central; EJD= Conducto eyaculatorio; PPS= Esfínter periprostático. (C) Representación esquemática e histológica de la próstata murina. CG=Glándulas coagulantes o próstata anterior; DD=Conductos deferentes (3); DP=Próstata dorsal (6); LP=Próstata lateral (5); SV=Vesículas seminales; VP=Próstata ventral (5); UB=vejiga urinaria; UR=Uretra (1); Glándulas ampulares (2). Imágenes obtenidas de Shappell SB. Y cols. I (2004) y Fine S. y cols. (2012) (74,75).

En los varones la próstata normal tiene usualmente el tamaño de una nuez, aumentando su tamaño con la edad. La próstata de individuos adultos puede sufrir un aumento de tamaño localizado, denominado 'hiperplasia benigna de próstata' (HBP) que está presente en el 50 % de los varones mayores de 60 años (77). Este fenómeno hiperplásico es un factor de riesgo en el cáncer de próstata. También podemos encontrar pequeñas lesiones localizadas en el epitelio prostático denominadas neoplasia intraepitelial prostática (PIN), que acabarán desarrollando un adenocarcinoma en el 99 % de los casos, siendo el 1 % restante tumores de tipo neuroendocrino. Los tumores metastásicos no son frecuentes, representando un 15 %

del total, pero cuando existen estas metástasis son en su mayoría óseas (78). En ratones, aunque es poco frecuente que desarrollen cáncer de próstata de forma natural, los tumores son en su mayoría adenocarcinomas, mientras que las metástasis son de tipo neuroendocrino y se establecen principalmente en órganos viscerales, no siendo frecuente encontrar metástasis óseas (79).

### 3.2 Señalización hormonal: el receptor de andrógenos

El receptor de andrógenos es una proteína codificada por el gen *AR* que en humanos se localiza en brazo largo del cromosoma X (Xq12) (80). La proteína presenta 3 dominios funcionales, un dominio amino terminal (residuos 1-555), seguido por un dominio de unión al ADN (residuos 555-623) y un dominio carboxilo terminal de unión a andrógenos (residuos 665-919), lo que conforma una proteína de 110 KDa [Fig.7] (81). Además, es un miembro de la familia de los receptores nucleares de hormonas esteroideas que incluye otros como del receptor de glucocorticoides, progesterona o de mineralocorticoides (82).

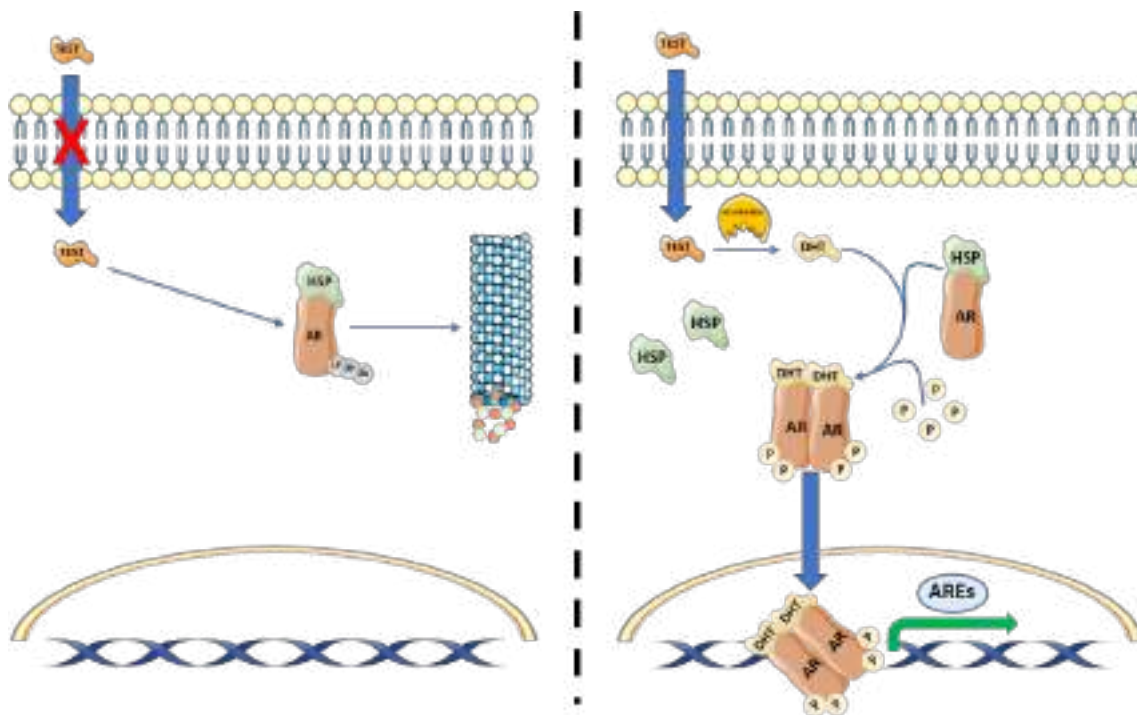


**Figura 7. Localización cromosómica y estructura proteica del receptor de andrógenos.** Imagen modificada de Tan y cols. (2014) (81).

La actividad del receptor de andrógenos está regulada por los andrógenos circulantes que son producidos principalmente por las células de Leydig del testículo, las cuales están bajo un estricto control hipotalámico, siendo la testosterona el andrógeno más importante en la activación del receptor (83). Esta es una hormona altamente conservada en la evolución, pues se ha encontrado tanto en vertebrados como en invertebrados (84). En los mamíferos es la principal hormona sexual masculina (85).

Funcionalmente, la testosterona cumple un papel clave en el desarrollo de los testículos y la próstata. Además, interviene en procesos como el crecimiento óseo o el aumento de la masa muscular (86,87).

En ausencia de andrógenos, el receptor se encuentra principalmente en el citoplasma, secuestrado por la proteína de choque térmico 90 (HSP90), lo que finalmente conduce a su etiquetado por ubiquitinación y dirigido a degradación por el proteasoma. Sin embargo, cuando la testosterona es internalizada en las células diana por transportadores de membrana, es metabolizada a su forma activa, la dihidrotestosterona (DHT) por la acción del enzima 5 $\alpha$ -reductasa. La DHT se une al dominio de unión al ligando del receptor de andrógenos y este es fosforilado, permitiendo así la liberación de la HSP90 y favoreciendo la formación de un dímero. Este complejo se translocará al núcleo donde se unirá a los elementos de respuesta a andrógenos (AREs) del genoma regulando la expresión génica [Fig.8] (88).



**Figura 8. Ruta canónica de señalización del receptor de andrógenos.** Izquierda: Representación esquemática del mecanismo de degradación de AR en ausencia de señalización androgénica. Derecha: Mecanismo de activación transcripcional de genes dependientes de andrógenos en presencia de testosterona.

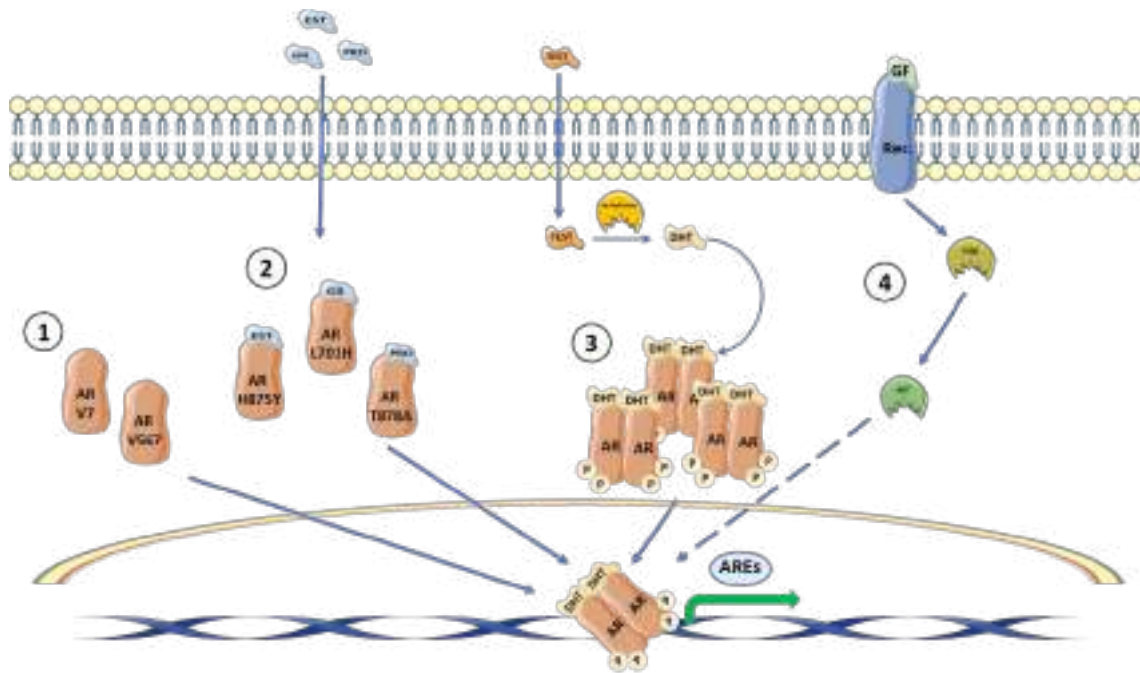
En las células tumorales de la próstata, el receptor de andrógenos modula la actividad transcripcional de genes involucrados en la evasión de la apoptosis y en la inducción de la proliferación. Además, durante las primeras etapas, el cáncer de

próstata es sensible al control androgénico, lo que se conoce como cáncer de próstata sensible a la castración (CSPC), siendo en esta etapa susceptibles del tratamiento con terapia antiandrogénica. Sin embargo, en estadios avanzados, estos tumores adquieren resistencias asociadas principalmente con alteraciones genéticas en el receptor de andrógenos, o con alteraciones en la ruta esteroideogénica, que favorecen la transactivación del receptor independientemente de la presencia de ligando, conociéndose a estos tumores como cáncer de próstata hormono-refractario o resistentes a la castración (CRPC). Las principales alteraciones genéticas del receptor de andrógenos responsables del fenotipo hormono-refractario son (i) variantes de 'splicing' alternativo, (ii) mutaciones puntuales, o (iii) sobreexpresión del receptor (89) [Fig.9].

Las variantes de 'splicing' del receptor de andrógenos dan lugar a formas truncadas del receptor (AR-V), que normalmente mantienen intacto tanto el dominio amino terminal como el dominio de unión al ADN. Sin embargo, estos suelen presentar alteraciones o pérdidas en el dominio de unión al ligando. Así, en el CRPC, la variante V7 (AR-V7) es la encontrada más frecuentemente en los tumores metastásicos, llegando a estar presente en un 75 % de los casos, y siendo muy poco frecuente en tumores en estadios iniciales (<1 %) (90). Además, se ha encontrado mediante el empleo de modelos xenoinjertos murinos de tumores humanos una variante de 'splicing' diferente, AR-V567, que en células tumorales circulantes parece ser más frecuente que la AR-V7, y que se origina cuando se somete al individuo a periodos largos de terapia hormonal (91).

Las mutaciones puntuales ocurren principalmente en el dominio de unión al ligando, lo que resulta en una menor especificidad al ligando, o bien en la transactivación del receptor por otras vías independientes de andrógenos. En cáncer de próstata estas mutaciones son más frecuentes en los tumores metastásicos, siendo las más prevalentes las mutaciones H875Y, T878A, T877A, L701H y L702H. Las mutaciones H875Y y T878A que corresponden con la sustitución de una histidina por una tirosina en la posición 875, y la sustitución de una treonina por una alanina en la posición 878, son dos mutaciones puntuales que resultan en una activación del receptor de andrógenos por estrógenos y progesterona, mientras que el resto de las mutaciones puntuales mencionadas provocan una activación del receptor mediada por glucocorticoides (92). Por último, la sobreexpresión del AR se ha detectado en el 80 % de los CRPC, estando relacionado este

aumento con incrementos en los niveles de expresión de ARN mensajero (ARNm) y de producción de proteína (93).



**Figura 9. Mecanismos de activación alternativos del receptor de andrógenos.** (1) Activación del RA por variantes de splicing alternativo. (2) Activación del RA por mutaciones puntuales, permite la activación por otras moléculas esteroideas. (3) Activación de RA por sobreexpresión del receptor. (4) Activación por otras rutas metabólicas que implican factores de crecimiento.

### 3.3 Cribado y tratamiento del cáncer de próstata

#### *Cribado*

El cribado es la primera línea en el diagnóstico del cáncer de próstata localizado en pacientes asintomáticos. El papel del cribado consiste en mejorar la prognosis de la enfermedad, permitiendo en algunos pacientes con tumores localizados incipientes aplicar terapias con carácter curativo. Uno de los métodos de cribado más común del cáncer de próstata es el análisis de los niveles séricos del antígeno específico de próstata (PSA).

El PSA es un enzima con actividad serin-proteasa perteneciente a la familia proteica de las calicreinas (KLKs). Esta proteasa en humanos está codificada por el gen *KLK3*, que se expresa y se produce casi exclusivamente en las células epiteliales secretoras de la próstata (94). En ratón encontramos genes que codifican para las KLKs, siendo la mayoría de ellos ortólogos de los genes humanos. Sin embargo, ni el gen *KLK2* ni el *KLK3*, correspondiente con el PSA, tienen su correspondiente ortólogo en el genoma

de ratón, por lo que los ratones no expresan ni producen PSA. El resto de los miembros de la familia de las KLKs presentan actividad enzimática como proteasas de serina (95), cuya función principal consiste en romper las proteínas de alto peso molecular presentes en el líquido seminal (96). En condiciones fisiológicas, existen pequeñas cantidades de PSA que son secretadas por la próstata y liberadas a circulación, lo que hace que esta proteasa pueda ser detectada mediante por ensayos bioquímicos. Sin embargo, los niveles de PSA aumentan generalmente en circulación debido a la presencia de un tumor, debido principalmente al aumento del número en células secretoras. Sin embargo, esta enzima también puede verse alterada por distintos factores como la edad o el tamaño de la próstata, no estando asociada siempre con un crecimiento tumoral, sino también con la presencia de HBP (97). Como segunda estrategia de cribado, y acompañando a los niveles séricos de PSA, es frecuente que se realice una exploración mediante tacto rectal en individuos mayores de 50 años (98). En caso de sospecha de la posible presencia de un tumor, estos análisis pueden ir acompañados de pruebas de imagen complementarias tales como tomografía axial computarizada (TAC), ecografía por ultrasonidos, o la tomografía por emisión de positrones (PET) para la detección de metástasis (99,100).

### *Tratamiento*

El tratamiento del cáncer de próstata varía mucho en función del tipo de tumor y del estadiaje de este. Así, una vez se ha detectado la presencia de un tumor prostático, se realiza una estadificación del tumor con el fin de determinar en qué etapa se encuentra (localizado o diseminado). A nivel clínico se emplean dos formas diferentes de estadiaje. Por un lado, encontramos la clasificación en cuanto al grado 'Gleason'. Esta es la forma de estadificación más común en el cáncer de próstata y se basa en la observación de las células tumorales al microscopio, asignado a las regiones de la próstata un valor en función de sus similitudes con una célula sana. Así, aquellas regiones más diferenciadas recibirán un valor más bajo, mientras que las regiones más indiferenciadas recibirán un valor más alto. Para determinar el grado del tumor se realiza una suma de los valores individuales de los patrones más frecuentemente encontrados, obteniendo como resultado 5 grupos diferentes donde el grupo 1 corresponde a pacientes de bajo riesgo, el 2 y 3 de riesgo intermedio y el 4 y 5 de riesgo alto (101). El

otro sistema utilizado en clínica, aunque menos usado en el caso de la próstata, es la estadificación TNM (tumor, nódulos, metástasis) que identifica a su vez el grado de diseminación del tumor (102).

Como primera línea es frecuente encontrar que, en aquellos pacientes con un riesgo bajo o muy bajo, no se suele aplicar terapia, sino que se realiza una observación activa basada en análisis de los niveles séricos de PSA cada 6 meses y tactos rectales y pruebas de imagen cada 1 o 3 años [Fig.10]. Esto es debido a que como ya se ha mencionado anteriormente algunos tumores de próstata son de crecimiento muy lento, y si tienen un buen pronóstico, no causando síntomas al paciente, siendo la vigilancia activa la aproximación elegida por urólogos y oncólogos. Aplicar terapias curativas como la prostatectomía radical o la radioterapia puede causar efectos secundarios perjudiciales para el paciente como disfunción eréctil o incontinencia urinaria, comprometiendo su calidad de vida (103).

En el caso de los individuos con un riesgo medio-alto, si el tumor está localizado o localmente avanzado se aplica terapia curativa. Sin embargo, aquellos individuos que por su condición no son susceptibles de recibir terapia curativa, son tratados con terapias sistémicas basadas en la terapia hormonal, inmunoterapia o quimioterapia [Fig.10]. En estos individuos, la terapia hormonal suele ser la principal estrategia elegida. Esta terapia está basada en la utilización de fármacos inhibidores de la señalización del receptor de andrógenos (ARSI), que incluyen antagonistas del receptor de andrógenos, o inhibidores de la síntesis de andrógenos de los que se hablará más adelante (89).

Cuando el cáncer progresa y adquiere un fenotipo metastásico y resistente a la castración, se abren dos líneas de tratamiento consecutivas con el fin de ralentizar la progresión y aumentar la supervivencia. En la primera línea de tratamiento se puede aplicar terapia hormonal, combinada con tratamientos más agresivos como la quimioterapia basada principalmente en el uso de docetaxel (104). Este quimioterápico es un taxano semisintético cuya actividad principal se debe a la estabilización de los microtúbulos bloqueando su despolimerización y evitando así la división celular (105).



En esta primera línea es frecuente también el uso de inhibidores de la poli ADP ribosa polimerasa (PARP), como olaparib, que bloquean los sistemas de reparación del ADN, otros como iptasertib, bloqueando la vía de PI3K/AKT, o pembrolizumab que actúa como un inhibidor de la ruta de BRAF/MAPK (106–108). Tras el tratamiento, con el tiempo suelen aparecer resistencias, por lo que la última opción es un tratamiento de segunda línea donde se puede combinar de nuevo la terapia hormonal con otros quimioterápicos como el cabazitaxel o carboplatino, un quimioterápico que actúa bloqueando la síntesis de ADN. En el caso de la inmunoterapia, la administración tanto de olaparib u otros inhibidores está indicada si no se presentan resistencias [Fig.10] (105).



Figura 10. Protocolo para la detección y tratamiento del cáncer de próstata prestando especial atención a las posibles terapias aplicables en cada etapa.

El uso de antagonistas del receptor de andrógenos no es nuevo en el tratamiento del cáncer de próstata. Estas terapias llevan utilizándose en clínica desde la década de los 80, cuando apareció la primera generación de fármacos antagonistas como la bicalutamida, flutamida o nilutamida [Fig.11] (109). Estos fármacos, aunque tienen un efecto positivo reduciendo en muchos casos la progresión tumoral, en algunos casos pueden convertirse en agonistas y mantener la señalización activa del receptor. Por ello se desarrolló una segunda generación de fármacos utilizados actualmente en la clínica con características funcionales similares pero que no presentan esa capacidad agonista, como es el caso de la apalutamida, enzalutamida, o darolutamida [Fig.11] (110) Sin embargo, una de las desventajas que presentan estos tratamientos es que no son eficaces cuando están presentes variantes del receptor de andrógenos como la AR-V7, además pueden provocar efectos secundarios a nivel del sistema nervioso central, siendo la darolutamida la que menos efectos secundarios de este tipo presenta al no ser

tan permeable a la barrera hematoencefálica (111,112). El tratamiento con estos fármacos está aprobado para aquellos tumores de próstata no metastásicos resistentes a la castración (nmCRPC) y para los tumores metastásicos sensibles a la castración (mCSPC) (89).

El uso de inhibidores de la síntesis de andrógenos es más novedoso ya que su uso fue aprobado en clínica en el 2011, siendo el acetato de abiraterona el fármaco de referencia en este sentido [Fig.11]. Este fármaco es un inhibidor irreversible de las dos primeras enzimas implicadas en la síntesis de andrógenos codificadas por el gen del citocromo P450 17A1 (*CYP17*) (113). Su bloqueo provoca una caída drástica de la síntesis de andrógenos en el testículo, glándulas adrenales y en las propias células tumorales. El tratamiento con abiraterona está recomendado tanto para los pacientes mCSPC como para los pacientes con fenotipo metastásico resistente a la castración (mCRPC), de forma aislada, puesto que aún no está aprobado su uso combinado junto con los antagonistas del receptor de andrógenos. Además, existen ensayos clínicos en fase III empleando la combinación entre ambos fármacos, aunque hasta la fecha no han mostrado mejoras en la supervivencia media de los individuos (89).



Figura 11. Escala temporal de la evolución en el tratamiento del cáncer de próstata, prestando especial atención al empleo de los fármacos inhibidores de la señalización androgénica. FDA=Administración de alimentos y medicamentos, CaP=Cáncer de próstata.

#### 4. SEÑALIZACIÓN DEL TEJIDO ADIPOSO Y EL MICROAMBIENTE TUMORAL

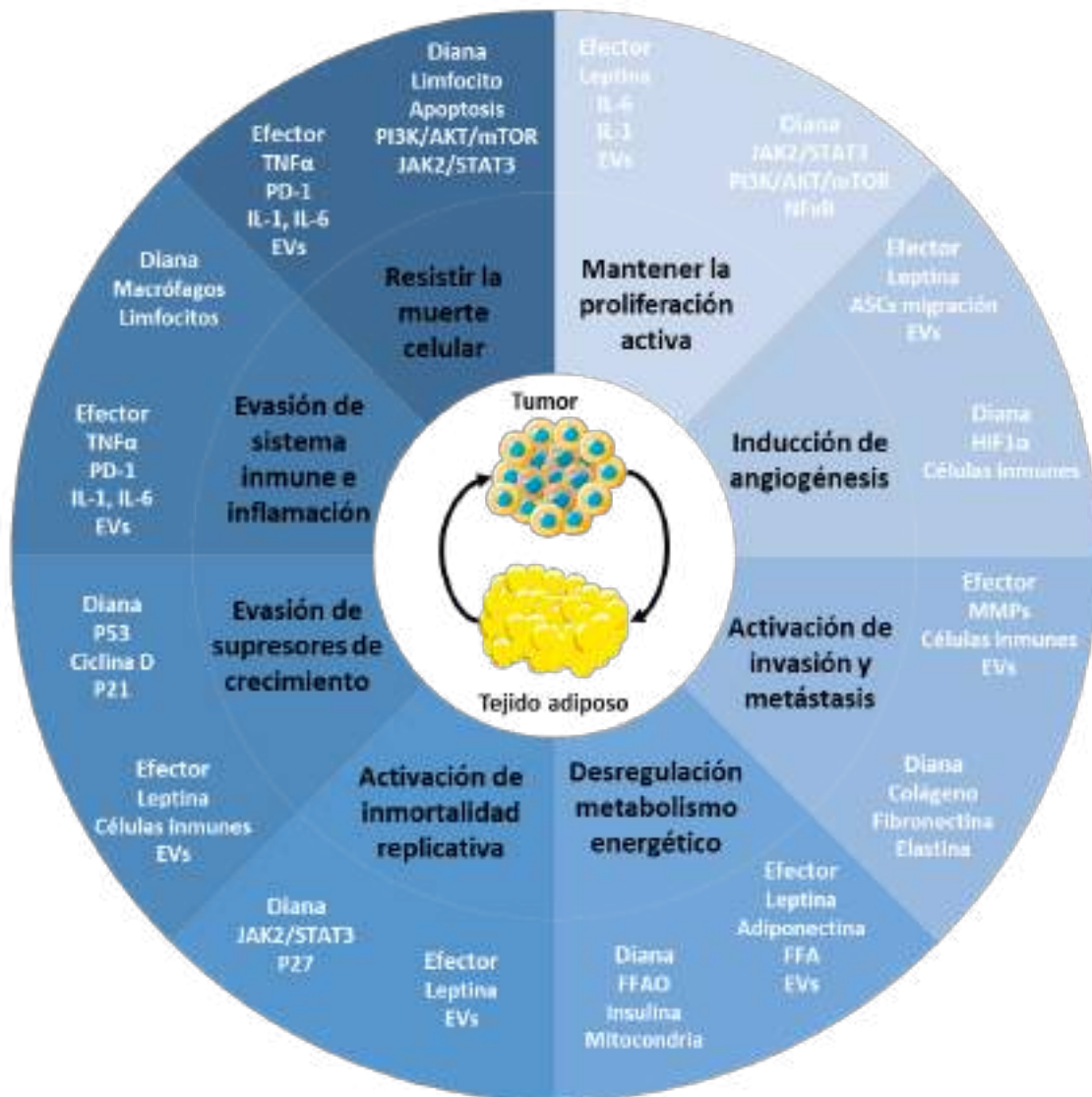
En la última década el microambiente tumoral ha sido objeto de una intensa investigación, ya que tanto las alteraciones como las interacciones que se producen entre los componentes del microambiente y las células tumorales resultan útiles para la generación de nuevas dianas terapéuticas en el tratamiento del cáncer. Por este motivo la alteración en la cantidad y/o actividad del tejido adiposo circundante al tumor es de especial importancia en dicho microambiente.

En este sentido, la obesidad se ha convertido en una patología pandémica y potencialmente problemática en los países industrializados (114). Está causada por un crecimiento excesivo del tejido adiposo generado por el desbalance energético a largo plazo fomentado por el aumento en la ingesta de calorías y la reducción del gasto energético (115). Actualmente la obesidad es considerada como uno de los factores de riesgo más importantes en cáncer y se correlaciona positivamente con el riesgo de padecer tumores de colon, páncreas, mama, hígado o próstata, entre otros (116). En el cáncer de próstata, numerosos metaanálisis muestran la relación entre la obesidad y parámetros como la progresión tumoral, la recidiva o la tasa de mortalidad. Otros metaanálisis han mostrado como la obesidad está relacionada con un aumento de los niveles de PSA tras el tratamiento del cáncer de próstata, afectando al 16-21 % de los individuos. En cuanto a la mortalidad, existe también una asociación directa que indica un mayor riesgo de mortalidad, oscilando entre el 9 y el 15 % en los individuos obesos. Por otro lado, estudios epidemiológicos muestran como la pérdida de peso, o la cirugía bariátrica, empleada para controlar la obesidad, disminuyen el riesgo de padecer cáncer (117).

Investigaciones previas han demostrado que los adipocitos son uno de los elementos celulares mayoritarios en el microambiente de múltiples tumores, conociéndose a estos como 'adipocitos asociados a cáncer' (CAAs). Estos CAAs a diferencia de los adipocitos presentes en el tejido sano muestran características particulares que permiten distinguirlos. Morfológicamente son de menor tamaño, con un menor contenido lipídico, una mayor cantidad de matriz extracelular entre ellos, y poseen un mayor número de mitocondrias. Además, presentan un fenotipo senescente secretor, caracterizado por la parada del ciclo celular, incrementos en la autofagia, y un

aumento en la liberación de moléculas bioactivas. A nivel metabólico estos adipocitos del tejido tumoral tienen desplazado su metabolismo hacia procesos catabólicos lo que provoca la liberación de moléculas con un alto poder energético como ATP, ácidos grasos libres, o glutamina. Los CAAs alteran el microambiente tumoral y favorecen, en última instancia, el desarrollo y progresión tumoral (118).

En el año 2000, Hanahan y Weinberg en su artículo *"The Hallmarks of Cancer"* describieron seis marcas distintivas comunes a todos los tumores y que caracterizan el proceso de iniciación y progresión tumoral, incluyendo; (i) mantenimiento de la señalización de la proliferación, (ii) evasión de la supresión del crecimiento, (iii) resistencia a la muerte celular, (iv) adquisición de inmortalidad replicativa, (v) inducción de angiogénesis, (vi) activación de los procesos de invasión y metástasis (119). En el año 2011, los autores revisaron y completaron su artículo, proponiendo la idea de que al contrario de lo que se pensaba, los tumores no son únicamente una masa de células proliferativas, sino complejos entramados de diferentes tipos celulares con capacidad para interactuar unas con otras, afectando esto a los diferentes sellos propuestos. Así, en esa revisión incluyeron cuatro nuevos sellos; (vii) desregulación del metabolismo celular, (viii) evasión del sistema inmune, (ix) inestabilidad genómica, (x) promoción de la inflamación (120). Este mismo año, Hanahan ha propuesto además cuatro nuevos sellos identificativos; (xi) activación de la plasticidad celular (xii) reprogramación epigenética, (xiii) microbiomas polimórficos y (xiv) la adquisición del fenotipo senescente. A este nivel, el papel clave de los CAAs del microentorno tumoral pone de manifiesto su importancia en la progresión tumoral y su participación en muchas de las marcas distintivas del cáncer [Fig.12] (121,122).



**Figura 12. Papel del tejido adiposo sobre los diferentes sellos identificativos del cáncer.** En el gráfico se muestran diferentes biomoléculas efectoras liberadas por los adipocitos asociados a cáncer y la diana sobre la que actúan en cada uno de los diferentes sellos. Imagen modificada de Moraes J. (2021) (122).

#### 4.1 Efecto inmunomodulador del tejido adiposo en el microambiente tumoral.

Asociados a los adipocitos del tejido adiposo se encuentran una gran cantidad de células estromales, conocidas como células estromales del tejido adiposo (ASCs). Estas ASCs incluyen fibroblastos, pericitos, células endoteliales o células inmunes. La obesidad está asociada a alteraciones del tejido adiposo entre las que destacan cambios en las poblaciones de ASCs, que en última instancia participan en procesos inflamatorios y son promotores tumorales (123).

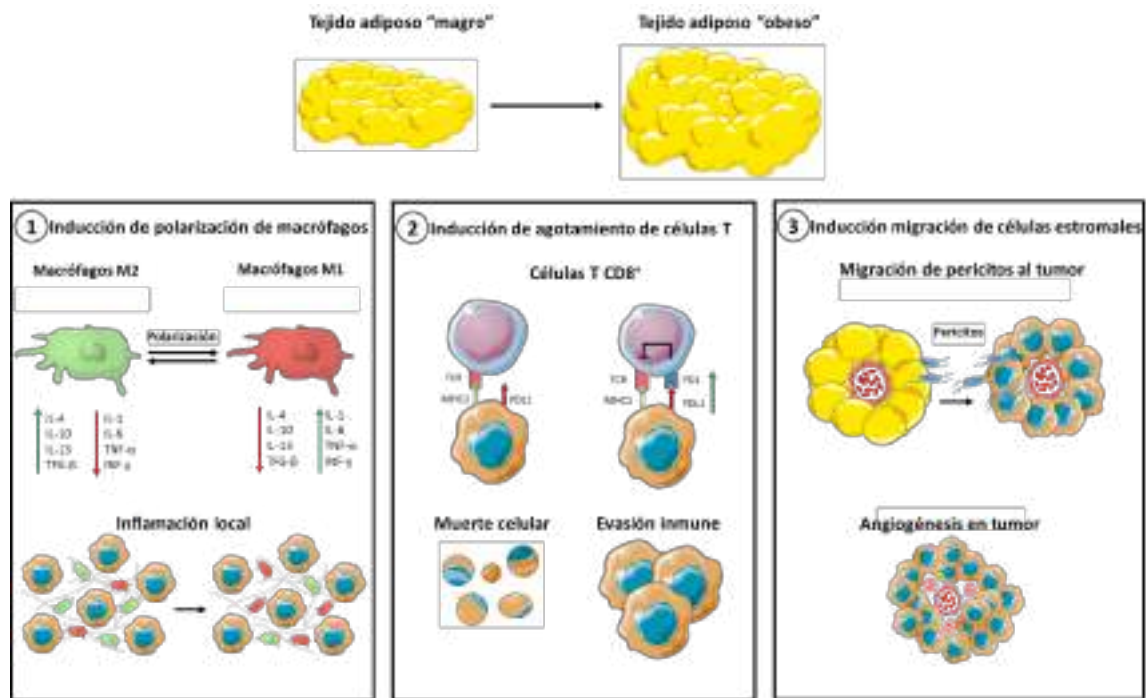
El tejido adiposo del microambiente tumoral contiene distintos tipos de células inflamatorias, siendo los macrófagos las células residentes más abundantes. La cantidad de macrófagos residentes se ha visto que está directamente relacionada con el aumento del tejido adiposo (124). Además, en el tejido adiposo inflamado se pueden observar unas estructuras características denominadas estructuras en forma de corona (“Crown-like structures”) compuestas principalmente por macrófagos que rodean a adipocitos muertos, o en proceso de muerte celular, siendo estas estructuras factor de mal pronóstico en tumores como el cáncer de mama (125). Los macrófagos se pueden clasificar a su vez en dos poblaciones diferentes, macrófagos activados por la vía clásica (M1), dependiente de lipopolisacárido e interferón  $\gamma$ , y macrófagos activados por la vía alternativa (M2) dependiente de la acción de citoquinas como IL-4 e IL-13 (126). Los macrófagos M1 tienen un perfil proinflamatorio mediado por la liberación de diferentes citoquinas como IL-1 $\beta$ , IL-6 o TNF $\alpha$  entre otras. Por el contrario, los macrófagos M2 tienen un perfil antiinflamatorio marcado principalmente por la liberación de IL-10 (127). En situaciones fisiológicas, con un tejido adiposo sano, los macrófagos residentes son principalmente del tipo M2. Sin embargo, en el tejido adiposo asociado al tumor, ocurre una polarización de estos macrófagos a su fenotipo M1, caracterizado por ser capaz de promover la reorganización de la matriz extracelular, y favorecer la angiogénesis [Fig.13] (128).

La infiltración linfocitaria en el microambiente tumoral es otra de las consecuencias de la alteración del tejido adiposo, teniendo éste un papel en la alteración de la actividad de los linfocitos. El tejido adiposo del microambiente tumoral participa en la evasión del sistema inmune por parte de los tumores, y en la promoción de la inflamación. Los linfocitos T CD8<sup>+</sup> son claves en la iniciación tumoral, ya que su capacidad efectora les permite reconocer y destruir directamente a las células tumorales (118). Sin embargo, durante la progresión se desarrollan mecanismos de evasión por parte de las células tumorales que lo impiden. Se ha observado así una relación entre la obesidad y la sobreexpresión de la proteína de muerte 1 (PD-1) en estos linfocitos, lo que bloquea la respuesta mediada por el receptor de linfocitos T (TCR) y los incapacita, impidiendo así que reconozcan a las células tumorales (129). Asociado a este mecanismo encontramos también un aumento de la cantidad de linfocitos T reguladores con la

obesidad, lo que se relaciona con una mayor inmunotolerancia, y la pérdida de la vigilancia inmunológica debido a la liberación por parte de estas células de citoquinas inmunosupresoras como IL-10, o el factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) [Fig.13] (118).

## 4.2 Migración de células del estroma y tumorigénesis

La comunicación entre el tejido adiposo y el tumor puede ser directa, sin necesidad de estar mediada por otras células del microambiente, sobre todo en los frentes invasivos de los tumores, donde tanto las células tumorales como los adipocitos del microambiente tumoral están en contacto directo (130). Se ha observado como los adipocitos más cercanos al tumor presentan tamaños más reducidos y un menor contenido lipídico que los adipocitos más alejados, debido principalmente a un cambio metabólico provocado por el tumor (131). Sin embargo, lo interesante de esta relación directa es la movilización de diferentes células estromales desde el tejido adiposo hacia el tumor, contribuyendo así con la progresión tumoral. A este nivel los adipocitos son capaces de liberar la proteína ácida rica en serinas (SPARC) que se une a los pericitos a través de las  $\beta$ 1-integrinas, lo que provoca la movilización de estos pericitos hacia el tumor donde favorecen la angiogénesis. El tumor también contribuye a esta movilización de células estromales del tejido adiposo mediante la liberación de moléculas quimioatrayentes, CXCL-1 y CXCL-8 entre otras, cuya función en cáncer de próstata consiste en favorecer el reclutamiento de células estromales del tejido adiposo [Fig.13] (130).



**Figura 13. El tejido adiposo como modulador de diferentes poblaciones celulares del microambiente tumoral.** El crecimiento excesivo del tejido adiposo durante la obesidad provoca cambios en la polarización de los macrófagos residentes en el microambiente, lo que da lugar a fenómenos de inflamación local (1). En las células inmunes efectoras (T CD8<sup>+</sup>) los adipocitos inducen aumentos en la expresión de la proteína de muerte 1 (PD1), impidiendo que estas reconozcan las células tumorales y favoreciendo así la evasión de la inmunidad por parte de las células tumorales (2). La comunicación de los adipocitos asociados a cáncer con otras células del microambiente tumoral como los pericitos favorece la migración de estas hacia el entorno del tumor, dando lugar a creación de nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis) que fomentan el crecimiento y progresión tumoral (3).

### 4.3 Comunicación en el microambiente tumoral: papel del 'secretoma'

Como ya se ha mencionado anteriormente, el tejido adiposo es uno de los mayores órganos endocrinos en el individuo. Tanto los propios adipocitos como las células del estroma contribuyen al mecanismo de señalización celular liberando al microambiente, o a circulación sanguínea, una gran cantidad de factores solubles con capacidad bioactiva, denominándose en su conjunto 'secretoma'. La mayoría de estos factores solubles son de carácter proteico tales como hormonas, factores de crecimiento, o moduladores de la inmunidad. Se ha descrito que los adipocitos asociados a cáncer son capaces de producir un círculo vicioso de comunicación intercelular con las células tumorales, que en última instancia favorece el fenotipo tumoral [Fig.14] (132).

Las interacciones entre los adipocitos asociados a cáncer y las células tumorales mediante adipocinas se realizan a través de los receptores de membrana presentes en las células tumorales. Dos de las adipocinas más importantes son la leptina y la



adiponectina. Ambas hormonas son sintetizadas y liberadas principalmente por el tejido adiposo, y cumplen funciones importantes en la regulación del metabolismo de la glucosa y la respuesta a insulina. Sin embargo, en tumores se ha observado que están implicadas en diversos mecanismos de señalización presentando funciones antagónicas (3). La leptina está directamente relacionada con un mayor riesgo de desarrollar tumores, ya que su liberación se incrementa con la alteración del tejido adiposo asociado, y en individuos obesos los niveles circulantes de leptina son elevados (133). Cuando interacciona con su receptor de membrana (OB-R) desencadena cascadas de señalización que afectan a tres de las principales rutas alteradas comúnmente en cáncer; (i) vía de RAS/RAF/MAPK, (ii) ruta de JAK2/STAT3, (iii) Vía de PI3K/AKT/mTOR. La activación de estas tres rutas de señalización en la célula tumoral da lugar a la activación de genes que intervienen en la proliferación y la supervivencia celular, así como en la inhibición de la apoptosis(134). Por el contrario, la adiponectina muestra la relación inversa, sus niveles circulantes en individuos obesos son mucho menores, y la síntesis y liberación por parte de los adipocitos disminuye (135). Además, en las células tumorales ejerce ciertos mecanismos antitumorales favoreciendo la apoptosis mediada por la actividad de las caspasas, o bloqueando la angiogénesis mediante la inhibición de factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) (136,137). Esta relación antagónica hace que estudiar la relación entre la cantidad de ambas hormonas en circulación se esté evaluando como un posible mecanismo de predicción frente al riesgo de padecer cáncer en los individuos obesos (124,125).

Otro de los principales componentes del 'secretoma' soluble del tejido adiposo son las proteínas inmunomoduladoras. Como ya habíamos mencionado, el tejido adiposo del microambiente tumoral está asociado en la mayoría de los casos con una inflamación local, por lo que en este tejido la liberación de citoquinas y quimiocinas está aumentada. Estas citoquinas y quimiocinas a su vez ejercen un papel sobre las poblaciones de células inmunes del microambiente tumoral como ya se mencionó anteriormente, pero también pueden actuar directamente sobre el tumor. Algunas citoquinas proinflamatorias como la IL-1 o la IL-6 son promotoras de la progresión en diferentes tumores. Aunque ambas actúan por mecanismos de señalización diferentes, la IL-1 mediante la unión con su receptor (IL-1R) provoca activación principalmente en

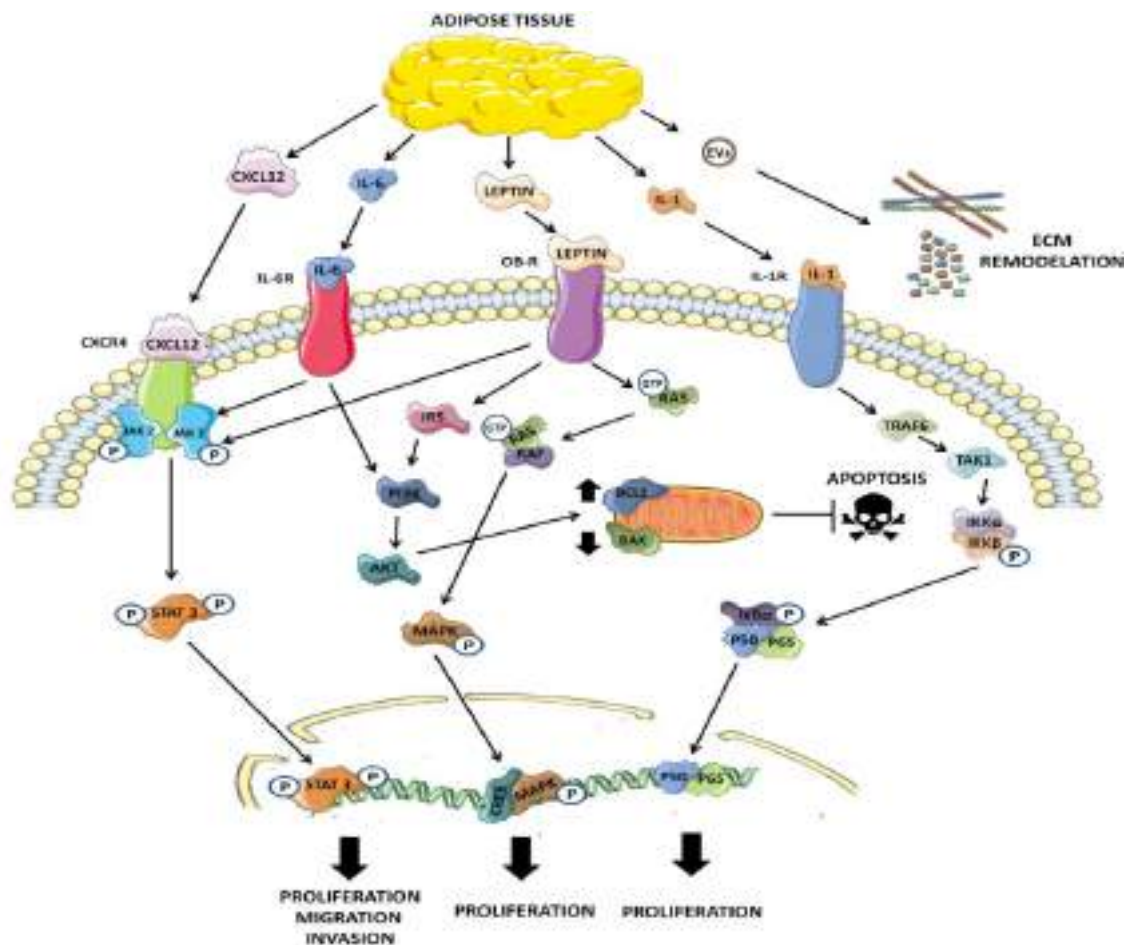
la vía de NFκB, la IL-6 lo hace a través de su receptor (IL-6R) activando las vías de JAK2/STAT3 y PI3K/AKT, ambas fomentan el crecimiento y supervivencia celular (140–142).

#### 4.4 Papel emergente de las vesículas extracelulares en la comunicación del microambiente tumoral

Clásicamente todos los estudios del ‘secretoma’ se han centrado en analizar los mecanismos de señalización celular basados en estos factores solubles. Sin embargo, actualmente están emergiendo los estudios de la comunicación celular basada en el empleo de vesículas extracelulares (EVs) como elementos cruciales en el desarrollo, progresión y metástasis de los tumores (143). Las EVs pueden subdividirse en dos clases en función de su tamaño y origen. En primer lugar, los exosomas, con un tamaño que oscila entre los 30 y los 150 nm, derivados de membranas lumbales de los cuerpos multivesiculares, los cuales mediante fusión con la membrana plasmática liberan estas pequeñas vesículas. En segundo lugar, las micro vesículas, con tamaños que oscilan entre los 150 y los 1000 nm, conforman una población heterogénea de vesículas que se forman mediante evaginación de la membrana plasmática. (17). El interés en el estudio de EVs recae en el cargo que pueden contener, variando mucho en función del tipo celular que las produzca. En el tejido adiposo, las EVs cargan en su mayoría adipoquinas -recientemente denominadas como “exoadipoquinas”, pequeños micro ARN o incluso fragmentos de orgánulos celulares. Además, este mecanismo de comunicación es una manera perfecta de mantener protegida la carga cuando esta es expuesta tanto a los enzimas del microambiente como de la sangre, puesto que está contenida dentro de una bicapa lipídica (144,145).

Actualmente se conocen los efectos que diferentes EVs derivadas de las células tumorales ejercen sobre células no tumorales del tejido adyacente, induciendo en ellas mecanismos de iniciación tumoral. También causan efectos sobre las propias células del microambiente, favoreciendo la remodelación de la matriz, el suministro de nutrientes, o la supresión de la inmunidad [Fig.14]. Investigaciones recientes han demostrado un papel clave de estas EVs en varios de los sellos distintivos del cáncer. Sin embargo,

debido a la escasez de datos en este sentido, la comunicación mediada por EVs entre las células del microambiente y las células tumorales no se conoce con claridad (143).



**Figura 14. Principales rutas que impulsan la influencia del tejido adiposo en la progresión tumoral.** El tejido adiposo puede liberar adipocinas que juegan un papel importante en las vías normalmente alteradas en el cáncer. El factor 1 derivado de células del estroma (CXCL12) a través de la interacción directa con el receptor de quimiocinas CXC tipo 4 (CXCR4) presente en la membrana de las células tumorales activa la cascada de señalización JAK2/STAT3, que finalmente tiene la función de translocación de STAT3 al núcleo donde actúa como un factor de transcripción para los genes implicados en la supervivencia celular, o la migración y la invasión, promoviendo así la EMT. La leptina, otra de las principales adipocinas del tejido adiposo, actúa por interacción con su receptor de membrana (OB-R). Este receptor está asociado a la proteína JAK2, que a su vez fosforila STAT3, desencadenando la activación de vías de supervivencia. Asimismo, su interacción con la proteína serina/treonina quinasa RAF y la GTPasa RAS inducen la activación de la vía MAPK, favoreciendo el crecimiento y la supervivencia celular. Esta hormona también es importante en la regulación de la apoptosis ya que vía PI3K/AKT puede modular los niveles de las proteínas BCL-2 y BAX, inhibiendo la apoptosis de las células tumorales y favoreciendo así tanto la proliferación como la resistencia a la quimioterapia. En un ambiente inflamatorio, es común que el tejido adiposo y las células inmunes de su microambiente liberen diferentes interleucinas como IL-6 o IL-1, que al unirse a sus receptores de membrana (IL-6R e IL-1R) son capaces de activar las vías de supervivencia mencionadas anteriormente. La IL-1 también puede promover la proliferación y la supervivencia al activar la señalización mediada por NFκB. Finalmente, el tejido adiposo puede contribuir indirectamente a la diseminación de las células tumorales a través de la remodelación de la matriz extracelular mediada la acción de vesículas extracelulares (EVs). Imagen obtenida de Alvarez-Artime y cols. (2021) (3)



# HIPÓTESIS Y OBJETIVOS



Tal y como se ha descrito en los antecedentes de esta tesis, hay un tipo de cáncer de próstata indolente que no tiene manifestaciones clínicas severas y permanece circunscrito a la glándula. Sin embargo, con el tiempo algunos tumores de próstata se hacen agresivos, no responden al control hormonal y migran e invaden tejidos distantes. Las razones moleculares y celulares que discriminan ambos tipos de tumor son todavía desconocidas. En la bibliografía está ampliamente descrito el efecto de las hormonas sexuales masculinas como la testosterona sobre la biología del tejido adiposo y el papel de este tejido como uno de los principales factores de riesgo en múltiples enfermedades entre las que se incluye el cáncer de próstata. No se conocen, sin embargo, la relación entre los andrógenos y el contenido de grasa blanca en el entorno tumoral de próstata, ni la relevancia que la falta de andrógenos, derivada de los tratamientos hormonales puede tener en el contexto del microambiente tumoral. Por ello el objetivo principal de esta tesis doctoral es **estudiar el papel de la eliminación sistémica de andrógenos en el contenido y la funcionalidad del tejido adiposo en el microambiente de la próstata tumoral y su papel en la alteración de los mecanismos progresión tumoral**. Para desarrollar este objetivo principal lo hemos dividido en los siguientes objetivos secundarios.

1. Valorar los efectos de la ausencia de andrógenos sobre el tejido adiposo del microambiente tumoral, empleando un modelo transgénico de cáncer de próstata.
2. Demostrar el papel regulador de la señalización androgénica en el contenido de tejido adiposo en la próstata.
3. Analizar el efecto del tejido adiposo sobre la progresión tumoral en la próstata, prestando especial atención al efecto mediado por el secretoma y las vesículas extracelulares que este produce.





# MATERIAL Y MÉTODOS



## 1. MATERIALES

### 1.1 Líneas celulares

Las siguientes líneas celulares fueron empleadas para la realización de los experimentos de cultivos *in vitro* (ver resumen en Tabla 2).

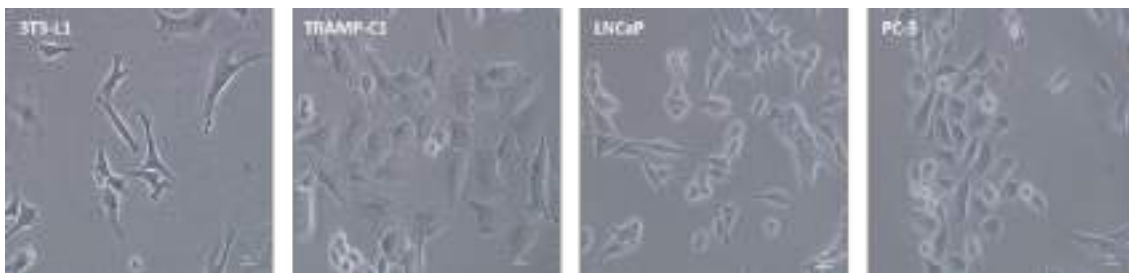
**3T3-L1** [Fig.15]. Fibroblastos embrionarios de ratón generados por expansión clonal de células 3T3 procedentes de ratones Swiss albinos. Estas células presentan inhibición por contacto, y una alta capacidad para diferenciarse hacia adipocitos maduros bajo la estimulación apropiada. Las células fueron amablemente cedidas por el laboratorio del Dr. Manuel Reina del Pozo (Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología de la Universitat de Barcelona). Las células se cultivaron en medio de proliferación (MP) compuesto por DMEM suplementado con 4.5 g/L de glucosa, de suero bovino de recién nacido al 10 % (NBCS), 4 mM de L-Glutamina, 1 mM de piruvato sódico, y un 1 % de un cóctel de antibióticos y antimicóticos que contiene 100 U/mL de penicilina, 10 µg/mL de estreptomina y 0.25 µg/mL de anfotericina B. Para realizar la diferenciación adipogénica las células se cultivaron en un medio de diferenciación (MDif.) compuesto por una mezcla 1:1 de DMEM y medio F12 (DMEM/F12), suplementado con 4.5 g/L de glucosa, 10 % de suero fetal bovino (FBS), 4 mM de L-glutamina, y 1 % de un cóctel de antibióticos y antimicóticos que contiene 100 U/mL de penicilina, 10 µg/mL de estreptomina y 0.25 µg/mL de anfotericina B.

**TRAMP-C1** [Fig.15]. Células tumorales de ratón derivadas de un tumor primario andrógeno dependiente de próstata generado en un ratón de 32 semanas del modelo murino transgénico de adenocarcinoma prostático (TRAMP). Estas células son *Ar<sup>+/+</sup>* y *Tp53<sup>-/-</sup>*. Las células se adquirieron en ATCC (#CRL-2730<sup>TM</sup>), y fueron cultivadas en DMEM suplementado con 4.5 g/L de glucosa, 4 mM de L-glutamina, 5 % FBS, 5 % del suplemento Nu-serum IV, 0.005 mg/mL de insulina bovina, 10 nM de dehidroepiandrosterona (DHEA), y 1 % del cóctel de antibióticos y antimicóticos que contiene 100 U/mL de penicilina, 10 µg/mL de estreptomina y 0.25 µg/mL de anfotericina B.

**LNCaP** [Fig.15]. Células epiteliales de próstata humanas dependientes de andrógenos derivadas de un nódulo linfóide supraclavicular metastásico. Estas células

son  $AR^{+/+}$ ,  $TP53^{+/+}$ , tienen altos niveles de  $5\alpha$ -reductasa y son capaces de producir PSA. Las células fueron adquiridas a ATCC (#CRL-1740<sup>TM</sup>), y se cultivaron en RPMI 1640 suplementado con 4.5 g/L de glucosa, 10 % de FBS, 2 mM de L-glutamina, 15 mM de ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfónico (HEPES), y 1 % de un cóctel de antibióticos que contiene 100 U/mL de penicilina, 10  $\mu$ g/mL de estreptomicina.

**PC-3** [Fig.15]. Células humanas de adenocarcinoma prostático independiente de andrógenos derivadas de una metástasis ósea. Estas células son  $AR^{-/-}$ ,  $TP53^{-/-}$ , presentan bajos niveles de  $5\alpha$ -reductasa y no son capaces de producir PSA. Las células fueron adquiridas a ATCC (#CRL-1435<sup>TM</sup>), y fueron cultivadas en DMEM/F12 suplementado con 4.5 g/L de glucosa, 10 % de FBS, 2 mM de L-glutamina, y 1 % de un cóctel de antibióticos y antimicóticos que contiene 100 U/mL de penicilina, 10  $\mu$ g/mL de estreptomicina y 0.25  $\mu$ g/mL de anfotericina B.



**Figura 15. Imágenes de las diferentes líneas celulares utilizadas en el estudio.** Las imágenes fueron tomadas en un microscopio invertido Nikon Eclipse TS100 con objetivos de contraste de fases, a un aumento de 200x

Todas las líneas celulares utilizadas en los experimentos de la presente tesis doctoral fueron caracterizadas genéticamente mediante identificación de repeticiones cortas en tándem (STR) por el área de ensayos Biotecnológicos y Biomédicos de los Servicios Científico-Técnicos de la Universidad de Oviedo, y se comprobó la ausencia de *Mycoplasma sp.* en el cultivo por análisis PCR cada 3 meses. Las células fueron cultivadas a 37 °C en un ambiente húmedo con una concentración de CO<sub>2</sub> del 5 %, y el medio se cambió cada 2-3 días. Para realizar la siembra de los experimentos, las células se despegaron del sustrato cuando se encontraban al 80 % de confluencia utilizando una solución de tripsina-EDTA al 0.05 % y se centrifugaron a 500 xg durante 5 minutos. Las células antes de ser sembradas se contaron en una cámara de Neubauer.

Tabla 2 Características de las líneas celulares empleadas en este proyecto.

Línea Celular	3T3-L1	TRAMP-C1	LNCaP clon FGC	PC-3
Casa comercial	ATCC	ATCC	ATCC	ATCC
Referencia	CL-173 <sup>TM</sup>	CRL-2730 <sup>TM</sup>	CRL-1740 <sup>TM</sup>	CRL-1435 <sup>TM</sup>
Especie	Ratón	Ratón	Humano	Humano
Morfología	Fibroblasto	Epitelial	Epitelial	Epitelial
Origen	Embrionario	Tumor primario próstata de ratón TRAMP (32 semanas)	Metástasis nódulo supraclavicular	Metástasis ósea
Medio de cultivo	DMEM	DMEM	RPMI 1640	DMEM/F12
Características moleculares	Capacidad de diferenciación adipogénica	<i>Ar</i> <sup>+/+</sup> , <i>Tp53</i> <sup>-/-</sup> , <i>Cdh1</i> <sup>+/+</sup> , <i>Krt</i> <sup>+/+</sup>	<i>AR</i> <sup>+/+</sup> , <i>TP53</i> <sup>+/+</sup> , <i>KLK3</i> <sup>+/+</sup> , ↑ 5α-Reductasa	<i>AR</i> <sup>-/-</sup> , <i>TP53</i> <sup>-/-</sup> , <i>KLK3</i> <sup>-/-</sup> , ↓ 5α-Reductasa

## 1.2 Animales

### Modelo de ratones transgénicos 'TRAMP'

Transgenic Adenocarcinoma of the Mouse Prostate (TRAMP), C57BL/6-Tg (TRAMP)8247Ng/J x FVB/NJ) F1/J. Este modelo expresa los antígenos T grande y T pequeño (T/tag) de la oncoproteína SV40 específicamente en las células

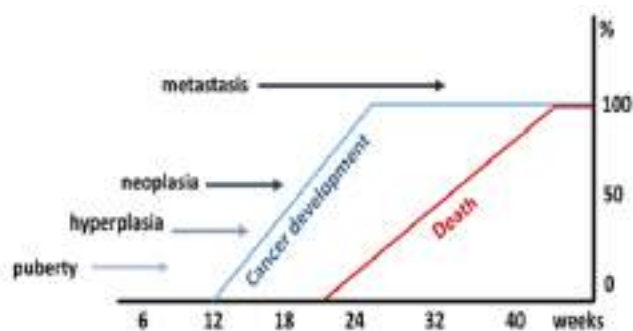


Figura 16. Proceso de tumoral en el modelo animal TRAMP. Imagen obtenida de <http://thegreenberglab.fhcr.org>

por andrógenos a través del promotor de probasina de rata (Pb; -426/+ 28 pares de bases) (146). En estos animales la progresión del cáncer de próstata cursa de manera similar a la enfermedad humana. Así, el 100 % de los ratones TRAMP desarrollan de forma uniforme tumores en la próstata, primero adenocarcinomas localizados, dependientes de la presencia de andrógenos que progresan a un fenotipo resistente a hormonas, y finalmente produce metástasis distales y un fenotipo tumoral neuroendocrino, si bien este último aspecto

es controvertido. Greenberg y colaboradores observaron que estos animales desarrollan fenotipos hiperplásicos a las 10 semanas de edad, presentan tumores invasivos a las 18 semanas y metástasis a las 24, no llegando a superar las 50 semanas de edad (147)[Fig.16].

Los procedimientos aplicados en la experimentación animal desarrollada en esta tesis doctoral siguieron la directiva 2010/63/UE, y todos los protocolos fueron aprobados por el Comité de Ética sobre la Experimentación Animal de la Universidad de Oviedo (PROAE 32/2016, PROAE 01/2020, PROAE 20/2021). Todos los animales fueron identificados mediante genotipado al destete, 3 semanas después de su nacimiento. Además, todos fueron mantenidos en un ciclo de luz-oscuridad 12:12 horas, regulado a 21 °C y 50 % humedad con acceso a comida y agua *ad libitum*.

### 1.3 Reactivos químicos

A continuación, se enumera en la Tabla 3 el conjunto de reactivos químicos, ensayos comerciales, equipamiento y programas utilizados durante el desarrollo de la presente tesis doctoral, indicando la empresa suministradora y su referencia de catálogo. Además, se enumeran las sedes de cada una de las compañías suministradoras de los productos anteriormente mencionados (Tabla 4).

**Tabla 3. Compañías y referencias de todos los reactivos usados en este proyecto.**

Reactivo	Compañía	Referencia
<b>Compuestos químicos</b>		
<b>3-isobutil-1-metilxantina</b>	Sigma-Aldrich, Merck	410957
<b>4-6-Diamino-2-Phenylindole</b>	Invitrogen, Thermo Fisher Sci.	D1306
<b>Agarosa E</b>	Condalab	8100
<b>Albúmina Sérica Bovina</b>	Panreac Química SLU	A1391
<b>Antibióticos y antimicóticos</b>	Gibco™, Thermo Fisher Sci.	15240062
<b>Ascorbato sódico</b>	Sigma-Aldrich, Merck	A7631
<b>Bicalutamida</b>	Sigma-Aldrich, Merck	B9061
<b>Charcoal</b>	Sigma-Aldrich, Merck	1021860250
<b>Citrato sódico</b>	Sigma-Aldrich, Merck	71365
<b>Cloroformo</b>	Sigma-Aldrich, Merck	25668
<b>Dexametasona</b>	Sigma-Aldrich, Merck	D9184
<b>Dextrano-T70</b>	Sigma-Aldrich, Merck	D1390
<b>D-glucosa</b>	AMRESCO Inc.	0188

<b>Dihidroepiandrosterona</b>	Sigma-Aldrich, Merck	390089
<b>Dihidrotestosterona</b>	Sigma-Aldrich, Merck	A8505
<b>Dimetilsulfóxido</b>	AppliChem GmbH	1,319,541,611
<b>DMEM</b>	Sigma-Aldrich, Merck	D5671
<b>DMEM/F12</b>	Sigma-Aldrich, Merck	D8437
<b>EDTA</b>	AMRESCO Inc.	245
<b>Eosina</b>	Sigma-Aldrich, Merck	15935
<b>Etanol</b>	VWR	ALCH0121F5
<b>EUKITT®</b>	ORSAtec GmbH	6,272,068
<b>FBS</b>	Gibco™, Thermo Fisher Sci.	11573397
<b>Fluoromount™</b>	Sigma-Aldrich, Merck	F4680
<b>H<sub>2</sub>O libre de nucleasas</b>	Invitrogen, Thermo Fisher Sci.	AM9938
<b>Hematoxilina</b>	DAKO-Agilent Technologies	GC80811-2
<b>HEPES</b>	Sigma-Aldrich, Merck	H3375
<b>Indometacina</b>	VWR	ACRO458030250
<b>Insulina humana</b>	Sigma-Aldrich, Merck	I9272
<b>Isoflurano</b>	Zoetis	N/A
<b>Isopropanol</b>	Panreac Química SLU	I9516
<b>Ketamina</b>	Merial	N/A
<b>L-Glutamina</b>	Sigma-Aldrich, Merck	67513
<b>Luciferina</b>	Gold Biotechnology	eLUCK
<b>Matrigel® Alta concentración</b>	Corning®	354262
<b>Melatonina</b>	Sigma-Aldrich, Merck	M520
<b>MTT</b>	Sigma-Aldrich, Merck	M5655
<b>NaOH</b>	Sigma-Aldrich, Merck	1.06498
<b>NBCS</b>	Gibco™, Thermo Fisher Sci.	1158050
<b>Oil Red O</b>	Sigma-Aldrich, Merck	21600
<b>Paraformaldehído</b>	Appllichem GmbH	A3813,0500
<b>Piruvato sódico</b>	Gibco™, Thermo Fisher Sci.	11360-039
<b>Pronasa</b>	Sigma-Aldrich, Merck	10165921001
<b>Rosiglitazona</b>	Cayman Chemicals	CAYM71740
<b>RPMI 1640</b>	Sigma-Aldrich, Merck	R0883
<b>Solución tripsina-EDTA 0.05 %</b>	Gibco™, Thermo Fisher Sci.	25300054
<b>Suero de cabra</b>	Gibco™, Thermo Fisher Sci.	16210064
<b>Suplemento Nu-serum IV</b>	Corning®	392-0321
<b>Testosterona</b>	Sigma-Aldrich, Merck	T1500
<b>TRI Reagent®</b>	Sigma-Aldrich, Merck	T9424
<b>Triiodotironina</b>	Thermo Fisher Sci.	11946891
<b>Tritón X-100</b>	VWR	327371000
<b>Trizma base</b>	VWR	28808.294
<b>Tween 20</b>	Sigma-Aldrich, Merck	P7949
<b>Xilacina</b>	Bayer	N/A

<b>Ensayos comerciales</b>		
<b>Ensayo de detección de proteínas BCA</b>	Bioquochem	KB03005
<b>In vivo EdU Click Kit 488</b>	Baseclick GmbH	BCK488-IV-IM-S
<b>Lipofectamina™ 3000 reagent</b>	Thermo Fisher Sci.	L3000015
<b>Mycoplasma Gel form kit</b>	Biotoools	4542
<b>MyTaq™ HS Red Mix</b>	Bioline, Meridian Bioscience	BIO25047
<b>NG dART RT-PCR kit</b>	EURx Sp. z.o.o	E0802-02
<b>Power Up™ SYBER™ Green Master Mix</b>	Applied Biosystem	A25742
<b>SimpleCHIP® Enzymatic Chromatin IP</b>	Cell signaling Technology	9003
<b>Equipamiento</b>		
<b>Accesorios para el cultivo Transwell®</b>	Corning®	734-1567
<b>Biotek Synergy H1</b>	BioTek Instruments	N/A
<b>Cabina de imagen <i>in vivo</i> IVIS®</b>	Perkin Elmer	N/A
<b>Camara Nikon DS-5M</b>	Nikon	N/A
<b>Espectrofotómetro Nanodrop® 2000</b>	Thermo Fisher Sci.	N/A
<b>Filtro fluorescencia DAPI DM400</b>	Nikon	N/A
<b>Filtro fluorescencia FITC DM505</b>	Nikon	N/A
<b>Homogeneizador ULTRATURRAX®</b>	IKA-Werke	N/A
<b>Microscopio Nikon Eclipse 80i</b>	Nikon	N/A
<b>Microscopio Nikon Eclipse TS100</b>	Nikon	N/A
<b>Microtomo Microm HM 350s</b>	Thermo Fisher Sci.	N/A
<b>Rotor basculante SW 40 Ti</b>	Beckman Coulter	N/A
<b>Termociclador MyCycler™</b>	Bio-Rad	N/A
<b>Termociclador QuantiStudio 5</b>	Applied Biosystem	N/A
<b>Ultracentrífuga Beckman Optima L90K</b>	Beckman Coulter	N/A
<b>Unidad de control Nikon DS-L1</b>	Nikon	N/A
<b>Unidad de control Nikon DS-U3</b>	Nikon	N/A
<b>Zetasizer Nano</b>	Malvern Panalytical	N/A
<b>Software empleado</b>		
<b>FinchTV</b>	<a href="https://digitalworldbiology.com/FinchTV">https://digitalworldbiology.com/FinchTV</a>	N/A
<b>ImageJ/Fiji</b>	<a href="https://imagej.nih.gov/ij/">https://imagej.nih.gov/ij/</a>	N/A
<b>Mega11</b>	<a href="https://www.megasoftware.net/">https://www.megasoftware.net/</a>	N/A
<b>PerlPrimer</b>	<a href="http://perlprimer.sourceforge.net/">http://perlprimer.sourceforge.net/</a>	N/A
<b>Prism8</b>	GraphPad Software	N/A
<b>ZEN 2.6 Pro</b>	ZEISS	N/A



Tabla 4 Localización de la sede de todas las compañías suministradoras de todos los reactivos utilizados en este proyecto

<b>Compañía</b>	<b>Sede</b>
<b>AmResco Inc.</b>	Solon, OH, Estados Unidos
<b>AppliChem GmbH</b>	Darmstadt, Alemania
<b>Applied Biosystem</b>	Foster City, CA, Estados Unidos
<b>ATCC®</b>	Manassas, VA, Estados Unidos
<b>Baseclick GmbH</b>	Neuried, Munich, Alemania
<b>Bayer</b>	Bayer, Leverkusen, Alemania
<b>Beckman Coulter</b>	Brea, CA, Estados Unidos
<b>Bioline, Meridian Bioscience</b>	Cincinnati, OH, Estados Unidos
<b>Bioquochem</b>	Siero, Principado de Asturias, España
<b>Bio-Rad</b>	Hércules, CA, Estados Unidos
<b>BioTek Instruments</b>	Winooski, VT, Estados Unidos
<b>Biotoools</b>	Madrid, Comunidad de Madrid, España
<b>Cayman Chemicals</b>	Ann Arbor, MI, Estados Unidos
<b>Cell signaling Technology</b>	Danvers, MA, Estados Unidos
<b>Condalab</b>	Madrid, Comunidad de Madrid, España
<b>Corning®</b>	New York, NY, Estados Unidos
<b>DAKO-Agilent Technologies</b>	Santa Clara, CA, Estados Unidos
<b>EURx Sp. z.o.o</b>	Gdansk, Polonia
<b>Gibco™, Thermo Fisher Scientific.</b>	Gaithersburg, MA, Estados Unidos
<b>Gold Biotechnology</b>	St.Louis, MO, Estados Unidos
<b>GraphPad Software</b>	San Diego, CA, Estados Unidos
<b>IKA-Werke</b>	Staufen, Alemania
<b>Invitrogen</b>	Waltham, MA, Estados Unidos
<b>Malvern Panalytical</b>	Malvern, Reino Unido
<b>Merial</b>	Lyon, Francia
<b>Nikon</b>	Minato, Tokio, Japón
<b>ORSAtec GmbH</b>	Bobingen, Alemania
<b>Panreac Química SLU</b>	Barcelona, Barcelona, España
<b>Perkin Elmer</b>	Waltham, MA, Estados Unidos
<b>Santa Cruz Biotechnology</b>	Dallas, TX, Estados Unidos
<b>Sigma-Aldrich, Merck</b>	Massachusetts, MA, Estados Unidos
<b>Thermo Fisher Scientific</b>	Waltham, MA, Estados Unidos
<b>VWR</b>	Monroeville, PA, Estados Unidos
<b>Zeiss</b>	Oberkochen, Baden-Württemberg, Alemania
<b>Zoetis</b>	Parispany-Troy Hills, NJ, Estados Unidos

## 2. METODOLOGÍA

### 2.1 TÉCNICAS DE BIOLOGÍA CELULAR

#### 2.1.1 Diferenciación adipogénica blanca

Para realizar el proceso de diferenciación de los fibroblastos hacia adipocitos blancos maduros se empleó un cóctel de diferenciación compuesto por 1  $\mu\text{M}$  de dexametasona, 0.5 mM de 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX), 2  $\mu\text{M}$  de rosiglitazona, y 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de insulina humana. Todos los compuestos se disolvieron de dimetilsulfóxido (DMSO) y se preparó un stock 1.000x de todos ellos. Las células se sembraron en placas de cultivo a una densidad de partida de 5.000 células/ $\text{cm}^2$ . Con el fin de conseguir una parada completa del ciclo celular, una vez alcanzada la confluencia las células se dejaron en el cultivo durante 48h (Considerado como día '0'). Transcurrido este tiempo, las células se lavaron en tampón fosfato salino (PBS), pH 7.4 y se añadió el cóctel de diferenciación (MDif.1). Las células se mantuvieron en este MDif.1 durante 48h (Día 2). Pasado este tiempo, se retiró el MDif.1, se lavaron las células con PBS pH 7.4 y se añadió DMEM/F12 suplementado con 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de insulina humana (MDif.2). Tras 4 días de cultivo con el MDif.2 se comenzó a observar la aparición de pequeños depósitos lipídicos en el interior de las células (Día 6). El cultivo se continuó durante 4 días más en este medio de cultivo hasta obtener células diferenciadas las cuales se emplearon para realizar los diferentes experimentos (Día 10) [Fig.17].

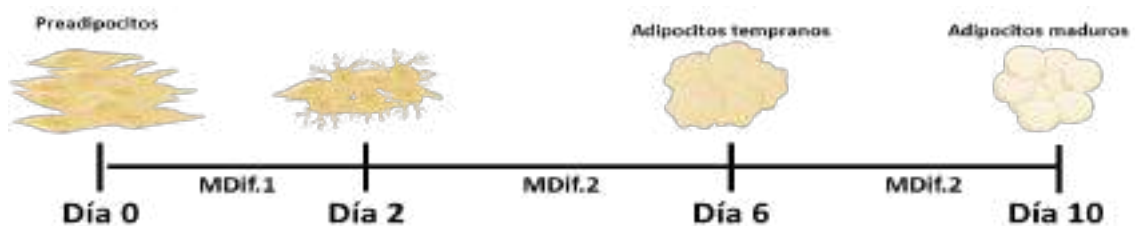


Figura 17. Protocolo de diferenciación adipogénica blanca a partir desde fibroblastos 3T3-L1 hasta adipocitos maduros.

#### 2.1.2 Preparación de suero fetal bovino libre de esteroides

La eliminación de esteroides del FBS se realiza por tratamiento de este con carbono activo (FBSch). La mezcla de carbono activo-dextrano se preparó previamente en tampón Tris-HCl 10 mM pH 8.0 al que se añadió 2.5 % de carbono activo y 0.025 %

de dextrano-T70, dejándose la solución en agitación a 4 °C durante toda la noche. Posteriormente esta solución fue esterilizada mediante autoclave. Tras esto, la mezcla carbono activo/dextrano se sedimentó mediante centrifugación a 3.000 xg durante 5 minutos a 4 °C y se incorporó a esta mezcla la parte equivalente de volumen de FBS retirado previamente. Esta solución de FBSch se agitó toda la noche a 4 °C en agitación suave y a continuación fue centrifugada a 3.000 xg durante 5 minutos para eliminar el exceso de mezcla carbono activo/dextrano, proceso que se repitió hasta eliminar el residuo sólido en suspensión. Finalmente, el medio de cultivo correspondiente, que contenía un 10 % de este FBSch se filtró a través de un filtro HEPA de 0.2 µm de baja retención de proteína, considerándose así medio completo libre de andrógenos y otros esteroides.

### 2.1.3 Tinción de las células con Oil Red 'O'

La presencia de lípidos en el citoplasma celular se valoró mediante la tinción con el colorante lipofílico Oil Red O (ORO). ORO es un colorante liposoluble con capacidad para unirse a lípidos neutros y a ésteres de colesterol, pero incapaz de unirse con los lípidos de membrana, permitiendo detectar acúmulos lipídicos en el citoplasma celular, y presenta un pico de absorción a 520 nm. Para realizar la tinción, las células se fijaron con una solución de paraformaldehído (PFA) al 4 % disuelto en una solución 0.1 M de tampón fosfato (PB) pH 7.4 durante 30 minutos a 4 °C. Posteriormente, las células se lavaron 3 veces con agua y se permeabilizaron con isopropanol al 60 % durante 2 minutos a temperatura ambiente (TA). Transcurrido este tiempo, se retiró el isopropanol y se tiñeron durante 10 minutos con una solución de ORO 3 mg/ml, diluida en agua desionizada en una relación 3:2. Se retiró el exceso de ORO y los núcleos se contrastaron con una solución comercial de hematoxilina.

Con el fin de realizar una cuantificación del contenido lipídico se realizó una extracción de ORO. Para ello se añadió a cada grupo isopropanol al 100 % y se incubó en agitación suave durante 5 minutos a TA. Una vez hecho esto se recogió el isopropanol y se analizó la absorbancia a 520 nm en un espectrofotómetro de placas Biotek Synergy H1.

#### 2.1.4 Ensayo de proliferación

Según el estudio, se utilizaron las líneas celulares TRAMP-C1, LNCaP o PC-3. Las células se sembraron en placas de 6 pocillos a una densidad inicial de 2.500 células/cm<sup>2</sup>. Transcurrido el tiempo de cultivo indicado, las células se despegaron por tripsinización, utilizando una solución de tripsina-EDTA 0.05 %, y tras la inactivación de la tripsina mediante FBS se centrifugaron a 500 xg durante 5 minutos. El sedimento con las células se resuspendió en 10 mL de medio de cultivo y una alícuota fue teñida durante 3 minutos a TA con una solución al 0.4 % de azul de tripán diluida 1:1 con la suspensión de células, tras lo cual se contaron mediante una cámara de Neubauer. Para realizar el conteo se añadieron 10 µL de muestra a cada compartimento de la cámara y se contaron un total de 10 campos. Se calculó el número total de células y el porcentaje de viabilidad.

#### 2.1.5 Co-cultivo de células tumorales de próstata y fibroblastos 3T3-L1

Para estos ensayos se emplearon placas de 6 pocillos con fibroblastos 3T3-L1 sin diferenciar y diferenciados, siguiendo las estrategias experimentales descritas más abajo en el apartado "Diseño Experimental". Una vez que los fibroblastos 3T3-L1 se anclaron al sustrato, estos se colocaron sobre estos insertos Transwell™ de policarbonato con un tamaño de poro de 0.4 µm. Sobre los insertos se sembraron células tumorales de próstata TRAMP-C1 a una densidad de 5.000 células/cm<sup>2</sup>. En las células tumorales, se realizó un marcaje de la proliferación mediante tinción con 5'-ethynyl-2-deoxyuridine (EdU). Para ello, los insertos se colocaron en una placa en medio de cultivo completo suplementado con 10 µM de EdU, y las células se incubaron durante 1 hora a 37 °C. Se retiró el medio de cultivo y se lavaron las células con una solución al 3 % de albúmina sérica bovina (BSA) en PBS pH 7.4. Las células se fijaron con una solución de PFA al 4 % en 0.1 M de PB pH 7.4, durante 15 minutos a TA en oscuridad. Las células se lavaron con un 3 % de BSA en PBS pH 7.4, y se incubaron durante 20 minutos a TA en la solución de permeabilización proporcionada por el fabricante. Se retiró la solución de permeabilización y se añadió la solución de reacción (solución de catálisis, colorante azida, tampón aditivo en PBS pH 7.4). Esta solución se preparó 15 minutos antes de ser añadida a las muestras. Las células se incubaron en esta solución durante 30 minutos a TA en oscuridad. Se retiró la solución de reacción y se lavaron las células con un 3 % de

BSA en PBS pH 7.4. Las células se contra tiñeron con 1µg/mL de 4-6-Diamino-2-Phenylindole (DAPI). Los insertos Transwell™ se retiraron de su soporte, se colocaron sobre un portaobjetos, y se montaron con medio de montaje acuoso (Fluoromount™). Las muestras fueron observadas en un microscopio Nikon Eclipse 80i de epifluorescencia, utilizando filtros correspondientes para FITC ( $\lambda_{ex}$  465-495 nm;  $\lambda_{em}$  515-555 nm; DM505) en el caso del EdU, o para DAPI ( $\lambda_{ex}$  340-380 nm;  $\lambda_{em}$  435-485 nm, DM400). Para las cuantificaciones se realizaron imágenes a 100 aumentos y se estableció la relación entre número de células EdU positivas respecto del número de células totales teñidas con DAPI.

### 2.1.6 Aislamiento de vesículas extracelulares de células en cultivo

Para aislar vesículas extracelulares (EVs) producidas por células 3T3-L1, se eliminaron las EVs presentes en condiciones normales en el FBS del medio de cultivo, ya que este tiene un elevado contenido de éstas. Para ello se ultracentrifugó el FBS a 120.000 xg durante 18 horas a 4 °C empleando una ultracentrífuga Beckman Optima L90K. Después de la centrifugación se tomó una alícuota y del suero y se realizó un análisis de dispersión dinámica de la luz (DLS) en un Zetasizer Nano para comprobar que las vesículas habían sido retiradas del suero de cultivo.

Los fibroblastos 3T3-L1 sin diferenciar o diferenciados, se cultivaron en placas de 150 mm en medio MDif.2 suplementado con un 10 % de FBS libre de EVs. El volumen de partida de medio de cultivo fue de 120 ml y todas las centrifugaciones se realizaron a 4 °C. Tras el cultivo se recogió el medio y las vesículas fueron aisladas por ultracentrifugación diferencial. En primer lugar, se realizó una centrifugación a 500 xg durante 10 minutos. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y se centrifugó a 3.000 xg durante 15 minutos. Posteriormente se recogió el sobrenadante y se centrifugó a 15.000 xg durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo el sobrenadante se repartió en tubos de ultracentrifugación y las EVs se sedimentaron a 120.000 xg durante 70 minutos. Finalizada la sedimentación, el sobrenadante fue retirado, el pellet se lavó con PBS pH 7.4 previamente ultracentrifugado y filtrado con filtros de fluoruro de polivinilideno (PVDF) de 0.2 µm, y las EVs se sedimentaron de nuevo por ultracentrifugación. Tras el aislamiento, el pellet resultante se suspendió en 100 µl de PBS pH

7.4 ultracentrifugado y filtrado. La eficiencia de la sedimentación se determinó mediante DLS, y el contenido proteico se cuantificó mediante el ensayo del ácido bicinconínico (BCA). Las EVs fueron congeladas y mantenidas a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

### 2.1.7 Sobreexpresión de luciferasa en células TRAMP-C1

Para la obtención de clones estables que sobreexpresen el enzima luciferasa, células TRAMP-C1 fueron transfectadas con el plásmido de pcDNA 3-1-plive-luct2a, cedido amablemente por el laboratorio del Dr. Carlos López Otín (Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Oviedo), cuando se encontraban al 70 % de confluencia. Para ello se lavaron las células con PBS pH 7.4 y se añadió medio DMEM con una concentración de  $0.012\text{ }\mu\text{g/mL}$  de lipofectamina<sup>TM</sup> 3.000, y  $0.014\text{ }\mu\text{g/mL}$  del plásmido pcDNA 3-1-plive-luct2a [Fig.18]. Las



**Figura 18.** Construcción plasmídica del pcDNA 3-1-plive-luct2a.

células se incubaron durante 4 horas. Tras esto se realizó un cambio de medio y se mantuvieron durante 48h. Transcurrido este tiempo se procedió a realizar la selección de células resistentes mediante la adición  $1.500\text{ }\mu\text{g/mL}$  de gentamicina (G418) al medio de cultivo, manteniéndose las células en estas condiciones durante 2 semanas, y realizando cambios de medio suplementado con G418 cada 48 horas. Transcurrido este tiempo se realizó una selección de los clones resistentes que fueron congeladas hasta su utilización.

## 2.2 TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

### 2.2.1 Aislamiento de ARN y PCR cuantitativa

Para el aislamiento de ARN de células en cultivo, se añadió a cada placa de células 1 mL TRI Reagent® por cada 10 cm<sup>2</sup> de superficie de la placa de cultivo. A continuación, las células se recogieron de la placa por raspado. En el caso de muestras de tejido, se emplearon 50 mg de tejido prostático o 300 mg de tejido adiposo para realizar la extracción. A todas las muestras se les añadió 1 mL de TRI Reagent® por cada 100 mg de tejido, y las muestras se homogeneizaron utilizando un homogeneizador ULTRA-TURRAX®. Tras la homogeneización, las muestras se incubaron durante 5 minutos a TA para permitir la completa disociación de los complejos de nucleoproteínas y se añadieron 0.1 volúmenes de cloroformo. Las muestras se agitaron y se dejaron incubar durante 15 min a TA. A continuación, se centrifugaron a 12.000 xg durante 15 min a 4 °C. La fase acuosa se transfirió a un tubo limpio y se añadieron 0.2 volúmenes de isopropanol a 4°C a cada muestra. Las muestras se dejaron a TA durante 10 minutos y posteriormente se centrifugaron a 12.000 xg durante 10 min a 4 °C. Se descartó el sobrenadante y el pellet resultante se lavó utilizando una solución de etanol al 75 % diluido en agua libre de ADNasas y ARNasas. Posteriormente se realizó una centrifugación a 7.500 xg durante 5 min a 4 °C, se retiró el sobrenadante y se dejaron las muestras secar a TA para eliminar todo el exceso de etanol sobrante. Finalmente, el pellet resultante se suspendió en 100 µL de agua libre de nucleasas. La concentración de ARN se calculó empleando un Nanodrop, y se registró la relación de absorbancias 260/280. Solo se emplearon muestras con ratio 260/280 superior a 1.8. Además, para evaluar la integridad del ARN, 1 µg de muestra fue separado en un gel de agarosa al 1 %. Solo se emplearon muestras en las que las dos subunidades ribosómicas (18S y 28S) eran claramente identificables.

Para sintetizar el ADN complementario (ADNc), se empleó un kit de transcripción reversa. El ADNc se obtuvo a partir de 1 µg de ARN. Para la realización de la PCR cuantitativa (qPCR), el ADNc fue diluido 10 veces en agua libre de nucleasas. La qPCR se realizó utilizando “Power Up™ SYBER™ Green Máster Mix”. Las secuencias de oligonucleótidos empleadas fueron obtenidas de la base de datos ‘Primer Bank’. Las

secuencias y condiciones utilizadas se muestran en las Tablas 5 y 6. La qPCR fue realizada en un termociclador QuantiStudio 5 con un bloque para placas de 384 pocillos. Se utilizó un protocolo de amplificación de 40 ciclos seguido de una curva de disociación para detectar hibridaciones inespecíficas [Fig.19].

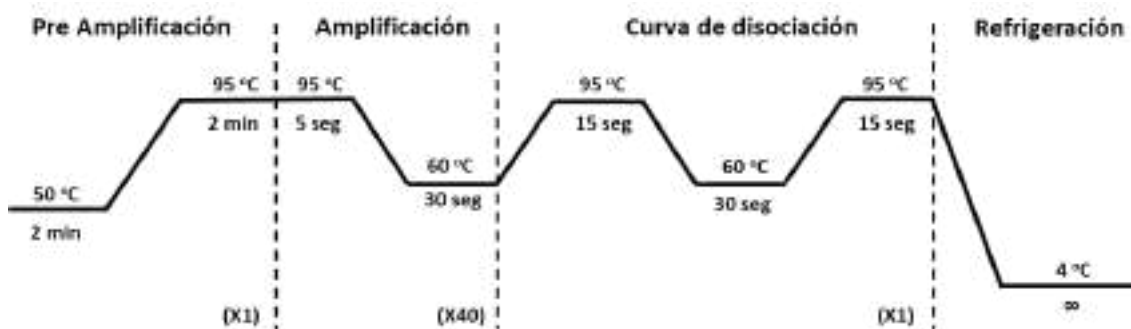


Figura 19. Diagrama de ciclos y temperaturas de la PCR cuantitativa.

Tabla 5. Secuencias de los cebadores empleados para la detección de la expresión génica

Cebadores	Secuencia
<i>Ucp1</i> murino directo	5' AGGCTTCCAGTACCATTAGGT 3'
<i>Ucp1</i> murino reverso	5' CTGAGTGAGGCAAAGCTGATTT 3'
$\beta$ -Actina murino directo	5' GGCTGTATACCCCTCCAT 3'
$\beta$ -Actina murino reverso	5' CCAGTTGGTAACAATGCCATG 3'

Tabla 6. Reactivos y concentraciones utilizados para la realización de la PCR Cuantitativa

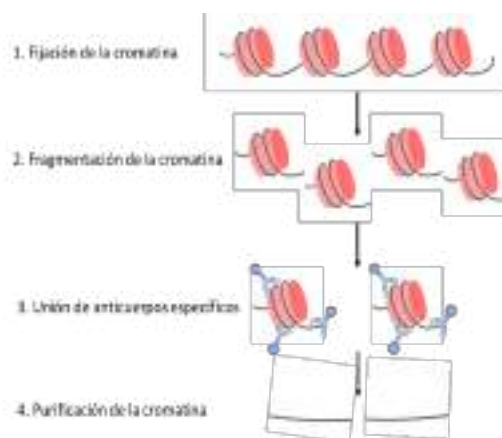
Reactivos por muestra	Volumen ( $\mu$ L)
Power Up™ SYBER™ Green Master Mix	2.5
H <sub>2</sub> O	0.25
Oligonucleótidos 10 $\mu$ M	0.25
ADNc (1:10)	2

### 2.2.2 Inmunoprecipitación de cromatina (“ChIP”)

Tres placas de 150mm con cultivos confluentes fueron incubadas en presencia o ausencia de 20  $\mu$ M de CDX. Los controles fueron cultivados con 0.1 % de DMSO que se empleó como vehículo. La extracción de cromatina se realizó utilizando un kit de inmunoprecipitación de cromatina siguiendo las instrucciones del fabricante (Cell Signaling Technology).



Quince µg de ADN fueron utilizados para la realización de la inmunoprecipitación. La muestra se incubó con 4 µg de anticuerpo frente al RA (Anti-AR (441), sc-7305X). La incubación se llevó a cabo durante toda la noche en agitación a 4 °C. Al día siguiente, y de acuerdo con las instrucciones del fabricante, el extracto se combinó con las bolas magnéticas acopladas a proteínas A/G las cuales permiten la separación magnética de los fragmentos de



**Figura 20. Representación esquemática del protocolo de inmunoprecipitación de cromatina.**

interés de los extractos [Fig.20]. Tras la inmunoprecipitación, el RA se separó de la secuencia de ADN y esta fue purificada siguiendo la metodología de purificación recomendada por el fabricante. Para confirmar la unión del RA al promotor de *Ucp1* se emplearon los oligonucleótidos indicados en la Tabla 7. El producto amplificado es una secuencia de 199 pares de bases (pb) correspondiente a una zona intermedia del promotor.

**Tabla 7. Secuencias de los cebadores utilizados para la realización de PCR convencional y secuenciación**

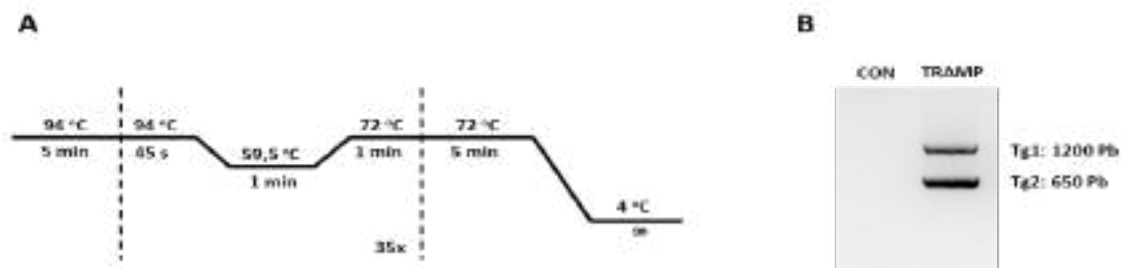
Cebadores	Secuencia
<b><i>Ucp1</i> directo</b>	5' CCACACGATGCACTCACTTT 3'
<b><i>Ucp1</i> reverso</b>	5' CCCCTTCCCATGCATCTACT 3'

El producto de PCR obtenido tras la inmunoprecipitación de cromatina fue purificado y secuenciado por el servicio de Ensayos Biotecnológicos y Biomédicos de los Servicios Científico-Técnicos de la Universidad de Oviedo. Para la secuenciación se utilizaron como cebadores los mismos que se emplearon para la amplificación por PCR. Para los análisis de secuencia y alineamiento se utilizaron los programas de libre acceso FinchTV y MEGA11.

## 2.3 EXPERIMENTACIÓN ANIMAL

### 2.3.1 Genotipado

Tras el destete, los animales fueron caracterizados mediante el genotipado. Para ello se cortó una pequeña sección de la cola a partir de la cual se realizó una extracción de ADN. Para realizar la extracción se añadieron a cada muestra 75  $\mu$ l de una solución alcalina (25 mM NaOH, 0.2 mM EDTA), y se incubó a 99 °C durante 1 hora. Tras esto se añadieron a cada muestra 75  $\mu$ l de una solución de neutralización (40 mM TRIS-HCl pH 7.4). Posteriormente se realizó una amplificación mediante PCR utilizando como cebadores las secuencias de oligonucleótidos frente a los antígenos T (*Tg1*) y t (*Tg2*) del transgén, empleando el protocolo original sugerido por 'Jackson Laboratories', proveedores de esta línea transgénica murina, y que se indica en las Tablas 8 y 9. Una vez finalizada la amplificación, el producto de PCR se resolvió en un gel de agarosa al 2 % [Fig.21].



**Figura 21. Condiciones y resultado del genotipado de ratones de la colonia TRAMP.** (A) Representación esquemática del protocolo de PCR para el genotipado. (B) Ejemplo del resultado de un genotipado en un gel de agarosa al 2% para ratones Control y TRAMP.

Al final de cada experimento los animales fueron sacrificados mediante cámara de CO<sub>2</sub>, a excepción de los animales destinados a la obtención de tejido adiposo epididimario para la realización del cultivo organotípico, donde la dislocación cervical fue escogida como método eutanásico. Los tejidos correspondientes en cada experimento se extrajeron rápidamente y fueron ultracongelados en nitrógeno líquido o sumergidos en PFA 4 % para su posterior empleo.

Tabla 8. Secuencias de los cebadores utilizados para el genotipado de los animales de la colonia TRAMP.

Cebadores	Secuencia
<b>Tg1 directo</b>	5' CCGGTCGACCGGAAGCTTCCACAAGTGCATTTA 3'
<b>Tg1 reverso</b>	5' AGGCATTCCACCACTGCTCCCATTTCATC 3'
<b>Tg2 directo</b>	5' GCGCTGCTGACTTTCTAAACATAAG 3'
<b>Tg2 reverso</b>	5' GAGCTCACGTTAAGTTTTGATGTGT 3'

Tabla 9. Reactivos y concentraciones utilizados para el genotipado de la colonia TRAMP.

Reactivos por muestra	Volumen ( $\mu$ L)
<b>MyTaq<sup>TM</sup> HS Red Mix</b>	6,25
<b>H<sub>2</sub>O</b>	5,5
<b>Oligonucleótidos (10<math>\mu</math>M)</b>	0,25
<b>ADN (Dilución 1:10)</b>	1

### 2.3.2 CIRUGÍA

La orquiectomía bilateral se realizó a los tiempos indicados (12 o 20 semanas de edad) bajo anestesia general, empleando 100 mg/Kg de ketamina y analgesia con 20 mg/Kg de xilacina, que fueron ambos administrados mediante inyección intraperitoneal. A los animales con operación simulada ("Sham") se les practicó únicamente la incisión e inmediata sutura.

Para realizar los experimentos de retirada de grasa blanca epididimaria (eWAT) se emplearon animales de 16 semanas de edad. Los animales fueron anestesiados y tratados con analgesia tal y como se describe arriba. En este caso, se realizó una incisión en el peritoneo y la eWAT fue eliminada con precaución de mantener intacta la arteria espermática interior y la rama epididimaria, ya que se encuentran embebidas en el tejido adiposo. A los animales del grupo control, se les practicó una operación simulada mediante incisión y sutura en el peritoneo.

## 2.4 ANÁLISIS MORFOMÉTRICOS Y MORFOLÓGICOS

### 2.4.1 Diagnóstico histopatológico de los tractos genitourinarios

Los tractos genitourinarios (GU) fueron fijados utilizando una solución de PFA 4 % en 0.1 M de PB pH 7.4 durante toda la noche a 4 °C. Al día siguiente fueron lavados

con agua (24 h) y posteriormente conservados en etanol 70 % hasta su procesamiento. Para ello, los tejidos fueron remitidos a la Unidad de Histopatología Molecular en Modelos Animales de Cáncer, del Instituto Universitario de Oncología del Principado de Asturias (IUOPA), donde se incluyeron en parafina.

A partir de las muestras de tejido embebidas en parafina se obtuvieron secciones de unas 5  $\mu\text{m}$  empleando un microtomo Microm HM 350s. Las muestras fueron desparafinadas, hidratadas, y se tiñeron con una solución comercial de hematoxilina durante 10 minutos a TA. Se lavaron con agua del grifo y se sumergieron durante 2 minutos en una solución al 0.2 % de eosina en agua a TA. Tras esto las muestras se lavaron en agua hasta retirar todo el exceso de eosina, se deshidrataron y se montaron en un medio de montaje con base de xilol (EUKITT®). Las muestras se almacenaron hasta su uso, y se realizó un diagnóstico histopatológico de los mismos por la Dra. Maite Fernandez.

#### 2.4.2 Morfometría del tejido adiposo blanco y pardo/beige en el microambiente tumoral.

En cortes histológicos de 5  $\mu\text{m}$ , obtenidos a partir de las muestras de próstata en parafina, se analizó tanto el área media de los adipocitos como la relación entre la superficie de grasa blanca y grasa parda/beige respecto a la superficie de tejido glandular, y la cantidad de adipocitos intra prostáticos. Para la cuantificación del área media de los adipocitos de una forma estadísticamente representativa, se seleccionaron al azar 10 regiones del tejido adiposo blanco y se tomaron micrografías a un aumento de 100x en un microscopio Nikon Eclipse 80i. Tras esto, se desarrolló, con la ayuda del Servicio de Procesamiento de Imagen de los Servicios Científico-Técnicos de la Universidad de Oviedo, una macro para el software libre ImageJ/Fiji. La macro está configurada para seleccionar el área de interés dentro de la muestra, lo que permite identificar los límites de los adipocitos, pudiendo así hacer una selección precisa de los mismos. Una vez seleccionados, el programa realiza una cuantificación tanto del número de adipocitos detectados, como de la superficie media de los mismos [Fig.22].

Para la cuantificación de la superficie total de la superficie ocupada por el tejido adiposo periprostático (TAPP), se escanearon las laminillas teñidas con hematoxilina-

eosina en un escáner para muestras histológicas Leica SCN 400, a un aumento de 1x. Para el análisis, se diseñó una macro para el software libre ImageJ/Fiji que permitió identificar y cuantificar la cantidad de grasa blanca, grasa parda/beige, así como la superficie de tejido glandular. Esta macro permitió seleccionar las áreas de interés sobre las que realizó la cuantificación, descartando de las mediciones todo aquello que quedara fuera de la zona seleccionada. En nuestro caso se seleccionaron de forma individual las regiones de grasa blanca, parda/beige y tejido glandular, obteniéndose la superficie que ocupaban cada una de ellas [Fig.22].

Por último, se cuantificó el número de adipocitos encontrados en el tejido glandular tumoral o adipocitos intra tumorales. Para ello se tomaron imágenes representativas de la próstata y el procesamiento se realizó utilizando la misma macro que para la cuantificación del área de los adipocitos del tejido adiposo del microambiente [Fig.22].



**Figura 22. Imágenes del procedimiento de cuantificación morfométrica.** (A) Análisis del número y tamaño medio de los adipocitos. (B) Análisis de la superficie de grasa blanca, parda/beige y superficie de glándula. En verde se representa la selección manual del tejido adiposo blanco, en rojo la selección del pardo/beige, y en azul la selección de la superficie glandular. (C) Análisis del número y tamaño medio de los adipocitos intra tumorales.

### 2.4.3 Tinción con azul de toluidina.

Secciones de 5  $\mu\text{m}$  fueron desparafinadas, hidratadas, y teñidas con una solución de azul de toluidina al 0.1 % durante 2 minutos a TA. Los cortes se lavaron con agua destilada para retirar el exceso de colorante y los núcleos se contrastaron con una solución comercial de hematoxilina. Las muestras se deshidrataron y se montaron empleando EUKITT®. Una vez secas, se realizaron 5 imágenes representativas a un aumento inicial de 200x empleando un microscopio Nikon Eclipse 80i. Para la cuantificación se contó el número de células metacromáticas por superficie de la glándula, utilizando dos macros para el software libre ImageJ/Fiji. La primera de ellas permite discriminar las células metacromáticas del resto de células del tejido,

ofreciendo así un conteo del número de células teñidas. La segunda macro permite realizar una selección manual de la región de interés proporcionado como resultado el área que ocupa dentro de la imagen.

#### 2.4.4 Inmunohistoquímica

A partir de las muestras de tejido embebidas en parafina, se obtuvieron secciones de 5  $\mu\text{m}$  con el microtomo. Las secciones se calentaron 1 hora a 60 °C y posteriormente fueron desparafinadas, hidratadas, y sometidas un proceso de desenmascaramiento antigénico. Para la inmunodetección de la proteína UCP1, los cortes se sumergieron inicialmente en una solución de 0.1 M de TRIS-HCl pH 7.5 a 37 °C durante 30 minutos. Las muestras se incubaron durante 30 min a 37 °C en una solución al 0.05 % de pronasa disuelta en tampón 0.1 M TRIS-HCl pH 7.5. El desenmascaramiento se detuvo sumergiendo las secciones en una solución 0.1M de TRIS-HCl pH 7.5 a 4 °C durante 40 minutos. Para realizar la inmunodetección de las proteínas RA y al KI67, el desenmascaramiento antigénico se realizó mediante incubación de los cortes con tampón citrato 10 mM pH 6 durante 25 minutos. Para la detección de la proteína F4/80 no se realizó desenmascaramiento antigénico. En todos los casos las secciones se lavaron 3 veces con PBS pH 7.4, y se permeabilizaron con una solución 0.15 % de Tween 20 en PBS pH 7.4 durante 20 minutos a TA. Posteriormente, las reacciones inespecíficas de los anticuerpos se bloquearon utilizando una dilución 1:30 de suero de cabra (GS) durante 1 hora a TA y se incubaron con los siguientes anticuerpos primarios (Tabla 10). Tras la hibridación, las muestras se lavaron 3 veces con PBS pH 7.4 y se incubaron en una solución 1:250 del correspondiente anticuerpo secundario fluorescente durante 2h a TA (Tabla 10). Finalmente, las muestras fueron contra teñidas con una disolución 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$  de DAPI, y montadas con Fluoromount™. Las muestras fueron observadas en un microscopio Nikon Eclipse 80i de epifluorescencia, utilizando la combinación de filtros para FITC ( $\lambda_{\text{ex}}$  465-495 nm;  $\lambda_{\text{em}}$  515-555 nm; DM505) en el caso del EdU, y filtros para DAPI ( $\lambda_{\text{ex}}$  340-380 nm;  $\lambda_{\text{em}}$  435-485; DM400nm) en el caso del DAPI. Para obtener una información morfológica estadísticamente representativa, en función de los aumentos empleados, se tomaron 5 (100x) o 10 (200x) micrografías de campos aleatorios.

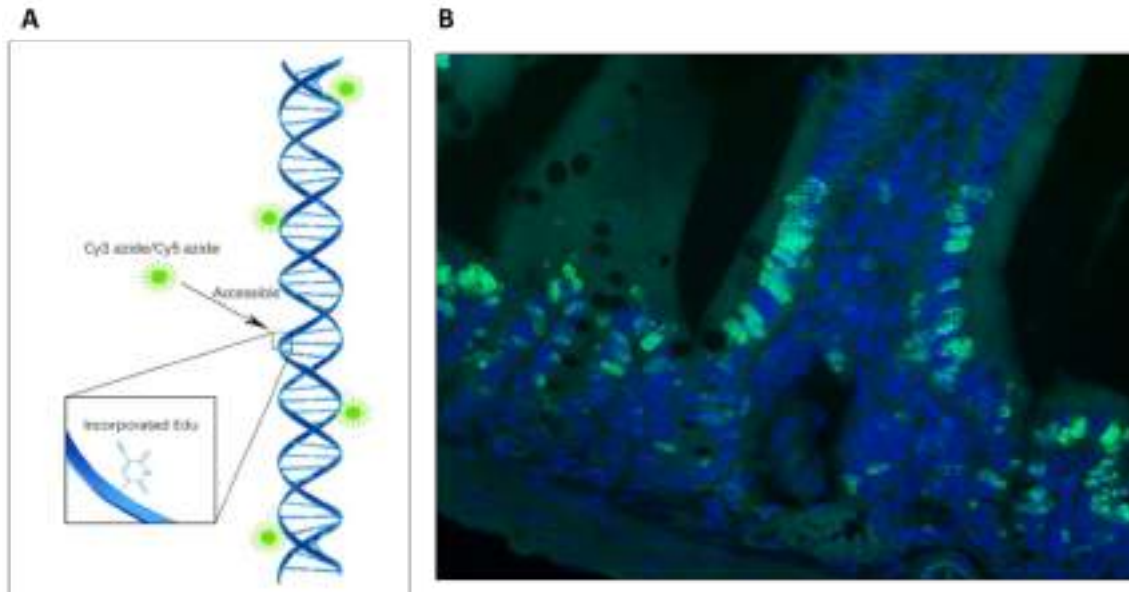
Tabla 10. Anticuerpos empleados para las inmunohistoquímicas

Anticuerpo	Compañía	Referencia	Desenmascaramiento	Dilución 1.º ario	Dilución 2.º ario
<b>Androgen Receptor (D6F11) XP® Rabbit mAb</b>	Cell signaling	5153S	Tampón citrato 10 mM pH 6.0, 95 °C, 25 min	1:100	1:200
<b>Anti UCP-1 antibody produced in rabbit</b>	Merck	U6382	Pronasa 0,05 % en Tris-HCl pH 7.5, 37 °C 30 min	1:6000	1:250
<b>F4/80 Monoclonal antibody (CI:A3-1)</b>	Invitrogen	MA1-91124	N/A	1:1000	1:250
<b>Recombinant Anti-Ki67 antibody (SP6)</b>	Abcam	ab16667	Tampón citrato 10 mM pH 6.0, 95 °C, 25 min	1:200	1:200
<b>Alexa fluor 488 goat anti rat</b>	Invitrogen	A11006	N/A	N/A	N/A
<b>Alexa fluor 488 goat anti rabbit</b>	Jackson Immuno Research	111-545-003	N/A	N/A	N/A

#### 2.4.5 Marcaje de células proliferativas *in vivo*

Para valorar y cuantificar el nivel de proliferación del tejido epitelial de la próstata, los animales fueron inyectados intraperitonealmente con 50 mg/Kg de EdU 4 horas antes del momento del sacrificio. Transcurrido este tiempo, los animales fueron sacrificados y los tractos genitourinarios fueron disecados, extraídos y sumergidos en PFA al 4 % en 0.1 M de PBS pH 7.4 para su posterior inclusión en parafina. Se realizaron cortes histológicos de 5 µm de grosor de las muestras. Como control positivo del ensayo se utilizaron muestras de intestino delgado. Las preparaciones se calentaron a 60 °C durante 1 hora, y fueron desparafinadas e hidratadas. Las muestras se lavaron con una solución de PBS pH 7.4 con un 3 % de BSA. A continuación, se realizó una permeabilización de las muestras durante 20 minutos a TA con una solución de PBS pH 7.4 con un 0.5 % de Tritón X-100. Se retiró la solución de permeabilización y se lavaron las muestras con PBS pH 7.4 con un 3 % de BSA. Se añadió a cada muestra la solución de reacción (tampón de solución, solución de catálisis, colorante azida, tampón aditivo, y agua desionizada), siguiendo las instrucciones del fabricante [Fig.23]. Esta solución se preparó 15 minutos antes de ser añadida a las muestras. Las muestras se incubaron en solución de reacción durante 30 minutos a TA en oscuridad. Se retiró la solución y se

lavar las muestras con PBS pH 7.4 con un 3 % de BSA. Por último, Se realizó una contra tinción de los núcleos con una disolución 1 µg/mL de DAPI, y las muestras se montaron con Fluoromount™. El marcaje se observó en un microscopio Nikon Eclipse 80i de epifluorescencia, utilizando la combinación de filtros para FITC ( $\lambda_{ex}$  465-495 nm;  $\lambda_{em}$  515-555 nm; DM505) en el caso del EdU, y filtros para DAPI ( $\lambda_{ex}$  340-380 nm;  $\lambda_{em}$  435-485; DM400nm) en el caso del DAPI.



**Figura 23. Marcaje de la proliferación mediante EdU.** (A), Mecanismo de unión del EdU al ADN (imagen modificada de APEXIO). (B), Imagen de la proliferación de células intestinales mediante el marcaje con EdU. Imagen obtenida a 400x



### 3. DISEÑO EXPERIMENTAL

#### 3.1 Diferenciación adipogénica beige en cultivo 2D

Para realizar el proceso de diferenciación adipogénica a partir de adipocitos blancos maduros en adipocitos “beige”, las células 3T3-L1 diferenciadas se incubaron en medio MDif.2 suplementado con 20  $\mu$ M del antiandrógeno bicalutamida (CDX), la cual se disolvió a una concentración de 20 mM en DMSO. El volumen final de DMSO era inferior al 0.1 %, vehículo que se añadió al medio de las células del grupo control. Para los experimentos de expresión, los adipocitos blancos maduros se incubaron durante 24 h con CDX. Para obtener células “beige” diferenciadas, las células se cultivaron durante 7 días. la diferenciación a grasa beige se confirmó mediante el análisis de la expresión de *Ucp1* por PCR cuantitativa [Fig.24].



Figura 24. Protocolo de diferenciación adipogénica a partir de adipocitos blancos maduros hasta adipocitos beige maduros.

#### 3.2 Diferenciación adipogénica beige en cultivo organotípico

Se ensayó el proceso de diferenciación adipogénica en cultivos organotípicos de tejido adiposo del epidídimo de animales control adultos de 20 semanas. Con este fin, se disecó la eWAT de estos animales y se lavó en PBS pH 7.4 estéril, previamente atemperado a 37 °C. El tejido adiposo fue previamente seccionado en fragmentos de 2 a 5 mm distribuyendo estos en 6 placas de 60 mm con 5-6 fragmentos por placa. A los fragmentos de eWAT se le añadió medio DMEM suplementado con 4 mM de L-Glutamina, 10 % de FBS, 1 mM de piruvato sódico, 1 % de un cóctel de antibióticos y antimicóticos que contiene 100 U/mL de penicilina, 10  $\mu$ g/mL de estreptomicina, 20 mM de HEPES, 50  $\mu$ g/mL de ascorbato sódico, y 1  $\mu$ M de insulina bovina.

Las piezas fueron cultivadas durante 24 horas en un incubador de con un 5 % de CO<sub>2</sub> a 37 °C. Tras 24 horas se procedió a realizar el protocolo de diferenciación. Para ello se utilizó un cóctel de diferenciación basado en una modificación de Blumenfeld y colaboradores (148), compuesto por 1 µM de dexametasona, 500 µM de IBMX, 50 µM de indometacina, 1 µM de rosiglitazona, y 250 nM de triiodotironina (T3), usado como control positivo. Por otro lado, 2 de las placas se incubaron con 20 µM de CDX. A los controles se les añadió DMSO como vehículo.

Los fragmentos se mantuvieron en cultivo durante 21 días, durante los cuales se realizaron cambios de medio regulares cada 48 o 72 horas, siempre suplementado con los factores de diferenciación arriba indicados. Transcurridas 3 semanas, los fragmentos se recogieron y determinó la adipogénesis a grasa beige mediante qPCR de *Ucp1*. [Fig.25].

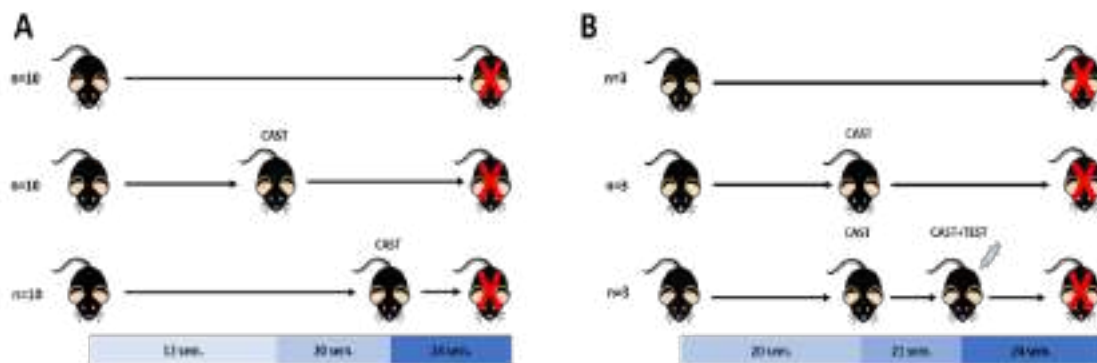


Figura 25. Protocolo de diferenciación adipogénica desde tejido adiposo blanco maduro hacia tejido adiposo beige.

### 3.3 Experimento de castración

Con el fin de eliminar casi completamente los andrógenos circulantes, se castraron animales de fenotipo salvaje (CON) y ratones transgénicos TRAMP, a las 12 y a las 20 semanas de edad (n=10). Para los correspondientes grupos de referencia, al mismo número de animales CON y TRAMP castrados a las 20 semanas se les inyectaron de forma subcutánea 2.5 mg/Kg de testosterona 7 días después de la castración. El andrógeno se disolvió previamente en etanol absoluto y se diluyó en aceite de sésamo hasta una concentración final de etanol del 1 %. A todos los animales castrados sin testosterona se les administró dicho vehículo. Durante el experimento, se registró el peso corporal de los animales una vez por semana. Todos los animales fueron finalmente sacrificados a las 24 semanas de edad [Fig.26]. Tras el sacrificio se registró el peso corporal de todos los animales y se extrajo la sangre, el tracto genitourinario (GU),

la grasa blanca epididimaria, perirrenal, subcutánea, y la grasa parda interescapular (iBAT). Se registró el peso de todos los tejidos, las grasas fueron ultracongeladas en nitrógeno líquido y almacenadas a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . La sangre se centrifugó posteriormente a  $3.000\text{ xg}$  durante 10 minutos a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , separando así el plasma de la fracción celular. El GU fue dividido en próstata y vesículas seminales. A su vez, la próstata fue dividida a la mitad y una porción junto con una de las vesículas seminales fue ultracongelada, mientras que la otra se fijó en PFA al 4 %.

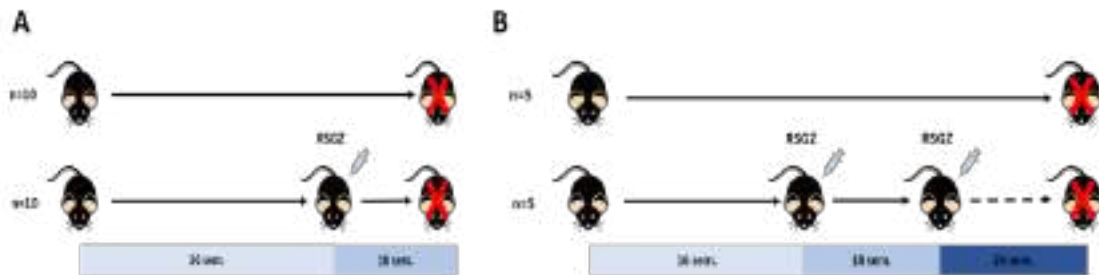


**Figura 26.** Diseño experimental de los experimentos de castración quirúrgica en animales CON y TRAMP. (A) Representación esquemática del diseño de castración durante 4 y 12 semanas. (B) Diseño experimental del experimento de reposición de andrógenos.

### 3.4 Experimento de tratamiento con rosiglitazona

Con el fin de inducir pardeamiento de grasa blanca *in vivo* se realizó un experimento de tratamiento con rosiglitazona (RSGZ). Se emplearon animales de 16 semana de edad que se dividieron al azar en 4 grupos experimentales: Controles (CON), controles tratados con rosiglitazona ( $\text{CON}^{\text{RSGZ}}$ ), TRAMP y tratados con rosiglitazona ( $\text{TRAMP}^{\text{RSGZ}}$ ). A los animales tratados se les administró una dosis diaria de  $10\text{ mg/Kg}$  de RSGZ durante 10 días disuelta en DMSO y diluida en PBS pH 7.4 filtrado hasta una concentración final de DMSO al 1 %. A los animales control se les inyectó el vehículo. Tras 10 días de tratamiento, 10 animales de cada grupo experimental se sacrificaron, los 20 animales restantes se sacrificaron a las 24 semanas de edad. En estos últimos animales, tras los 10 días de tratamiento continuado, la RSGZ se inyectó cada 72h hasta el sacrificio. Durante el experimento se registró el peso corporal de los animales una vez por semana. [Fig.27]. Tras el sacrificio se registró el peso corporal de todos los animales y se extrajo la sangre, el tracto genitourinario, la grasa blanca epididimaria (eWAT), perirrenal, subcutánea, y la grasa parda interescapular. Se registró el peso de todos los

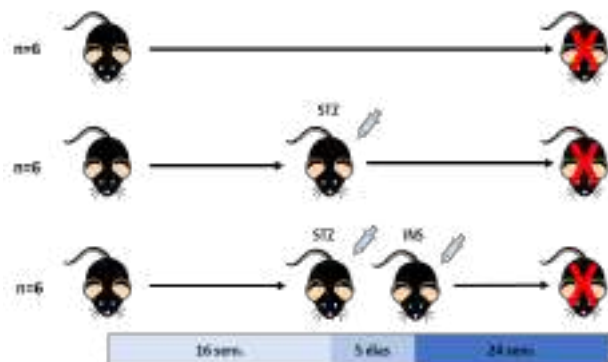
tejidos, las grasas fueron ultracongeladas en nitrógeno líquido y almacenadas a -80 °C. La sangre se centrifugó posteriormente a 3.000 xg durante 10 minutos a 4 °C separando así el plasma de la fracción celular. El GU fue dividido en próstata y vesículas seminales. A su vez, la próstata fue dividida a la mitad y una porción junto con una de las vesículas seminales fue ultracongelada, mientras que la otra se fijó en PFA al 4 %.



**Figura 27. Diseño experimental de los experimentos de tratamiento con RSGZ en CON y TRAMP.** (A) Representación esquemática del diseño de tratamiento con RSGZ durante 10 días. (B) Diseño experimental del experimento de tratamiento con RSGZ durante 6 semanas.

### 3.5 Inducción de diabetes tipo I

Animales TRAMP de 16 semanas de edad fueron divididos en tres grupos experimentales. 12 animales recibieron una dosis diaria de 50 mg/Kg de estreptozotocina (STZ) durante 5 días por inyección I.P. Tras 2 semanas del comienzo del experimento, 5 de los animales inyectados previamente con STZ



**Figura 28. Diseño experimental de la inducción de diabetes tipo I en animales TRAMP.**

fueron inyectados diariamente con una dosis de 0.6 U de Humulina 70:30. Para comprobar la eficiencia del tratamiento se analizó los niveles de glucemia en ayuno a los animales tras los 5 días de administración de la STZ. Esta comprobación se repitió a las 20 semanas y en el momento del sacrificio. Se consideró que un animal presentaba diabetes tipo I cuando sus niveles de glucemia eran superiores a 250 mg/dL durante 3 días consecutivos, para ello se utilizó un glucómetro OneTouchUltraEasy™. Los animales que superaban valores superiores a los 500 mg/dL fueron descartados. El tratamiento con insulina se prolongó durante 6 semanas hasta el sacrificio a las 24 semanas de edad

[Fig.28]. El efecto de la insulina se comprobó mediante análisis de los niveles circulantes de glucosa a las 2, 6 y 24 horas después de la inyección. Durante el experimento se registró el peso corporal de los animales una vez por semana. Tras el sacrificio se registró el peso corporal de todos los animales y se extrajo la sangre, el tracto genitourinario (GU), la grasa blanca epididimal (eWAT), perirrenal (prWAT). Se registró el peso de todos los tejidos, las grasas fueron ultracongeladas en nitrógeno líquido y almacenadas a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . La sangre se centrifugó posteriormente a  $3.000\times g$  durante 10 minutos a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  separando así el plasma de la fracción celular. El GU fue dividido en próstata y vesículas seminales. A su vez, la próstata fue dividida a la mitad y una porción junto con una de las vesículas seminales fue ultracongelada, mientras que la otra se fijó en PFA al 4%. Se extrajeron también los páncreas de los animales para confirmación de la atrofia en los islotes de Langerhans.

### 3.6 Tratamiento con melatonina

Se seleccionaron al azar animales TRAMP de 16 semanas de edad. Al grupo experimental ( $n=6$ ) se les administró  $20\text{ mg/Kg}$  de melatonina en el agua de bebida, con una concentración final de 1 % de etanol. La bebida se cambió cada 2 días. Los animales



Figura 29. Diseño experimental de la administración de melatonina in vivo en animales TRAMP.

del grupo control de TRAMP recibieron igualmente 1 % de etanol en el agua de bebida. Durante el experimento se registró el peso corporal de los animales una vez por semana. Los animales se sacrificaron a las 24 semanas [Fig.29]. Tras el sacrificio se registró el peso corporal de todos los animales, se extrajo la sangre, el tracto genitourinario (GU), la grasa blanca epididimaria, perirrenal. Se registró el peso de todos los tejidos, las grasas fueron ultracongeladas en nitrógeno líquido y almacenadas a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . La sangre se centrifugó posteriormente a  $3.000\text{ }xg$  durante 10 minutos a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  separando así el plasma de la fracción celular. El GU fue dividido en próstata y vesículas seminales. A su vez, la próstata fue dividida a la mitad y una porción junto con una de las vesículas seminales fue ultracongelada, mientras que la otra se fijó en PFA al 4 %.

### 3.7 Generación de tumores subcutáneos mediante aloinjertos

Células TRAMP-C1 y TRAMP-C1<sup>Luc</sup> se distribuyeron en 4 matraces de cultivo T75. Cuando las células alcanzaron la confluencia se recogieron por tripsinización utilizando una solución 0.05 % de tripsina-EDTA, se centrifugaron a 500 xg durante 5 minutos y se contaron mediante una cámara de Neubauer. Para la preparación de los aloinjertos se recogieron  $1 \times 10^6$  células (TRAMP-C1 o TRAMP-C1<sup>Luc</sup>) y fueron diluidas en PBS pH 7.4. Esta suspensión de células se mezcló en un tubo Eppendorf con Matrigel® de alta concentración, en una proporción 1:1. Dentro de esta suspensión se colocó un fragmento de tejido adiposo blanco o beige que previamente había sido cultivado siguiendo el procedimiento del cultivo organotípico mencionado anteriormente. En el grupo control el aloinjerto no contenía ningún tipo de tejido adiposo.

La implantación de los tumores se realizó utilizando 4 animales control. Estos animales fueron previamente pesados y se procedió a administrarles por vía inhalatoria una mezcla de isoflurano más O<sub>2</sub> como anestésico. Una vez sedados se retiró el pelo dejando la piel a la vista. Sobre la piel se realizaron dos pequeñas incisiones a nivel de ambos flancos. Los aloinjertos preparados anteriormente fueron aspirados con la ayuda de una pipeta y se depositaron en la zona subcutánea expuesta de los ratones. Finalizada la cirugía, los animales se suturaron y se retiraron de la fuente de anestésico para su recuperación [Fig.30].

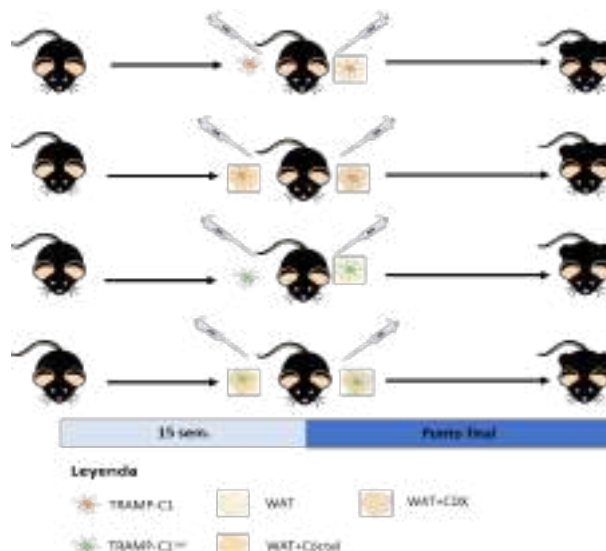


Figura 30. Diseño experimental del modelo de aloinjerto de tumores prostáticos subcutáneos en animales control.

Durante el experimento se registró el peso corporal de los animales una vez por semana. Además, dos veces por semana se registraron las medidas de los ejes mayores y menores de los tumores implantados, utilizando estos para calcular el volumen tumoral en base a la fórmula  $V = (\text{Eje mayor} \times \text{Eje menor}^2) / 2$ .

Adicionalmente, a los animales a los que se les administraron células TRAMP-C1<sup>Luc</sup>, se les realizó un seguimiento del desarrollo de los tumores mediante visualización de la luminiscencia generada por la actividad de la luciferasa. Para ello, 10 minutos antes de la visualización se les administró a los animales una dosis intraperitoneal de 150 mg/Kg de peso de D-luciferina. Tras esto y bajo anestesia con isoflurano se analizaron los niveles de luminiscencia de los animales en un sistema IVIS®. Las imágenes se registraron con un tiempo de exposición de 5 minutos.

#### **4. ANALISIS ESTADÍSTICO**

Todos los datos graficados o tabulados en el presente estudio se representan como la media  $\pm$  el error estándar de la media (EEM), o bien como el área bajo la curva (AUC). Bajo una distribución normal, las diferencias se estimaron mediante un análisis ANOVA de una vía, seguida de un estudio 'post-hoc' para varios grupos experimentales, mediante un Student-Newman-Keuls (Test-t). Cuando las muestras no seguían una distribución normal, se realizó un análisis de ANOVA en rangos seguido de un estudio post-hoc 'Kruskal-Wallis'. Para estandarizar los análisis estadísticos, se utilizó '\*' para denotar una  $p < 0.05$ , '\*\*',  $p < 0.01$ , '\*\*\*',  $p < 0.001$  y '\*\*\*\*' para una  $p < 0.0001$ .





# RESULTADOS

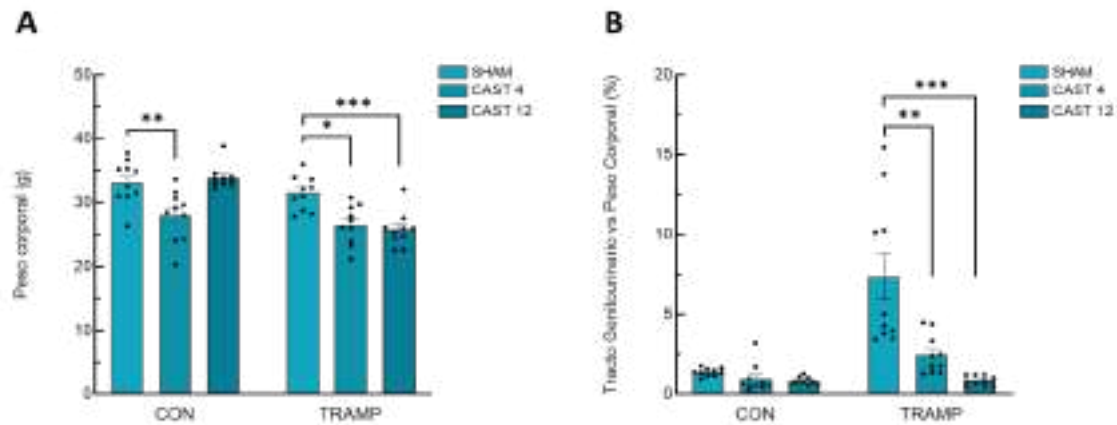


## 5. Castración y microambiente tumoral en la próstata

### 5.1 La castración provoca un aumento de la grasa parda/beige en el microambiente tumoral, a la vez que una reversión del fenotipo tumoral.

La primera aproximación terapéutica en el cáncer de próstata es la terapia antihormonal. Dado que los andrógenos son claves no solo en la homeostasis y funcionamiento de la próstata sino que su señalización es importante en la distribución de los depósitos de grasa a lo largo del organismo, se decidió estudiar el papel de la retirada de andrógenos sobre el epitelio y el microambiente normal y tumoral de la próstata, prestando atención específicamente al contenido de tejido adiposo periprostático, así como a los posibles adipocitos que se pueden encontrar en el parénquima glandular.

En primer lugar, se realizó una orquiectomía bilateral durante 4 o durante 12 semanas y se estudiaron las características anatómicas e histológicas de la próstata. En cuanto al análisis del peso corporal y del peso del tracto urogenital, se observó que en los animales control se produce una caída del peso corporal en el grupo castrado durante 4 semanas, mientras que en la castración a más largo plazo no muestra diferencias significativas con los animales no castrados. Sin embargo, si se produce una caída significativa del peso de los animales TRAMP castrados respecto de los animales TRAMP con cirugía simulada [Fig.31A]. Para valorar el crecimiento tumoral se registró la relación entre el peso del tracto genitourinario y el peso corporal. En los animales no transgénicos la castración no tuvo ningún efecto sobre el peso del tracto genitourinario. Sin embargo, en los ratones TRAMP, la castración tanto tras 4 como tras 12 semanas provocó una caída significativa del peso relativo del tracto en comparación con los animales operados de forma simulada [Fig.31B].

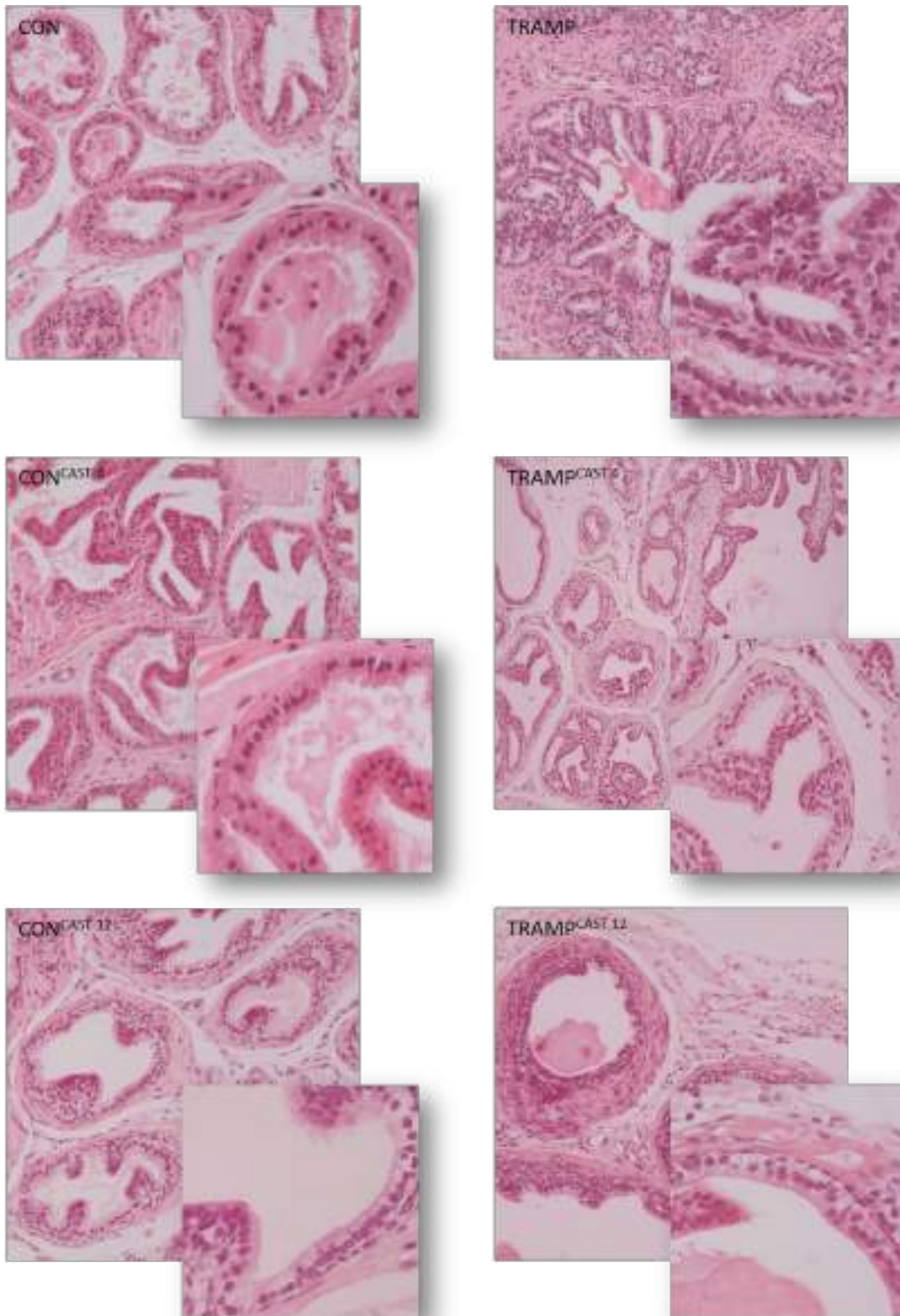


**Figura 31. Efecto de la castración sobre el peso de los animales control (CON) y transgénicos (TRAMP).** (A) Peso corporal. (B) Relación entre el peso del tracto genitourinario y el peso corporal, expresados en % del total del peso corporal, en animales con cirugía simulada (SHAM) o castrados 4 (CAST 4) o 12 semanas (CAST 12). Los datos se representan como la media  $\pm$  EEM, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$

Histológicamente se observa como las glándulas de los animales control presentaron un epitelio cúbico simple con un núcleo redondeado central bien definido. En el estroma se aprecia un tejido conjuntivo laxo, con poca celularidad. En estos animales, la castración aumentó la cantidad de tejido conjuntivo, se aprecia un tejido conjuntivo más denso en la periferia de las glándulas y un aumento de la celularidad. Además, algunas de las glándulas mostraron un epitelio cubico simple con un núcleo bien definido, en posición basal [Fig.32].

Como se esperaba, en los animales TRAMP se observa un claro fenotipo tumoral caracterizado histopatológicamente por un aumento del número de pequeñas glándulas, donde el epitelio presenta un aumento de la celularidad marcado por la presencia de un mayor número de núcleos hiper cromáticos. Las células epiteliales se disponían conformando un epitelio prismático con núcleos basales y en algunos casos estos núcleos presentaban una morfología elongada característica del tejido tumoral. En cuanto al estroma, se observa un aumento de la densidad y celularidad de este en comparación con los animales control. En los animales TRAMP, la castración revirtió el fenotipo tumoral, se observa atrofia glandular sin llegar a apreciar en la mayoría de las glándulas signos de malignidad histopatológica. Las glándulas de los animales TRAMP castrados presentaron epitelios cúbicos o prismáticos, con núcleos redondeados y bien definidos. El tejido conjuntivo observado en la periferia de las glándulas es denso, mientras que en las regiones más alejadas se aprecia una clara disminución del

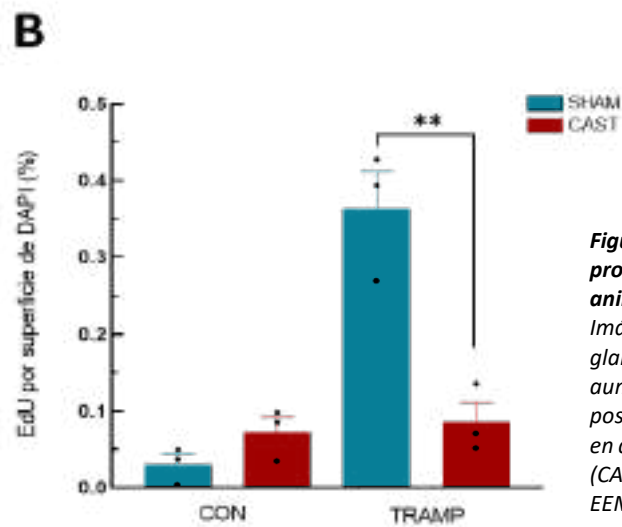
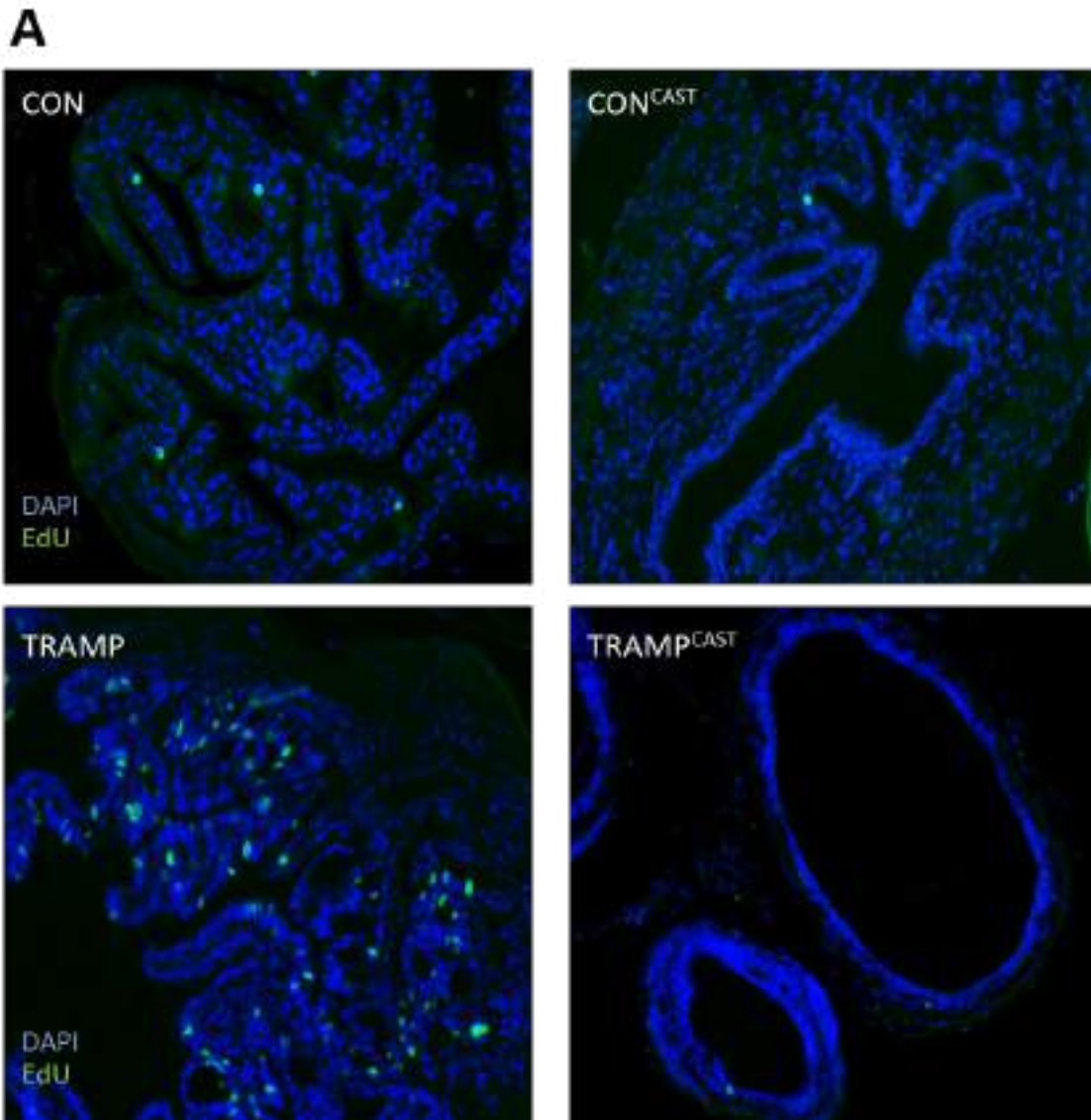
contenido fibroso y de la celularidad, semejante al observado en una glándula normal no patológica [Fig.32].



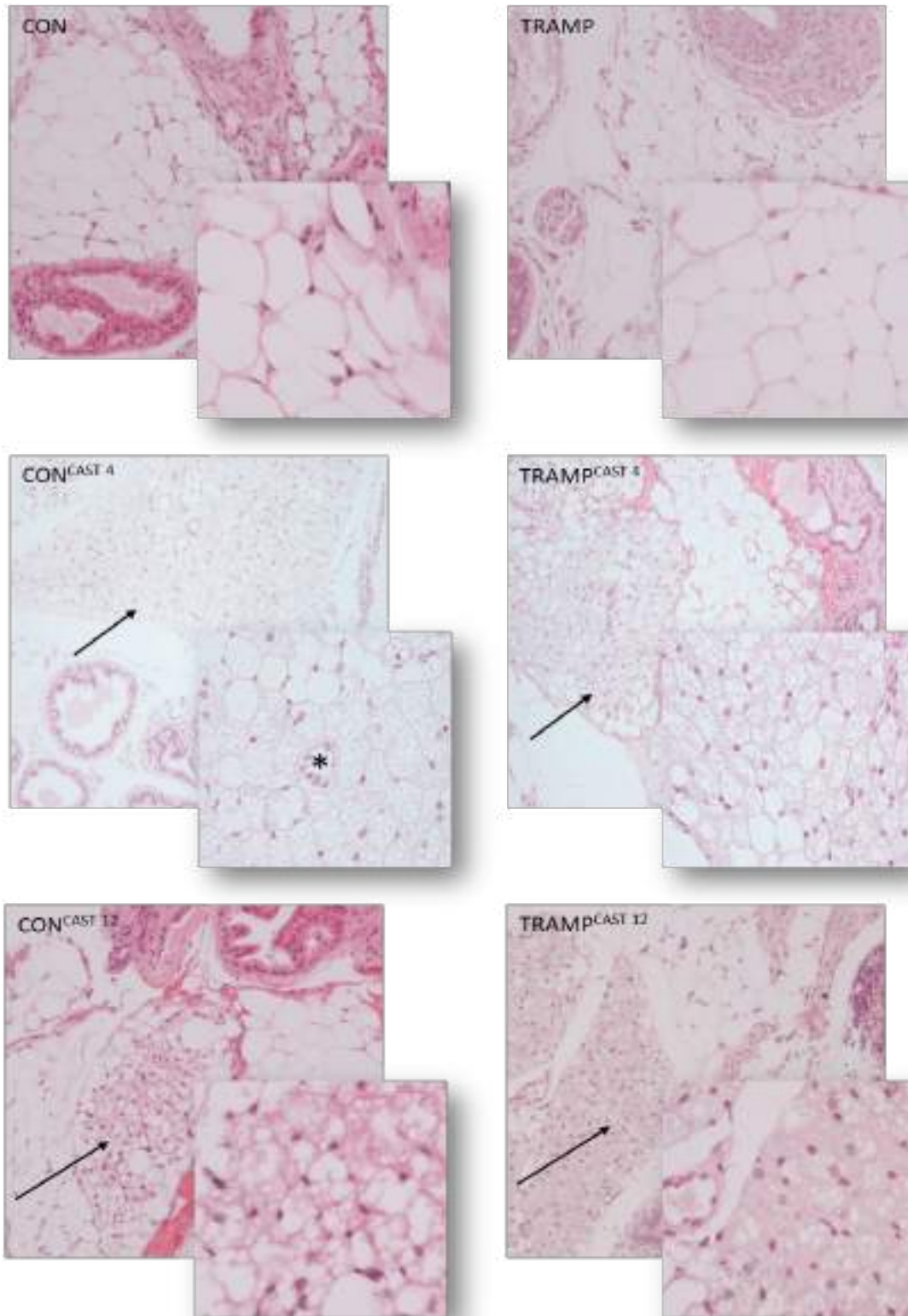
**Figura 32. Efecto de la castración sobre el epitelio prostático.** Imágenes representativas teñidas con hematoxilina-eosina de secciones de próstata de los animales control (CON) y transgénico (TRAMP) en respuesta a la castración tras 4 (CAST 4) o 12 semanas (CAST 12). En detalle se muestran las características de los epitelios prostáticos de cada uno de los grupos. Imágenes tomadas a 100 y 400 aumentos.

Tras observar una reducción significativa del peso del tracto genitourinario con la castración, se valoró a nivel histológico, mediante 'click chemistry' las alteraciones de proliferación de las células epiteliales prostáticas. Para ello se inyectó EdU 4 horas antes del sacrificio de animales controles y castrados durante 4 semanas. Se comprobó así que la relación observada en los pesos mostrados anteriormente se mantuvo a nivel celular. Tanto en los animales control como en castrados, no se observaron glándulas con un número elevado de células positivas para EdU, lo cual indica una baja tasa de proliferación. Por el contrario, en los animales TRAMP, las glándulas mostraron una elevada tasa de proliferación activa, la cual se redujo significativamente tras la castración [Fig.33A]. Estas observaciones fueron confirmadas mediante cuantificación del número de células positivas para EdU respecto de la superficie total ocupada por los núcleos teñidos con DAPI en la glándula [Fig.33B].

Asociado con la reducción de la patología tumoral de la próstata, en los animales castrados se observaron también alteraciones en el tejido adiposo periprostático. A nivel histológico, se detectó la presencia de adipocitos multiloculares, característicos del tejido adiposo pardo/beige, distribuidos entre la grasa blanca periprostática. Estos adipocitos multiloculares fueron fácilmente distinguibles microscópicamente, dada su mayor eosinofilia ya que son más eosinófilos que el tejido adiposo blanco adyacente. Además, a 400 aumentos se puede apreciar claramente el núcleo redondeado ocupando una posición central en la célula, morfología típica de adipocitos pardos, que estaba rodeado por una gran cantidad de pequeñas gotas de grasa. Mientras que los adipocitos blancos presentan su núcleo elongado y la mayor parte del citoplasma de la célula es ocupado por una gran gota lipídica [Fig.34].



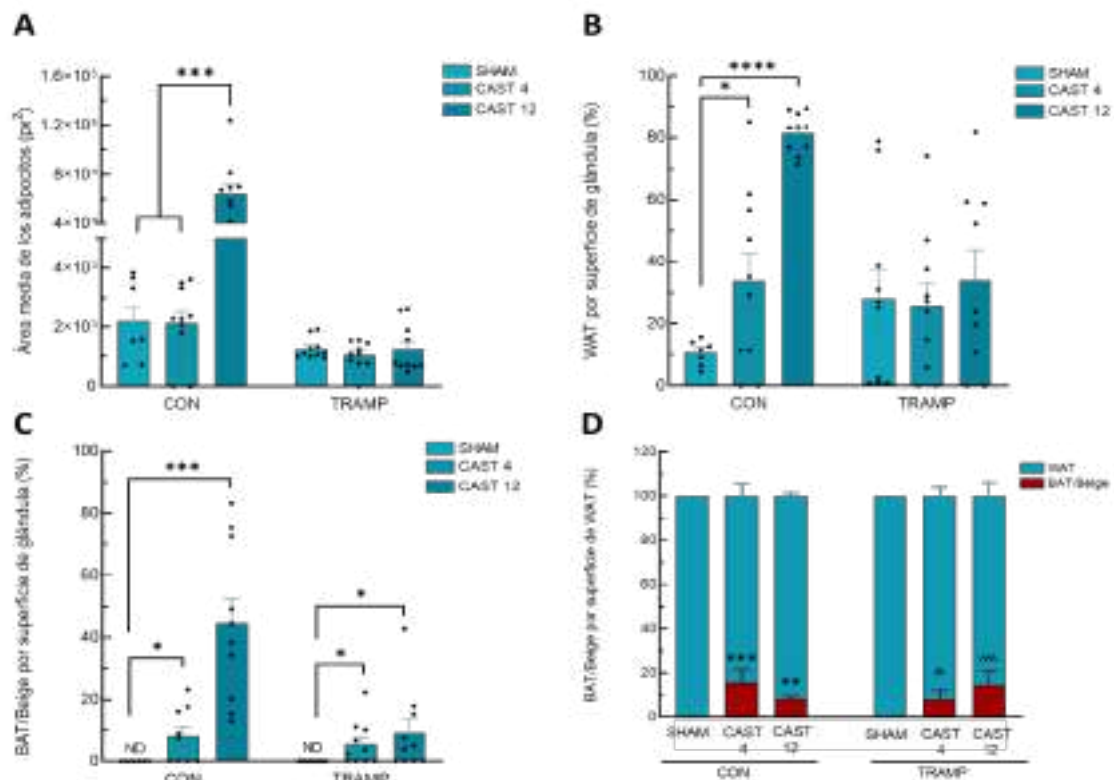
**Figura 33. Efecto de la castración sobre la proliferación de células epiteliales prostáticas de animales control (CON) y transgénicos (TRAMP).** (A) Imágenes de fluorescencia representativas de tejido glandular prostático. Imágenes tomadas a 200 aumentos. (B) Cuantificación del número de núcleos positivos para EdU respecto de la superficie de DAPI en animales con cirugía simulada (SHAM) y castrados (CAST). Los datos se representan como la media  $\pm$  EEM. \*\*  $p < 0.01$ .



**Figura 34. Efecto de la castración sobre el tejido adiposo periprostático.** Imágenes representativas teñidas con hematoxilina-eosina de secciones de próstata de animales control (CON) y transgénicos (TRAMP) en respuesta a la castración tras 4 (CAST 4) o 12 semanas (CAST 12). La flecha indica depósitos de grasa parda/beige. (\*) Vaso sanguíneo. En detalle se muestra la histología de los diferentes depósitos de tejido adiposo. Imágenes tomadas a 100 y 400 aumentos.

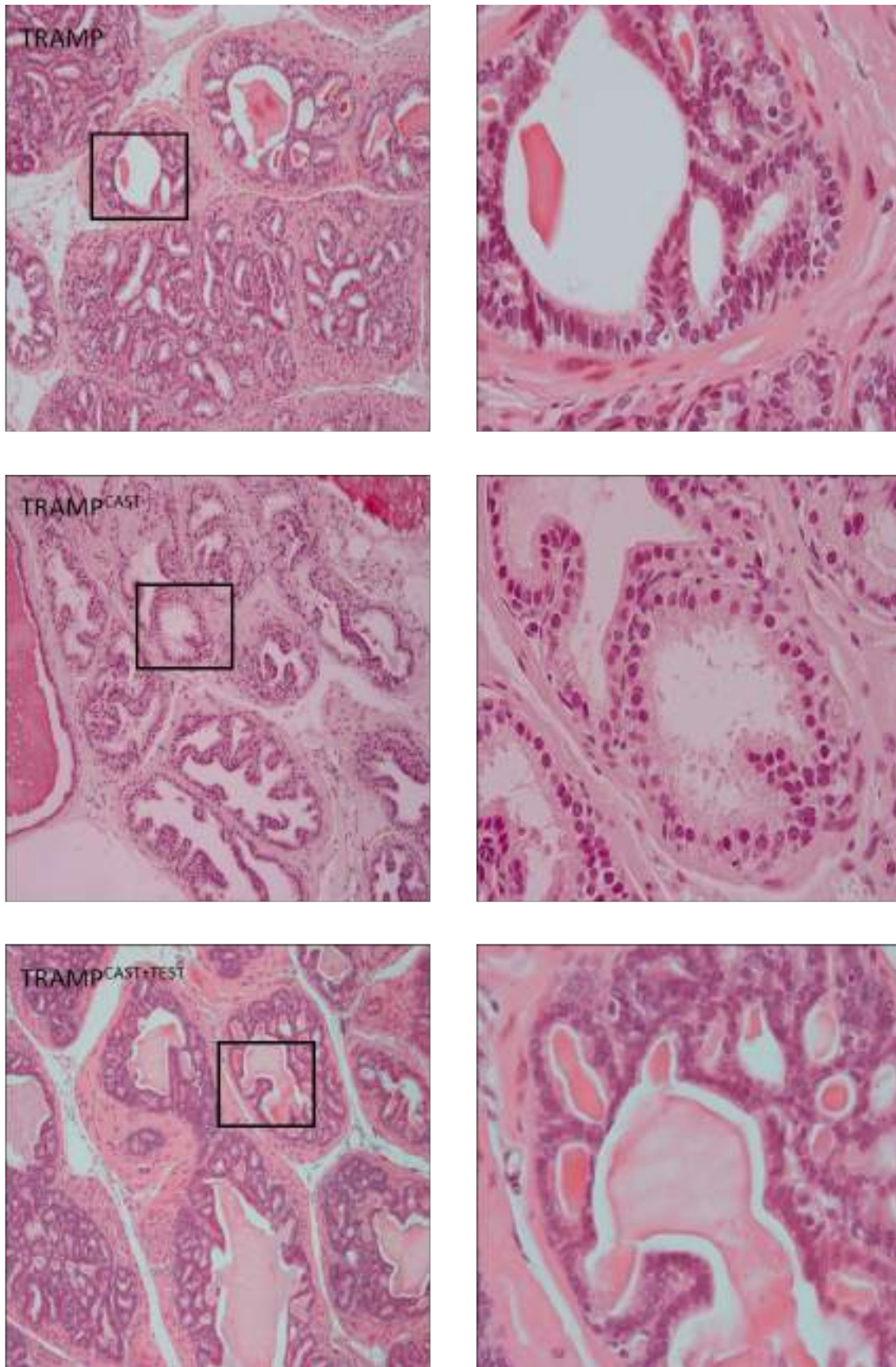


El análisis morfométrico mostró que el tejido adiposo periprostático de los animales control sometidos a castración durante 12 semanas contenía adipocitos de mayor tamaño que los adipocitos de los animales control con operación simulada, no ocurriendo así con los animales castrados durante 4 semanas. Por su parte, en los animales TRAMP no se observaron diferencias en cuanto al tamaño medio de los adipocitos tras la castración [Fig.35A]. En cuanto al contenido total de grasa blanca, en los animales control fue significativamente mayor tras la castración, a cualquiera de los tiempos empleados en este estudio, mientras que en los ratones transgénicos TRAMP no se apreciaron diferencias significativas tras la castración [Fig.35B]. Respecto al contenido de grasa parda/beige, esta aumentó significativamente en ambos grupos (control y TRAMP) tras la castración [Fig.35C]. Por último, se analizó la relación entre la cantidad de tejido pardo/beige y tejido blanco, y se comprobó como en ambos genotipos el contenido de grasa parda/beige aumentó significativamente con la castración [Fig.35D].



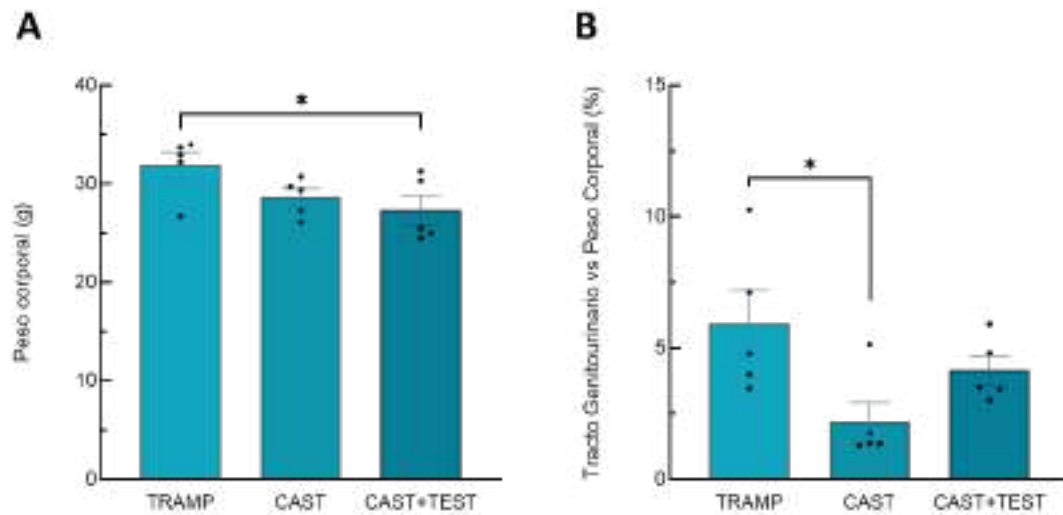
**Figura 35. Análisis morfométrico del tejido adiposo periprostático de animales control (CON) y transgénicos (TRAMP).** (A) Tamaño de los adipocitos blancos. (B) Superficie de grasa blanca respecto de la superficie total de glándula. (C) Superficie de grasa parda/beige respecto de la superficie total de glándula (ND) no detectable. (D) Relación entre la superficie de grasa parda/beige respecto de la superficie de grasa blanca en animales con cirugía simulada (SHAM) o castrados tras 4 (CAST 4) o 12 semanas (CAST 12). Los datos se representan como la media ± EEM. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ , ^^ $p < 0.01$ , ^^ $p < 0.001$

Para confirmar que los resultados obtenidos tras la castración estaban directamente relacionados con la señalización androgénica, se restituyó la presencia de andrógenos mediante inyección exógena de testosterona. En primer lugar, se estudió el efecto de la testosterona sobre la histología de la próstata. La administración de testosterona tras la castración recuperó el fenotipo proliferativo en la próstata, presentando una histología similar a la de los animales TRAMP operados de forma simulada, con abundantes glándulas de pequeño tamaño y presencia de núcleos elongados. El estroma observado en las glándulas de este grupo también fue muy similar al de los animales TRAMP [Fig.36].



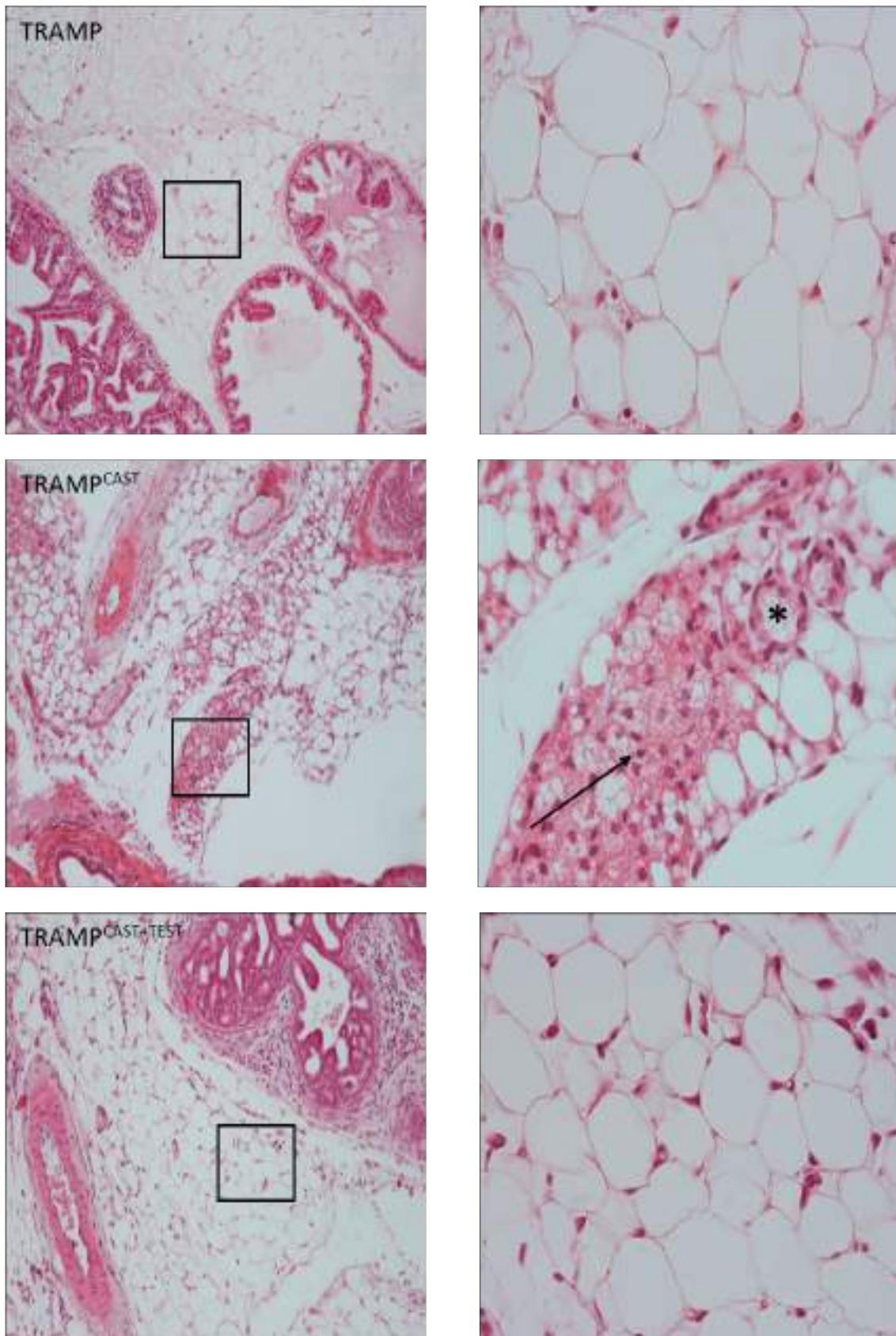
**Figura 36.** Efecto de la administración de testosterona sobre la histología de la próstata tumoral. Imágenes representativas teñidas con hematoxilina-eosina de secciones de próstata de animales TRAMP, TRAMP castrados (TRAMP<sup>CAST</sup>) y TRAMP castrados con testosterona (TRAMP<sup>CAST+TEST</sup>). Imágenes tomadas a 100 (izquierda) y 400 aumentos (derecha).

Al analizar los pesos de los animales tras la inyección de testosterona, se observó que el peso corporal de los animales mostró una ligera, aunque significativa, disminución [Fig.37A]. El peso del tracto se redujo significativamente tras la castración con respecto de los animales TRAMP intactos y la inyección de testosterona recuperó casi completamente esta caída [Fig.37B].



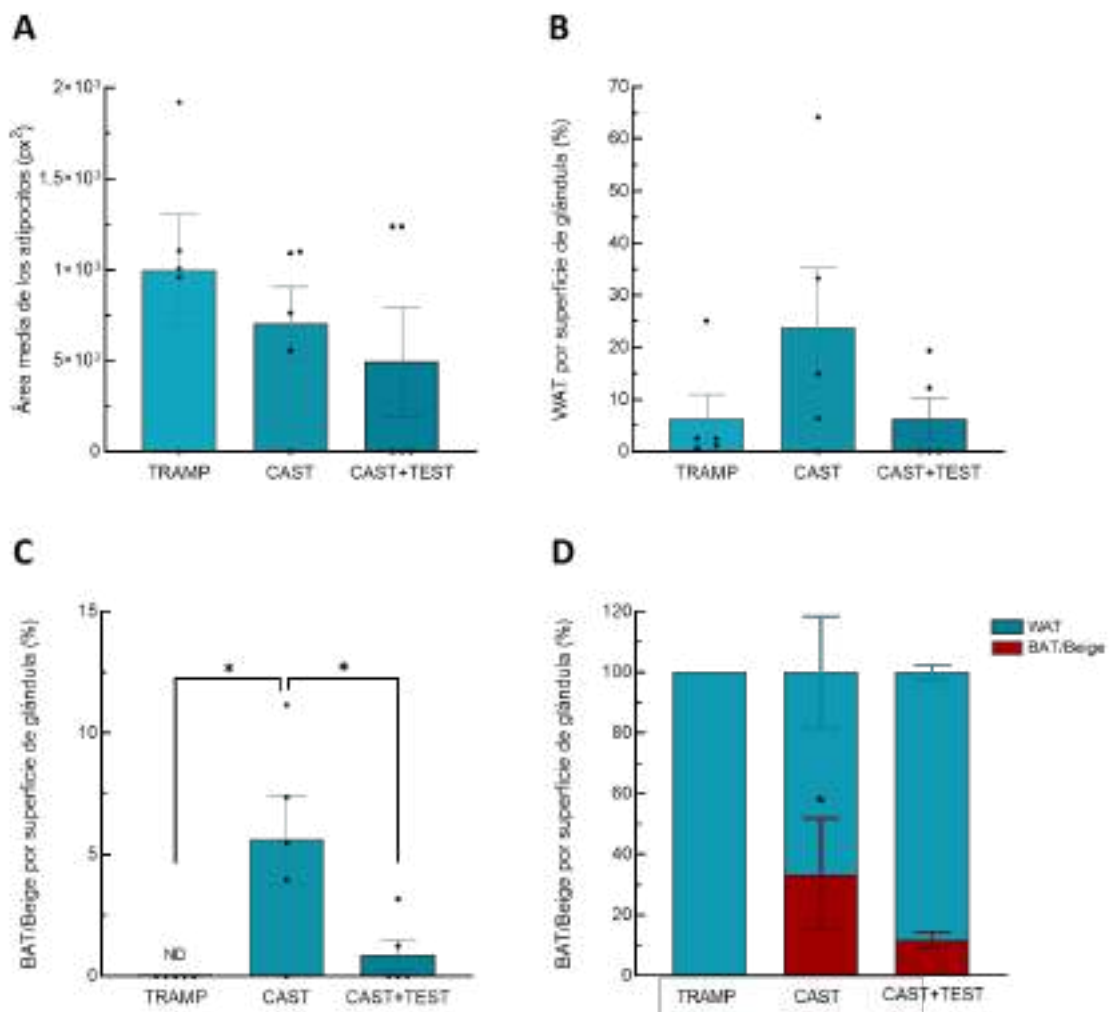
**Figura 37. Efecto de la castración y posterior administración de testosterona sobre el peso corporal y del tracto de animales TRAMP.** (A) Peso corporal. (B) Relación entre el peso del tracto genitourinario y el peso corporal expresados en % del total del peso corporal en animales TRAMP, TRAMP castrados (CAST) y TRAMP castrados con testosterona (CAST+TEST). Los datos se representan como la media  $\pm$  EEM, \*  $p < 0.05$ .

Para continuar con nuestro estudio sobre el tejido adiposo, a continuación, se analizó como la administración de testosterona exógena podría afectar al tejido adiposo periprostático del microambiente tumoral. Como se observó anteriormente, la castración indujo un aumento de los focos de grasa parda/beige en el tejido adiposo residente en el microambiente tumoral de la próstata, y la administración exógena de testosterona previno este incremento [Fig.38].



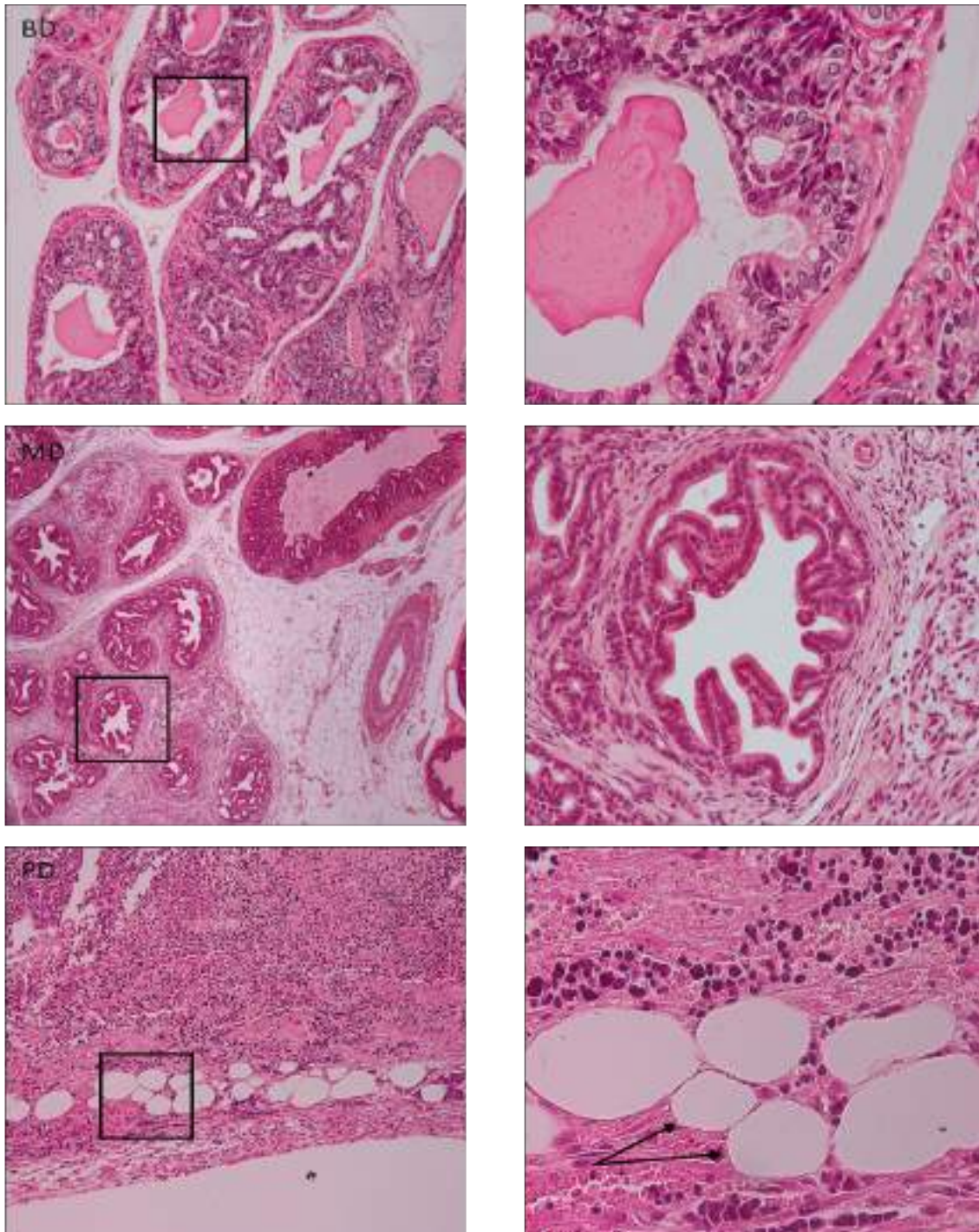
**Figura 38.** Efecto de la administración de testosterona sobre el tejido adiposo periprostático. Imágenes representativas teñidas con hematoxilina-eosina de secciones de próstata de animales TRAMP, TRAMP castrados (TRAMP<sup>CAST</sup>) y TRAMP castrados con testosterona (TRAMP<sup>CAST+TEST</sup>). La flecha indica depósitos de grasa parda/beige. (\*) Vaso sanguíneo. Imágenes tomadas a 100 (izquierda) y 400 (derecha) aumentos.

A nivel morfométrico, no se observaron diferencias ni en el tamaño medio de los adipocitos, ni en la superficie de grasa blanca respecto a la glándula [Fig.39A-B]. Sin embargo, tras la castración aumentaron significativamente los depósitos de tejido adiposo pardo/beige periprostático. Por su parte, la administración exógena de testosterona redujo estos depósitos adiposos significativamente, hasta niveles cercanos a los observados en el grupo TRAMP de referencia [Fig.39C]. Además, la relación entre el contenido en grasa blanca y grasa parda/beige, que aumentó significativamente tras la castración, se redujo significativamente en los animales castrados tratados con testosterona [Fig.39D].



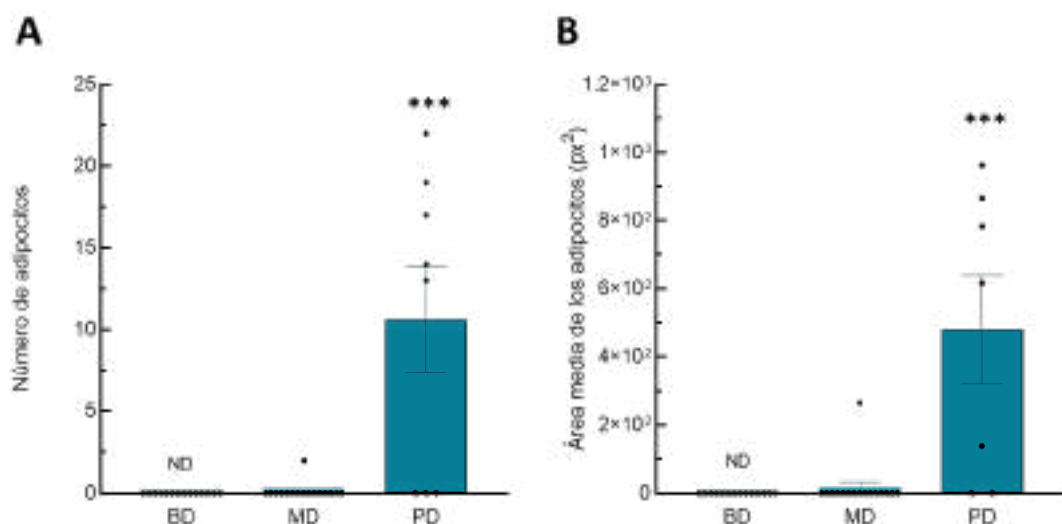
**Figura 39. Análisis morfométrico del tejido adiposo periprostático tras la castración y posterior administración de testosterona.** (A) Tamaño de los adipocitos blancos. (B) Superficie de grasa blanca respecto de la superficie total de glándula. (C) Superficie de grasa parda/beige respecto de la superficie total de glándula (ND) no detectable. (D) Relación entre la superficie de grasa parda/beige respecto de la superficie de grasa blanca de animales TRAMP, castrados (CAST) y TRAMP castrados con testosterona (CAST+TEST). Los datos se representan como la media ± EEM. \*  $p < 0.05$  vs TRAMP.

La importancia del tejido adiposo en la próstata tumoral quedó de manifiesto con la observación de que durante la progresión tumoral los animales presentaban adipocitos blancos intra tumorales. Estos adipocitos solo fueron detectados en tumores pobremente diferenciados, localizados en la periferia de los tumores, y se encontraban distribuidos bien de forma aislada, o en grupos de no más de 10 células [Fig.40].



**Figura 40. Identificación de adipocitos intra tumorales con la progresión tumoral en animales TRAMP de 24 semanas.** Las imágenes muestran regiones representativas de secciones de próstata con diferente estadificación histopatológica. Bien diferenciado (BD), moderadamente diferenciado (MD) y pobremente diferenciado (PD). Imágenes a 100 aumentos (izquierda) y 400 aumentos (derecha). Las flechas señalan adipocitos intra tumorales.

Se cuantificaron los adipocitos intra tumorales en los animales que, a su vez, fueron agrupados según el diagnóstico histopatológico. Así, se comprobó que apenas se encontraron adipocitos intra tumorales en los animales con tumores bien y moderadamente diferenciados, mientras que se observó un aumento significativo en animales con tumores pobremente diferenciados [Fig.41].

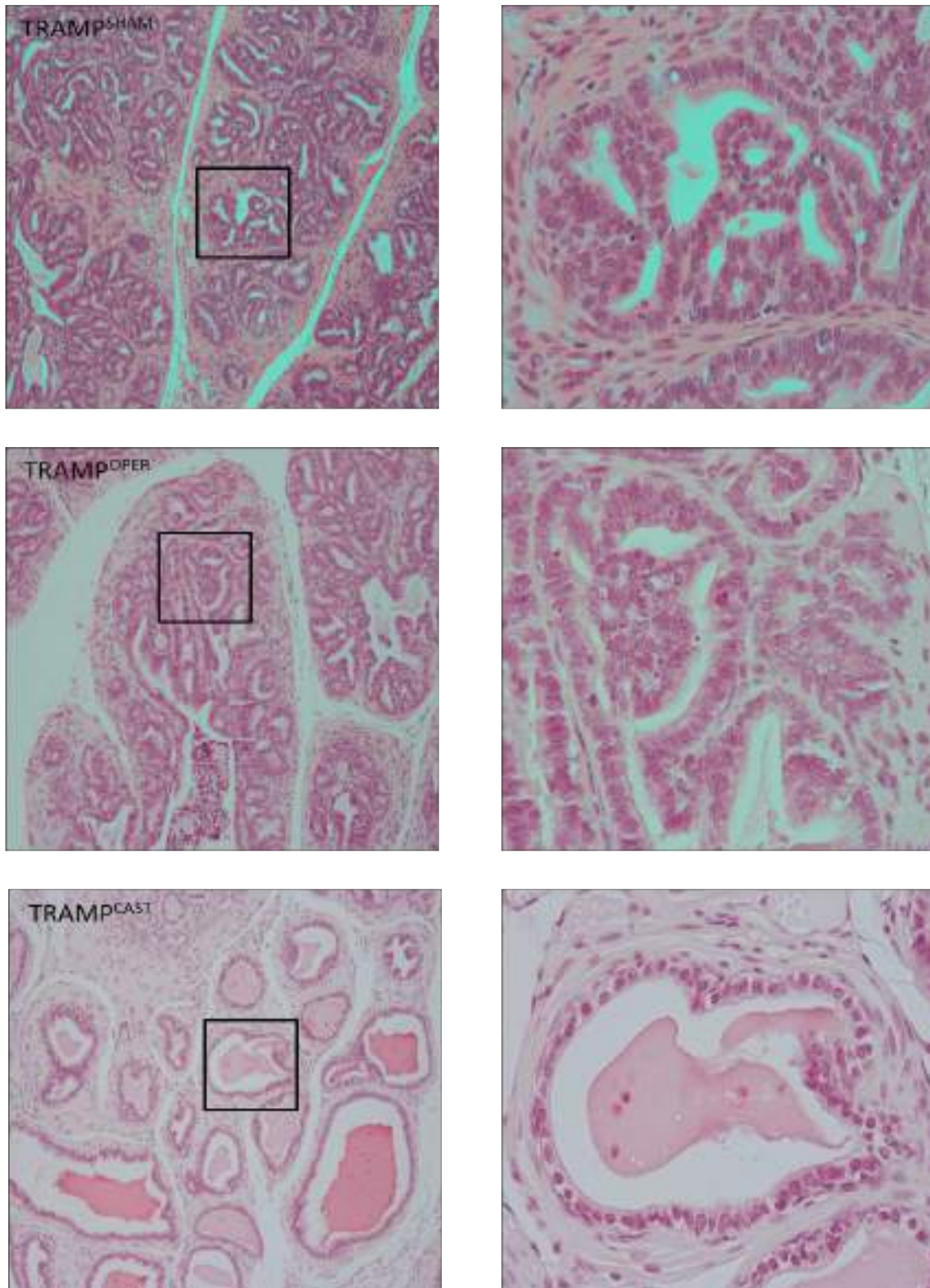


**Figura 41. Análisis morfológico de los adipocitos intra tumorales.** (A) Número de adipocitos intra tumorales en tumores de animales TRAMP de 24 semanas con diferente estadificación histopatológica. (B) Tamaño medio de los adipocitos intra tumorales de animales TRAMP de 24 semanas con diferente estadificación histopatológica. Bien diferenciado (BD), moderadamente diferenciado (MD) y pobremente diferenciado (PD). Los datos se representan como la media  $\pm$  EEM. \*\*\*  $p < 0.001$  vs BD y MD.

## 5.2 La retirada del tejido adiposo epididimario, reduce el peso del tracto genitourinario, sin afectar al contenido del tejido adiposo periprostático

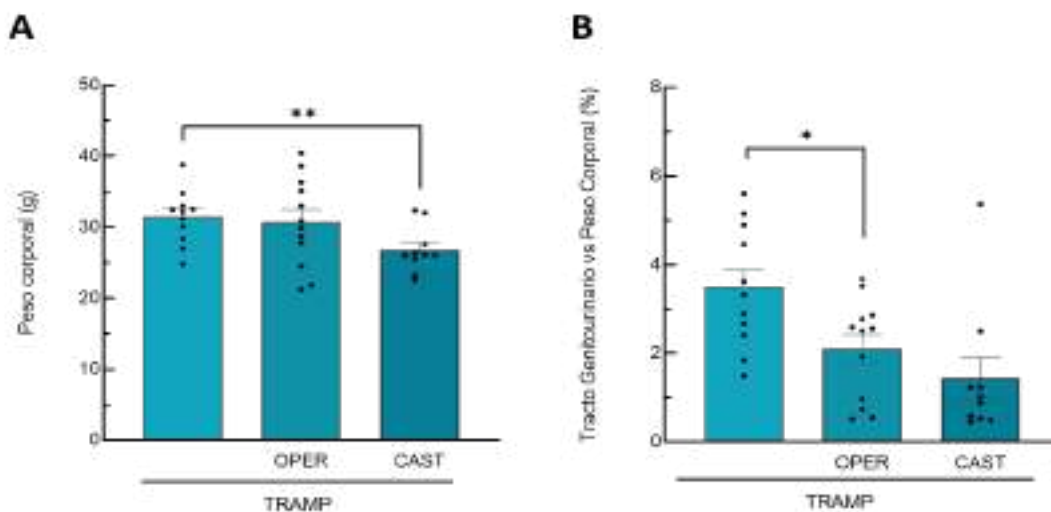
La presencia de adipocitos intra tumorales en las próstatas de los animales TRAMP, junto con el papel negativo que el tejido adiposo blanco desempeña en el desarrollo y progresión tumoral, favoreciendo la supervivencia y proliferación de las células tumorales, motivó el estudio del efecto de la retirada del tejido adiposo del epidídimo, uno de los depósitos de grasa mayoritarios en el ratón adulto. Se valoró como afectaba tanto a la progresión tumoral de la próstata, como al balance de grasa/parda respecto a la superficie de tejido glandular en el microambiente tumoral prostático. Histológicamente, la retirada del tejido adiposo del epidídimo no provocó cambios morfológicos sustanciales en las próstatas de los animales TRAMP. En estos animales, la glándula mantuvo un patrón de crecimiento maligno con una histología similar a la de los animales TRAMP con cirugía simulada [Fig.42].





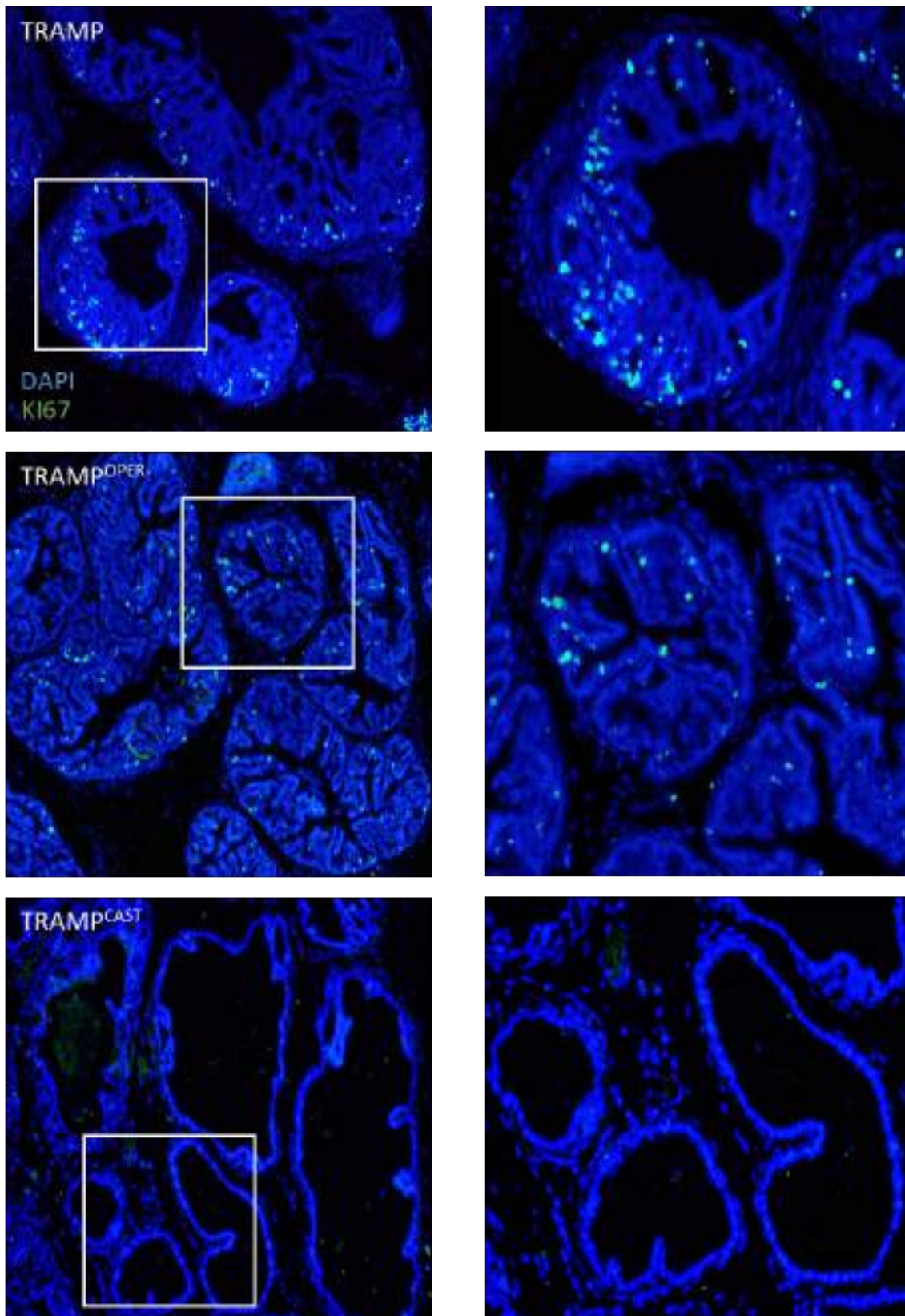
**Figura 42.** Efecto de la retirada del tejido adiposo epididimario sobre el epitelio prostático. Imágenes representativas teñidas con hematoxilina-eosina de secciones de próstata de animales TRAMP con cirugía simulada (TRAMP<sup>SHAM</sup>), TRAMP sin tejido adiposo epididimario (TRAMP<sup>OPER</sup>), y TRAMP castrados (TRAMP<sup>CAST</sup>). En detalle se muestran las características histológicas de los epitelios prostáticos de cada uno de los grupos. Imágenes tomadas a 100 (derecha) y 400 (izquierda) aumentos

Para confirmar los datos histológicos, se registraron las variaciones tanto del peso corporal como del peso del tracto urogenital tras la eliminación de la grasa epididimaria. En cuanto al peso de los animales, como era de esperar, se comprobó que los animales castrados pesan menos que los animales TRAMP intactos (operación simulada) o los animales TRAMP<sup>OPER</sup> [Fig.43A]. Sin embargo, en el peso del tracto genitourinario se observó una reducción significativa en los animales castrados y también en los animales TRAMP a los que se les había eliminado el tejido adiposo epididimario [Fig.43B].



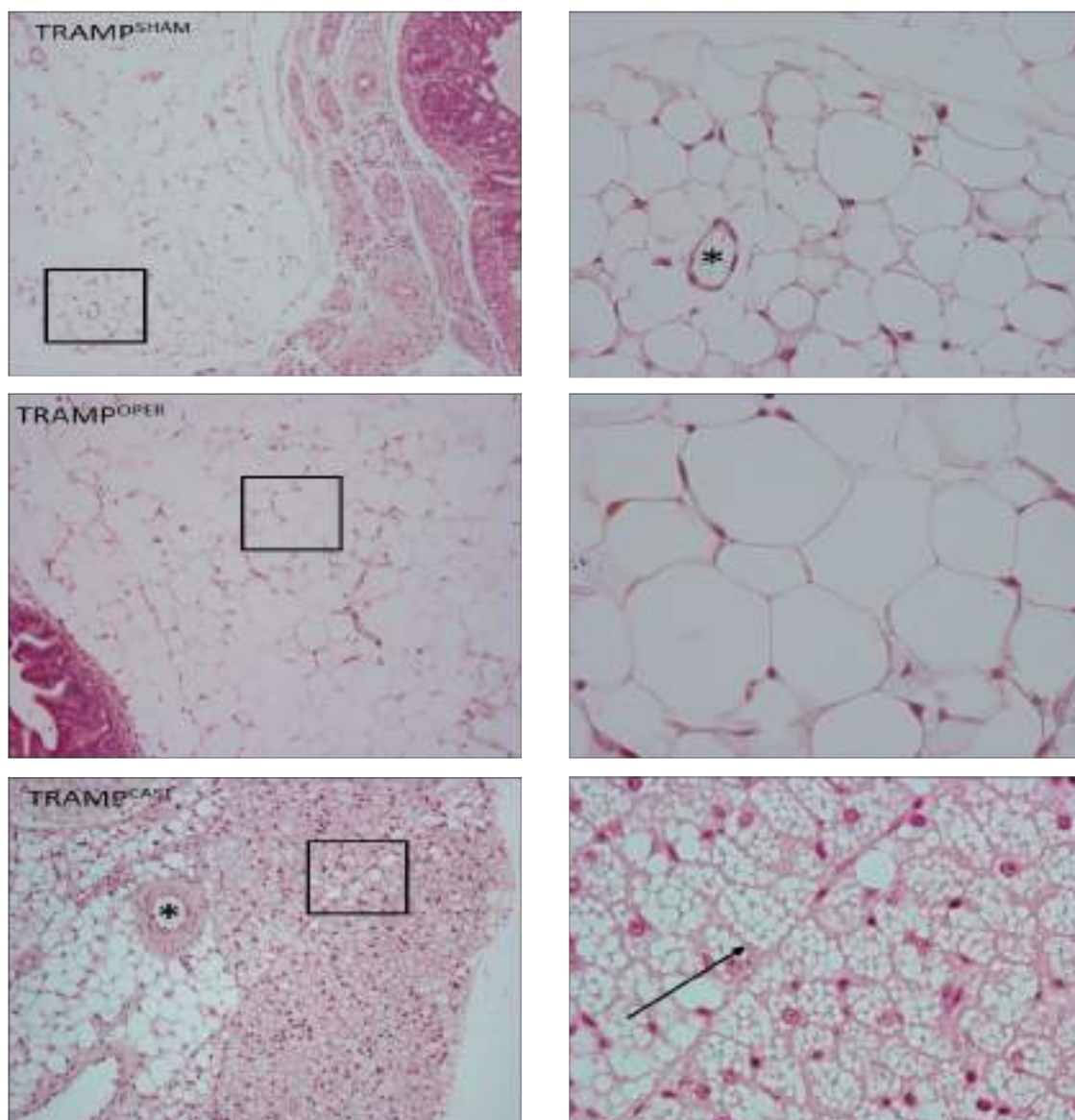
**Figura 43. Efecto la retirada de grasa epididimaria sobre el peso corporal y del tracto de animales TRAMP.** (A) Peso corporal. (B) Relación entre el peso del tracto genitourinario y el peso corporal expresados en % del total del peso corporal de animales TRAMP, TRAMP con retirada de grasa epididimaria (OPER) y TRAMP castrados (CAST). Los datos se representan como la media  $\pm$  EEM, \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ .

Al observar diferencias significativas en el peso de los tractos genitourinarios de animales TRAMP<sup>OPER</sup> se analizó si en el epitelio prostático se observaban diferencias a nivel proliferativo. Se estudió el estado proliferativo de las glándulas de ratones TRAMP, TRAMP<sup>OPER</sup> y TRAMP<sup>CAST</sup> mediante inmunofluorescencia del marcador nuclear Ki67. Observamos como tanto en los animales con operación simulada, como en los animales a los que se les eliminó la grasa, las glándulas presentaban un marcaje positivo para Ki67 en muchas de células epiteliales. [Fig.44].



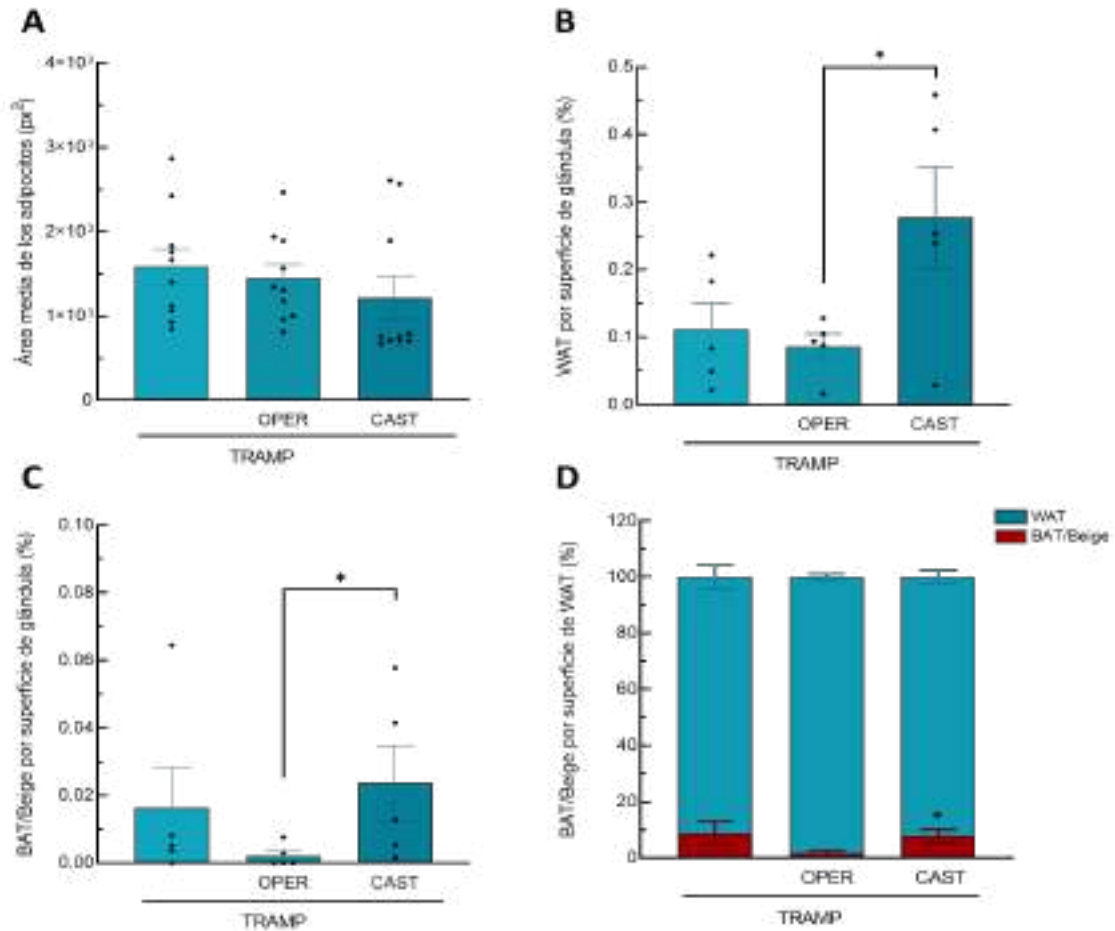
**Figura 44.** Efecto de la retirada de grasa epididimaria sobre los niveles de Ki67 en la próstata. Imágenes de inmunofluorescencia en animales TRAMP, TRAMP sin tejido adiposo epididimario (TRAMP<sup>OPER</sup>), y TRAMP castrados (TRAMP<sup>CAST</sup>). Imágenes tomadas a 100 (izquierda) y 200 (derecha) aumentos.

Como la eliminación de la grasa epididimaria alteraba el peso del tracto urogenital sin modificar el grado de proliferación del tejido epitelial en la próstata, se estudió el contenido en tejidos adiposo blanco y pardo/beige del microambiente tumoral en la próstata de animales TRAMP a los que se retiró la grasa epididimaria. En cuanto al tejido adiposo blanco periprostático, a nivel histológico no se detectaron diferencias aparentes entre los grupos. Tampoco se observaron diferencias en el enriquecimiento en tejido adiposo pardo/beige en los animales a los que se les eliminó la grasa epididimaria como si ocurre en el caso de los animales TRAMP castrados [Fig.45].



**Figura 45. Efecto de la retirada de tejido adiposo epididimario sobre el tejido adiposo periprostático.** Imágenes representativas teñidas con hematoxilina-eosina de secciones de próstata de animales TRAMP con cirugía simulada (TRAMP<sup>SHAM</sup>), TRAMP sin tejido adiposo epididimario (TRAMP<sup>OPER</sup>), y TRAMP castrados (TRAMP<sup>CAST</sup>). La flecha indica depósitos de grasa parda/beige (\*) Vaso sanguíneo. En detalle se muestran las características histológicas del tejido adiposo de cada uno de los grupos. Imágenes tomadas a 100 (derecha) y 400 (izquierda) aumentos.

Se cuantificó el tejido adiposo periprostático para comprobar si eliminar un depósito mayoritario de tejido graso provocaba una remodelación del tejido adiposo en la próstata. No se encontraron alteraciones en el tamaño medio de los adipocitos, ni el contenido tanto de grasa blanca por superficie de tejido epitelial, ni en los niveles de grasa parda/beige en relación con la eliminación de la grasa epididimaria [Fig.46].

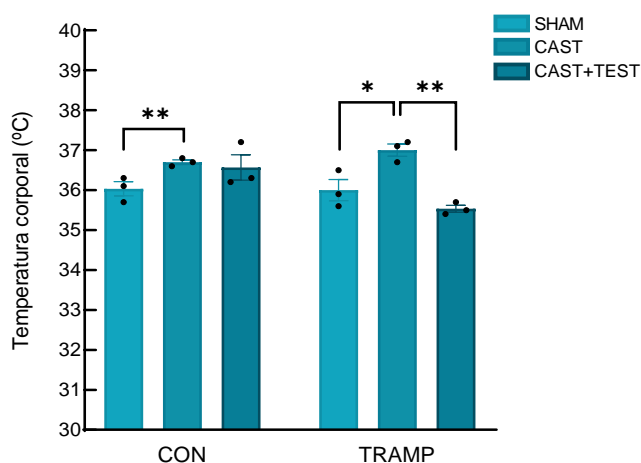


**Figura 46. Análisis morfométrico del tejido adiposo periprostático de animales TRAMP tras la retirada de grasa epididimaria.** (A) Tamaño de los adipocitos blancos. (B) Superficie de grasa blanca respecto de la superficie total de glándula. (C) Superficie de grasa parda/beige respecto de la superficie total de glándula. (D) Relación entre la superficie de grasa parda/beige respecto de la superficie de grasa blanca en animales TRAMP, TRAMP con retirada de grasa epididimaria (OPER) y TRAMP castrados (CAST). Los datos se representan como la media ± EEM. \* $p < 0.05$ .

### 5.3 La castración altera el metabolismo energético en los animales TRAMP

Puesto que la castración aumentó la cantidad de grasa parda/beige en el tejido adiposo y esta tiene un claro efecto en la termogénesis, se analizaron las variaciones en la temperatura corporal. Además, puesto que el tejido adiposo cumple un papel importante en la regulación de la homeostasis metabólica, se estudió mediante calorimetría indirecta de circuito abierto, el perfil metabólico de animales controles y animales TRAMP con la castración, y con la restitución de andrógenos mediante la administración exógena de testosterona. Para ello se analizó como cambió el consumo de oxígeno ( $VO_2$ ) y la producción de dióxido de carbono ( $VCO_2$ ) durante un ciclo de 24 horas. Estos datos nos proporcionaron además información adicional sobre la tasa de intercambio respiratorio (RER) y el gasto energético (EE).

El aumento de la temperatura corporal es uno de los fenómenos característicos asociados con el aumento en el contenido de grasa parda/beige. Se observó en ambos genotipos que la castración provocó un aumento significativo de la temperatura corporal. El

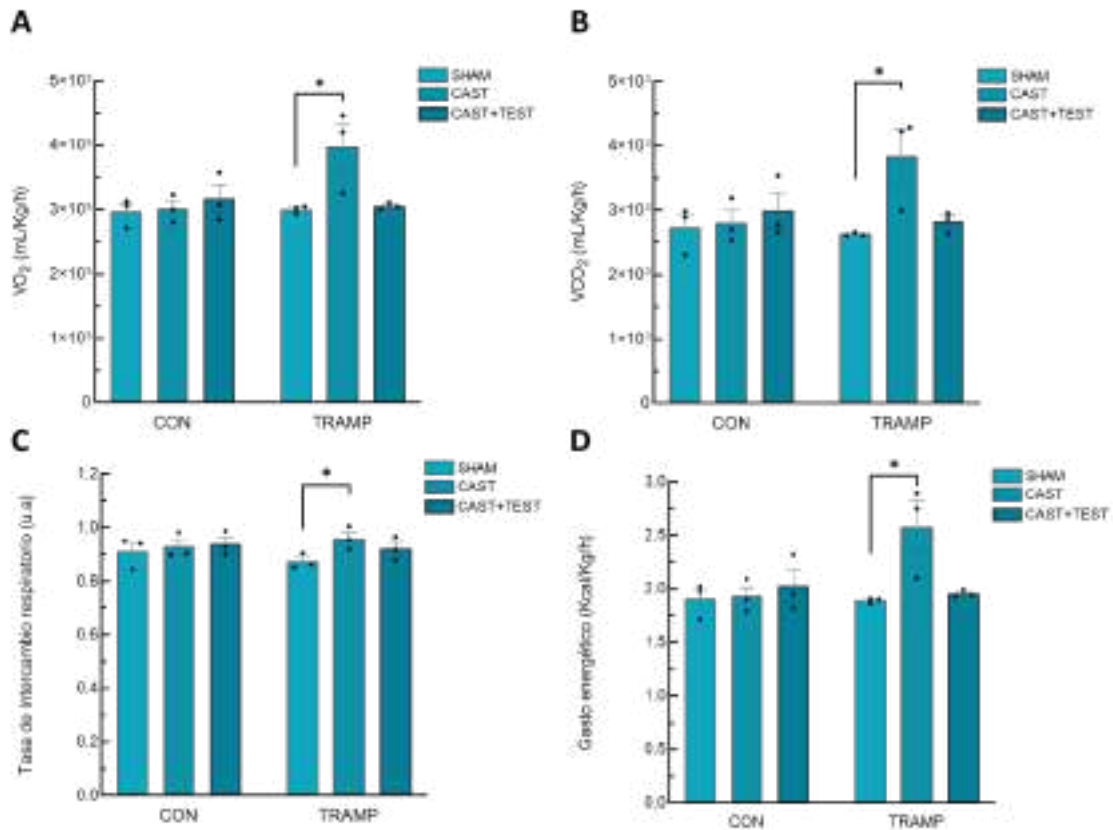


**Figura 47. Temperatura corporal registrada en animales de 24 semanas control (CON) o transgénicos (TRAMP), castrados (CAST) y tras el tratamiento con testosterona (CAST+TEST). Los datos se representan como la media  $\pm$  EEM. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .**

tratamiento con testosterona en los animales control no fue capaz de disminuir la temperatura, mientras que en los animales TRAMP ésta se redujo a los valores de los animales TRAMP con operación simulada [Fig.47].

No se observaron diferencias a nivel metabólico en los animales control, ni en el consumo de  $O_2$ , ni en la producción de  $CO_2$ , tras la castración, ni tras el tratamiento con testosterona. Sin embargo, en los animales TRAMP, la castración aumentó tanto el consumo de  $O_2$  como la producción de  $CO_2$  por parte de los ratones. [Fig.48A-B]. Este aumento se vio reflejado también en un aumento en la tasa de intercambio respiratorio

en los animales TRAMP castrados [Fig.48C], y en el gasto energético global normalizado frente al peso corporal de los animales [Fig.48D]. El tratamiento con testosterona restableció todos los parámetros analizados a los niveles observados en los ratones TRAMP con cirugía simulada.

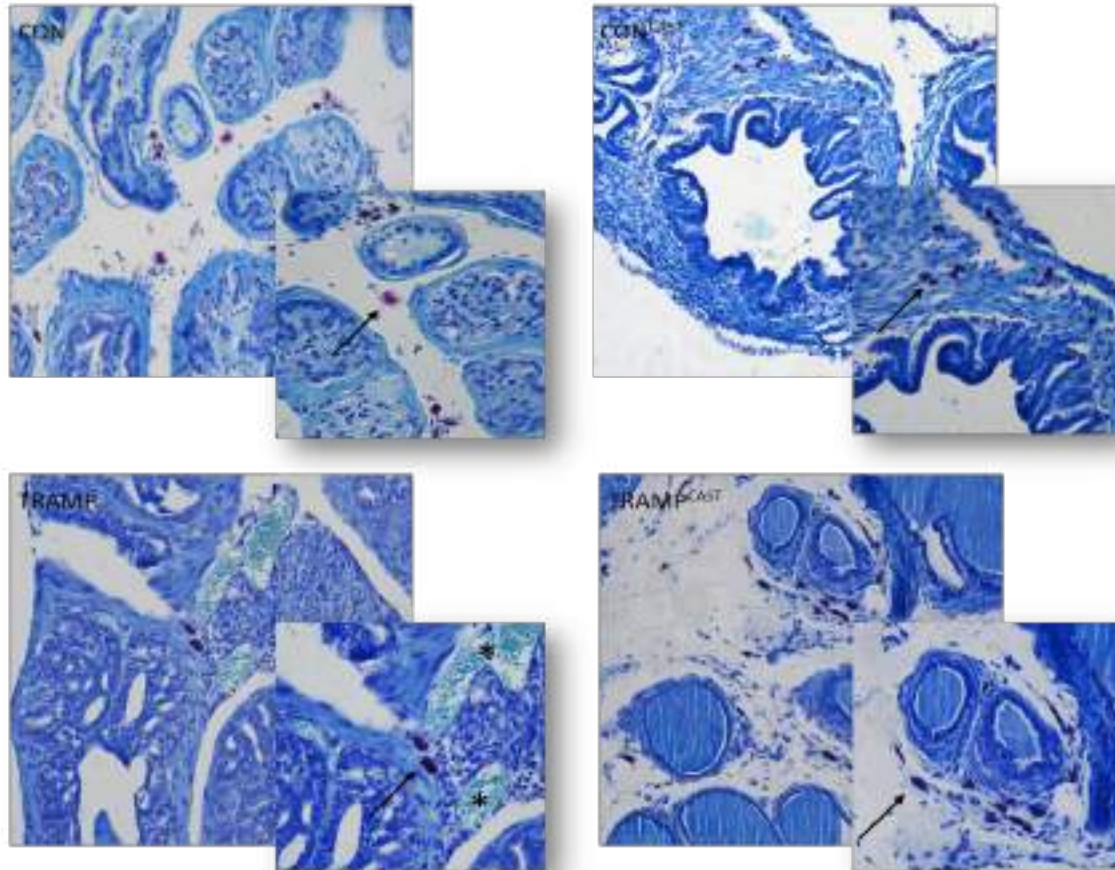


**Figura 48. Parámetros metabólicos en animales de 24 semanas control (CON) y transgénicos (TRAMP) tras la castración y tratamiento con testosterona.** (A) Niveles de consumo de oxígeno (VO<sub>2</sub>). (B) Producción de dióxido de carbono (VCO<sub>2</sub>). (C) Tasa de intercambio respiratorio (RER), (D). Animales con cirugía simulada (SHAM), castrados (CAST) y castrados tratados con testosterona (CAST+TEST) Los datos se representan como la media del área bajo la curva (AUC) ± EEM. \*p<0.05.

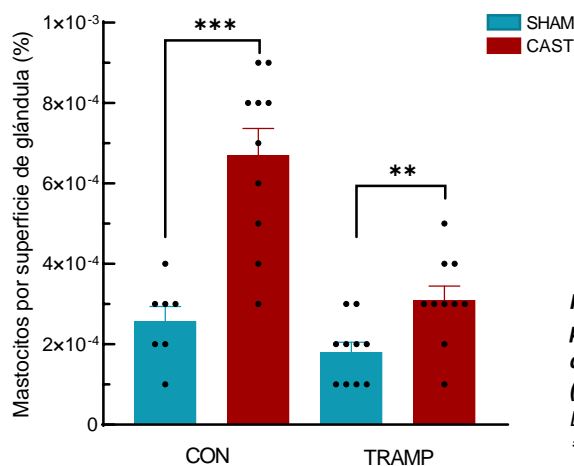
### 5.4 La castración aumenta el número de mastocitos y reduce el de macrófagos en el microambiente prostático

Las alteraciones en diferentes poblaciones de células del sistema inmune innato juegan un papel clave en la progresión tumoral en la próstata. Por ello se estudiaron las alteraciones en dos poblaciones presentes en el microambiente tumoral de la próstata relacionadas directamente con la progresión tumoral, como son los mastocitos y los macrófagos, tras 12 semanas de castración. La mayoría de estas células se encontraban en el estroma adyacente a las glándulas, y frecuentemente estaban asociados también con la presencia de pequeños vasos sanguíneos [Fig.49].

Al realizar la cuantificación del número de mastocitos por superficie de glándula se observa como la castración provocó un incremento significativo en el número de mastocitos en el entorno de la próstata en ratones control y ratones TRAMP [Fig.50].



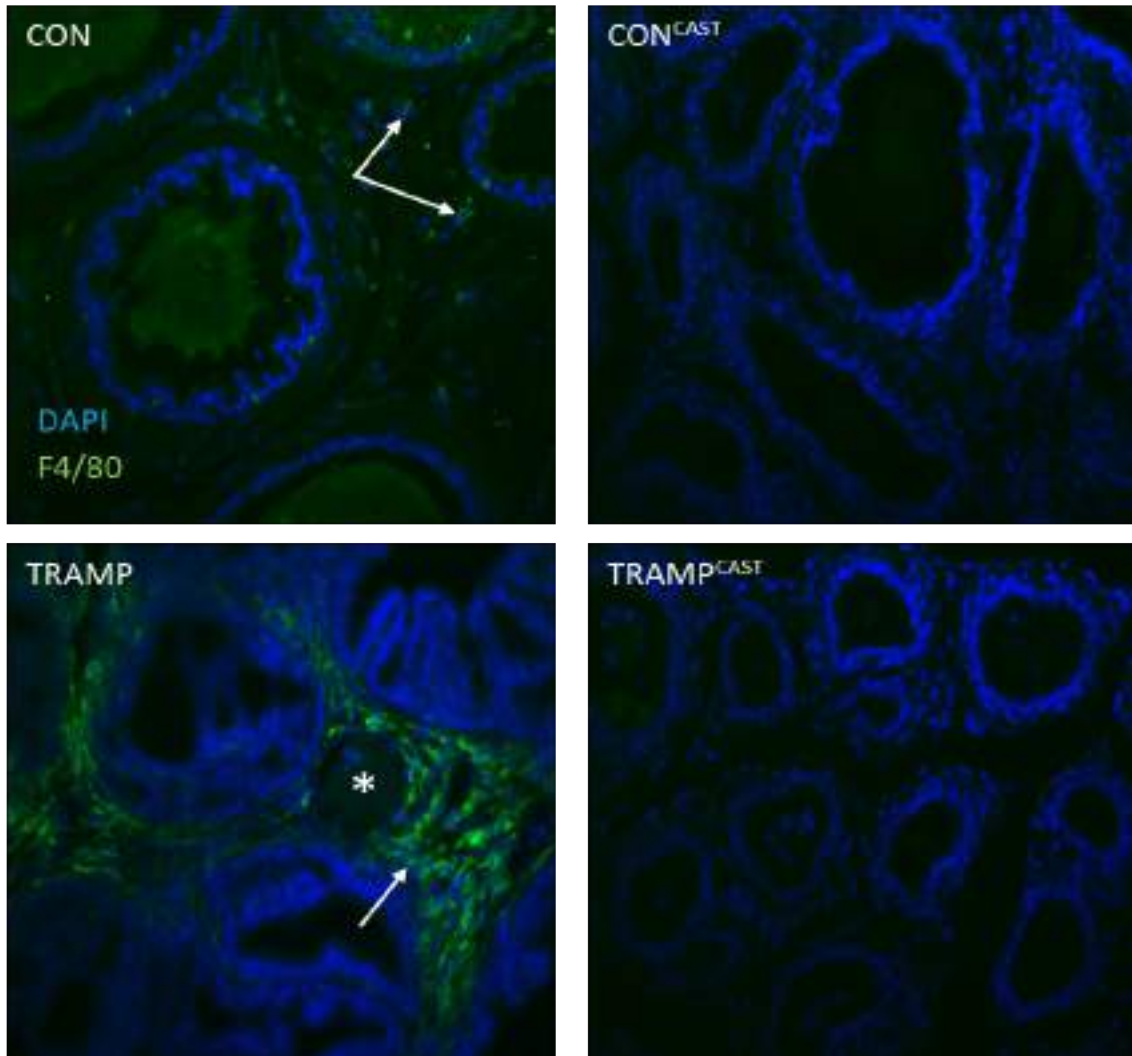
**Figura 49. Mastocitos presentes en el microambiente prostático de animales control (CON) y transgénicos (TRAMP) de 24 semanas.** Imágenes representativas de tejido prostático teñido con azul de toluidina de animales control y TRAMP con cirugía simulada, y tras 12 semanas de castración (CAST). Las flechas indican células metacromáticas en el estroma prostático (mastocitos). (\*) Vaso sanguíneo. Imágenes tomadas a 200 y 400 aumentos.



**Figura 50. Cuantificación de mastocitos en el microambiente prostático de animales de 24 semanas tras 12 semanas de castración, en animales control (CON) y transgénicos (TRAMP), con cirugía simulada (SHAM) o castrados (CAST).** Los datos se representan como la media ± EEM. \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001.

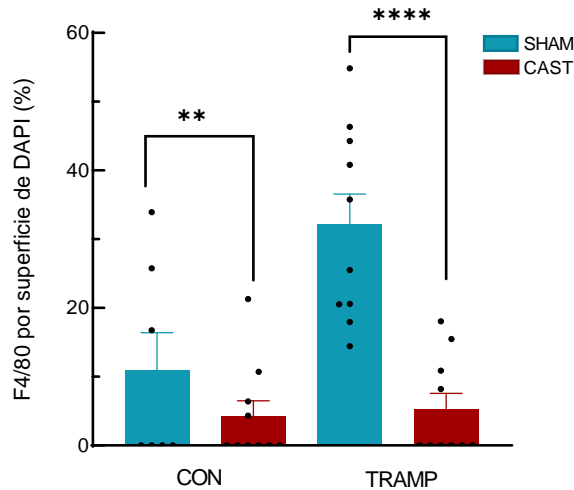


Los macrófagos del microambiente tumoral de la próstata se identificaron empleando como marcador la proteína F4/80. Se observó que este tipo celular también se encontraba mayoritariamente en el estroma adyacente a las glándulas, y asociado frecuentemente con pequeños vasos sanguíneos [Fig.51]



**Figura 51.** Localización de macrófagos en el estroma de la próstata de animales de 24 semanas control (CON) y transgénicos (TRAMP) tras 12 semanas de castración. Se muestran imágenes representativas de una inmunohistoquímica realizada en tejido prostático. Las flechas indican células positivas para F4/80. (\*) Indica un vaso sanguíneo. Imágenes tomadas a 200 aumentos.

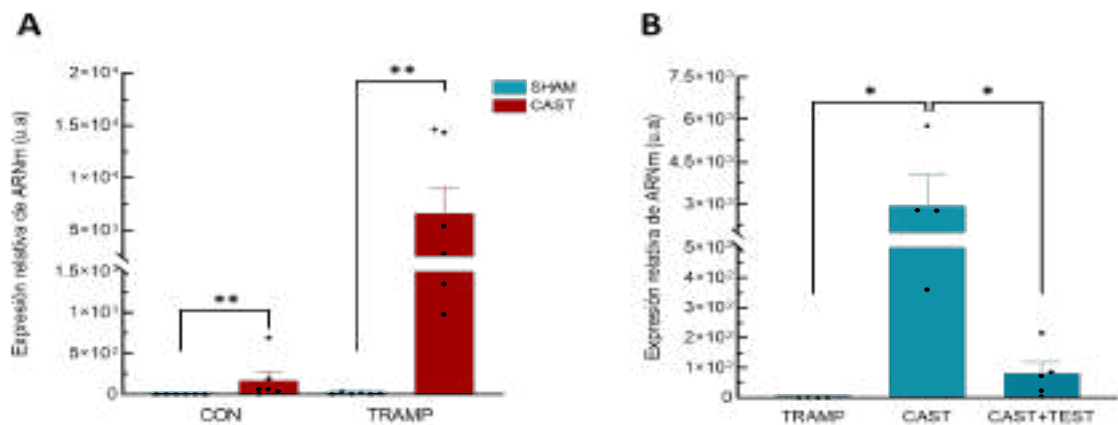
En cuanto a la cuantificación de la superficie positiva para F4/80, ésta fue significativamente mayor en los animales TRAMP que en los animales control, indicando una mayor presencia de macrófagos en el microambiente tumoral. Por el contrario, la castración redujo el marcaje significativamente en las próstatas de los animales controles y los animales TRAMP. Esta disminución fue muy notable en los animales TRAMP [Fig.52].



**Figura 52. Cuantificación de macrófagos el microambiente prostático de animales control (CON) y transgénicos (TRAMP) de 24 semanas.** Animales con cirugía simulada (SHAM), animales castrados durante 12 semanas (CAST). Los datos se representan como la media  $\pm$  EEM. \*\* $p < 0.01$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ .

### 5.5 La castración aumenta los niveles de UCP1

Al observar los efectos de la castración sobre el balance de grasa parda/beige en la próstata, se estudiaron los niveles de expresión del marcador de grasa parda *Ucp1* en el tejido adiposo de animales castrados. Los niveles de expresión de *Ucp1* en el tejido adiposo de animales control y TRAMP castrados durante 12 semanas aumentaron significativamente respecto a los niveles encontrados en los animales operados de forma simulada [Fig.53A]. Además, en los animales TRAMP castrados durante 4 semanas la administración exógena de testosterona redujo significativamente los niveles de expresión de *Ucp1* en el tejido adiposo, lo que confirmó el papel de los andrógenos sobre su regulación en el tejido adiposo [Fig.53B].

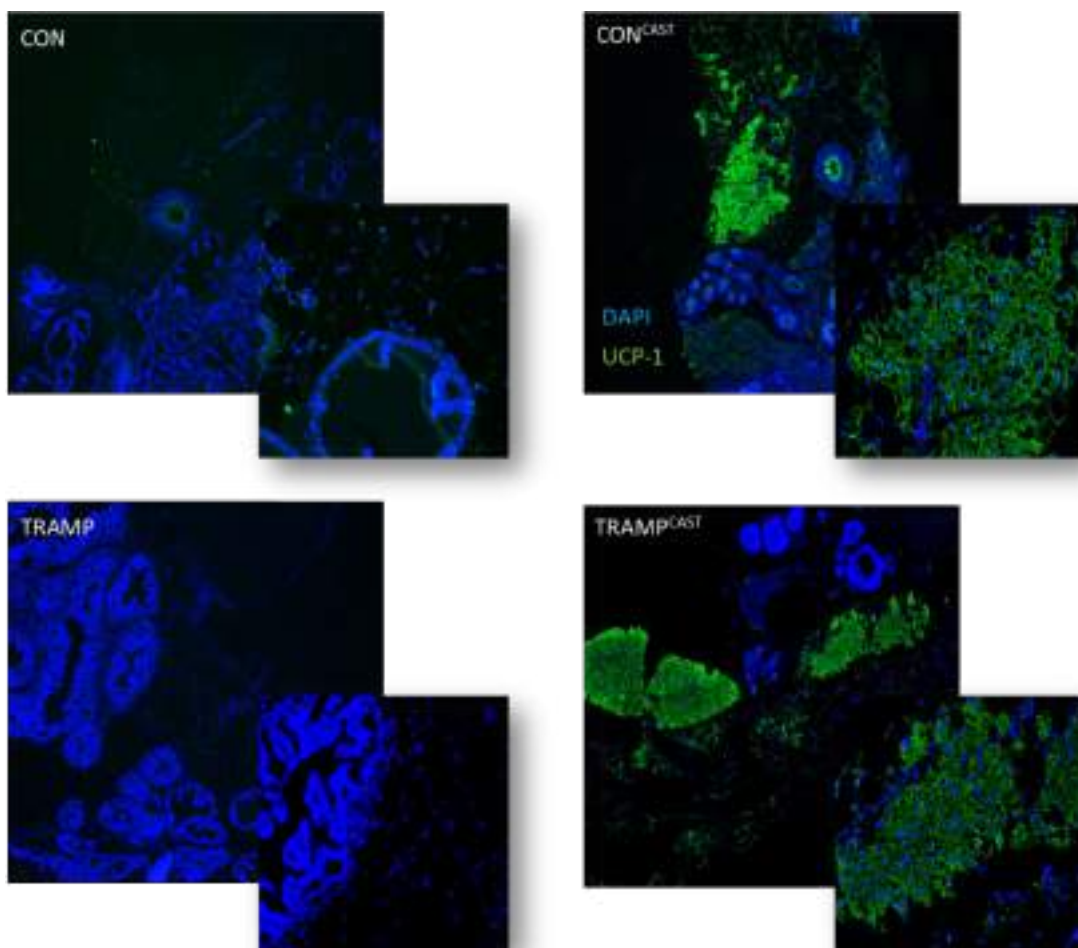


**Figura 53. Cuantificaciones de los niveles de expresión de Ucp1.** (A) Niveles de expresión de *Ucp1* en animales control (CON) y transgénicos (TRAMP) con cirugía simulada (SHAM) y tras 12 semanas de castración (CAST) (B) Niveles de expresión de *Ucp1* en animales TRAMP, tras 4 semanas de castración (CAST) y después de castración y administración de testosterona (CAST+TEST). Los datos se representan como la media  $\pm$  EEM. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .

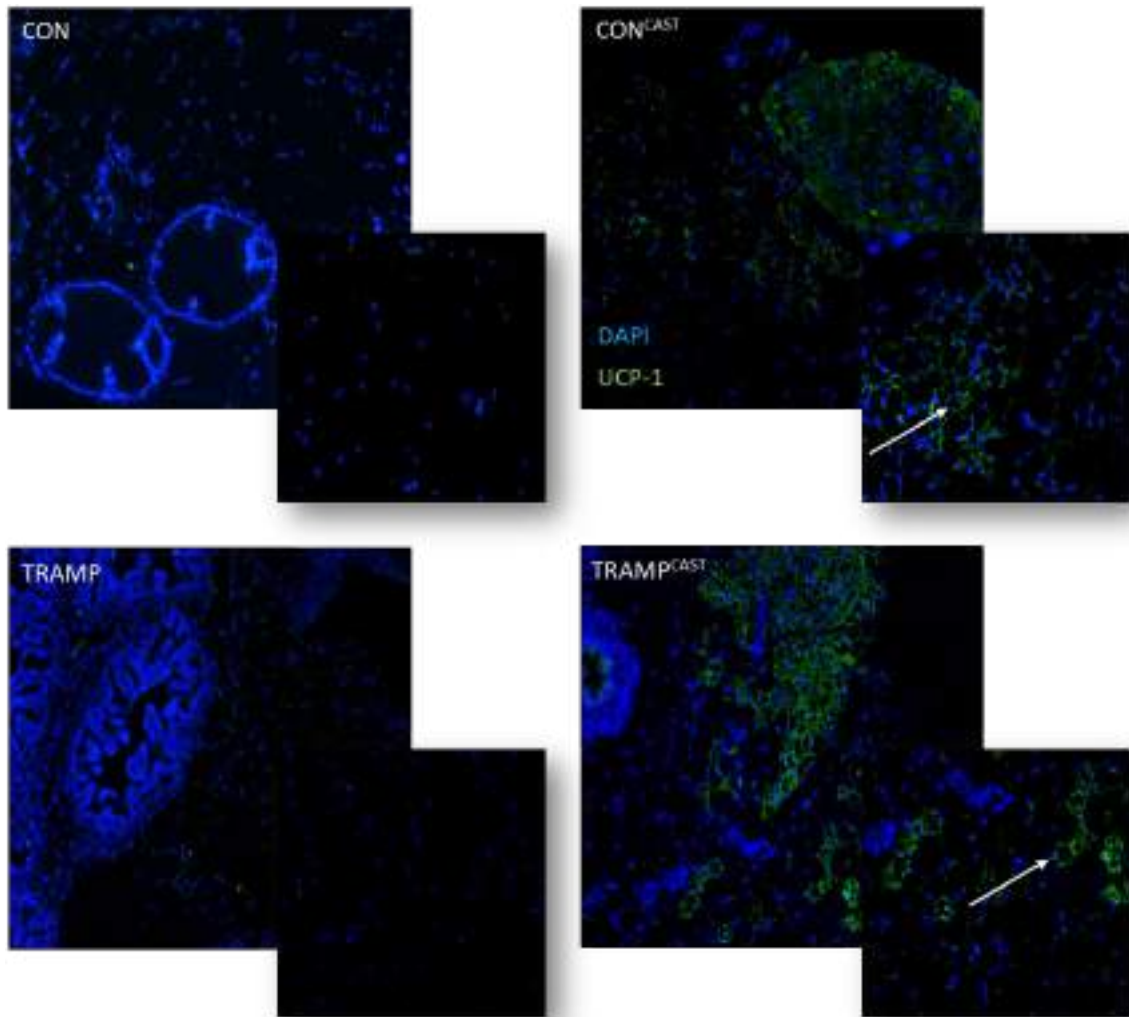
Se analizó también la producción de la proteína UCP1 en los depósitos de grasa del tejido adiposo periprostático. Solo se detectó marcaje positivo para UCP1 en el tejido

adiposo de animales castrados, tanto controles como TRAMP. En todos los casos el marcaje el marcaje identificaba inequívocamente los depósitos de adipocitos multiloculares. [Fig.54].

La proteína desacoplante UCP1 se produce de forma específica en los adipocitos del tejido adiposo pardo. Sin embargo, en los animales castrados se observó que el tejido adiposo blanco adyacente a los depósitos de grasa parda/beige también presentaba un marcaje positivo para UCP1, aunque no se extendía al conjunto de adipocitos blancos presente en la muestra [Fig.55].



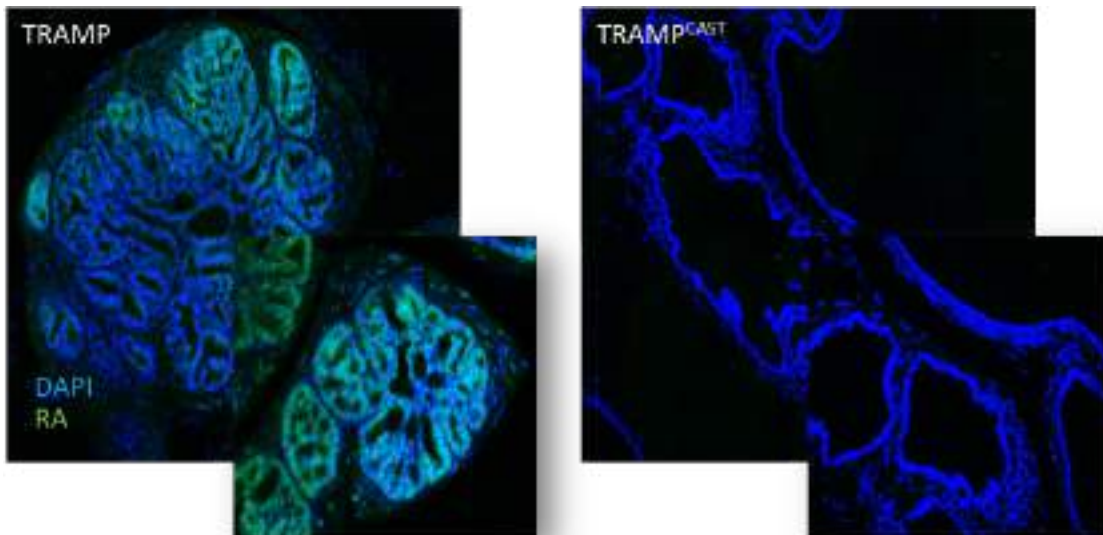
**Figura 54. Producción de UCP1 en el tejido adiposo periprostático de animales control (CON) y transgénicos (TRAMP) en respuesta a la castración (CAST).** Se muestran imágenes representativas de la inmunofluorescencia para UCP1 en tejido prostático. En detalle se muestra a más aumento el marcaje en el tejido adiposo pardo/beige de cada uno de los animales. Imágenes tomadas a 40 y 400 aumentos.



**Figura 55. Producción de UCP1 en el tejido adiposo blanco periprostático de animales control (CON) y transgénicos (TRAMP) en respuesta a la castración (CAST).** Se muestran imágenes representativas de una inmunofluorescencia para UCP1 en tejido prostático. Las flechas indican adipocitos blancos con marcaje positivo. En detalle se muestra a más aumento el marcaje en el tejido adiposo blanco. Imágenes tomadas a 100 y 400 aumentos.

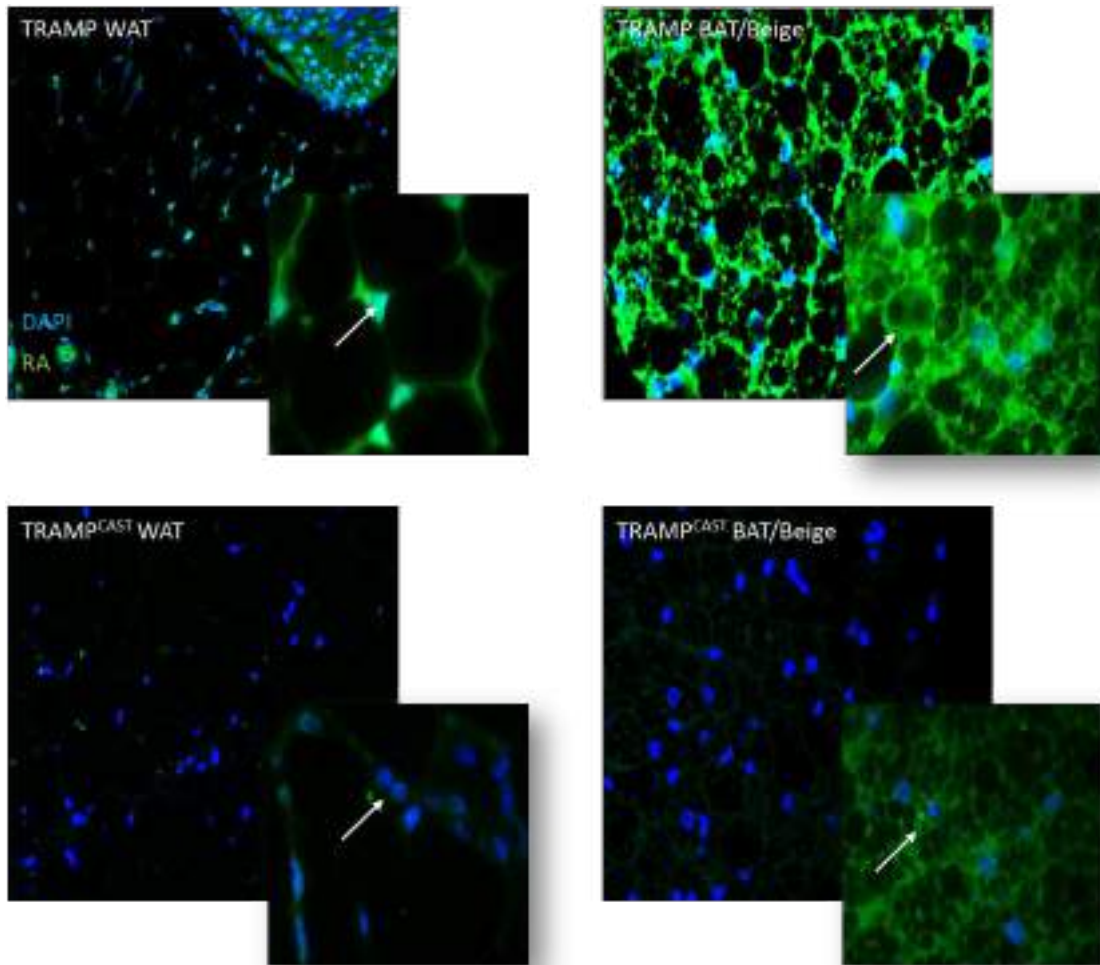
## 5.6 Los niveles y la localización del receptor de andrógenos están alterados en el tejido adiposo periprostático tras la castración

Por último, se estudiaron las posibles variaciones en la localización del receptor de andrógenos (RA) tanto en la próstata como en el tejido adiposo de animales TRAMP en respuesta a la castración. Como se esperaba, se observó que en el epitelio secretor en los animales TRAMP, el receptor de andrógenos tenía principalmente localización nuclear, mientras que en los animales TRAMP castrados los niveles del receptor fueron mucho menores, con localización principalmente citoplásmica, y en algunas ocasiones indetectable [Fig.56].



**Figura 56. Producción de RA en el tejido prostático de animales transgénicos (TRAMP).** Se muestran imágenes representativas de inmunofluorescencia en tejido prostático de animales con cirugía simulada y tras 12 semanas de castración (TRAMP<sup>CAST</sup>). Imágenes tomadas a 100 y 200 aumentos.

Se analizaron los posibles cambios en la localización subcelular del RA en el tejido adiposo periprostático. Así, mientras que en los adipocitos blancos la localización fue principalmente nuclear, en los adipocitos pardos/beige, la localización fue principalmente citoplásmica. Además, los niveles de receptor en los animales castrados disminuyeron de forma significativa [Fig.57].

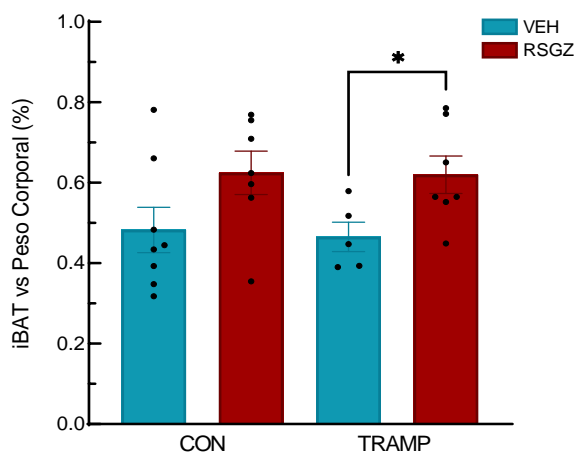


**Figura 57. Producción de receptor de andrógenos en el tejido adiposo periprostático de animales TRAMP en respuesta a la castración (CAST). Se muestran imágenes representativas de inmunofluorescencia para RA. Las flechas indican localización subcelular del receptor de andrógenos. Imágenes tomadas a 100 y 400 aumentos.**

## 6. Tratamiento con rosiglitazona durante 10 días

### 6.1 El tratamiento con rosiglitazona aumenta la grasa parda escapular, pero no induce diferencias en el tejido adiposo peripróstático.

La castración incrementa la cantidad de tejido adiposo pardo/beige en el microambiente tumoral de la próstata en ratones TRAMP, sin embargo, el papel de este componente adiposo es desconocido en la progresión tumoral. Con el fin de estudiar el efecto de incrementar los niveles de grasa parda/beige sobre la progresión tumoral en la próstata en presencia de andrógenos circulantes se empleó una estrategia farmacológica de inducción de tejido pardo/beige, mediante la administración durante 10 días del antidiabético rosiglitazona (RSGZ) a una dosis de 10 mg/Kg de peso.

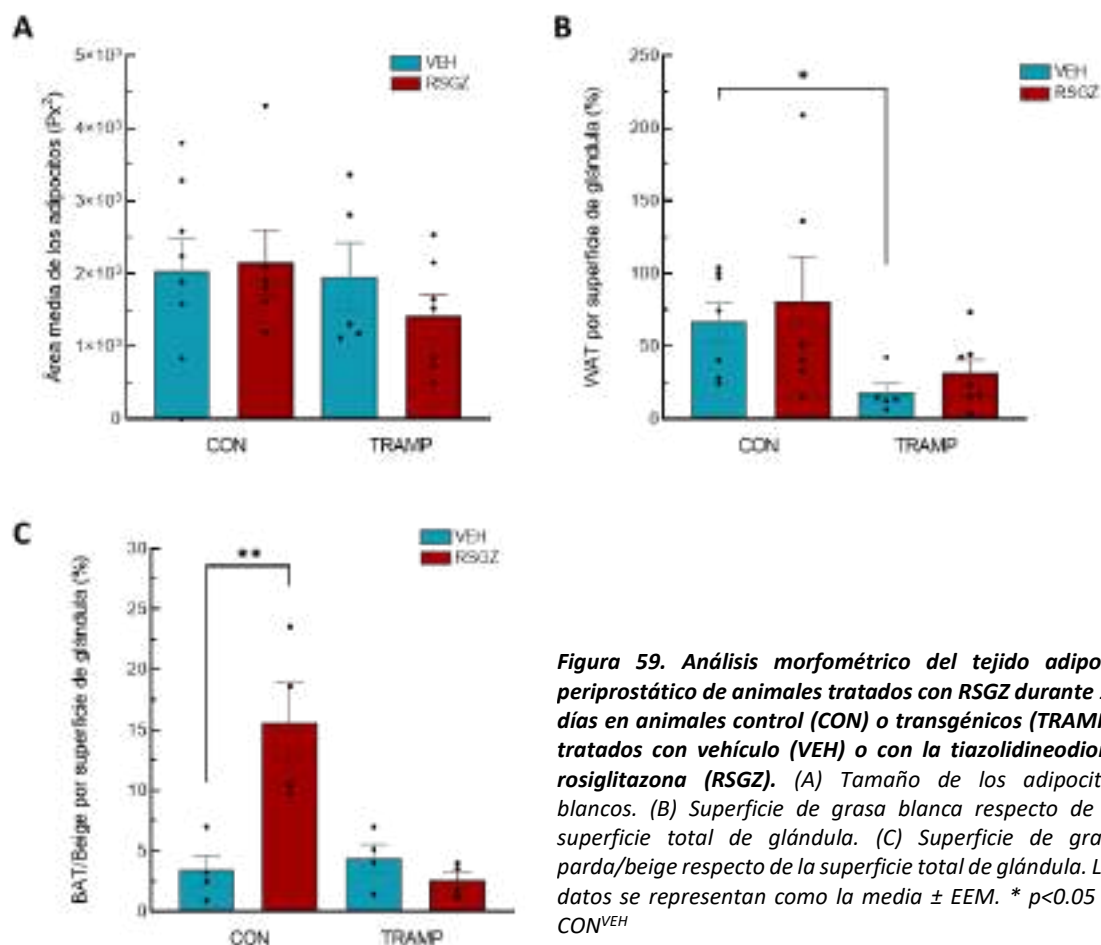


**Figura 58.** Alteraciones en el contenido de grasa parda interescapular (iBAT) de animales control (CON) y transgénicos (TRAMP) tratados con rosiglitazona (RSGZ) durante 10 días. Los datos se representan como la media  $\pm$  EEM. \*  $p < 0.05$ .

En primer lugar, se estudió el efecto de la inyección de RSGZ en el contenido de grasa parda escapular (iBAT). En ambos genotipos se obtuvo un aumento del peso medio de iBAT normalizado frente al peso del animal con el tratamiento, aunque solo se apreciaron diferencias estadísticamente significativas en los animales TRAMP [Fig.58].

Se analizó por morfometría el contenido de tejido adiposo pardo/beige en el microentorno de la próstata. No se observaron diferencias en el tamaño de los adipocitos blancos [Fig.59A]. Se observó una disminución del contenido de grasa blanca total en los animales TRAMP, tal y como habíamos observado y descrito anteriormente, siendo esta diferencia estadísticamente significativa [Fig.59B]. En cuanto al contenido de grasa parda/beige, se observó un incremento muy significativo de este tejido en los

animales control tratados con RSGZ durante 10 días. Sin embargo, en los animales TRAMP no se observó ninguna diferencia [Fig.59C].



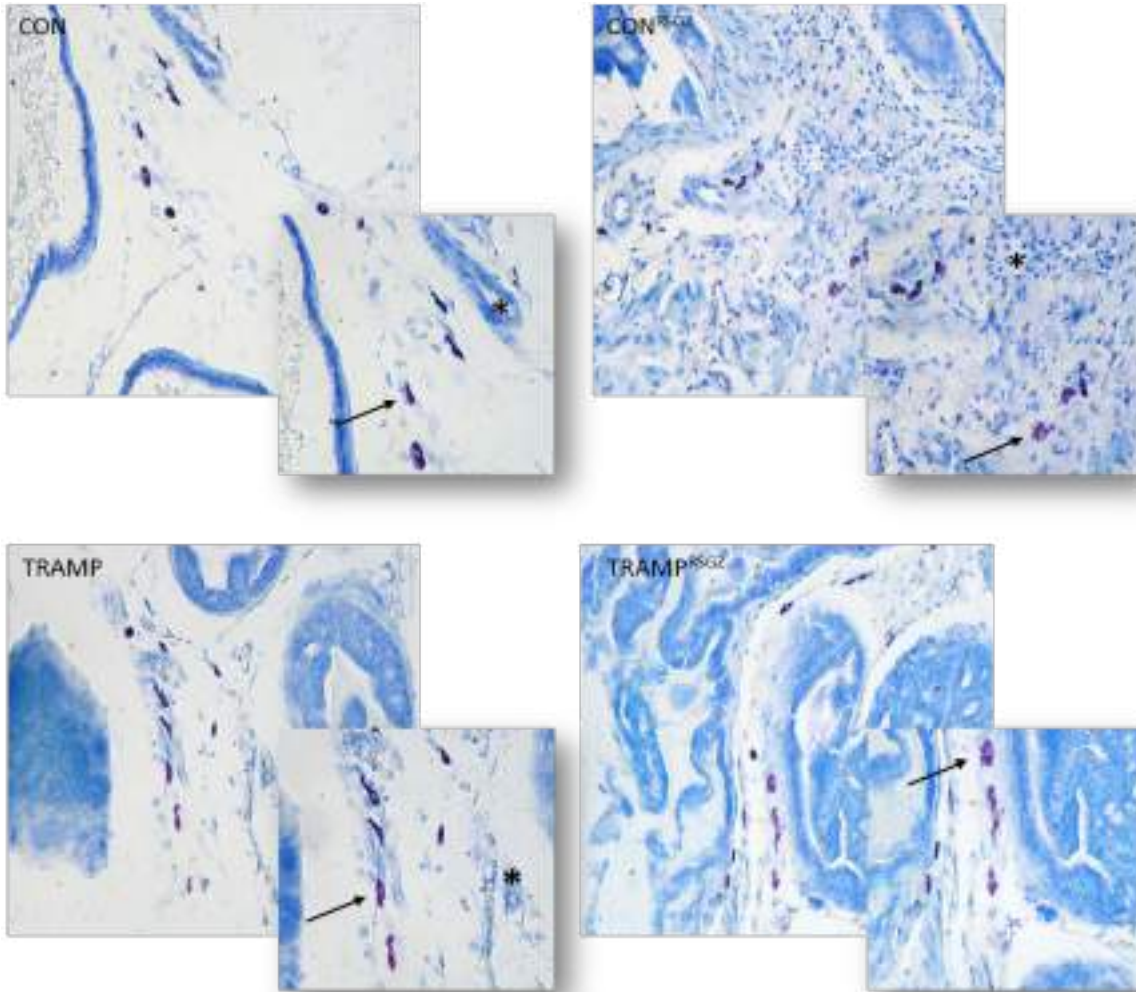
**Figura 59. Análisis morfométrico del tejido adiposo periprostático de animales tratados con RSGZ durante 10 días en animales control (CON) o transgénicos (TRAMP), tratados con vehículo (VEH) o con la tiazolidinediona rosiglitazona (RSGZ).** (A) Tamaño de los adipocitos blancos. (B) Superficie de grasa blanca respecto de la superficie total de glándula. (C) Superficie de grasa parda/beige respecto de la superficie total de glándula. Los datos se representan como la media ± EEM. \*  $p < 0.05$  vs  $CON^{VEH}$

## 6.2 El tratamiento con RSGZ no altera el número de mastocitos y reduce los macrófagos en el microambiente de la próstata tumoral

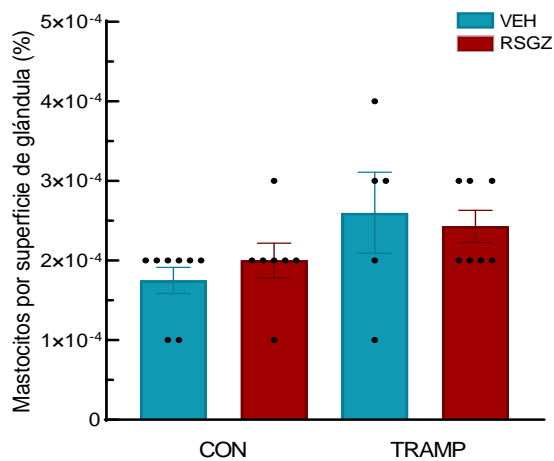
Se analizó si la RSGZ provocaba algún cambio en las poblaciones de mastocitos y macrófagos en el microambiente tumoral de la próstata. Los mastocitos se identificaron en el estroma adyacente a las glándulas y frecuentemente cerca de pequeños vasos sanguíneos y capilares [Fig.60]. Su cuantificación no reveló diferencias en el número de



mastocitos en el estroma glandular, ni entre genotipos, ni en respuesta al tratamiento con RSGZ [Fig.61].

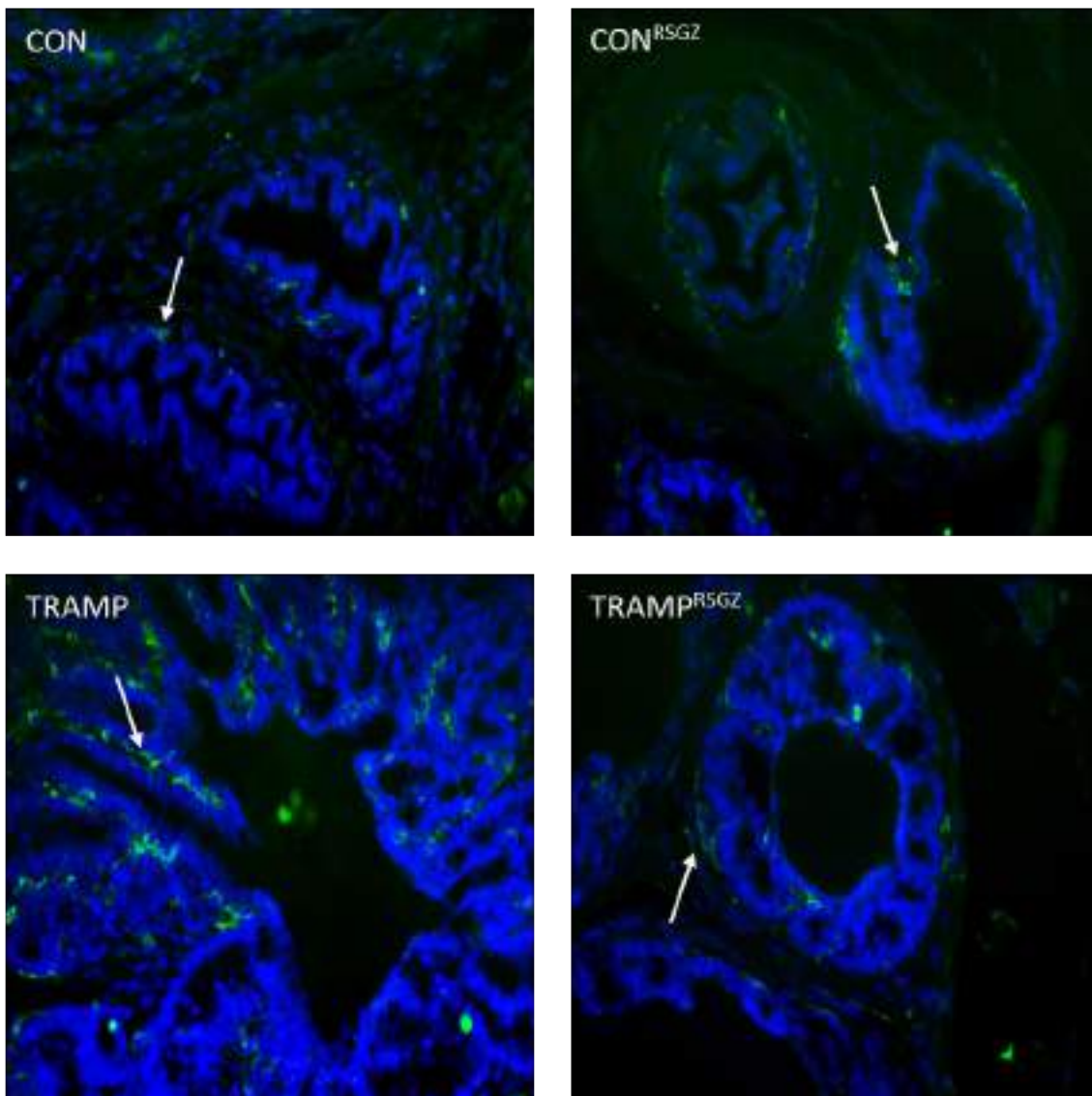


**Figura 60. Mastocitos presentes en el microambiente prostático de animales control (CON) y transgénicos (TRAMP) tras 10 días de tratamiento con RSGZ.** Imágenes representativas de tejido prostático teñido con azul de toluidina. Las flechas indican células metacromáticas en el estroma prostático (mastocitos). (\*) Vaso sanguíneo. Imágenes tomadas a 200 y 400 aumentos.



**Figura 61. Cuantificación de mastocitos en el microambiente prostático de animales de animales control (CON) y transgénicos (TRAMP) tras 10 días de tratamiento con RSGZ.** Los datos se representan como la media  $\pm$  EEM.

Al igual que los mastocitos, los macrófagos identificados con el marcador de superficie F4/80 se encontraron mayoritariamente en la región del tejido conjuntivo entre las glándulas, sobre todo en los animales TRAMP [Fig.62]. En este caso, la cantidad de macrófagos sí que se observó alterada tras el tratamiento con RSGZ durante 10 días. Los animales TRAMP presentaban un aumento significativo de los niveles de marcaje positivo para F4/80 con respecto a sus homólogos control, y el tratamiento con RSGZ redujo significativamente el marcaje, lo que se asocia con una menor cantidad de macrófagos residentes en el microambiente tumoral. En los animales control no observamos diferencias tras el tratamiento [Fig.63].



**Figura 62.** Macrófagos presentes en el estroma prostático de animales control (CON) y transgénicos (TRAMP) tras 10 días de tratamiento con RSGZ. Se muestran imágenes representativas de una inmunofluorescencia en tejido prostático. Las flechas indican células positivas para F4/80. Imágenes tomadas a 200 aumentos.

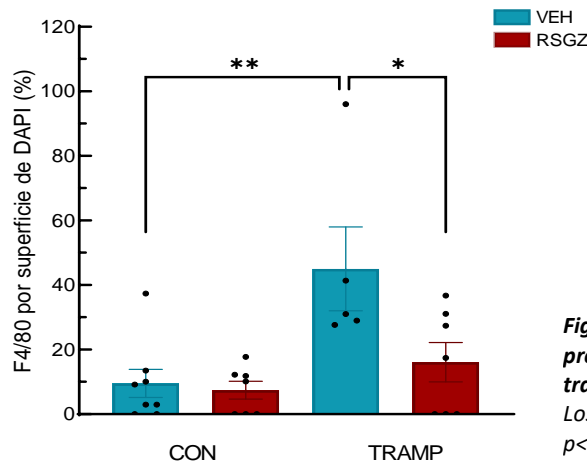


Figura 63. Cuantificación de macrófagos en el microambiente prostático de animales de animales control (CON) y transgénicos (TRAMP) tras 10 días de tratamiento con RSGZ. Los datos se representan como la media  $\pm$  EEM. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$

### 6.3 El tratamiento con RSGZ no altera el crecimiento tumoral en la próstata

Una vez analizado el efecto de la RSGZ sobre el contenido de grasa parda/beige en el microambiente de la próstata y sobre el número de macrófagos, se estudió el efecto de la RSGZ sobre el crecimiento tumoral de la próstata. Para ello en primer lugar se analizó el peso de los animales, y la relación entre el peso del tracto urogenital y el peso corporal. En cuanto al peso corporal no se observaron diferencias ni entre genotipos, ni en respuesta al tratamiento con RSGZ [Fig.64A]. En relación con los pesos de los tractos genitourinarios, se apreció que el tratamiento con RSGZ durante 10 días no modificó significativamente el peso del tracto en los animales TRAMP [Fig.64B].

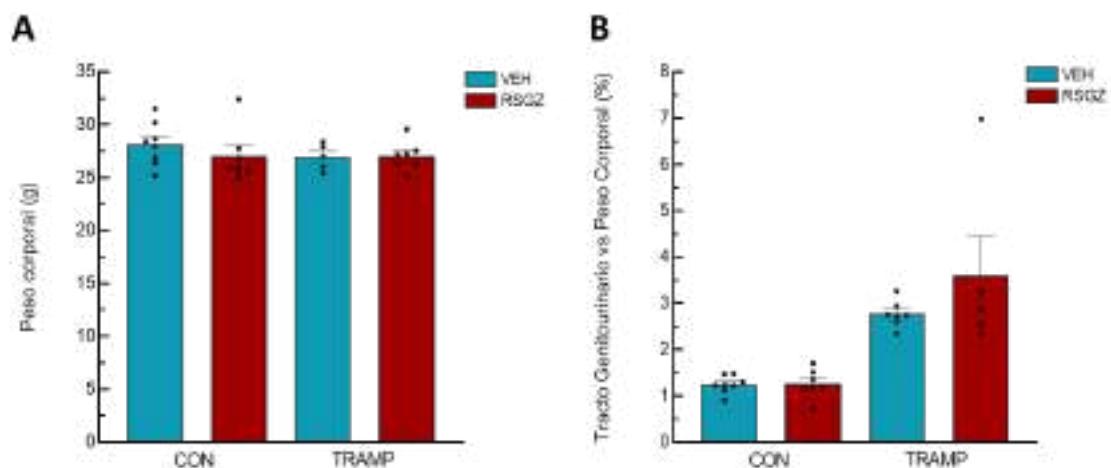
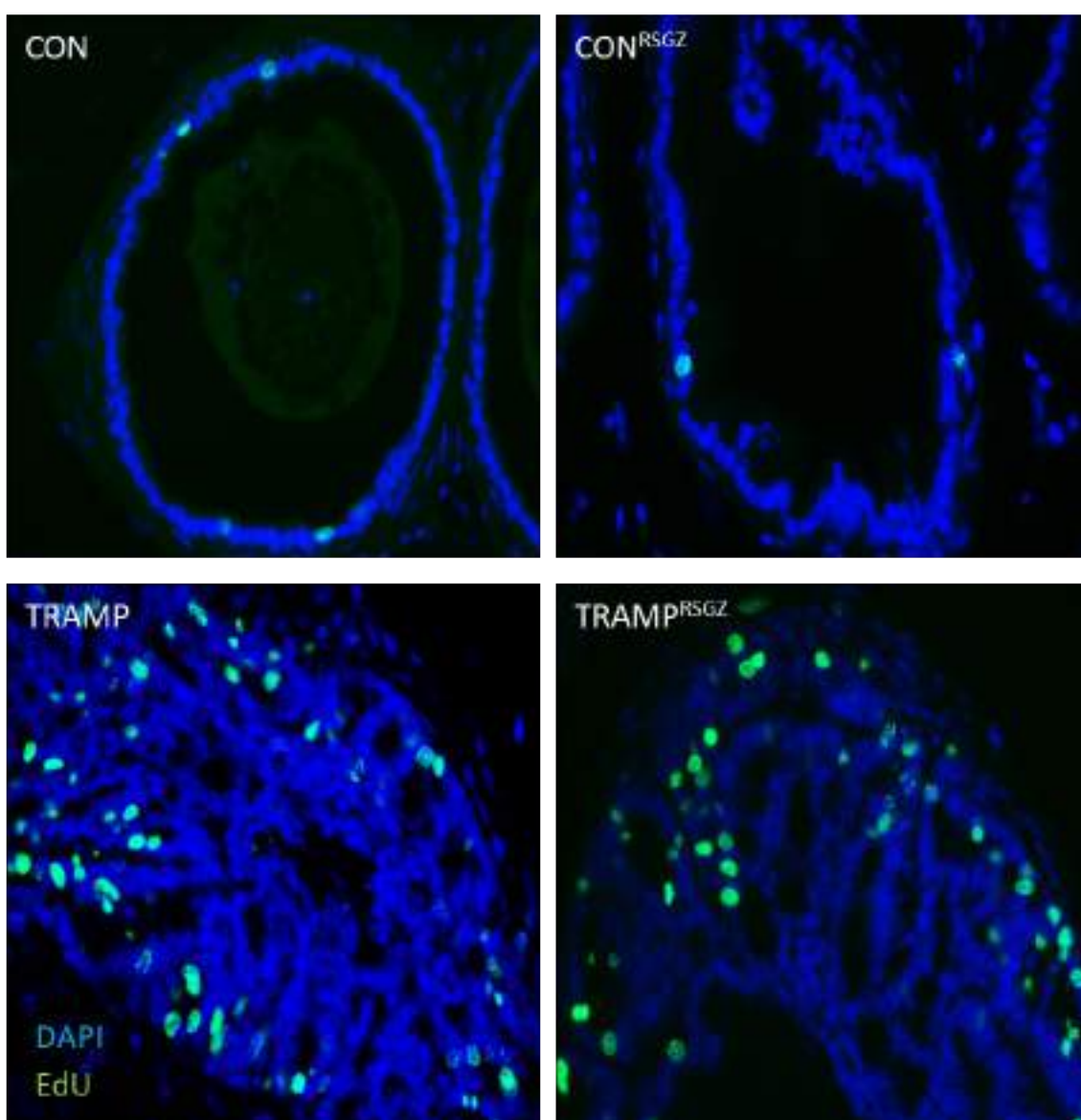


Figura 64. Efecto del tratamiento con rosiglitazona (RSGZ) sobre el peso corporal y del tracto urogenital en animales control (CON) y transgénicos (TRAMP). (A) Peso corporal. (B) Relación entre el peso del tracto genitourinario y el peso corporal en %. Los datos se representan como la media  $\pm$  EEM.

Se analizó también la tasa de proliferación en el tejido glandular mediante marcaje con EdU. Como se puede observar en las micrografías de fluorescencia mostradas en la figura 65, en los animales control, tal y como se espera, las glándulas presentaban niveles muy bajos de proliferación, existiendo únicamente células aisladas que se encontraban en fases de crecimiento activo. Sin embargo, en los animales TRAMP la proliferación en las glándulas fue mucho más elevada, detectándose un gran número de células marcadas con EdU [Fig.65]. Al realizar la cuantificación con respecto a la superficie de DAPI se comprobó que el tratamiento con RSGZ no modificó los niveles de proliferación, no observando diferencias ni entre grupos, ni entre genotipos [Fig.66].



**Figura 65.** Efecto del tratamiento durante 10 días con rosiglitazona (RSGZ) sobre la proliferación de células epiteliales glandulares de la próstata de animales control (CON) y transgénicos (TRAMP). Imágenes de fluorescencia representativas de tejido glandular prostático. Imágenes tomadas a 400 aumentos.

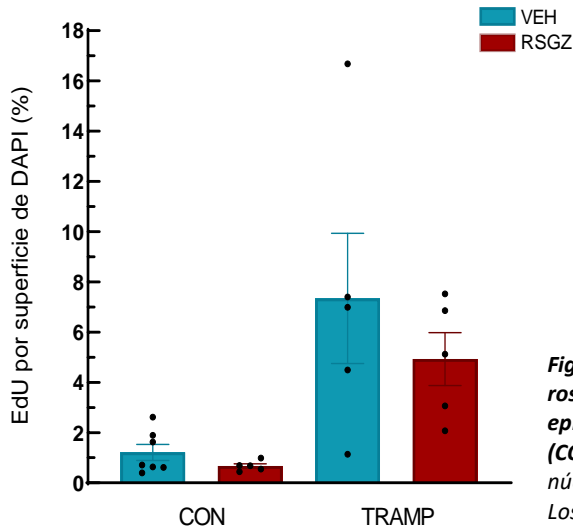


Figura 66. Efecto del tratamiento durante 10 días con rosiglitazona (RSGZ) sobre la proliferación de células epiteliales glandulares de la próstata de animales control (CON) y transgénicos (TRAMP). Cuantificación del número de núcleos positivos para EdU respecto de la superficie de DAPI. Los datos se representan como la media ± EEM.

## 7. Tratamiento con rosiglitazona durante 6 semanas

### 7.1 EL tratamiento con rosiglitazona aumenta la grasa parda interescapular en ratones control y TRAMP

Al no observar diferencias en el contenido de grasa parda o en la alteración del tumor tras 10 días de tratamiento con RSGZ, se decidió aumentar el tiempo de tratamiento con RSGZ hasta las 24 semanas. Al igual que se había hecho en el experimento anterior en primer lugar se comprobó la efectividad del tratamiento mediante el análisis del peso de la grasa parda interescapular. Se observó que el tratamiento con RSGZ durante 6 semanas aumentó significativamente el contenido de iBAT en los animales controles y en los animales TRAMP [Fig.67].

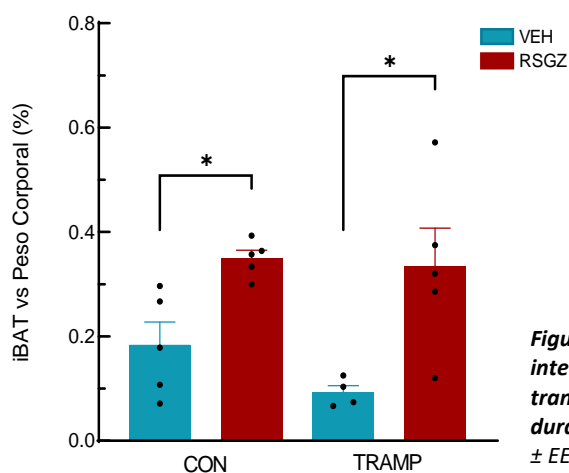


Figura 67. Alteraciones en el contenido de grasa parda interescapular (iBAT) de animales control (CON) y transgénicos (TRAMP) tratados con rosiglitazona (RSGZ) durante 6 semanas. Los datos se representan como la media ± EEM. \*  $p < 0.05$ .

Se analizó por morfometría el contenido en tejido adiposo pardo/beige en el microentorno de la próstata tras 6 semanas de tratamiento con RSGZ. En primer lugar, se observaron adipocitos blancos de menor tamaño en los animales TRAMP tratados con RSGZ [Fig.68A]. El contenido en grasa blanca coincide con lo observado en cuanto al tamaño de los adipocitos, detectándose un menor contenido de grasa blanca en los animales TRAMP tratados [Fig.68B]. En relación con el contenido en grasa parda/beige, se observó un aumento muy significativo en los animales control tratados con RSGZ durante 6 semanas respecto a sus homólogos tratados con vehículo, mientras que no se encontraron focos de grasa parda/beige en los animales TRAMP tratados [Fig.68C].

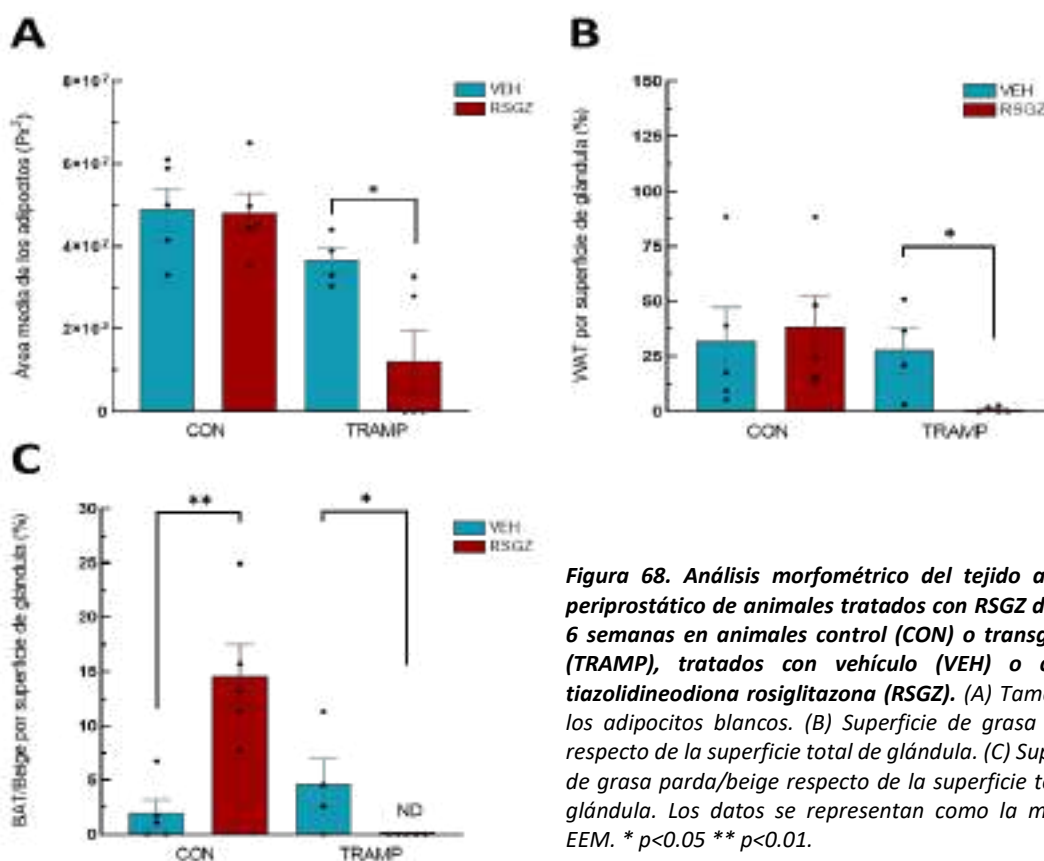


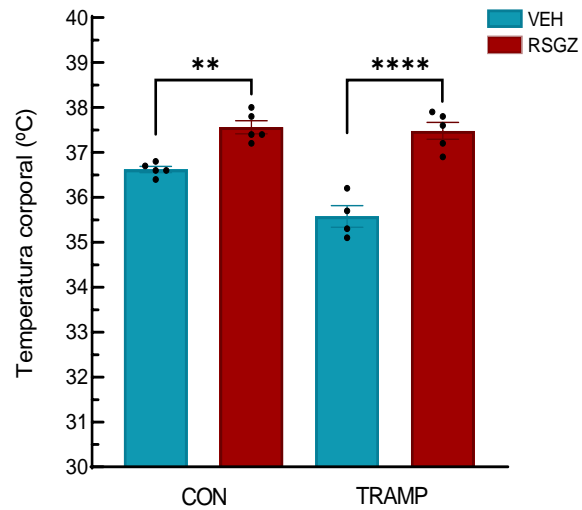
Figura 68. Análisis morfométrico del tejido adiposo periprostático de animales tratados con RSGZ durante 6 semanas en animales control (CON) o transgénicos (TRAMP), tratados con vehículo (VEH) o con la tiazolidinediona rosiglitazona (RSGZ). (A) Tamaño de los adipocitos blancos. (B) Superficie de grasa blanca respecto de la superficie total de glándula. (C) Superficie de grasa parda/beige respecto de la superficie total de glándula. Los datos se representan como la media ± EEM. \*  $p < 0.05$  \*\*  $p < 0.01$ .

## 7.2 El tratamiento con RSGZ aumenta la termogénesis, pero no altera el metabolismo energético basal en animales control y TRAMP.

Puesto que el tratamiento con RSGZ durante 6 semanas modificó el contenido de grasa parda interescapular de los animales, se analizó mediante calorimetría

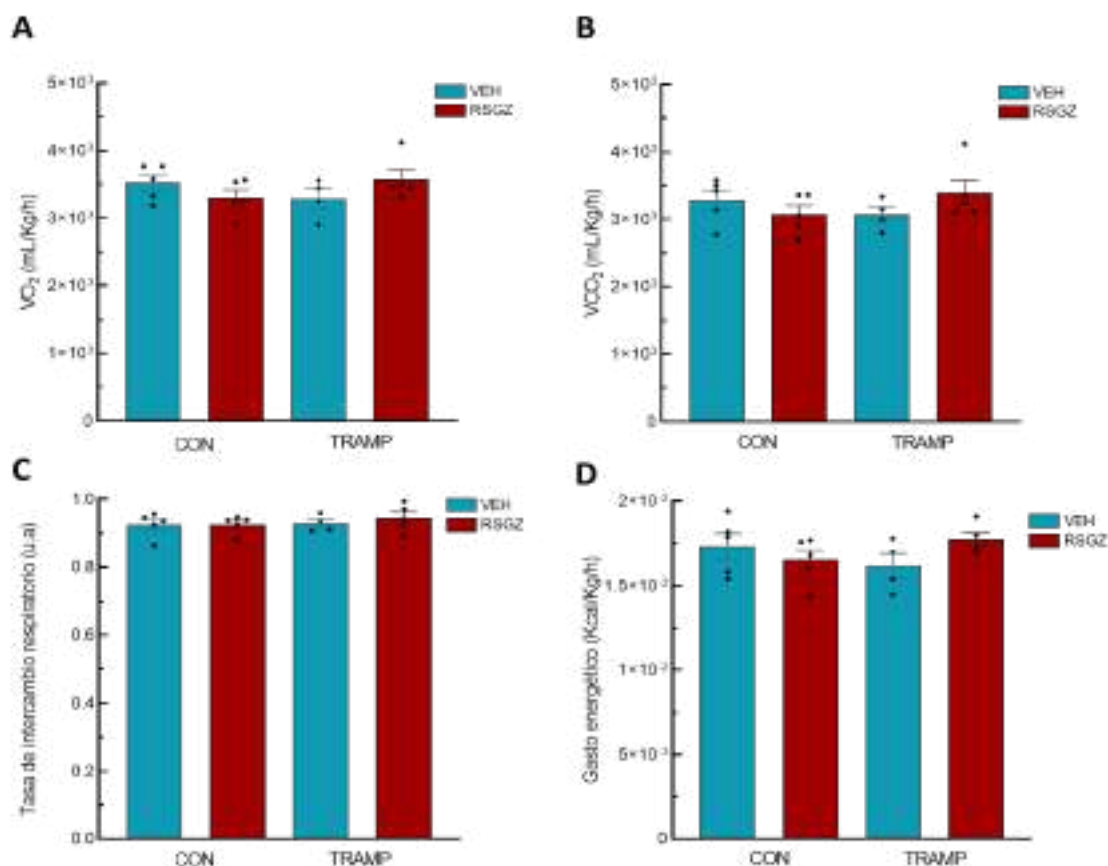
indirecta las posibles implicaciones del tratamiento con RSGZ sobre el metabolismo energético de nuestros animales.

En primer lugar y puesto que se detectó un aumento del contenido de grasa parda/beige escapular en los animales tratados, y dada la importante función termogénica de este tejido, se estudió si el tratamiento con RSGZ provocó alguna alteración sobre la temperatura corporal. Se comprobó cómo, tanto en animales control como en animales TRAMP tratados, se produjo un aumento incrementado significativo de la temperatura corporal en relación con los animales sin tratar [Fig.69].



**Figura 69.** Temperatura corporal tras el tratamiento durante 6 semanas con rosiglitazona (RSGZ) en animales control (CON) y transgénicos (TRAMP). Los datos se representan como la media  $\pm$  EEM. \*\* $p < 0.01$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$

En cuanto a los parámetros energéticos, no se observó alteración alguna en el consumo de O<sub>2</sub> y producción de CO<sub>2</sub>, ni entre genotipos, ni en respuesta al tratamiento. Esto se refleja además en la tasa de intercambio respiratorio y el gasto energético global de los animales, no observándose diferencias en ninguno de los dos parámetros [Fig.70].

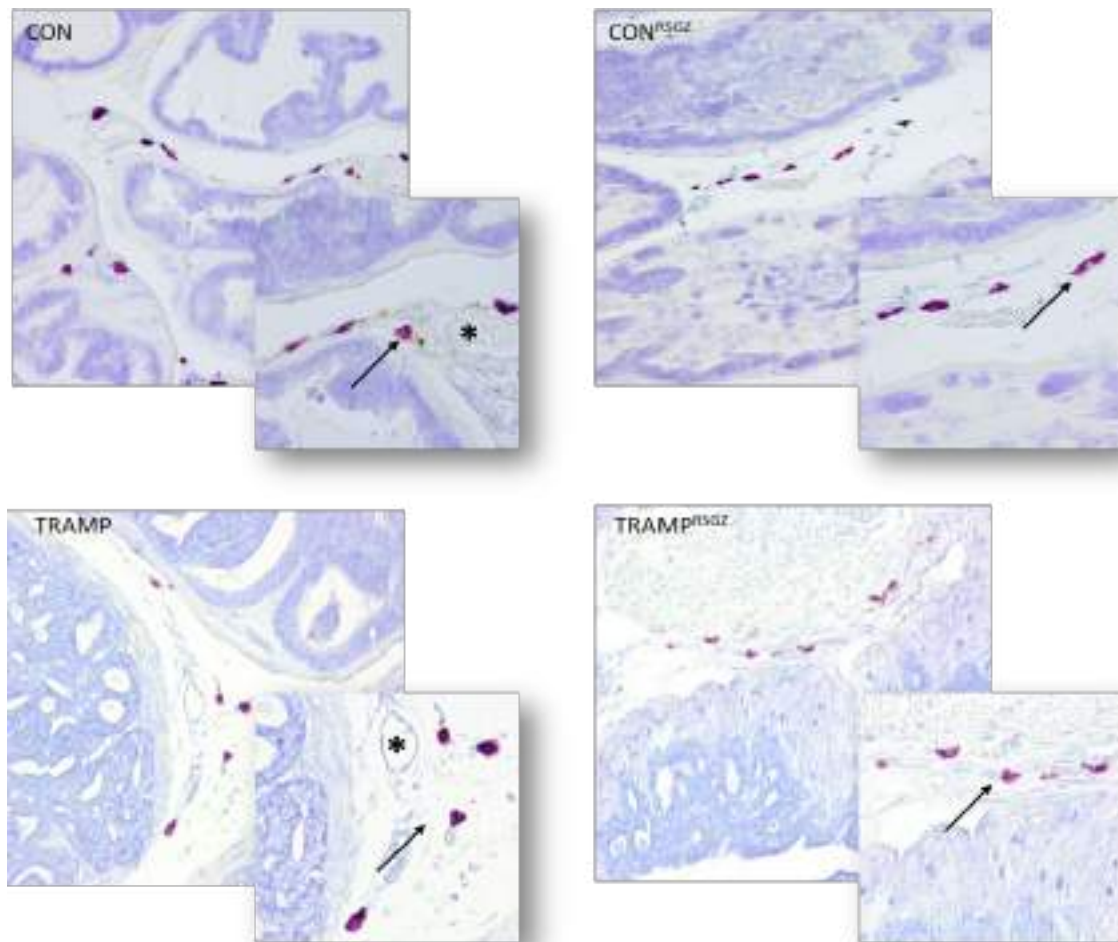


**Figura 70.** Parámetros metabólicos en animales control (CON) y transgénicos (TRAMP) tratados con rosiglitazona (RSGZ) durante 6 semanas. (A) Niveles de consumo de oxígeno (VO<sub>2</sub>). (B) Producción de dióxido de carbono (VCO<sub>2</sub>). (C) Tasa de intercambio respiratorio (RER), (D) Gasto energético. Los datos se representan como la media del área bajo la curva (AUC) ± EEM.

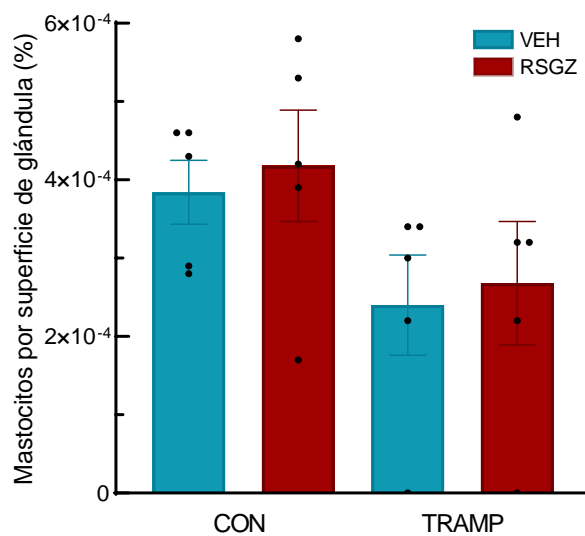
### 7.3 El tratamiento con RSGZ no altera la población de mastocitos, pero disminuye la de macrófagos en el microambiente tumoral de la próstata

También se estudiaron las poblaciones de mastocitos y macrófagos para comprobar si aumentar el tiempo de tratamiento con RSGZ provocaba algún cambio sobre estas poblaciones celulares. En relación con los mastocitos, no se apreciaron diferencias el número de células cebadas [Fig.71], lo que se demostró de forma cuantitativa tras análisis morfométrico, no detectándose cambios ni entre grupos ni entre genotipos [Fig.72].



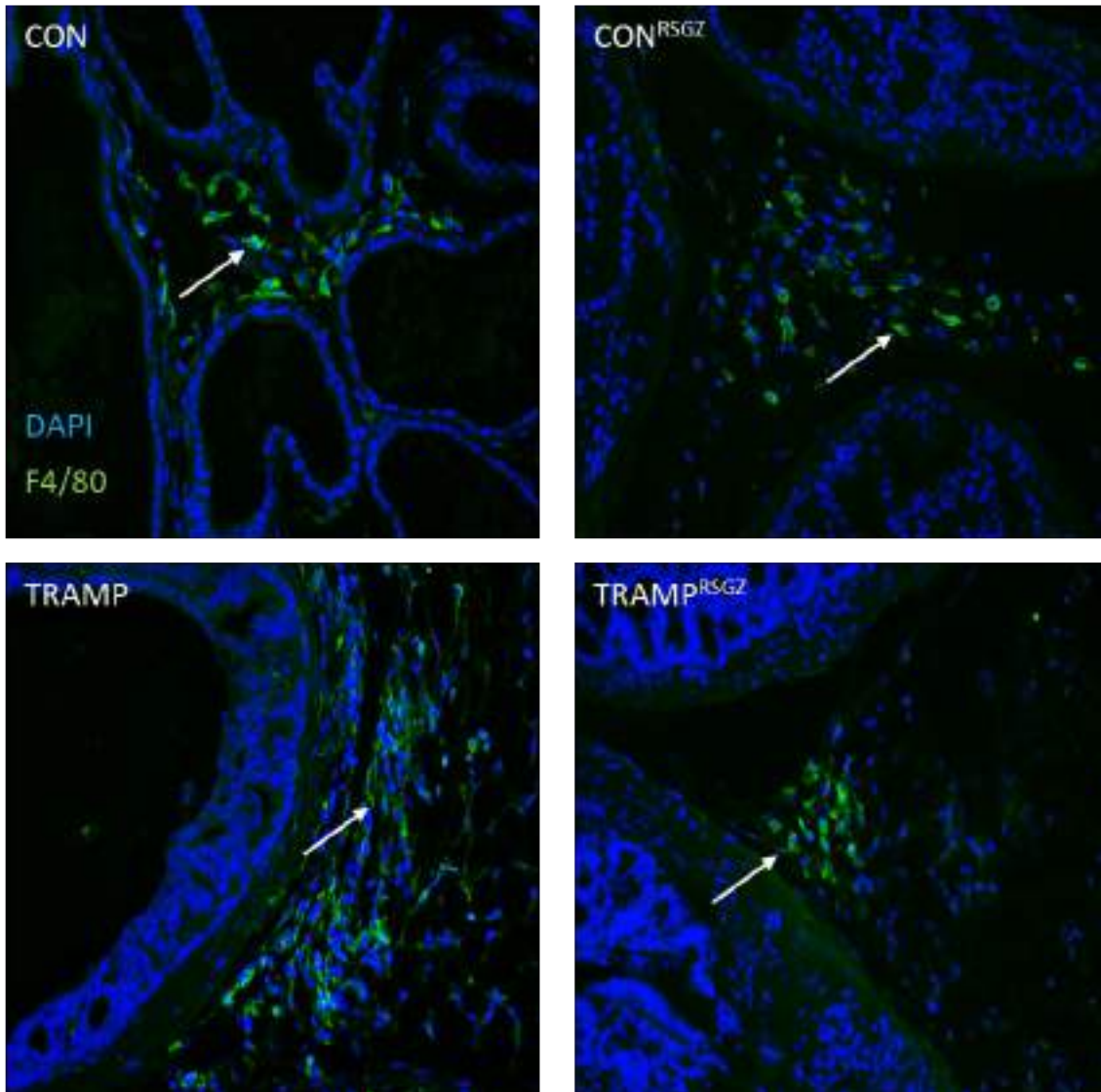


**Figura 71.** Mastocitos presentes en el microambiente prostático de animales control (CON) y transgénicos (TRAMP) tras 6 semanas de tratamiento con rosiglitazona (RSGZ). (A) Imágenes representativas de tejido prostático teñido con azul de toluidina. Las flechas indican los mastocitos. (\*) Vaso sanguíneo. Imágenes tomadas a 200 y 400 aumentos.



**Figura 72.** Cuantificación de mastocitos en el microambiente prostático de animales de animales control (CON) y transgénicos (TRAMP) tras 6 semanas de tratamiento con rosiglitazona (RSGZ). Los datos se representan como la media  $\pm$  EEM.

En cuanto al contenido en macrófagos, los resultados fueron semejantes al tratamiento durante 10 días con RSGZ. Se observó un aumento de marcaje positivo para F4/80 en el estroma adyacente a las glándulas en animales TRAMP respecto a los controles y el tratamiento con RSGZ durante 6 semanas redujo significativamente el marcaje para F4/80 en animales control y en animales TRAMP [Fig.73, 74].



**Figura 73. Macrófagos presentes en el estroma prostático de animales control (CON) y transgénicos (TRAMP) tras 6 semanas de tratamiento con rosiglitazona (RSGZ). Se muestran imágenes representativas de una inmunofluorescencia en tejido prostático. Las flechas indican células positivas para F4/80. Imágenes tomadas a 200 aumentos.**

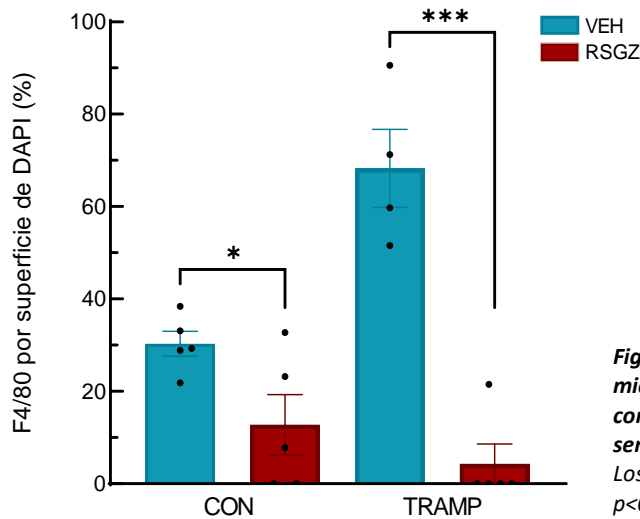


Figura 74. Cuantificación de macrófagos en el microambiente prostático de animales de animales control (CON) y transgénicos (TRAMP) tras 6 semanas de tratamiento con rosiglitazona (RSGZ). Los datos se representan como la media ± EEM. \*  $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .

### 7.4 El tratamiento con RSGZ durante 6 semanas aumenta el crecimiento tumoral en la próstata

Se estudio el efecto del tratamiento con RSGZ durante 6 semanas sobre los pesos de los animales, y la relación entre el peso del tracto genitourinario y el peso corporal. En cuanto al peso corporal no observamos diferencias entre los dos genotipos en respuesta al tratamiento [Fig.75A]. En cuanto al peso del tracto genitourinario, los animales TRAMP tratados con vehículo presentaron un peso del tracto genitourinario mayor que los animales control, pero, el tratamiento con RSGZ no causó ningún efecto [Fig.75B].

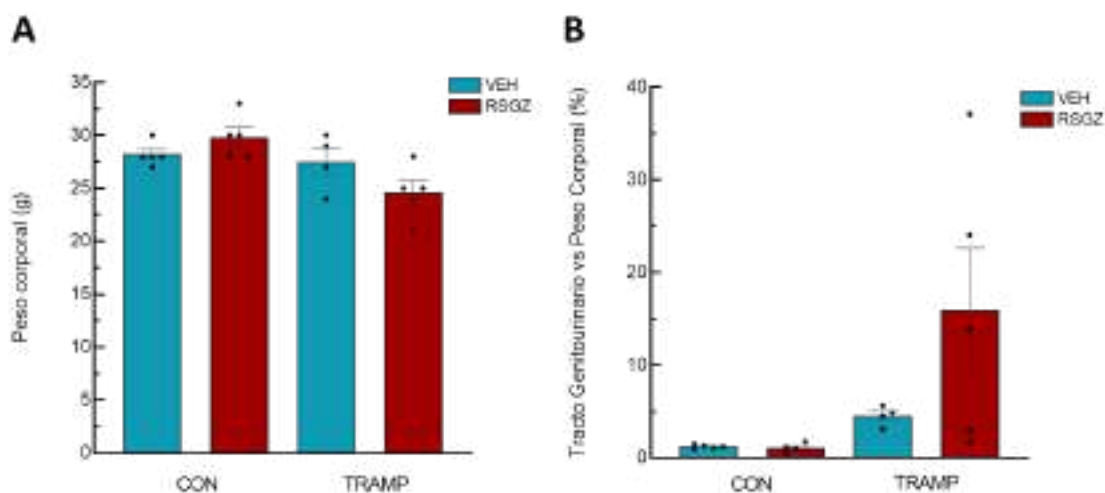
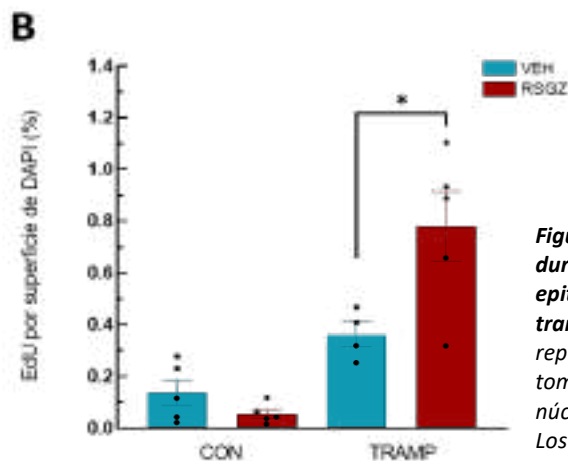
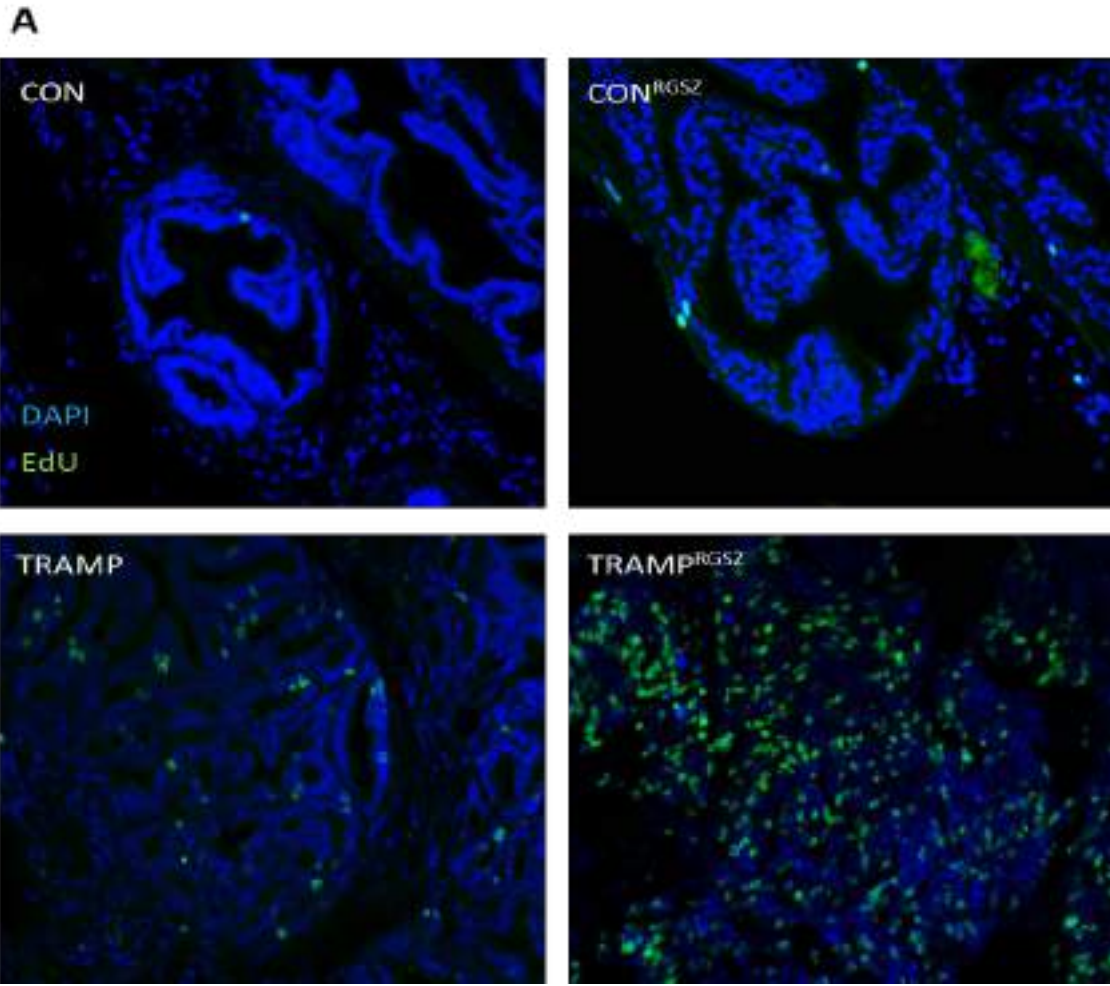


Figura 75. Efecto del tratamiento durante 6 semanas con rosiglitazona (RSGZ) sobre el peso corporal y del tracto de animales control (CON) y transgénicos (TRAMP). (A) Peso corporal. (B) Relación entre el peso del tracto genitourinario y el peso corporal en %. Los datos se representan como la media ± EEM.

Por último, se evaluó el efecto del tratamiento con RSGZ durante 6 semanas sobre la proliferación de las células epiteliales de la próstata mediante tinción de los núcleos con EdU. El número de células positivas para EdU aumentó, como es esperable, en los animales TRAMP respecto a los animales controles. Además, los niveles de células positivas para EdU son significativamente mayores en los animales TRAMP tratados con RSGZ y la mayor parte de los tumores observados tenían un fenotipo pobremente diferenciados (4/5) [Fig.76A-B].

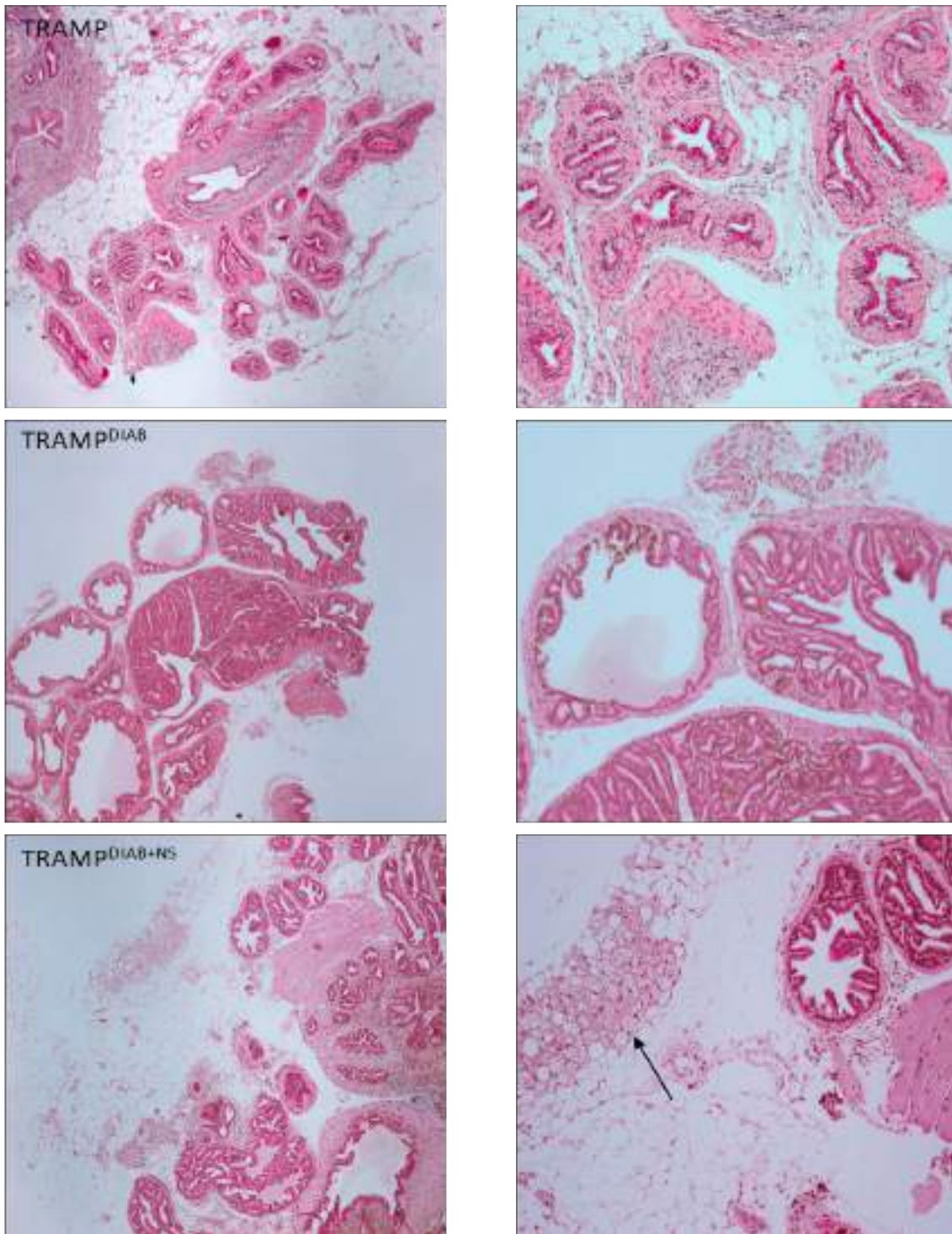


**Figura 76. Efecto del tratamiento con rosiglitazona (RSGZ) durante 6 semanas sobre la proliferación de células epiteliales en la próstata de animales control (CON) y transgénicos (TRAMP).** (A) Imágenes de fluorescencia representativas de tejido glandular prostático. Imágenes tomadas a 200 aumentos. (B) Cuantificación del número de núcleos positivos para EdU respecto de la superficie de DAPI. Los datos se representan como la media  $\pm$  EEM, \*  $p < 0.05$ .

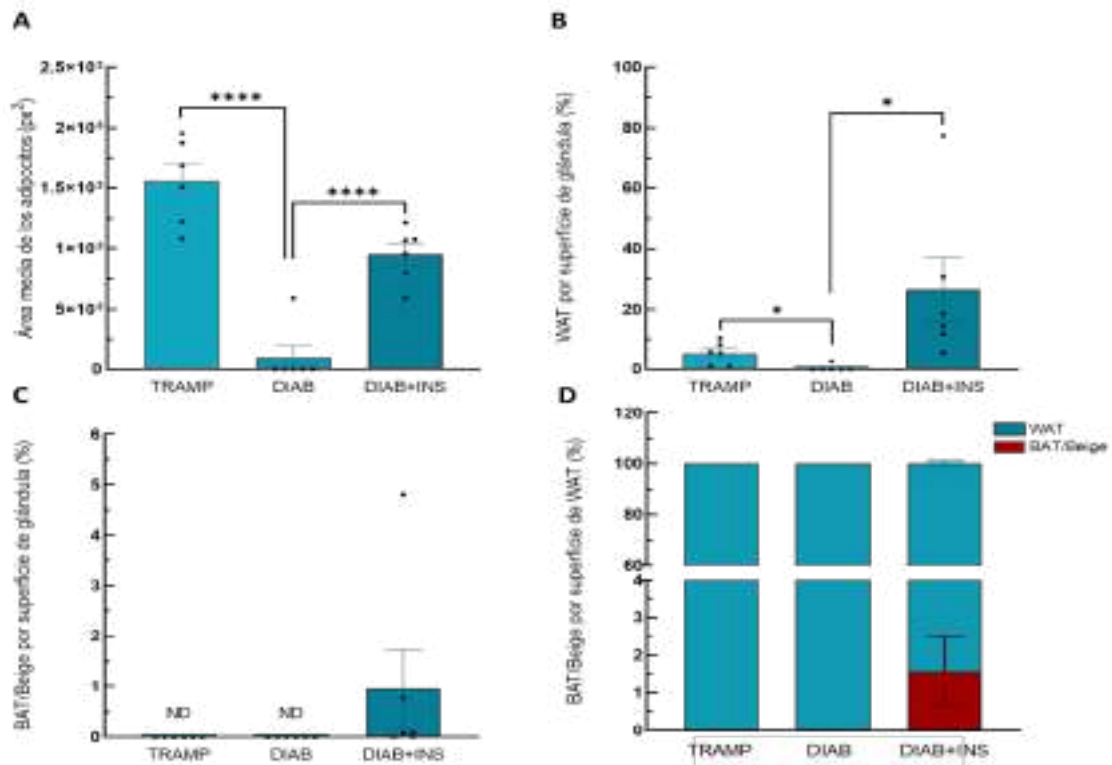
## 8. Otras estrategias endocrinas que regulan la progresión tumoral en ratones TRAMP, no alteran el contenido en grasa parda

Resultados recientes publicados por nuestro laboratorio demuestran que la inducción de diabetes por tratamiento con estreptozotocina o la administración exógena de melatonina reducen la progresión tumoral en la próstata de ratones TRAMP. La inducción de diabetes y el tratamiento con melatonina alteran el metabolismo glucolítico de la próstata, alterando el transporte de glucosa por ello decimos valorar, cómo otras dos estrategias experimentales endocrinas, modificaban el contenido de grasa en el microambiente tumoral de la próstata.

En cuanto al contenido de tejido adiposo tanto blanco como pardo/beige en el microambiente de animales a los que se indujo diabetes tipo 1, se observó como la inducción de diabetes prácticamente hace desaparecer el tejido adiposo del microambiente [Fig.77]. Sin embargo, la administración de insulina origina de forma significativa la aparición de WAT en las próstatas de los animales TRAMP [Fig.78]. El tratamiento con insulina, aumenta, aunque de manera no significativa la observación de focos de grasa parda/beige en el microambiente de la próstata de ratones TRAMP.



**Figura 77. Efecto de la inducción de diabetes tipo I sobre el tejido adiposo periprostático de animales de 24 semanas.** Imágenes representativas teñidas con hematoxilina-eosina de secciones de próstata de animales transgénicos (TRAMP), diabéticos (TRAMP<sup>DIAB</sup>) y diabéticos tratados con insulina (TRAMP<sup>DIAB+INS</sup>). La flecha indica depósitos de grasa parda/beige. Imágenes tomadas a 100 y 200 aumentos.



**Figura 78. Análisis morfométrico del tejido adiposo periprostático de animales diabéticos de 24 semanas.** (A) Tamaño de los adipocitos blancos. (B) Superficie de grasa blanca respecto de la superficie total de glándula. (C) Superficie de grasa parda/beige respecto de la superficie total de glándula (ND) no detectable. (D) Relación entre la superficie de grasa parda/beige respecto de la superficie de grasa blanca de animales Datos representados como la media ± EEM. \* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$

Por último, se decidió estudiar el efecto del tratamiento con melatonina sobre el balance de grasa en el tejido adiposo periprostático de animales TRAMP. En los animales tratados con melatonina se detectó la presencia de depósitos de adipocitos multiloculares característicos del tejido adiposo pardo/beige entre la grasa blanca periprostática, que como se había comprobado previamente no se encontraban en el grupo TRAMP de referencia [Fig.79].

El análisis morfométrico sobre el tejido adiposo no reveló diferencias estadísticamente significativas ni en el contenido, ni las características de la grasa blanca, pero los animales TRAMP tratados con melatonina presentaron un aumento, no significativo de la cantidad de tejido pardo/beige. [Fig.80].

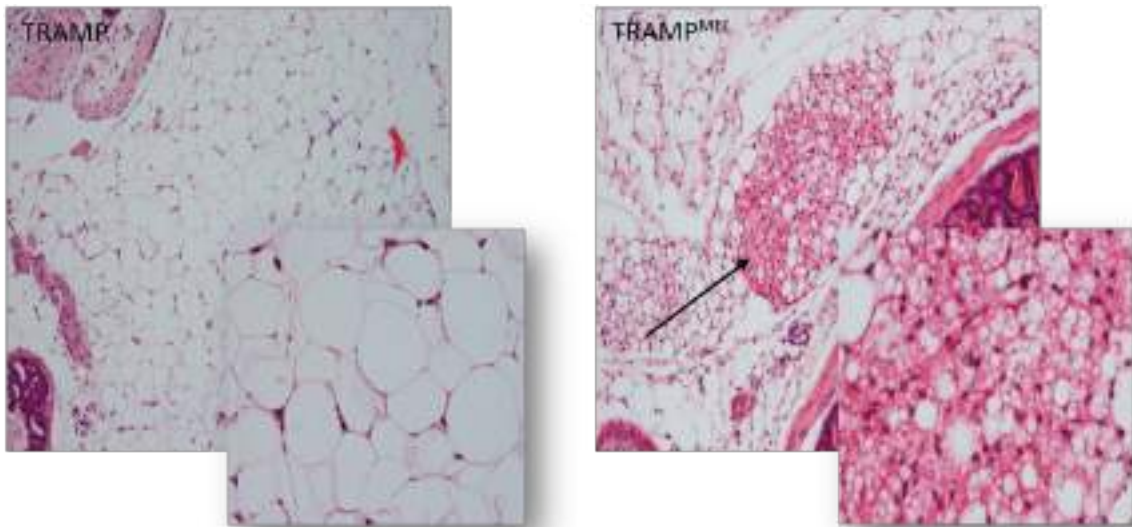


Figura 79. Efecto del tratamiento con melatonina en animales transgénicos (TRAMP) sobre el tejido adiposo periprostático. Imágenes representativas teñidas con hematoxilina-eosina de secciones de próstata. La flecha indica depósitos de grasa parda/beige. Imágenes tomadas a 100 y 200 aumentos.

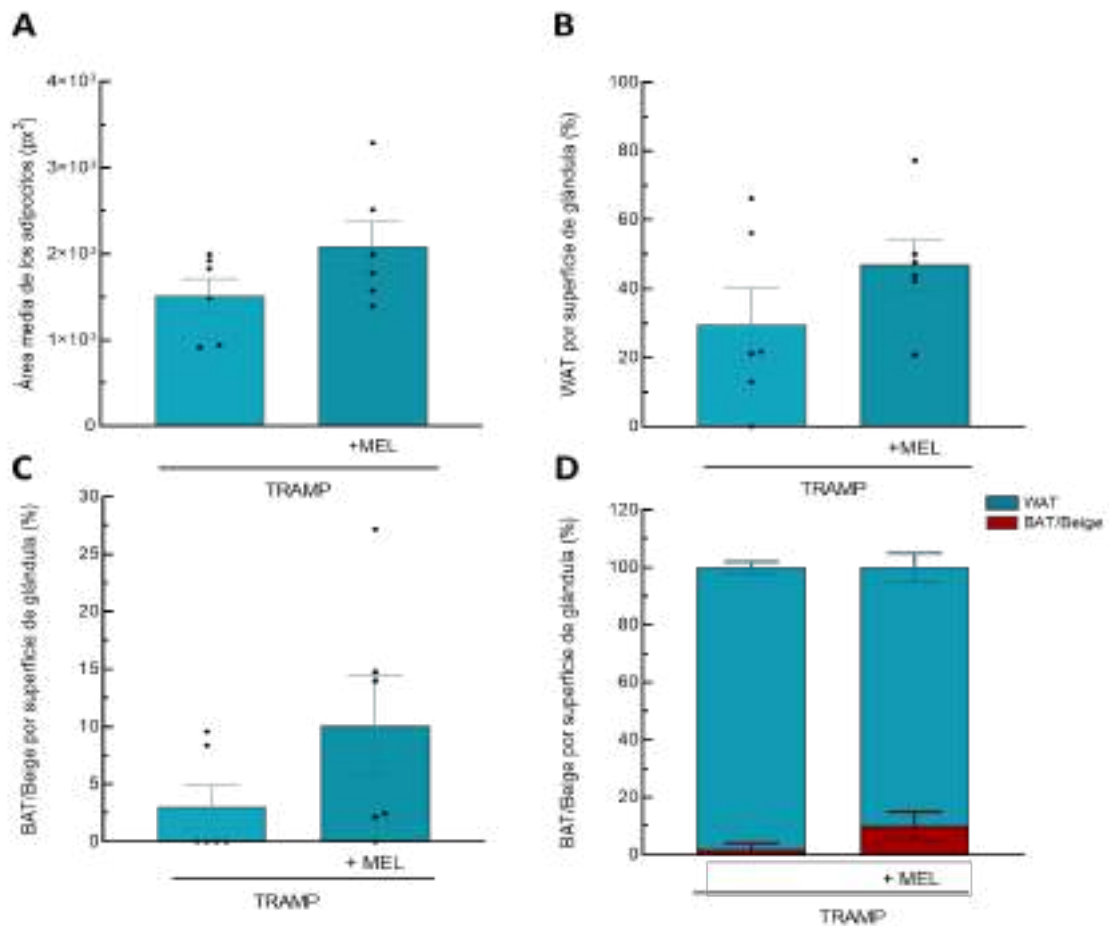


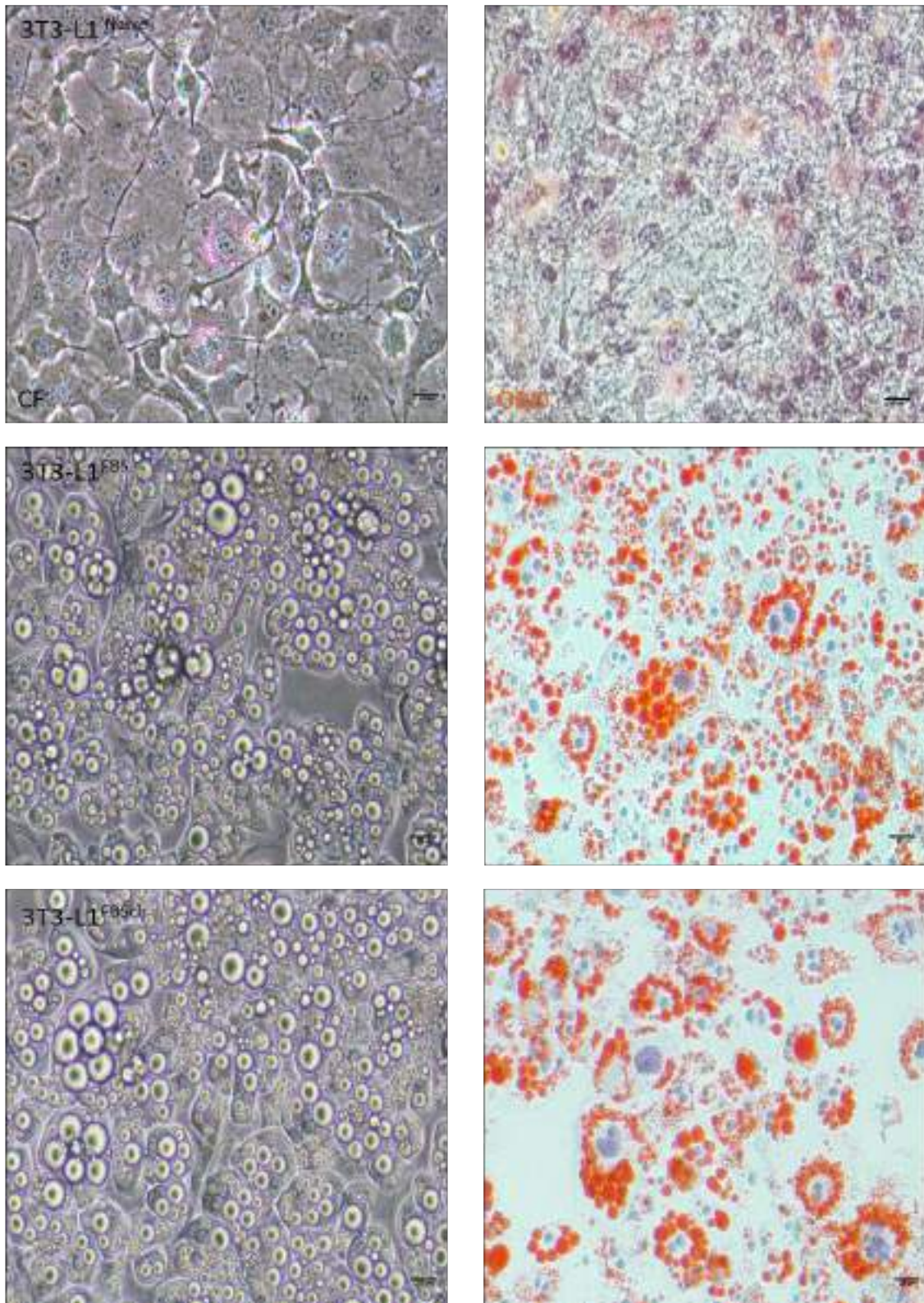
Figura 80. Análisis morfométrico del tejido adiposo periprostático de animales transgénicos (TRAMP) tras el tratamiento con melatonina (MEL). (A) Tamaño de los adipocitos blancos. (B) Superficie de grasa blanca respecto de la superficie total de glándula. (C) Superficie de grasa parda/beige respecto de la superficie total de glándula. (D) Relación entre la superficie de grasa parda/beige respecto de la superficie de grasa blanca. Los datos se representan como la media ± EEM.



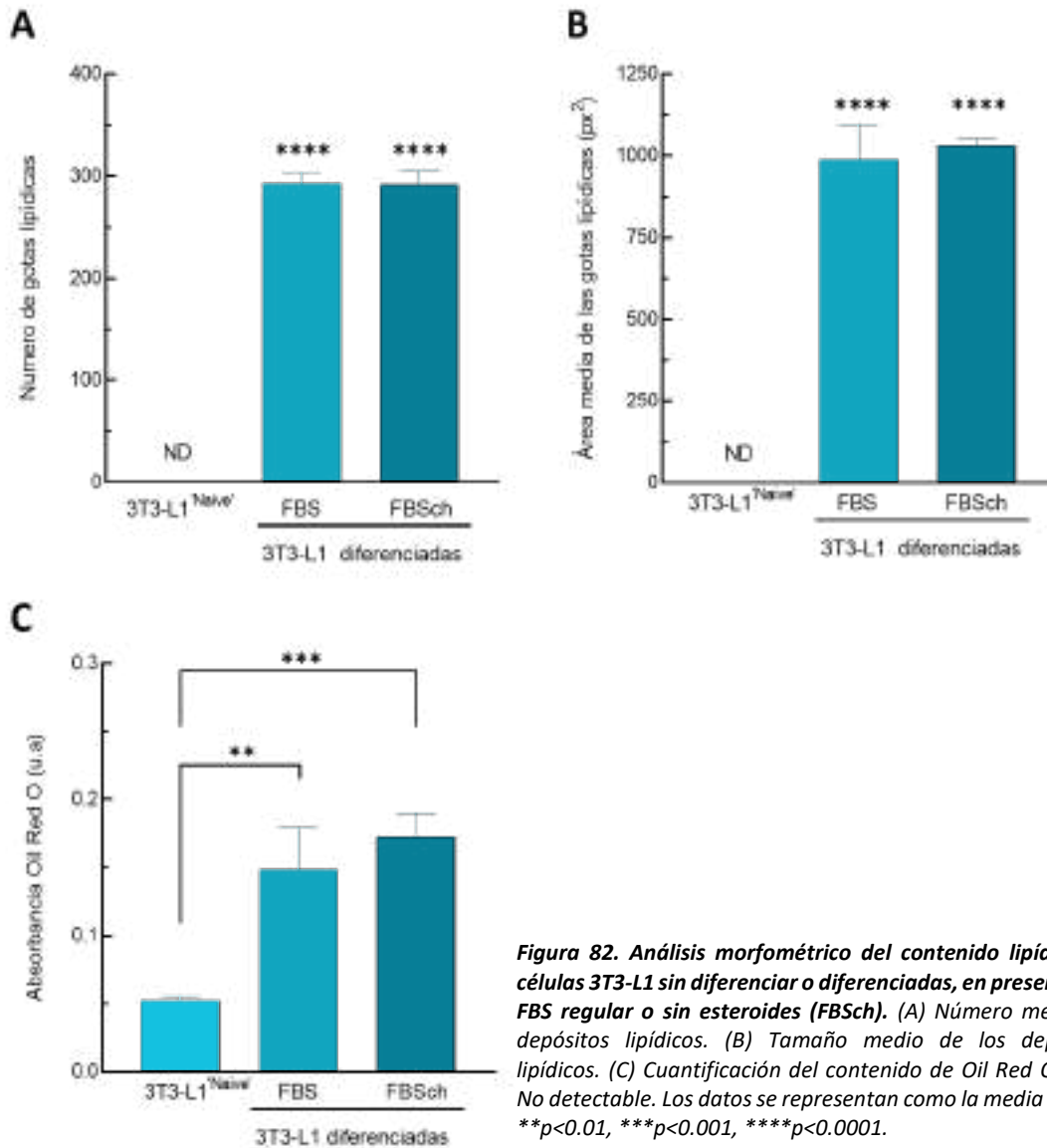
## 9. La retirada de andrógenos *in vitro* aumenta los niveles de UCP1 en células 3T3-L1

El efecto de la castración quirúrgica en ratones TRAMP sobre los acúmulos de grasa parda en la próstata no pudieron confirmarse mediante el tratamiento con rosiglitazona puesto que este fármaco no fue capaz de aumentar los depósitos de grasa parda/beige en el microambiente tumoral de la próstata. Estos resultados, nos indicaron que la señalización androgénica es fundamental para el aumento de grasa parda/beige en el microambiente de la próstata de ratones TRAMP. Además, las aproximaciones fisiológicas empleadas no nos permitieron dilucidar el posible papel que los adipocitos pardos/beige ejercen en el crecimiento del epitelio tumoral en la próstata. Por estos motivos, se analizó *in vitro*, mediante el empleo de fibroblastos embrionarios de ratón 3T3-L1, que tienen una alta capacidad para diferenciarse a adipocitos, el efecto directo de los andrógenos sobre la diferenciación adipogénica, y sobre los mecanismos de comunicación celular entre el tejido adiposo y el cáncer de próstata.

Para ello, las células 3T3-L1 se diferenciaron a adipocitos mediante el empleo de un cóctel compuesto por IBMX, dexametasona, rosiglitazona, e insulina durante 10 días. Utilizando células 3T3-L1 diferenciadas a adipocitos se analizó el efecto de la privación de andrógenos sobre dicha diferenciación. Para la privación androgénica, en primer lugar, se empleó FBS carente de esteroides (FBSch). Transcurridos 10 días desde el inicio de la diferenciación, se observó que la mayoría de las células incubadas con el cóctel de diferenciación y mantenidas en medio suplementado con insulina presentaban un elevado contenido en depósitos lipídicos en el citoplasma [Fig.81]. A nivel morfológico, las células 3T3-L1 'naive' sin diferenciar presentaron una forma estrellada con un núcleo central. En las células en las que se indujo el proceso de diferenciación se observó que, tanto con FBS como con FBSch, las células mostraron una morfología redondeada con un núcleo poco visible, y un gran contenido de acúmulos de tamaño variable muy refringentes en contraste de fases que se corresponden con acúmulos lipídicos. Para visualizar y cuantificar las gotas lipídicas, las células se tiñeron con "Oil Red O", colorante específico para lípidos neutros, observándose que estos acúmulos se disponían en su mayoría rodeando el núcleo celular. No se apreciaron diferencias significativas en las células diferenciadas en presencia de FBS o de FBSch [Fig.81].



**Figura 81. Diferenciación adipogénica en células 3T3-L1 cultivadas con FBS control (3T3-L1<sup>FBS</sup>) o privado de andrógenos (3T3-L1<sup>FBSch</sup>).** A la izquierda se muestran imágenes representativas mediante microscopía de contraste de fases (CF) de los tres grupos estudiados. A la derecha se muestran imágenes representativas de células de los tres grupos experimentales tras la tinción con Oil Red O (ORO). Imágenes tomadas a 200 aumentos.



**Figura 82. Análisis morfométrico del contenido lipídico de células 3T3-L1 sin diferenciar o diferenciadas, en presencia de FBS regular o sin esteroides (FBSch).** (A) Número medio de depósitos lipídicos. (B) Tamaño medio de los depósitos lipídicos. (C) Cuantificación del contenido de Oil Red O. (ND) No detectable. Los datos se representan como la media ± EEM. \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, \*\*\*\*p<0.0001.

A nivel morfométrico se analizó tanto el número como el tamaño de los acúmulos lipídicos en los tres grupos experimentales. Se observó, como era esperable que en el grupo de células control 3T3-L1 'naive' sin diferenciar, no se detectaron depósitos lipídicos, mientras que en ambos grupos de células 3T3-L1 diferenciadas, tanto las cultivadas con FBS como con FBSch privadas de andrógenos, estas exhibían un aumento significativo en el número de gotas de lípidos [Fig.82A]. En cuanto al tamaño de las gotas, se observó un resultado similar. No se detectaron gotas lipídicas en los fibroblastos 3T3-L1 'naive', y se observó un aumento significativo en ambos grupos de células diferenciadas, no existiendo diferencias entre ellos en el tamaño relativo de las gotas lipídicas [Fig.82B]. Por último, y con el fin de obtener una cuantificación del contenido total de lípidos se realizó una extracción del ORO contenido en las células y

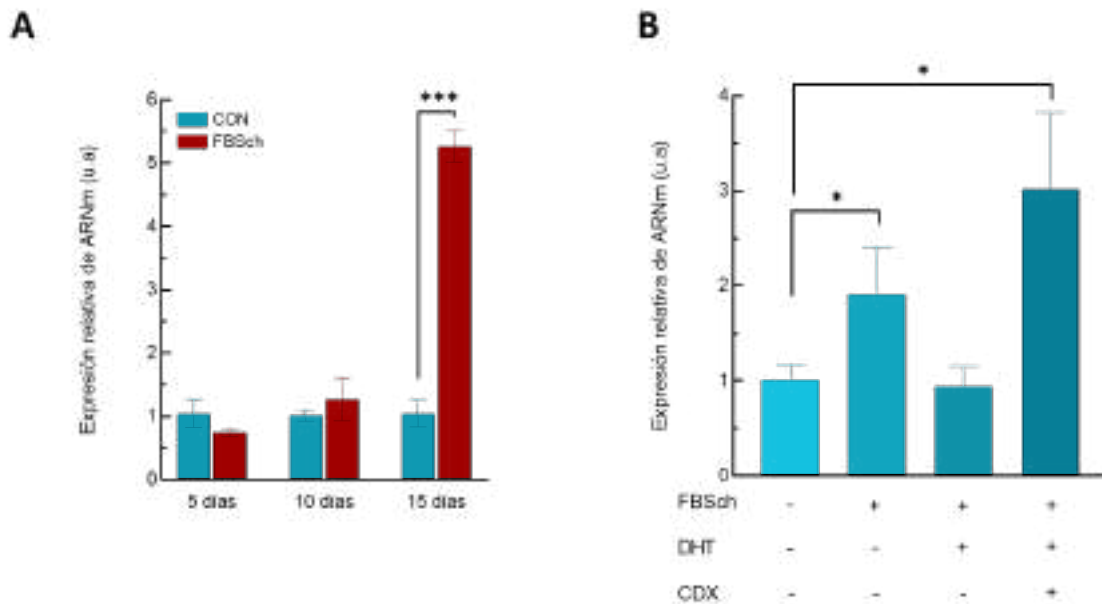
se analizó mediante colorimetría. Tal y como se observa en la Fig.82C, las células diferenciadas y cultivadas en presencia de FBS o FBSch presentaron un aumento significativo del contenido de ORO respecto de las células control, sin mostrar diferencias significativas entre ambos grupos de células diferenciadas.

Dado que no se observaron cambios aparentes entre las células 3T3-L1 diferenciadas y cultivadas en medio con o sin esteroides, se estudiaron los niveles de expresión de *Ucp1* en ambos grupos. Para ello se incubaron las células diferenciadas en medio completo y en medio suplementado con FBSch durante 5, 10 y 15 días. Transcurrido este tiempo se analizó por qPCR la expresión de *Ucp1*. Tras 15 días de diferenciación se observó un aumento significativo de la expresión de *Ucp1* en las células que habían sido cultivadas en medio con FBSch en comparación con las células cultivadas en medio completo [Fig.83A].

Para confirmar si este efecto era debido directamente a la ausencia de los andrógenos del suero, se añadió DHT al medio de cultivo suplementado con FBSch y se realizó un bloqueo farmacológico del receptor de andrógenos mediante la adición al medio de cultivo del antagonista del receptor de andrógenos bicalutamida (CDX). Transcurrido el tiempo de diferenciación adipogénica, se incubaron las células 3T3-L1 diferenciadas durante 15 días adicionales con (i) medio control (10% FBS), (ii) medio suplementado con 10% FBSch, (iii) medio suplementado con 10% FBSch más 5 nM DHT, (iv) medio suplementado con 10% FBSch, 5 nM DHT y 20  $\mu$ M de bicalutamida (CDX). Posteriormente las células se recogieron y se analizó la expresión de *Ucp1*.

En cuanto a la expresión de *Ucp1*, como ya hemos descrito arriba la incubación con suero libre de esteroides, FBSch, provocó un aumento significativamente los niveles relativos de expresión en comparación con las células cultivadas en medio control (FBS). La adición de DHT inhibió la sobreexpresión de *Ucp1*, manteniendo estos niveles de expresión similares a las células control. Por último, la adición de bicalutamida (CDX) al medio de cultivo aumentó significativamente los niveles de expresión de *Ucp1* respecto de las células control, de forma similar a como lo hace la incubación con FBSch, lo que

sugiere un posible papel del receptor de andrógenos en la regulación de la expresión génica de *Ucp1* [Fig.83B].

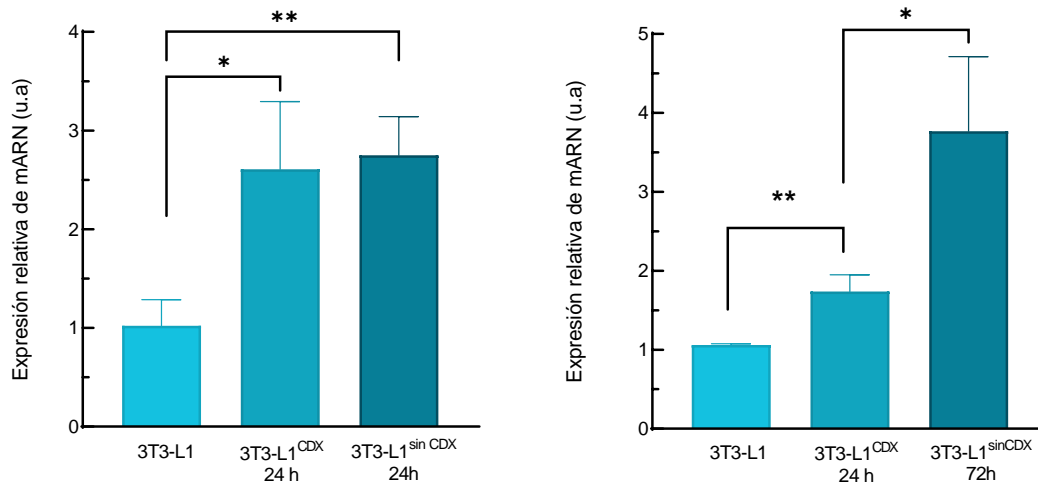


**Figura 83. Variación in vitro de los niveles de *Ucp1* en células 3T3-L1 diferenciadas a adipocitos.** (A) Niveles de expresión de *Ucp1* en células incubadas en medio control (CON) y tras la retirada de moléculas esteroideas del medio de cultivo (FBSch) durante 5, 10 y 15 días. (B) Niveles de expresión de *Ucp1* tras la retirada de moléculas esteroideas, (FBSch) adición de DHT, y bloqueo específico del receptor de andrógenos con bicalutamida (CDX). Los datos se representan como la media  $\pm$  EEM. \* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

Tras observar como la incubación con bicalutamida aumentó la expresión de *Ucp1* en las células 3T3-L1 diferenciadas, se comprobó si este efecto inhibitor de la expresión de *Ucp1* era o no reversible. Para ello fibroblastos 3T3-L1 previamente diferenciados durante 10 días se incubaron durante 24 h con 20  $\mu$ M de bicalutamida, posteriormente las células se lavaron en PBS pH 7.4, y se les añadió medio completo sin bicalutamida. Las células se incubaron en estas condiciones durante 24 y 72 horas más, tras lo cual se recogieron para analizar la expresión de *Ucp1*.

Tras 24 horas de cultivo se comprobó que en el grupo de células 3T3-L1 diferenciadas e incubadas con bicalutamida la expresión de *Ucp1* era significativamente mayor que el de las células 3T3-L1 diferenciadas e incubadas con el vehículo (DMSO). Además, tras la retirada de la bicalutamida del medio no disminuyó la expresión de *Ucp1*, no se observaron diferencias con respecto a las células incubadas en presencia del antiandrógeno [Fig.84A]. Tampoco la retirada de CDX y el análisis de *Ucp1* tras 72 horas recuperó los niveles de *Ucp1* del control. los niveles obtenidos en la expresión de *Ucp1*

fueron elevados con respecto al tratamiento con CDX. Estos resultados sugieren un papel represor irreversible sobre la expresión de *Ucp1* [Fig.84B].



**Figura 84. Efecto de la retirada de bicalutamida sobre los niveles de expresión de *Ucp1* en células 3T3-L1 diferenciadas a adipocitos.** (A) Niveles de expresión de *Ucp1* tras adición y retirada de bicalutamida (CDX) durante 24h. (B) Niveles de expresión de *Ucp1* tras la adición de bicalutamida durante 24h y retirada tras 72 horas. Los datos se representan como la media  $\pm$  EEM. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .

## 10.El receptor de andrógenos se une específicamente al promotor de *Ucp1* y actúa como un represor de la expresión génica.

El receptor de andrógenos actúa como un factor de transcripción involucrado en la regulación de la expresión de diferentes genes. Además, en células 3T3-L1 diferenciadas a adipocitos se comprobó que el bloqueo del receptor de andrógenos con bicalutamida aumenta los niveles de expresión de *Ucp1*. Por ello, se estudió si este efecto del receptor de andrógenos sobre la expresión de *Ucp1* era un efecto directo, actuando a nivel transcripcional, mediante la interacción con el promotor del gen, o se trata de un efecto indirecto mediado por otras posibles vías de señalización intracelulares. Para llevar a cabo el estudio, se diseñó un experimento de inmunoprecipitación de cromatina en fibroblastos 3T3-L1 indiferenciados incubados y sin incubar con bicalutamida durante 24 horas. Para este propósito se diseñaron cebadores específicos frente al promotor de *Ucp1* que generaron un producto de PCR de 199 pares de bases (pb).

Mediante PCR convencional se comprobó el resultado de la inmunoprecipitación. Se confirmó la amplificación por PCR, se detectó un producto de aproximadamente 150 pb correspondiente con una región del gen de la histona H3, y que es suministrado por el fabricante como control positivo (C+). En cuanto a las muestras problema, se obtuvo un producto de PCR de aproximadamente 200 pb. En la

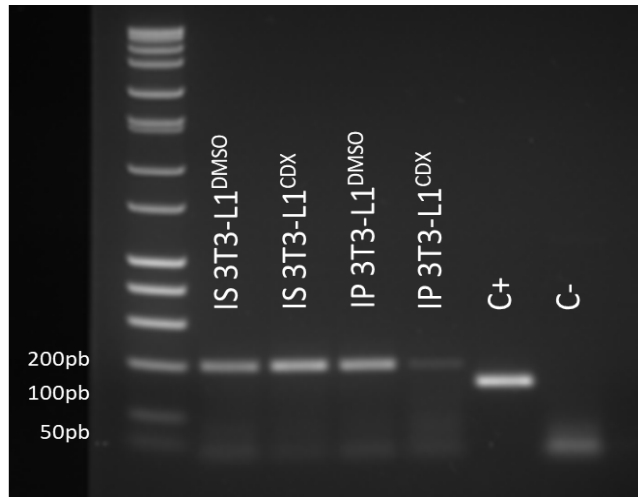


Figura 85. Gel de agarosa al 2% con los productos de PCR generados tras la inmunoprecipitación de cromatina sin (DMSO) y con bloqueo (CDX) del receptor de andrógenos. En el gel se cargaron muestras sin inmunoprecipitar (IS) e inmunoprecipitadas (IP), control positivo (C+), control negativo (c-).

muestra de fibroblastos 3T3-L1 incubados durante 24 horas con bicalutamida, el producto de la amplificación por PCR fue significativamente menor. En el caso de los fibroblastos 3T3-L1 tratados con vehículo, los niveles de producto obtenidos fueron similares a los obtenidos en las muestras sin precipitar (IS) [Fig.85].

A continuación, se comprobó si el producto de PCR obtenido tras la amplificación se correspondía con la región esperada del promotor de *Ucp1*. Para ello se secuenciaron los productos de PCR. En este caso escogimos la muestra inmunoprecipitada de fibroblastos 3T3-L1 incubados con vehículo y su control sin inmunoprecipitar. La secuenciación se realizó empleando los mismos cebadores que se emplearon para la PCR. Tanto en la muestra control como en la inmunoprecipitada, se detectaron secuencias con los dos cebadores (directo y reverso). [Fig.86].

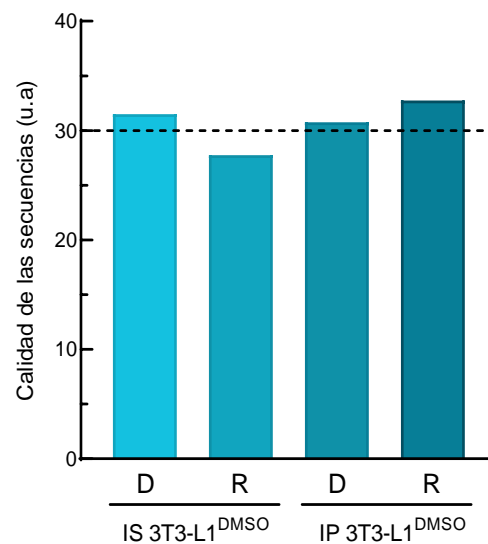
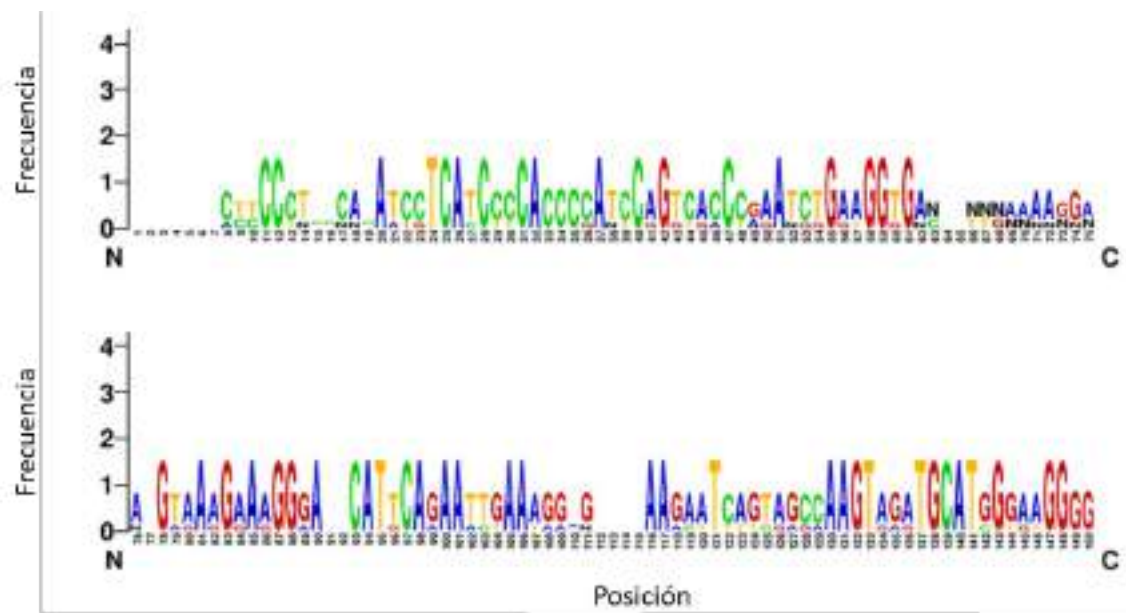


Figura 86. Representación gráfica de la calidad de la secuenciación para cada una de las muestras ensayadas. Se utilizaron de fibroblastos 'naive' 3T3-L1 incubados con vehículo (DMSO). Se ensayaron los cebadores directo (D) y reverso (R) en muestras sin inmunoprecipitar (IS) e inmunoprecipitadas (IP).

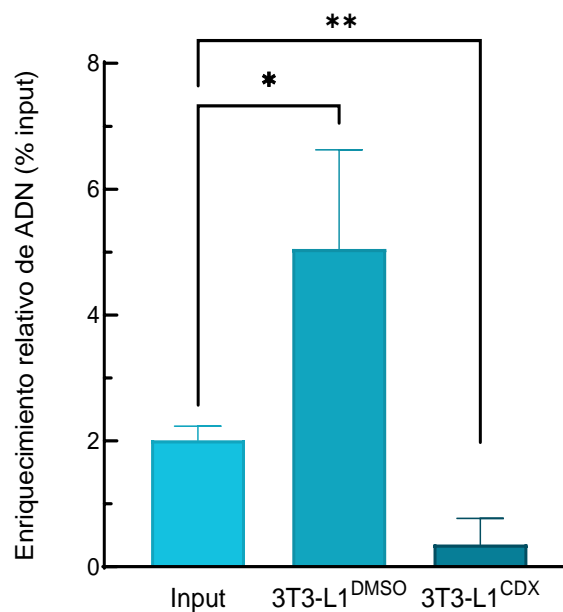
Tras comprobar que las secuencias obtenidas presentaban la calidad para continuar con el análisis, el siguiente paso fue realizar un alineamiento de múltiples secuencias. Para ello se enfrentaron cada una de las secuencias obtenidas de los diferentes productos de PCR a la secuencia de referencia, en este caso se correspondía con la secuencia completa del gen de ratón *Ucp1* (#NM\_009463). Los alineamientos se realizaron utilizando el software MEGA 11 y se utilizó el algoritmo MUSCLE para el análisis. Los resultados del alineamiento mostraron una concordancia entre las secuencias obtenidas de los productos de PCR junto con el genoma de referencia, mostrados de forma resumida mediante una representación WebLogo [Fig.87]. Se confirmó así que las secuencias obtenidas mediante inmunoprecipitación de cromatina se corresponden con una región localizada entre las posiciones 84.016.440 y 84.016.590 del cromosoma 8 del genoma de ratón, correspondiente con una región intermedia del promotor génico de *Ucp1*.



**Figura 87. Representación del alineamiento mediante Weblogo de las secuencias obtenidas de la secuenciación enfrentadas contra la secuencia completa del gen de *Ucp1*.** El esquema representa los nucleótidos en cada una de las posiciones de las secuencias. Adenina (A), citosina (C), guanina (G), timina (T), no detectado (N). La altura total de cada posición indica el grado de conservación de esa posición entre las secuencias. La altura del símbolo indica la frecuencia relativa de ese nucleótido para la posición predicha en cada una de las secuencias.



Por último, con el fin de cuantificar la cantidad de promotor de *Ucp1* tras la incubación de fibroblastos 3T3-L1 con bicalutamida, se realizó una PCR cuantitativa de las muestras tras la inmunoprecipitación, y comparamos estas con la muestra sin inmunoprecipitar (input). Se observó como la muestra de fibroblastos 3T3-L1 inmunoprecipitada que había sido incubada con vehículo (DMSO) presentaba niveles de amplificación de la región del promotor de *Ucp1* significativamente mayores que la muestra de ADN sin inmunoprecipitar, mientras que la muestra de células 3T3-L1 incubada con bicalutamida (CDX) durante 24 h e inmunoprecipitada con el anticuerpo contra el RA mostró unos niveles de amplificación de la región del promotor significativamente menores que la de la muestra de ADN sin inmunoprecipitar [Fig.88].



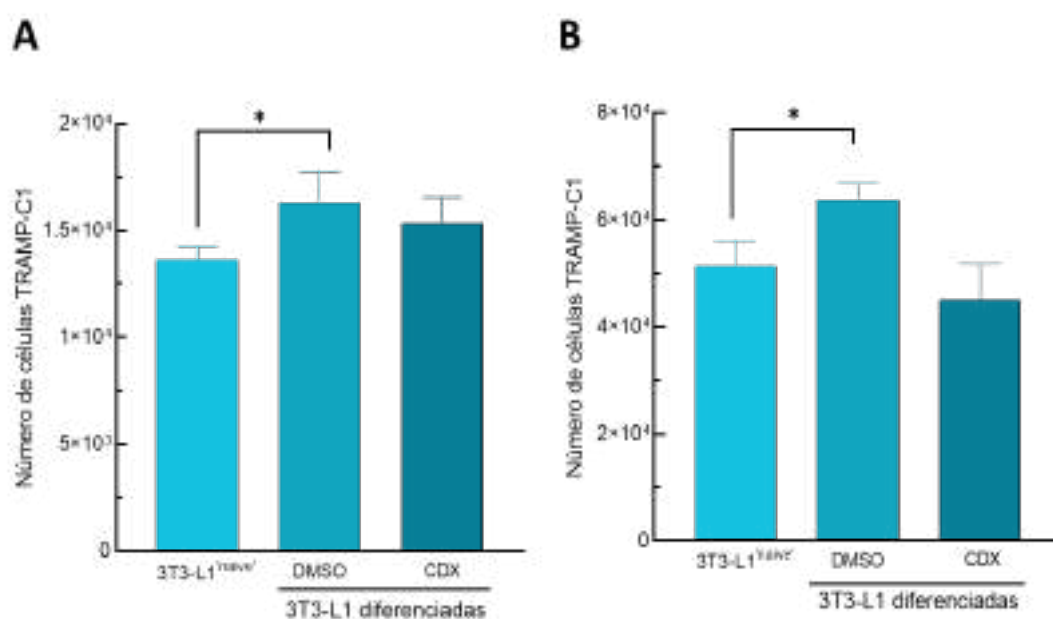
**Figura 88.** Enriquecimiento relativo en % respecto al input de la secuencia del promotor de *Ucp1* en fibroblastos 3T3-L1 incubados con vehículo (3T3-L1<sup>DMSO</sup>) o con bicalutamida (3T3-L1<sup>CDX</sup>) tras la inmunoprecipitación de cromatina. Los datos se representan como la media  $\pm$  EEM. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .

## 11. El secretoma liberado por células 3T3-L1 diferenciadas a adipocitos altera la proliferación de células tumorales de cáncer de próstata

Está ampliamente descrito en la bibliografía que el tejido adiposo blanco, a través de su secretoma, presenta diferentes actividades endocrinas y/o paracrinas en el control de la progresión tumoral. Así favorece en varios tipos tumorales la proliferación y supervivencia de las células neoplásicas. Sin embargo, el papel del secretoma del tejido adiposo pardo/beige en los tumores no se conoce con claridad. Utilizando fibroblastos 3T3-L1 diferenciados, se estudió el papel de los productos de secreción de estas células sobre la proliferación de células tumorales de cáncer de próstata. En primer lugar, se realizó un estudio de proliferación basado en la utilización de medios condicionados, tal y como se indica en el apartado de Material y Métodos. Para ello se incubaron las células

TRAMP-C1 durante 24 y 48 horas en este medio de cultivo, tras el cultivo las células fueron recogidas y contadas en una cámara de Neubauer.

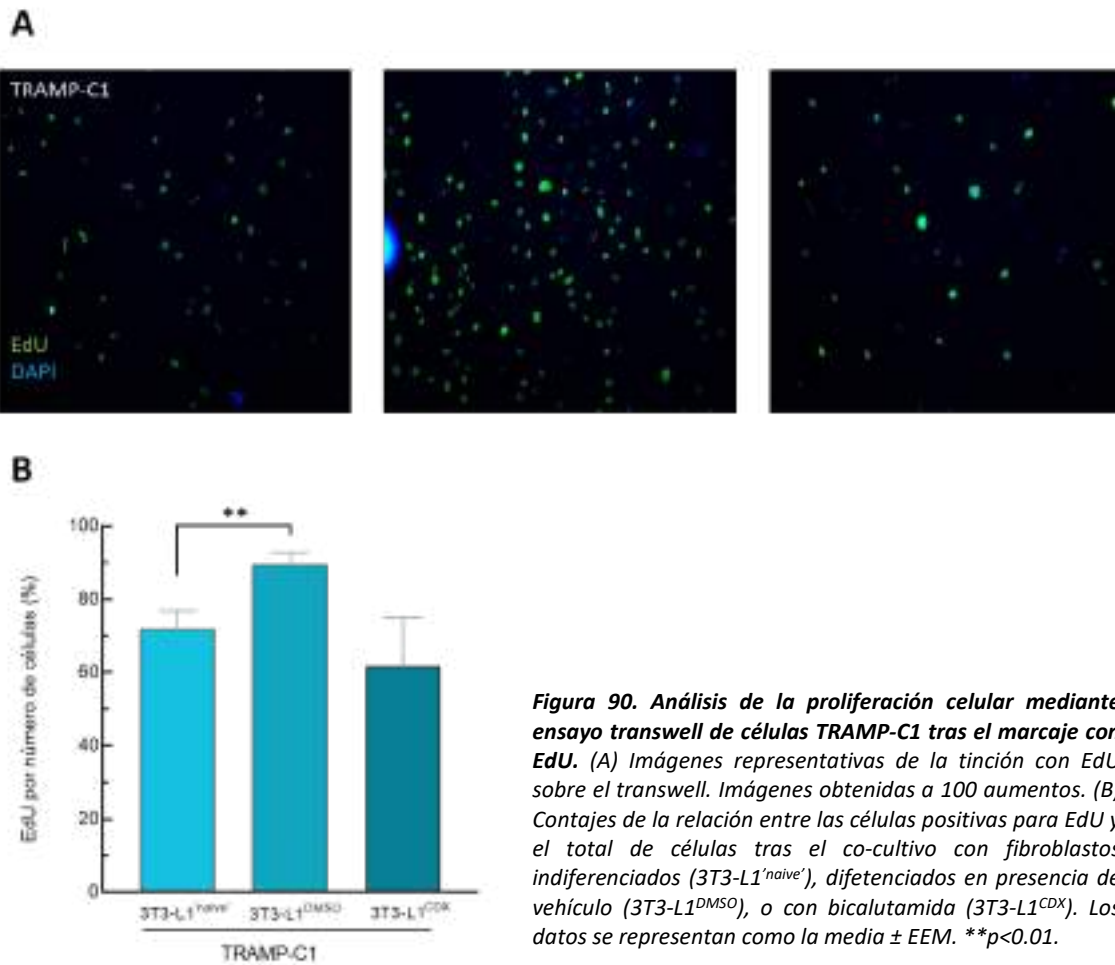
Se observó que, tras 24 h de cultivo en medio condicionado de células 3T3-L1 diferenciadas a adipocitos, el número de células TRAMP-C1 fue significativamente mayor que el del grupo control, incubadas en un medio condicionado derivado de fibroblastos 3T3-L1. En cuanto a las células TRAMP-C1 incubadas en un medio derivado de células 3T3-L1 diferenciadas y posteriormente incubadas con bicalutamida no se obtuvieron diferencias significativas [Fig.89A]. Tras 48h de cultivo, se observaron los mismos resultados, y aunque la proliferación de las células TRAMP-C1 cultivadas en un medio derivado de adipocitos incubados con bicalutamida fue menor que el grupo tratado con vehículo, las diferencias no fueron significativas [Fig.89B].



**Figura 89. Análisis de la proliferación celular en células TRAMP-C1 incubadas con medios condicionados de células 3T3-L1 y células 3T3-L1 diferenciadas a adipocitos.** (A) Número de células TRAMP-C1 tras 24 horas de cultivo. (B) Número de células TRAMP-C1 tras 48 horas de cultivo. Los datos se representan como la media  $\pm$  EEM. \* $p < 0.05$ .

Se realizó un sistema de co-cultivo, utilizando para ello insertos transwell™ y se cuantificó el número de células proliferativas TRAMP-C1 mediante tinción con EdU. Se observó que, el número de células positivas para EdU fue mayor en el grupo que había sido cultivado sobre células 3T3-L1 previamente diferenciadas a adipocitos. Sin embargo, el número de células positivas para EdU en el grupo cultivado sobre células 3T3-L1 diferenciadas a adipocitos y tratadas con bicalutamida fue menor. [Fig.90A]. Al

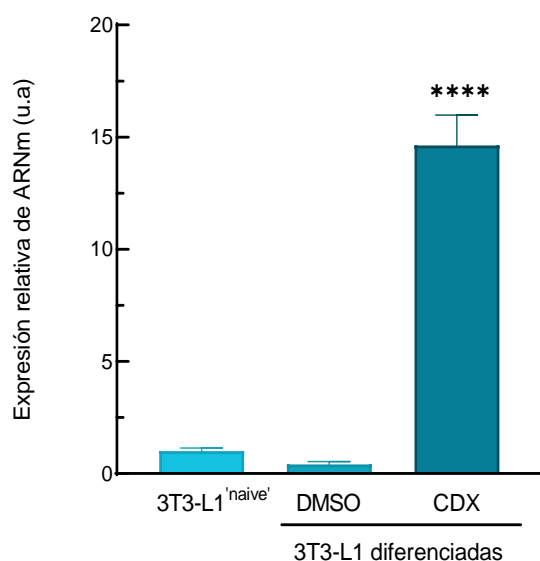
realizar las cuantificaciones del número de células positivas para EdU respecto al número de células teñidas con DAPI se confirmó la observación, mostrando un aumento en las TRAMP-C1 cultivadas sobre células 3T3-L1 diferenciadas respecto de las células TRAMP-C1 cultivadas sobre fibroblastos sin diferenciar. En cuanto a las células TRAMP-C1 cultivadas sobre células 3T3-L1 incubadas previamente con bicalutamida, no se detectaron diferencias respecto a las células incubadas sobre los fibroblastos [Fig.90B].



El tejido adiposo es capaz de sintetizar y liberar como parte de su secretoma una gran cantidad de vesículas extracelulares con importante actividad reguladora sobre otras células diana. Con el fin de estudiar dicho secretoma, se aislaron vesículas extracelulares del medio de cultivo de fibroblastos 3T3-L1 y células 3T3-L1 diferenciadas a adipocitos incubadas tanto con vehículo como con bicalutamida.

Con el objetivo de comprobar si la bicalutamida había tenido efecto sobre las células 3T3-L1 diferenciadas a adipocitos cuyo secretoma se iba a estudiar, se realizó un análisis de la expresión relativa de *Ucp1* en estas células. Se confirmó que la incubación

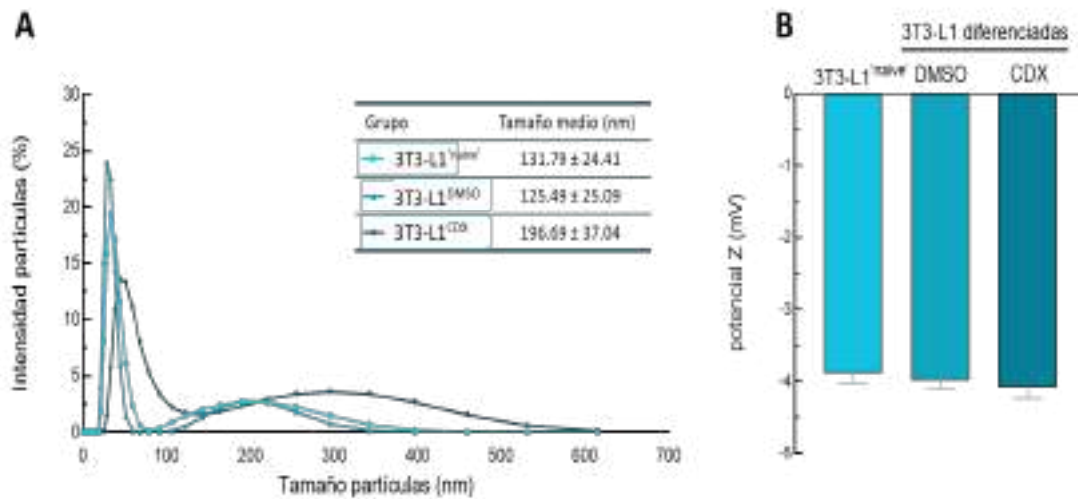
con bicalutamida aumentó significativamente de los niveles de expresión de *Ucp1* en las células 3T3-L1 diferenciadas a adipocitos [Fig.91].



**Figura 91.** Niveles de expresión de *Ucp1* en células 3T3-L1 indiferenciadas (3T3-L1'naive'), y diferenciadas en presencia de vehículo (3T3-L1DMSO) o bicalutamida (3T3-L1CDX). Los datos se representan como la media  $\pm$  EEM. \*\*\*\* $p < 0.0001$  vs 3T3-L1'naive' y 3T3-L1DMSO.

Una vez comprobado a nivel molecular la diferenciación de las células 3T3-L1, a continuación, se aislaron las vesículas extracelulares siguiendo un método de aislamiento basado en la ultracentrifugación diferencial. Tras el aislamiento de las vesículas extracelulares se comprobó el tamaño y grado de agregación de la población de estas vesículas mediante dispersión dinámica de la luz (DLS). Las muestras obtenidas, tanto de los fibroblastos 3T3-L1 como de las células 3T3-L1 diferenciadas a adipocitos, presentaron partículas cuyos tamaños oscilaron entre los 30 y los 600 nm, lo que se corresponde con el rango de tamaños descrito para las EVs en otros tipos celulares. Dentro de este rango de tamaños, las EVs derivadas de células 3T3-L1 diferenciadas a adipocitos e incubadas con bicalutamida presentaron un tamaño medio mayor ( $196.69 \pm 37.04$ ) que el de las EVs derivadas tanto de fibroblastos 3T3-L1 'naive' ( $131.79 \pm 24.24$ ) como de células 3T3-L1 diferenciadas e incubadas con el vehículo ( $125.49 \pm 25.09$ ). Además, el análisis de los diferentes tamaños de partículas en función de la intensidad reveló la presencia de dos poblaciones claramente diferenciadas. La población mayoritaria estaba comprendida en tamaños que oscilaba entre los 20 y los 60 nm, lo que podría corresponderse con poblaciones de exosomas. Por otro lado, y en mucha menor cantidad, se encontraron vesículas cuyos tamaños estaban comprendidos entre los 100 y los 600 nm, las cuales podrían corresponder a micro vesículas [Fig.92A]. Se cuantificó también el estado de agregación de las EVs presentes en las muestras

mediante el análisis del potencial Z. De acuerdo con la característica carga negativa superficial que rodea a las membranas plasmáticas, se obtuvieron potenciales Z negativos. Se observó que el potencial Z fue de aproximadamente -4 mV, no existiendo diferencias entre las tres muestras analizadas. La presencia de un potencial tan bajo puede ser indicador de posible agregación de las EVs presentes en la muestra [Fig.92B].

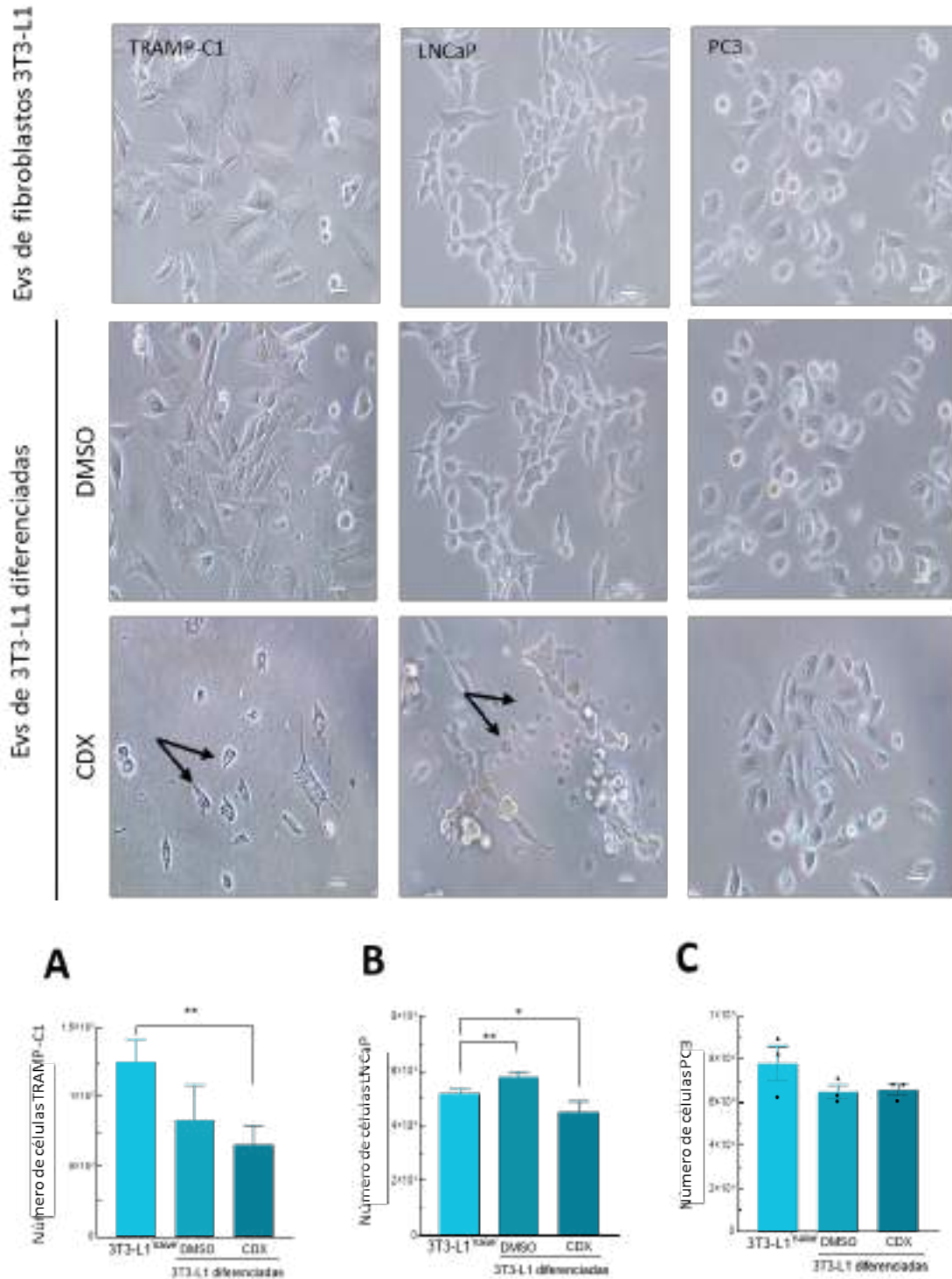


**Figura 92. Caracterización fisicoquímica de los extractos de vesículas extracelulares.** (A). Análisis de la intensidad de las partículas mediante dispersión dinámica de la luz. (B) Cuantificación del estado de agregación de las vesículas en suspensión mediante análisis del potencial Z. Los datos se representan como la media ± EMM.

Tras caracterizar las EVs derivadas tanto de fibroblastos 3T3-L1 'naive' como de células 3T3-L1 diferenciadas a adipocitos, o diferenciadas e incubadas con bicalutamida, se estudió el papel de sus EVs sobre la proliferación de tres líneas celulares de cáncer de próstata, dos de ellas dependientes de andrógenos (TRAMP-C1 y LNCaP) y una independiente de andrógenos (PC-3). Para ello, las células se incubaron durante 48h con una cantidad determinada de EVs de cada uno de los grupos de células 3T3-L1, que se estableció en base a la cuantificación proteica mediante el método BCA. 5 µg de proteína fueron añadidos al cultivo, y se analizó la proliferación mediante conteo celular en cámara de Neubauer.

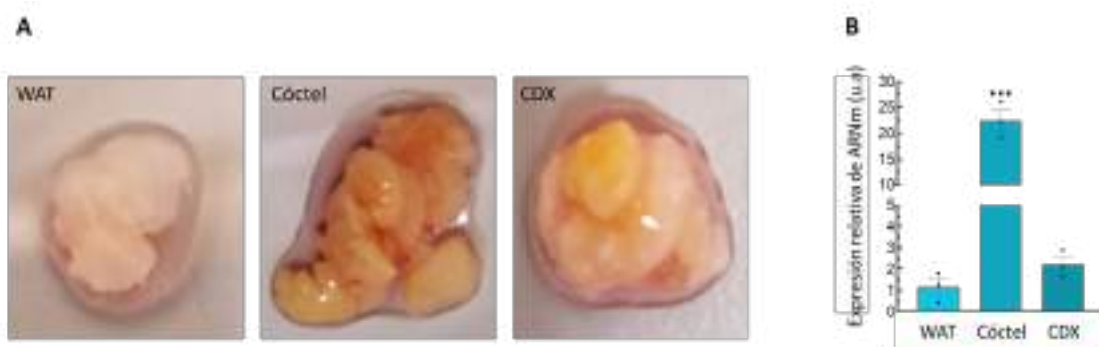
En la línea celular TRAMP-C1 se observó que la incubación con EVs procedentes de células diferenciadas y cultivadas en presencia de bicalutamida redujo significativamente la cantidad de células con respecto de las células con EVs de fibroblastos 'naive' sin diferenciar. Tras 48h de incubación se observaron signos

morfológicos de muerte celular. En el caso de la línea celular tumoral de próstata humana LNCaP, tras 48 horas de incubación se encontró un mayor número de células en presencia del extracto de EVs derivadas de células 3T3-L1 diferenciadas a adipocitos, mientras que en las células cultivada con vesículas obtenidas de fibroblastos 3T3-L1 diferenciados a adipocitos y cultivados con bicalutamida mostraron un número de células significativamente menor que aquellas cultivadas en presencia de vesículas obtenidas de fibroblastos 3T3-L1 no diferenciados. Además, al igual que ocurrió con la línea celular TRAMP-C1, en este grupo se observaron también fenómenos de muerte celular. Por último, se analizó que ocurría en el modelo de cáncer de próstata hormono-resistente PC-3. En este caso la incubación con el extracto de EVs no alteró la proliferación de estas células [Fig.93]. Esto podría sugerir un posible papel antitumoral del secretoma de los adipocitos pardos/beige en las células tumorales de próstata sensibles a control hormonal.



**Figura 93. Efecto del tratamiento con EVs aisladas de células 3T3-L1 diferenciadas y sin diferenciar sobre la proliferación celular de TRAMP-C1, LNCaP, PC3.** Superior: imágenes de contraste de fases, Las flechas indican células en proceso de muerte celular. se observa una imagen representativa de las tres líneas celulares (TRAMP-C1, LNCaP y PC3) tomadas a 200 aumentos. Inferior: Cuantificación de la proliferación celular tras 48 horas incubadas con extractos de vesículas extracelulares de fibroblastos indiferenciados (3T3-L1<sup>naive</sup>), y diferenciados en presencia de vehículo (DMSO) o bicalutamida (CDX). (A) TRAMP-C1 (B) LNCaP (C) PC-3. Los datos se representan como la media ± EEM. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .

Puesto que ni con la castración, ni con el tratamiento con rosiglitazona se pudo confirmar el efecto del tejido adiposo pardo/beige sobre la progresión tumoral en la próstata, se decidió comprobar *in vivo* sus efectos sobre la proliferación de células tumorales primarias de próstata. Se realizó un experimento preliminar basado en la utilización de un aloinjerto entre tejido adiposo blanco, tejido adiposo pardo/beige diferenciado *in vitro*, y células tumorales TRAMP-C1. En primer lugar, para la realización de la diferenciación del tejido adiposo *in vitro*, se empleó un cultivo organotípico siguiendo las indicaciones explicadas en el apartado de Material y Métodos. Transcurridas 3 semanas desde el inicio del cultivo, se observó que los explantes de tejido adiposo epididimario que fueron incubados tanto en presencia de un cóctel de diferenciación compuesto por dexametasona, IBMX, indometacina, rosiglitazona y triiodotironina, utilizado como control positivo, como de bicalutamida, presentaron una tonalidad parda en comparación con los fragmentos incubados en presencia de vehículo, que mantenían el aspecto de tejido adiposo blanco [Fig.94A]. Además, para comprobar la diferenciación se analizó mediante qPCR los niveles de expresión de *Ucp1* en los explantes, y se observó que los niveles de expresión de *Ucp1* en los fragmentos incubados con el medio suplementado con el cóctel de diferenciación fueron significativamente mayores que los del control, en el caso de los explantes incubados con bicalutamida, se observa un aumento de la expresión de *Ucp1*, aunque esta no llega a alcanzar la significación estadística [Fig.94B].

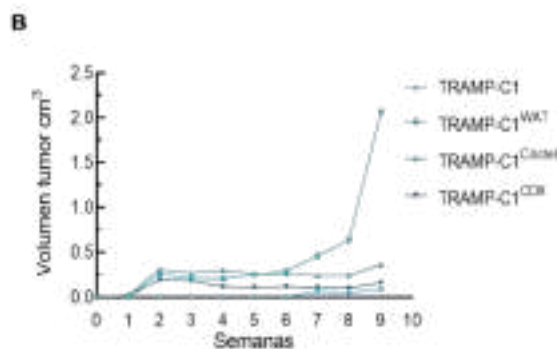
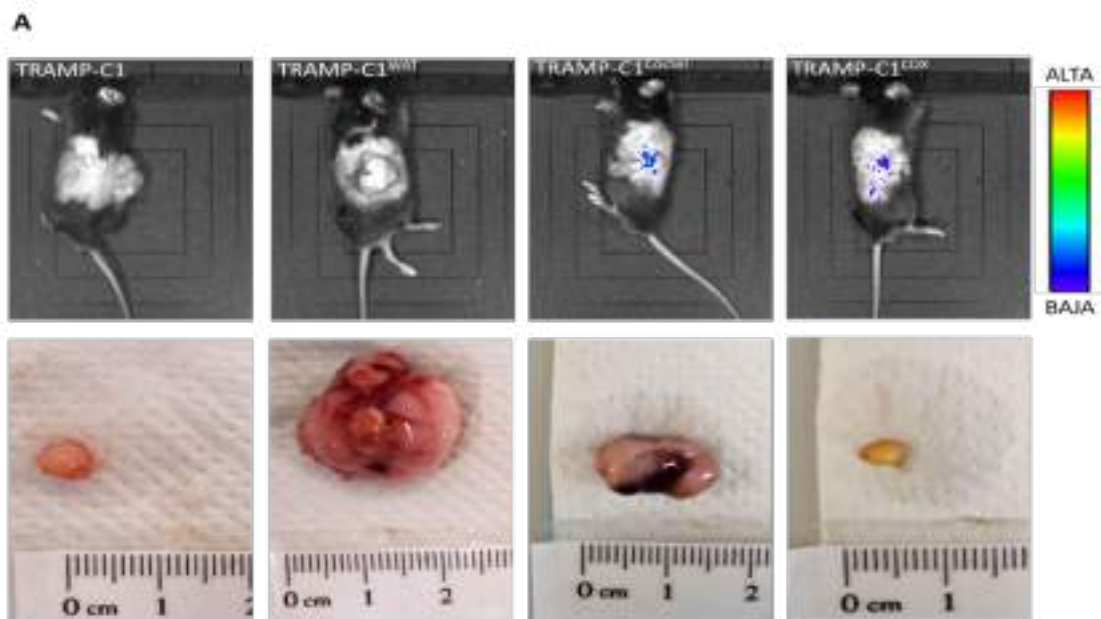


**Figura 94. Diferenciación de fragmentos de tejido adiposo epididimario mediante cultivo organotípico. (A)** Imágenes de los fragmentos de grasa incubada con vehículo (WAT), incubada con cóctel, e incubada con bicalutamida (CDX) grasa tras 3 semanas de cultivo. **(B)** Niveles de expresión relativa de *Ucp1* en los grupos y tiempo anteriormente mencionados. \*\*\*  $p < 0.001$

Una vez determinada la diferenciación *in vitro* de los explantes de tejido adiposo, se procedió a realizar el aloinjerto junto con células tumorales TRAMP-C1 transfectadas



con luciferasa (TRAMP-C1<sup>Luc</sup>) en ratones C57BL/6 control. Transcurridas 9 semanas desde la inoculación, se visualizó la presencia de células luminiscentes en los tumores generados con un sistema de imagen IVIS. Mediante esta técnica de imagen, solo se detectó la presencia de células tumorales en los animales que presentaban aloinjerto de células TRAMP-C1 con tejido adiposo pardo/beige, tanto diferenciado a partir del cóctel (TRAMP-C1<sup>cóctel</sup>), como de bicalutamida (TRAMP-C1<sup>CDX</sup>). En el caso de los animales control (TRAMP-C1), que solo tenían células tumorales, o con grasa blanca (TRAMP-C1<sup>WAT</sup>), no se observó señal luminiscente. Al sacrificio los tumores fueron extraídos observándose tumores de mayor tamaño en los animales con fragmentos de grasa blanca [Fig.95A]. Finalmente, se hizo un seguimiento del volumen tumoral a lo largo de las 9 semanas del experimento. Los tumores generados a partir de células TRAMP-C1<sup>WAT</sup> presentaron un crecimiento mayor que el resto de los aloinjertos de TRAMP-C1, TRAMP-C1<sup>cóctel</sup> o TRAMP-C1<sup>CDX</sup>, que presentaron una tendencia de crecimiento similar [Fig.95B].



**Figura 95. Modelo in vivo de aloinjerto entre tejido adiposo y células tumorales de próstata.** (A) Localización de la bioluminiscencia (superior), imágenes ex vivo de los tumores (inferior). (B) Evolución del volumen tumoral a lo largo de las semanas en aloinjertos de células tumorales de próstata (TRAMP-C1), células tumorales y grasa incubada en presencia de vehículo (TRAMP-C1<sup>WAT</sup>), grasa incubada con cóctel (TRAMP-C1<sup>cóctel</sup>), y bicalutamida (TRAMP-C1<sup>CDX</sup>)



# DISCUSIÓN



El cáncer de próstata a pesar de su elevada incidencia suele tener un curso indolente en un elevado número de pacientes. Sin embargo, en un número significativo de individuos esta neoplasia presenta factores clínicos relevantes asociados con elevadas tasas de morbilidad y mortalidad. Actualmente los mecanismos implicados en este comportamiento agresivo de los tumores de próstata no se conocen con claridad, pero está bien establecido el papel decisivo que el microambiente tumoral desempeña durante el proceso tumorigénico, cumpliendo funciones clave tanto en la iniciación como a lo largo de la progresión tumoral (149).

El tejido adiposo blanco es uno de los componentes mayoritarios del microambiente tumoral de la próstata. Este tejido adiposo periprostático se encuentra en muchas ocasiones en contacto directo con las células tumorales, pudiendo influir en el fenotipo de las células malignas gracias a su importante actividad secretora (130). La actividad secretora, cantidad y distribución del tejido adiposo están muy influenciadas por diferentes factores externos como el consumo de dietas ricas en grasas, o el estilo de vida sedentario, lo que tiene como consecuencia el desarrollo de patologías como la obesidad que suponen un factor de riesgo mayor a padecer diferentes tipos de tumores entre los que se incluye el cáncer de próstata (116). Esta asociación entre obesidad y cáncer ha fomentado el estudio de las relaciones de comunicación celular que acontecen entre los adipocitos y las células tumorales, convirtiéndose así este tejido en objeto de diana terapéutica en algunas ocasiones (150). A este nivel, la transdiferenciación del tejido adiposo blanco a tejido adiposo pardo ha emergido como un potencial mecanismo de modulación debido a su capacidad para reducir la adiposidad y regular la actividad del tejido adiposo. Además, se han descrito efectos beneficiosos de esta transdiferenciación en el tratamiento de diferentes patologías de origen metabólico como la diabetes (151). Sin embargo, sus efectos en el ámbito del control de la progresión tumoral no están bien definidos y se requiere un estudio más profundo.

A lo largo de esta tesis doctoral se ha estudiado la posible relación entre la aparición de depósitos de tejido adiposo pardo/beige en el tejido adiposo blanco periprostático y el crecimiento tumoral en la próstata de animales TRAMP. Así como, se ha analizado la influencia de la actividad secretora de estas células sobre la proliferación

## DISCUSIÓN

de líneas celulares tumorales de cáncer de próstata a través del uso de modelos celulares, en un intento por contribuir al conocimiento de la función del tejido graso pardo en el microambiente tumoral de la próstata.

### **Castración y grasa parda/beige en el microambiente tumoral de la próstata**

El papel de las hormonas sexuales es importante en la fisiología del tejido adiposo, existiendo un claro dimorfismo sexual en humanos en cuanto a la localización de los principales depósitos de tejido adiposo, correlacionados positivamente con los niveles circulantes de estrógenos y testosterona (152). Sin embargo, los efectos de los andrógenos en depósitos tejido-específicos como el tejido adiposo periprostático no se ha estudiado de forma profunda. Por ello, utilizando el modelo murino TRAMP evaluamos el efecto de la retirada de andrógenos sobre el contenido del tipo de tejido adiposo periprostático.

A nivel del tejido adiposo periprostático observamos que la castración provoca un aumento del contenido en grasa blanca en ratones control, asociado con un mayor tamaño de los adipocitos blancos. Esto concuerda con otros datos publicados tanto en otras especies de roedores, como de otros mamíferos en diferentes depósitos de tejido adiposo (149,150). El aumento en el contenido en grasa blanca está relacionado con la bajada de la tasa metabólica asociada con la ausencia de testosterona circulante, lo que reduce las necesidades energéticas del individuo. En este contexto, mantener una dieta con el mismo valor energético se manifiesta en un exceso de la ingesta de calorías que se traduce en aumentos de la lipogénesis del tejido adiposo, aumentando el tamaño de los adipocitos y, por tanto, el contenido de tejido adiposo blanco (154). En los animales TRAMP, la castración provocó la remisión anatómica e histológica del tumor, así como una reducción en los niveles de producción de receptor de andrógenos por parte de las células epiteliales, y no se observaron diferencias en el contenido de tejido adiposo blanco periprostático, que pueden ser debidas a la presencia del fenotipo tumoral, con un metabolismo y necesidades energéticas más elevadas. El tejido adiposo podría servir como una importante fuente energética que soporte el crecimiento tumoral como ya ha sido propuesto en numerosas ocasiones (155–157). En animales TRAMP observamos también la presencia de pequeños grupos de adipocitos blancos intra tumorales que se asocian directamente con la progresión, siendo frecuentes en los tumores más

agresivos. Este resultado está en concordancia con los datos publicados por Huang y cols. en 2018, donde observaron, en el modelo TRAMP, como los frentes invasivos de los tumores afectan al tejido adiposo periprostático dejando pequeños grupos de adipocitos recluidos en el interior de la masa tumoral. Además, en estudios *in vitro* mediante co-cultivo entre células tumorales de próstata y adipocitos blancos, estos mismos autores comprobaron como las células tumorales migraban e invadían a los adipocitos quedando estos rodeados por células tumorales (158).

Asociado a la castración en animales controles y en animales TRAMP, detectamos la presencia de adipocitos multiloculares similares a los adipocitos pardos entre los depósitos del tejido adiposo blanco periprostático. Estos adipocitos multiloculares presentaron mayores niveles de expresión y producción del marcador de tejido adiposo pardo UCP1. Además, algunos adipocitos blancos adyacentes mostraron un marcaje positivo para UCP1, indicando un posible fenómeno de transdiferenciación desde los adipocitos blancos. El pardeamiento del tejido adiposo blanco periprostático es un fenómeno no descrito con anterioridad en la bibliografía. Sin embargo, el pardeamiento del tejido adiposo en respuesta a la castración en otros depósitos de tejido adiposo blanco, como el subcutáneo, fue descrito por anterioridad por Hashimoto y cols. en el año 2016. Estos autores observan cómo tras la castración el tejido adiposo blanco subcutáneo de ratones macho adultos presenta depósitos de adipocitos multiloculares similares a los adipocitos pardos, y además estos son positivos para el marcador de tejido adiposo pardo/beige UCP1, confirmando el proceso. Sin embargo, los autores desconocían el mecanismo por el cual la castración provoca dicha diferenciación (159).

Para comprobar que el fenómeno de transdiferenciación de grasa blanca a grasa parda era debido a la acción directa de los andrógenos, estudiamos el efecto de la administración exógena de testosterona sobre a animales castrados y su efecto sobre el tejido adiposo periprostático. En el modelo TRAMP, la administración exógena de testosterona en animales castrados indujo una reducción del contenido de tejido adiposo pardo/beige en la próstata, así como de los niveles de expresión de *Ucp1* en el tejido adiposo. Estos resultados concuerdan con los publicados previamente por Gasparini y cols. en tejido adiposo pardo, donde observan cómo la castración aumenta

## DISCUSIÓN

la cantidad de grasa parda, registrando un mayor peso del tejido, y la testosterona, mediante la sensibilización de los adipocitos a los glucocorticoides, reduce de nuevo el contenido en grasa parda (160). *In vitro* también se ha comprobado el efecto de la testosterona sobre los adipocitos pardos detectando una reducción en la expresión de los marcadores específicos de este tipo celular (*Ucp1*, *Pgc1 $\alpha$* , *Prdm16*), y disminuyendo la cantidad de mitocondrias y su actividad termogénica, lo que se traduce en una reversión hacia un fenotipo adiposo blanco, denominado en inglés como “whitening of brown adipose tissue” o blanqueamiento del tejido adiposo pardo (161). Sin embargo, otros grupos afirman lo contrario, indicando que tanto el tratamiento con testosterona como con DHT reduce la cantidad de grasa blanca en el individuo, pero por el contrario aumenta el contenido en tejido adiposo pardo y el gasto energético (162), por lo que el efecto de los andrógenos en el tejido adiposo pardo está siendo objeto de debate en la actualidad.

En conclusión, hemos demostrado como en animales TRAMP, la castración induce la activación de mecanismos de diferenciación adipogénica que dan lugar a la aparición de tejido adiposo pardo/beige en el tejido adiposo periprostático, lo que no ha sido observado con anterioridad en la glándula.

### **El tejido adiposo blanco soporta el proceso tumorigénico**

Estudios epidemiológicos en diferentes poblaciones describen el papel de la obesidad como un factor de riesgo de desarrollar diferentes tipos de tumores, entre los que se incluye el cáncer de próstata (117). Además, aproximaciones experimentales han descrito tanto el papel pro tumoral del tejido adiposo blanco, como los efectos beneficiosos de reducir el contenido de grasa mediante el consumo de dietas equilibradas o la práctica diaria de ejercicio físico (163). Actualmente diferentes estudios demuestran como la cirugía bariátrica o la reducción quirúrgica del contenido de tejido graso presentan efectos beneficiosos en tumores como el cáncer de mama (164,165). Sin embargo, el efecto de la reducción del tejido adiposo en el cáncer de próstata no ha sido estudiado en profundidad. En este trabajo demostramos que la retirada del tejido adiposo epididimaria, uno de los depósitos grasos mayoritarios en el ratón, induce una clara reducción del peso del tracto urogenital en los animales operados, en concordancia con los efectos descritos en tumores como los de mama.



Se ha descrito previamente que la retirada de la grasa en hembras adultas de ratón reduce la formación de tumores cutáneos inducidos por la exposición a radiación ultravioleta. Además, el tamaño de estos tumores es significativamente menor, lo que concuerda con la remisión tumoral que observamos en la próstata. Esta reducción del tamaño de los tumores tras la resección quirúrgica del tejido adiposo es debida a alteraciones en los niveles circulantes de diferentes adipoquinas capaces de soportar el proceso tumorigénico (166). Busetto y cols. observaron que la eliminación del tejido adiposo subcutáneo de individuos obesos provoca una disminución significativa de los niveles circulantes de adipoquinas como la leptina o la adiponectina, ambas adipoquinas con un papel importante en el incremento del riesgo a padecer tumores asociados con la obesidad (167). Por otra parte, Sebnova y cols. muestran como la cirugía bariátrica, capaz de reducir el peso corporal, mediado en parte por una disminución del contenido graso, altera los niveles circulantes de leptina y adiponectina, y diferentes moléculas de carácter lipídico como el colesterol o triglicéridos, todas adipoquinas liberadas en su mayoría por el tejido adiposo (168).

A la vista de la reducción del peso del tracto urogenital que habíamos observado tras la cirugía, analizamos las posibles variaciones de contenido en el tejido adiposo periprostático. Es lógico pensar que, tras la retirada de una gran cantidad de masa grasa del organismo, el tejido adiposo sufra una redistribución de su contenido. Este fenómeno ya está descrito para otras especies de roedores como la rata (169). En humanos también se conoce el proceso, sufriendo una importante redistribución en mujeres tras la menopausia. Durante la etapa menstrual, las mujeres son más propensas a acumular tejido graso subcutáneo, mientras que, tras la aparición de la menopausia, este sufre una redistribución de contenido, mediado principalmente por factores hormonales, hacia el tejido visceral (170). En los ratones TRAMP no observamos diferencias en el contenido de tejido adiposo periprostático entre los animales operados y los controles, sugiriendo que la eliminación del tejido adiposo epididimal no provoca cambios en los depósitos de grasa blanca en la próstata, ni modifica el tipo de tejido adiposo. Sin embargo, no podemos descartar que se haya producido una redistribución hacia otros depósitos mayoritarios. Esto puede ser debido principalmente a la función del tejido adiposo periprostático, el cual principalmente desempeña un papel

## DISCUSIÓN

metabólico dando soporte a la glándula, mientras que su función como reservorio energético es más reducida (171). Por tanto, los efectos negativos del tejido adiposo blanco sobre la progresión tumoral son también relevantes en el cáncer de próstata.

### **Castración y metabolismo energético**

La terapia anti hormonal pesar de haber contribuido significativamente a una mayor supervivencia global en pacientes de cáncer de próstata, lleva asociados efectos secundarios de carácter principalmente metabólico, siendo el aumento de los depósitos de tejido adiposo uno de los más analizados (172). En humanos se ha descrito que la aplicación de este tipo de terapias está asociada con aumentos en el índice de masa corporal, relacionado principalmente con una reducción de la masa muscular como consecuencia de la atrofia generada por la falta de andrógenos, y una ganancia de tejido adiposo (173). Esta misma observación se pudo apreciar en los ratones controles sometidos a castración en este trabajo, donde el tejido adiposo blanco aumentó de forma significativa.

Tras la castración observamos un aumento de la temperatura corporal con respecto de los animales no operados que además es revertido por el tratamiento con testosterona. Este aumento de la temperatura corporal es un claro indicio del aumento de la actividad termogénica mediada por el incremento de los depósitos de grasa parda/beige, ya que como se mencionó anteriormente, el efecto de la castración sobre el contenido de grasa parda/beige ocurre no solo en el tejido adiposo periprostático, por lo que se podría afirmar que la castración desempeña un papel sistémico sobre el pardeamiento del tejido adiposo blanco. En concordancia con Hashimoto y cols. quienes también describen un aumento de la temperatura corporal en los animales castrados respecto a los controles con operación simulada (159). Además, Rothwell y cols. describen como las mitocondrias del propio tejido adiposo pardo presentan un incremento de la actividad termogénica tras la castración en ratas (174). Recientemente, Lerner y cols. demostraron *in vitro* como el tratamiento de adipocitos pardos con DHT reduce significativamente la actividad respiratoria de la mitocondria (161).

Tanto las alteraciones en contenido como actividad del tejido adiposo, como ya se mencionó anteriormente, tienen importantes efectos a nivel metabólico. Se ha descrito

una correlación entre el aumento en los niveles circulantes de adipoquinas, ácidos grasos libres, o triglicéridos, con una disminución de los niveles séricos de testosterona (172). A nivel experimental, una de las aproximaciones más simples para conocer el estado metabólico de los animales es la utilización de la calorimetría indirecta. Mediante esta aproximación se analiza *in vivo* el consumo de O<sub>2</sub> y la liberación del CO<sub>2</sub> durante las reacciones metabólicas. Gracias a la relación entre ambos gases podemos conocer diferentes parámetros metabólicos. Uno de estos indicadores es la tasa de intercambio respiratorio (RER). Este parámetro establece una relación entre la cantidad de O<sub>2</sub> consumida y el volumen de CO<sub>2</sub> producido, proporcionando así información relativa al tipo de metabolismo de los animales, e indicando si este es dependiente de carbohidratos o lípidos. En este trabajo se demostró un aumento tanto del consumo de O<sub>2</sub> como de la producción de CO<sub>2</sub> en los animales TRAMP respecto a los animales salvajes. Dicho aumento se ve reflejado en un incremento en el RER, que además es revertido por el tratamiento con testosterona. En el ratón los valores de RER deben oscilar entre 0.7 y 1.0 unidades arbitrarias. Valores próximos al límite inferior indican un metabolismo basado principalmente en la oxidación de lípidos, mientras que valores próximos al límite superior indican un metabolismo basado en la oxidación de los carbohidratos (175). Los animales tanto control como TRAMP, presentan un metabolismo es mixto, dependiendo a partes iguales de ambas fuentes energéticas. Sin embargo, en los animales TRAMP la castración parece modificar el metabolismo haciéndolo más dependiente de la utilización de carbohidratos, y vuelve a ser mixto tras la administración de testosterona. Asociado con este aumento en la tasa de intercambio respiratorio se demostró un aumento en el gasto energético de los animales TRAMP. El desbalance en este parámetro es una de las principales causas de la obesidad (176). El tejido adiposo pardo, por su condición termogénica, se encarga de producir calor gracias al aumento del consumo energético. Así, como era de esperar en los animales TRAMP, el aumento del gasto energético es concomitante con el aumento de la tasa de intercambio respiratorio, y el propio aumento de la temperatura corporal, lo que nos indican un cambio metabólico posiblemente debido al enriquecimiento en grasa parda/beige tras la castración y como consecuencia del aumento de la actividad mitocondrial en el tejido pardo/beige.

## DISCUSIÓN

En conclusión, los ya esperados cambios metabólicos asociados con la castración parecen estar estrechamente relacionados con los mecanismos de inducción de adipocitos multiloculares, mostrando el aumento en contenido y actividad termogénica.

### **Castración y las poblaciones celulares inmunológicas en la próstata tumoral**

La inflamación es otro de los factores de riesgo estrechamente relacionado con la iniciación y progresión del cáncer de próstata. A este nivel, el aumento excesivo del tejido adiposo provoca alteraciones en el perfil secretor de los adipocitos, lo que tiene una implicación directa en la regulación de diferentes poblaciones de células inmunes en el microambiente del tumor (177). Asociados tanto al tumor como al tejido adiposo encontramos diferentes poblaciones de células inmunes entre las que podemos destacar mastocitos y macrófagos. Los mastocitos contienen principalmente gránulos de histamina que liberan ante una respuesta a un alérgeno, sin embargo, no es su única función. En situaciones de obesidad, los mastocitos están relacionados con el control de poblaciones de células implicadas en la respuesta inflamatoria actuando como atrayentes de otros tipos de células como los macrófagos (178). Durante la progresión tumoral, los mastocitos cumplen un papel importante en el control de la inflamación y angiogénesis (179). En nuestro trabajo observamos como la castración aumentó de forma significativa el número de mastocitos tanto en los animales control como TRAMP. Es posible que los andrógenos jueguen un papel sobre la desgranulación de los mastocitos, ya que se ha descrito la presencia de receptor de andrógenos en este tipo celular (180). Lo cual implicaría que, aunque no exista un aumento en el número de células cebadas en el microambiente tumoral, la ausencia de testosterona esté provocando que estos mastocitos sufran una menor desgranulación, pudiendo ser detectados mediante la tinción con azul de toluidina. Observar esta menor desgranulación nos podría estar indicando que estas células estarían en un estado inactivo y, por lo tanto, proporcionando un entorno menos inflamatorio. Aunque existen artículos que informan sobre cómo la testosterona no muestra ningún efecto sobre la desgranulación de estas células en la piel, nuestro grupo ha descrito el efecto de testosterona como un activador de este proceso de desgranulación en la glándula de Harder de hámster sirio (181).

Estudiamos también la población de macrófagos por su estrecha relación tanto con los mastocitos, el tejido adiposo y el tejido tumoral. Los macrófagos son células fagocíticas con capacidad para eliminar patógenos externos o células muertas. Además, tienen capacidad de presentación antigénica frente a linfocitos T, lo que les confiere un importante papel en la respuesta inmune, siendo así unos principales mediadores de la inflamación (182). En el tejido sano el contenido de macrófagos puede representar aproximadamente un 5% del total de células inmunes residentes en el estroma. Sin embargo, ante procesos patológicos como la presencia de un tumor, la infiltración de este tipo celular se incrementa considerablemente pudiendo llegar a representar entre un 30 y un 50% del total de células inmunes del microambiente tumoral (183,184). En la bibliografía se ha descrito la presencia de receptor de andrógenos en macrófagos. Sin embargo, los efectos de los andrógenos en la actividad o distribución de los macrófagos aún no se conoce con claridad (185). A pesar de no conocer el efecto del receptor de andrógenos sobre los macrófagos, si se conoce el papel de estas células en la progresión tumoral del cáncer de próstata, estando su aumento directamente relacionado con un peor pronóstico y adquisición del fenotipo hormono refractario (186). A este respecto, mientras que los animales con fenotipo tumoral presentaron una cantidad muy elevada de macrófagos, tras la castración observamos una menor infiltración de macrófagos en el entorno del epitelio glandular. Estos resultados concuerdan con los datos obtenidos por otros grupos tanto en pacientes como en modelos animales. En pacientes se describe como la administración de terapia anti hormonal reduce los niveles de infiltración de macrófagos en el microambiente tumoral, lo que se relaciona con una mayor supervivencia. Además, existe una correlación positiva entre la presencia de macrófagos en el microentorno tumoral y elevados niveles de PSA (186). Sin embargo, estos resultados son controvertidos. Silva y cols. muestran un aumento en las poblaciones de macrófagos asociados a la castración en el microambiente de la próstata. Estos autores atribuyen este aumento en el número de macrófagos a una respuesta del organismo ante la apoptosis que las células epiteliales prostáticas sufren tras la castración (187). Sin embargo, Cioni y cols. describen lo contrario (185). En estudios con pacientes de cáncer de próstata, observan que tras el tratamiento con bicalutamida el número de macrófagos en el microambiente prostático se reduce, lo que coincidiría con nuestros resultados en ratones tras la castración de los animales.

## DISCUSIÓN

Podemos concluir, que la castración parece regular positivamente la inmunidad en el modelo TRAMP, presentando los animales castrados un microentorno con un perfil menos inflamatorio y lo que se podría relacionar con un mejor pronóstico.

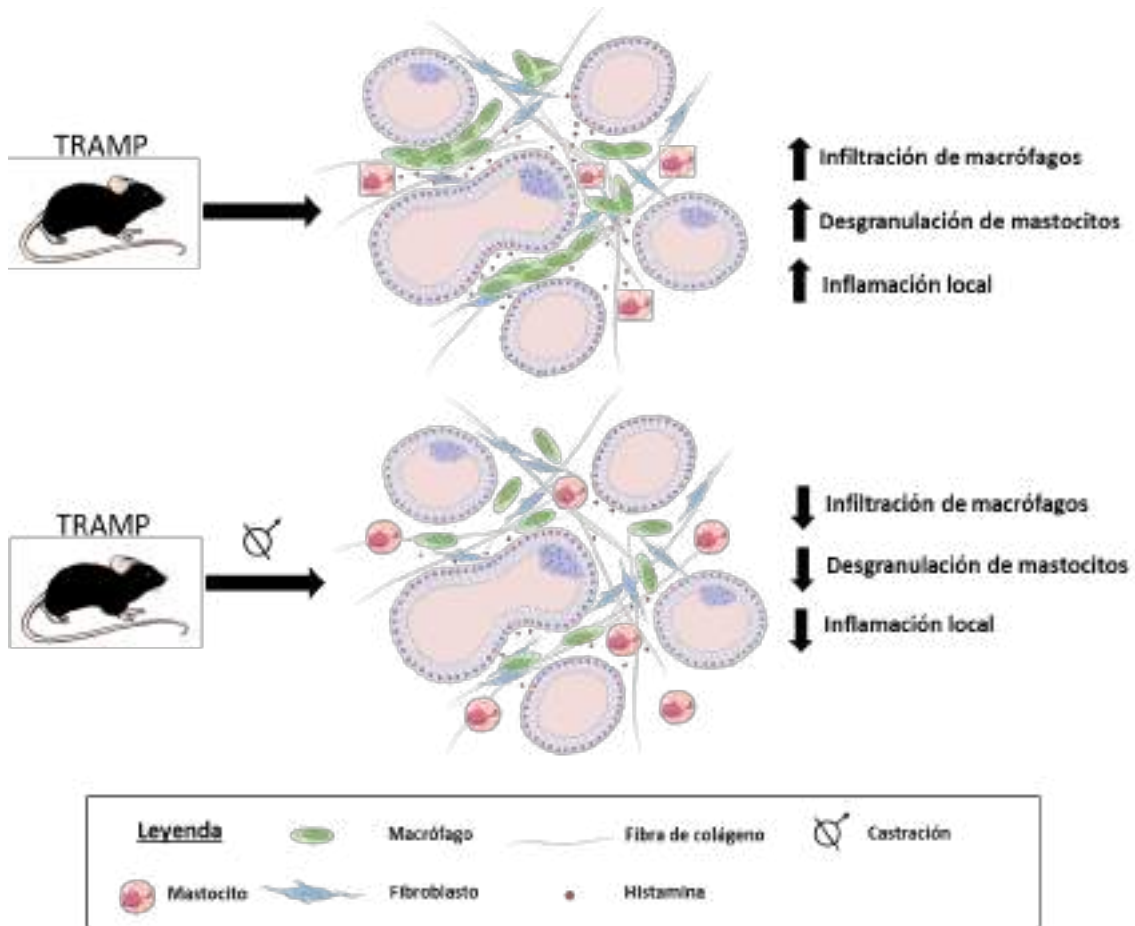


Figura 96. Efecto de la castración sobre la regulación del microambiente inflamatorio en la próstata de los animales TRAMP.

### Rosiglitazona y grasa parda/beige en el microambiente tumoral de la próstata

Como se ha mencionado al principio de la discusión, la disminución de grasa blanca a favor de un aumento del contenido en grasa parda/beige tiene efectos beneficiosos en diferentes patologías (150,188). La eliminación de andrógenos circulantes es un mecanismo capaz de reducir esta adiposidad gracias al aumento del tejido adiposo pardo/beige. Sin embargo, dada la alta dependencia de los andrógenos por parte de la próstata no podemos discernir con claridad los efectos del tejido adiposo pardo/beige sobre la próstata tumoral, puesto que la mayoría de los animales presentaron glándulas atróficas sin malignidad por la falta de testosterona. Para ello, se indujo tejido adiposo pardo/beige mediante la administración diaria de rosiglitazona

umentando el contenido de tejido adiposo pardo/beige, pero manteniendo los niveles fisiológicos de testosterona, (46).

Tras el tratamiento con rosiglitazona durante 10 días, encontramos un aumento del contenido en grasa parda interescapular en los animales tratados. Este aumento ya ha sido descrito anteriormente, y está asociado con el efecto como agonista del fármaco sobre el PPAR $\gamma$ , uno de los marcadores esenciales durante la adipogénesis parda (189). Además, Ohno y cols. describen como el tratamiento con rosiglitazona durante 10 días es suficiente para inducir la aparición de tejido adiposo pardo/beige en la grasa subcutánea y visceral (67). Estudiamos los efectos de la rosiglitazona sobre el balance del tejido adiposo periprostático, y observamos como tras el tratamiento los animales control tratados presentaron niveles significativamente mayores de tejido adiposo pardo/beige respecto a sus homólogos tratados con vehículo, mientras que en los animales con fenotipo tumoral no observamos diferencias. Podemos concluir por tanto que el tratamiento con rosiglitazona es una buena aproximación para estudiar los efectos del tejido adiposo pardo/beige sobre la biología de la próstata murina, aunque son requeridas modificaciones experimentales para poder estudiar los efectos sobre la progresión tumoral.

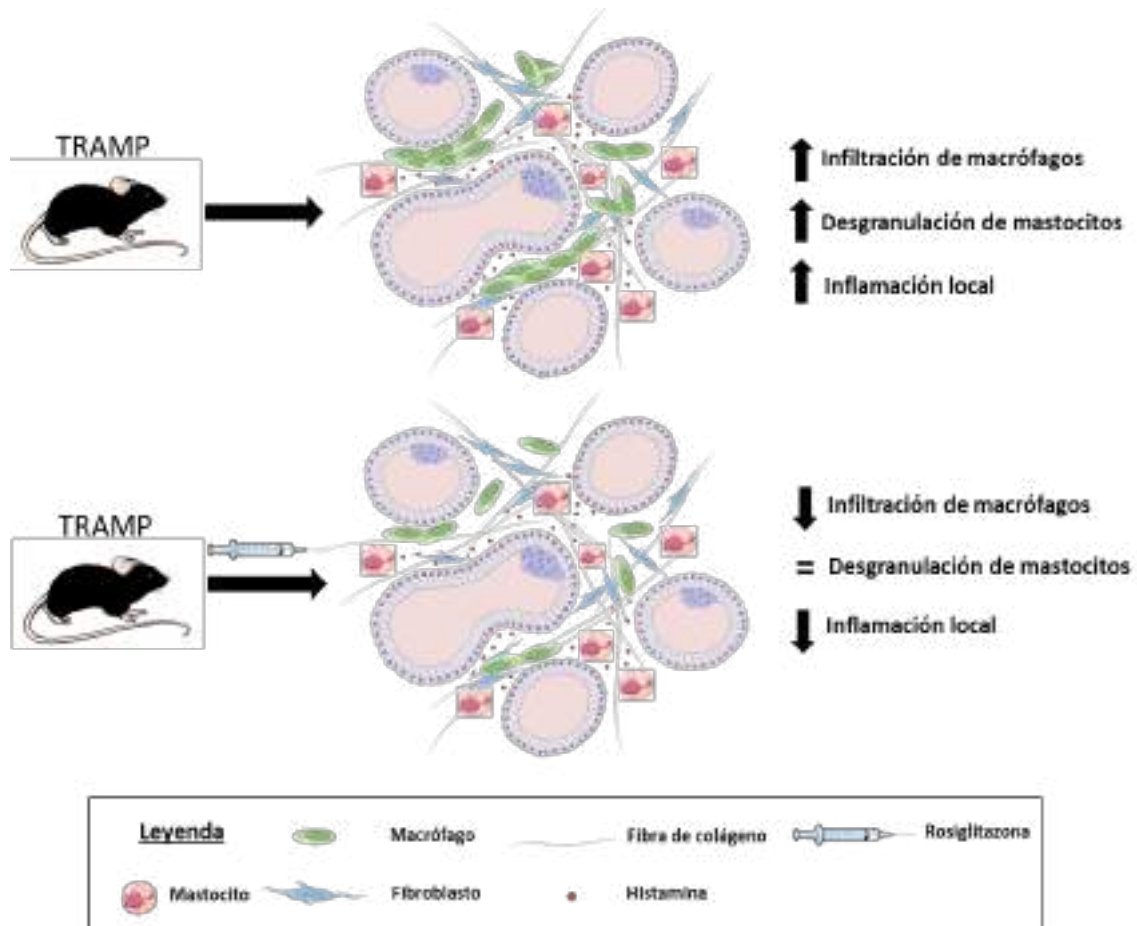
Tras la inyección con rosiglitazona no observamos diferencias en ninguno de los parámetros relacionados con el metabolismo, solo detectando cambios en la temperatura corporal. La castración, al contrario que la inducción farmacológica del pardeamiento, tiene consecuencias sistémicas a nivel hormonal en un ratón macho adulto. No obstante, los resultados obtenidos en este trabajo con la rosiglitazona reproducen los publicados con anterioridad por Kroon y cols. quienes observaron que, en animales tratados con rosiglitazona durante periodos de 2 a 5 semanas, no existen diferencias entre el grupo control y el grupo tratado a nivel metabólico, aunque si observan aumentos en los niveles de UCP1 y tejido adiposo pardo/beige (51).

Las tiazolidinedionas como la rosiglitazona, además de ser importantes moléculas con capacidad antidiabética, presentan también cierta actividad inmunomoduladora. A este nivel, Miyazawa y cols. describen las propiedades antiinflamatorias de la pioglitazona, otro miembro de la familia de las tiazolidinedionas, en el tejido periprostático. Este grupo observa como el tratamiento con pioglitazona es

## DISCUSIÓN

capaz de reducir la cantidad de estructuras en forma de corona asociadas a inflamación mediada por macrófagos en el tejido adiposo periprostático, y que este proceso está mediado por la inhibición de la proteína quimioatrayente de monocitos (MCP1), lo que implica una disminución de la infiltración por macrófagos profesionales y, por tanto, una reducción de la inflamación (190). El tratamiento con rosiglitazona reduce significativamente la infiltración de macrófagos en el microambiente tumoral de la próstata, lo que coincide con los resultados observados con la castración, y con los publicados por Miyazawa y cols. Las citoquinas producidas por los macrófagos cumplen un papel en el proceso de diferenciación adipogénica, mientras que los adipocitos pardos son capaces de inducir la polarización de los macrófagos cambiando su fenotipo (184,191). Además, en los macrófagos PPAR $\gamma$  cumple funciones importantes tanto en la diferenciación desde el monocito hasta el macrófago como en la regulación inflamatoria por parte de estas células (192). Estos efectos moduladores hacen que la rosiglitazona pueda tener per se un efecto directo sobre las poblaciones de macrófagos independientemente del pardeamiento del tejido adiposo blanco, que en este caso podría jugar un papel importante en términos de polarización entre los fenotipos M1 y M2. Se han publicado resultados que muestran como el tratamiento con rosiglitazona reduce el número de macrófagos residentes en el tejido adiposo blanco (193). Dichos resultados coinciden con los resultados obtenidos en este trabajo en la próstata tras el tratamiento con el fármaco. Además, otros grupos han observado *in vitro* como el tratamiento con rosiglitazona reduce la capacidad de adhesión y migración de los macrófagos (194). Aun con un efecto directo sobre los macrófagos, tanto el pardeamiento como esta reducción en la población de estas células inmunes puede tener un papel relevante en la progresión tumoral puesto que todo apunta a un ambiente que sufre una reducción de la inflamación local, y que por tanto es menos favorable para el tumor. Concluimos por tanto que el tratamiento con rosiglitazona proporciona un microambiente tumoral compuesto por un menor número de células implicadas en la respuesta inflamatoria, lo que podría tener relación con una menor agresividad tumoral.





**Figura 97.** Efecto del tratamiento con rosiglitazona sobre la regulación del microambiente inflamatorio en la próstata de los animales TRAMP.

El objetivo principal de este experimento era valorar el papel de la diferenciación del tejido adiposo blanco a tejido adiposo beige/pardo independiente de la ausencia de andrógenos. Tras 10 días de tratamiento con rosiglitazona no observamos diferencias ni en el peso del tracto genitourinario de los animales, ni en los niveles de proliferación en el epitelio glandular mediante marcaje con EdU, lo que parece indicar que la rosiglitazona no inhibe la progresión tumoral en la próstata. De acuerdo con la publicación de Greenberg y cols. los animales TRAMP comienzan a desarrollar tumores de próstata a partir de las 16 semanas de edad (146). En nuestro caso, y de acuerdo con estos antecedentes, realizamos el tratamiento con rosiglitazona a esta edad, con el fin de estudiar los efectos del pardeamiento en etapas iniciales del tumor, ya que los efectos del tejido adiposo pardo/beige en estadios más avanzados del cáncer de próstata ya han sido estudiados, y en este caso presentan efectos negativos al ser mediadores de la pérdida de peso fomentando los fenotipos caquéticos (195). El tratamiento durante 10 días con rosiglitazona es suficiente para inducir el fenómeno de

## DISCUSIÓN

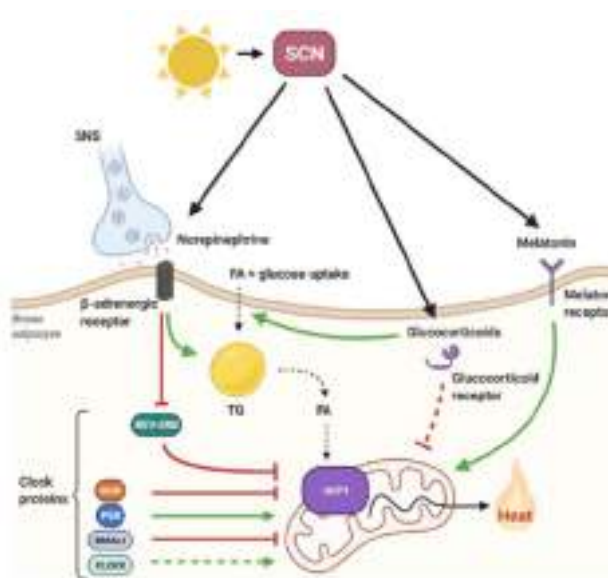
diferenciación a grasa parda, pero quizás sea poco tiempo como para poder observar alteraciones proliferativas en la próstata, por lo que estudiamos el efecto de la inyección de rosiglitazona cuando el tratamiento duró 6 semanas. Tampoco observamos diferencias en cuanto al peso del tracto urogenital en los animales tras el tratamiento con rosiglitazona. Sin embargo, encontramos un aumento de marcaje con EdU en las próstatas de los animales TRAMP tratados con rosiglitazona respecto de sus homólogos controles. Estos resultados no concuerdan con resultados publicados, en los que se encontró como en otros órganos como la mama, las tiazolidineonas como la rosiglitazona promueven la diferenciación y reducen la proliferación de las células tumorales (196,197). Sin embargo, existen ensayos clínicos en pacientes con este tumor, donde tras la administración durante 6 semanas del fármaco por vía oral no se observan diferencias a nivel de proliferación analizada por el marcaje con KI67 entre el grupo tratado y el grupo placebo (198).

En el cáncer de próstata, se ha descrito un efecto beneficioso de estas tiazolidineodionas sobre la proliferación e invasión, además de inducir apoptosis *in vitro* en las células de forma directa o indirectamente por la acción del PPAR $\gamma$  (199). Sin embargo, en ratones TRAMP, la administración de rosiglitazona incrementó significativamente la proliferación en la próstata. Varios autores presentan diferentes actividades antitumorales del PPAR $\gamma$ , aunque recientemente otros autores discrepan y muestran diferentes actividades oncogénicas en próstata mediadas de forma dependiente e independiente del receptor de andrógenos (200,201). A la vista de estos resultados, es posible que los efectos que estamos observando en la próstata de nuestros animales tengan principalmente un componente farmacológico y no debido a la inducción de grasa parda/beige. Podemos concluir por tanto que a pesar de obtener un mecanismo de inducción farmacológica de tejido adiposo pardo/beige, los efectos observados en la próstata de animales TRAMP parecen tener un componente farmacológico, no siendo observado el efecto del tejido adiposo periprostático.

La actividad del tejido adiposo no permanece constante a lo largo del día. Se conoce que presenta actividad circadiana sufriendo variaciones a lo largo del día (202). A este nivel la melatonina es una de las principales implicadas en la regulación de su actividad. A través de sus receptores de membrana (MT1 y MT2) en el adipocito pardo

es capaz de modular la actividad termogénica de UCP1 mediante aumento de los niveles intracelulares de AMPc (202,203) [Fig.98].

En nuestro modelo, aunque no vimos diferencias estadísticamente significativas, probablemente debido al pequeño tamaño muestral, sí que observamos una ligera tendencia al aumento del tejido adiposo pardo/beige en los animales tratados. Estos resultados concuerdan con los publicados por otros grupos de investigación donde observan como el tratamiento con melatonina en ratas Zucker, que presentan un fenotipo obeso, mostraba aumentos del tejido adiposo pardo/beige de la grasa inguinal (204). Así como se ha descrito que una deficiencia de melatonina reduce el pardeamiento y la capacidad termogénica del BAT en ratas (205).



**Figura 98. Mecanismo de regulación de la actividad termogénica de UCP1 en el tejido adiposo pardo mediada por la actividad de la melatonina.** Imagen obtenida y modificada de Straat y cols. (202)

### Receptor de andrógenos y *Ucp1*

Las observaciones previas obtenidas *in vivo* sobre la aparición de tejido adiposo beige en el tejido adiposo periprostático en respuesta a la castración, dirigieron nuestros estudios hacia modelos *in vitro* que nos permitieran observar el efecto de los andrógenos sobre el mecanismo de diferenciación. Así, empleando el modelo de adipocitos diferenciados 3T3-L1, estudiamos el efecto de la privación de andrógenos sobre la diferenciación adipogénica. No se observaron diferencias morfológicas ni morfométricas en las células tras la privación de andrógenos, en concordancia con los resultados de Singh y cols. quienes describen que tras 12 días de tratamiento no existen

## DISCUSIÓN

diferencias entre las células 3T3-L1 diferenciadas incubadas con flutamida y las células cultivadas en medio control (206). Sin embargo, en la bibliografía está descrito el efecto de otros activadores farmacológicos de *Ucp1* en adipocitos 3T3-L1 como el isoproterenol, un fármaco agonista de los receptores  $\beta_3$  adrenérgicos capaz de estimular la actividad de *Ucp1* (207). En nuestros resultados, la privación de andrógenos en adipocitos 3T3-L1 provocó un aumento de *Ucp1*. Estos resultados, muestran un efecto sobre la activación de *Ucp1* independiente de la vía clásica mediada por la respuesta a catecolaminas. Además, el efecto causado por la DHT coincide con los resultados publicados por Lerner y cols. donde observan una reducción a niveles basales de la expresión de *Ucp1* tras el tratamiento con DHT en células incubadas en presencia de isoproterenol (161).

Adicionalmente, mediante el empleo del antagonista del receptor de andrógenos bicalutamida pudimos comprobar que el efecto represor de los andrógenos es un efecto irreversible. El receptor de andrógenos se localiza en el tejido adiposo blanco y en el pardo/beige. La localización subcelular del receptor varía entre ambos tipos de grasa, en el tejido conjuntivo, y en la próstata tumoral en ratones TRAMP. Mientras que en el tejido adiposo blanco su localización era principalmente nuclear, en el tejido adiposo pardo/beige observamos que el receptor de andrógenos se localiza principalmente en el citoplasma. Este cambio de localización, junto con la respuesta celular aumentando *Ucp1* en 3T3-L1 diferenciadas en presencia de bicalutamida nos llevó a pensar un posible efecto directo del receptor sobre el promotor del gen. Se conocen muchos genes en los cuales el receptor de andrógenos actúa como un represor de la expresión, bien uniéndose a diferentes regiones reguladoras (“enhancers”), o directamente al promotor del gen diana, siendo la gran mayoría de ellos genes implicados en la homeostasis prostática. Sin embargo, dentro de estos grupos de genes negativamente regulados por el receptor de andrógenos, se han descrito varios implicados en la diferenciación adipogénica tales como PPAR $\gamma$  o C/EBP $\alpha$  (208,209). En este trabajo hemos descrito una interacción directa y de carácter represor entre el receptor de andrógenos y el gen *Ucp1* para la cual proponemos el mecanismo ilustrado en la siguiente figura [Fig.99]. Podemos concluir por tanto que el receptor de

andrógenos juega un papel clave en el proceso de diferenciación adipogénica, siendo uno de sus efectos el de actuar como un represor directo sobre *Ucp1*.

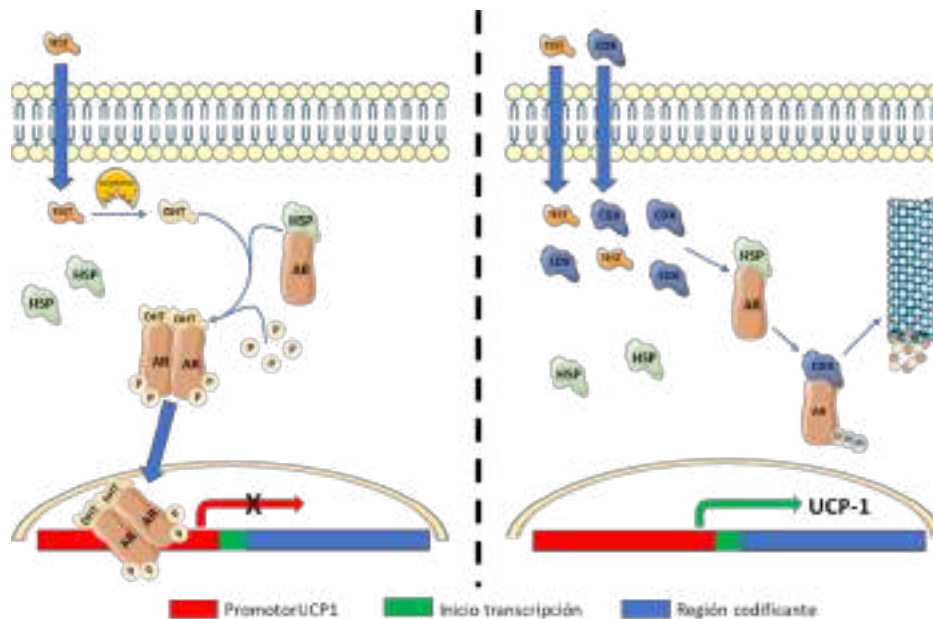


Figura 99. Representación esquemática del mecanismo de inhibición del receptor de andrógenos sobre la expresión de UCP-1.

### Secretoma derivado de adipocitos sobre la proliferación de células tumorales

A través de los estudios *in vivo* no obtuvimos una conclusión clara acerca del efecto del pardeamiento del tejido adiposo periprostático en la progresión tumoral de la próstata. Sin embargo, está claramente establecido en la bibliografía los efectos del secretoma liberado por los adipocitos blancos en la regulación del microambiente tumoral, modulando rutas de señalización implicadas en la remodelación del microambiente, o en el control de la progresión tumoral (210). En primer lugar, estudiamos el efecto de la inducción de adipocitos pardos/beige en las células 3T3-L1 sobre la proliferación de células tumorales TRAMP-C1 mediante ensayos de medios condicionados y co-cultivo. Observamos que las células TRAMP-C1 que habían sido incubadas en medio donde se cultivaron adipocitos blancos la proliferación fue mayor, Estos resultados concuerdan con los de otros grupos que observan un resultado similar relacionado con la formación de esferoides en TRAMP-C1, atribuyendo un efecto pro tumoral del tejido adiposo blanco, favoreciendo incluso la degradación con gelatinasas de la superficie de cultivo de las TRAMP-C1, fomentando así la formación de esferoides

## DISCUSIÓN

(211). Estos resultados no son exclusivos de células tumorales de próstata, puesto que este efecto se reproduce en otros tipos tumorales de características similares como es el caso del cáncer de mama, donde se ha descrito que el secretoma de adipocitos 3T3-L1 es capaz de incrementar la tasa de proliferación y migración de células MCF-7 y MDA-MB-231 (212).

Como ya se había mencionado anteriormente, no existen evidencias claras del pardeamiento del tejido adiposo sobre la progresión tumoral en la próstata. Los únicos resultados experimentales publicados sobre la progresión tumoral en la próstata están relacionados con etapas muy avanzadas donde hay existencia de metástasis, y se produce una caquexia asociada al tumor debida a su alta actividad metabólica. Según los autores, la presencia de pardeamiento en estos individuos implica una alta demanda energética que consume las fuentes de reserva energética favoreciendo el deterioro global (195). Sin embargo, como ya hemos planteado, en estadios iniciales del tumor sus efectos podrían ser los contrarios relacionado principalmente a su actividad endocrina mediada por su secretoma. Actualmente varios grupos de investigación han mostrado resultados preliminares sobre el efecto tanto del tejido adiposo pardo como del tejido adiposo beige en diferentes tipos tumorales. Frille y colaboradores observan un papel pro tumoral en cáncer de pulmón. Este grupo muestra como en células H1299 y PC-9, el co-cultivo junto a tejido adiposo pardo favorece la proliferación de las células tumorales e incluso les confiere cierto grado de resistencia al cisplatino (213). Por otro lado, en mama también existen resultados preliminares que además concuerdan con nuestros resultados. La mama presenta histología glandular, al igual que la próstata, y las hormonas sexuales están muy relacionadas con la progresión tumoral. En este tumor Muniraj y cols. observan como la aparición de depósitos de tejido adiposo pardo/beige en el tejido adiposo blanco reduce la proliferación de las células de cáncer de mama, mientras que Silva y colaboradores hipotetizan sobre un posible papel beneficioso en pacientes con cáncer de mama por sus resultados preliminares en estudios retrospectivos (214,215).

Dentro del amplio secretoma liberado por los adipocitos, las vesículas extracelulares han cobrado una gran importancia en los mecanismos de comunicación intercelular. Se ha demostrado que distintas células tumorales pueden comunicarse a

través de EVs con células no tumorales del tejido sano adyacente induciendo en estas malignidad o confiriendo a otras células tumorales características metastáticas (143). En mama, las EVs producidas por células tumorales MDA-MB-231 son capaces de inducir cambios fenotípicos en células tumorales MCF-10A (216). En próstata, las EVs derivadas de células LNCaP y PC-3 son capaces de modular la actividad de fibroblastos asociados a cáncer, permitiendo la migración e invasión de las células tumorales (217). Sin embargo, esta interacción no es unidireccional ya que la interacción entre el microambiente tumoral con las propias células tumorales es igual de importante jugando un papel clave durante la tumorigénesis.

El tejido adiposo como ya habíamos comentado es uno de los más abundantes en el microambiente de la próstata y presenta una gran actividad secretora de EVs, siendo estas uno de los componentes principales del secretoma. Muchas de las adipoquinas secretadas por el tejido adiposo pueden ser liberadas directamente o bien empaquetadas en EVs en lo que se conoce como “exo-adipoquinas”, término acuñado por Harwtig y cols. (144). Se conoce que la mayoría de las adipoquinas secretadas por el tejido adiposo blanco tienen efectos sobre los diferentes sellos identificativos del cáncer, favoreciendo en la mayoría de los casos la adquisición del fenotipo neoplásico (143). Muchas de estas moléculas secretadas por la grasa son comunes tanto para el tejido adiposo blanco como pardo (3). Sin embargo, mediante estudios de proteómica se ha detectado la presencia de 101 moléculas en las EVs derivadas del BAT y que son exclusivas de este tejido, lo que permite diferenciar dos poblaciones claramente establecidas (218). Aunque, la función de éstas en progresión tumoral no está del todo aclarada.

En este trabajo, se estudió *in vitro* el efecto de estas EVs derivadas de adipocitos sobre la proliferación de células tumorales de próstata. En células LNCaP cultivadas con EVs aisladas del medio de células 3T3-L1 diferenciadas a adipocitos blancos se observó un aumento de proliferación. Este aumento de la proliferación inducida por las EVs derivadas de adipocitos blancos está ampliamente descrito en la bibliografía en varios tipos tumorales (143). Observamos como en el caso de las células andrógeno dependientes, el tratamiento con EVs derivadas de adipocitos tratados previamente con bicalutamida redujo significativamente la proliferación de estas células llegando incluso

## DISCUSIÓN

a producir muerte celular. Además, Se ha descrito que las EVs derivadas de adipocitos 3T3-L1 contribuyen a la progresión tumoral favoreciendo la invasión tanto *in vitro* como *in vivo* de células tumorales de pulmón, carcinoma hepatocelular o carcinoma de mama (219–221). Estos resultados concuerdan parcialmente con los observados en la línea LNCaP. En el caso de las células TRAMP-C1, no observamos los mismos resultados, en este caso la proliferación se redujo. Esto podría ser debido a que en esta línea celular el componente que favorece la proliferación no estuviera relacionado con las EVs, y fuera un factor secretado al medio de cultivo como ácidos grasos libres u otras adipoquinas no incluidas en EVs. En células LNCaP Ribeiro y cols. describen un papel inhibitor de la proliferación mediado por adipoquinas liberadas al medio de cultivo por adipocitos derivados del tejido adiposo periprostático, y atribuyen este efecto inhibitor a adipoquinas como el TNF $\alpha$ , lo que fue previamente descrito por otros grupos (222,223). En el caso de la línea celular PC3, el tratamiento con EVs derivadas de adipocitos no produjo ningún efecto sobre la proliferación celular, indicando una posible mayor actividad del componente adiposo en células andrógeno dependientes que en células hormono-resistentes (224,225). Concluimos por tanto que el efecto de los adipocitos pardos/beige obtenidos mediante mecanismos de diferenciación *in vitro*, reducen la proliferación de células tumorales andrógeno dependientes de próstata, aunque los mecanismos moleculares implicados no están aclarados.





# CONCLUSIONES



## CONCLUSIONES

1. La privación de andrógenos en la próstata causa la acumulación de tejido adiposo pardo/beige en el tejido adiposo periprostático, concomitante con una disminución del fenotipo tumoral en modelos transgénicos.
2. La presencia de adipocitos intra tumorales está directamente relacionada con un fenotipo tumoral menos diferenciado en la próstata.
3. La eliminación de la señalización androgénica altera la termogénesis y la tasa metabólica basal en el modelo murino de cáncer de próstata TRAMP.
4. La orquiectomía está asociada con una menor infiltración de células inmunes en el microambiente tumoral de la próstata.
5. En el tejido adiposo periprostático existe una correlación inversa entre la producción de UCP1 y la localización nuclear del receptor de andrógenos.
6. El tratamiento con rosiglitazona reproduce una situación similar a la privación de andrógenos en lo que se refiere a la regulación de la infiltración de células inmunes en la glándula prostática, pero no aumenta el contenido de grasa parda en el microambiente tumoral de la próstata.
7. Los andrógenos reprimen la expresión de *Ucp1* en el modelo celular 3T3-L1.
8. El secretoma liberado por células 3T3-L1 diferenciadas *in vitro* en ausencia de andrógenos presenta inhibe la proliferación de células tumorales de próstata dependientes de andrógenos.



## BIBLIOGRAFÍA



## BIBLIOGRAFÍA

1. Trayhurn P, Beattie JH. Physiological role of adipose tissue: white adipose tissue as an endocrine and secretory organ. *Proceedings of the Nutrition Society*. 2001;60(3):329–39.
2. Bozec A, Hannemann N. Mechanism of regulation of adipocyte numbers in adult organisms through differentiation and apoptosis homeostasis. *Journal of Visualized Experiments*. 2016;2016(112):53822.
3. Álvarez-artime A, García-soler B, Sainz RM, Mayo JC. Emerging roles for browning of white adipose tissue in prostate cancer malignant behaviour. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021.22(11) p. 5560.
4. Scheja L, Heeren J. The endocrine function of adipose tissues in health and cardiometabolic disease. *Nature Reviews Endocrinology*. 2019;15(9):507–24.
5. Moseti D, Regassa A, Kim WK. Molecular regulation of adipogenesis and potential anti-adipogenic bioactive molecules. *International Journal of Molecular Sciences*. 2016.17(1):124
6. Stenkula KG, Erlanson-Albertsson C. Adipose cell size: importance in health and disease. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2018;315(2):284–95.
7. Chait A, den Hartigh LJ. Adipose Tissue Distribution, Inflammation and Its Metabolic Consequences, Including Diabetes and Cardiovascular Disease. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*. 2020;7(22):1-41
8. Reddy P, Lent-Schochet D, Ramakrishnan N, McLaughlin M, Jialal I. Metabolic syndrome is an inflammatory disorder: A conspiracy between adipose tissue and phagocytes. *Clinica Chimica Acta*. 2019;496:35–44.
9. Luong Q, Huang J, Lee KY. Deciphering white adipose tissue heterogeneity. *Biology (Basel)*. 2019;8(2):1-14
10. Wronska A, Schorr AB, Bergman D. Structural and biochemical characteristics of various white adipose tissue depots. *Acta Physiologica*. 2012;255(2)194-208
11. Suchacki KJ, Tavares AAS, Mattiucci D, Scheller EL, Papanastasiou G, Gray C, et al. Bone marrow adipose tissue is a unique adipose subtype with distinct roles in glucose homeostasis. *Nature Communications*. 2020;11(1):3097
12. Li Y, Meng Y, Yu X. The unique metabolic characteristics of bone marrow adipose tissue. *Frontiers in Endocrinology*. 2019.10:1-69
13. Hausman GJ, Basu U, Du M, Fernyhough-Culver M, Dodson M v. Intermuscular and intramuscular adipose tissues: Bad vs. good adipose tissues. 2014;3(4): 242–55.
14. Staples JF. Metabolic suppression in mammalian hibernation: The role of mitochondria. *Journal of Experimental Biology*. 2014;217(12): 2032–6.
15. Chen HJ, Meng T, Gao PJ, Ruan CC. The Role of Brown Adipose Tissue Dysfunction in the Development of Cardiovascular Disease. *Frontiers in Endocrinology*. 2021;12:652246
16. Branca RT, McCallister A, Yuan H, Aghajanian A, Faber JE, Weimer N, et al. Accurate quantification of brown adipose tissue mass by xenon-enhanced computed tomography. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018;115(1):174–9.
17. Becher T, Palanisamy S, Kramer DJ, Eljalby M, Marx SJ, Wibmer AG, et al. Brown adipose tissue is associated with cardiometabolic health. *Nature Medicine*. 2021;27(1):58–65.
18. Ginzac A, Barres B, Chanchou M, Gadéa E, Molnar I, Merlin C, et al. A decrease in brown adipose tissue activity is associated with weight gain during chemotherapy in early breast cancer patients. *BMC Cancer*. 2020;20(1):96
19. Scheele C, Nielsen S. Metabolic regulation and the anti-obesity perspectives of human brown fat. *Redox Biology*. 2017;12:770–5.



20. Ikeda K, Maretich P, Kajimura S. The Common and Distinct Features of Brown and Beige Adipocytes. *Trends in Endocrinology and Metabolism*. 2018;29(3): 191–200.
21. Stock MJ, Cinti S. ADIPOSE TISSUE | Structure and Function of Brown Adipose Tissue. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*. 2003. p. 29–34.
22. Cheong LY, Xu A. Intercellular and inter-organ crosstalk in browning of white adipose tissue: Molecular mechanism and therapeutic complications. *Journal of Molecular Cell Biology*. 2021;13(7):466–79.
23. Ong FJ, Ahmed BA, Oreskovich SM, Blondin DP, Haq T, Konyer NB, et al. Recent advances in the detection of brown adipose tissue in adult humans: A review. *Clinical Science*. 2018;132(10):1039–54.
24. Villarroya F, Gavaldà-Navarro A, Peyrou M, Villarroya J, Giralt M. The Lives and Times of Brown Adipokines. *Trends in Endocrinology and Metabolism*. 2017;28(12): 855–67.
25. Lee, Park, Oh, Lee, Kim, Bae. The Role of Adipose Tissue Mitochondria: Regulation of Mitochondrial Function for the Treatment of Metabolic Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019;20(19):4924.
26. Monteiro BS, Freire-Brito L, Carrageta DF, Oliveira PF, Alves MG. Mitochondrial Uncoupling Proteins (UCPs) as Key Modulators of ROS Homeostasis: A Crosstalk between Diabesity and Male Infertility? *Antioxidants*. 2021;10(11):1746.
27. Krauss S, Zhang CY, Lowell BB. The mitochondrial uncoupling-protein homologues. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2005;6(3):248–61.
28. Ledesma A, de Lacoba MG, Rial E. The mitochondrial uncoupling proteins. *Genome Biol*. 2002;3(12):3015.
29. Haguenaer A, Raimbault S, Masscheleyn S, Gonzalez-Barroso MDM, Criscuolo F, Plamondon J, et al. A new renal mitochondrial carrier, KMCP1, is up-regulated during tubular cell regeneration and induction of antioxidant enzymes. *Journal of Biological Chemistry*. 2005;280(23):22036–43.
30. Brand MD, Esteves TC. Physiological functions of the mitochondrial uncoupling proteins UCP2 and UCP3. *Cell Metabolism*. 2005;2(2) 85–93.
31. Echtay KS. Mitochondrial uncoupling proteins-What is their physiological role? *Free Radical Biology and Medicine*. 2007;43(10) 1351–71.
32. Ježek P, Holendová B, Garlid KD, Jabůrek M. Mitochondrial Uncoupling Proteins: Subtle Regulators of Cellular Redox Signaling. *Reviewing Editors: Jerzy Beltowski, Joseph Burgoyne, Gabor Csanyi, Sergey Dikalov, Frank Krause, Anibal Vercesi, and Jeremy Ward. Antioxidants & Redox Signaling*. 2018;29(7):667–714.
33. Hirschenson J, Melgar-Bermudez E, Mailloux RJ. The Uncoupling Proteins: A Systematic Review on the Mechanism Used in the Prevention of Oxidative Stress. *Antioxidants*. 2022;11(2):322.
34. Nicholls DG, Bernson VS, Heaton GM. The identification of the component in the inner membrane of brown adipose tissue mitochondria responsible for regulating energy dissipation. *Experientia Suppl*. 1978;32:89–93.
35. Bouillaud F, Raimbault S, Ricquier D. The gene for rat uncoupling protein: Complete sequence, structure of primary transcript and evolutionary relationship between exons. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1988;157(2):783–92.
36. Douette P, Navet R, Bouillenne F, Brans A, Sluse-Goffart C, Matagne A, et al. Secondary-structure characterization by far-UV CD of highly purified uncoupling protein 1 expressed in yeast. *Biochemical Journal*. 2004;380(1):139–45.

## BIBLIOGRAFÍA

37. Divakaruni AS, Brand MD. The Regulation and Physiology of Mitochondrial Proton Leak. *Physiology*. 2011;26(3):192–205.
38. Riis-Vestergaard MJ, Richelsen B, Bruun JM, Li W, Hansen JB, Pedersen SB. Beta-1 and not Beta-3 adrenergic receptors may be the primary regulator of human brown adipocyte metabolism. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2020;105(4):E994–1005.
39. Crichton PG, Lee Y, Kunji ERS. The molecular features of uncoupling protein 1 support a conventional mitochondrial carrier-like mechanism. *Biochimie*. 2017;134:35–50.
40. Jastroch M, Oelkrug R, Keipert S. Insights into brown adipose tissue evolution and function from non-model organisms. *Journal of Experimental Biology*. 2018;221(1).
41. Cannon B, Nedergaard J. What Ignites UCP1? *Cell Metabolism*. 2017;26(5):697–8.
42. Jarmuszkiewicz W, Woyda-Ploszczyca A, Antos-Krzeminska N, Sluse FE. Mitochondrial uncoupling proteins in unicellular eukaryotes. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*. 2010;1797(6-7): 792–9.
43. Lefterova MI, Lazar MA. New developments in adipogenesis. *Trends in Endocrinology and Metabolism*. 2009;20(3): 107–14.
44. James AW. Review of Signaling Pathways Governing MSC Osteogenic and Adipogenic Differentiation. *Scientifica (Cairo)*. 2013;2013:1–17.
45. Chang E, Kim C. Natural Products and Obesity: A Focus on the Regulation of Mitotic Clonal Expansion during Adipogenesis. *Molecules*. 2019;24(6):1157.
46. Farmer SR. Transcriptional control of adipocyte formation. *Cell Metab*. 2006;4(4):263–73.
47. Rodríguez A, Ezquerro S, Méndez-Giménez L, Becerril S, Frühbeck G. Revisiting the adipocyte: a model for integration of cytokine signaling in the regulation of energy metabolism. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. 2015;309(8):E691–714.
48. Sanchez-Gurmaches J, Guertin DA. Adipocytes arise from multiple lineages that are heterogeneously and dynamically distributed. *Nature Communications*. 2014;5(1):4099.
49. Timmons JA, Wennmalm K, Larsson O, Walden TB, Lassmann T, Petrovic N, et al. Myogenic gene expression signature establishes that brown and white adipocytes originate from distinct cell lineages. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2007;104(11):4401–6.
50. Kim JB, Spiegelman BM. ADD1/SREBP1 promotes adipocyte differentiation and gene expression linked to fatty acid metabolism. *Genes and Development*. 1996;10(9):1096–107.
51. Siersbæk R, Nielsen R, Mandrup S. PPAR $\gamma$  in adipocyte differentiation and metabolism - Novel insights from genome-wide studies. *FEBS Letters*. 2010;584(15):3242–9.
52. Tanaka T, Yoshida N, Kishimoto T, Akira S. Defective adipocyte differentiation in mice lacking the C/EBP $\beta$  and/or C/EBP $\delta$  gene. *The EMBO Journal*. 1997;16(24): 7432-43.
53. Ahmad B, Serpell CJ, Fong IL, Wong EH. Molecular Mechanisms of Adipogenesis: The Anti-adipogenic Role of AMP-Activated Protein Kinase. *Frontiers in Molecular Biosciences*. 2020;7(76).
54. Seale P, Bjork B, Yang W, Kajimura S, Chin S, Kuang S, et al. PRDM16 controls a brown fat/skeletal muscle switch. *Nature*. 2008;454(7207):961–7.
55. Reddy NL, Tan BK, Barber TM, Randeve HS. Brown adipose tissue: endocrine determinants of function and therapeutic manipulation as a novel treatment strategy for obesity. *BMC Obesity*. 2014;1(1):13.

56. Alcalá M, Calderon-Dominguez M, Serra D, Herrero L, Viana M. Mechanisms of impaired brown adipose tissue recruitment in obesity. *Frontiers in Physiology*. 2019;10(2): 94
57. Tseng YH, Kokkotou E, Schulz TJ, Huang TL, Winnay JN, Taniguchi CM, et al. New role of bone morphogenetic protein 7 in brown adipogenesis and energy expenditure. *Nature*. 2008;454(7207):1000–4.
58. Kajimura S, Seale P, Kubota K, Lunsford E, Frangioni J v., Gygi SP, et al. Initiation of myoblast to brown fat switch by a PRDM16-C/EBP- $\beta$  transcriptional complex. *Nature*. 2009;460(7259):1154–8.
59. Friedrichs M, Wirsdörfer F, Flohé SB, Schneider S, Wuelling M, Vortkamp A. BMP signaling balances proliferation and differentiation of muscle satellite cell descendants. *BMC Cell Biology*. 2011;12(1):26.
60. Fontecha-Barriuso M, Martin-Sanchez D, Martinez-Moreno J, Monsalve M, Ramos A, Sanchez-Niño M, et al. The Role of PGC-1 $\alpha$  and Mitochondrial Biogenesis in Kidney Diseases. *Biomolecules*. 2020;10(2):347.
61. Young P, Arch JRS, Ashwell M. Brown adipose tissue in the parametrial fat pad of the mouse. *FEBS Letters*. 1984;167(1):10–4.
62. Lo KA, Sun L. Turning WAT into BAT: A review on regulators controlling the browning of white adipocytes. *Bioscience Reports*. 2013;33(5):711–9.
63. Cinti S. Reversible physiological transdifferentiation in the adipose organ. *Proceedings of the Nutrition Society*. 2009;68(4):340–9.
64. Frontini A, Vitali A, Perugini J, Murano I, Romiti C, Guerrieri M, et al. WAT to BAT transdifferentiation of omental fat in adult humans affected by pheochromocytomas. *Italian Journal of Anatomy and Embryology*. 2013;118(2):94.
65. Lee YH, Petkova AP, Mottillo EP, Granneman JG. In vivo identification of bipotential adipocyte progenitors recruited by  $\beta$ 3-adrenoceptor activation and high-fat feeding. *Cell Metabolism*. 2012;15(4):480–91.
66. Cannon B, Nedergaard J. Brown Adipose Tissue: Function and Physiological Significance. *Physiological Reviews*. 2004;84(1):277–359.
67. Ohno H, Shinoda K, Spiegelman BM, Kajimura S. PPAR $\gamma$  agonists induce a white-to-brown fat conversion through stabilization of PRDM16 protein. *Cell Metabolism*. 2012;15(3):395–404.
68. Loh RKC, Formosa MF, Eikelis N, Bertovic DA, Anderson MJ, Barwood SA, et al. Pioglitazone reduces cold-induced brown fat glucose uptake despite induction of browning in cultured human adipocytes: a randomised, controlled trial in humans. *Diabetologia*. 2018;61(1):220–30.
69. Hauner H. The mode of action of thiazolidinediones. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*. 2002;18(S2):S10–5.
70. Vella V, Nicolosi ML, Giuliano S, Bellomo M, Belfiore A, Malaguarnera R. PPAR- $\gamma$  Agonists As Antineoplastic Agents in Cancers with Dysregulated IGF Axis. *Frontiers in Endocrinology*. 2017;8(2): 31.
71. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2021;71(3):209–49.
72. Abbott DE, Pritchard C, Clegg NJ, Ferguson C, Dumpit R, Sikes RA, et al. Expressed sequence tag profiling identifies developmental and anatomic partitioning of gene expression in the mouse prostate. *Genome Biol*. 2003;4(12):R79.

## BIBLIOGRAFÍA

73. Ittmann M. Anatomy and Histology of the Human and Murine Prostate. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 2018;8(5):a030346.
74. Shappell SB, Thomas G v., Roberts RL, Herbert R, Ittmann MM, Rubin MA, et al. Prostate Pathology of Genetically Engineered Mice: Definitions and Classification. The Consensus Report from the Bar Harbor Meeting of the Mouse Models of Human Cancer Consortium Prostate Pathology Committee. *Cancer Research*. 2004;64(6):2270–305.
75. Fine SW, Reuter VE. Anatomy of the prostate revisited: Implications for prostate biopsy and zonal origins of prostate cancer. *Histopathology*. 2012;60(1):142–52.
76. Oliveira DSM, Dzinic S, Bonfil AI, Saliganan AD, Sheng S, Bonfil RD. The mouse prostate: a basic anatomical and histological guideline. *Bosnian Journal of Basic Medical Sciences*. 2016;16(1):8–13.
77. Carson C, Rittmaster R. The role of dihydrotestosterone in benign prostatic hyperplasia. *Urology*. 2003;61(4): 2–7.
78. Grabowska MM, Degraff DJ, Yu X, Jin RJ, Chen Z, Borowsky AD, et al. Mouse models of prostate cancer: Picking the best model for the question. *Cancer and Metastasis Reviews*. 2014;33(2.3): 377–97.
79. Ittmann M, Huang J, Radaelli E, Martin P, Signoretti S, Sullivan R, et al. Animal models of human prostate cancer: The consensus report of the new york meeting of the mouse models of human cancers consortium prostate pathology committee. *Cancer Research*. 2013;73(9): 2718–36.
80. Gao W, Bohl CE, Dalton JT. Chemistry and structural biology of androgen receptor. *Chemical Reviews*. 2005;105(9):3352–70.
81. Tan ME, Li J, Xu HE, Melcher K, Yong E leong. Androgen receptor: structure, role in prostate cancer and drug discovery. *Acta Pharmacologica Sinica*. 2015;36(1):3–23.
82. Proverbs-Singh T, Feldman JL, Morris MJ, Autio KA, Traina TA. Targeting the androgen receptor in prostate and breast cancer: several new agents in development. *Endocrine-Related Cancer*. 2015;22(3):R87–106.
83. Kong L, Tang M, Zhang T, Wang D, Hu K, Lu W, et al. Nickel nanoparticles exposure and reproductive toxicity in healthy adult rats. *International Journal of Molecular Sciences*. 2014;15(11):21253–69.
84. Hau M. Regulation of male traits by testosterone: Implications for the evolution of vertebrate life histories. *BioEssays*. 2007;29(2):133–44.
85. Miller WL, Auchus RJ. The Molecular Biology, Biochemistry, and Physiology of Human Steroidogenesis and Its Disorders. *Endocrine Reviews*. 2011;32(1):81–151.
86. Hiort O. The differential role of androgens in early human sex development. *BMC Medicine*. 2013;11(1): 152.
87. Lang TF. The Bone-Muscle Relationship in Men and Women. *Journal of Osteoporosis*. 2011;2011:1–4.
88. Tindall D, Lonergan P. Androgen receptor signaling in prostate cancer development and progression. *Journal of Carcinogenesis*. 2011;10(1):20.
89. Jacob A, Raj R, Allison DB, Myint ZW. Androgen Receptor Signaling in Prostate Cancer and Therapeutic Strategies. *Cancers (Basel)*. 2021;13(21):5417.
90. Hu R, Lu C, Mostaghel EA, Yegnasubramanian S, Gurel M, Tannahill C, et al. Distinct transcriptional programs mediated by the ligand-dependent full-length androgen receptor and its splice variants in castration-resistant prostate cancer. *Cancer Research*. 2012;72(14):3457–62.

91. Cao B, Qi Y, Zhang G, Xu D, Zhan Y, Alvarez X, et al. Androgen receptor splice variants activating the full-length receptor in mediating resistance to androgen-directed therapy. *Oncotarget*. 2014;5(6):1646–56.
92. Jernberg E, Bergh A, Wikström P. Clinical relevance of androgen receptor alterations in prostate cancer. *Endocrine Connections*. 2017;6(8):R146–61.
93. Guo H, Wu Y, Nouri M, Spisak S, Russo JW, Sowalsky AG, et al. Androgen receptor and MYC equilibration centralizes on developmental super-enhancer. *Nature Communications*. 2021;12(1):7308.
94. Kalinska M, Meyer-Hoffert U, Kantyka T, Potempa J. Kallikreins – The melting pot of activity and function. *Biochimie*. 2016;122:270–82.
95. Anamthathmakula P, Winuthayanon W. Mechanism of semen liquefaction and its potential for a novel non-hormonal contraception†. *Biology of Reproduction*. 2020;103(2):411–26.
96. Chand Sharma P, Verma K. Molecular alterations and precision medicine in prostate cancer. In: *Precision Medicine for Investigators, Practitioners and Providers*. 2020: 167–78.
97. Catalona WJ. Prostate Cancer Screening. *Medical Clinics of North America*. 2018;102(2):199–214.
98. Naji L, Randhawa H, Sohani Z, Dennis B, Lautenbach D, Kavanagh O, et al. Digital Rectal Examination for Prostate Cancer Screening in Primary Care: A Systematic Review and Meta-Analysis. *The Annals of Family Medicine*. 2018;16(2):149–54.
99. Turkbey B, Pinto PA, Choyke PL. Imaging techniques for prostate cancer: implications for focal therapy. *Nature Reviews Urology*. 2009;6(4):191–203.
100. Minamimoto R, Senda M, Jinnouchi S, Terauchi T, Inoue T. Detection of prostate cancer by an FDG-PET cancer screening program: results from a Japanese nationwide survey. *Asia Ocean J Nucl Med Biol*. 2014;2(1):19–23.
101. Gleason DF. Histologic grading of prostate cancer: A perspective. *Human Pathology*. 1992;23(3):273–9.
102. Greene FL, Sobin LH. The Staging of Cancer: A Retrospective and Prospective Appraisal. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2008;58(3):180–90.
103. Kinsella N, Helleman J, Bruinsma S, Carlsson S, Cahill D, Brown C, et al. Active surveillance for prostate cancer: a systematic review of contemporary worldwide practices. *Translational Andrology and Urology*. 2018;7(1):83–97.
104. Tsao CK, Oh WK. First-Line Treatment of Hormone-Sensitive Metastatic Prostate Cancer: Is There a Single Standard of Care? *Journal of Clinical Oncology*. 2018;36(11):1060–1.
105. Hurwitz M. Chemotherapy in Prostate Cancer. *Current Oncology Reports*. 2015;17(10):44.
106. de Bono J, Mateo J, Fizazi K, Saad F, Shore N, Sandhu S, et al. Olaparib for Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2020;382(22):2091–102.
107. Sweeney C, Bracarda S, Sternberg CN, Chi KN, Olmos D, Sandhu S, et al. Ipatasertib plus abiraterone and prednisolone in metastatic castration-resistant prostate cancer (IPATential150): a multicentre, randomised, double-blind, phase 3 trial. *The Lancet*. 2021;398(10295):131–42.
108. Antonarakis ES, Piulats JM, Gross-Goupil M, Goh J, Ojamaa K, Hoimes CJ, et al. Pembrolizumab for Treatment-Refractory Metastatic Castration-Resistant Prostate

## BIBLIOGRAFÍA

- Cancer: Multicohort, Open-Label Phase II KEYNOTE-199 Study. *Journal of Clinical Oncology*. 2020;38(5):395–405.
109. Zoubeidi A, Ghosh PM. Celebrating the 80th anniversary of hormone ablation for prostate cancer. *Endocrine-Related Cancer*. 2021;28(8):T1–10.
  110. Rice MA, Malhotra S v., Stoyanova T. Second-Generation Antiandrogens: From Discovery to Standard of Care in Castration Resistant Prostate Cancer. *Frontiers in Oncology*. 2019;9(8):801
  111. Zhao J, Ning S, Lou W, Yang JC, Armstrong CM, Lombard AP, et al. Cross-resistance among next-generation antiandrogen drugs through the AKR1C3/AR-V7 axis in advanced prostate cancer. *Molecular Cancer Therapeutics*. 2020;19(8):1708–18.
  112. Liu C, Yang JC, Armstrong CM, Lou W, Liu L, Qiu X, et al. AKR1C3 promotes AR-V7 protein stabilization and confers resistance to AR-targeted therapies in advanced prostate cancer. *Molecular Cancer Therapeutics*. 2019;18(10):1875–86.
  113. Schweizer MT, Antonarakis ES. Abiraterone and other novel androgen-directed strategies for the treatment of prostate cancer: A new era of hormonal therapies is born. *Therapeutic Advances in Urology*. 2012;4(4):167–78.
  114. Malik VS, Willet WC, Hu FB. Nearly a decade on - trends, risk factors and policy implications in global obesity. *Nat Rev Endocrinol*. 2020;16(11):615–6.
  115. Blüher M. Obesity: global epidemiology and pathogenesis. *Nature Reviews Endocrinology*. 2019;15(5):288–98.
  116. Pischon T, Nimptsch K. Obesity and Risk of Cancer: An Introductory Overview. *Recent Results in Cancer Research*. 2016;208: 1–15.
  117. Wilson RL, Taaffe DR, Newton RU, Hart NH, Lyons-Wall P, Galvão DA. Obesity and prostate cancer: A narrative review. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 2022;169:103543.
  118. Wu Q, Li B, Li J, Sun S, Yuan J, Sun S. Cancer-associated adipocytes as immunomodulators in cancer. *Biomarker Research*. 2021;9(1):2.
  119. Hanahan D, Weinberg RA. The Hallmarks of Cancer. *Cell*. 2000;100(1):57–70.
  120. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*. 2011;144(5) 646–74.
  121. Hanahan D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discovery*. 2022;12(1):31–46.
  122. Moraes JA, Encarnação C, Franco VA, Xavier Botelho LG, Rodrigues GP, Ramos-Andrade I, et al. Adipose Tissue-Derived Extracellular Vesicles and the Tumor Microenvironment: Revisiting the Hallmarks of Cancer. *Cancers (Basel)*. 2021;13(13):3328.
  123. Quail DF, Dannenberg AJ. The obese adipose tissue microenvironment in cancer development and progression. *Nature Reviews Endocrinology*. 2019;15(3):139–54.
  124. Chen Q, Lai SM, Xu S, Tan Y, Leong K, Liu D, et al. Resident macrophages restrain pathological adipose tissue remodeling and protect vascular integrity in obese mice. *EMBO Rep*. 2021;22(8).
  125. Wu Q, Li B, Li Z, Li J, Sun S, Sun S. Cancer-associated adipocytes: Key players in breast cancer progression. *Journal of Hematology and Oncology*. 2019;12(1): 95
  126. Leopold Wager CM, Wormley FL. Classical versus alternative macrophage activation: the Ying and the Yang in host defense against pulmonary fungal infections. *Mucosal Immunology*. 2014;7(5):1023–35.
  127. Yao Y, Xu XH, Jin L. Macrophage Polarization in Physiological and Pathological Pregnancy. *Frontiers in Immunology*. 2019;10(3):792

128. Ruggiero AD, Key CCC, Kavanagh K. Adipose Tissue Macrophage Polarization in Healthy and Unhealthy Obesity. *Frontiers in Nutrition*. 2021;8(2):625331.
129. Le CT, Khat LT, Caryotakis SE, Wang M, Dunai C, Nguyen A v., et al. PD-1 Blockade Reverses Obesity-Mediated T Cell Priming Impairment. *Front Immunol*. 2020;11:590568.
130. Lengyel E, Makowski L, DiGiovanni J, Kolonin MG. Cancer as a Matter of Fat: The Crosstalk between Adipose Tissue and Tumors. *Trends in Cancer*. Cell Press. 2018;4(5) 374–84.
131. Nieman KM, Romero IL, van Houten B, Lengyel E. Adipose tissue and adipocytes support tumorigenesis and metastasis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*. 2013;1831(10):1533–41.
132. Dominiak A, Chelstowska B, Olejarz W, Nowicka G. Communication in the Cancer Microenvironment as a Target for Therapeutic Interventions. *Cancers (Basel)*. 2020;12(5):1232.
133. Obradovic M, Sudar-Milovanovic E, Soskic S, Essack M, Arya S, Stewart AJ, et al. Leptin and Obesity: Role and Clinical Implication. *Frontiers in Endocrinology*. 2021;12(5):585887.
134. Samad N. Role of Leptin in Cancer: A Systematic Review. *Biomedical Journal of Scientific & Technical Research*. 2019;18(1).
135. Muratsu J, Kamide K, Fujimoto T, Takeya Y, Sugimoto K, Taniyama Y, et al. The Combination of High Levels of Adiponectin and Insulin Resistance Are Affected by Aging in Non-Obese Old Peoples. *Frontiers in Endocrinology*. 2022;12(1): 805244
136. Wang X, Chen Q, Pu H, Wei Q, Duan M, Zhang C, et al. Adiponectin improves NF- $\kappa$ B-mediated inflammation and abates atherosclerosis progression in apolipoprotein E-deficient mice. *Lipids in Health and Disease*. 2016;15(1):33
137. Gao Q, Zheng J, Yao X, Peng B. Adiponectin inhibits VEGF-A in prostate cancer cells. *Tumor Biology*. 2015;36(6):4287–92.
138. Zhang L, Yuan Q, Li M, Chai D, Deng W, Wang W. The association of leptin and adiponectin with hepatocellular carcinoma risk and prognosis: a combination of traditional, survival, and dose-response meta-analysis. *BMC Cancer*. 2020;20(1):1167
139. Obi N, Jung AY, Maurer T, Huebner M, Johnson T, Behrens S, et al. Association of circulating leptin, adiponectin, and resistin concentrations with long-term breast cancer prognosis in a German patient cohort. *Scientific Reports*. 2021;11(1):23526.
140. Croston GE, Cao Z, Goeddel D v. NF- $\kappa$ B Activation by Interleukin-1 (IL-1) Requires an IL-1 Receptor-associated Protein Kinase Activity. *Journal of Biological Chemistry*. 1995;270(28):16514–7.
141. Richard AJ, Stephens JM. The role of JAK–STAT signaling in adipose tissue function. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. 2014;1842(3):431–9.
142. Hideshima T, Nakamura N, Chauhan D, Anderson KC. Biologic sequelae of interleukin-6 induced PI3-K/Akt signaling in multiple myeloma. *Oncogene*. 2001;20(42):5991–6000.
143. Moraes JA, Encarnação C, Franco VA, Botelho LGX, Rodrigues GP, Ramos-Andrade I, et al. Adipose tissue-derived extracellular vesicles and the tumor microenvironment: Revisiting the hallmarks of cancer. *Cancers*. 2021;13(13):3328
144. Hartwig S, de Filippo E, Göddeke S, Knebel B, Kotzka J, Al-Hasani H, et al. Exosomal proteins constitute an essential part of the human adipose tissue secretome. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*. 2019;1867(12):140172

## BIBLIOGRAFÍA

145. Crewe C, Funcke JB, Li S, Joffin N, Gliniak CM, Ghaben AL, et al. Extracellular vesicle-based interorgan transport of mitochondria from energetically stressed adipocytes. *Cell Metabolism*. 2021;33(9):1853-1868.
146. Greenberg NM, DeMayo FJ, Sheppard PC, Barrios R, Lebovitz R, Finegold M, et al. The rat probasin gene promoter directs hormonally and developmentally regulated expression of a heterologous gene specifically to the prostate in transgenic mice. *Molecular Endocrinology*. 1994;8(2):230–9.
147. Gingrich J, Barrios R, Foster B, Greenberg N. Pathologic progression of autochthonous prostate cancer in the TRAMP model. *Prostate Cancer and Prostatic Diseases*. 1999;2(2):70–5.
148. Blumenfeld NR, Kang HJ, Fenzl A, Song Z, Chung JJ, Singh R, et al. A direct tissue-grafting approach to increasing endogenous brown fat. *Sci Rep*. 2018;8(1):7957.
149. Bahmad HF, Jalloul M, Azar J, Moubarak MM, Samad TA, Mukherji D, et al. Tumor Microenvironment in Prostate Cancer: Toward Identification of Novel Molecular Biomarkers for Diagnosis, Prognosis, and Therapy Development. *Frontiers in Genetics*. 2021;12(3):652747
150. Munteanu R, Onaciu A, Moldovan C, Zimta AA, Gulei D, Paradiso A v., et al. Adipocyte-based cell therapy in oncology: The role of cancer-associated adipocytes and their reinterpretation as delivery platforms. *Pharmaceutics*. 2020;12(5):402
151. LI G, LIU X, MU J, XU Q, MENG Q, ZHANG L, et al. White adipose tissue browning: A novel and effective therapeutic strategy and approach for type 2 diabetes. *Diabetes Updates*. 2018;4(6).
152. Macotela Y, Boucher J, Tran TT, Kahn CR. Sex and depot differences in adipocyte insulin sensitivity and glucose. *Diabetes*. 2009;58(4):803–12.
153. Aoki A, Fujitani K, Takagi K, Kimura T, Nagase H, Nakanishi T. Male Hypogonadism Causes Obesity Associated with Impairment of Hepatic Gluconeogenesis in Mice. *Biol. Pharm. Bull.* 2016;39(4):587-592.
154. Fettman MJ, Stanton CA, Banks LL, Hamar DW, Johnson DE, Hegstad RL, et al. Effects of neutering on bodyweight, metabolic rate and glucose tolerance of domestic cats. *Research in Veterinary Science*. 1997;62(2):131–6.
155. Uehara H, Kobayashi T, Matsumoto M, Watanabe S, Yoneda A, Yoshimi B. Adipose tissue: Critical contributor to the development of prostate cancer. *The Journal of Medical Investigation*. 2018;65(1.2):9–17.
156. Sacca PA, Calvo JC. Periprostatic Adipose Tissue Microenvironment: Metabolic and Hormonal Pathways During Prostate Cancer Progression. *Frontiers in Endocrinology*. 2022;13(4):863027.
157. Sun X, Feng X, Wu X, Lu Y, Chen K, Ye Y. Fat Wasting Is Damaging: Role of Adipose Tissue in Cancer-Associated Cachexia. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2020;8(2):33
158. Huang J, Duran A, Reina-Campos M, Valencia T, Castilla EA, Müller TD, et al. Adipocyte p62/SQSTM1 Suppresses Tumorigenesis through Opposite Regulations of Metabolism in Adipose Tissue and Tumor. *Cancer Cell*. 2018;33(4):770-784.
159. Hashimoto O, Noda T, Morita A, Morita M, Ohtsuki H, Sugiyama M, et al. Castration induced browning in subcutaneous white adipose tissue in male mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2016;478(4):1746–50.



160. Gasparini SJ, Swarbrick MM, Kim S, Thai LJ, Henneicke H, Cavanagh LL, et al. Androgens sensitise mice to glucocorticoid-induced insulin resistance and fat accumulation. *Diabetologia*. 2019;62(8):1463–77.
161. Lerner A, Kewada D, Ahmed A, Hardy K, Christian M, Franks S. Androgen reduces mitochondrial respiration in mouse brown adipocytes: A model for disordered energy balance in polycystic ovary syndrome. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;22(1):1–15.
162. Kim NR, David K, Corbeels K, Khalil R, Antonio L, Schollaert D, et al. Testosterone Reduces Body Fat in Male Mice by Stimulation of Physical Activity Via Extrahypothalamic ER $\alpha$  Signaling. *Endocrinology*. 2021;162(6).
163. Rocha-Rodrigues S, Matos A, Afonso J, Mendes-Ferreira M, Abade E, Teixeira E, et al. Skeletal Muscle-Adipose Tissue-Tumor Axis: Molecular Mechanisms Linking Exercise Training in Prostate Cancer. *Int J Mol Sci*. 2021;22(9):4469.
164. Feigelson HS, Caan B, Weinmann S, Leonard AC, Powers JD, Yenumula PR, et al. Bariatric Surgery is Associated With Reduced Risk of Breast Cancer in Both Premenopausal and Postmenopausal Women. *Ann Surg*. 2020;272(6):1053–9.
165. Bertolini F. Adipose tissue and breast cancer progression: A link between metabolism and cancer. *The Breast*. 2013;22(S2):S48–9.
166. Lu YP, Lou YR, Bernard JJ, Peng QY, Li T, Lin Y, et al. Surgical removal of the parametrial fat pads stimulates apoptosis and inhibits UVB-induced carcinogenesis in mice fed a high-fat diet. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(23):9065–70.
167. Busetto L, Bassetto F, Zocchi M, Zuliani F, Nolli ML, Pigozzo S, et al. The effects of the surgical removal of subcutaneous adipose tissue on energy expenditure and adipocytokine concentrations in obese women. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*. 2008;18(2):112–20.
168. Šebunova N, Štšepetova J, Kullisaar T, Suija K, Rätsep A, Junkin I, et al. Changes in adipokine levels and metabolic profiles following bariatric surgery. *BMC Endocrine Disorders*. 2022;22(1):33.
169. Foster MT, Shi H, Seeley RJ, Woods SC. Removal of intra-abdominal visceral adipose tissue improves glucose tolerance in rats: Role of hepatic triglyceride storage. *Physiology and Behavior*. 2011;104(5):845–54.
170. Fenton A. Weight, shape, and body composition changes at menopause. *Journal of Mid-life Health*. 2021;12(3):187.
171. Nassar ZD, Aref AT, Miladinovic D, Mah CY, Raj G v., Hoy AJ, et al. Peri-prostatic adipose tissue: the metabolic microenvironment of prostate cancer. *BJU Int*. 2018;121(S3):9–21.
172. Faris JE, Smith MR. Metabolic sequelae associated with androgen deprivation therapy for prostate cancer. *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity*. 2010;17(3): 240–6.
173. Galvão DA, Taaffe DR, Newton RU. Body weight, fat mass and metabolic complications during androgen deprivation therapy: should urologists recommend exercise and diet to help patients overcome toxicities? *Prostate Cancer and Prostatic Diseases*. 2021;24(3):591–3.
174. Rothwell NJ, Stock MJ. Energy Balance and Brown Fat Activity in Adrenalectomized Male, Female, and Castrated Male Rats. *Metabolism*. 1986;35(7):657–660.
175. Nie Y, Gavin TP, Kuang S. Measurement of Resting Energy Metabolism in Mice Using Oxymax Open Circuit Indirect Calorimeter. *Bio-Protocol*. 2015;5(18):1602

## BIBLIOGRAFÍA

176. Romieu I, Dossus L, Barquera S, Blotti re HM, Franks PW, Gunter M, et al. Energy balance and obesity: what are the main drivers? *Cancer Causes and Control*. 2017;28(3):247–58.
177. Vargovic P, Manz G, Kvetnansky R. Continuous cold exposure induces an anti-inflammatory response in mesenteric adipose tissue associated with catecholamine production and thermogenin expression in rats. *Endocrine Regulations*. 2016;50(3):137–44.
178. Divoux A, Moutel S, Poitou C, Lacasa D, Veyrie N, Aissat A, et al. Mast Cells in Human Adipose Tissue: Link with Morbid Obesity, Inflammatory Status, and Diabetes. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2012;97(9):E1677–85.
179. Johansson A, Rudolfsson S, Hammarsten P, Halin S, Pietras K, Jones J, et al. Mast cells are novel independent prognostic markers in prostate cancer and represent a target for therapy. *American Journal of Pathology*. 2010;177(2):1031–41.
180. Chen WC, Beck I, Schober W, Brockow K, Effner R, Buters JTM, et al. Human mast cells express androgen receptors but treatment with testosterone exerts no influence on IgE-independent mast cell degranulation elicited by neuromuscular blocking agents. *Experimental Dermatology*. 2010;19(3): 302–4.
181. Mayo JC, S niz RM, Antol n I, Ur a H, Menéndez-Peláez A, Rodríguez C. Androgen-dependent mast cell degranulation in the Harderian gland of female Syrian hamsters: in vivo and organ culture evidence. *Anatomy and Embryology*. 1997;196(2):133–40.
182. Wynn TA, Chawla A, Pollard JW. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature*. 2013;496(7446):445–55.
183. Martori C, Sanchez-Moral L, Paul T, Pardo JC, Font A, Ruiz de Porras V, et al. Macrophages as a Therapeutic Target in Metastatic Prostate Cancer: A Way to Overcome Immunotherapy Resistance? *Cancers (Basel)*. 2022;14(2):440.
184. Catrysse L, van Loo G. Adipose tissue macrophages and their polarization in health and obesity. *Cell Immunol*. 2018;330:114–9.
185. Cioni B, Zaalberg A, van Beijnum JR, Melis MHM, van Burgsteden J, Muraro MJ, et al. Androgen receptor signalling in macrophages promotes TREM-1-mediated prostate cancer cell line migration and invasion. *Nature Communications*. 2020;11(1):4498
186. Herwig R, Horninger W, Rehder P, Klocker H, Ramoner R, Thurnher M, et al. Ability of PSA-positive circulating macrophages to detect prostate cancer. *The Prostate*. 2005;62(3):290–8.
187. Silva JAF, Bruni-Cardoso A, Augusto TM, Damas-Souza DM, Barbosa GO, Felisbino SL, et al. Macrophage roles in the clearance of apoptotic cells and control of inflammation in the prostate gland after castration. *The Prostate*. 2018;78(2):95–103.
188. Roth CL, Molica F, Kwak BR. Browning of White Adipose Tissue as a Therapeutic Tool in the Fight against Atherosclerosis. *Metabolites*. 2021;11(5):319.
189. Fayyad AM, Khan AA, Abdallah SH, Alomran SS, Bajou K, Khattak MNK. Rosiglitazone enhances browning adipocytes in association with MAPK and PI3-K pathways during the differentiation of telomerase-transformed mesenchymal stromal cells into adipocytes. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019;20(7):1618.
190. Miyazawa M, Subbaramaiah K, Bhardwaj P, Zhou XK, Wang H, Falcone DJ, et al. Pioglitazone inhibits periprostatic white adipose tissue inflammation in obese mice. *Cancer Prevention Research*. 2018;11(4):215–26.
191. Abdullahi A, Auger C, Stanojic M, Patsouris D, Parousis A, Epelman S, et al. Alternatively Activated Macrophages Drive Browning of White Adipose Tissue in Burns. *Annals of Surgery*. 2019;269(3):554–63.

192. Moore KJ, Rosen ED, Fitzgerald ML, Rando F, Andersson LP, Altshuler D, et al. The role of PPAR- $\gamma$  in macrophage differentiation and cholesterol uptake. *Nature Medicine*. 2001;7(1):41–7.
193. Hulsmans M, Geeraert B, Arnould T, Tsatsanis C, Holvoet P. PPAR Agonist-Induced Reduction of Mcp1 in Atherosclerotic Plaques of Obese, Insulin-Resistant Mice Depends on Adiponectin-Induced Irak3 Expression. Cignarella A, editor. *PLoS ONE*. 2013;8(4):e62253.
194. Tsai JS, Chen CY, Chen YL, Chuang LM. Rosiglitazone inhibits monocyte/macrophage adhesion through de novo adiponectin production in human monocytes. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2010;110(6):1410–9.
195. Kir S, Spiegelman BM. Cachexia and Brown Fat: A Burning Issue in Cancer. Vol. 2, *Trends in Cancer*. 2016;2(9): 461–3.
196. Mueller E, Sarraf P, Tontonoz P, Evans RM, Martin KJ, Zhang M, et al. Terminal Differentiation of Human Breast Cancer through PPAR $\gamma$ . *Molecular Cell*. 1998;1(3):465–70.
197. Mody M, Dharker N, Bloomston M, Wang PS, Chou FS, Glickman TS, et al. Rosiglitazone sensitizes MDA-MB-231 breast cancer cells to anti-tumour effects of tumour necrosis factor- $\alpha$ , CH11 and CYC202. *Endocrine-Related Cancer*. 2007;14(2):305–15.
198. Yee LD, Williams N, Wen P, Young DC, Lester J, Johnson M v., et al. Pilot study of rosiglitazone therapy in women with breast cancer: Effects of short-term therapy on tumor tissue and serum markers. *Clinical Cancer Research*. 2007;13(1):246–52.
199. Qin L, Gong C, Chen AM, Guo FJ, Xu F, Ren Y, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  agonist rosiglitazone inhibits migration and invasion of prostate cancer cells through inhibition of the CXCR4/CXCL12 axis. *Molecular Medicine Reports*. 2014;10(2):695–700.
200. Galbraith LCA, Mui E, Nixon C, Hedley A, Strachan D, MacKay G, et al. PPAR-gamma induced AKT3 expression increases levels of mitochondrial biogenesis driving prostate cancer. *Oncogene*. 2021;40(13):2355–66.
201. Dang YF, Jiang XN, Gong FL, Guo XL. New insights into molecular mechanisms of rosiglitazone in monotherapy or combination therapy against cancers. *Chemico-Biological Interactions*. 2018;296:162–70.
202. Straat ME, Hogenboom R, Boon MR, Rensen PCN, Kooijman S. Circadian control of brown adipose tissue. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*. 2021;1866(8):158961.
203. Xu Z, You W, Liu J, Wang Y, Shan T. Elucidating the Regulatory Role of Melatonin in Brown, White, and Beige Adipocytes. *Advances in Nutrition*. 2019;11(2):447–60.
204. Jiménez-Aranda A, Fernández-Vázquez G, Campos D, Tassi M, Velasco-Perez L, Tan DX, et al. Melatonin induces browning of inguinal white adipose tissue in Zucker diabetic fatty rats. *Journal of Pineal Research*. 2013;55(4):416–23.
205. Halpern B, Mancini MC, Mendes C, Machado CML, Prando S, Sapienza MT, et al. Melatonin deficiency decreases brown adipose tissue acute thermogenic capacity of in rats measured by 18F-FDG PET. *Diabetology & Metabolic Syndrome*. 2020;12(1):82.
206. Singh R, Artaza JN, Taylor WE, Braga M, Yuan X, Gonzalez-Cadavid NF, et al. Testosterone inhibits adipogenic differentiation in 3T3-L1 cells: Nuclear translocation of androgen receptor complex with  $\beta$ -catenin and T-cell factor 4 may bypass canonical Wnt signaling to down-regulate adipogenic transcription factors. *Endocrinology*. 2006;147(1):141–54.

## BIBLIOGRAFÍA

207. Suzuki M, Murakami M, Shirai M, Hashimoto O, Kawada T, Matsui T, et al. Role of estradiol and testosterone in Ucp1 expression in brown/beige adipocytes. *Cell Biochemistry and Function*. 2018;36(8):450–6.
208. Olokpa E, Bolden A, Stewart LM v. The Androgen Receptor Regulates PPAR $\gamma$  Expression and Activity in Human Prostate Cancer Cells. *Journal of Cellular Physiology*. 2016;231(12):2664–72.
209. Barakat DJ, Zhang J, Barberi T, Denmeade SR, Friedman AD, Paz-Priel I. CCAAT/Enhancer binding protein  $\beta$  controls androgen-deprivation-induced senescence in prostate cancer cells. *Oncogene*. 2015;34(48):5912–22.
210. Pogodziński D, Ostrowska L, Smarkusz-Zarzecka J, Zysk B. Secretome of Adipose Tissue as the Key to Understanding the Endocrine Function of Adipose Tissue. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022;23(4):2309.
211. Tang KD, Liu J, Jovanovic L, An J, Hill MM, Vela I, et al. Adipocytes promote prostate cancer stem cell self-renewal through amplification of the cholecystokinin autocrine loop. *Oncotarget*. 2016;7(4):4939–48.
212. Balaban S, Shearer RF, Lee LS, van Geldermalsen M, Schreuder M, Shtein HC, et al. Adipocyte lipolysis links obesity to breast cancer growth: adipocyte-derived fatty acids drive breast cancer cell proliferation and migration. *Cancer & Metabolism*. 2017;5(1):1.
213. Frille A, Kuhn H, Ebert T, Seyfarth HJ, Wirtz H. The influence of brown adipose tissue on the proliferation and chemosensitivity in non-small cell lung cancer cells. *Lung Cancer*. 2018: PA2844.
214. Muniraj N, Siddharth S, Parida S, Shriver M, Nagalingam A, Sharma D. Abstract 2690: Therapeutic browning of white adipose tissue in the tumor microenvironment to inhibit breast cancer progression. *Cancer Research*. 2021;81(13):2690–2690.
215. Silva OE, Warsch SM, Torres AE, Gomez Arteaga A, Westin G, Dawar R, et al. “Fight fat with fat”: The impact of brown adipose tissue (BAT) on breast cancer prognosis—A retrospective analysis. *Journal of Clinical Oncology*. 2015;33(15):1585–1585.
216. Galindo-Hernandez O, Serna-Marquez N, Castillo-Sanchez R, Salazar EP. Extracellular vesicles from MDA-MB-231 breast cancer cells stimulated with linoleic acid promote an EMT-like process in MCF10A cells. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*. 2014;91(6):299–310.
217. Vlaeminck-Guillem V. Extracellular Vesicles in Prostate Cancer Carcinogenesis, Diagnosis, and Management. *Frontiers in Oncology*. 2018;8(6):222
218. Deshmukh AS, Peijs L, Beaudry JL, Jespersen NZ, Nielsen CH, Ma T, et al. Proteomics-Based Comparative Mapping of the Secretomes of Human Brown and White Adipocytes Reveals EPDR1 as a Novel Adipokine. *Cell Metabolism*. 2019;30(5):963–975.
219. Wang J, Wu Y, Guo J, Fei X, Yu L, Ma S. Adipocyte-derived exosomes promote lung cancer metastasis by increasing MMP9 activity via transferring MMP3 to lung cancer cells. *Oncotarget*. 2017;8(47):81880–91.
220. Zhang H, Deng T, Ge S, Liu Y, Bai M, Zhu K, et al. Exosome circRNA secreted from adipocytes promotes the growth of hepatocellular carcinoma by targeting deubiquitination-related USP7. *Oncogene*. 2019;38(15):2844–59.
221. la Camera G, Gelsomino L, Malivindi R, Barone I, Panza S, de Rose D, et al. Adipocyte-derived extracellular vesicles promote breast cancer cell malignancy through HIF-1 $\alpha$  activity. *Cancer Lett*. 2021;521:155–68.

222. Ribeiro R, Monteiro C, Cunha V, Oliveira MJ, Freitas M, Fraga A, et al. Human periprostatic adipose tissue promotes prostate cancer aggressiveness in vitro. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. 2012;31(1).
223. Chopra DP, Menard RE, Januszewski J, Mattingly RR. TNF- $\alpha$ -mediated apoptosis in normal human prostate epithelial cells and tumor cell lines. *Cancer Letters*. 2004;203(2):145–54.
224. Crowley F, Sterpi M, Buckley C, Margetich L, Handa S, Dovey Z. A review of the pathophysiological mechanisms underlying castration-resistant prostate cancer. Vol. 13, *Research and Reports in Urology*. Dove Medical Press Ltd; 2021. p. 457–72.
225. Bellmunt J, Oh WK. Review: Castration-resistant prostate cancer: new science and therapeutic prospects. *Therapeutic Advances in Medical Oncology*. 2010;2(3):189–207.



**PUBLICACIONES**





Durante el periodo predoctoral Alejandro Álvarez Artime ha publicado como primer autor dos artículos científicos en la revista *International Journal of Molecular Sciences*.

**Álvarez-artime A**, García-soler B, Sainz RM, Mayo JC. Emerging roles for browning of white adipose tissue in prostate cancer malignant behaviour. Vol. 22, *International Journal of Molecular Sciences*. 2021. p. 5560.

**Alvarez-Artime A**, Cernuda-Cernuda R, -Artime-naveda F, Cepas V, Gonzalez-Menendez P, Fernandez-Vega S, et al. Melatonin-induced cytoskeleton reorganization leads to inhibition of melanoma cancer cell proliferation. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;21(2).

Adicionalmente, se han publicado dos artículos más en los que ha colaborado como autor y que están estrechamente relacionados con el tema de la tesis doctoral en las revistas *Redox Biology* y *Molecules*.

Mayo JC, Aguado A, Cernuda-Cernuda R, **Álvarez-Artime A**, Cepas V, Quirós-González I, et al. Melatonin uptake by cells: An answer to its relationship with glucose? *Molecules*. 2018;23(8)

Gonzalez-Menendez P, Hevia D, Alonso-Arias R, **Alvarez-Artime A**, Rodriguez-Garcia A, Kinet S, et al. GLUT1 protects prostate cancer cells from glucose deprivation-induced oxidative stress. *Redox Biology*. 2018;17.





Review

# Emerging Roles for Browning of White Adipose Tissue in Prostate Cancer Malignant Behaviour

Alejandro Álvarez-Artime <sup>1,2,3</sup> , Belén García-Soler <sup>1,2</sup>, Rosa María Sainz <sup>1,2,3</sup> and Juan Carlos Mayo <sup>1,2,3,\*</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Morfología y Biología Celular, Redox Biology Unit, University of Oviedo, Facultad de Medicina, Julián Clavería 6, 33006 Oviedo, Spain; alejandroalvarezartime@gmail.com (A.Á.-A.); belengaso.ies@gmail.com (B.G.-S.); sainzrosa@uniovi.es (R.M.S.)

<sup>2</sup> Instituto Universitario de Oncología del Principado de Asturias (IUOPA), Santiago Gascón Building, Fernando Bongera s/n, 33006 Oviedo, Spain

<sup>3</sup> Instituto de Investigación Sanitaria del Principado de Asturias (ISPA), Avda. Hospital Universitario s/n, 33011 Oviedo, Spain

\* Correspondence: mayojuan@uniovi.es

**Abstract:** In addition to its well-known role as an energy repository, adipose tissue is one of the largest endocrine organs in the organism due to its ability to synthesize and release different bioactive molecules. Two main types of adipose tissue have been described, namely white adipose tissue (WAT) with a classical energy storage function, and brown adipose tissue (BAT) with thermogenic activity. The prostate, an exocrine gland present in the reproductive system of most mammals, is surrounded by periprostatic adipose tissue (PPAT) that contributes to maintaining glandular homeostasis in conjunction with other cell types of the microenvironment. In pathological conditions such as the development and progression of prostate cancer, adipose tissue plays a key role through paracrine and endocrine signaling. In this context, the role of WAT has been thoroughly studied. However, the influence of BAT on prostate tumor development and progression is unclear and has received much less attention. This review tries to bring an update on the role of different factors released by WAT which may participate in the initiation, progression and metastasis, as well as to compile the available information on BAT to discuss and open a new field of knowledge about the possible protective role of BAT in prostate cancer.

**Keywords:** adipose tissue; browning; prostate cancer



**Citation:** Álvarez-Artime, A.; García-Soler, B.; Sainz, R.M.; Mayo, J.C. Emerging Roles for Browning of White Adipose Tissue in Prostate Cancer Malignant Behaviour. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 5560. <https://doi.org/10.3390/ijms22115560>

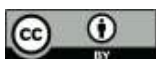
Academic Editor: Eliska Svastova

Received: 2 May 2021

Accepted: 17 May 2021

Published: 24 May 2021

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. White Adipose Tissue (WAT)

In adult mammals, WAT is widely distributed throughout the body to provide one of its main functions, i.e., offering mechanical protection against impacts, thus preventing organ harm. Additionally, it also serves as a long-term energy store by accumulating triglycerides in the form of lipid droplets inside the adipocytes [1], as the complete oxidation of fatty acids provides more than twice the energy associated with carbohydrates and proteins [2,3]. Therefore, white adipocytes, namely unilocular adipocytes, may exceed 100 µm in diameter and usually display a large droplet surrounded by a phospholipid monolayer [4], which restricts the nucleus and cytoplasm to the periphery, leaving less than 2 µm between the droplet and the plasma membrane (Table 1) [5].

Two genes are responsible for many of the changes observed during WAT adipogenesis, i.e., the proliferative activated peroxisomal receptor (PPAR $\gamma$ ) and the  $\alpha$ -protein binding sequence CAAT (C/EBP $\alpha$ ) [6]. PPAR $\gamma$  is essential for the differentiation process to occur and in turn, it also induces the expression of C/EBP $\alpha$ , which makes this gene a key regulator of WAT differentiation [7]. On the other hand, it has been shown that C/EBP $\alpha$  expression is necessary but not sufficient, since C/EBP $\alpha^{-/-}$  cells are capable of proceeding through the differentiation process. However, this differentiation is incomplete since the cells store a lower lipid content. Once the preadipocyte reaches a 'threshold' in

the expression of these two genes, cells begin to accumulate triglycerides in small lipid droplets, which eventually merge into a single one.

## 2. Brown Adipose Tissue (BAT)

In mammals, BAT is also widely distributed but restricted to the first stages of development, tending these fat depots to disappear with age. However, this is not the case for all species, since this specialized adipose tissue prevents the body temperature drop that would occur in many heterotherms during hibernation. Classically, it has been assumed that human adults show small BAT depots limited to certain regions including the cervical, supraclavicular and axillary areas, perivascular regions and small areas close to the kidney. Nevertheless, very recently, Leitner and co-workers have accurately mapped the human BAT depots, using positron emission tomography/computed tomography, showing that previous studies have underestimated the presence of this tissue in adults [8].

BAT major function relates to the ability to produce the so-called ‘non-shivering thermogenesis’, a process that, at the molecular level, is carried out by the mitochondrial uncoupling protein 1 (UCP-1/thermogenin) [9]. As its own name suggests, this transmembrane protein uncouples the ETC by pumping protons from the intermembrane space back into the mitochondrial matrix, thereby generating heat rather than ATP [10]. This protein is activated by allosteric binding of long-chain fatty acids produced during the lipolysis of cytoplasmic lipid droplets after adrenergic stimulation [11,12]. Furthermore, it is also subjected to positive transcriptional regulation by different factors, both genetic such as the presence of a 211-base pair enhancer, and molecular such as rosiglitazone or retinoic acid [13,14].

BAT adipocytes are characterized by a central nucleus and a cytoplasm filled with numerous small lipid droplets (multilocular adipocytes) as well as many mitochondria which are important for the thermogenic process, giving the tissue its characteristic brown color. Like WAT, BAT mainly accumulates triglycerides (30–70%), but in this case, brown adipocytes may also accumulate phospholipids such as phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine, and, to a lesser extent, phosphatidylinositol. Many of these features differentially displayed by adipocytes are presented in Table 1 [15].

**Table 1.** Main differences among the three types of adipose tissue. Modified from Cedikova. et al. [16].

Characteristic	White	Brown	Beige
Morphology Shape	Spherical	Polygonal	Spherical
Cell Size	Variable, large	Small	Variable
Lipid Droplet	Single large LD	Multiple small	Multiple variable
Mitochondria	+	+++	++ (upon stimulation)
Development	From Myf 5 <sup>-</sup> precursors	From Myf 5 <sup>+</sup> precursors	From Myf 5 <sup>-</sup> precursors
Location	Subcutaneous Visceral	Cervical Supraclavicular Axilar	Inguinal Perivascular Other locations?
Function	Energy storage	Heat production	Adaptative thermogenesis
Uncoupling Protein	Nearly undetectable	+++	++ (upon stimulation)
Vascularization	Low	High	High (upon stimulation)
Lipid Content	Tryglicerides	Tryglicerides phopholipids	Tryglicerides phospholipids
Impact on Obesity	Positive	Negative	Negative

### 3. 'Beige' Adipose Tissue

In recent decades, a phenomenon known as 'browning' of WAT has been described, which was first reported by Young and colleagues in 1984 [17]. This process is triggered by the increased gene expression levels of different markers involved in the BAT adipogenic differentiation, including PPAR $\gamma$  or PGC-1 $\alpha$  [18]. Such increase causes the appearance of multilocular adipocytes, morphologically similar to brown adipocytes, but rather located in those anatomical sites characteristic of WAT [19]. PPAR $\gamma$ , a key regulator of mitochondrial biogenesis and activator of oxidative metabolism, also induces the expression and production of UCP-1 in these adipocytes [20]. Other genetic markers of the browning process are the bone morphogenetic proteins 4 and 7 (BMP4, BMP7), which act as increasing both energy expenditure and insulin sensitivity in adipocytes [21]. Browning mainly occurs due to non-pharmacological activators such as thermal stimuli including exposure to low temperatures, physical exercise or diet [22,23]. Nevertheless, browning can be pharmacologically induced by drugs that trigger the  $\beta$ -adrenergic response, or by modulation of proteins involved in the adipose tissue differentiation such as PPAR $\gamma$ , AMPK or Sirtuins [24]. These stimuli cause sympathetic nervous system activation, which in turn triggers  $\beta$ -adrenergic signaling mediated by norepinephrine (NE) [25]. Browning of male murine subcutaneous WAT after orchidectomy has also been described, though the mechanistic insight of this process is still unclear [26].

Even though beige adipocytes display some ultrastructural and biochemical features in common with brown adipocytes, such as mitochondrial content and elevated UCP-1 expression, both types of adipocytes differ in many features [27]. While brown adipocytes derive from a mesenchymal precursor expressing myogenic factor 5 (Myf5) and paired box protein 7 (Pax7) as cellular markers, beige adipocytes have a controversial origin. Some experts defend that these cells would originate from WAT transdifferentiation [28]. This alteration is supported by evidence indicating that, in nursing mothers, breast adipose tissue is capable of transdifferentiating into glandular tissue and then dedifferentiate back into mature adipose tissue after the completion of nursing [29]. On the other hand, some groups defend that beige adipocytes would arise from de novo differentiation of mesenchymal precursors residing within the adipose tissue stroma [30] (see Table 1).

Preliminary results from our group agree with the phenomenon of transdifferentiation from WAT adipocytes, since we observe an increase in the amount of beige adipose tissue between the periprostatic adipose tissue depots (PPAT), without altering the total fat content in the prostate, a finding not previously described in the literature (unpublished data). The browning process has been associated with different roles in obesity, where a beneficial effect has been reported by increasing energy expenditure in favor of thermogenesis, thus decreasing the amount of WAT [26]. On the other hand, the browning process might have a role in the development of breast tumors or participate in collateral phenomena such as cachexia [31].

### 4. Prostate Cancer: A Key Role for Adipose Tissue

Prostate cancer is the most commonly diagnosed tumor among men in western countries and the second most common in the world after skin cancer. Its incidence is determined by several factors such as age, race or lifestyle [32]. The latter is currently thought to have a key role in its development and progression. During the last years, an increase in prostate cancer incidence has been observed, positively correlated with an increase in the prevalence of other pathologies such as obesity or metabolic syndrome [33]. It has been widely reported that a high-fat diet is related to an increase in the number of metastases originating from a primary prostate tumor [34]. As a consequence, a variety of mechanisms have been elucidated supporting the relationship between these pathologies, including elevated systemic and local inflammation levels derived from increased infiltration of immune cells in fat depots, hyperinsulinemia as a consequence of the increase in adipose tissue and its activity, or alterations in the availability of lipids and adipokines [35].

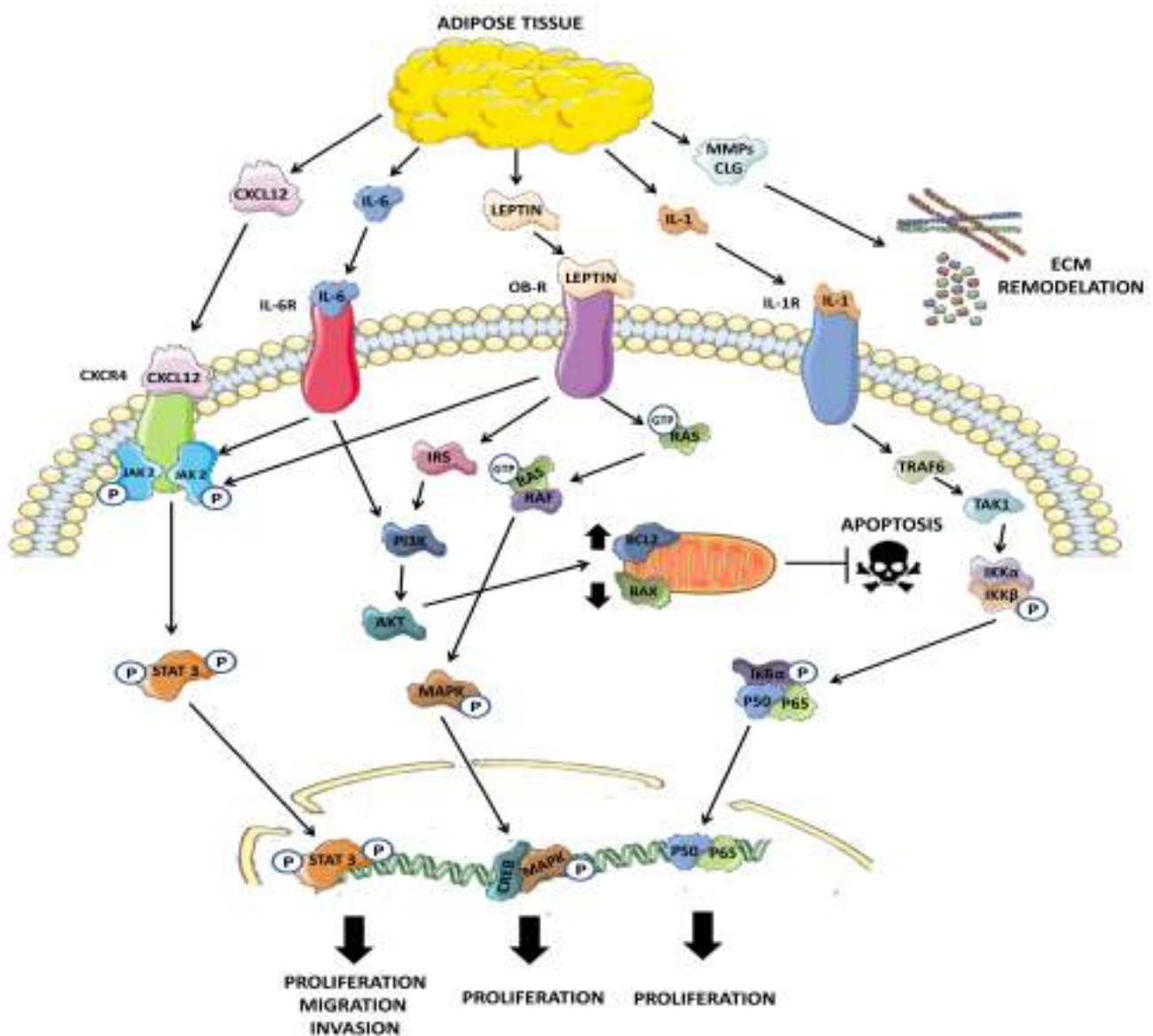
All these mechanisms have been proposed, to a greater or lesser degree, as keys in the carcinogenesis process of different tumors and have been reviewed in detail elsewhere [36].

Furthermore, WAT is one of the most abundant components of the prostate microenvironment both in healthy and tumorous settings and its activity is closely related to the gland. Given its endocrine role, WAT modulates the activity of both, glandular cells and the microenvironment itself causing alterations that favor the processes of migration, invasion and aggressiveness of prostate tumors [37]. However, this interaction is not unidirectional, since several studies have revealed the capacity of the prostate tumor to induce genetic and phenotypic changes in adjacent adipocytes, leading to their transformation into the so-called 'cancer-associated adipocytes' [38].

### 5. Adipose Tissue-Tumor Crosstalk. A Role for BAT in Tumorigenesis?

In normoweight subjects with BMI between 18.5–25, the microenvironment of adipose tissue is rich in anti-inflammatory cytokines produced by the immune cells found in the extracellular matrix and also secreted by the adipocytes themselves [39]. However, when weight gain occurs, in addition to the secretion of adipokines related to insulin resistance or inflammation, the adipocytes become hypertrophied and, in some cases, their own cell death causes the release of cellular components as well as intracellular molecules that will ultimately trigger the innate immune response activation. Consequently, the microenvironment acquires a pro-inflammatory profile contributing to the recruitment of more immune cells that feed back the process [40]. It is described that both, induction and transplantation of BAT in individuals with adipose tissue dysfunction have a beneficial role in reducing weight gain [41]. Stanford and colleagues have described how BAT transplantation is able to regulate metabolic homeostasis, thus improving glucose tolerance and insulin sensitivity [42]. Similarly, Vargovic and co-workers observed how cold-induced BAT exerts anti-inflammatory effects, which were manifested through an upregulation of anti-inflammatory cytokines, i.e., IL-4 and IL-10 families, as well as a downregulation of pro-inflammatory cytokines of the IL-1 $\beta$ , IL-6 or IL-17 families [42]. Furthermore, they also suggest an increase in the number of polarized macrophages (M2) in the adipose tissue microenvironment to the detriment of classical activated macrophages (M1) in WAT dysfunction associated with obesity. These findings are in line with data published by others groups, which support the anti-inflammatory profile of BAT [43].

Cancer-associated adipocytes have been shown to be ultimately capable of producing a vicious feedback loop that increases the malignancy of tumor cells. To promote this malignancy, adipocytes and cancer cells establish crosstalk mediated by paracrine signaling. This interplay is based on the release of different adipokines that modulate cell growth and survival, as is shown in Figure 1. Leptin and adiponectin are two of the most important hormones involved in this process and are also the main adipokines released by adipose tissue [44]. In normal prostate, adipose tissue is present in approximately 48% of the gland surface [45]. During tumor growth, epithelial cells leave the glandular niche and invade the microenvironment becoming exposed to huge concentrations of adipokines released by periprostatic adipose tissue that boost their proliferation [46]. Likewise, it has been shown in vitro that co-culture of human prostate tumor cells, LNCaP and PC3, with adipocytes favors the epithelial-mesenchymal transition and weaponize tumor cells with certain resistance to chemotherapy treatment such as docetaxel or cisplatin [47]. In addition, a study using ob/ob leptin deficient mice, which develop obesity due to lack of the aforementioned hormone, found that the induction of benign prostatic hyperplasia (BPH) by exogenous testosterone administration resulted in an attenuated phenotype in comparison with controls and ob/ob mice [48]. Moreover, ob/ob mice treated with testosterone showed higher levels of E-cadherin and lower levels of vimentin, suggesting that leptin plays a key role in the EMT [49]. In accordance with these results, other groups found that the treatment of high fat diet mice with exogenous recombinant adiponectin, the opposite of leptin, protects obese mice against BPH [50].



**Figure 1.** Major routes driving the influence of adipose tissue on tumor progression. Adipose tissue can release adipokines which play important roles in normally altered pathways in cancer. The stromal cell derived factor 1 (CXCL12) through direct interaction with the chemokine receptor CXC type 4 (CXCR4) present in the membrane of tumor cells activates the JAK2/STAT3 signaling cascade, that ultimately has the function of translocation from STAT3 to the nucleus where it acts as a transcription factor for genes involved in cell survival, or migration and invasion, thus promoting EMT. Leptin, another of the main adipokines in adipose tissue, acts by interaction with its membrane receptor (OB-R). This receptor is associated with the JAK2 protein, which in turn phosphorylates STAT3, triggering the activation of survival pathways. Likewise, its interaction with the serine/threonine kinase RAF protein, and the GTPase RAS induce the activation of the MAPK pathway, promoting cell growth and survival. This hormone is also important in the regulation of apoptosis since via PI3K/AKT can modulate the levels of the BCL-2 and BAX proteins, inhibiting apoptosis of tumor cells and thus favoring both proliferation and resistance to chemotherapy. In an inflammatory environment, it is common for the adipose tissue and its microenvironment immune cells to release different interleukins such as IL-6 or IL-1, which by binding to their membrane receptors (IL-6R and IL-1R) are capable to activate the survival pathways mentioned above. IL-1, can also promote proliferation and survival by activating NF $\kappa$ B-mediated signaling. Finally, adipose tissue can contribute indirectly to the spread of tumor cells through the remodeling of the extracellular matrix mediated by collagenases (CLG) and metalloproteinases (MMPs) which, in conjunction with EMT, favors the migration of cells out of the primary niche and their dissemination.

In human studies, Sacca and colleagues described that the PPAT secretome of different stages of prostate cancer and BHP contains proteins involved in lipid transport and adipogenesis. The levels of these proteins were higher in advanced stages of tumors and decreased in early stages, with lower levels in patients with BPH. According to these results, researchers related this secretome with some pathways involved in cell adhesion, migration and invasion [51].

These alterations make this crosstalk become a key factor, due to its influence on tumor development and growth during the initial stages of tumorigenesis, which has subsequent consequences in the development of the disease and its mortality.

### 5.1. Leptin

Leptin is a hormone released by adipose tissue, involved in the regulation of food intake and body weight through hypothalamic control [52]. Commonly known as the 'satiety hormone', leptin is responsible for reducing the appetite sensation when reserve levels in adipose tissue are high, thus favoring energy expenditure [53,54]. In tumors, however, leptin acts rather as a promoter of growth and cell proliferation, by ultimately leading to phosphorylation of the mitogen-activated protein kinases (MAPKs), as well as acting as a cyclin D1 promoter, which collectively contributes to the progression of the cell cycle [55,56]. In obese subjects, the levels of this hormone are higher than in non-obese individuals. Epidemiological studies have found an association between high levels of leptin and an increased risk of colon and breast cancer [57,58].

In prostate cancer, its effects have been demonstrated in cell culture models, where leptin stimulation increases cell growth in androgen-independent PC-3 and DU145, but not in hormone-responsive LNCaP cells [59]. Regarding the relationship between circulating levels of leptin and prostate cancer, there are some conflicting results. While some groups describe that increases in serum leptin levels show a positive correlation with prostate cancer risk, other groups report no differences between them [60,61]. It is noteworthy to mention that such association between high levels of circulating leptin and prostate cancer is more striking in advanced prostate tumors, thus its use as a potential tumor progression marker should not be ruled out.

### 5.2. Adiponectin

Adiponectin is a peptide hormone mainly synthesized by adipose tissue whose main role resides in regulating glucose metabolism, by promoting insulin sensitivity and glucose uptake and stimulating fatty acids oxidation [62]. Adiponectin interacts with cells through its membrane receptors, namely ADIPOR1 and ADIPOR2 [63]. Upon interaction with their membrane receptors, it triggers cellular signaling that involves antitumor effects including the induction of caspase-mediated apoptosis, anti-inflammatory activity mediated by nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF $\kappa$ B), or anti-angiogenic activity by the inhibition of vascular endothelial growth factor A (VEGF-A) [64,65]. Furthermore, adiponectin is found at very low levels in obese individuals and shows a negative correlation between its circulating levels and the occurrence of some tumors, making this adipokine a prognostic risk factor to be considered [53]. Both adiponectin receptors are overexpressed in invasive and non-invasive breast tumors [66]. On the contrary, in the prostate, the presence of the ADIPOR1 receptor is diminished in tumor tissue, compared to non-pathologic prostatic tissues from healthy individuals [67]. Similar results have been reported in colon cancer, where adiponectin levels have been negatively correlated with the development and progression of neoplastic lesions [68]. In breast cancer, another endocrine-related tumor, adipose tissue plays an important role. Breast fat depots are the major endocrine system of the breast and release a large variety of growth factors and enzymes that contribute to the normal development, differentiation and homeostasis of the gland [69]. It has been described an abnormal development of the breast acinus in the absence of leptin that it is recovered when leptin was re-administrated [70]. Furthermore,



excessive growth of the mammary gland was observed in mice when adiponectin was overexpressed [71].

In addition, adipose tissue differentiating genes such as PPAR $\gamma$  and C/EBP are considered tumor suppressor genes in breast cancer. Evidence has shown that downregulation of PPAR $\gamma$  correlates with a protumorigenic ambient. C/EBP was related to estrogen negative and metastatic breast cancer [72,73].

According to the secretory activity of adipose tissue, breast adipose tissue hormones also play an important role. Leptin activates the MAPK and AKT pathways increasing the proliferation, angiogenesis and decreasing apoptosis in tumor cells [74]. Moreover, leptin activates the estrogen receptor and the epidermal growth factor receptor 2 (HER2) which results in an increase in cell growth and resistance to therapies [75]. On the contrary, adiponectin acts as an antagonist, showing antiproliferative and proapoptotic effects by inactivation of AKT and activation of STAT3 pathways [76].

On the other hand, given the high functionality of BAT in the control of energy homeostasis, its possible influence on tumor processes has been studied. Experiments carried out mostly in breast cancer, relate an increase in the expression of anti-tumor genes such as phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate 3-phosphatase (PTEN) with the presence of BAT in WAT depots in vivo [77]. PTEN is a gene capable of regulating cell growth and proliferation by controlling the cell cycle [78]. However, the presence of brown adipose tissue might negatively affect the survival of cancer patients due to its role in the phenomena of cancer-associated cachexia, since it contributes to a rapid loss of fat and the dysfunction of the adipose tissue itself due to its high metabolic activity [79]. Collectively, the opposing data reported to date point that the role of this type of adipose tissue within the tumor process remains unclear and many of its routes of action are unknown, therefore it requires further study and further investigation into its possible function. Nevertheless, to date, several factors derived from adipose tissue have been reported to have a role in cancer progression, related to extracellular matrix remodeling and/or metastasis.

## 6. Adipocytes Modulate Extracellular Matrix Reorganization

The extracellular matrix (ECM) is a complex structure made up of different proteins, proteoglycans and polysaccharides that serves as a scaffold for cells. This structure supports cells in processes such as cell adhesion, tissue repair and regeneration, or survival [80].

In obesity, ECM remodeling is crucial, since it needs to undergo a reorganization to allow accommodation of the hypertrophic adipocytes, which makes it highly plastic based on fluctuations in the lipid content of adipocytes [81]. Likewise, during tumorigenesis, ECM remodeling is a key factor involved in the progression, since the undergone alterations allow invasion and cell migration [82].

Endocrine activity of adipocytes includes several factors implicated in ECM formation and remodeling. Therefore, during tumorigenesis, tumor cells switch on the synthesis and release of molecules such as collagenases or metalloproteinases, favoring a better environment for cell migration out of the primary tumor [45,83]. In addition, as mentioned above, an exaggerated increase in adipose tissue leads to the recruitment of white blood cells that will ultimately trigger local inflammation due to the release of proinflammatory cytokines such as IL-1, IL-6 or TNF- $\alpha$  both by adipocytes and immune cells [84].

### 6.1. Interleukin-1 (IL-1)

IL-1 is a regulatory cytokine involved in different processes, including host defense response to inflammation and fever. Its pivotal role in fever after the activation of peripheral immune cells has been widely reported [85]. Additional cellular functions including its regulatory functions on cell growth and survival through the mediation of NF $\kappa$ B, upon binding to its receptor, have also received attention [86].

This cytokine was found elevated in the plasma of obese subjects [87,88]. Furthermore, it is described that circulating levels of IL-1 would be a risk factor in various tumor types such as lung and colorectal cancer [89,90]. In the tumor microenvironment, not only is

IL-1 released by the activated macrophages present in the area but it is also produced by adipose tissue [91]. Squamous carcinoma cells either, produce IL-1 or stimulate cells of the tumor microenvironment to produce it in order to be later used by tumor cells [92]. IL-1 effects on growth and progression have been described in most of the known tumors [93]. In the case of prostate cancer, several laboratories have reported in vitro effects on the modulation of neuroendocrine differentiation processes in the prostate, a phenomenon that increases the aggressiveness, chemo/radioresistance and worsens tumor prognosis. Furthermore, it can drive the migration of tumor cells out of the glandular niche [94–96].

### 6.2. Interleukin-6 (IL-6)

IL-6 is a cytokine produced by adipose tissue whose levels have been seen increased in obese individuals [97]. This molecule is an important modulator in the chronic inflammation associated with carcinogenesis, and its tumorigenic properties are related to both, the Janus kinase 2 and signal transducer and activator 3 pathway (JAK2/STAT3) and the phosphoinositide 3 kinase and serine/threonine kinase pathway (PI3K/Akt). Both kinases are essential regulators of the antiapoptotic and proliferative mechanisms in tumor cells. Consequences of IL-6 activation have been observed in a variety of tumors, such as breast cancer and colorectal cancer [67]. In prostate cancer, on the other hand, circulating levels of this cytokine are found elevated in those patients with untreated metastases or hormone-refractory tumors, when compared to individuals with a localized tumor [98]. In addition, several groups have described the ability of androgen-independent, PC3 cells and DU145 to produce this cytokine indicating a paracrine or autocrine role of the molecule itself [99].

### 6.3. Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- $\alpha$ )

TNF- $\alpha$ /TNFA is synthesized mainly by the monocyte/macrophage system, but it is not restricted to it [100]. This pleiotropic cytokine is one of the proinflammatory adipokines produced and secreted by adipose tissue and plays an important role in pathogenesis and disease by interacting with its membrane receptors [101]. Overweighted individuals exhibit higher TNF- $\alpha$  levels than subjects with normal BMI [102]. In addition, this increase in TNF- $\alpha$  is related to oncogenic phenomena in several tumors such as colorectal tumors [89].

In tumors, it is thought that the activity of TNF- $\alpha$  may be related to the tumor microenvironment at the local level of the adipose tissue, where it acts as a signaling molecule, either at the paracrine or autocrine level, regulating the different processes of tumor development and progression. In addition, this cytokine is related to the regulation of other adipokines involved in tumorigenic processes such as Interleukin 6 (IL-6) [103]. In prostate tumors, a dual function has been described for this molecule [104]. On the one hand, there is evidence that it stimulates angiogenesis and is involved in processes such as the acquisition of androgen independence, related to tumor progression and a worse prognosis [105]. However, other research groups have described different antitumor activities such as the inhibition of neovascularization or the ability to induce apoptosis in prostate tumor cells [106].

BAT has acquired in recent years the qualification as an endocrine organ, similarly to that of WAT. This statement relates to the ability of this tissue to regulate energy homeostasis in a UCP-1 independent manner. Therefore, molecules similar to those adipokines secreted by WAT have been also identified and in this case, they are termed brown adipokines or “batokines” [107]. Even though some of these batokines are common with those produced by WAT, there are, however, some specific cytokines exclusively produced by this tissue [108]. Recently, the potential protective effect of these batokines in different pathologies, including metabolic syndrome or obesity has been proposed, making them gain great importance [109]. The classical batokines originally produced by this tissue are secreted molecules that act primarily in a paracrine or autocrine manner such as vascular endothelial growth factor (VEGF), bone morphogenetic proteins (BMPs) or UCP-1 [110–113].

#### 6.4. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)

VEGF is widely distributed throughout the body and plays an important role in different tissues [114]. BAT is a known source of VEGF, which in turn performs important functions primarily at the autocrine and paracrine levels. It has been observed that BAT-induced increases in VEGF secretion do not significantly contribute to the blood concentration of the factor, so it acts mainly at the local level [115,116]. In adipose tissue, VEGF signaling has been associated with browning of WAT after exposure to low temperatures, as well as with decreases in the metabolic dysfunction caused by diet-induced obesity (DIO) [117]. In tumors, VEGF plays an important role in the progression and metastasis due to the de novo blood vessel formation, thus favoring growth and dissemination [118,119].

Bone morphogenic proteins (BMPs) are extracellular signaling proteins with an important presence in bone and cartilage, where they regulate the neof ormation and regeneration of these supporting tissues [120]. In adipose tissue, these proteins intervene in the process of cell differentiation from the mesenchymal precursor to the mature adipocyte [121]. The main BMP produced by BAT, i.e., BMP7, stimulates the production of UCP-1 and mitochondrial biogenesis and in turn triggers subcutaneous WAT browning. However, this is not the principal actor among BMPs in adipogenesis, as BMP4 and particularly BMP8 show a more prominent role. At a systemic level, the increase in the expression and production of these proteins is related to an increase in basal energy expenditure and therefore has important beneficial effects in the protection against DIO [113].

In prostatic tumors, beneficial effects from increasing extracellular BMP7 levels against the migration and invasion of tumor cells have been reported, since it is not a protein produced in large quantities by the epithelial cells of the prostate [122]. It has been observed that in prostate tumors the levels of this protein are reduced in relation to healthy glandular tissue [123]. Several groups have described an overexpression of this protein response in relation to androgen deprivation [124]. Likewise, it has been observed that treatment with this batokine causes an upregulation of epithelial markers such as E-cadherin in contrast to a down-regulation of mesenchymal markers such as fibronectin or vimentin in prostate tumors [125].

#### 6.5. Mitochondrial Uncoupling Protein 1 (UCP-1)

Even though it is not a secreted protein, UCP-1 may have important effects in the regulation of the tissue microenvironment due to its indirect role in redox homeostasis [126]. Adrenergic regulation after BAT stimulation with NE modifies the secretome considerably. Under normal conditions, in the absence of adrenergic stimulation, the batokines released correspond to those proteins involved in the remodeling of the matrix, such as lysozyme C-2, collagenase alfa 1 or cathepsin. However, NE induces the production of batokines, mainly related to protein folding response, involved in various routes such as adipogenesis, lipolysis, autophagy or redox control [127]. Regarding the latter, an increase in antioxidant enzymes such as thioredoxin 1, heme oxygenase, or catalase is concomitant with an increase in PPAR $\gamma$  levels [128]. The role of BAT in the protection against oxidative damage is not new. Several works have highlighted the evolutionarily conserved role of UCP-1 in reducing the production of superoxide anion by mitochondria, where it decreases the membrane potential between the inner membrane and intermembrane space, thus making it difficult for electrons to pass through the transport chain to reach the molecular oxygen [129,130]. In addition, as already mentioned above, increases in the expression levels of UCP-1 are associated with an elevated expression of PPAR $\gamma$  [131].

ECM alterations also play a key role in the 'epithelial-to-mesenchymal' transition (EMT) process that tumor cells undergo during the early stages of invasion and migration [132]. In cells this process occurs normally under physiological conditions, especially during embryonic development, favoring the creation of different tissues and organs [133]. This phenotypic change in cells endows them with special features in which they acquire greater plasticity, proliferative capacity and migration capacity, which makes it a sign of malignancy and worse prognosis in tumor cells [134]. This process is characterized by the

alteration of the expression patterns and the production of proteins involved in cell-cell and cell-matrix adhesion, such as E-cadherin or integrins, whose levels decrease in favor of mesenchymal markers including N-cadherin or vimentin [135]. For this process to occur, the cells respond to different stimuli, either intracellularly as gene expression such as WNT or Hedgehog or due to extracellular factors such as EGF, HGF, TGF- $\beta$ , FGF or IGF present in the extracellular matrix and which are released by fat cells [136]. Table 2 shows a detailed list of the most important batokines and their reported assayed levels in solid tumors.

**Table 2.** Common reported levels of “batokines” in solid tumors.

Batokine/Gene	Physiological Activity	Cancer Type	Protein Levels <sup>1</sup>	Model	References
Adiponectin/ ADIPOQ	Receptor mediated: Regulates proliferation Receptor independent: Regulates insulin sensitivity and modulates immune response	Colorectal	Low (serum)	H	[137]
		Breast	Low (serum)	H	[138,139]
		Pancreas	High (serum) Low (serum)	H	[140,141]
		Liver	High (serum)	H	[142]
		Prostate	Low (serum)	H	[143,144]
		Lung	Low (advanced stages)	H	[145]
		Melanoma	Low (serum)	H	[146]
Bone morphogenetic proteins/BMPx	Receptor mediated: Regulates proliferation, differentiation and apoptosis	Colorectal	High BMP2 (metastasis) Low BMP3 (Primary)	H	[147,148]
		Breast	High BMP4, BMP7 (CL, Primary)	CL, M, H	[148,149]
		Pancreas	Low (Cells)	CL	[150]
		Liver	High (serum)	M	[151]
		Prostate	Low (Primary)	H	[152]
		Lung	BMP2 and BMP 4 high (Primary). BMP7 high (metastasis)	CL, H	[153,154]
C-X-C Motif Chemokine Ligand 14/CXCL-14	Implicated in recruitment of immune cells and immune surveillance	Colorectal	Low (Primary)	H	[156]
		Breast	Low (Primary, CL)	CL, M, H	[157,158]
		Pancreas	High (Primary, CL)	CL, H	[159]
		Liver	Low (Primary, CL)	CL, H	[160]
		Prostate	High (Primary, CL)	CL, H	[161]
		Lung	Methylated (Primary)	H	[162]
		Melanoma	N/A	H	[163]
Retinol binding protein 4/RBP-4	Regulates insulin resistance and glucose homeostasis	Colorectal	High (serum), High (CL)	CL, H	[164,165]
		Breast	High (serum)	H	[166]
		Pancreas	High (serum, Primary)	H	[167]
		Liver	High (CL), Correlation serum levels-survival	CL, H	[168]
		Prostate	High (CL)	CL	[169]
		Lung	High (serum)	H	[170]
Fibroblast growth factor 21/FGF-21	Regulates cell proliferation, glucose homeostasis and acts as a stress sensor	Colorectal	High (serum)	H	[171,172]
		Breast	Low (serum) with hormonal therapy	H	[173]
		Pancreas	Low (Primary)	M	[174,175]
		Liver	High (Primary)	M	[175,176]
		Prostate	Low (Primary, CL)	CL, M, H	[177]
		Lung	High (Primary, CL)	H	[178]
		Melanoma	N/A		
Insulin growth factor binding protein 2/IGFBP-2	Interacts with components of ECM, controls cell growth and metabolism	Colorectal	High (serum)	H	[179,180]
		Breast	High (Serum, Primary)	CL, H	[181,182]
		Pancreas	High (pancreatic juice, serum)	H	[183]
		Liver	High (serum)	H	[180,184]
		Prostate	High (serum, CL)	CL, H	[185,186]
		Lung	High (serum), Secreted (CL)	CL, H	[187,188]
Insulin like growth factor 1/IGF-1	Displays activity by a receptor mediated interaction. Plays an important role in growth and aging	Colorectal	Correlates with cancer risk	H	[190]
		Breast	High (serum)	H	[182,191]
		Pancreas	High (Primary)	H	[192]
		Liver	Low (serum)	H	[193]
		Prostate	High (serum, Primary)	H	[186,194]
		Lung	High (plasma)	H	[195,196]
Melanoma	High (serum)	H	[197]		

Table 2. Cont.

Batokine/Gene	Physiological Activity	Cancer Type	Protein Levels <sup>1</sup>	Model	References
Growth differentiation factor 15/GDF-15	Important role in regulation of inflammatory pathways by inhibition of macrophages and involvement in regulation of apoptosis, cell growth and cell repair	Colorectal	High (serum, Primary)	CL, H	[198,199]
		Breast	Suppression promotes metastasis	CL, H	[200]
		Pancreas	High (plasma, Primary)	CL, H	[201]
		Liver	High (Primary)	H	[202]
		Prostate	High (serum)	CL, H	[199]
		Lung	Correlates with metastasis	CL, M	[203]
Vascular endothelial growth factor/VEGF	Involved in angiogenesis and normal physiological function, development, wound healing, hematopoiesis	Melanoma	High (serum)	H	[204]
		Colorectal	High mRNA (Primary) High (serum)	H	[205,206]
		Breast	High (Primary), High (serum)	H	[207,208]
		Pancreas	High (Primary) Correlation with TNM	H	[209]
		Liver	High (serum)	H	[210]
		Prostate	High (plasma, Primary)	H	[211]
		Lung	High (serum)	H	[212]
Neuregulin 4/NRG-4	Potential activity in inhibition of lipogenesis in liver and control of glucose and lipid homeostasis	Melanoma	High (serum, CL)	CL, H	[213]
		Colorectal	Induces cell survival in cells	CL, M	[214]
		Breast	High (Primary)	H	[215]
		Pancreas	Normal pancreas function	H	[216]
		Liver	Protection against IR	M, H	[217]
		Prostate	High (advanced stages)	H	[218]
Melanoma	High (Primary, CL)	Lung	N/A		
		Melanoma	High (Primary, CL)	H	[219]

<sup>1</sup> Abbreviations: Primary: Primary Tumors; H: Human; CL: Cell Line; M: Mice; N/A: Not available data.

## 7. Adipose Tissue and the Pre-Metastatic Niche

Once the role of adipose tissue in feeding and fueling tumor cells as well as in the invasion and migration of tumor cells outside the gland has been reviewed, another important event to focus on is the implication of adipose tissue in the promotion of the metastatic process [220]. The metastatic process is one of the factors related to the increase in morbidity and mortality in cancer patients [221]. In this process, bidirectional communication between tumor cells and the microenvironment is crucial [222]. An important and necessary factor for metastasis to take place is the adequacy of the microenvironment of the target organ or tissue to the establishment of tumor cells that have escaped from the primary tumor and are in the bloodstream as circulating cancer cells. This process is known as the establishment of the pre-metastatic niche and is based on the adaptation of a permissive environment in terms of nutrients, extracellular matrix and immunity that allows the cells to stay and proliferate [223]. The high secretory capacity of adipokines by adipose tissue, and its role as one of the largest endocrine organs, makes it one of the potential tissues involved in metastasis. In addition, the increase in the levels of different cytokines in blood during obesity reveals that adipose tissue is capable of influencing other distant tissues and modulating their microenvironment in order to admit metastatic tumor cells [224].

Furthermore, another important factor in the establishment of the pre-metastatic niche is the ability of adipose cells to release extracellular vesicles (EVs), which help to promote the establishment of the premetastatic niche and subsequent colonization [225]. The EVs can be classified into two subtypes according to their size and origin: microvesicles and exosomes. Microvesicles (100–1000 nm) are a heterogeneous population of vesicles that come directly from the evagination of the plasma membrane, while exosomes (30–100 nm) derive from luminal membranes of multivesicular bodies, which through fusion events with these smaller vesicles are released from the plasma membrane [226]. EVs are involved in the horizontal transfer of material between cells modulating the phenotype and functional characteristics of cells as well as their number and content depending on the cellular and physiological activity in which the exosomes are involved. However, given their great stability in fluids such as blood, they have become emerging biomarkers with great potential for detecting pathologies [227].

Injecting exosomes of 3T3-L1 preadipocytes into breast fat depots, together with MCF10-DCIS tumor cells has been reported to promote the growth of the primary tumor [35]. Furthermore, *in vitro* treatment of MCF-7 cells with exosomes derived from adipose tissue mesenchymal cells favors the migration of tumor cells in a dose-dependent manner [228]. It has recently been described that exosomes secreted by adipose tissue, under physiological conditions, exhibit a specific organotropism in distant organs with mechanisms of action similar to adipokines. The surface markers that give this organotropism are not known, although it is speculated that they may be the integrins that are present on their surface [229].

The cargo of these exosomes largely varies and may contain different molecules depending on the types of fat. By using a proteomic approach, a recent report has described the presence of 262 molecules commonly secreted by WAT and BAT. Among these, a subset of 101 molecules is specifically released by BAT. This differential secretion allows discrimination of two secretory populations [230]. In accordance with these results, another group has confirmed the possibility to differentiate two populations of EVs coming from WAT and BAT [231]. WAT EVs contain some molecules related to ECM reorganization such as TGF- $\beta$ , tenascin or different MMPs, together with proinflammatory cytokines that are also involved in the ECM reorganization and accommodation in the target organ [232]. Exosomes from adipose tissue loaded with specific miRNAs have been reported to regulate the expression of pathways such as TGF- $\beta$  and Wnt/ $\beta$ -catenin in obesity models, inducing liver fibrosis [233]. Furthermore, the release of exosomes loaded with proinflammatory cytokines modulates the immune response of the target tissue microenvironment establishing an appropriate pre-metastatic niche for the nesting of circulating tumor cells [234]. On the other hand, BAT EVs' cargo is not clearly known. Some reports propose that BAT-derived EVs have beneficial effects by causing a negative regulation of the immune innate response mediated by different molecules, including complement factor H and various anti-inflammatory interleukins such as IL-10, as well as macrophage differentiation mediated by adiponectin [230,232].

## 8. Conclusions and Future Perspectives

Obesity is clearly a widespread problem in developed countries. In addition, it is involved in other pathologies such as diabetes, metabolic syndrome or cancer. Prostate cancer is one of the most frequent tumors in men in the western world. Despite advances in the field, primary tumors eventually progress to an aggressive and metastatic phenotype but treating these tumors remains a challenge. The prevalence of obesity in the developed world and the mechanisms that associate suffering from this pathology with tumor processes are important to study. However, patients with high-grade tumors are often lipodystrophic. Furthermore, in advanced stages, tumors are associated with a loss of function and WAT quantity, as well as increased body wasting (cachexia), which difficult and compromises survival. Likewise, interactions between adipose tissue and metastatic processes have been described, which makes it necessary to expand our studies on the potential role of this tissue in the processes of invasion, establishment of premetastatic niche and metastasis. The transformation of WAT to Beige/BAT has been proposed to play a role in the process. As we have mentioned, brown adipocytes have a high energy dissipation capacity. However, a relationship has been established between BAT activation and tumor progression in relation to cachexia. Apart from these results, the research in BAT is needed to broaden the field, since its potential role in releasing anti-inflammatory cytokines that could regulate the tumor microenvironment has also been described, which in turn would improve the prognosis and palliate the progression of different tumors.

**Author Contributions:** Conceptualization, R.M.S. and J.C.M.; writing—original draft preparation, A.Á.-A. and J.C.M.; writing—review and editing, B.G.-S. and R.M.S.; founding acquisition, R.M.S. and J.C.M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** A.Á.-A is currently supported by “Contratos de investigación para científicos en formación” from ‘FORD-Apadrina la Ciencia’ foundation. A.Á.-A. and B.G.-S. were also supported by ‘Instituto Universitario Oncológico del Principado de Asturias (IUOPA)’. This work was supported by grant from by “Ministerio de Ciencia e Innovación, Gobierno de España” (PID2019-111418RB-100).

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

- Coelho, M.; Oliveira, T.; Fernandes, R. Biochemistry of Adipose Tissue: An Endocrine Organ. *Arch. Med. Sci.* **2013**, *9*, 191–200. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Lagergren, K.; Lindam, A.; Lagergren, J. Dietary Proportions of Carbohydrates, Fat, and Protein and Risk of Oesophageal Cancer by Histological Type. *PLoS ONE* **2013**, *8*, 1–7. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Berry, D.C.; Stenesen, D.; Zeve, D.; Graff, J.M. The Developmental Origins of Adipose Tissue. *Development* **2013**, *140*, 3939–3949. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Fujimoto, T.; Parton, R.G. Not Just Fat: The Structure and Function of the Lipid Droplet. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2011**, *3*, 1–17. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Kim, J.B.; Spiegelman, B.M. ADD1/SREBP1 Promotes Adipocyte Differentiation and Gene Expression Linked to Fatty Acid Metabolism. *Genes Dev.* **1996**, *10*, 1096–1107. [[CrossRef](#)]
- Siersbæk, R.; Nielsen, R.; Mandrup, S. PPAR $\gamma$  in Adipocyte Differentiation and Metabolism—Novel Insights from Genome-Wide Studies. *FEBS Lett.* **2010**, *584*, 3242–3249. [[CrossRef](#)]
- Tanaka, T.; Yoshida, N.; Kishimoto, T.; Akira, S. Defective Adipocyte Differentiation in Mice Lacking the C/EBP $\beta$  and/or C/EBP $\delta$  Gene. *EMBO J.* **1997**, *16*, 7432–7443. [[CrossRef](#)]
- Leitner, B.P.; Huang, S.; Brychta, R.J.; Duckworth, C.J.; Baskin, A.S.; McGehee, S.; Tal, I.; Dieckmann, W.; Gupta, G.; Kolodny, G.M.; et al. Mapping of Human Brown Adipose Tissue in Lean and Obese Young Men. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2017**, *114*, 8649–8654. [[CrossRef](#)]
- Cannon, B.; Nedergaard, J. Brown Adipose Tissue: Function and Physiological Significance. *Physiol. Rev.* **2004**, *84*, 277–359. [[CrossRef](#)]
- Fedorenko, A.; Lishko, P.V.; Kirichok, Y. Mechanism of Fatty-Acid-Dependent UCP1 Uncoupling in Brown Fat Mitochondria. *Cell* **2012**, *151*, 400–413. [[CrossRef](#)]
- Nicholls, D.G.; Locke, R.M. Thermogenic Mechanisms in Brown Fat. *Physiol. Rev.* **1984**, *64*, 1–64. [[CrossRef](#)]
- Crichton, P.G.; Lee, Y.; Kunji, E.R.S. The Molecular Features of Uncoupling Protein 1 Support a Conventional Mitochondrial Carrier-like Mechanism. *Biochimie* **2017**, *134*, 35–50. [[CrossRef](#)]
- Gonzalez-Barroso, M.D.M.; Pecqueur, C.; Gelly, C.; Sanchis, D.; Alves-Guerra, M.C.; Bouillaud, F.; Ricquier, D.; Cassard-Doulcier, A.M. Transcriptional Activation of the Human Ucp1 Gene in a Rodent Cell Line. Synergism of Retinoids, Isoproterenol, and Thiazolidinedione Is Mediated by a Multipartite Response Element. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 31722–31732. [[CrossRef](#)]
- Teruel, T.; Hernandez, R.; Benito, M.; Lorenzo, M. Rosiglitazone and Retinoic Acid Induce Uncoupling Protein-1 (UCP-1) in a P38 Mitogen-Activated Protein Kinase-Dependent Manner in Fetal Primary Brown Adipocytes. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 263–269. [[CrossRef](#)]
- Ong, F.J.; Ahmed, B.A.; Oreskovich, S.M.; Blondin, D.P.; Haq, T.; Konyer, N.B.; Noseworthy, M.D.; Haman, F.; Carpentier, A.C.; Morrison, K.M.; et al. Recent Advances in the Detection of Brown Adipose Tissue in Adult Humans: A Review. *Clin. Sci.* **2018**, *132*, 1039–1054. [[CrossRef](#)]
- Cedikova, M.; Kripnerová, M.; Dvorakova, J.; Pitule, P.; Grundmanova, M.; Babuska, V.; Mullerova, D.; Kuncova, J. Mitochondria in White, Brown, and Beige Adipocytes. *Stem Cells Int.* **2016**, *2016*. [[CrossRef](#)]
- Young, P.; Arch, J.R.S.; Ashwell, M. Brown Adipose Tissue in the Parametrial Fat Pad of the Mouse. *FEBS Lett.* **1984**, *167*, 10–14. [[CrossRef](#)]
- Puigserver, P.; Wu, Z.; Park, C.W.; Graves, R.; Wright, M.; Spiegelman, B.M. A Cold-Inducible Coactivator of Nuclear Receptors Linked to Adaptive Thermogenesis. *Cell* **1998**, *92*, 829–839. [[CrossRef](#)]
- Nedergaard, J.; Cannon, B. The Browning of White Adipose Tissue: Some Burning Issues. *Cell Metab.* **2014**, *20*, 396–407. [[CrossRef](#)]
- Chawta, A.; Repa, J.J.; Evans, R.M.; Mangelsdorf, D.J. Nuclear Receptors and Lipid Physiology: Opening the x-Files. *Science* **2001**, *294*, 1866–1870.
- David, L.; Feige, J.J.; Bailly, S. Emerging Role of Bone Morphogenetic Proteins in Angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev.* **2009**, *20*, 203–212. [[CrossRef](#)]
- Lim, S.; Honek, J.; Xue, Y.; Seki, T.; Cao, Z.; Andersson, P.; Yang, X.; Hosaka, K.; Cao, Y. Cold-Induced Activation of Brown Adipose Tissue and Adipose Angiogenesis in Mice. *Nat. Protoc.* **2012**, *7*, 606–615. [[CrossRef](#)]
- Zhang, Y.; Xie, C.; Wang, H.; Foss, R.M.; Clare, M.; George, E.V.; Li, S.; Katz, A.; Cheng, H.; Ding, Y.; et al. Irisin Exerts Dual Effects on Browning and Adipogenesis of Human White Adipocytes. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **2016**, *311*, E530–E541. [[CrossRef](#)]
- Kuryłowicz, A.; Puzianowska-Kuźnicka, M. Induction of Adipose Tissue Browning as a Strategy to Combat Obesity. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 6241. [[CrossRef](#)]
- Collins, S.  $\beta$ -Adrenoceptor Signaling Networks in Adipocytes for Recruiting Stored Fat and Energy Expenditure. *Front. Endocrinol.* **2012**, *3*, 1–7. [[CrossRef](#)]

26. Hashimoto, O.; Noda, T.; Morita, A.; Morita, M.; Ohtsuki, H.; Sugiyama, M.; Funaba, M. Castration Induced Browning in Subcutaneous White Adipose Tissue in Male Mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2016**, *478*, 1746–1750. [[CrossRef](#)]
27. Ikeda, K.; Maretich, P.; Kajimura, S. The Common and Distinct Features of Brown and Beige Adipocytes. *Trends Endocrinol. Metab.* **2018**, *29*, 191–200. [[CrossRef](#)]
28. Rajan, S.; Gupta, A.; Beg, M.; Shankar, K.; Srivastava, A.; Varshney, S.; Kumar, D.; Gaikwad, A.N. Adipocyte Transdifferentiation and Its Molecular Targets. *Differentiation* **2014**, *87*, 183–192. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Cinti, S. Reversible Physiological Transdifferentiation in the Adipose Organ. *Proc. Nutr. Soc.* **2009**, *68*, 340–349. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Frontini, A.; Vitali, A.; Perugini, J.; Murano, I.; Romiti, C.; Guerrieri, M.; Cinti, S. WAT to BAT Transdifferentiation of Omental Fat in Adult Humans Affected by Pheochromocytomas. *Ital. J. Anat. Embryol.* **2013**, *118*, 94.
31. Daas, S.I.; Rizeq, B.R.; Nasrallah, G.K. Adipose Tissue Dysfunction in Cancer Cachexia. *J. Cell. Physiol.* **2018**, *234*, 13–22. [[CrossRef](#)]
32. Abbott, D.E.; Pritchard, C.; Clegg, N.J.; Ferguson, C.; Dumpit, R.; Sikes, R.A.; Nelson, P.S. Expressed Sequence Tag Profiling Identifies Developmental and Anatomic Partitioning of Gene Expression in the Mouse Prostate. *Genome Biol.* **2003**, *4*, R79. [[CrossRef](#)]
33. Allott, E.H.; Masko, E.M.; Freedland, S.J. Obesity and Prostate Cancer: Weighing the Evidence. *Eur. Urol.* **2013**, *63*, 800–809. [[CrossRef](#)]
34. Mehlem, A.; Hagberg, C.E.; Muhl, L.; Eriksson, U.; Falkevall, A. Imaging of Neutral Lipids by Oil Red O for Analyzing the Metabolic Status in Health and Disease. *Nat. Protoc.* **2013**, *8*, 1149–1154. [[CrossRef](#)]
35. Bunney, P.E.; Zink, A.N.; Holm, A.A.; Billington, C.J.; Kotz, C.M. Orexin Activation Counteracts Decreases in Nonexercise Activity Thermogenesis (NEAT) Caused by High-Fat Diet. *Physiol. Behav.* **2017**, *176*, 139–148. [[CrossRef](#)]
36. Park, J.; Euhus, D.M.; Scherer, P.E. Paracrine and Endocrine Effects of Adipose Tissue on Cancer Development and Progression. *Endocr. Rev.* **2011**, *32*, 550–570. [[CrossRef](#)]
37. Hurwitz, A.A.; Foster, B.A.; Allison, J.P.; Greenberg, N.M.; Kwon, E.D. The TRAMP mouse as a model for prostate cancer. In *Current Protocols in Immunology*; John, E., Ed.; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA, 2001; Chapter 20, Unit 20.5.
38. Wu, Q.; Li, B.; Li, Z.; Li, J.; Sun, S.; Sun, S. Cancer-Associated Adipocytes: Key Players in Breast Cancer Progression. *J. Hematol. Oncol.* **2019**, *12*, 1–15. [[CrossRef](#)]
39. Brestoff, J.R.; Artis, D. Immune Regulation of Metabolic Homeostasis in Health and Disease. *Cell* **2015**, *161*, 146–160. [[CrossRef](#)]
40. Howe, L.R.; Subbaramaiah, K.; Hudis, C.A.; Dannenberg, A.J. Molecular Pathways: Adipose Inflammation as a Mediator of Obesity-Associated Cancer. *Clin. Cancer Res.* **2013**, *19*, 6074–6083. [[CrossRef](#)]
41. Shankar, K.; Kumar, D.; Gupta, S.; Varshney, S.; Rajan, S.; Srivastava, A.; Gupta, A.; Gupta, A.P.; Vishwakarma, A.L.; Gayen, J.R.; et al. Role of Brown Adipose Tissue in Modulating Adipose Tissue Inflammation and Insulin Resistance in High-Fat Diet Fed Mice. *Eur. J. Pharmacol.* **2019**, *854*, 354–364. [[CrossRef](#)]
42. Stanford, K.I.; Middelbeek, R.J.W.; Townsend, K.L.; An, D.; Nygaard, E.B.; Hitchcox, K.M.; Markan, K.R.; Nakano, K.; Hirshman, M.F.; Tseng, Y.H.; et al. Brown Adipose Tissue Regulates Glucose Homeostasis and Insulin Sensitivity. *J. Clin. Invest.* **2013**, *123*, 215–223. [[CrossRef](#)]
43. Nguyen, K.D.; Qiu, Y.; Cui, X.; Goh, Y.P.S.; Mwangi, J.; David, T.; Mukundan, L.; Brombacher, F.; Locksley, R.M.; Chawla, A. Alternatively Activated Macrophages Produce Catecholamines to Sustain Adaptive Thermogenesis. *Nature* **2011**, *480*, 104–108. [[CrossRef](#)]
44. Sierra, H.; Cordova, M.; Chen, C.-S.J.; Rajadhyaksha, M. Confocal Imaging-Guided Laser Ablation of Basal Cell Carcinomas: An Ex Vivo Study. *J. Invest. Dermatol.* **2015**, *135*, 612–615. [[CrossRef](#)]
45. Hong, H.; Koch, M.O.; Foster, R.S.; Bihrl, R.; Gardner, T.A.; Fyffe, J.; Ulbright, T.M.; Eble, J.N.; Cheng, L. Anatomic Distribution of Periprostatic Adipose Tissue: A Mapping Study of 100 Radical Prostatectomy Specimens. *Cancer* **2003**, *97*, 1639–1643. [[CrossRef](#)]
46. Uehara, H.; Kobayashi, T.; Matsumoto, M.; Watanabe, S.; Yoneda, A.; Bando, Y. Adipose Tissue: Critical Contributor to the Development of Prostate Cancer. *J. Med. Investig.* **2018**, *65*, 9–17. [[CrossRef](#)]
47. Su, F.; Ahn, S.; Saha, A.; DiGiovanni, J.; Kolonin, M.G. Adipose Stromal Cell Targeting Suppresses Prostate Cancer Epithelial-Mesenchymal Transition and Chemoresistance. *Oncogene* **2019**, *38*, 1979–1988. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Estève, D.; Roumiguié, M.; Manceau, C.; Milhas, D.; Muller, C. Periprostatic Adipose Tissue: A Heavy Player in Prostate Cancer Progression. *Curr. Opin. Endocr. Metab. Res.* **2020**, *10*, 29–35. [[CrossRef](#)]
49. Zhang, B.; Chen, X.; Xie, C.; Chen, Z.; Liu, Y.; Ru, F.; He, Y. Leptin Promotes Epithelial-Mesenchymal Transition in Benign Prostatic Hyperplasia through Downregulation of BAMBI. *Exp. Cell Res.* **2020**, *387*, 111754. [[CrossRef](#)]
50. Fu, S.; Xu, H.; Gu, M.; Liu, C.; Wang, Q.; Wan, X.; Chen, Y.; Chen, Q.; Peng, Y.; Cai, Z.; et al. Adiponectin Deficiency Contributes to the Development and Progression of Benign Prostatic Hyperplasia in Obesity. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 1–15. [[CrossRef](#)]
51. Sacca, P.A.; Mazza, O.N.; Scorticati, C.; Vitagliano, G.; Casas, G.; Calvo, J.C. Human Periprostatic Adipose Tissue: Secretome from Patients with Prostate Cancer or Benign Prostate Hyperplasia. *Cancer Genom. Proteom.* **2019**, *16*, 29–58. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Triantafyllou, G.A.; Paschou, S.A.; Mantzoros, C.S. Leptin and Hormones: Energy Homeostasis. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* **2016**, *45*, 633–645. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Schulz, C.; Paulus, K.; Jöhren, O.; Lehnert, H. Intranasal Leptin Reduces Appetite and Induces Weight Loss in Rats with Diet-Induced Obesity (DIO). *Endocrinology* **2012**, *153*, 143–153. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



54. Pandit, R.; Beerens, S.; Adan, R.A.H. Role of Leptin in Energy Expenditure: The Hypothalamic Perspective. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **2017**, *312*, R938–R947. [[CrossRef](#)]
55. Dieudonne, M.N.; Machinal-Quelin, F.; Serazin-Leroy, V.; Leneveu, M.C.; Pecquery, R.; Giudicelli, Y. Leptin Mediates a Proliferative Response in Human MCF7 Breast Cancer Cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2002**, *293*, 622–628. [[CrossRef](#)]
56. Gonzalez, R.R.; Cherfils, S.; Escobar, M.; Yoo, J.H.; Carino, C.; Styer, A.K.; Sullivan, B.T.; Sakamoto, H.; Olawaiye, A.; Serikawa, T.; et al. Leptin Signaling Promotes the Growth of Mammary Tumors and Increases the Expression of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Its Receptor Type Two (VEGF-R2). *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 26320–26328. [[CrossRef](#)]
57. Aparicio, T.; Kotelevets, L.; Tsocas, A.; Laigneau, J.P.; Sobhani, I.; Chastre, E.; Lehy, T. Leptin Stimulates the Proliferation of Human Colon Cancer Cells in Vitro but Does Not Promote the Growth of Colon Cancer Xenografts in Nude Mice or Intestinal Tumorigenesis in ApcMin/+ Mice. *Gut* **2005**, *54*, 1136–1145. [[CrossRef](#)]
58. Li, K.; Wei, L.; Huang, Y.; Wu, Y.; Su, M.; Pang, X.; Wang, N.; Ji, F.; Zhong, C.; Chen, T. Leptin Promotes Breast Cancer Cell Migration and Invasion via IL-18 Expression and Secretion. *Int. J. Oncol.* **2016**, *48*, 2479–2487. [[CrossRef](#)]
59. Hoda, M.R.; Theil, G.; Mohammed, N.; Fischer, K.; Fornara, P. The Adipocyte-Derived Hormone Leptin Has Proliferative Actions on Androgen-Resistant Prostate Cancer Cells Linking Obesity to Advanced Stages of Prostate Cancer. *J. Oncol.* **2012**. [[CrossRef](#)]
60. Stattin, P.; Söderberg, S.; Hallmans, G.; Bylund, A.; Kaaks, R.; Stenman, U.H.; Bergh, A.; Olsson, T. Leptin Is Associated with Increased Prostate Cancer Risk: A Nested Case-Referent Study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2001**, *86*, 1341–1345. [[CrossRef](#)]
61. Gupta, A.; Herman, Y.; Ayers, C.; Beg, M.S.; Lakoski, S.G.; Abdullah, S.M.; Johnson, D.H.; Neeland, I.J. Plasma Leptin Levels and Risk of Incident Cancer: Results from the Dallas Heart Study. *PLoS ONE* **2016**, *11*, 1–11. [[CrossRef](#)]
62. Achari, A.E.; Jain, S.K. Adiponectin, a Therapeutic Target for Obesity, Diabetes, and Endothelial Dysfunction. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 1321. [[CrossRef](#)]
63. Parker-Duffen, J.L.; Nakamura, K.; Silver, M.; Zuriaga, M.A.; Maclachlan, S.; Aprahamian, T.R.; Walsh, K. Divergent Roles for Adiponectin Receptor 1 (AdipoR1) and AdipoR2 in Mediating Revascularization and Metabolic Dysfunction in Vivo. *J. Biol. Chem.* **2014**, *289*, 16200–16213. [[CrossRef](#)]
64. Wang, X.; Chen, Q.; Pu, H.; Wei, Q.; Duan, M.; Zhang, C.; Jiang, T.; Shou, X.; Zhang, J.; Yang, Y. Adiponectin Improves NF- $\kappa$ B-Mediated Inflammation and Abates Atherosclerosis Progression in Apolipoprotein E-Deficient Mice. *Lipids Health Dis.* **2016**, *15*, 1–14. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Gao, Q.; Zheng, J.; Yao, X.; Peng, B. Adiponectin Inhibits VEGF-A in Prostate Cancer Cells. *Tumor Biol.* **2015**, *36*, 4287–4292. [[CrossRef](#)]
66. Katira, A.; Tan, P.H. Evolving Role of Adiponectin in Cancer-Controversies and Update. *Cancer Biol. Med.* **2016**, *13*, 101–119. [[CrossRef](#)]
67. Richard, A.J.; Stephens, J.M. The Role of JAK–STAT Signaling in Adipose Tissue Function. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* **2014**, *1842*, 431–439. [[CrossRef](#)]
68. Fujisawa, T.; Endo, H.; Tomimoto, A.; Sugiyama, M.; Takahashi, H.; Saito, S.; Inamori, M.; Nakajima, N.; Watanabe, M.; Kubota, N.; et al. Adiponectin Suppresses Colorectal Carcinogenesis under the High-Fat Diet Condition. *Gut* **2008**, *57*, 1531–1538. [[CrossRef](#)]
69. Zangani, D.; Darcy, K.M.; Shoemaker, S.; Ip, M.M. Adipocyte–Epithelial Interactions Regulate the in Vitro Development of Normal Mammary Epithelial Cells. *Exp. Cell Res.* **1999**, *247*, 399–409. [[CrossRef](#)]
70. Hu, X.; Juneja, S.C.; Maihle, N.J.; Cleary, M.P. Leptin—A Growth Factor in Normal and Malignant Breast Cells and for Normal Mammary Gland Development. *J. Natl. Cancer Inst.* **2002**, *94*, 1704–1711. [[CrossRef](#)]
71. Kim, J.Y.; Van De Wall, E.; Laplante, M.; Azzara, A.; Trujillo, M.E.; Hofmann, S.M.; Schraw, T.; Durand, J.L.; Li, H.; Li, G.; et al. Obesity-Associated Improvements in Metabolic Profile through Expansion of Adipose Tissue. *J. Clin. Invest.* **2007**, *117*, 2621–2637. [[CrossRef](#)]
72. Lourenço, A.R.; Coffey, P.J. A Tumor Suppressor Role for C/EBP $\alpha$  in Solid Tumors: More than Fat and Blood. *Oncogene* **2017**, *36*, 5221–5230. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Saez, E.; Rosenfeld, J.; Livolsi, A.; Olson, P.; Lombardo, E.; Nelson, M.; Banayo, E.; Cardiff, R.D.; Izpisua-Belmonte, J.C.; Evans, R.M. PPAR $\gamma$  Signaling Exacerbates Mammary Gland Tumor Development. *Genes Dev.* **2004**, *18*, 528–540. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Cirillo, D.; Rachiglio, A.M.; La Montagna, R.; Giordano, A.; Normanno, N. Leptin Signaling in Breast Cancer: An Overview. *J. Cell. Biochem.* **2008**, *105*, 956–964. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Soma, D.; Kitayama, J.; Yamashita, H.; Miyato, H.; Ishikawa, M.; Nagawa, H. Leptin Augments Proliferation of Breast Cancer Cells via Transactivation of HER2. *J. Surg. Res.* **2008**, *149*, 9–14. [[CrossRef](#)]
76. Kothari, C.; Diorio, C.; Durocher, F. The Importance of Breast Adipose Tissue in Breast Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 5760. [[CrossRef](#)]
77. Ortega-Molina, A.; Serrano, M. PTEN in Cancer, Metabolism, and Aging. *Trends Endocrinol. Metab.* **2013**, *24*, 184–189. [[CrossRef](#)]
78. Lu, X.X.; Cao, L.Y.; Chen, X.; Xiao, J.; Zou, Y.; Chen, Q. PTEN Inhibits Cell Proliferation, Promotes Cell Apoptosis, and Induces Cell Cycle Arrest via Downregulating the PI3K/AKT/HTERT Pathway in Lung Adenocarcinoma A549 Cells. *Biomed Res. Int.* **2016**, *2016*. [[CrossRef](#)]
79. Vaitkus, J.A.; Celi, F.S. The Role of Adipose Tissue in Cancer-Associated Cachexia. *Exp. Biol. Med.* **2017**, *242*, 473–481. [[CrossRef](#)]
80. Ruiz-Ojeda, F.J.; Méndez-Gutiérrez, A.; Aguilera, C.M.; Plaza-Díaz, J. Extracellular Matrix Remodeling of Adipose Tissue in Obesity and Metabolic Diseases. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 4888. [[CrossRef](#)]

81. Schoettl, T.; Fischer, I.P.; Ussar, S. Heterogeneity of Adipose Tissue in Development and Metabolic Function. *J. Exp. Biol.* **2018**, *121*, jeb162958. [[CrossRef](#)]
82. Walker, C.; Mojares, E.; Del Río Hernández, A. Role of Extracellular Matrix in Development and Cancer Progression. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 103028. [[CrossRef](#)]
83. Occhino, F.; Stehulak, T. Behind the Slow Pace of Wage Growth. *Economic Trends* **2015**, *115*, 8–10.
84. Liu, R.; Nikolajczyk, B.S. Tissue Immune Cells Fuel Obesity-Associated Inflammation in Adipose Tissue and Beyond. *Front. Immunol.* **2019**, *10*, 1587. [[CrossRef](#)]
85. Dinarello, C.A. Overview of the IL-1 Family in Innate Inflammation and Acquired Immunity. *Immunol. Rev.* **2018**, *281*, 8–27. [[CrossRef](#)]
86. Croston, G.E.; Cao, Z.; Goeddel, D.V. NF- $\kappa$ B Activation by Interleukin-1 (IL-1) Requires an IL-1 Receptor- Associated Protein Kinase Activity. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 16514–16517. [[CrossRef](#)]
87. Jung, C.; Gerdes, N.; Fritzenwanger, M.; Figulla, H.R. Circulating Levels of Interleukin-1 Family Cytokines in Overweight Adolescents. *Mediat. Inflamm.* **2010**, *2010*, 1–6. [[CrossRef](#)]
88. Shoda, H.; Nagafuchi, Y.; Tsuchida, Y.; Sakurai, K.; Sumitomo, S.; Fujio, K.; Yamamoto, K. Increased Serum Concentrations of IL-1 Beta, IL-21 and Th17 Cells in Overweight Patients with Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Res. Ther.* **2017**, *19*, 1–9. [[CrossRef](#)]
89. Kim, S.; Keku, T.O.; Martin, C.; Galanko, J.; Woosley, J.T.; Schroeder, J.C.; Satia, J.A.; Halabi, S.; Sandler, R.S. Circulating Levels of Inflammatory Cytokines and Risk of Colorectal Adenomas. *Cancer Res.* **2008**, *68*, 323–328. [[CrossRef](#)]
90. Il'yasova, D.; Colbert, L.H.; Harris, T.B.; Newman, A.B.; Bauer, D.C.; Satterfield, S.; Kritchevsky, S.B. Circulating Levels of Inflammatory Markers and Cancer Risk in the Health Aging and Body Composition Cohort. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **2005**, *14*, 2413–2418. [[CrossRef](#)]
91. Juge-Aubry, C.E.; Somm, E.; Giusti, V.; Pernin, A.; Chicheportiche, R.; Verdumo, C.; Rohner-Jeanrenaud, F.; Burger, D.; Dayer, J.M.; Meier, C.A. Adipose Tissue Is a Major Source of Interleukin-1 Receptor Antagonist: Upregulation in Obesity and Inflammation. *Diabetes* **2003**, *52*, 1104–1110. [[CrossRef](#)]
92. Dudás, J.; Fullár, A.; Bitsche, M.; Schartinger, V.; Kovalszky, I.; Sprinzl, G.M.; Riechelmann, H. Tumor-Produced, Active Interleukin-1  $\beta$  Regulates Gene Expression in Carcinoma-Associated Fibroblasts. *Exp. Cell Res.* **2011**, *317*, 2222–2229. [[CrossRef](#)]
93. Lewis, A.M.; Varghese, S.; Xu, H.; Alexander, H.R. Interleukin-1 and Cancer Progression: The Emerging Role of Interleukin-1 Receptor Antagonist as a Novel Therapeutic Agent in Cancer Treatment. *J. Transl. Med.* **2006**, *4*, 1–12. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
94. Liu, Q.; Russell, M.R.; Shahriari, K.; Jernigan, D.L.; Lioni, M.I.; Garcia, F.U.; Fatatis, A. Interleukin-1 $\beta$  Promotes Skeletal Colonization and Progression of Metastatic Prostate Cancer Cells with Neuroendocrine Features. *Cancer Res.* **2013**, *73*, 3297–3305. [[CrossRef](#)]
95. Diaz, M.; Abdul, M.; Hoosein, N. Modulation of Neuroendocrine Differentiation in Prostate Cancer by Interleukin-1 and -2. *Prostate* **1998**, *36*, 32–36. [[CrossRef](#)]
96. Sainz, R.M.; Mayo, J.C.; Tan, D.X.; León, J.; Manchester, L.; Reiter, R.J. Melatonin Reduces Prostate Cancer Cell Growth Leading to Neuroendocrine Differentiation via a Receptor and PKA Independent Mechanism. *Prostate* **2005**, *63*, 29–43. [[CrossRef](#)]
97. Timper, K.; Denson, J.L.; Steculorum, S.M.; Heilinger, C.; Engström-Ruud, L.; Wunderlich, C.M.; Rose-John, S.; Wunderlich, F.T.; Brüning, J.C. IL-6 Improves Energy and Glucose Homeostasis in Obesity via Enhanced Central IL-6 Trans-Signaling. *Cell Rep.* **2017**, *19*, 267–280. [[CrossRef](#)]
98. Nguyen, D.P.; Li, J.; Tewari, A.K. Inflammation and Prostate Cancer: The Role of Interleukin 6 (IL-6). *BJU Int.* **2014**, *113*, 986–992. [[CrossRef](#)]
99. Okamoto, M.; Lee, C.; Oyasu, R. Interleukin-6 as a Paracrine and Autocrine Growth Factor in Human Prostatic Carcinoma Cells in Vitro. *Cancer Res.* **1997**, *57*, 141–146.
100. Kalliolias, G.D.; Ivashkiv, L.B. TNF Biology, Pathogenic Mechanisms and Emerging Therapeutic Strategies. *Nat. Rev. Rheumatol.* **2016**, *12*, 49–62. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
101. Sedger, L.M.; McDermott, M.F. TNF and TNF-Receptors: From Mediators of Cell Death and Inflammation to Therapeutic Giants—Past, Present and Future. *Cytokine Growth Factor Rev.* **2014**, *25*, 453–472. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
102. Popko, K.; Gorska, E.; Stelmaszczyk-Emmel, A.; Plywaczewski, R.; Stokłosa, A.; Gorecka, D.; Pyrzak, B.; Demkow, U. Proinflammatory Cytokines IL-6 and TNF- $\alpha$  and the Development of Inflammation in Obese Subjects. *Eur. J. Med. Res.* **2010**, *15*, 120. [[CrossRef](#)]
103. Mohamed-Ali, V.; Goodrick, S.; Rawesh, A.; Katz, D.R.; Miles, J.M.; Yudkin, J.S.; Klein, S.; Coppel, S.W. Subcutaneous Adipose Tissue Releases Interleukin-6, but Not Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ , in Vivo. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **1997**, *82*, 4196–4200. [[CrossRef](#)]
104. Tse, B.W.C.; Scott, K.F.; Russell, P.J. Paradoxical Roles of Tumour Necrosis Factor-Alpha in Prostate Cancer Biology. *Prostate Cancer* **2012**, *2012*, 1–8. [[CrossRef](#)]
105. Maolake, A.; Izumi, K.; Natsagdorj, A.; Iwamoto, H.; Kadomoto, S.; Makino, T.; Naito, R.; Shigehara, K.; Kadono, Y.; Hiratsuka, K.; et al. Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Induces Prostate Cancer Cell Migration in Lymphatic Metastasis through CCR7 Upregulation. *Cancer Sci.* **2018**, *109*, 1524–1531. [[CrossRef](#)]
106. Chopra, D.P.; Menard, R.E.; Januszewski, J.; Mattingly, R.R. TNF- $\alpha$ -Mediated Apoptosis in Normal Human Prostate Epithelial Cells and Tumor Cell Lines. *Cancer Lett.* **2004**, *203*, 145–154. [[CrossRef](#)]
107. Villarroya, F.; Gavalda-Navarro, A.; Peyrou, M.; Villarroya, J.; Giralt, M. The Lives and Times of Brown Adipokines. *Trends Endocrinol. Metab.* **2017**, *28*, 855–867. [[CrossRef](#)]

108. Wang, G.X.; Zhao, X.Y.; Lin, J.D. The Brown Fat Secretome: Metabolic Functions beyond Thermogenesis. *Trends Endocrinol. Metab.* **2015**, *26*, 231–237. [[CrossRef](#)]
109. Gunawardana, S.C. Therapeutic Value of Brown Adipose Tissue. *Adipocyte* **2012**, *1*, 250–255. [[CrossRef](#)]
110. Wang, G.X.; Zhao, X.Y.; Meng, Z.X.; Kern, M.; Dietrich, A.; Chen, Z.; Cozacov, Z.; Zhou, D.; Okunade, A.L.; Su, X.; et al. The Brown Fat-Enriched Secreted Factor Nrg4 Preserves Metabolic Homeostasis through Attenuation of Hepatic Lipogenesis. *Nat. Med.* **2014**, *20*, 1436–1443. [[CrossRef](#)]
111. Hondares, E.; Iglesias, R.; Giralt, A.; Gonzalez, F.J.; Giralt, M.; Mampel, T.; Villarroya, F. Thermogenic Activation Induces FGF21 Expression and Release in Brown Adipose Tissue. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 12983–12990. [[CrossRef](#)]
112. Sun, K.; Kusminski, C.M.; Luby-Phelps, K.; Spurgin, S.B.; An, Y.A.; Wang, Q.A.; Holland, W.L.; Scherer, P.E. Brown Adipose Tissue Derived VEGF-A Modulates Cold Tolerance and Energy Expenditure. *Mol. Metab.* **2014**, *3*, 474–483. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
113. Tseng, Y.H.; Kokkotou, E.; Schulz, T.J.; Huang, T.L.; Winnay, J.N.; Taniguchi, C.M.; Tran, T.T.; Suzuki, R.; Espinoza, D.O.; Yamamoto, Y.; et al. New Role of Bone Morphogenetic Protein 7 in Brown Adipogenesis and Energy Expenditure. *Nature* **2008**, *454*, 1000–1004. [[CrossRef](#)]
114. Stefanini, M.O.; Wu, F.T.H.; Mac Gabhann, F.; Popel, A.S. A Compartment Model of VEGF Distribution in Blood, Healthy and Diseased Tissues. *BMC Syst. Biol.* **2008**, *2*, 1–25. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
115. Elias, I.; Franckhauser, S.; Ferré, T.; Vilà, L.; Tafuro, S.; Muñoz, S.; Roca, C.; Ramos, D.; Pujol, A.; Riu, E.; et al. Adipose Tissue Overexpression of Vascular Endothelial Growth Factor Protects against Diet-Induced Obesity and Insulin Resistance. *Diabetes* **2012**, *61*, 1801–1813. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
116. Aase, K.; Lymboussaki, A.; Kaipainen, A.; Olofsson, B.; Alitalo, K.; Eriksson, U. Localization of VEGF-B in the Mouse Embryo Suggests a Paracrine Role of the Growth Factor in the Developing Vasculature. *Dev. Dyn.* **1999**, *215*, 12–25. [[CrossRef](#)]
117. Park, J.; Kim, M.; Sun, K.; An, Y.A.; Gu, X.; Scherer, P.E. VEGF-A—Expressing Adipose Tissue Shows Rapid Beiging and Enhanced Survival after Transplantation and Confers IL-4-Independent Metabolic Improvements. *Diabetes* **2017**, *66*, 1479–1490. [[CrossRef](#)]
118. Chekhonin, V.P.; Shein, S.A.; Korchagina, A.A.; Gurina, O.I. VEGF in Tumor Progression and Targeted Therapy. *Curr. Cancer Drug Targets* **2013**, *13*, 423–443. [[CrossRef](#)]
119. Carmeliet, P. VEGF as a Key Mediator of Angiogenesis in Cancer. *Oncology* **2005**, *69*, 4–10. [[CrossRef](#)]
120. Carreira, A.C.; Alves, G.G.; Zambuzzi, W.F.; Sogayar, M.C.; Granjeiro, J.M. Bone Morphogenetic Proteins: Structure, Biological Function and Therapeutic Applications. *Arch. Biochem. Biophys.* **2014**, *561*, 64–73. [[CrossRef](#)]
121. Schulz, T.J.; Tseng, Y.H. Emerging Role of Bone Morphogenetic Proteins in Adipogenesis and Energy Metabolism. *Cytokine Growth Factor Rev.* **2009**, *20*, 523–531. [[CrossRef](#)]
122. Kobayashi, A.; Okuda, H.; Xing, F.; Pandey, P.R.; Watabe, M.; Hirota, S.; Pai, S.K.; Liu, W.; Fukuda, K.; Chambers, C.; et al. Bone Morphogenetic Protein 7 in Dormancy and Metastasis of Prostate Cancer Stem-like Cells in Bone. *J. Exp. Med.* **2011**, *208*, 2641–2655. [[CrossRef](#)]
123. Buijs, J.T.; Rentsch, C.A.; Van Der Horst, G.; Van Overveld, P.G.M.; Wetterwald, A.; Schwaninger, R.; Henriquez, N.V.; Ten Dijke, P.; Borovecki, F.; Markwalder, R.; et al. BMP7, a Putative Regulator of Epithelial Homeostasis in the Human Prostate, Is a Potent Inhibitor of Prostate Cancer Bone Metastasis in Vivo. *Am. J. Pathol.* **2007**, *171*, 1047–1057. [[CrossRef](#)]
124. Thomas, R.; Anderson, W.A.; Raman, V.; Reddi, A.H. Androgen-Dependent Gene Expression of Bone Morphogenetic Protein 7 in Mouse Prostate. *Prostate* **1998**, *37*, 236–245. [[CrossRef](#)]
125. Fournier, P.G.J.; Guise, T.A. BMP7: A New Bone Metastases Prevention? *Am. J. Pathol.* **2007**, *171*, 739–743. [[CrossRef](#)]
126. Mailloux, R.J.; Harper, M.E. Uncoupling Proteins and the Control of Mitochondrial Reactive Oxygen Species Production. *Free Radic. Biol. Med.* **2011**, *51*, 1106–1115. [[CrossRef](#)]
127. Ali Khan, A.; Hansson, J.; Weber, P.; Foehr, S.; Krijgsveld, J.; Herzig, S.; Scheideler, M. Comparative Secretome Analyses of Primary Murine White and Brown Adipocytes Reveal Novel Adipokines. *Mol. Cell. Proteom.* **2018**, *17*, 2358–2370. [[CrossRef](#)]
128. Valle, I.; Álvarez-Barrientos, A.; Arza, E.; Lamas, S.; Monsalve, M. PGC-1 $\alpha$  Regulates the Mitochondrial Antioxidant Defense System in Vascular Endothelial Cells. *Cardiovasc. Res.* **2005**, *66*, 562–573. [[CrossRef](#)]
129. Oelkrug, R.; Goetze, N.; Meyer, C.W.; Jastroch, M. Antioxidant Properties of UCP1 Are Evolutionarily Conserved in Mammals and Buffer Mitochondrial Reactive Oxygen Species. *Free Radic. Biol. Med.* **2014**, *77*, 210–216. [[CrossRef](#)]
130. Echtay, K.S.; Roussel, D.; St-Pierre, J.; Jekabsons, M.B.; Cadenas, S.; Stuart, J.A.; Harper, J.A.; Roebuck, S.J.; Morrison, A.; Pickering, S.; et al. Superoxide Activates Mitochondrial Uncoupling Proteins. *Nature* **2002**, *415*, 96–99. [[CrossRef](#)]
131. Hondares, E.; Rosell, M.; Díaz-Delfín, J.; Olmos, Y.; Monsalve, M.; Iglesias, R.; Villarroya, F.; Giralt, M. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\alpha$  (PPAR $\alpha$ ) Induces PPAR $\gamma$  Coactivator 1 $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ ) Gene Expression and Contributes to Thermogenic Activation of Brown Fat: Involvement of PRDM16. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 43112–43122. [[CrossRef](#)]
132. Koen, E.J.; Collier, A.B. Particle-in-Cell Simulations of a Beam Driven Plasma. *Phys. Plasmas* **2010**, *19*, 1420–1428.
133. Micalizzi, D.S.; Ford, H.L. Epithelial-Mesenchymal Transition in Development and Cancer. *Future Oncol.* **2009**, *5*, 1129–1143. [[CrossRef](#)]
134. Lu, W.; Kang, Y. Epithelial-Mesenchymal Plasticity in Cancer Progression and Metastasis. *Dev. Cell* **2019**, *49*, 361–374. [[CrossRef](#)]
135. Loh, C.Y.; Chai, J.Y.; Tang, T.F.; Wong, W.F.; Sethi, G.; Shanmugam, M.K.; Chong, P.P.; Looi, C.Y. The E-Cadherin and N-Cadherin Switch in Epithelial-to-Mesenchymal Transition: Signaling, Therapeutic Implications, and Challenges. *Cells* **2019**, *8*, 1118. [[CrossRef](#)]

136. Tsubakihara, Y.; Moustakas, A. Epithelial-Mesenchymal Transition and Metastasis under the Control of Transforming Growth Factor  $\beta$ . *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 3672. [[CrossRef](#)]
137. Dalamaga, M.; Diakopoulos, K.N.; Mantzoros, C.S. The Role of Adiponectin in Cancer: A Review of Current Evidence. *Endocr. Rev.* **2012**, *33*, 547–594. [[CrossRef](#)]
138. Miyoshi, Y.; Funahashi, T.; Kihara, S.; Taguchi, T.; Tamaki, Y.; Matsuzawa, Y.; Noguchi, S. Association of Serum Adiponectin Levels with Breast Cancer Risk. *Clin. Cancer Res.* **2003**, *9*, 5699–5704.
139. Macis, D.; Gandini, S.; Guerrieri-Gonzaga, A.; Johansson, H.; Magni, P.; Ruscica, M.; Lazzeroni, M.; Serrano, D.; Cazzaniga, M.; Mora, S.; et al. Prognostic Effect of Circulating Adiponectin in a Randomized 2 × 2 Trial of Low-Dose Tamoxifen and Fenretinide in Premenopausal Women at Risk for Breast Cancer. *J. Clin. Oncol.* **2012**, *30*, 151–157. [[CrossRef](#)]
140. Chang, M.C.; Chang, Y.T.; Su, T.C.; Yang, W.S.; Chen, C.L.; Tien, Y.W.; Liang, P.C.; Wei, S.C.; Wong, J.M. Adiponectin as a Potential Differential Marker to Distinguish Pancreatic Cancer and Chronic Pancreatitis. *Pancreas* **2007**, *35*, 16–21. [[CrossRef](#)]
141. Stolzenberg-Solomon, R.Z.; Weinstein, S.; Pollak, M.; Tao, Y.; Taylor, P.R.; Virtamo, J.; Albanes, D. Prediagnostic Adiponectin Concentrations and Pancreatic Cancer Risk in Male Smokers. *Am. J. Epidemiol.* **2008**, *168*, 1047–1055. [[CrossRef](#)]
142. Arano, T.; Nakagawa, H.; Tateishi, R.; Ikeda, H.; Uchino, K.; Enooku, K.; Goto, E.; Masuzaki, R.; Asaoka, Y.; Kondo, Y.; et al. Serum Level of Adiponectin and the Risk of Liver Cancer Development in Chronic Hepatitis C Patients. *Int. J. Cancer* **2011**, *129*, 2226–2235. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
143. Michalakis, K.; Williams, C.J.; Mitsiades, N.; Blakeman, J.; Balafouta-Tselenis, S.; Giannopoulos, A.; Mantzoros, C.S. Serum Adiponectin Concentrations and Tissue Expression of Adiponectin Receptors Are Reduced in Patients with Prostate Cancer: A Case Control Study. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* **2007**, *16*, 308–313. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
144. Li, H.; Stampfer, M.J.; Mucci, L.; Rifai, N.; Qiu, W.; Kurth, T.; Ma, J. A 25-Year Prospective Study of Plasma Adiponectin and Leptin Concentrations and Prostate Cancer Risk and Survival. *Clin. Chem.* **2010**, *56*, 34–43. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
145. Petridou, E.T.; Mitsiades, N.; Gialamas, S.; Angelopoulos, M.; Skalkidou, A.; Dessypris, N.; Hsi, A.; Lazaris, N.; Polyzos, A.; Syrigos, C.; et al. Circulating Adiponectin Levels and Expression of Adiponectin Receptors in Relation to Lung Cancer: Two Case-Control Studies. *Oncology* **2008**, *73*, 261–269. [[CrossRef](#)]
146. Mantzoros, C.S.; Trakatelli, M.; Gogas, H.; Dessypris, N.; Stratigos, A.; Chrousos, G.P.; Petridou, E.T. Circulating Adiponectin Levels in Relation to Melanoma: A Case-Control Study. *Eur. J. Cancer* **2007**, *43*, 1430–1436. [[CrossRef](#)]
147. Park, Y.; Kim, J.W.; Kim, D.S.; Kim, E.B.; Park, S.J.; Park, J.Y.; Choi, W.S.; Song, J.G.; Seo, H.Y.; Oh, S.C.; et al. The Bone Morphogenesis Protein-2 (BMP-2) Is Associated with Progression to Metastatic Disease in Gastric Cancer. *Cancer Res. Treat.* **2008**, *40*, 127. [[CrossRef](#)]
148. Riehn, M.; Klopocki, E.; Molkentin, M.; Reinhardt, R.; Burmeister, T. A BACH2-BCL2L1 Fusion Gene Resulting from a Lymphoma Cell Line BLUE-1. *Cancer* **2011**, *396*, 389–396.
149. Buijs, J.T.; Henriquez, N.V.; Van Overveld, P.G.M.; Van Der Horst, G.; Que, I.; Schwaninger, R.; Rentsch, C.; Ten Dijke, P.; Cleton-Jansen, A.M.; Driouch, K.; et al. Bone Morphogenetic Protein 7 in the Development and Treatment of Bone Metastases from Breast Cancer. *Cancer Res.* **2007**, *67*, 8742–8751. [[CrossRef](#)]
150. Virtanen, S.; Alarmo, E.L.; Sandström, S.; Ampuja, M.; Kallioniemi, A. Bone Morphogenetic Protein -4 and -5 in Pancreatic Cancer—Novel Bidirectional Players. *Exp. Cell Res.* **2011**, *317*, 2136–2146. [[CrossRef](#)]
151. Wu, G.; Huang, F.; Chen, Y.; Zhuang, Y.; Huang, Y.; Xie, Y. High Levels of BMP2 Promote Liver Cancer Growth via the Activation of Myeloid-Derived Suppressor Cells. *Front. Oncol.* **2020**, *10*, 1–14. [[CrossRef](#)]
152. Španjol, J.; Djordjević, G.; Markić, D.; Klarić, M.; Fučkar, D.; Bobinac, D. Role of Bone Morphogenetic Proteins in Human Prostate Cancer Pathogenesis and Development of Bone Metastases: Immunohistochemical Study. *Coll. Antropol.* **2010**, *34*, 119–125.
153. Bieniasz, M.; Oszażca, K.; Eusebio, M.; Kordiak, J.; Bartkowiak, J.; Szemraj, J. The Positive Correlation between Gene Expression of the Two Angiogenic Factors: VEGF and BMP-2 in Lung Cancer Patients. *Lung Cancer* **2009**, *66*, 319–326. [[CrossRef](#)]
154. Chen, J.; Ye, L.; Xie, F.; Yang, Y.; Zhang, L.; Jiang, W.G. Expression of Bone Morphogenetic Protein 7 in Lung Cancer and Its Biological Impact on Lung Cancer Cells. *Anticancer Res.* **2010**, *30*, 1113–1120.
155. Rothhammer, T.; Poser, I.; Soncin, F.; Bataille, F.; Moser, M.; Bosserhoff, A.K. Bone Morphogenetic Proteins Are Overexpressed in Malignant Melanoma and Promote Cell Invasion and Migration. *Cancer Res.* **2005**, *65*, 448–456.
156. Lin, K.; Zou, R.; Lin, F.; Zheng, S.; Shen, X.; Xue, X. Expression and Effect of CXCL14 in Colorectal Carcinoma. *Mol. Med. Rep.* **2014**, *10*, 1561–1568. [[CrossRef](#)]
157. Gu, X.L.; Ou, Z.L.; Lin, F.J.; Yang, X.L.; Luo, J.M.; Shen, Z.Z.; Shao, Z.M. Expression of CXCL14 and Its Anticancer Role in Breast Cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* **2012**, *135*, 725–735. [[CrossRef](#)]
158. Westrich, J.A.; Vermeer, D.W.; Colbert, P.L.; Spanos, W.C.; Pyeon, D. The Multifarious Roles of the Chemokine CXCL14 in Cancer Progression and Immune Responses. *Mol. Carcinog.* **2020**, *59*, 794–806. [[CrossRef](#)]
159. Wenthe, M.N.; Mayer, C.; Gaida, M.M.; Michalski, C.W.; Giese, T.; Bergmann, F.; Giese, N.A.; Büchler, M.W.; Friess, H. CXCL14 Expression and Potential Function in Pancreatic Cancer. *Cancer Lett.* **2008**, *259*, 209–217. [[CrossRef](#)]
160. Wang, W.; Huang, P.; Zhang, L.; Wei, J.; Xie, Q.; Sun, Q.; Zhou, X.; Xie, H.; Zhou, L.; Zheng, S. Antitumor Efficacy of C-X-C Motif Chemokine Ligand 14 in Hepatocellular Carcinoma in Vitro and in Vivo. *Cancer Sci.* **2013**, *104*, 1523–1531. [[CrossRef](#)]
161. Augsten, M.; Hägglöf, C.; Olsson, E.; Stolz, C.; Tsagozis, P.; Levchenko, T.; Frederick, M.J.; Borg, Å.; Micke, P.; Egevad, L.; et al. CXCL14 Is an Autocrine Growth Factor for Fibroblasts and Acts as a Multi-Modal Stimulator of Prostate Tumor Growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 3414–3419. [[CrossRef](#)]

162. Tessema, M.; Klinge, D.M.; Yingling, C.M.; Do, K.; Van Neste, L.; Belinsky, S.A. Re-Expression of CXCL14, a Common Target for Epigenetic Silencing in Lung Cancer, Induces Tumor Necrosis. *Oncogene* **2010**, *29*, 5159–5170. [[CrossRef](#)]
163. Hata, R.I.; Izukuri, K.; Kato, Y.; Sasaki, S.; Mukaida, N.; Maehata, Y.; Miyamoto, C.; Akasaka, T.; Yang, X.; Nagashima, Y.; et al. Suppressed Rate of Carcinogenesis and Decreases in Tumour Volume and Lung Metastasis in CXCL14/BRAK Transgenic Mice. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 1–10. [[CrossRef](#)]
164. Karunanithi, S.; Levi, L.; DeVecchio, J.; Karagkounis, G.; Reizes, O.; Lathia, J.D.; Kalady, M.F.; Noy, N. RBP4-STRA6 Pathway Drives Cancer Stem Cell Maintenance and Mediates High-Fat Diet-Induced Colon Carcinogenesis. *Stem. Cell Rep.* **2017**, *9*, 438–450. [[CrossRef](#)]
165. Abola, M.V.; Thompson, C.L.; Chen, Z.; Chak, A.; Berger, N.A.; Kirwan, J.P.; Li, L. Serum Levels of Retinol-Binding Protein 4 and Risk of Colon Adenoma. *Endocr. Relat. Cancer* **2015**, *22*, L1–L4. [[CrossRef](#)]
166. Jiao, C.; Cui, L.; Ma, A.; Li, N.; Si, H. Elevated Serum Levels of Retinol-Binding Protein 4 Are Associated with Breast Cancer Risk: A Case-Control Study. *PLoS ONE* **2016**, *11*, 1–12. [[CrossRef](#)]
167. El-Mesallamy, H.O.; Hamdy, N.M.; Zaghoul, A.S.; Sallam, A.M. Serum Retinol Binding Protein-4 and Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin Are Interrelated in Pancreatic Cancer Patients. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **2012**, *72*, 602–607. [[CrossRef](#)]
168. Wang, D.D.; Zhao, Y.M.; Wang, L.; Ren, G.; Wang, F.; Xia, Z.G.; Wang, X.L.; Zhang, T.; Pan, Q.; Dai, Z.; et al. Preoperative Serum Retinol-Binding Protein 4 Is Associated with the Prognosis of Patients with Hepatocellular Carcinoma after Curative Resection. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **2011**, *137*, 651–658. [[CrossRef](#)]
169. Uehara, H.; Takahashi, T.; Izumi, K. Induction of Retinol-Binding Protein 4 and Placenta-Specific 8 Expression in Human Prostate Cancer Cells Remaining in Bone Following Osteolytic Tumor Growth Inhibition by Osteoprotegerin. *Int. J. Oncol.* **2013**, *43*, 365–374. [[CrossRef](#)]
170. Hu, X.; Huang, W.; Wang, F.; Dai, Y.; Hu, X.; Yue, D.; Wang, S. Serum Levels of Retinol-Binding Protein 4 and the Risk of Non-Small Cell Lung Cancer: A Case-Control Study. *Medicine* **2020**, *99*, e21254. [[CrossRef](#)]
171. Florea, A.; Harris, R.B.; Klimentidis, Y.C.; Kohler, L.N.; Jurutka, P.W.; Jacobs, E.T. Circulating Fibroblast Growth Factor-21 and Risk of Metachronous Colorectal Adenoma. *J. Gastrointest. Cancer* **2020**, 173. [[CrossRef](#)]
172. Qian, J.; Tikk, K.; Weigl, K.; Balavarca, Y.; Brenner, H. Fibroblast Growth Factor 21 as a Circulating Biomarker at Various Stages of Colorectal Carcinogenesis. *Br. J. Cancer* **2018**, *119*, 1374–1382. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
173. Akyol, M.; Alacacioglu, A.; Demir, L.; Kucukzeybek, Y.; Yildiz, Y.; Gumus, Z.; Kara, M.; Salman, T.; Varol, U.; Taskaynatan, H.; et al. The Alterations of Serum FGF-21 Levels, Metabolic and Body Composition in Early Breast Cancer Patients Receiving Adjuvant Endocrine Therapy. *Cancer Biomark.* **2017**, *18*, 441–449. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
174. Luo, Y.; Yang, Y.; Liu, M.; Wang, D.; Wang, F.; Bi, Y.; Ji, J.; Li, S.; Liu, Y.; Chen, R.; et al. Oncogenic KRAS Reduces Expression of FGF21 in Acinar Cells to Promote Pancreatic Tumorigenesis in Mice on a High-Fat Diet. *Gastroenterology* **2019**, *157*, 1413–1428.e11. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
175. Lu, W.; Li, X.; Luo, Y. FGF21 in Obesity and Cancer: New Insights. *Cancer Lett.* **2021**, *499*, 5–13. [[CrossRef](#)]
176. Singhal, G.; Kumar, G.; Chan, S.; Fisher, F.M.; Ma, Y.; Vardeh, H.G.; Nasser, I.A.; Flier, J.S.; Maratos-Flier, E. Deficiency of Fibroblast Growth Factor 21 (FGF21) Promotes Hepatocellular Carcinoma (HCC) in Mice on a Long Term Obesogenic Diet. *Mol. Metab.* **2018**, *13*, 56–66. [[CrossRef](#)]
177. Dai, H.; Hu, W.; Zhang, L.; Jiang, F.; Mao, X.; Yang, G.; Li, L. FGF21 Facilitates Autophagy in Prostate Cancer Cells by Inhibiting the PI3K–Akt–MTOR Signaling Pathway. *Cell Death Dis.* **2021**, *12*, 1–12. [[CrossRef](#)]
178. Yu, X.; Li, Y.; Jiang, G.; Fang, J.; You, Z.; Shao, G.; Zhang, Z.; Jiao, A.; Peng, X. FGF21 Promotes Non-Small Cell Lung Cancer Progression by SIRT1/PI3K/AKT Signaling. *Life Sci.* **2021**, *269*, 118875. [[CrossRef](#)]
179. Vocka, M.; Langer, D.; Fryba, V.; Petrtyl, J.; Hanus, T.; Kalousova, M.; Zima, T.; Petruzalka, L. Novel Serum Markers HSP60, CHI3L1, and IGFBP-2 in Metastatic Colorectal Cancer. *Oncol. Lett.* **2019**, *18*, 6284–6292. [[CrossRef](#)]
180. Pickard, A.; McCance, D.J. IGF-Binding Protein 2—Oncogene or Tumor Suppressor? *Front. Endocrinol.* **2015**, *6*, 1–8. [[CrossRef](#)]
181. Busund, L.T.R.; Richardsen, E.; Busund, R.; Ukkonen, T.; Bjørnsen, T.; Busch, C.; Stalsberg, H. Significant Expression of IGFBP2 in Breast Cancer Compared with Benign Lesions. *J. Clin. Pathol.* **2005**, *58*, 361–366. [[CrossRef](#)]
182. Frommer, K.W.; Reichenmiller, K.; Schutt, B.S.; Hoeflich, A.; Ranke, M.B.; Dodt, G.; Elmlinger, M.W. IGF-Independent Effects of IGFBP-2 on the Human Breast Cancer Cell Line Hs578T. *J. Mol. Endocrinol.* **2006**, *37*, 13–23. [[CrossRef](#)]
183. Liu, H.; Li, L.; Chen, H.; Kong, R.; Pan, S.; Hu, J.; Wang, Y.; Li, Y.; Sun, B. Silencing IGFBP-2 Decreases Pancreatic Cancer Metastasis and Enhances Chemotherapeutic Sensitivity. *Oncotarget* **2017**, *8*, 61674–61686. [[CrossRef](#)]
184. Ma, Y.; Cui, D.; Zhang, Y.; Han, C.C.; Wei, W. Insulin-like Growth Factor Binding Protein-2 Promotes Proliferation and Predicts Poor Prognosis in Hepatocellular Carcinoma. *Onco. Targets. Ther.* **2020**, *13*, 5083–5092. [[CrossRef](#)]
185. Cohen, P.; Peehl, D.M.; Stamey, T.A.; Wilson, K.F.; Clemmons, D.R.; Rosenfeld, R.G. Elevated Levels of Insulin-like Growth Factor-Binding Protein-2 in the Serum of Prostate Cancer Patients. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **1993**, *76*, 1031–1035.
186. Monti, S.; Di Silverio, F.; Lanzara, S.; Varasano, P.; Martini, C.; Tosti-Croce, C.; Sciarra, F. Insulin-like Growth Factor-I and -II in Human Benign Prostatic Hyperplasia: Relationship with Binding Proteins 2 and 3 and Androgens. *Steroids* **1998**, *63*, 362–366. [[CrossRef](#)]
187. Yazawa, T.; Sato, H.; Shimoyamada, H.; Okudela, K.; Woo, T.; Tajiri, M.; Ogura, T.; Ogawa, N.; Suzuki, T.; Mitsui, H.; et al. Neuroendocrine Cancer-Specific up-Regulating Mechanism of Insulin-like Growth Factor Binding Protein-2 in Small Cell Lung Cancer. *Am. J. Pathol.* **2009**, *175*, 976–987. [[CrossRef](#)]

188. Guo, C.; Lu, H.; Gao, W.; Wang, L.; Lu, K.; Wu, S.; Pataer, A.; Huang, M.; El-Zein, R.; Lin, T.; et al. Insulin-Like Growth Factor Binding Protein-2 Level Is Increased in Blood of Lung Cancer Patients and Associated with Poor Survival. *PLoS ONE* **2013**, *8*, 1–8. [[CrossRef](#)]
189. Wang, H.; Shen, S.S.; Wang, H.; Diwan, A.H.; Zhang, W.; Fuller, G.N.; Prieto, V.G. Expression of Insulin-like Growth Factor-Binding Protein 2 in Melanocytic Lesions. *J. Cutan. Pathol.* **2003**, *30*, 599–605. [[CrossRef](#)]
190. Giovannucci, E. Insulin, Insulin-like Growth Factors and Colon Cancer: A Review of the Evidence. *J. Nutr.* **2001**, *131*, 3109S–3120S. [[CrossRef](#)]
191. Murphy, N.; Knuppel, A.; Papadimitriou, N.; Martin, R.M.; Tsilidis, K.K.; Smith-Byrne, K.; Fensom, G.; Perez-Cornago, A.; Travis, R.C.; Key, T.J.; et al. Insulin-like Growth Factor-1, Insulin-like Growth Factor-Binding Protein-3, and Breast Cancer Risk: Observational and Mendelian Randomization Analyses with ~430 000 Women. *Ann. Oncol.* **2020**, *31*, 641–649. [[CrossRef](#)]
192. Mutgan, A.C.; Besikcioglu, H.E.; Wang, S.; Friess, H.; Ceyhan, G.O.; Demir, I.E. Insulin/IGF-Driven Cancer Cell-Stroma Crosstalk as a Novel Therapeutic Target in Pancreatic Cancer. *Mol. Cancer* **2018**, *17*, 1–11. [[CrossRef](#)]
193. Stuver, S.O.; Kuper, H.; Tzonou, A.; Lagiou, P.; Spanos, E.; Hsieh, C.C.; Mantzoros, C.; Trichopoulos, D. Insulin-like Growth Factor 1 in Hepatocellular Carcinoma and Metastatic Liver Cancer in Men. *Int. J. Cancer* **2000**, *87*, 118–121. [[CrossRef](#)]
194. Shi, R.; Berkel, H.J.; Yu, H. Insulin-like Growth Factor-I and Prostate Cancer: A Meta-Analysis. *Br. J. Cancer* **2001**, *85*, 991–996. [[CrossRef](#)]
195. Velcheti, V.; Govindan, R. Insulin-like Growth Factor and Lung Cancer. *J. Thorac. Oncol.* **2006**, *1*, 607–610.
196. Nurwidya, F.; Andarini, S.; Takahashi, F.; Syahrudin, E.; Takahashi, K. Implications of Insulin-like Growth Factor 1 Receptor Activation in Lung Cancer. *Malays. J. Med. Sci.* **2016**, *23*, 9–21.
197. Kucera, R.; Treskova, I.; Vrzalova, J.; Svobodova, S.; Topolcan, O.; Fuchsova, R.; Rousarova, M.; Treska, V.; Kydlicek, T. Evaluation of IGF1 Serum Levels in Malignant Melanoma and Healthy Subjects. *Anticancer Res.* **2014**, *34*, 5217–5220.
198. Li, C.; Wang, J.; Kong, J.; Tang, J.; Wu, Y.; Xu, E.; Zhang, H.; Lai, M. GDF15 Promotes EMT and Metastasis in Colorectal Cancer. *Oncotarget* **2016**, *7*, 860–872. [[CrossRef](#)]
199. Spanopoulou, A.; Gkretsi, V. Growth Differentiation Factor 15 (GDF15) in Cancer Cell Metastasis: From the Cells to the Patients. *Clin. Exp. Metastasis* **2020**, *37*, 451–464. [[CrossRef](#)]
200. Gkretsi, V.; Louca, M.; Stylianou, A.; Minadakis, G.; Spyrou, G.M.; Stylianopoulos, T. Inhibition of Breast Cancer Cell Invasion by Ras Suppressor-1 (RSU-1) Silencing Is Reversed by Growth Differentiation Factor-15 (GDF-15). *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 163. [[CrossRef](#)]
201. Zhao, Z.; Zhang, J.; Yin, L.; Yang, J.; Zheng, Y.; Zhang, M.; Ni, B.; Wang, H. Upregulated GDF-15 Expression Facilitates Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Progression through Orphan Receptor GFRAL. *Aging* **2020**, *12*, 22564–22577. [[CrossRef](#)]
202. Liu, X.; Chi, X.; Gong, Q.; Gao, L.; Niu, Y.; Chi, X.; Cheng, M.; Si, Y.; Wang, M.; Zhong, J.; et al. Association of Serum Level of Growth Differentiation Factor 15 with Liver Cirrhosis and Hepatocellular Carcinoma. *PLoS ONE* **2015**, *10*, 1–13. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
203. Duan, L.; Pang, H.L.; Chen, W.J.; Shen, W.W.; Cao, P.P.; Wang, S.M.; Liu, L.L.; Zhang, H.L. The Role of GDF15 in Bone Metastasis of Lung Adenocarcinoma Cells. *Oncol. Rep.* **2019**, *41*, 2379–2388. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
204. Suesskind, D.; Schatz, A.; Schnichels, S.; Coupland, S.E.; Lake, S.L.; Wissinger, B.; Bartz-Schmidt, K.U.; Henke-Fahle, S. GDF-15: A Novel Serum Marker for Metastases in Uveal Melanoma Patients. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* **2012**, *250*, 887–895. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
205. Broll, R.; Erdmann, H.; Duchrow, M.; Oevermann, E.; Schwandner, O.; Markert, U.; Bruch, H.P.; Windhövel, U. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)—A Valuable Serum Tumour Marker in Patients with Colorectal Cancer? *Eur. J. Surg. Oncol.* **2001**, *27*, 37–42. [[CrossRef](#)]
206. George, M.L.; Tutton, M.G.; Janssen, F.; Arnaoutz, A.; Abulafi, A.M.; Eccles, S.A.; Swift, R.I. VEGF-A, VEGF-C, and VEGF-D in Colorectal Cancer Progression. *Neoplasia* **2001**, *3*, 420–427. [[CrossRef](#)]
207. Salven, P.; Perhoniemi, V.; Tykkä, H.; Mäenpää, H.; Joensuu, H. Serum VEGF Levels in Women with a Benign Breast Tumor or Breast Cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* **1999**, *53*, 161–166. [[CrossRef](#)]
208. Liu, Y.; Tamimi, R.M.; Collins, L.C.; Schnitt, S.J.; Gilmore, H.L.; Connolly, J.L.; Colditz, G.A. The Association between Vascular Endothelial Growth Factor Expression in Invasive Breast Cancer and Survival Varies with Intrinsic Subtypes and Use of Adjuvant Systemic Therapy: Results from the Nurses' Health Study. *Breast Cancer Res. Treat.* **2009**, *129*, 175–184. [[CrossRef](#)]
209. Costache, M.I.; Ioana, M.; Iordache, S.; Ene, D.; Costache, C.A.; Săftoiu, A. VEGF Expression in Pancreatic Cancer and Other Malignancies: A Review of the Literature. *Rom. J. Intern. Med.* **2015**, *53*, 199–208. [[CrossRef](#)]
210. Mukozu, T.; Nagai, H.; Matsui, D.; Kanekawa, T.; Sumino, Y. Serum VEGF as a Tumor Marker in Patients with HCV-Related Liver Cirrhosis and Hepatocellular Carcinoma. *Anticancer Res.* **2013**, *33*, 1013–1022. [[CrossRef](#)]
211. Botelho, F.; Pina, F.; Lunet, N. VEGF and Prostatic Cancer: A Systematic Review. *Eur. J. Cancer Prev.* **2010**, *19*, 385–392. [[CrossRef](#)]
212. Frezzetti, D.; Gallo, M.; Maiello, M.R.; D'Alessio, A.; Esposito, C.; Chicchinelli, N.; Normanno, N.; De Luca, A. VEGF as a Potential Target in Lung Cancer. *Expert Opin. Ther. Targets* **2017**, *21*, 959–966. [[CrossRef](#)]
213. Redondo, P.; Bandrés, E.; Solano, T.; Okroujnov, I.; García-Foncillas, J. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Melanoma. N-Acetylcysteine Downregulates VEGF Production in Vitro. *Cytokine* **2000**, *12*, 374–378. [[CrossRef](#)]
214. Bernard, J.K.; McCann, S.P.; Bhardwaj, V.; Washington, M.K.; Frey, M.R. Neuregulin-4 Is a Survival Factor for Colon Epithelial Cells Both in Culture and in Vivo. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 39850–39858. [[CrossRef](#)]

215. Dunn, M.; Sinha, P.; Campbell, R.; Blackburn, E.; Levinson, N.; Rampaul, R.; Bates, T.; Humphreys, S.; Gullick, W.J. Co-Expression of Neuregulins 1,2,3 and 4 in Human Breast Cancer. *J. Pathol.* **2004**, *203*, 672–680. [[CrossRef](#)]
216. Li, M.; Chen, Y.; Jiang, J.; Lu, Y.; Song, Z.; Zhang, S.; Sun, C.; Ying, H.; Fan, X.; Song, Y.; et al. Elevated Serum Neuregulin 4 Levels in Patients with Hyperthyroidism. *Endocr. Connect.* **2019**, *8*, 728–735. [[CrossRef](#)]
217. Blüher, M. Neuregulin 4: A “Hotline” Between Brown Fat and Liver. *Obesity* **2019**, *27*, 1555–1557. [[CrossRef](#)]
218. Hayes, N.V.L.; Blackburn, E.; Smart, L.V.; Boyle, M.M.; Russell, G.A.; Frost, T.M.; Morgan, B.J.T.; Baines, A.J.; Gullick, W.J. Identification and Characterization of Novel Spliced Variants of Neuregulin 4 in Prostate Cancer. *Clin. Cancer Res.* **2007**, *13*, 3147–3155. [[CrossRef](#)]
219. Stove, C.; Stove, V.; Derycke, L.; Van Marck, V.; Mareel, M.; Bracke, M. The Heregulin/Human Epidermal Growth Factor Receptor as a New Growth Factor System in Melanoma with Multiple Ways of Deregulation. *J. Invest. Dermatol.* **2003**, *121*, 802–812. [[CrossRef](#)]
220. Lengyel, E.; Makowski, L.; DiGiovanni, J.; Kolonin, M.G. Cancer as a Matter of Fat: The Crosstalk between Adipose Tissue and Tumors. *Trends Cancer* **2018**, *4*, 374–384. [[CrossRef](#)]
221. Jiang, W.G.; Sanders, A.J.; Katoh, M.; Ungefroren, H.; Gieseler, F.; Prince, M.; Thompson, S.K.; Zollo, M.; Spano, D.; Dhawan, P.; et al. Tissue Invasion and Metastasis: Molecular, Biological and Clinical Perspectives. *Semin. Cancer Biol.* **2015**, *35*, S244–S275. [[CrossRef](#)]
222. Whiteside, T.L. The Tumor Microenvironment and Its Role in Promoting Tumor Growth. *Oncogene* **2008**, *27*, 5904–5912. [[CrossRef](#)]
223. Peinado, H.; Lavotshkin, S.; Lyden, D. The Secreted Factors Responsible for Pre-Metastatic Niche Formation: Old Sayings and New Thoughts. *Semin. Cancer Biol.* **2011**, *21*, 139–146. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
224. Zhang, X.; Xiang, J. Remodeling the Microenvironment before Occurrence and Metastasis of Cancer. *Int. J. Biol. Sci.* **2019**, *15*, 105–113. [[CrossRef](#)]
225. De Lope, L.R.; Alcibar, O.L.; López, A.A.; Hergueta-Redondo, M.; Peinado, H. Tumour–Adipose Tissue Crosstalk: Fuelling Tumour Metastasis by Extracellular Vesicles. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **2018**, 373.
226. Van Niel, G.; D’Angelo, G.; Raposo, G. Shedding Light on the Cell Biology of Extracellular Vesicles. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2018**, *19*, 213–228. [[CrossRef](#)]
227. Théry, C.; Zitvogel, L.; Amigorena, S. Exosomes: Composition, Biogenesis and Function. *Nat. Rev. Immunol.* **2002**, *2*, 569–579. [[CrossRef](#)]
228. Lin, R.; Wang, S.; Zhao, R.C. Exosomes from Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells Promote Migration through Wnt Signaling Pathway in a Breast Cancer Cell Model. *Mol. Cell. Biochem.* **2013**, *383*, 13–20. [[CrossRef](#)]
229. Thomou, T.; Mori, M.A.; Dreyfuss, J.M.; Konishi, M.; Sakaguchi, M.; Wolfrum, C.; Rao, T.N.; Winnay, J.N.; Garcia-Martin, R.; Grinspoon, S.K.; et al. Adipose-Derived Circulating MiRNAs Regulate Gene Expression in Other Tissues. *Nature* **2017**, *542*, 450–455. [[CrossRef](#)]
230. Deshmukh, A.S.; Peijs, L.; Beaudry, J.L.; Jespersen, N.Z.; Nielsen, C.H.; Ma, T.; Brunner, A.D.; Larsen, T.J.; Bayarri-Olmos, R.; Prabhakar, B.S.; et al. Proteomics-Based Comparative Mapping of the Secretomes of Human Brown and White Adipocytes Reveals EPDR1 as a Novel Adipokine. *Cell Metab.* **2019**, *30*, 963–975.e7. [[CrossRef](#)]
231. Jung, Y.J.; Kim, H.K.; Cho, Y.; Choi, J.S.; Woo, C.H.; Lee, K.S.; Sul, J.H.; Lee, C.M.; Han, J.; Park, J.H.; et al. Cell Reprogramming Using Extracellular Vesicles from Differentiating Stem Cells into White/Beige Adipocytes. *Sci. Adv.* **2020**, *6*, 1–14. [[CrossRef](#)]
232. Gao, X.; Salomon, C.; Freeman, D.J. Extracellular Vesicles from Adipose Tissue—A Potential Role in Obesity and Type 2 Diabetes? *Front. Endocrinol.* **2017**, *8*, 202. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
233. Koeck, E.S.; Iordanskaia, T.; Sevilla, S.; Ferrante, S.C.; Hubal, M.J.; Freishtat, R.J.; Nadler, E.P. Adipocyte Exosomes Induce Transforming Growth Factor Beta Pathway Dysregulation in Hepatocytes: A Novel Paradigm for Obesity-Related Liver Disease. *J. Surg. Res.* **2014**, *192*, 268–275. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
234. Kurywchak, P.; Tavormina, J.; Kalluri, R. The Emerging Roles of Exosomes in the Modulation of Immune Responses in Cancer. *Genome Med.* **2018**, *10*, 1–4. [[CrossRef](#)]



Article

# Melatonin-Induced Cytoskeleton Reorganization Leads to Inhibition of Melanoma Cancer Cell Proliferation

Alejandro Alvarez-Artime <sup>1,2</sup>, Rafael Cernuda-Cernuda <sup>1,2</sup>, Francisco-Artime-Naveda <sup>1,2</sup>, Vanesa Cepas <sup>1,2</sup> , Pedro Gonzalez-Menendez <sup>3</sup>, Sheila Fernandez-Vega <sup>1,2</sup>, Isabel Quiros-Gonzalez <sup>1,2</sup>, Rosa M. Sainz <sup>1,2</sup> and Juan C. Mayo <sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Morfología y Biología Celular, Redox Biology Group, Instituto Universitario Oncológico del Principado de Asturias (IUOPA), School of Medicine, University of Oviedo, C/Julian Claveria 6, 33006 Oviedo, Spain; alejandroalvarezartime@gmail.com (A.A.-A.); rcernuda@uniovi.es (R.C.-C.); UO230010@uniovi.es (F.-A.-N.); vanesa.cepas@gmail.com (V.C.); sheilafdzvega@gmail.com (S.F.-V.); iquiros@gmail.com (I.Q.-G.); sainzrosa@uniovi.es (R.M.S.)

<sup>2</sup> Instituto de Investigación Sanitaria del Principado de Asturias (ISPA), Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA), Avda. Roma s/n, 33011 Oviedo, Spain

<sup>3</sup> Institut de Genetique Moleculaire de Montpellier, University of Montpellier, CNRS, 34095 Montpellier, France; pedrogonzalezmenendez88@gmail.com

\* Correspondence: mayojuan@uniovi.es; Tel.: +34-985103000 (ext. 2730)

Received: 18 December 2019; Accepted: 13 January 2020; Published: 15 January 2020



**Abstract:** Neuroindole melatonin, a hormone synthesized during the night mainly—but not exclusively—by the pineal gland of all vertebrates, functions as an adapting signal to the light-dark cycle. Its antioxidant, neuroprotective, anti-inflammatory, and antitumor properties are all well-known and widely reported. Melanoma is one of the most common carcinomas among developed countries and a type of tumor particularly difficult to fight back in medium/advanced stages. In contrast to other types of cancer, influence of melatonin on melanoma has been scarcely investigated. Thus, we have chosen the murine melanoma model B16-F10 cell line to study antiproliferative and antitumoral actions of melatonin. For this purpose, we combined both, cell culture and in vivo models. Melatonin reduced either, growth rate or migration of B16-F10 cells. Furthermore, melanin synthesis was altered by melatonin, promoting its synthesis. Melatonin also induced a G2/M cell cycle arrest and altered the cytoskeletal organization. To corroborate these results, we tested the effect of melatonin in the in vivo model of B16-F10 cell injection in the tail vein, which causes numerous lung metastases. Two different strategies of melatonin administration were used, namely, in drinking water, or daily intraperitoneal injection. However, contrary to what occurred in cell culture, no differences were observed between control and melatonin treated groups. Results obtained led us to conclude that melatonin exerts an antiproliferative and anti-migrating effect on this melanoma model by interfering with the cytoskeleton organization, but this pharmacological effect cannot be translated in vivo as the indole did not prevent metastasis in the murine model, suggesting that further insights into the effects of the indole in melanoma cells should be approached to understand this apparent paradox.

**Keywords:** melatonin; melanoma; B16-F10; cytoskeleton; metastasis

## 1. Introduction

The pineal indole melatonin is a tryptophan-derived hormone, synthesized and released by the pineal gland during the dark period in all vertebrates [1]. Even though this gland is the organ responsible for the serum concentrations at night, both precursors and synthetic enzymes as well as



melatonin itself have been found in many other tissues including the Harderian gland, retina, and gut among others [2–4]. However, the contribution to the systemic circulation by these tissues is minimal—if any—as it is deduced from the fact that pinealectomy leads to a total drop in melatonin serum levels and, as a consequence, the lack of circadian rhythmicity [5]. Melatonin has been highly conserved during evolution which has recently led to propose the well-known antioxidant activity of the indole as the first function, since there is evidence of its presence in primitive organisms with aerobic metabolism. Therefore, melatonin would help in eliminating reactive oxygen species generated during oxidative phosphorylation [6]. In vertebrates, however, melatonin displays different functions, the most important being the biological clock indicating the light-dark period, and regulating the reproductive cycle, thus fulfilling an important role in organisms with seasonal reproduction [7,8].

At cellular level, melatonin can exert its functions in different ways. Firstly, by binding to specific G-coupled membrane receptors (i.e., MTNR1A, MTNR1B, and MTNR1C), which possess potential glycosylation and phosphorylation sites for various proteins such as protein kinases A and C (PKA, PKC). The corresponding associated G proteins will in turn give rise to signaling cascades that ultimately end up modifying different intracellular routes [9]. As an alternative, a receptor-independent, direct antioxidant ability associate with its chemical structure has also been well documented. In this way melatonin molecule can donate one or more electrons to free radicals, thus neutralizing its oxidizing activity or can act synergistically with other antioxidant molecules such as ascorbic acid or  $\alpha$ -tocopherol [10].

In addition to its broad physiological properties, numerous research groups have reported different antitumor effects of the indole on several tumor types including breast, colon, ovary, endometrium, prostate, liver and skin cancer cells, among others [11–17]. Furthermore, the indole is capable of inhibiting cell growth, either leading tumor cells to a cell cycle blockage at some stage, acting as an antagonist of other pro-tumorigenic molecules such as estradiol in breast cancer, or by preventing the activation of the androgen receptor in prostate cancer [18–20]. Another reported antitumor activity of melatonin relates to its ability to regulate the cell death processes. Although the role of melatonin as an apoptosis inhibitor in immune and neuronal cells was described more than two decades ago, more recently some authors have also shown that melatonin may have proapoptotic effects on tumor cells, commonly associated to its ability to inactivate NF- $\kappa$ B or to increase specific cytokine levels such as IL-6 [21].

The skin is one of the major defensive barriers against the environment, and also an organ where melatonin synthesis has been demonstrated [22]. Skin has all the molecular and biochemical machinery to produce melatonin and is mainly located in the upper layers of the epidermis [23]. Therefore, one of its main functions is the protection against UV radiation which, due to its high energy, can cause harmful alterations at genetic and cellular level, being therefore one of the main etiological agents involved in the development of skin cancer [24]. Among skin tumors, melanoma is frequently characterized by its poor prognosis and low survival rate [25]. These pigmented tumors are highly invasive and metastatic, generally appearing in cutaneous zones but also other tissues, i.e., intestine, oral cavity, or eye among others [26]. According to WHO, there are roughly 132,000 new cases of melanoma each year worldwide, of which 66,000 are fatal [27]. In addition to other well-demonstrated functions including the reduction of cell proliferation [28] or induction of cell differentiation [29], melatonin is involved in the modulation of melanin synthesis pathway. An increase in melanin pigment levels after melatonin treatment *in vitro* has been described [30]. In addition, due to the high incidence and severity, it is necessary to search for new molecular routes and drugs that will reduce or halt the development and progression of melanoma. Melatonin, as already described above, has different antitumor properties and specifically in melanoma cells, several groups have previously shown that treatment with melatonin triggers a suppressive effect of cell growth mediated by an increase in apoptosis levels in melanoma cell lines SBCE2, WM-98, WM-169, or SKMEL-188 [9], mainly throughout the interaction with specific membrane receptors. Other laboratories have described that

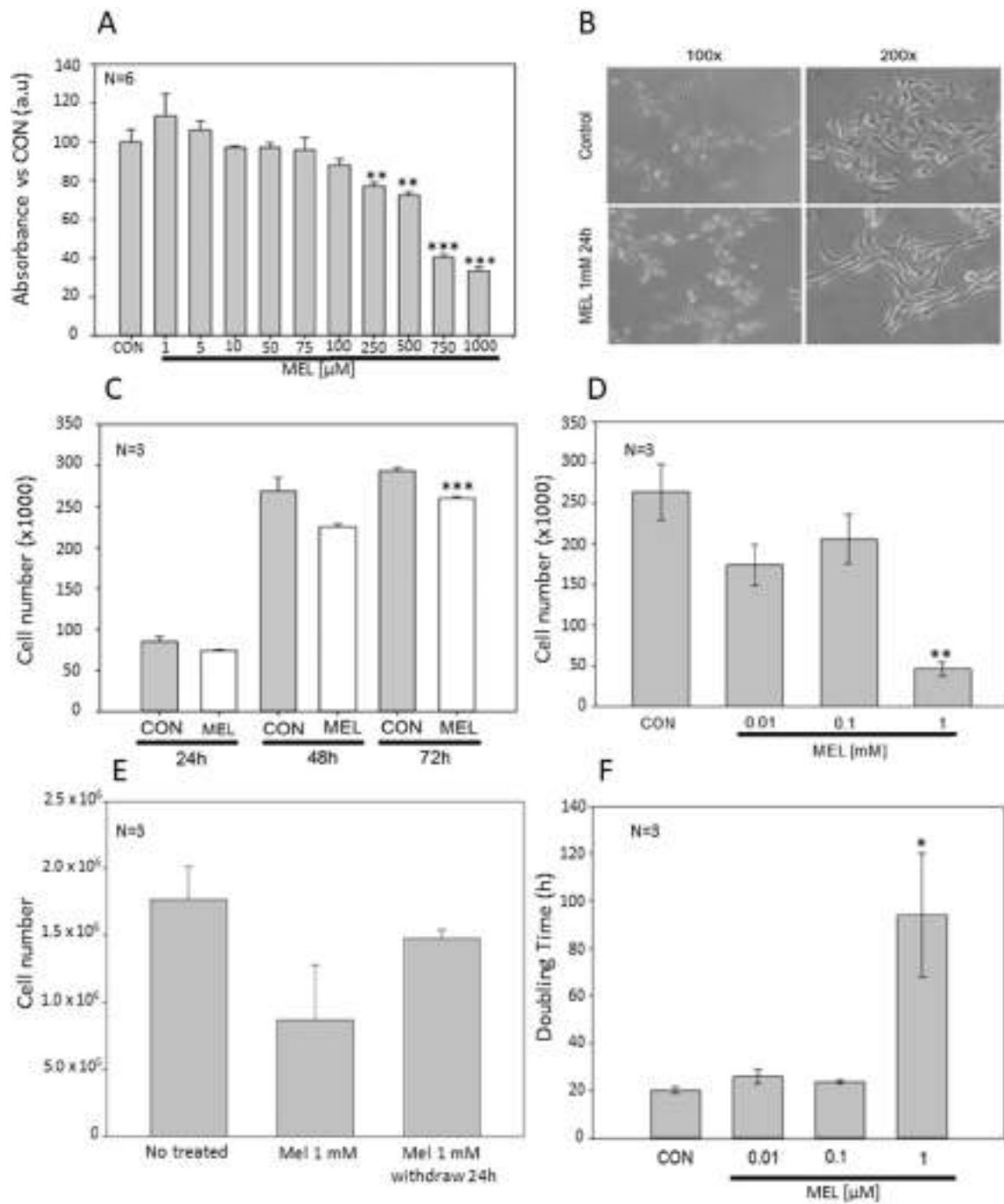
melatonin can induce apoptosis in the murine B16-F10 melanoma model but when combined with other death-inducing agents such as endoplasmic reticulum, stress-inducing drugs [28].

Since melanoma is considered one of the tumors with worse prognosis in Western countries and given the important antitumor and antioxidant activities of melatonin which make it an interesting molecule for the study of cancer therapies, the main objective of this work is to validate the antitumor role of the neuroindole pineal melatonin both in vitro and in vivo in the murine melanoma cell model B16-F10.

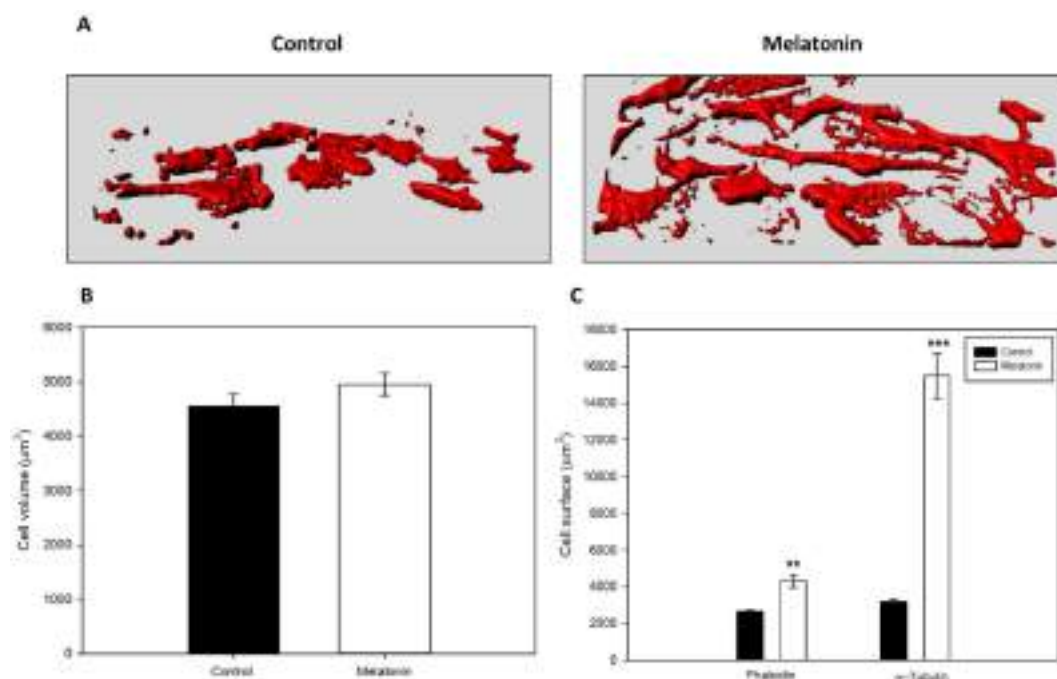
## 2. Results

### 2.1. Antiproliferative Effects of Melatonin In Vitro

Since melatonin displays antiproliferative effects on tumor cells, including different types of skin cancer cells, we assayed whether viability, cell growth, and doubling time of B16-F10 cells change after incubation with the indole. By using 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction to formazan as cell viability/proliferation assay, here we show that melatonin induces a decrease in MTT reduction in a dose-dependent manner, and this reduction was significant at concentrations above 250  $\mu$ M (Figure 1A). Since these data could indicate an increase in cell death, or a decrease in cell growth, morphology was checked using phase-contrast microscopy and no symptoms of cytotoxicity were observed, so we hypothesized that melatonin produced a decrease in growth rate without affecting cell death in our in vitro melanoma model (Figure 1B). To corroborate this result, we analyzed how both cell number and doubling time changes after treatment with melatonin. Cell counting showed a significant reduction in the cell number in a concentration-dependent manner, obtaining statistically differences with concentrations of 1 mM melatonin after 72 h treatment (Figure 1C). Furthermore, it was also studied how different concentrations of melatonin regulated cell growth, obtaining a significant reduction with 1 mM melatonin, as in the previous experiment (Figure 1D). To test whether the presence of the indole was required permanently in the cell culture medium for its action, we changed melatonin-containing medium by regular culture medium and let cells grow again. Cells partially recovered the growth rate after the removal of the indole, even though number of cells did not reach the levels of the control group (Figure 1E). After 72 h of growth, doubling time in melatonin-treated cells (1 mM) significantly increased respect to the control group (Figure 1F). However, some morphological changes were observed after incubation with the indole. Thus, melatonin induced an elongated, fibroblast-like morphology in melanoma cells, when compared to the common rounded and spindle-shaped morphology observed in control cells. For a quantitative study, two morphometric parameters such as volume and cell surface were analyzed. Three-dimensional reconstruction of cultured cells did not show significant differences between volumes in both groups (Figure 2A,B). However, specific staining of either actin microfilaments or microtubules showed that cells treated with melatonin occupied a larger surface area than the control cells (Figure 2C).



**Figure 1.** Antiproliferative effect of Melatonin in B16-F10 melanoma cells. (A) MTT cell viability assay. Cells were seeded in 96 Wells plate at the indicated concentrations, after 72 h MTT reduction levels were assessed. (B) B16-F10 micrographs from control or melatonin-incubated cells were taken at a final magnification of 100× and 200×. (C) Average cell number after 24, 48, and 72 h of treatment with 0.1 mM of melatonin. (D) Average cell number after 72 h of treatment with different concentrations of melatonin. (E) Average cell number after 24 h of treatment with 1mM of Melatonin and withdraw treatment other 24 h. (F) Cell culture doubling time of every experimental group after treatment with melatonin during 72 h. Data were shown as average +/− SEM. Significance vs. CON. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .



**Figure 2.** Morphological changes of B16-F10 cells after 24 h of treatment with melatonin. (A) 3D reconstruction of cell culture based on F-Actin distribution. Red areas represent the surface occupied by F-Actin (B) Average cell volume based on F-Actin distribution. (C) Average cell surface based on F-Actin distribution and  $\alpha$ -tubulin. Data were shown as average  $\pm$  SEM. Significance vs. CON. \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .

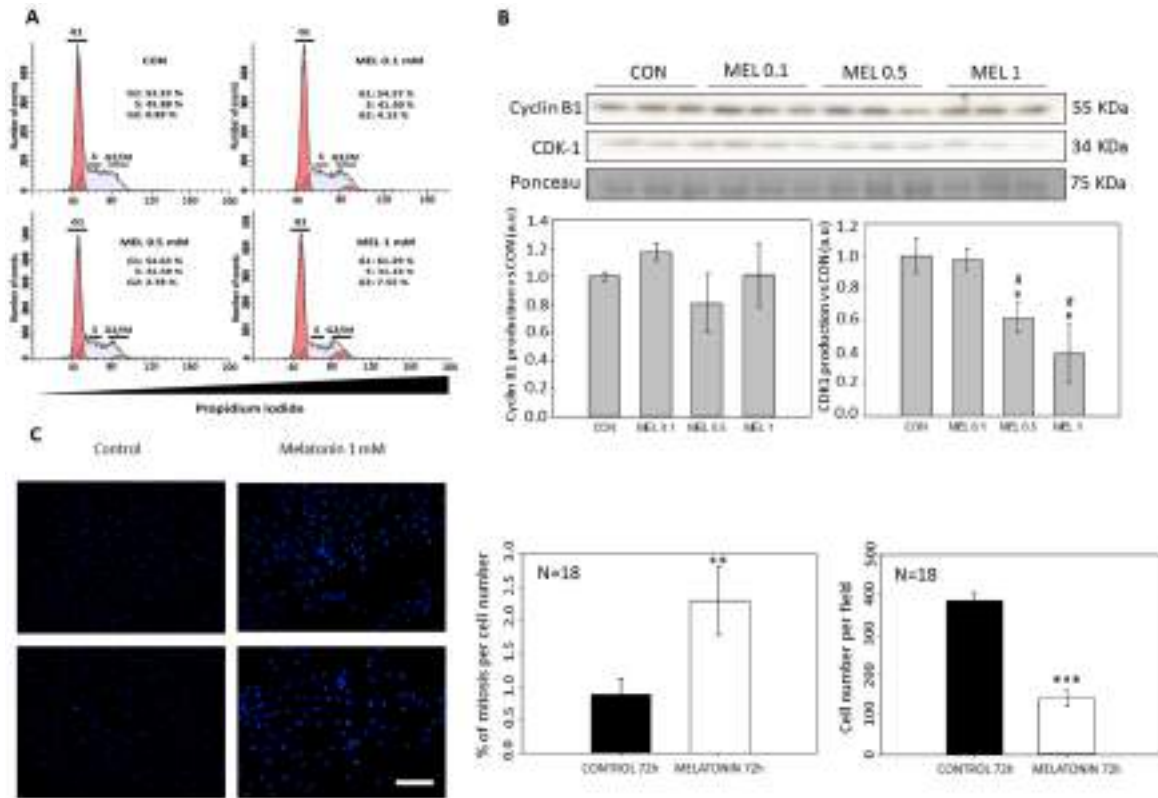
### 2.2. Melatonin Detection in Cell Culture by High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Extraction and quantification of melatonin were performed and assayed in both, extracellular culture medium and intracellular content of B16-F10 cells. The internal standard previously added (5-methoxy-tryptophol) displayed a 6.35 min retention peak. Samples from melatonin-incubated cells showed a characteristic peak at a retention time of 7.39 min, with a maximum absorption spectrum at 279 nm wavelength, both corresponding to the retention time and absorption spectra of melatonin, identical to that of the melatonin standard used. No peak was observed in control groups (Figure S1A,B). A total of 15.35 pmol/ $10^6$  cells were detected within the B16-F10 cells after 72h of melatonin culture. Culture media from these indole-treated cells showed a total concentration of 0.88 mM after 72 h of culture, indicated a relatively low uptake of melatonin by these cells.

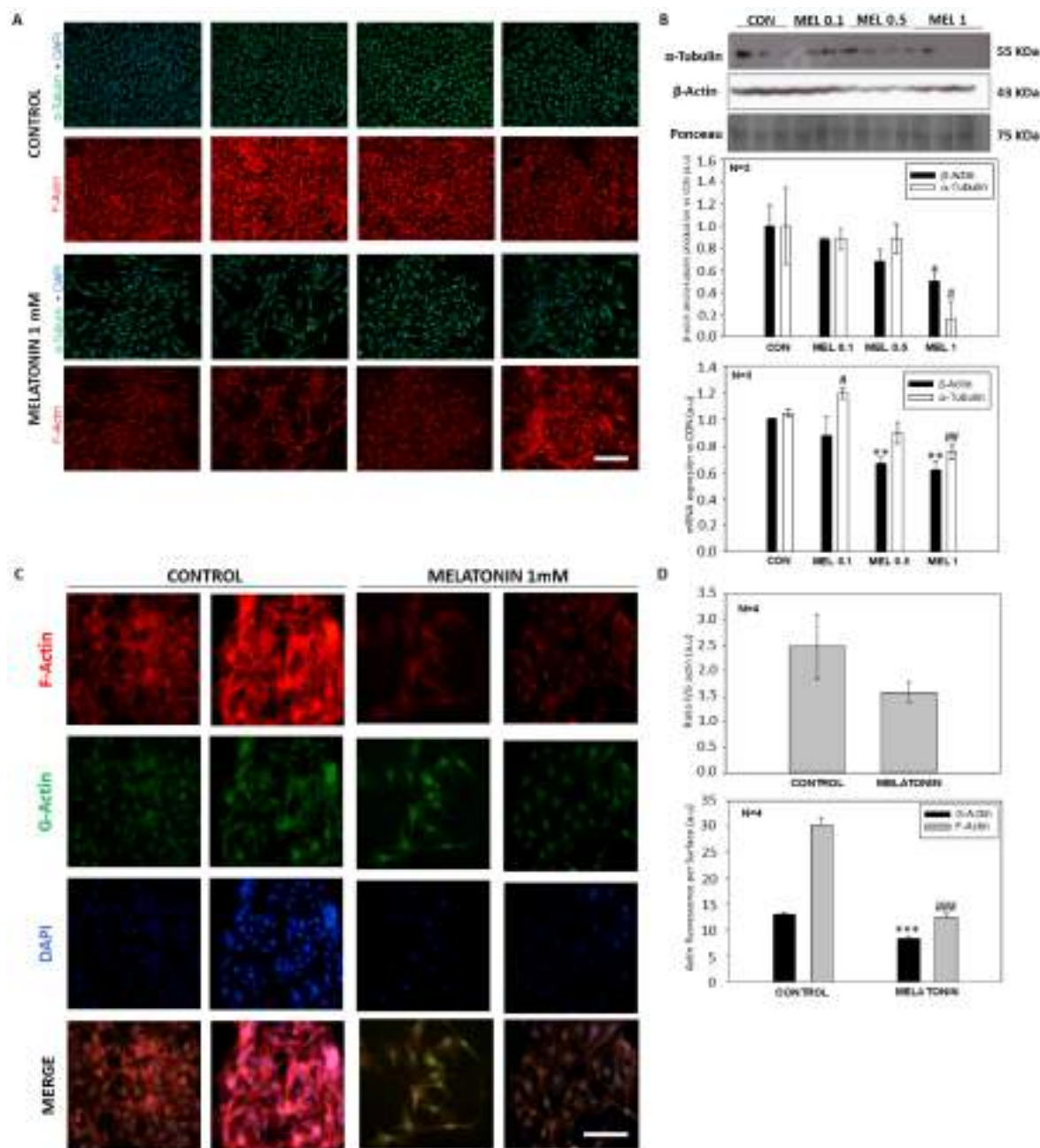
### 2.3. G2/M Cell Cycle Arrest Induced by Melatonin Treatment

Since melatonin decreased mitochondrial MTT reduction due to a decrease in the growth rate without increasing cell death, the specific effect of the indole on the cell cycle distribution was studied. To this aim, cells were analyzed by flow cytometry after 24 h of incubation with the indole. The study revealed an increase in the number of cells present in G1 and G2/M phases on detriment of the S phase in the groups treated with melatonin, thus indicating a G2/M arrest (Figure 3A). To study whether there was a halt in the cell cycle, analysis of the main proteins involved in these checkpoints was performed by Western blot. While no alteration in Cyclin B1 levels was observed, CDK1 levels were significantly reduced in melatonin-treated cells (0.5 and 1 mM) compared to control cells, which might account for an arrest in G2/M phase (Figure 3B). Furthermore, the total number of mitosis in melatonin-treated cells doubled those found in control groups (Figure 3C). These results prompted us to study the possible reorganization of the cytoskeleton components, as they play an important role in the progression of mitosis and cytokinesis and have important effects on cell morphology. When quantifying both,  $\beta$ -actin and  $\alpha$ -tubulin, a decrease in the fluorescence intensity of both proteins was observed in the treated

groups respect to the controls (Figure 4A). Furthermore, these results were corroborated by the levels of total protein production as well as the total mRNA expression (Figure 4B). The analysis of G:F actin ratios showed no differences between control and treated cells. Nevertheless, control cells exhibited a higher fluorescence of both proteins, when compared to melatonin-incubated cells (Figure 4C,D).



**Figure 3.** Cell cycle arrest induced by melatonin. (A) B16-F10 cells distribution around cell cycle after treatment with different concentrations of melatonin. (B) Analysis of proteins involved in G2/M checkpoint. (C) Percentage of mitosis per cell number in control and treatment group. Blue dots represent nuclear staining of DNA with DAPI. Significance vs. CON. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ . Significance vs. MEL 0.1. #  $p < 0.05$ . Image Scale bar = 100  $\mu\text{m}$ .

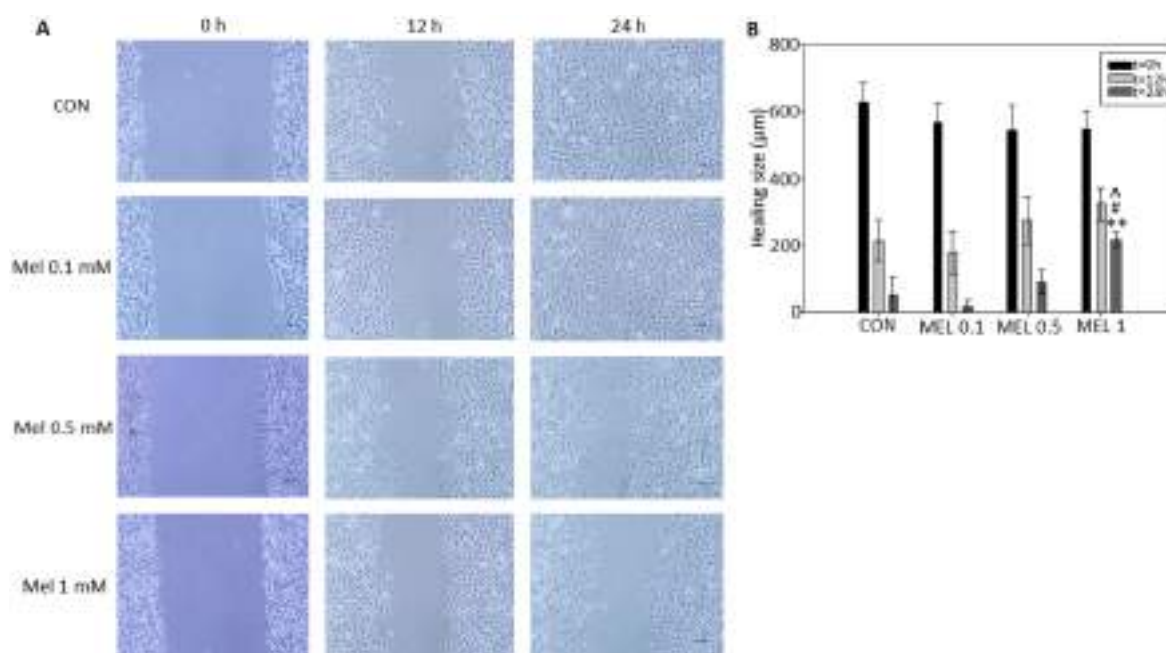


**Figure 4.** Cytoskeleton arrangement of B16-F10 cells treated with melatonin. (A) Fluorescence images of  $\alpha$ -tubulin and  $\beta$ -actin location in control and treated cells. (B) Western blot and qPCR analysis of protein and mRNA levels of  $\alpha$ -tubulin and  $\beta$ -actin. (C) Fluorescence images of G and F actin in control and treated cells. (D) Quantification of ratio between F and G actin and fluorescence level of both proteins. Significance vs.  $\beta$ -Actin CON. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ . Significance vs.  $\alpha$ -Tubulin CON. #  $p < 0.05$ , ##  $p < 0.01$ . Significance vs. G-Actin CON. \*\*\*  $p < 0.001$ . Significance vs. F-Actin CON. ###  $p < 0.001$ . Image Scale bar = 100  $\mu$ m.

#### 2.4. Melatonin Slows down the Wound-Healing

Given that melanomas are highly invasive and metastatic tumors, migration of the B16-F10 cells by wound healing assay was studied. After incubation with melatonin at the concentrations previously indicated, images were taken at the established time courses. As can be observed (Figure 5), wound closing speed was significantly lower in melatonin treated cells compared to control group. After 24 h wound had almost disappeared. Additionally, the rate of wound closure was dependent in a

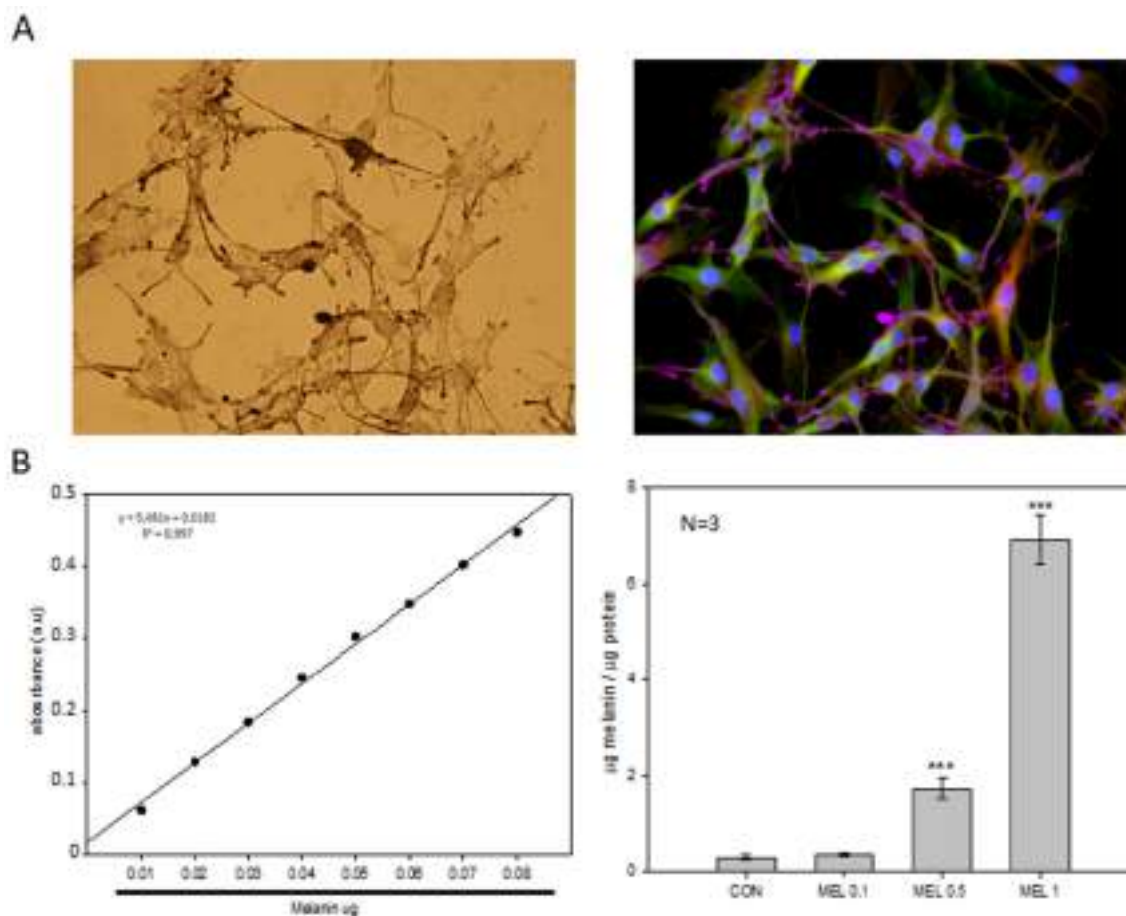
concentration-manner, since the size of the wound in the culture is significantly greater at 24 h in the group treated with 1 mM melatonin than in the rest of the melatonin-treated groups (Figure 5).



**Figure 5.** B16-F10 cell migration after incubation with different concentrations of melatonin. (A) Wound healing assay of each experimental group, images were taken at a magnification of 40. (B) Wound healing average size of each experimental group. Data were shown as average  $\pm$  SEM. Significance vs. CON 24h.  $^{\wedge} p < 0.05$ , significance vs. Mel 0.5 24h.  $\# p < 0.05$ , significance vs. Mel 0.1 24h.  $^{**} p < 0.01$ .

### 2.5. Intracellular Melanin Synthesis Induced by Melatonin

When cells were observed under phase-contrast microscopy, cells treated with melatonin appeared with dark pigmentation in the cytoplasm, mainly located in the periphery, which seemed to correspond to melanin, the characteristic pigment found in melanocytes and melanoma cells (Figure 6A). To quantify the number of pigmented cells in control and melatonin treated groups, the total content of intracellular melanin was analyzed. Previously, for this purpose, optimal melanin extraction time was estimated at 60 min, using synthetic melanin as standard. A calibration curve of extracted melanin from the B16-F10 cells was obtained. Incubation with 100  $\mu$ M, 500  $\mu$ M, and 1 mM melatonin for 24 h induced an increase in intracellular melanin levels in a dose-dependent manner, statistically significant when concentrations were over 100  $\mu$ M (Figure 6B).

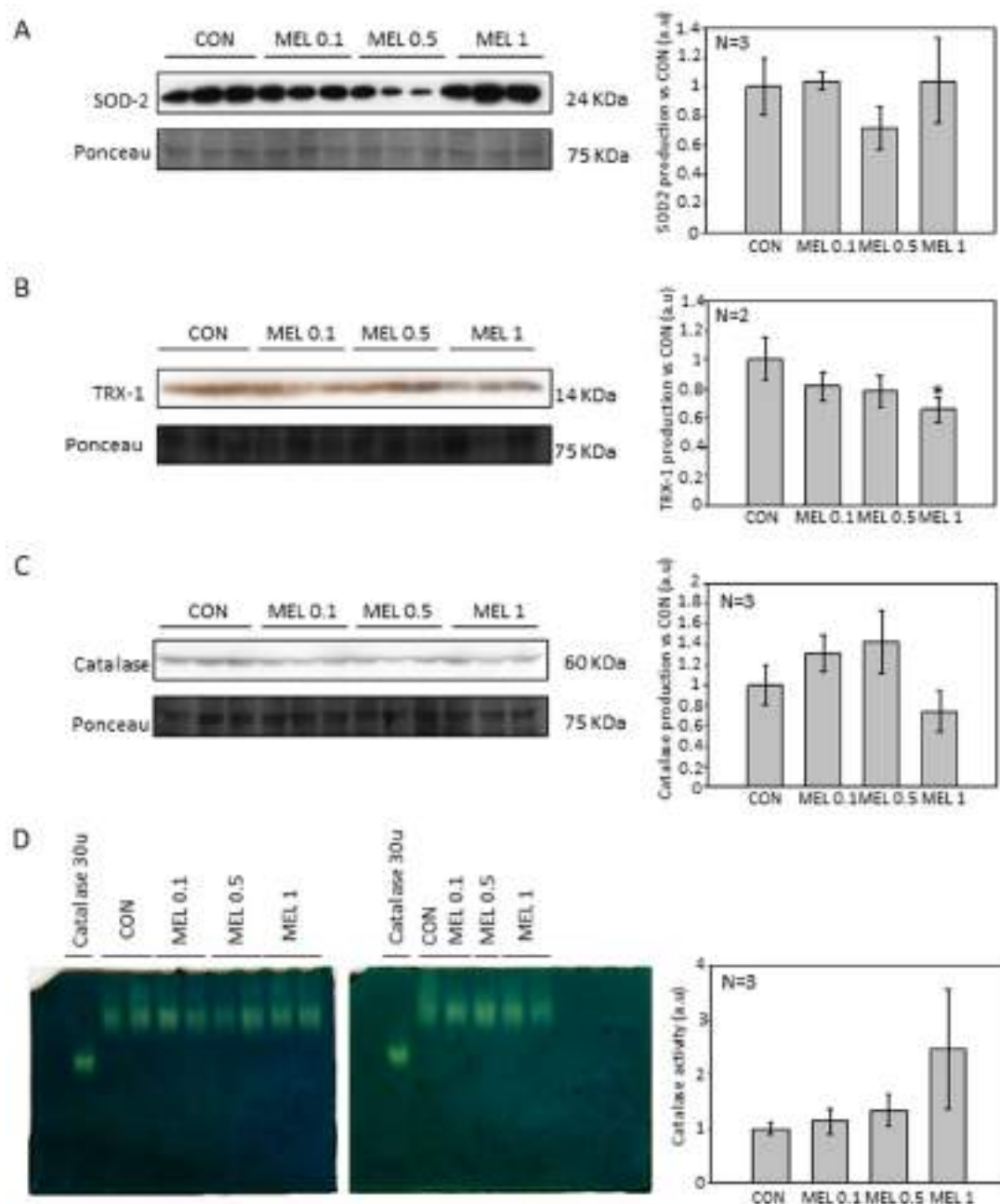


**Figure 6.** Melanin localization and quantification in B16-F10 cells. (A) Phase-contrast micrographs of intracellular melanin depots (left) and the corresponding merge with  $\alpha$ -tubulin and  $\beta$ -actin distribution (right). Micrographs were both taken at a final magnification of 200 $\times$ . (B) Quantification of total intracellular melanin after treatment with different concentrations of Melatonin. Data were shown as average  $\pm$  SEM. Significance vs. CON. \*\*\*  $p < 0.001$

## 2.6. Study of the Levels of Antioxidant Enzymes Involved in the Synthesis and Scavenging of Hydrogen Peroxide

It has been previously demonstrated that melatonin inhibits cell growth by either, directly decreasing ROS levels, or by increasing the expression and production of antioxidant enzymes. Besides, it has been described that hydrogen peroxide is one of the most important free radicals involved during melanin synthesis. Knowing the role played by reactive oxygen species such as hydrogen peroxide in the melanin synthesis process, the total amount of antioxidant enzymes SOD2, CAT and TRX1 present were assayed in control or melatonin-incubated cells, since those are the enzymes responsible for ROS scavenging. No significant differences in the total amount of SOD2 or CAT protein levels were found (Figure 7A,B). However, TRX-1 levels decreased after treatment in a dose-dependent manner, reaching statistical significance in the groups treated with 1 mM melatonin (Figure 7C). On the other hand, we also studied the change in the enzymatic activity of CAT, because it is a major enzyme implicated on hydrogen peroxide scavenging. Despite the fact that there was no difference in protein production, we observed an increase in CAT activity in the extracts of melatonin-treated cells although it was not significant (Figure 7D).





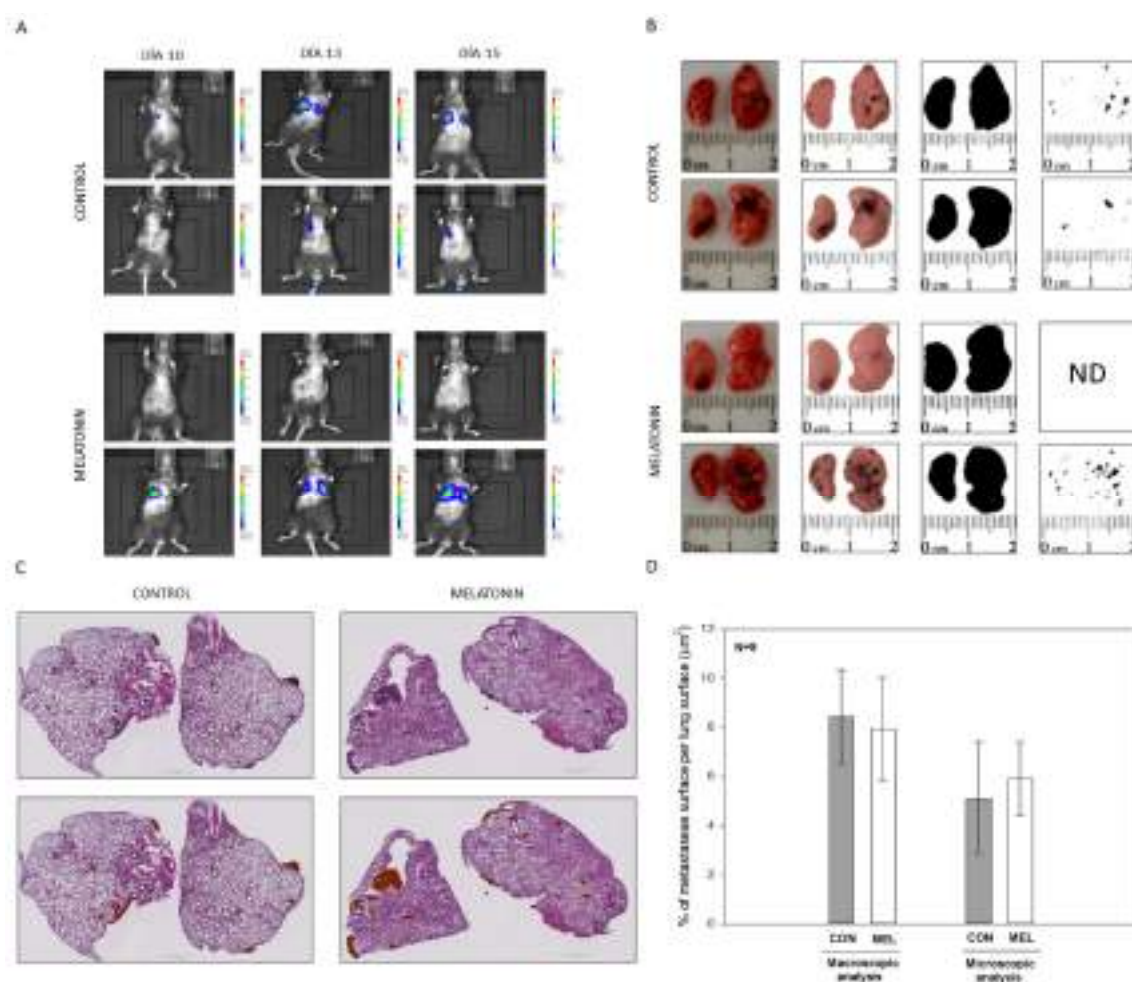
**Figure 7.** Study of redox proteins included in hydrogen peroxide production and scavenging after melatonin treatment. (A) SOD2 total protein production. (B) TRX-1 total protein production. (C) Catalase total protein production (D) Catalase activity gel. Data were shown as average  $\pm$  SEM. Significance vs. CON. \*  $p < 0.05$ .

### 2.7. Melatonin Effects on Melanoma Mice Model In Vivo

Finally, to corroborate our in vitro results, a murine model was used to study the in vivo effects that melatonin on cell metastasis after injecting the cells into the tail vein of C57BL/6J mice. As a first approach, imaging techniques to locate how cells nest and proliferation in the lung evolved were used. IP injection of luciferin-containing cells in mice indicated that bioluminescence could be observed 10 days after injection. In most animals, migration occurred first in the right lung, and from day 13 and on both lungs were found affected (Figure 8A). After the animals were sacrificed, macroscopic quantification of the metastases surface and their ratio respect to the total lung area was recorded, using a software macro specially designed for image J. No significant differences between

melatonin-treated animals and controls were detected (Figure 8B,D). Likewise, and as a reinforce for this study, microscopic analysis of lung sections of each group revealed again no differences. Microscopical observation showed that most of metastases were located in the peripheral area of the lung in both experimental groups, and in some cases, mice displayed metastases variable in size in more internal areas of the tissue. As in the case of the microscopy quantifications, no differences between the area occupied by metastasis in the lungs treated with IP injection of melatonin compared to the controls treated with vehicle were observed (Figure 8C,D).

Since we did not find differences in the migration of B16-F10 cells after the IP injection of melatonin, a new experiment with a different administration method was performed, in this case by adding melatonin in the drinking water. Similarly, as in the previous experiment, we also monitored the image by bioluminescence, corroborating that 10 days after the injection of the cells in the tail vein, most of the animals still did not show visible metastases in the lung, whereas after 15 days both lungs were already affected (Figure S2A). Again, the microscopical study of the metastatic surface respect to the total lung surface analyzed revealed no statistical differences between vehicle-treated or melatonin-treated groups (Figure S2B,C). Furthermore, there not exists differences in water intake between control and treatment animals over the experiment (Figure S2D).



**Figure 8.** In vivo model for B16-10 lung metastasis treated with IP melatonin. (A) Bioluminescence localization and size of total lung metastases. (B) Macroscopic images of lung metastases and image isolation process. (C) Microscopic scanning of lung sections and detection of metastatic tissue. (D) Percentage of metastases Surface per total lung surface. Data were shown as average  $\pm$  SEM. ND: not detectable.

### 3. Discussion

As described earlier, the pineal neuroindole melatonin has important antitumor actions, among which the antiproliferative effect stands out [31]. Previous studies have shown that concentrations ranging from high micromolar to 1 mM of this indole reduce cell proliferation and increase levels of cell death in this cell type [24]. However, it has not only been described in this cell type but also been found to perform the same effect on other tumor types of melanoma, as well as in breast cancer and prostate cancer among others [21,32].

Results show that increasing concentrations of melatonin in the high micromolar range have a direct impact on cell proliferation, following a dose-dependent decreasing trend. In addition, the presence of indole is necessary for its effects to be maintained, since once removed, cell proliferation immediately recovers to a normal growth rate. Contrary to other studies using different cell lines, no signs of cytotoxicity and cell death were observed. Kim and co-workers have reported that melatonin compromises cell survival using the same cell model, i.e., B16-F10 cells. However, in this study, they combined the indole with the induction of endoplasmic reticulum stress, and they observed that melatonin enhanced p-PERK. Furthermore, cell death is significantly increased when the indole is combined, in a dose-dependent manner [28]. Microscopically, we did not detect any morphological signs of damage as compared to the control group. However, morphologically, a larger, in relation to this section we observed that, although they did not show differences in cell volume, they occupied a greater surface area in the culture plate, thus as they were elongated, acquiring a morphology like fibroblasts. This is due to a reorganization of the cell cytoskeleton mediated by the action of melatonin, which also has different effects on the physiology of the cell altering other processes such as mitosis [33]. Furthermore, melatonin induces apoptosis in DLD1 ovarian colon cancer and A2780 ovarian cancer cells line after 24 h of treatments [34]. In human SK-LU-1 lung cancer cells, an increase in melatonin concentration was correlated with the increase in the concentration of apoptotic bodies [35].

By not observing signs of cytotoxicity in the cells, we studied whether melatonin exerted that antiproliferative effect *in vitro* due to an arrest at some stage of the cell cycle, since as we have mentioned previously other groups have demonstrated the effect of melatonin as an antiproliferative molecule when blocks the cells in the G0 and G1 phases of the cell cycle [36,37]. When analyzing the cell cycle in B16-F10 cells, we observed that the groups treated with melatonin had a greater number of events in G1, as previously published by other groups, as well as in G2/M. When studying proteins involved in the passage of the G2 phase cells to mitosis, we observed how there were alterations in CDK-1 levels, which occurred in smaller amounts in those groups treated with melatonin, which would prevent cells from entering mitosis at the same rate as the control which explains the reduction in cell number increment under melatonin treatment. In addition to this, we observed a greater number of mitoses in the groups treated with melatonin. This phenomenon could be related to the stop in the cell cycle, since the melatonin retaining the cells in G2/M for a longer period would cause this increase in the number of mitosis. On the other hand, and in relation to this phenomenon, we study the state of the cellular cytoskeleton, since as previously described by other groups, melatonin acts as a modulator of cytoskeleton proteins, altering the actin microfilaments to a greater extent, although It also acts at the level of microtubules, which are highly related to the mitotic processes of anaphase, telophase and cytokinesis [38,39]. When the levels of these proteins are altered, mitosis can suffer abnormalities that lead to the increment of the growth delay, as in our case.

In order to end cell proliferation studies in this model, we finally studied the effect that melatonin has on cell migration phenomena, since it is described both *in vitro* and *in vivo* in other models that this indole is a potent antiproliferative, inhibiting the growth and migration of tumor cells. It has been previously described by other research groups that melatonin reduces the migration rate by wound healing test, either by administering it individually or as an adjuvant with other treatments, in different tumor models such as squamous carcinomas of esophagus, gliomas, or melanoma itself, thus coinciding with our results, where we see how melatonin reduces the speed of wound closure in treated cells with respect to control cells [40,41].

An important feature of melanocytes is their ability to synthesize the melanin intracellular pigment. Melatonin is a molecule capable of causing the aggregation of melanosomes in those cells that present these organelles, and since the B16-F10 cell model is capable of synthesizing this pigment we decided to study the phenomenon, observing how the administration of melatonin to cells caused an increase in the synthesis of the melanin pigment, which was mainly distributed in the cell periphery, near the plasma membrane. As described above, melanin has the main function of protecting the skin from ultraviolet radiation, which can trigger mutagenic phenomena in the DNA which can trigger the appearance of tumorigenic processes [42]. Since during the synthesis of melanin oxidation reactions are triggered reduction where superoxide anion free radicals ( $O_2^{\cdot-}$ ) And hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) occur, mainly by the key enzyme of the synthesis pathway, tyrosinase, which It transforms the amino acid tyrosine to 3,4-Dihydroxyphenylalanine and later to dopaquinone, and due to the pro-tumorigenic effect that these free radicals present in tumors, we decided to analyze how levels of both production and activity of different antioxidant proteins varied [42,43]. In addition, different research groups have studied the levels of antioxidant proteins, mainly involved in the production and purification of  $O_2^{\cdot-}$ . in this cellular model, observing how melatonin treatment reduced the levels of both SOD2 and catalase [28]. When analyzing our results, we observed that the levels of the different antioxidant proteins studied were not altered, with the exception of thioredoxin 1 (TRX-1), which significantly decreased their production when cells were treated with melatonin, in relation to catalase, we observed also a decrease in production, but its levels do not reach statistical significance. Therefore, our results agree to some extent with those already published. However, we do not observe large differences in our model.

Altogether this result allows us to conclude that melatonin caused a reduction in cell proliferation in the melanoma cell model B16-F10. Then we expand our study towards an *in vivo* model of lung metastases in order to check if, at the systemic level, melatonin caused a decrease in the ability to migrate and metastasize in B16-F10 cells, which has not been previously described. To do this, we carried out two approaches as we have already described, administrating melatonin IP and using drinking water. In addition, the beneficial effects of the administration of melatonin in experimental mice in relation to other tumor models such as prostate cancer have been previously described by our group and others [43,44]. When analyzing our results, we did not observe differences in the number of metastases or at the macroscopic or microscopic level, which makes us think that due to the aggressiveness of these cells during the metastatic process, which already affects both lungs after 15 days of injection of the cells in the tail of the mouse, melatonin is not able to alter the rate of proliferation and migration of the cells. In contrast to *in vitro* model, where melatonin was directly applied within the culture medium, its availability in the lungs of our *in vivo* model might be compromised.

## 4. Materials and Methods

### 4.1. Cell Culture

Murine melanoma tumor cell line B16-F10 (ATCC<sup>®</sup>, CRL-6475<sup>™</sup>, Manassas, VA, USA,) was employed for the studies. This cell line was originated from the parental line B16 and it is characterized by its ability to form colonies (nodules) in the lung after intravenous injection in *in vivo* models [29]. Unless otherwise indicated, all reagents were purchased from Sigma (Sigma-Aldrich Inc., St Louis, MO, USA). Cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Sigma) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Sigma), 10mM HEPES, 2mM L-glutamine (Lonza, Basel, Switzerland) and 1% antibiotics and antifungals (amphotericin B, penicillin and streptomycin) (Gibco, Grand Island, NY, USA). Cells were kept under controlled conditions in a CO<sub>2</sub> incubator (New Brunswick<sup>™</sup> Galaxy<sup>®</sup>170s, Eppendorf, Germany) at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. Before carrying out each experiment, at least 24 h were expected from the time of seeding to favor the adhesion of the culture to the substrate.

#### 4.2. MTT Cell Viability Assay

Cells were seeded in a 96-well plate at a density of 1500 cells/well in 100  $\mu$ L of complete culture medium and left attach overnight. After 24 h, melatonin (ranging from 1  $\mu$ M to 1 mM) was added (Merck, Kenilworth, NJ, USA). The indole was dissolved at 1M stock solution in dimethyl sulfoxide (DMSO) (Sigma) and the corresponding DMSO concentration was added to control cells. After 72 h of incubation, MTT reagent was added at a final concentration of 0.5 mg/mL and allowed to react for 4 h. Then, one volume of lysis buffer solution (20% SDS in 50% dimethylformamide, pH = 4.7) was added and incubated in the dark at 37 °C overnight. The absorbance was measured at a spectrophotometer microplate reader Cary 50 MPR (Varian, Palo Alto, CA, USA) at a wavelength of 570 nm using absorbance at 690 nm as reference wavelength.

#### 4.3. Proliferation and Doubling Time Assay

To estimate both, cell proliferation and the doubling time, i.e., time required to double their number, a duplication test was designed. Cells were seeded in 6-well plates at a density of 12,500 cells/mL. Three replicates of each experimental group were seeded in the presence of 10  $\mu$ M, 100  $\mu$ M or 1 mM melatonin. After 72 h, cells were collected by scraping with a rubber policeman and fixed in 500  $\mu$ L of 70 % ethanol at 4 °C. Cells were then counted using a hemocytometer. The doubling time was calculated based on the following mathematical formula.

$$d = t \times \log(2) / \log(C_f) - \log(C_o) \quad (1)$$

#### 4.4. Quantification of Intracellular and Extracellular Melatonin in Cell Culture

To quantify the total content of melatonin present in the culture medium, and the intracellular content, a high-performance liquid chromatography (HPLC) assay was performed. To this aim, cells were seeded at the density of  $2.5 \times 10^4$  cell/mL in 100 mm plates. After 24 h, melatonin was added at a concentration of 1mM. After 48 h, cells and their respective culture medium were collected, and an organic extraction was carried out based on a protocol previously described by our research group [31]. As a reference, melatonin concentration was calculated using a melatonin calibration curved performed from 0.1 ppm to 10 ppm, as well as an internal standard to check the quality of the extraction.

#### 4.5. Cell Cycle Analysis

For these experiments, cells were seeded in 100 mm diameter plates at a density of  $4 \times 10^4$  cells/mL and left to reach 75–80% confluence. Melatonin was added at concentrations of 100  $\mu$ M, 500  $\mu$ M, and 1 mM, and after 24 h cell cycle was analyzed. For this purpose, cells were harvested by trypsinization and centrifuged at  $500 \times g$  for 5 min at 4 °C. After removing supernatant, cells were washed twice with ice-cold PBS, then fixed in 500  $\mu$ L of 70% ethanol and stored at 4 °C until analysis. At the time of analysis, cells were centrifuged for 5 min at  $700 \times g$ , and cell pellet was resuspended in 500  $\mu$ L of a staining solution (propidium iodide 100  $\mu$ g/mL, RNase 100 U/mL, 10 mL PBS with 1 g/L of glucose). Finally, it was incubated at RT for 30 min and the samples were analyzed on a Cytomics FC500 flow cytometer (Beckman Coulter, Indianapolis, IN, USA).

#### 4.6. Wound Healing Assay

To this purpose, cells were seeded in 6-well plates and left to reach confluence. Then, scratches wounds were made by scraping the cell layer across each well using a 100  $\mu$ L pipette tip. Then after washing with PBS to remove the detached cells, melatonin was added at 100  $\mu$ M, 500  $\mu$ M, and 1 mM in fresh complete culture medium. Micrographs of the scratched area were taken at the beginning ( $t = 0$ ) and at 12 and 24 h, using the  $40 \times$  magnification objective.

#### 4.7. Extraction and Quantification of Intracellular Melanin

Cells were seeded at concentration of  $2.5 \times 10^4$  cell/mL in 100 mm plates. When cells reached confluency, melatonin was added at the indicated concentrations. After 24 h, cells were collected by scraping in 1 mL of PBS and centrifuged for 5 min at  $500\times g$ . Pellets were resuspended in 500  $\mu$ L of 1  $\times$  PBS and sonicated in an ultrasonic bath. Afterward, samples were centrifuged at  $12,000\times g$  for 20 min at 4 °C and the supernatant was collected in a clean tube for protein precipitation by 10% trichloroacetic acid, and then quantified by the Bradford method (Sigma) [45]. The pellet was dissolved in 1 mL of NaOH 1N and 10% DMSO and heated in a heater at 80 °C for 1 h. After the incubation the absorbance was quantified at 470 nm. The melanin concentration was calculated using a synthetic melanin standard (Sigma) at concentrations from 0.01 to 0.1 mg of melanin.

#### 4.8. SDS-PAGE and Immunoblotting

Cells were seeded in 100 mm plates at  $2.5 \times 10^4$  cell/mL and left to reach 80% confluency. Then melatonin (ranging from 100  $\mu$ M to 1 mM) was added. For protein extraction, cells were scraped with a rubber policeman in culture medium and subsequently centrifuged at  $500\times g$  for 5 min. After medium removal, RIPA lysis buffer (0.1% sodium dodecyl sulphate (SDS), Igepal C 1%, 0.5% Sodium Deoxycholate, with 150 mM sodium chloride (NaCl) in a 50 mM solution of Tris-HCl at pH 7.4) with freshly added protease inhibitors (2  $\mu$ g/mL Apoptin A, 10  $\mu$ g/mL Leupeptin, 1  $\mu$ g/mL pepstatin, 200  $\mu$ M sodium orthovanadate, 1 mM sodium fluoride (NaF), 1 mM phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF) and 1 mM dithiothreitol (DTT) was added. Samples were incubated on ice for 30 min and subsequently centrifuged at  $15,000\times g$  for 15 min at 4 °C.

Proteins (50  $\mu$ g) were resolved in 12% acrylamide/bisacrylamide (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) gels with 15-lane combs and 1.5 mm spacer crystals in which 50  $\mu$ g of protein from each sample was loaded with 4 $\times$  loading buffer (250 mM Tris-HCl pH 6.8, 40% glycerol, 8% SDS, 0.2% bromophenol blue, 28  $\mu$ L/mL  $\beta$ -mercaptoethanol). Electrophoresis and transfer were performed in a Miniprotein3 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Once the electrophoresis was performed, proteins were transferred to PVDF immobilon-P membranes (Millipore, Burlington, MA, USA). Subsequently, membranes were stained with a solution containing 0.1% (w/v) Ponceau in 5% acetic acid (v/v) (Bioquochem, Siero, Asturias, Spain) and blocked for one hour in a 5% solution of non-fat milk powder (BD, Sparks, MD, USA) in TBS-T (Tris-HCl, 20 mM, 137 mM NaCl, and 0.05% Tween-20 pH 7.4). After blocking the membranes were incubated with the primary antibodies at 4 °C overnight using the concentrations indicated in the following table (Table 1).

**Table 1.** Anti-human antibodies employed for Western blot (WB), immunocytochemistry (ICC) and immunohistochemistry (IHC).

Antibody	Company	Reference	Lot#	(Conc.)
Catalase (CAT)	Calbiochem	219010	A00056904	1:5000
SOD2/MnSOD	Millipore	06-984	2557606	1:5000
Thioredoxin (TRX1)	YMCO	ATR-06		1:1000
CDK-1 (A-17)	Abcam	Ab18	GR3186726-2	1:1000
Cyclin B1 (EPR170609)	Abcam	Ab181593	GR238750-21	1:2000
$\beta$ -Actin (AC-15) (ACTB1)	Santa Cruz	SC-69879	C2818	1:8000
$\alpha$ -Tubulin (B-5-1-2)	Santa Cruz	SC-23948	B0212	1:1000
Anti-mouse	Millipore	12-349	2722855	
Anti-rabbit	Millipore	12-348	3166073	

#### 4.9. Catalase Activity Native Gel

Cells were seeded in 100 mm plates until they reached 75–80% confluence. Then, melatonin at 0.1 mM, 0.5 mM, or 1 mM was added. After 24 h, cells were harvested by trypsinization, centrifuged for 5 min at  $500\times g$ , resuspended in PBS supplemented with 0.5% IGEPAL C and incubated on ice for

30 min. After centrifuging lysate for 15 min at 15,000× *g*, supernatant was transferred to another tube and protein quantification was performed using the Bradford method. After electrophoresis gels were washed in milli-Q water to remove the remaining buffer and incubated for 10 min in 0.003% hydrogen peroxide (Sigma). Hydrogen peroxide was then removed and two staining solutions containing 2% ferric chloride and, 2% potassium ferrocyanide were added until white bands showing the catalase activity were displayed at in the expected native protein weight (i.e., 233 kD). Reaction was stopped by removing the stain and washing with milli-Q water. Gels were scanned, and band intensity was quantitated by densitometry, using the ImageJ software (version 1.49P, NIH, Bethesda, MD, USA) downloaded from the following link <https://imagej.nih.gov/ij/index.html>.

#### 4.10. RNA Isolation and qPCR Analysis

For RNA isolation, cells pellet was homogenized and extracted using Tri-Reagent procedure (Sigma) according to the manufacture protocol, next we quantized the total concentration and analyzed their stability in agarose gel. cDNA was synthesized from 1 µg of RNA extraction using NG dART RT-PCR kit (EURx, Gdansk, Przyrodników, Poland) according to the manufacture protocol. For qPCR analysis, samples of cDNA were run in triplicates using a dilution 1:10 and carried out using SYBER Green Master Mix (Applied Biosystem, Foster city, CA, USA), for this purpose we are using a sequence-specific primers with the following sequences (Table 2).

**Table 2.** Primers sequences used for the indicated murine genes.

Gen	Forward Primer	Reverse Primer
β-Actin	5'-GGCTGTATACCCCTCCAT-3'	5'-CCAGTTGGTAACAATGCCATG-3'
α-Tubulin	5'-TCGATATTGAGCGTCCAACCT-3'	5'-CAAAGGCAACAATGCCATGT-3'

#### 4.11. Immunocytochemistry

Cells were seeded over cell imaging cover glasses (Eppendorf). After the treatments, cells were washed in PBS and fixed in 4% paraformaldehyde in 0.1M phosphate buffer pH: 7.4 for 10 min at room temperature (RT). After fixation, cells were washed thrice in PBS, permeabilized and blocked with a solution containing 0.15% Tween-20 and 0.5% BSA for 30 min at RT. Once blocking solution was removed, and specific monoclonal antibody anti-α-tubulin (1:200) or mycotoxin phalloidin (1:500) was added and incubated overnight at 4 °C in a humid chamber. The next day, cells were washed in PBS and incubated with Goat anti-mouse fluorescent secondary antibody (Alexa Fluor 488, 1:500) for 1 h at RT. After incubation, cells were washed in PBS and the nuclei were stained with 4', 6-diamino-2-phenylindole (DAPI) at a concentration of 1 µg/mL for 5 min at RT. Finally, the culture chamber was removed, and slides were mounted using Fluoromont G (Dako, Produktionsvej, Glostrup, Denmark). For the estimation of the globular (G): polymerized actin (F) ratio we carried out a protocol based on Deoxyribonuclease I kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) in combination with phalloidin staining.

#### 4.12. Quantification of Mitosis Number

To calculate the number of mitosis present in the cell culture after treatment with melatonin, DAPI images from immunocytochemistry were used and the ratio between the number of mitosis respect to the total number of cells was calculated, analyzing a total of 18 fields per experimental group.

#### 4.13. Cell Volume Analysis

To calculate the in situ cell volume in cultured cells, we used a protocol previously developed by our research group, with minor modifications. To this aim, confocal microscopy micrographs of phalloidin staining samples, taken at a final 200× magnifications, were processed using the Imaris image processing software (Bitplane, Oxford instruments, Belfast, UK).

#### 4.14. Animal Models

All the experiments were designed with the approval (07/15/2016) of the ethical committee on animal experimentation of the University of Oviedo (PROAE 32/2016). Likewise, surgical and treatment procedures applied were carried out following the European Directive 2012/63/EU. To carry out the experiments, a cohort of 24, 10 week-old mice (*Mus musculus*) on a C57BL/6J genetic background were acquired from Charles River (Wilmington, MA, USA). This genetic background was chosen given the inability of these animals to produce melatonin, since they present a truncated form of the enzyme aril-alkylamine-N-Acetyltransferase (AANAT), the key enzyme in the synthesis of indole. All the animals were identified, housed individually and maintained under a 12:12 light dark cycle with food and water provided ad libitum. Lung metastasis from melanoma cells was induced by injection of B16-F10 cells in the tail vein, using a well-reported protocol. In all the experiments, animals were sacrificed 15 days after injection. Blood was collected by cardiac puncture and then part of both lungs were dissected and fixed overnight in a solution containing paraformaldehyde 4% in phosphate buffer 0.1M, pH 7.4. Subsequently, tissues were embedded in paraffin and 5  $\mu$ m sections were obtained and stained with hematoxylin/eosin. Additionally, metastasis present in the lungs were isolated by microsurgery and frozen in liquid nitrogen to perform molecular biology studies.

#### 4.15. Injection of Cells

When B16-F10 cells were confluent, they were trypsinized following the method described above. Cells were then counted in a hemocytometer and resuspended in DMEM medium without supplements at a final concentration of  $10^6$  cells/mL. From this suspension,  $2 \times 10^5$  cells were injected into the tail vein of each mouse.

#### 4.16. In Vivo Luciferase Imaging

Bioluminescence imaging was performed with an IVIS imaging system (Xenogen Corp, Alameda, CA, USA). After 10 days of cell injection, mice were IP injected with D-Luciferin potassium salt (Perkin Elmer, MA, USA) at 150 mg/Kg body weight, under isoflurane anesthesia (Zoetis, NJ, USA). Luminescence was measured 5 min after the injection, taking anatomical images in Dorsal, Lateral and Ventral position of each animal.

#### 4.17. Macroscopic and Microscopic Quantification of Pulmonary Metastasis

For the quantification of the surface occupied by melanoma metastasis in relation to the pulmonary surface, two macros were designed for the free image J software. These tools allow an automatic analysis of the surface of each of the metastasis, as well as the surface occupied by lung tissue both macroscopically and microscopically.

#### 4.18. Tumor Model with Intraperitoneal Melatonin (IP)

To perform the melanoma tumor model in vivo, animal cohort was divided into two experimental groups. For visualization four animals of both experimental groups received the injection of luciferase-transformed B16-F10 cells, which were kindly provided by Dr. López-Otín. The other group of 20 animals were injected with parental B16-F10 cells. Both groups were equally divided into treatment and control groups. Treated group were administered melatonin daily at a dose of 20 mg/kg body weight by intraperitoneal (IP) injection was performed two hours before the dark phase. Control group was administered a vehicle (10% ethanol).

#### 4.19. Tumor Model with Melatonin in Drinking Water

For the realization of the melanoma tumor model in vivo another cohort of 16 animals C57BL/6J was equally divided into two groups to which B16-F10 cells transformed with luciferin were administered. One of the groups was administered melatonin at a dose of 20 mg/kg of body weight in the drinking



water, while the control group was administered vehicle (10% ethanol). The amount of water consumed was recorded every two days and animals were sacrificed 15 days after the injection of the cells.

## 5. Conclusions

In view of these results, we can conclude that melatonin meets an antitumor papal in the in vitro model of melanoma B16-F10 carried out for its antiproliferative action, reducing the growth rate of cells and reducing their ability to migrate, which seems to be directly related to the presence of indole and its receptor-mediated effect, which would trigger an alteration of the cell cycle and cell cytoskeleton, not happening in murine models.

**Supplementary Materials:** Supplementary materials can be found at <http://www.mdpi.com/1422-0067/21/2/548/s1>.

**Author Contributions:** Conceptualization, R.M.S. and J.C.M.; methodology, F.-A.-N., V.C., and S.F.-V.; investigation, A.A.-A.; writing—original draft preparation, A.A.-A. and J.C.-M.; writing—review and editing, P.G.-M. and R.C.-C.; funding acquisition, R.M.S., J.C.M., I.Q.-G. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** A.A.-A. is currently supported by “Ayudas predoctorales para la realización de tesis doctorales modalidad A” (PAPI-18-PF-06), grant from Oviedo University. V.C. is currently supported by JPI HDHL SALIVAGES, grant from “Ministerio de Economía y Competitividad, Gobierno de España”. F.A.-N. is currently supported by “Contrato asociado a Proyecto de investigación” (PC-GRUPIN-IDI/2018/000239), grant from “Fundación para el fomento en Asturias de la Investigación Científica Aplicada y la Tecnología (FYCIT).” This work was supported by grant from “Ministerio de Economía y Competitividad, Gobierno de España” (MINECO-17-PCIN-2016-164).

**Acknowledgments:** We thank Marta Alonso-Guervos of the Unit of image processing and photonic microscopy of the University of Oviedo for their kind help with the confocal microscopy. We also thanks to the Molecular histopathology unit in cancer animal models of the “Instituto Universitario de Oncología del Principado de Asturias” (IUOPA), for his kind help with the paraffin sections and staining.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Mayo, J.C.; Sainz, R.M.; Uría, H.; Antolín, I.; Estéban, M.M.; Rodríguez, C. Inhibition of Cell Proliferation: A Mechanism Likely to Mediate the Prevention of Neuronal Cell Death by Melatonin. *J. Pineal Res.* **1998**, *25*, 12–18. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Djeridane, Y.; Touitou, Y. Melatonin Synthesis in the Rat Harderian Gland: Age- and Time-Related Effects. *Exp. Eye Res.* **2001**, *72*, 487–492. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Iuvone, M.M.; Brown, A.D.; Haque, R.; Weller, J.; Zawilska, J.B.; Chaurasia, S.S.; Ma, M.; Klein, D.C. Retinal Melatonin Production: Role of Proteasomal Proteolysis in Circadian and Photic Control of Arylalkylamine N-Acetyltransferase. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2002**, *43*, 564–572.
4. Mukherjee, S.; Maitra, S.K. Gut Melatonin in Vertebrates: Chronobiology and Physiology. *Front. Endocrinol.* **2015**, *6*, 1–5. [[CrossRef](#)]
5. Lv, D.; Cui, P.L.; Yao, S.W.; Xu, Y.Q.; Yang, Z.X. Melatonin Inhibits the Expression of Vascular Endothelial Growth Factor in Pancreatic Cancer Cells. *Chin. J. Cancer Res.* **2012**, *24*, 310–316. [[CrossRef](#)]
6. Tan, D.X.; Hardeland, R.; Back, K.; Manchester, L.C.; Alatorre-Jimenez, M.A.; Reiter, R.J. On the Significance of an Alternate Pathway of Melatonin Synthesis via 5-Methoxytryptamine: Comparisons across Species. *J. Pineal Res.* **2016**, *61*, 27–40. [[CrossRef](#)]
7. Zisapel, N. New Perspectives on the Role of Melatonin in Human Sleep, Circadian Rhythms and Their Regulation. *Br. J. Pharmacol.* **2018**, *175*, 3190–3199. [[CrossRef](#)]
8. Reiter, R.J.; Tan, D.-X.; Manchester, L.C.; Paredes, S.D.; Mayo, J.C.; Sainz, R.M. Melatonin and Reproduction Revisited. *Biol. Reprod.* **2009**, *81*, 445–456. [[CrossRef](#)]
9. Dubocovich, M.L. Melatonin Receptors: Role on Sleep and Circadian Rhythm Regulation. *Sleep Med.* **2007**, *8*, 34–42. [[CrossRef](#)]
10. Reiter, R.J.; Tan, D.X.; Manchester, L.C.; Pilar Terron, M.; Flores, L.J.; Koppisepi, S. Medical Implications of Melatonin: Receptor-Mediated and Receptor-Independent Actions. *Adv. Med. Sci.* **2007**, *52*, 11–28.

11. Mediavilla, M.D.; Cos, S.; Sánchez-Barceló, E.J. Melatonin Increases P53 and P21WAF1 Expression in MCF-7 Human Breast Cancer Cells in Vitro. *Life Sci.* **1999**, *65*, 415–420. [[CrossRef](#)]
12. Farriol, M.; Venereo, Y.; Orta, X.; Castellanos, J.M.; Segovia-Silvestre, T. In Vitro Effects of Melatonin on Cell Proliferation in a Colon Adenocarcinoma Line. *J. Appl. Toxicol.* **2000**, *20*, 21–24. [[CrossRef](#)]
13. Futagami, M.; Sato, S.; Sakamoto, T.; Yokoyama, Y.; Saito, Y. Effects of Melatonin on the Proliferation and Cis-Diamminedichloroplatinum (CDDP) Sensitivity of Cultured Human Ovarian Cancer Cells. *Gynecol. Oncol.* **2001**, *82*, 544–549. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Srinivasan, V.; Spence, D.W.; Pandi-Perumal, S.R.; Trakht, I.; Cardinali, D.P. Therapeutic Actions of Melatonin in Cancer: Possible Mechanisms. *Integr. Cancer Ther.* **2008**, *7*, 189–203. [[CrossRef](#)]
15. Rodríguez-García, A.; Mayo, J.C.; Hevia, D.; Quiros-Gonzalez, I.; Navarro, M.; Sainz, R.M. Phenotypic Changes Caused by Melatonin Increased Sensitivity of Prostate Cancer Cells to Cytokine-Induced Apoptosis. *J. Pineal Res.* **2013**, *54*, 33–45. [[CrossRef](#)]
16. Blask, D.E.; Dauchy, R.T.; Sauer, L.A.; Krause, J.A. Melatonin Uptake and Growth Prevention in Rat Hepatoma 7288CTC in Response to Dietary Melatonin: Melatonin Receptor-Mediated Inhibition of Tumor Linoleic Acid Metabolism to the Growth Signaling Molecule 13-Hydroxyoctadecadienoic Acid and the Potential Role. *Carcinogenesis* **2004**, *25*, 951–960. [[CrossRef](#)]
17. Cabrera, J.; Negrín, G.; Estévez, F.; Loro, J.; Reiter, R.J.; Quintana, J. Melatonin Decreases Cell Proliferation and Induces Melanogenesis in Human Melanoma SK-MEL-1 Cells. *J. Pineal Res.* **2010**, *49*, 45–54. [[CrossRef](#)]
18. Blask, D.E.; Hill, S.M. Effects of Melatonin on Cancer: Studies on MCF-7 Human Breast Cancer Cells in Culture. *J. Neural Transm. Suppl.* **1986**, *21*, 433–449.
19. Čmielová, J.; Řezáčová, M. Protein and Its Function Based on a Subcellular Localization. *J. Cell. Biochem.* **2011**, *112*, 3502–3506. [[CrossRef](#)]
20. Rimler, A.; Culig, Z.; Lupowitz, Z.; Zisapel, N. Nuclear Exclusion of the Androgen Receptor by Melatonin. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2002**, *81*, 77–84. [[CrossRef](#)]
21. Sainz, R.M.M.; Mayo, J.C.C.; Tan, D.X.; Leo, J.; Manchester, L.; Reiter, R.J.J.; León, J.; Manchester, L.; Reiter, R.J.J. Melatonin Reduces Prostate Cancer Cell Growth Leading to Neuroendocrine Differentiation via a Receptor and PKA Independent Mechanism. *Prostate* **2005**, *63*, 29–43. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Boer, M.; Duchnik, E.; Maleszka, R.; Marchlewicz, M. Structural and Biophysical Characteristics of Human Skin in Maintaining Proper Epidermal Barrier Function. *Postep. Dermatol. Alergol.* **2016**, *33*, 1–5. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Wang, S.Q.; Setlow, R.; Berwick, M.; Polsky, D.; Marghoob, A.A.; Kopf, A.W.; Bart, R.S. Ultraviolet A and Melanoma: A Review. *J. Am. Acad. Dermatol.* **2001**, *44*, 837–846. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Tas, F. Metastatic Behavior in Melanoma: Timing, Pattern, Survival, and Influencing Factors. *J. Oncol.* **2012**, *2012*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Stanienda-Sokół, K.; Salwowska, N.; Sławińska, M.; Wicherska-Pawlowska, K.; Lorenc, A.; Wcisło-Dziadecka, D.; Wydmański, J.; Majewski, W. Primary Locations of Malignant Melanoma Lesions Depending on Patients' Gender and Age. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* **2017**, *18*, 3081–3086.
26. National Cancer Institute. No Title. Available online: <http://www.cancer.gov/espanol/tipos/piel/protratamiento-piel-pdq> (accessed on 11 February 2016).
27. Janjetovic, Z.; Jarrett, S.G.; Lee, E.F.; Duprey, C.; Reiter, R.J.; Slominski, A.T. Melatonin and Its Metabolites Protect Human Melanocytes against UVB-Induced Damage: Involvement of NRF2-Mediated Pathways. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 1–13. [[CrossRef](#)]
28. Kim, H.S.; Kim, T.-J.; Yoo, Y.-M. Melatonin Combined with Endoplasmic Reticulum Stress Induces Cell Death via the PI3K/Akt/MTOR Pathway in B16F10 Melanoma Cells. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e92627. [[CrossRef](#)]
29. Huang, G.X.; Wang, Y.; Su, J.; Zhou, P.; Li, B.; Yin, L.J.; Lu, J. Up-Regulation of Rho-Associated Kinase 1/2 by Glucocorticoids Promotes Migration, Invasion and Metastasis of Melanoma. *Cancer Lett.* **2017**, *410*, 1–11. [[CrossRef](#)]
30. Hevia, D.; Sainz, R.M.; Blanco, D.; Quirós, I.; Tan, D.X.; Rodríguez, C.; Mayo, J.C. Melatonin Uptake in Prostate Cancer Cells: Intracellular Transport versus Simple Passive Diffusion. *J. Pineal Res.* **2008**, *45*, 247–257. [[CrossRef](#)]
31. Cutando, A.; López-Valverde, A.; Arias-Santiago, S.; De Vicente, J.; De Diego, R.G. Role of Melatonin in Cancer Treatment. *Anticancer Res.* **2012**, *32*, 2747–2754.

32. Hill, S.M.; Belancio, V.P.; Dauchy, R.T.; Xiang, S.; Brimer, S.; Mao, L.; Hauch, A.; Lundberg, P.W.; Summers, W.; Yuan, L.; et al. Melatonin: An Inhibitor of Breast Cancer. *Endocr. Relat. Cancer* **2015**, *22*, R183–R204. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Benítez-King, G. Melatonin as a Cytoskeletal Modulator: Implications for Cell Physiology and Disease. *J. Pineal Res.* **2006**, *40*, 1–9. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Chovancova, B.; Hudcova, S.; Lencesova, L.; Babula, P.; Rezuchova, I.; Penesova, A.; Grman, M.; Moravcik, R.; Zeman, M.; Krizanova, O. Melatonin-Induced Changes in Cytosolic Calcium Might Be Responsible for Apoptosis Induction in Tumour Cells. *Cell. Physiol. Biochem.* **2017**, *44*, 763–777. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Plaimee, P.; Weerapreeyakul, N.; Thumanu, K.; Tanthanuch, W.; Barusrux, S. Melatonin Induces Apoptosis through Biomolecular Changes, in SK-LU-1 Human Lung Adenocarcinoma Cells. *Cell Prolif.* **2014**, *47*, 564–577. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Song, J.; Ma, S.J.; Luo, J.H.; Zhang, H.; Wang, R.X.; Liu, H.; Li, L.; Zhang, Z.G.; Zhou, R.X. Melatonin Induces the Apoptosis and Inhibits the Proliferation of Human Gastric Cancer Cells via Blockade of the AKT/MDM2 Pathway. *Oncol. Rep.* **2018**, *39*, 1975–1983. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Martín-Renedo, J.; Mauriz, J.L.; Jorquera, F.; Ruiz-Andrés, O.; González, P.; González-Gallego, J. Melatonin Induces Cell Cycle Arrest and Apoptosis in Hepatocarcinoma HepG2 Cell Line. *J. Pineal Res.* **2008**, *45*, 532–540. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Benítez-King, G.; Huerto-Delgadillo, L.; Antón-Tay, F. Melatonin Effects on the Cytoskeletal Organization of MDCK and Neuroblastoma N1E-115 Cells. *J. Pineal Res.* **1990**, *9*, 209–220. [[CrossRef](#)]
39. Ramírez-Rodríguez, G.B.; Olvera-Hernández, S.; Vega-Rivera, N.M.; Ortiz-López, L. Melatonin Influences Structural Plasticity in the Axons of Granule Cells in the Dentate Gyrus of Balb/C Mice. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 73. [[CrossRef](#)]
40. Vermeij, W.P.; Backendorf, C. Skin Cornification Proteins Provide Global Link between ROS Detoxification and Cell Migration during Wound Healing. *PLoS ONE* **2010**, *5*, e11957. [[CrossRef](#)]
41. Chen, X.; Wang, Z.; Ma, H.; Zhang, S.; Yang, H.; Wang, H.; Fang, Z. Melatonin Attenuates Hypoxia-Induced Epithelial-Mesenchymal Transition and Cell Aggressive via Smad7/ CCL20 in Glioma. *Oncotarget* **2017**, *8*, 93580–93592. [[CrossRef](#)]
42. Sierra, H.; Cordova, M.; Chen CS, J.; Rajadhyaksha, M. Confocal Imaging-Guided Laser Ablation of Basal Cell Carcinomas: An Ex Vivo Study. *J. Investig. Dermatol.* **2015**, *135*, 612–615. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Mayo, J.C.; Hevia, D.; Quiros-Gonzalez, I.; Rodriguez-Garcia, A.; Gonzalez-Menendez, P.; Cepas, V.; Gonzalez-Pola, I.; Sainz, R.M. IGFBP3 and MAPK/ERK Signaling Mediates Melatonin-Induced Antitumor Activity in Prostate Cancer. *J. Pineal Res.* **2017**, *62*, e12373. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Bondy, S.C.; Campbell, A. Mechanisms Underlying Tumor Suppressive Properties of Melatonin. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 2205. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Bradford, M.M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248–254. [[CrossRef](#)]



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Review

# Melatonin Uptake by Cells: An Answer to Its Relationship with Glucose?

Juan C. Mayo <sup>1,2,\*</sup> , Arturo Aguado <sup>1</sup>, Rafael Cernuda-Cernuda <sup>1</sup>, Alejandro Álvarez-Artme <sup>1,2</sup>, Vanesa Cepas <sup>1,2</sup>, Isabel Quirós-González <sup>1,2</sup>, David Hevia <sup>1,2</sup> and Rosa M. Sáinz <sup>1,2</sup> 

<sup>1</sup> Departamento de Morfología y Biología Celular, Facultad de Medicina, Universidad de Oviedo, 33006 Oviedo, Spain; arturoaguadog@gmail.com (A.A.); rcernuda@uniovi.es (R.C.-C.); alejandroalvarezartime@gmail.com (A.Á.A.); cepasvanesa@uniovi.es (V.C.); quirosisabel@uniovi.es (I.Q.-G.); heviadavid@uniovi.es (D.H.), sainzrosa@uniovi.es (R.M.S.)

<sup>2</sup> Instituto Universitario Oncológico del Principado de Asturias, Universidad de Oviedo; 33006 Oviedo, Spain

\* Correspondence: mayojuan@uniovi.es; Tel.: +34-985-103-610

Received: 3 July 2018; Accepted: 6 August 2018; Published: 10 August 2018



**Abstract:** Melatonin, *N*-acetyl-5-methoxytryptamine, is an indole mainly synthesized from tryptophan in the pineal gland and secreted exclusively during the night in all the animals reported to date. While the pineal gland is the major source responsible for this night rise, it is not at all the exclusive production site and many other tissues and organs produce melatonin as well. Likewise, melatonin is not restricted to vertebrates, as its presence has been reported in almost all the phyla from protozoa to mammals. Melatonin displays a large set of functions including adaptation to light: dark cycles, free radical scavenging ability, antioxidant enzyme modulation, immunomodulatory actions or differentiation–proliferation regulatory effects, among others. However, in addition to those important functions, this evolutionary ‘ancient’ molecule still hides further tools with important cellular implications. The major goal of the present review is to discuss the data and experiments that have addressed the relationship between the indole and glucose. Classically, the pineal gland and a pinealectomy were associated with glucose homeostasis even before melatonin was chemically isolated. Numerous reports have provided the molecular components underlying the regulatory actions of melatonin on insulin secretion in pancreatic beta-cells, mainly involving membrane receptors MTNR1A/B, which would be partially responsible for the circadian rhythmicity of insulin in the organism. More recently, a new line of evidence has shown that glucose transporters GLUT/SLC2A are linked to melatonin uptake and its cellular internalization. Beside its binding to membrane receptors, melatonin transportation into the cytoplasm, required for its free radical scavenging abilities, still generates a great deal of debate. Thus, GLUT transporters might constitute at least one of the keys to explain the relationship between glucose and melatonin. These and other potential mechanisms responsible for such interaction are also discussed here.

**Keywords:** melatonin; glucose; GLUT/SLC2A; metabolism; insulin

## 1. Melatonin: A Universal and Ubiquitous Molecule

Melatonin, chemically *N*-acetyl-5-methoxytryptamine, was first isolated and further characterized by Lerner and co-workers in the late 1950s [1,2]. However, 40 years before, in 1917, McCord and Allen reported for the first time the ability of cow pineal extracts to lighten tadpoles when they were fed with them [3]. This clue was further exploited by Lerner and co-workers who coined the name ‘melatonin’ for this substance, a portmanteau from ‘mela’ (able to lighten) and ‘tonin’ because of its derived from serotonin. As a consequence, this could be considered the first, and yet minor, function attributed to the indole. Two years later, Axelrod and Weissbach identified the rate limiting synthetic enzymes, namely *N*-acetyl-transferase (aralkylamine-NAT, AANAT) and hydroxyindole-*O*-methyl-transferase (acetylserotonin *O*-methyl transferase or ASMT/HIOMT), which control melatonin synthesis from tryptophan in the pineal [4]. This epithalamic gland is responsible for melatonin nocturnal serum rise,

while light signals, transduced by the retina and transmitted via suprachiasmatic nuclei, constitute its major synthesis inhibitor [5,6]. Due to its association with the day: night cycle melatonin was rapidly associated with the regulation of circadian rhythms and further shown to modulate reproduction in seasonal breeding animals by adapting their physiology to external photoperiodic conditions [7,8], an evolutionarily acquired mechanism that ensures offspring survival [9,10]. Duration and intensity of light regulate melatonin production [11,12] and nocturnal production decays with age [13,14]. This fact prompted the further investigation of melatonin effects on aging and neurodegeneration [15–18]. In addition to this important function, it has also been linked to other important roles including immunomodulation or anti-cancer actions [19–24].

Melatonin production was initially thought to be restricted to the pineal gland, but pinealectomies did not completely remove it in rodents. Highly sensitive detection methods revealed that about 20% of normal levels was still present in serum or urine, although these basal levels were not modified by light–dark rhythms [25]. In 1965, Quay first showed in a pioneer study the existence of HIOMT (now ASMT) in both retina and pineal gland and, later on, the same activity was also demonstrated in the orbital Harderian gland [26]. Years later, Bubenik’s and Kvetnoy’s groups were the first to show that melatonin can be localized outside the pineal gland [27,28]. Thus, retina, cerebellum and the enterochromaffin cells, the latter as part of the APUD system (now commonly referred to as ‘diffuse endocrine system’), were the first organs/cells in which authors showed the potential local production of melatonin. Soon after that, the Harderian gland was also found to demonstrate an immunopositive reaction to melatonin [29], thus corroborating the findings mentioned above. However, in all these studies the demonstration included non-analytical detection strategies, but rather was based on the immunohistochemical detection of either synthetic enzymes (AANAT/ASMT) or melatonin itself. Even though this methodology could generate some doubts, these first findings definitively boosted the search for new sites of melatonin synthesis. The introduction of radioimmunoassay (RIA) [30] was necessary to reinforce evidence about the presence of extra-pineal melatonin, particularly after the discovery of  $^{125}\text{I}$ -radiolabeled melatonin as a tracer [31,32]. Not only did this technique allow the quantification of serum melatonin, but it also allowed the discovery of high-affinity melatonin-binding sites in rat synaptosomal preparations [33], as well as in the brain of other species, including human suprachiasmatic nuclei [34–36].

Thanks to the use of RIA and more recently to high-performance liquid chromatography (HPLC) [30,37], the production of the indole has been accurately assayed in several tissues and organs including the retina, Harderian glands, gut, testis or skin, among many others, but these local productions do not seem to contribute to the nocturnal serum levels [38]. The extra-pineal sites of melatonin production and the corresponding references are summarized in Table 1. Among these extracellular sites of melatonin production, one of the first organs reported in which melatonin is thought to play a local key function was the retina [27]. Additionally, two other sites of production appear to be of particular importance, i.e., the gut and the skin, due to the relatively high amount and also the key physiological function played [39–42]. At least in the skin, melatonin synthesis can take a shortcut through an AANAT-independent pathway involving alternative enzymes [43].

In addition to the ubiquitous presence of melatonin in so many tissues, the indole has been identified in evolutionarily different organisms. One of the breakthrough discoveries in this field was made by Hardeland’s group, who first discovered the indole as well as its synthesis in the dinoflagellate *Lyngulodinium polyedrum* (syn *Gonyaulax polyedra*) [44]. Melatonin appears to be present at least in some bacteria (*Rodospirillum rubrum*) [45], unicellular phyla [46,47] as well as in *Saccharomyces cerevisiae* [48]. Likewise, the presence of melatonin in Arthropoda, Nematoda, nemertine worms or Gastropoda, among others, have also been shown [49–53]. More surprisingly, the discovery in fungi [53] and in vascular plants [54,55] has now attracted the attention of researchers to many other groups, and melatonin has been found in red and brown algae (Rhodophyta, Phaeophyta), green algae and land plants (Viridiplantae) [56–59]. This brings out the question of the ancient and basic role(s) that melatonin seems to play in all these organisms, likely preceding the more “modern” circadian-related actions [57,60]. The presence of melatonin in the different phyla of invertebrates is shown in Table 2.

**Table 1.** Extra-pineal sites of melatonin production reported to date.

Organ/Tissue	Strategy	Original Reference(s)
Retina, cerebellum	Immunohistochemical localization of aaNAT	Bubenik et al. (1974) [27]; Quay (1983) [61].
Gut (Enterochromaffin cells)	Frog skin melanophores lightening of enterochromaffin cells extracts	Raikhlin et al. (1975) [28]; Raikhlin & Kvetnoy (1976) [62]
Airway epithelium, adrenal, thyroid gland, liver, renal cortex, gallbladder, inner ear, ovary, endometrium, placenta, mast cells, NK cells, eosinophils, thymus	Immunohistochemistry	Raikhlin et al. (1975) [28]; Raikhlin & Kvetnoy (1994) [63]; Kvetnoy et al. (2001) [64]
Harderian gland	NAT/ASMT enzymatic activities, immunohistochemical localization, RIA, NAT and ASMT enzymatic activities, immunohistochemistry of melatonin	Cardinali & Wurtman (1972) [26]; Bubenik et al. (1976a y 1976b) [29,65]; Pang et al. (1977) [66]; Menéndez-Peláez et al. (1987) [67]; Bubenik, G.A. (1980) [68]
Digestive tract		
Cochlea (inner ear)	RIA, TLC (detection of radio-labelled metabolites after primary culture in medium supplemented with [ <sup>14</sup> C]5-HT) Direct enzyme-linked immunosorbent assay	Biesalski et al. (1988) [69]; López-González et al. (1997) [70]
Peripheral blood mononuclear cell (PBMCs)	HPLC, TLC, Mass Spectrometry, RIA	Finocchiaro et al. (1991) [71]
Eye	Ciliary body	HPLC (electrochemical detection), NAT/ASMT enzymatic activities
	Crystalline	RIA, HPLC (for precursors), NAT/ASMT enzymatic activities
Skin	HPLC (fluorometric detection), Mass spectrometry, NAT/ASMT activity and expression (RT-PCR)	Slominski et al. (1996; 2002) [73,74]
Testis	TLC, NAT/ASMT enzymatic activities	Tijmes et al. (1996) [75]
Ovary	HPLC (fluorometric detection), RIA, NAT/ASMT enzymatic activities	Itoh et al. (1997; 1999) [76,77].
Bone marrow	RIA, HPLC (electrochemical detection), Mass spectrometry Immunocytochemistry, NAT enzymatic activity, ASMT expression	Tan et al. (1999) [78]; Conti et al. (2000) [79]
Thymus, spleen, lung, heart, kidney, muscle, liver, stomach, gut, testis, spinal cord, brain, platelets	NAT/ASMT expression	Stefulj et al. (2001) [79]
Thymus	HPLC (fluorometric detection), NAT/ASMT enzymatic activities	Jiménez-Jorge et al. (2005) [79]
Lymphocytes	HPLC (fluorometric detection), NAT/ASMT activity and expression	Carrillo-Vico et al. (2004) [80]
Placenta	NAT/ASMT expression (RT-PCR)	Iwasaki et al. (2005) [81]
Liver, kidney, heart	ELISA, NAT/ASMT expression (RT-PCR)	Sánchez-Hidalgo et al. (2009) [81]
Mast cells	ELISA, NAT/ASMT activity and expression (RT-PCR)	Maldonado et al. (2010) [82]

Table 2. Melatonin in microorganisms and invertebrates.

Organism	Strategy for Detection	Original Reference(s)
<b>EUBACTERIA</b>		
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	RIA	Manchester et al. (1995) [45]
<i>Erythrobacter longus</i>	RIA	Tilden et al. (1997) [83]
<i>Bacillus</i> sp.	UPLC-MS/MS	Jiao et al. (2016) [84]
<i>Euglena gracilis</i>	HPLC	Balzer et al. (1996) [85]
<b>PROTISTS</b>		
<b>Lingulodinium (syn Gonyaulax) polyedra (Dinoflagellate)</b>	HPLC	Poeggeler and Hardeland (1994) [86]
<b>Saccharomyces cerevisiae (Yeast)</b>	HPLC	Sprenger et al. (1999) [87]
<i>Euglena gracilis</i>	HPLC	Pandi-Perumal and Cardinali (2007) [87]
<i>Trypanosoma cruzi</i>	RIA	Macías et al. (1999) [47]
Other Dinoflagellates including: <i>Alexandrium</i> (sp.), <i>Ceratium horridum</i> , <i>Amphidinium carterae</i> , <i>Pyrocystis lunula</i> , <i>Noctiluca scintillans</i>	HPLC/RIA	Data obtained from abstracts or proceedings
Ciliates: <i>Tetrahymena thermophila</i>	HPLC	Kohidai et al. (2003) [88]
<b>LOWER INVERTEBRATES</b>		
<i>Dugesia japonica</i>	Biosynthetic enzymes	Itoh et al. (1999) [89]
<i>Caenorhabditis elegans</i>	Biosynthetic enzymes	Migliori et al. (2012) [90]
<i>Lumbricus terrestris</i>	Spectrophotometry	Subaraja and Vanisree (2016) [91]
<b>ARTHROPODA</b>		
<i>Locusta migratoria</i>	RIA	Vivien-Roels et al. (1984) [49]
<i>Drosophila melanogaster</i> , <i>Periplaneta americana</i>	TLC	Finocchiaro et al. (1988) [92]; Richter et al. (2000) [93]
<i>Musa autumnalis</i>	RIA	Wetterberg et al. (1987) [94]
<i>Daphnia magna</i>	ELISA/IHC	Markowska et al. (2009) [95]
Decapoda: <i>Carcinus maenas</i> , <i>Uca pugilator</i> , <i>Nephrops norvegicus</i> , <i>Procambarus</i> sp., <i>Neohelice granulata</i> , <i>Eriocheir sinensis</i>	RIA/HPLC	Vivien-Roels and Pevet (1993) [96]; Tilden et al. (1997) [97]; Aguzzi et al. (2009) [98]; Farca-Luna et al. (2010) [99]; Maciel et al. (2014) [100]; Yang et al. (2018) [101]
<b>COELENTERATES</b>		
<i>Renilla koellikeri</i>	RIA	Mechawar and Anctil (1997) [102]
<b>MOLLUSCA</b>		
<i>Aplysia californica</i>	HPLC	Abran et al. (1994) [103]
<i>Sepia officinalis</i>	RIA	Vivien-Roels and Pevet (1986) [52]

The antioxidant properties of melatonin, discovered in the early 1990s [104] has opened a new research line that has highlighted the important cytoprotective actions of the indole in almost every single organ, tissue and cell type [105], with important clinical implications in neurodegeneration, cancer or ischemia-reperfusion related pathologies. Similarly, melatonin might also show protection against stress-related challenges in plants [43]. Melatonin reaction with free radicals give different metabolites, namely cyclic 3-OH-melatonin, *N*(1)-acetyl-*N*(2)-formyl-5-methoxykynuramine (AFMK) and *N*(1)-acetyl-5-methoxykynuramine (AMK), which also show free radical-scavenging activities, thus converting melatonin in a very efficient free radical chain reaction [43]. These melatonin metabolite reactions might be of importance in protecting those tissues/organs that act as barriers in the organism, e.g., skin or gut, where melatonin is produced in significant quantities [106].

## 2. Vesicle Secretion or Membrane Diffusion?

### 2.1. Vesicles in the Pineal Gland

The pineal organ of non-mammalian vertebrates is photoreceptive and pinealocytes exhibit a very similar morphology to that of retinal photoreceptors. These cells display an outer segment containing multiple membrane discs, an intermediate part with a '9 + 0' cilium structure, an inner segment, and a basal part with basal processes. This basal part usually contains multiple secretory vesicles [107]. The outer photoreceptor-like segment become partially lost in the mammalian pinealocytes, thus leading to the lack of photoreceptive function. However, while these pinealocytes evolved toward a non-sensory structure, they also show numerous vesicles, frequently associated to synaptic ribbons or rosette-like structures, indicating high secretory function [108]. There is a controversy about the exact content of such vesicles. Some of them are also known as Golgi dense-core vesicles (DCR) while others show a more classic homogeneous electro-lucent content. The number of vesicles are subjected to opposite circadian rhythmicity [109] and it is altered by either superior cervical gangliectomy or melatonin treatment itself [110]. Interestingly, some authors have reported that DCR contain neither melatonin nor serotonin (5 hydroxy-tryptamine, 5-HT) and the electron-dense material observed within DCR would rather correspond to pineal neuropeptides [108,111]. On the contrary, Juillard and Collin [112], based on fluorescence histochemical methods, determined that 5-HT fluorescence corresponded with DCV. The pinealocytes can, therefore, be considered part of the diffuse NE system, as the secretion products are released either into the pineal recess blood vessels or even directly into the CVF at the third ventricle [113]. Both serotonin and melatonin display important regulating functions on their own secretion. Serotonin itself, through 5-HT<sub>2</sub> receptors, may contribute to the optimal secretion of melatonin, as has been shown in cultured pinealocytes [114,115]. This would explain why serotonin always precedes a melatonin peak during the dark phase in all the species studied [114]. A similar role has been found for glutamate, which also seems to accumulate inside the pinealocyte vesicles [116]. More importantly, this would indicate that these paracrine/autocrine mediators would modulate the release of melatonin, thus indicating a more complex regulatory mechanism than simple diffusion, which depends exclusively on the relative concentrations at both sides of the membranes, must also be involved. Nevertheless, the coexistence of diffusion through cell membranes with other transporter or carrier-like systems should not be completely discarded.

### 2.2. Chemical Features of Melatonin and Membrane Diffusion

According to PubChem database (all the chemical information has been consulted at <https://pubchem.ncbi.nlm.gov>), melatonin solubility in ethanol is very high (182 g/L) while the solubility in water varies from roughly 2 g/L (20 °C) to 3.5 g/L, a feature confirmed by Shida and co-workers, who were able to solubilize melatonin at 5 mM [117]. Strictly from the chemical point of view, this should be considered a moderate to high hydro-solubility and, more importantly, this would make unnecessary the involvement of serum proteins as blood carriers for the indole. Contrary to this hypothesis, Li and Wang have recently reported that melatonin binds to human serum albumin in a



1:1 stoichiometry [118]. As a reference, serotonin solubility in water is 10-fold higher (>25 g/L) [118]. As a reference, serotonin's solubility in water is 10-fold higher (>25 g/L) while a cholesterol-derived steroid such as testosterone is much lower (33 mg/L). This high testosterone lipophilicity makes these substances thermodynamically compatible with rapid lipid bilayer diffusion [119]. Like the rest of the steroid hormones, testosterone is supposed to be continuously liberated through the lipid bilayer in a gradient-favored manner. Interestingly, its release, which is finely regulated by LH in Leydig cells, might involve additional secretory mechanisms. Likewise, the same principle would apply to melatonin, which is thought to be released by diffusion, but it is under the control of different stimuli (see above). Nevertheless, considering the relative indole lipophilicity, the diffusion rate should be rather low when compared to androgens or estrogens. The question remains as to how much of this membrane diffusion has been really investigated throughout the literature. Surprisingly, the answer is that not so many studies have been focused on this issue.

### 2.3. Melatonin and Interactions with Lipid Membranes

For many years, most authors have assumed that melatonin, due to some of the physical features mentioned above, moves across biological membranes through passive diffusion. Additionally, the ubiquity of melatonin's actions, the potential synthesis in different subcellular compartments—i.e., mitochondria and chloroplasts—or the number of different sites described have been used as strong arguments to endorse membrane diffusion as the major mechanism of release. Yet, few experimental demonstrations have been found within the scientific literature.

Using optical absorption after dialysis, Lamy-Freund's group studied the interaction of the indole with lipid bilayers, determining that melatonin crosses asolectin vesicles [120] and, using fluorescence and electron spin resonance spectroscopy (ESR), they further showed association between melatonin and lipids [121]. Nonetheless, rather than crossing, these and other studies have shown that the indole preferentially associates with the polar head groups [122,123], thus creating a sort of melatonin-rich membrane domain, particularly if the concentration used is high [124]. Since much of the melatonin would be tightly associated to the polar region, the speed for crossing a multilayer membrane would be low [122]. This has also been corroborated with *in vivo* studies by Venegas and colleagues [125], who reported melatonin accumulation in membranes, cytosol, mitochondria and nuclei. However, while an increasing dose led a 10-fold increase in membranes, mitochondrial and nuclear levels reached saturation, indicating that passive diffusion would not be the exclusive mechanism of melatonin transport. The presence of high concentrations of melatonin within or tightly associated to the lipid bilayer might explain the efficiency of the indole in reducing lipid peroxidation and preserving membrane fluidity [126–128]. Contrary to these studies, Yu and co-workers, using direct amperometric measurements, have shown the efflux of melatonin from human embryonic kidney cells, reaching a fast equilibrium at both sides of membranes [129]. It can be deduced from this bulk of data that more research is needed to clarify the real behaviour of melatonin within the cell membranes, but it appears clear that the indole, as it occurs with steroids, might use different strategies to move across plasma (or organelle) membranes.

### 3. An Alternative View: Protein-Facilitated Transport

As mentioned above, melatonin can interact with lipid bilayers, although currently there is no consensus about how this interaction occurs. The question remains as to what potential alternative mechanisms exist for such a rather low passage through the bilayers are taking place. A potential melatonin uptake by cells is not a new concept. Forty years ago, Bubenik et al., using immunohistochemical detection of the indole in retina and Harderian glands, observed a great increase after melatonin application. Therefore, they suggested a potential uptake mechanism and/or receptors in these organs [130], which was further assessed by other studies. In this context, compounds with structural similarities to melatonin, such as tryptophan or serotonin (or other monoamines), can be translocated by different members of the solute carriers (SLCs) superfamily, including SLC3, SLC7,

SLC16 and SLC36 for tryptophan or SLC6, SCL18 and SCL22 for serotonin/monoamines, among others. These carriers are present at either the plasma membrane or the membranes of organelles such as vesicles and mitochondria, as has been recently suggested for melatonin [131–133].

The classic view of melatonin behavior with lipid bilayers has nevertheless left only a few studies focused on protein-mediated carriers or active transporters, as most of them were centered on the role of melatonin membrane receptors. However, the situation recently changed when Hevia and colleagues [134] challenged the classical idea by studying melatonin uptake in normal as well as in cancer cells. Using a specifically developed HPLC method [37] and a highly accurate estimation of the cell volume [135], these authors reported that both intracellular concentrations and kinetics adjust to a transporter-assisted mechanism rather than to a simple passive diffusion, a finding that was consolidated by studying different cell lines. Accordingly, no equilibration at both membrane sides was observed, contrary to what had been suggested by others [120], thus demonstrating that the indole might cross membranes through facilitated transport and not exclusively by passive diffusion. The carrier involved was later attributed to a member of the SCL2A/GLUT transporters subfamily [136]. The classic glucose transporter GLUT1/SLC2A1 would be the prototype member of this subfamily. However, it has only been very recently that the X-ray crystallographic structure of human GLUT1 has been elucidated [137] and until now the homologue XylE bacterial transporter has been employed as the reference protein model. With both docking models, it was predicted that melatonin binding was thermodynamically favorable. Moreover, as a physiological approach, the assays performed on melatonin uptake by erythrocytes, which only express GLUT1, showed that indole uptake was greatly enhanced by adding glucose to the growth medium [136], as it could be deduced if GLUT1 played a role in such internalization. Furthermore, overexpression of GLUT1, but not structurally-related GLUT4, leads to an increase in melatonin uptake in prostate cancer cells (Hevia et al., personal communication). Even though many other cell types and SLC2A carriers should also be investigated, this research field should provide additional data that may be of physiological importance.

Interestingly, melatonin has not been the only metabolite associated to GLUT1. It is well documented that, in addition to glucose, GLUT1/SLC2A1 is also in charge of transporting the oxidized form of ascorbic acid, i.e., DHA, into cells [138]. This might be the main role of GLUT1 in the erythrocytes of those species unable to synthesize vitamin C, a function that requires stomatin as a regulatory partner [139]. By similarities, it could be deduced that melatonin uptake through GLUT1/SLC2A1 transporter might also involve additional association with other regulatory factors. Finally, it is noteworthy to mention that the involvement of GLUT/SLC2A transporters in melatonin membrane transport can provide additional insights underlying the specific relationship between melatonin and glucose. However, it is not known whether it is GLUT1 itself or rather its association to other membrane proteins (e.g., membrane receptors) that would deserve further attention.

GLUT1 has not been the only transporter recently linked to melatonin membrane translocation. Similarly, Huo et al. [140] have described the possible involvement of PEPT1/2 oligopeptide transporters (proton-coupled SCL15A1/2 family) in the uptake of melatonin and its sulfation derivatives. SLC15A1 displays two isoforms in the rat; interestingly, while one is highly expressed in the small intestine, mainly participating in the absorption of protein digestion products [141], isoform 2 is restricted to pinealocytes, where it exhibits a striking circadian rhythmicity in its expression, with a clear 100-fold upregulation during the dark phase, which might underlie into the mechanism of melatonin secretion [142]. The study also reported the localization of PEPT1 in the mitochondria, therefore shedding some light on melatonin's translocation into this organelle, although no transition peptide for directing this protein to mitochondria was described. Again, as it occurs with previous work, authors here showed a kinetics for the uptake that is incompatible with passive diffusion [140]. So, the questions that remain to be answered are whether these two transport systems, as it appears, can be compatible with each other and whether facilitated transport would provide a faster and, perhaps under specific physiological circumstances, an additional way to internalize melatonin into cells and/or organelles. The wide expression if any of these two transporters provide an answer to

the pleiotropic role of melatonin in different cell types and tissues/organs, including metabolic and glucose-related effects.

#### 4. Melatonin and Glucose: An Ancient Relationship?

##### 4.1. Glucose Effect on Melatonin Secretion

Milcou and coworkers reported a relationship between the pineal and glucose homeostasis [143], but these pioneering studies used pineal extracts, since melatonin had not been yet isolated. Years later, one of the first associations between melatonin and diet glucose was made by Wetterberg's laboratory. First, using 13 participants, his group showed that water-supplemented, short-term (2 days) fasting led to a significant decrease in nocturnal melatonin levels, an effect prevented by glucose intake during the fasting period [144]. This is similar to what occurred to the inhibition of the pituitary-testicular axis under the same type of fasting [145]. Authors tried to explain this reduction based on the dependence of glucose delivery on pinealocytes to function properly. Later on, the same group found that obesity does not alter the pattern of melatonin secretion [146]. Interestingly, other early evidence found that glucose itself may affect AANAT activity [143,147] but in some of these pioneering studies they used pineal extracts, since melatonin had not been yet isolated. Collectively, all this early evidence point out that glucose could modulate melatonin secretion.

As described below, the antagonism between melatonin and insulin is well documented. But beyond those regulatory effects of the indole on insulin secretion, it has also been reported that streptozotocin-treated, diabetic rats display an elevated AANAT activity and consequently an increase in melatonin levels in the pineal gland [148]. Contrary to this, AANAT activity and melatonin content in the retina are both reduced in the retina of streptozotocin-treated rats [149], but none of the studies approached the involvement of glucose levels on this effect. This is also the case in type 2 diabetes patients, who have reduced melatonin secretion [150], and also a reduced night pineal melatonin synthesis is observed in type 2 diabetic Goto-Kakizaki rats [150,151]. Similarly, reduced night melatonin production has also been found in women with metabolic syndrome [152]. Cano and co-workers have also found a reduced melatonin content in high-fat fed rats, concomitant with hyperglycemia [153]. When the melatonin rhythm is compared between fasted and hyperglycemic rats, there is a shift in the night-peak pattern [154]. Again, all these studies demonstrate a relation between glucose levels and melatonin secretion, but the molecular insights underlying these effects are still unclear.

##### 4.2. Melatonin and Insulin

Conversely, in addition to the glucose effects on melatonin secretion, the indole itself is involved in controlling glucose homeostasis [155] (reviewed by [156,157]). In fasted rats, a rhythm in plasma glucose has been well described, with a peak in glucose starting at the dark phase, similar to what occurs at dawn in humans, and this evidence persisted even in hyperglycemia or with a normal pattern of glucose feeding. Not surprisingly, a circadian rhythmicity was reported for insulin secretion in rats and also in human subjects, with a nadir at midnight and peaking between noon and 6 pm [154,158]. Bailey et al. and Gorray et al. [159,160] were the first groups to demonstrate that pinealectomy results in a significant increase in insulin secretion, an effect that was confirmed using pineal incubation media. Further studies from different laboratories showed that pinealectomy increases glucose levels as well as glucose intolerance in rats, an effect prevented by melatonin administration [161,162]. Overall, as described above, most authors, therefore, agree that a physiological antagonism between melatonin and insulin occurs. Reciprocally, increased insulin plays a role on melatonin secretion from the pineal gland but while most studies showed an inhibitory effect [163], a few reports have shown a stimulatory effect under some circumstances [155].

This physiological function of melatonin appears to be mainly mediated by membrane receptor signaling. These receptors are highly expressed in pancreatic islets [164] and both MTNR1A/B

membrane receptors have been involved not only in regulating insulin production [165–167] but also in glucagon and somatostatin [40,168]. In vivo data were confirmed by using cell culture models, in which melatonin directly modulates insulin secretion from pancreatic  $\beta$ -cells, an action directly mediated by membrane receptors [169–171]. Interestingly, some polymorphisms, particularly in MTNR1B, have been associated with a higher risk in type 2 diabetes, thus reinforcing the role of this G-coupled membrane receptors on insulin synthesis regulation [172–174]. However, whether this is due as has been suggested to an excess of melatonin signaling [175] or rather, on the contrary, to a defective receptor function is still a matter of debate [176].

Other molecular mechanisms of action have also been related to the melatonin–insulin axis. Hence, recent studies point out the involvement of redox-related pathways, namely NADPH oxidase [177]. Similarly, the direct or indirect free radical-scavenging action of melatonin might also play a role in this context, as the indole protects glucotoxicity-mediated pancreatic islets cell death through either its own signaling or an antioxidant pathway [178–180]. More recently, insulin-like growth factor binding proteins, such as IGFBP3, which can modulate insulin signaling, have been linked to melatonin actions in other tissues [181] so they should not be ruled out in playing a role in melatonin-induced glucose homeostasis.

All this strong evidence and compelling data have led some authors to propose melatonin as a potential therapeutic agent in diabetes [182,183], although the timing of administration might have different outcomes [184]. A summary of this evidence is shown in Table 3.

**Table 3.** Summary of the evidences/links between glucose or insulin and melatonin.

Evidence/Finding Reported	Type of Assay/Molecular Mechanism Demonstrated	Reference(s)
<b>Glucose Influence on Melatonin Secretion</b>		
Short-term fasting inhibits melatonin secretion ( <i>H. sapiens</i> )	N/A	Röjdmarm & Wetterberg (1989) [144]
Glucose affects AANAT activity ( <i>R. norvegicus</i> )	Enzyme activity	Welker & Vollrath (1984) [147]
Streptozotocin increases pineal AANAT ( <i>R. norvegicus</i> )	Enzyme activity	Peschke et al. (2008) [148]
Streptozotocin decreases retinal AANAT ( <i>R. norvegicus</i> )	Enzyme activity, melatonin content (RIA)	Buonfiglio et al. (2011) [149]
Type 2 diabetes patients display reduced night melatonin	Melatonin content (RIA); urine 6-sulfatoxymelatonin (RIA)	Peschke et al. (2006) [150]; McMullan et al. (2013) [150]
Type 2 diabetic Goto-Kakizaki rats display reduced night pineal melatonin	Plasma and pineal melatonin and precursors content (RIA)	Peschke et al. (2006) [150]; Frese et al. (2009) [151]
Metabolic syndrome women show lower night melatonin	Melatonin content (RIA)	Corbalán-Tutau et al. (2014) [152]
Hyperglycemia (high fat diet, <i>R. norvegicus</i> ) shifts melatonin peak	Melatonin content (RIA)	Cano et al. (2008) [153]
Induced diabetes reduces night pineal melatonin content ( <i>R. norvegicus</i> )	Melatonin content (RIA)	Champney et al. (1983) [163]
<b>Melatonin and Insulin Secretion</b>		
Circadian rhythm in insulin secretion ( <i>R. norvegicus</i> , <i>H. sapiens</i> )	RIA, Immunoreaction	Rigas et al. (1968) [185]; Gagliardino y Henández (1971) [186]; Boden et al. (1996) [187]
Correlation between melatonin and insulin levels	RIA	Bizot-Spinard et al. (1998) [154]; Peschke et al. (2013) [155]
Pinealectomy-increase in insulin secretion	N/A	Bailey et al. (1974) [159]; Gorry et al. (1979) [160]
Pinealectomy increases glucose intolerance	Immunoreaction	Díaz y Blázquez (1986) [161]
Presence of melatonin receptors in pancreatic cells	Western blotting/IHC	Nagorny et al. (2011) [164]; Zibolka et al. (2018) [188]
Melatonin inhibits insulin secretion from pancreatic beta-cells	MTNR1B receptor-mediated/cGMP Raf-1/ERK mediated/NADPH oxidase	Stumpf et al. (2008) [169]; Mühlbauer et al. (2011) [165]; Li et al. (2018) [171]; Simoes et al. (2016) [177]
Melatonin influences somatostatin and glucagon	MTNR1A/B receptor-mediated	Bähr et al. (2011) [40]; Zibolka et al. (2015) [168]
Melatonin protects against glucotoxicity	Prevents ER stress	Park et al. 2014 [178]
MTNR1 polymorphisms and type 2 diabetes association	Genetic polymorphisms/altered MTNR1 signalling pathway	Bouatia-Naji et al. (2009) [189]; Sparso et al. 2009 [174]; Mssig et al. (2010) [172]; Tam et al. (2010) [173]; Tuomi et al. 2016 [175]; Mulder 2017 [176]

#### 4.3. Melatonin and Glucose in Invertebrates and Protozoans

Regulation of glucose metabolism by melatonin does not appear to be restricted to vertebrates. Most of the studies have been accomplished in crustaceans. Thus, in the crab *Eriocheir sinensis*, melatonin injection provoked hyperglycemia by inducing crustacean hyperglycemic hormone (CHH) mRNA synthesis and a similar effect was observed in *Uca pugilator* [190] and in *Neohelice granulata* [100], thus demonstrating an ancient relationship between melatonin and glucose.

Apart from invertebrates, even some protozoans with melatonin synthetic ability, e.g., *Tetrahymena*, were seen to respond to insulin in an autocrine mode, but the relationship between the indole and glucose metabolism has not yet been approached [191].

### 5. Concluding Remarks

There is no doubt that melatonin is a ubiquitously molecule, present in evolutionarily different organisms, from protozoa to mammals or higher plants. Although the pineal gland is responsible for the serum night peak, it is also synthesized in a variety of tissues and organs, therefore indicating a well-conserved function(s) in all living cells. Considering that glucose is one of the preferred sources for energy and carbon and the particular relationship that seems to be between both, melatonin-related glucose homeostasis might be one of the primitive functions of the indole. Here we have reviewed most of the data that link melatonin with glucose metabolism, including glucose control of melatonin synthesis, the physiological role of pineal melatonin in controlling insulin secretion, and finally novel findings relating GLUT1/SLC2A transporter and melatonin uptake, among others.

However, there are still several questions that remain to be answered regarding melatonin and glucose: (i) is melatonin one of the major and important factors that control glucose metabolism in cells and tissues? (ii) Are membrane receptors the exclusive mediators of what seems to be a major melatonin-glucose interrelation? (iii) Could GLUT/SLC2A glucose transporters also mediate and control glucose homeostasis by interacting with the melatonin uptake? (iv) How universal throughout the different phyla is the glucose homeostasis exerted by the indole?

These questions urgently need an experimental approach, since they have multiple implications for evolutionary aspects, but also in pathologies with high incidence, such as diabetes and the metabolic syndrome.

**Funding:** This research was funded by Ministerio de Economía y Competitividad, Gobierno de España, co-funded by FEDER, grant number MINECO-17-BFU2016-79139-R.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

### References

1. Lerner, A.B.; Case, J.D.; Takahashi, Y.; Lee, T.H.; Mori, W. Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes. *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, *80*, 2587. [[CrossRef](#)]
2. Lerner, A.B.; Case, J.D.D.; Takahashi, Y. Isolation of melatonin and 5-methoxyindole-3-acetic acid from bovine pineal glands. *J. Biol. Chem.* **1960**, *235*, 1992–1997. [[PubMed](#)]
3. McCord, C.P.; Allen, F.P. Evidences associating pineal gland function with alterations in pigmentation. *J. Exp. Zool.* **1917**, *23*, 207–224. [[CrossRef](#)]
4. Axelrod, J.; Weissbach, H. Enzymatic O-methylation of N-acetylserotonin to melatonin. *Science* **1960**, *131*, 1312. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Wurtman, R.J.; Axelrod, J.; Phillips, L.S. Melatonin synthesis in the pineal gland: Control by light. *Science* (80-) **1963**, *142*, 1071–1073. [[CrossRef](#)]
6. Reiter, R.J. The pineal and its hormones in the control of reproduction in mammals. *Endocr. Rev.* **1980**, *1*, 109–131. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Hoffman, R.A.; Reiter, R.J. Pineal gland influence on gonads of male Hamsters. *Science* **1965**, *148*, 1609–1611. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

8. Reiter, R.J. Comparative Physiology: Pineal Gland. *Annu. Rev. Physiol.* **1973**, *35*, 305–328. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Reiter, R.J.; Hoffman, J.C.; Rubin, P.H. Pineal gland: Influence on gonads of male rats treated with androgen 3 days after birth. *Science (80-)* **1968**, *160*, 420–421. [[CrossRef](#)]
10. Arendt, J. Role of the pineal gland and melatonin in seasonal reproductive function in mammals. *Oxf. Rev. Reprod. Biol.* **1986**, *8*, 266–320. [[PubMed](#)]
11. Brainard, G.C.; Richardson, B.A.; King, T.S.; Reiter, R.J. The influence of different light spectra on the suppression of pineal melatonin content in the Syrian hamster. *Brain Res.* **1984**, *294*, 333–339. [[CrossRef](#)]
12. Reiter, R.J. Action Spectra, Dose-Response Relationships, and Temporal Aspects of Light's Effects on the Pineal Gland. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1985**, *453*, 215–230. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Reiter, R.J.; Craft, C.M.; Johnson, J.E.; King, T.S.; Richardson, B.A.; Vaughan, G.M.; Vaughan, M.K. Age-associated reduction in nocturnal pineal melatonin levels in female rats. *Endocrinology* **1981**, *109*, 1295–1297. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Pang, S.F.; Tang, P.L. Decreased serum and pineal concentrations of melatonin and *N*-acetylserotonin in aged male hamsters. *Horm. Res.* **1983**, *17*, 228–234. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Reiter, R.J. The ageing pineal gland and its physiological consequences. *BioEssays* **1992**, *14*, 169–175. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Reiter, R.J. Melatonin: The chemical expression of darkness. *Mol. Cell. Endocrinol.* **1991**, *79*, C153–C158. [[CrossRef](#)]
17. Guo, X.H.; Li, Y.H.; Zhao, Y.S.; Zhai, Y.Z.; Zhang, L.C. Anti-aging effects of melatonin on the myocardial mitochondria of rats and associated mechanisms. *Mol. Med. Rep.* **2017**, *15*, 403–410. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Odinkova, I.; Baburina, Y.; Kruglov, A.; Fadeeva, I.; Zvyagina, A.; Sotnikova, L.; Akatov, V.; Krestinina, O. Effect of melatonin on rat heart mitochondria in acute heart failure in aged rats. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 1555. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Maestroni, G.J.M.M. The immunoneuroendocrine role of melatonin. *J. Pineal Res.* **1993**, *14*, 1–10. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Bartsch, C.; Bartsch, H. Melatonin in cancer patients and in tumor-bearing animals. *Adv. Exp. Med. Biol.* **1999**, *467*, 247–264. [[PubMed](#)]
21. Blask, D.E.; Dauchy, R.T.; Sauer, L.A.; Krause, J.A.; Brainard, G.C. Light during darkness, melatonin suppression and cancer progression. *Neuroendocrinol. Lett.* **2002**, *23*, 52–56. [[PubMed](#)]
22. Tamarkin, L.; Cohen, M.; Reichert, C.; Reichert, C.; Lippman, M.; Chabner, B. Melatonin Inhibition and Pinealectomy Enhancement of 7,12-Dimethylbenz(a)anthracene-induced Mammary Tumors in the Rat. *Cancer Res.* **1981**, *41*, 4432–4436. [[PubMed](#)]
23. Chen, S.J.; Huang, S.H.; Chen, J.W.; Wang, K.C.; Yang, Y.R.; Liu, P.F.; Lin, G.J.; Sytwu, H.K. Melatonin enhances interleukin-10 expression and suppresses chemotaxis to inhibit inflammation in situ and reduce the severity of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Int. Immunopharmacol.* **2016**, *31*, 169–177. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Mocikova, K.; Mnichova, M.; Kubatka, P.; Bojkova, B.; Ahlers, I.; Ahlersova, E. Mammary carcinogenesis induced in Wistar:Han rats by the combination of ionizing radiation and dimethylbenz(a)anthracene: Prevention with melatonin. *Neoplasma* **2000**, *47*, 227–229.
25. Ozaki, Y.; Lynch, H.J. Presence of melatonin in plasma and urine of pinealectomized rats. *Endocrinology* **1976**, *99*, 641–644. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Cardinali, D.P.; Wurtman, R.J. Hydroxyindole-O-Methyl Transferases in Rat Pineal, Retina and Harderian Gland. *Endocrinology* **1972**, *91*, 247–252. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Bubenik, G.A.; Brown, G.M.; Uhler, I.; Grota, L.J. Immunohistological localization of *N*-acetylindolealkylamines in pineal gland, retina and cerebellum. *Brain Res.* **1974**, *81*, 233–242. [[CrossRef](#)]
28. Raikhlin, N.T.; Kvetnoy, I.M.; Tolkachev, V.N. Melatonin may be synthesised in enterochromaffin cells. *Nature* **1975**, *255*, 344–345. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Bubenik, G.A.; Brown, G.M.; Grota, L.J. Immunohistochemical localization of melatonin in the rat Harderian gland. *J. Histochem. Cytochem.* **1976**, *24*, 1173–1177. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Arendt, J.; Paunier, L.; Sizonenko, P.C. Melatonin radioimmunoassay. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **1975**, *40*, 347–350. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

31. Vakkuri, O.; Lamsa, E.; Rahkamaa, E.; Ruotsalainen, H.; Leppaluoto, J. Iodinated melatonin: Preparation and characterization of the molecular structure by mass and <sup>1</sup>H NMR spectroscopy. *Anal. Biochem.* **1984**, *142*, 284–289. [[CrossRef](#)]
32. Vakkuri, O.; Leppaluoto, J.; Vuolteenaho, O. Development and validation of a melatonin radioimmunoassay using radioiodinated melatonin as tracer. *Eur. J. Endocrinol.* **1984**, *106*, 152–157. [[CrossRef](#)]
33. Laudon, M.; Zisapel, N. Characterization of central melatonin receptors using <sup>125</sup>I-melatonin. *FEBS Lett.* **1986**, *197*, 9–12. [[CrossRef](#)]
34. Duncan, M.J.; Takahashi, J.S.; Dubocovich, M.L. Characterization of 2-[<sup>125</sup>I]iodomelatonin binding sites in hamster brain. *Eur. J. Pharmacol.* **1986**, *132*, 333–334. [[CrossRef](#)]
35. Weaver, D.R.; Namboodiri, M.A.A.; Reppert, S.M. Iodinated melatonin mimics melatonin action and reveals discrete binding sites in fetal brain. *FEBS Lett.* **1988**, *228*, 123–127. [[CrossRef](#)]
36. Reppert, S.M.; Weaver, D.R.; Rivkees, S.A.; Stopa, E.G. Putative melatonin receptors in a human biological clock. *Science* **1988**, *242*, 78–81. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Hevia, D.; Botas, C.; Sainz, R.M.; Quiros, I.; Blanco, D.; Tan, D.X.; Gomez-Cordoves, C.; Mayo, J.C. Development and validation of new methods for the determination of melatonin and its oxidative metabolites by high performance liquid chromatography and capillary electrophoresis, using multivariate optimization. *J. Chromatogr. A* **2010**, *1217*, 1368–1374. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Acuña-Castroviejo, D.; Escames, G.; Venegas, C.; Díaz-Casado, M.E.; Lima-Cabello, E.; López, L.C.; Rosales-Corral, S.; Tan, D.X.; Reiter, R.J. Extrapineal melatonin: Sources, regulation, and potential functions. *Cell. Mol. Life Sci.* **2014**, *71*, 2997–3025. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Chen, C.Q.; Fichna, J.; Bashashati, M.; Li, Y.Y.; Storr, M. Distribution, function and physiological role of melatonin in the lower gut. *World J. Gastroenterol.* **2011**, *17*, 3888–3898. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Bähr, I.; Muhlbauer, E.; Schucht, H.; Peschke, E. Melatonin stimulates glucagon secretion in vitro and in vivo. *J. Pineal Res.* **2011**, *50*, 336–344. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Slominski, A.T.; Hardeland, R.; Zmijewski, M.A.; Slominski, R.M.; Reiter, R.J.; Paus, R. Melatonin: A Cutaneous Perspective on its Production, Metabolism, and Functions. *J. Investig. Dermatol.* **2018**, *138*, 490–499. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Slominski, A. The cutaneous serotonergic/melatonergic system: Securing a place under the sun. *FASEB J.* **2005**, *19*, 176–194. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Yu, Y.; Lv, Y.; Shi, Y.; Li, T.; Chen, Y.; Zhao, D.; Zhao, Z. The Role of Phyto-Melatonin and Related Metabolites in Response to Stress. *Molecules* **2018**, *23*, 1887. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Pöggeler, B.; Balzer, I.; Hardeland, R.; Lerchl, A. Pineal hormone melatonin oscillates also in the dinoflagellate *Gonyaulax polyedra*. *Naturwissenschaften* **1991**, *78*, 268–269. [[CrossRef](#)]
45. Manchester, L.C.; Poeggeler, B.; Alvares, F.L.; Ogden, G.B.; Reiter, R.J. Melatonin immunoreactivity in the photosynthetic prokaryote *Rhodospirillum rubrum*: Implications for an ancient antioxidant system. *Cell. Mol. Biol. Res.* **1995**, *41*, 391–395. [[PubMed](#)]
46. Balzer, I. Recent progress in understanding the temporal behavior of unicellular organisms. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **1996**, *29*, 95–99. [[PubMed](#)]
47. Macías, M.; Rodríguez-Cabezas, M.N.; Reiter, R.J.; Osuna, A.; Acuña-Castroviejo, D. Presence and effects of melatonin in *Trypanosoma cruzi*. *J. Pineal Res.* **1999**, *27*, 86–94. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Ganguly, S.; Mummaneni, P.; Steinbach, P.J.; Klein, D.C.; Coon, S.L. Characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* Homolog of the Melatonin Rhythm Enzyme Arylalkylamine *N*-Acetyltransferase (EC 2.3.1.87). *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 47239–47247. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Vivien-Roels, B.; Pevet, P.; Beck, O.; Fevre-Montange, M. Identification of melatonin in the compound eyes of an insect, the locust (*Locusta migratoria*), by radioimmunoassay and gas chromatography-mass spectrometry. *Neurosci. Lett.* **1984**, *49*, 153–157. [[CrossRef](#)]
50. Arnoult, F.; Vivien-Roels, B.; Pévet, P.; Vernet, G. Melatonin in the nemertine worm *lineus lacteus*: Identification and daily variations. *Neurosignals* **1994**, *3*, 296–301. [[CrossRef](#)]
51. Blanc, A.; Vivien-Roels, B.; Pévet, P.; Attia, J.; Buisson, B. Melatonin and 5-methoxytryptophol (5-ML) in nervous and/or neurosensory structures of a gastropod mollusc (*Helix aspersa maxima*): Synthesis and diurnal rhythms. *Gen. Comp. Endocrinol.* **2003**, *131*, 168–175. [[CrossRef](#)]
52. Vivien-Roels, B.; Pevet, P. Is melatonin an evolutionary conservative molecule involved in the transduction of photoperiodic information in all living organisms? *Adv. Pineal Res.* **1986**, *1*, 61–68.



53. Balzer, I.; Kapp, H. Occurrence and comparative physiology of melatonin in evolutionary diverse organisms. In *The Redox State and Circadian Rhythms*; Vanden Driessche, T., Petiau-de Vries, G.M., Eds.; Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, The Netherlands, 2000; pp. 95–119. ISBN 0-7923-6453-8.
54. Dubbels, R.; Reiter, R.J.J.; Klenke, E.; Goebel, A.; Schnakenberg, E.; Ehlers, C.; Schiwara, H.W.W.; Schloot, W. Melatonin in edible plants identified by radioimmunoassay and by high performance liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Pineal Res.* **1995**, *18*, 28–31. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Hattori, A.; Migita, H.; Iigo, M.; Itoh, M.; Yamamoto, K.; Ohtani-Kaneko, R.; Hara, M.; Suzuki, T.; Reiter, R.J. Identification of melatonin in plants and its effects on plasma melatonin levels and binding to melatonin receptors in vertebrates. *Biochem. Mol. Biol. Int.* **1995**, *35*, 627–634. [[PubMed](#)]
56. Tan, D.X.; Hardeland, R.; Manchester, L.C.; Korkmaz, A.; Ma, S.; Rosales-Corral, S.; Reiter, R.J. Functional roles of melatonin in plants, and perspectives in nutritional and agricultural science. *J. Exp. Bot.* **2012**, *63*, 577–597. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Tan, D.X.; Hardeland, R.; Manchester, L.C.; Paredes, S.D.; Korkmaz, A.; Sainz, R.M.; Mayo, J.C.; Fuentes-Broto, L.; Reiter, R.J. The changing biological roles of melatonin during evolution: From an antioxidant to signals of darkness, sexual selection and fitness. *Biol. Rev.* **2010**, *85*, 607–623. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Hardeland, R. Melatonin in plants and other phototrophs: Advances and gaps concerning the diversity of functions. *J. Exp. Bot.* **2015**, *66*, 627–646. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Arnao, M.B.; Hernández-Ruiz, J. Functions of melatonin in plants: A review. *J. Pineal Res.* **2015**, *59*, 133–150. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Reiter, R.J.; Tan, D.X.; Rosales-Corral, S.; Manchester, L.C. The universal nature, unequal distribution and antioxidant functions of melatonin and its derivatives. *Mini-Rev. Med. Chem.* **2013**, *13*, 373–384. [[PubMed](#)]
61. Quay, W.B. Retinal and pineal hydroxyindole-o-methyl transferase activity in vertebrates. *Life Sci.* **1965**, *4*, 983–991. [[CrossRef](#)]
62. Raikhlin, N.T.; Kvetnoy, I.M. Melatonin and enterochromaffine cells. *Acta Histochem.* **1976**, *55*, 19–24. [[CrossRef](#)]
63. Kvetnoy, I.; Yuzhakov, V. Extrapineal melatonin: Non-traditional localization and possible significance for oncology. In *Advances in Pineal Research*; Maestroni, G.J.M., Conti, A., Reiter, R.J., Eds.; John Libbey and Company: London, UK, 1994; Volume 7, pp. 199–212.
64. Kvetnoy, I.M.; Kvetnaia, T.V.; Yuzhakov, V.V. Role of Extrapineal Melatonin and Related APUD Series Peptides in Malignancy. In *The Pineal Gland and Cancer*; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2001; pp. 259–274.
65. Bubenik, G.A.; Brown, G.M.; Grota, L.J. Immunohistological investigations of N-Acetylserotonin in the rat cerebellum after parachlorophenylalanine treatment. *Experientia* **1976**, *32*, 579–581. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Pang, S.F.; Brown, G.M.; Grota, L.J.; Chambers, J.W.; Rodman, R.L. Determination of N-acetylserotonin and melatonin activities in the pineal gland, retina, Harderian gland, brain and serum of rats and chickens. *Neuroendocrinology* **1977**, *23*, 1–13. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Menendez-Pelaez, A.; Howes, K.A.; Gonzalez-Brito, A.; Reiter, R.J. N-Acetyltransferase activity, hydroxyindole-O-methyltransferase activity, and melatonin levels in the Harderian glands of the female Syrian hamster: Changes during the light: Dark cycle and the effect of 6-parachlorophenylalanine administration. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1987**, *145*, 1231–1238. [[CrossRef](#)]
68. Bubenik, G.A. Localization of Melatonin in the Digestive Tract of the Rat. *Horm. Res.* **1980**, *12*, 313–323. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
69. Biesalski, H.K.; Welker, H.A.; Thalmann, R.; Vollrath, L. Melatonin and other serotonin derivatives in the guinea pig membranous cochlea. *Neurosci. Lett.* **1988**, *91*, 41–46. [[CrossRef](#)]
70. Lopez-Gonzalez, M.A.; Guerrero, J.M.; Delgado, F. Presence of the pineal hormone melatonin in rat cochlea: Its variations with lighting conditions. *Neurosci. Lett.* **1997**, *238*, 81–83. [[CrossRef](#)]
71. Finocchiaro, L.M.; Nahmod, V.E.; Launay, J.M. Melatonin biosynthesis and metabolism in peripheral blood mononuclear leucocytes. *Biochem. J.* **1991**, *280 Pt 3*, 727–731. [[CrossRef](#)]
72. Abe, M.; Itoh, M.T.; Miyata, M.; Ishikawa, S.; Sumi, Y. Detection of melatonin, its precursors and related enzyme activities in rabbit lens. *Exp. Eye Res.* **1999**, *68*, 255–262. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

73. Slominski, A.; Pisarchik, A.; Semak, I.; Sweatman, T.; Wortsman, J.; Szczesniewski, A.; Slugocki, G.; McNulty, J.; Kauser, S.; Tobin, D.J.; et al. Serotonergic and melatonergic systems are fully expressed in human skin. *FASEB J.* **2002**, *16*, 896–898. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Slominski, A.; Baker, J.; Rosano, T.G.; Guisti, L.W.; Ermak, G.; Grande, M.; Gaudet, S.J. Metabolism of serotonin to *N*-acetylserotonin, melatonin, and 5-methoxytryptamine in hamster skin culture. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 12281–12286. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Tijmes, M.; Pedraza, R.; Valladares, L. Melatonin in the rat testis: Evidence for local synthesis. *Steroids* **1996**, *61*, 65–68. [[CrossRef](#)]
76. Itoh, M.T.; Ishizuka, B.; Kuribayashi, Y.; Amemiya, A.; Sumi, Y. Melatonin, its precursors, and synthesizing enzyme activities in the human ovary. *Mol. Hum. Reprod.* **1999**, *5*, 402–408. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
77. Itoh, M.T.; Ishizuka, B.; Kudo, Y.; Fusama, S.; Amemiya, A.; Sumi, Y. Detection of melatonin and serotonin *N*-acetyltransferase and hydroxyindole-*O*-methyltransferase activities in rat ovary. *Mol. Cell. Endocrinol.* **1998**, *136*, 7–13. [[CrossRef](#)]
78. Tan, D.X.; Manchester, L.C.; Reiter, R.J.; Qi, W.B.; Zhang, M.; Weintraub, S.T.; Cabrera, J.; Sainz, R.M.; Mayo, J.C. Identification of highly elevated levels of melatonin in bone marrow: Its origin and significance. *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* **1999**, *1472*, 206–214. [[CrossRef](#)]
79. Conti, A.; Conconi, S.; Hertens, E.; Skwarlo-Sonta, K.; Markowska, M.; Maestroni, J.M. Evidence for melatonin synthesis in mouse and human bone marrow cells. *J. Pineal Res.* **2000**, *28*, 193–202. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
80. Carrillo-Vico, A.; Calvo, J.R.; Abreu, P.; Lardone, P.J.; García-Mauriño, S.; Reiter, R.J.; Guerrero, J.M. Evidence of melatonin synthesis by human lymphocytes and its physiological significance: Possible role as intracrine, autocrine, and/or paracrine substance. *FASEB J.* **2004**, *18*, 537–539. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
81. Iwasaki, S.; Nakazawa, K.; Sakai, J.; Kometani, K.; Iwashita, M.; Yoshimura, Y.; Maruyama, T. Melatonin as a local regulator of human placental function. *J. Pineal Res.* **2005**, *39*, 261–265. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
82. Maldonado, M.D.; Mora-Santos, M.; Naji, L.; Carrascosa-Salmoral, M.P.; Naranjo, M.C.; Calvo, J.R. Evidence of melatonin synthesis and release by mast cells. Possible modulatory role on inflammation. *Pharmacol. Res.* **2010**, *62*, 282–287. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Tilden, A.R.; Becker, M.A.; Amma, L.L.; Arciniega, J.; McGaw, A.K. Melatonin production in an aerobic photosynthetic bacterium: An evolutionarily early association with darkness. *J. Pineal Res.* **1997**, *22*, 102–106. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Jiao, J.; Ma, Y.; Chen, S.; Liu, C.; Song, Y.; Qin, Y.; Yuan, C.; Liu, Y. Melatonin-Producing Endophytic Bacteria from Grapevine Roots Promote the Abiotic Stress-Induced Production of Endogenous Melatonin in Their Hosts. *Front. Plant Sci.* **2016**, *7*, 1387. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
85. Balzer, I.; Hardeland, R. Melatonin in algae and higher plants—Possible new roles as a phytohormone and antioxidant. *Bot. Acta* **1996**, *109*, 180–183. [[CrossRef](#)]
86. Poeggeler, B.; Hardeland, R. Detection and quantification of melatonin in a dinoflagellate, *Gonyaulax polyedra*: Solutions to the problem of methoxyindole destruction in non-vertebrate material. *J. Pineal Res.* **1994**, *17*, 1–10. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
87. Sprenger, J.; Hardeland, R.; Fuhrberg, B.; Han, S.-Z. Melatonin and Other 5-Methoxylated Indoles in Yeast: Presence in High Concentrations and Dependence on Tryptophan Availability. *Cytologia (Tokyo)* **1999**, *64*, 209–213. [[CrossRef](#)]
88. Köhida, L.; Vakkuri, O.; Keresztesi, M.; Leppäluoto, J.; Csaba, G. Induction of melatonin synthesis in *Tetrahymena pyriformis* by hormonal imprinting—A unicellular “factory” of the indoleamine. *Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand)* **2003**, *49*, 521–524.
89. Itoh, M.T.; Shinozawa, T.; Sumi, Y. Circadian rhythms of melatonin-synthesizing enzyme activities and melatonin levels in planarians. *Brain Res.* **1999**, *830*, 165–173. [[CrossRef](#)]
90. Migliori, M.L.; Romanowski, A.; Simonetta, S.H.; Valdez, D.; Guido, M.; Golombek, D.A. Daily variation in melatonin synthesis and arylalkylamine *N*-acetyltransferase activity in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *J. Pineal Res.* **2012**, *53*, 38–46. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
91. Subaraja, M.; Vanisree, A.J. Neurotransmissional, structural, and conduction velocity changes in cerebral ganglions of *Lumbricus terrestris* on exposure to acrylamide. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2016**, *23*, 17123–17131. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
92. Finocchiaro, L.; Callebert, J.; Launay, J.M.; Jallon, J.M. Melatonin Biosynthesis in *Drosophila*: Its Nature and Its Effects. *J. Neurochem.* **1988**, *50*, 382–387. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

93. Richter, K.; Peschke, E.; Peschke, D. A neuroendocrine releasing effect of melatonin in the brain of an insect, *Periplaneta americana* (L.). *J. Pineal Res.* **2000**, *28*, 129–135. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
94. Wetterberg, L.; Hayes, D.K.; Halberg, F. Circadian rhythm of melatonin in the brain of the face fly, *Musca autumnalis* De Geer. *Chronobiologia* **1987**, *14*, 377–381. [[PubMed](#)]
95. Markowska, M.; Bentkowski, P.; Kloc, M.; Pijanowska, J. Presence of melatonin in *Daphnia magna*. *J. Pineal Res.* **2009**, *46*, 242–244. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
96. Vivien-Roels, B.; Pévet, P. Melatonin: Presence and formation in invertebrates. *Experientia* **1993**, *49*, 642–647. [[CrossRef](#)]
97. Tilden, A.R.; Rasmussen, P.; Awantang, R.M.; Furlan, S.; Goldstein, J.; Palsgrove, M.; Sauer, A. Melatonin cycle in the fiddler crab *Uca pugilator* and influence of melatonin on limb regeneration. *J. Pineal Res.* **1997**, *23*, 142–147. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
98. Aguzzi, J.; Sanchez-Pardo, J.; García, J.A.; Sardà, F. Day-night and depth differences in haemolymph melatonin of the Norway lobster, *Nephrops norvegicus* (L.). *Deep Sea Res. Part I Oceanogr. Res. Pap.* **2009**, *56*, 1894–1905. [[CrossRef](#)]
99. Farca Luna, A.J.; Heinrich, R.; Reischig, T. The circadian biology of the marbled crayfish. *Front. Biosci. (Elite Ed.)* **2010**, *2*, 1414–1431. [[PubMed](#)]
100. Maciel, F.E.; Geihs, M.A.; Cruz, B.P.; Vargas, M.A.; Allodi, S.; Marins, L.F.; Nery, L.E.M. Melatonin as a signaling molecule for metabolism regulation in response to hypoxia in the crab *Neohelice granulata*. *Int. J. Mol. Sci.* **2014**, *15*, 22405–22420. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
101. Yang, X.; Xu, M.; Huang, G.; Zhang, C.; Pang, Y.; Yang, Z.; Cheng, Y. The hyperglycemic effect of melatonin in the Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*. *Front. Physiol.* **2018**, *9*, 270. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
102. Mechawar, N.; Anctil, M. Melatonin in a primitive metazoan: Seasonal changes of levels and immunohistochemical visualization in neurons. *J. Comp. Neurol.* **1997**, *387*, 243–254. [[CrossRef](#)]
103. Abran, D.; Anctil, M.; Ali, M.A. Melatonin activity rhythms in eyes and cerebral ganglia of *Aplysia californica*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **1994**, *96*, 215–222. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
104. Tan, D.X.; Chen, L.D.; Poeggeler, B.; Manchester, L.; Reiter, R.J. Melatonin: A potent, endogenous hydroxyl radical scavenger. *Endocr. J.* **1993**, *1*, 59–60.
105. Reiter, R.J.; Mayo, J.C.; Tan, D.X.; Sainz, R.M.; Alatorre-Jimenez, M.; Qin, L. Melatonin as an antioxidant: Under promises but over delivers. *J. Pineal Res.* **2016**, *61*, 253–278. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
106. Slominski, A.T.; Semak, I.; Fischer, T.W.; Kim, T.K.; Kleszczyński, K.; Hardeland, R.; Reiter, R.J. Metabolism of melatonin in the skin: Why is it important? *Exp. Dermatol.* **2017**, *26*, 563–568. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
107. Ueck, M.; Wake, K. The pinealocyte—A paraneuron? A review. *Arch. Histol. Jpn.* **1977**, *40*, 261–278. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
108. McNulty, J.A.; Fox, L.M.; Lisco, S.J. Pinealocyte Dense-Cored Vesicles and Synaptic Ribbons: A Correlative Ultrastructural-Biochemical Investigation in Rats and Mice. *J. Pineal Res.* **1987**, *4*, 45–59. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
109. Romijn, H.J.; Mud, M.T.; Wolters, P.S. Diurnal variations in number of Golgi-dense core vesicles in light pinealocytes of the rabbit. *J. Neural Transm.* **1976**, *38*, 231–237. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
110. Benson, B.; Krasovich, M. Circadian rhythm in the number of granulated vesicles in the pinealocytes of mice. Effects of sympathectomy and melatonin treatment. *Cell Tissue Res.* **1977**, *184*, 499–506. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
111. Kappers, J.A. Localization of indoleamine and protein synthesis in the mammalian pineal gland. *J. Neural Transm. Suppl.* **1978**, *13*, 13–24.
112. Juillard, M.T.; Collin, J.P. Pools of serotonin in the pineal gland of the mouse: The mammalian pinealocyte as a component of the diffuse neuroendocrine system. *Cell Tissue Res.* **1980**, *213*, 273–291. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
113. Tricoire, H.; Malpoux, B.; Møller, M. Cellular lining of the sheep pineal recess studied by light-, transmission-, and scanning electron microscopy: Morphologic indications for a direct secretion of melatonin from the pineal gland to the cerebrospinal fluid. *J. Comp. Neurol.* **2003**, *456*, 39–47. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
114. Miguez, J.M.; Simonneaux, V.; Pévet, P. The role of the intracellular and extracellular serotonin in the regulation of melatonin production in rat pinealocytes. *J. Pineal Res.* **1997**, *23*, 63–71. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
115. Olcese, J.; Münker, M. Extracellular serotonin promotes melatonin release from cultured rat pinealocytes: Evidence for an S2-type receptor-mediated autocrine feedback. *Brain Res.* **1994**, *643*, 150–154. [[CrossRef](#)]
116. Moriyama, Y.; Hayashi, M.; Yamada, H.; Yatsushiro, S.; Ishio, S.; Yamamoto, A. Synaptic-like microvesicles, synaptic vesicle counterparts in endocrine cells, are involved in a novel regulatory mechanism for the synthesis and secretion of hormones. *J. Exp. Biol.* **2000**, *203*, 117–125. [[PubMed](#)]

117. Shida, C.; Castrucci, A.M.L.; Lamy-Freund, M.T. High melatonin solubility in aqueous medium. *J. Pineal Res.* **1994**, *16*, 198–201. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
118. Li, X.; Wang, S. Binding of glutathione and melatonin to human serum albumin: A comparative study. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2015**, *125*, 96–103. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
119. Oren, I.; Fleishman, S.J.; Kessel, A.; Ben-Tal, N. Free diffusion of steroid hormones across biomembranes: A simplex search with implicit solvent model calculations. *Biophys. J.* **2004**, *87*, 768–779. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
120. Costa, E.J.X.; Lopes, R.H.; Lamy-Freund, M.T. Permeability of pure lipid bilayers to melatonin. *J. Pineal Res.* **1995**, *19*, 123–126. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
121. Costa, E.J.X.; Shida, C.S.; Biaggi, M.H.; Ito, A.S.; Lamy-Freund, M.T. How melatonin interacts with lipid bilayers: A study by fluorescence and ESR spectroscopies. *FEBS Lett.* **1997**, *416*, 103–106. [[CrossRef](#)]
122. Saija, A.; Tomaino, A.; Trombetta, D.; Pellegrino, M.L.; Tita, B.; Caruso, S.; Castelli, F. Interaction of melatonin with model membranes and possible implications in its photoprotective activity. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2002**, *53*, 209–215. [[CrossRef](#)]
123. Severcan, F.; Sahin, I.; Kazanci, N. Melatonin strongly interacts with zwitterionic model membranes-evidence from Fourier transform infrared spectroscopy and differential scanning calorimetry. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **2005**, *1668*, 215–222. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
124. Dies, H.; Cheung, B.; Tang, J.; Rheinstädter, M.C. The organization of melatonin in lipid membranes. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **2015**, *1848*, 1032–1040. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
125. Venegas, C.; García, J.A.; Escames, G.; Ortiz, F.; López, A.; Doerrier, C.; García-Corzo, L.; López, L.C.; Reiter, R.J.; Acuña-Castroviejo, D. Extrpineal melatonin: Analysis of its subcellular distribution and daily fluctuations. *J. Pineal Res.* **2012**, *52*, 217–227. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
126. Melchiorri, D.; Reiter, R.J.; Sewerynek, E.; Chen, L.D.; Nisticó, G. Melatonin reduces kainate-induced lipid peroxidation in homogenates of different brain regions. *FASEB J.* **1995**, *9*, 1205–1210. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
127. García, J.J.; Reiter, R.J.; Guerrero, J.M.; Escames, G.; Yu, B.P.; Oh, C.S.; Muñoz-Hoyos, A. Melatonin prevents changes in microsomal membrane fluidity during induced lipid peroxidation. *FEBS Lett.* **1997**, *408*, 297–300. [[CrossRef](#)]
128. García, J.J.; López-Pingarrón, L.; Almeida-Souza, P.; Tres, A.; Escudero, P.; García-Gil, F.A.; Tan, D.X.; Reiter, R.J.; Ramírez, J.M.; Bernal-Pérez, M. Protective effects of melatonin in reducing oxidative stress and in preserving the fluidity of biological membranes: A review. *J. Pineal Res.* **2014**, *56*, 225–237. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
129. Yu, H.; Dickson, E.J.; Jung, S.-R.; Koh, D.-S.; Hille, B. High membrane permeability for melatonin. *J. Gen. Physiol.* **2016**, *147*, 63–76. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
130. Bubenik, G.A.; Purtill, R.A.; Brown, G.M.; Grotta, L.J. Melatonin in the retina and the harderian gland. Ontogeny, diurnal variations and melatonin treatment. *Exp. Eye Res.* **1978**, *27*, 323–333. [[CrossRef](#)]
131. Escames, G.; López, L.C.; Tapias, V.; Utrilla, P.; Reiter, R.J.; Hitos, A.B.; León, J.; Rodríguez, M.I.; Acuña-Castroviejo, D. Melatonin counteracts inducible mitochondrial nitric oxide synthase-dependent mitochondrial dysfunction in skeletal muscle of septic mice. *J. Pineal Res.* **2006**, *40*, 71–78. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
132. Mayo, J.C.; Sainz, R.M.; González-Menéndez, P.; Hevia, D.; Cernuda-Cernuda, R. Melatonin transport into mitochondria. *Cell. Mol. Life Sci.* **2017**, *74*, 3927–3940. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
133. Reiter, R.J.; Rosales-Corral, S.; Tan, D.X.; Jou, M.J.; Galano, A.; Xu, B. Melatonin as a mitochondria-targeted antioxidant: One of evolution's best ideas. *Cell. Mol. Life Sci.* **2017**, *74*, 3863–3881. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
134. Hevia, D.; Sainz, R.M.; Blanco, D.; Quirós, I.; Tan, D.X.; Rodríguez, C.; Mayo, J.C. Melatonin uptake in prostate cancer cells: Intracellular transport versus simple passive diffusion. *J. Pineal Res.* **2008**, *45*, 247–257. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
135. Hevia, D.; Rodríguez-García, A.; Alonso-Gervós, M.; Quirós-González, I.; Cimadevilla, H.M.; Gómez-Cordovés, C.; Sainz, R.M.; Mayo, J.C.; Hevia, D.; Rodríguez-García, A.; et al. Cell Volume and Geometric Parameters Determination in Living Cells Using Confocal Microscopy and 3D Reconstruction. Available online: [http://www.nature.com/protocolexchange/protocols/2264%0Ahttp://www.nature.com/protocolexchange/protocols/2264#/anticipated\\_results](http://www.nature.com/protocolexchange/protocols/2264%0Ahttp://www.nature.com/protocolexchange/protocols/2264#/anticipated_results) (accessed on 13 June 2017).
136. Hevia, D.; González-Menéndez, P.; Quiros-González, I.; Miar, A.; Rodríguez-García, A.; Tan, D.X.; Reiter, R.J.; Mayo, J.C.; Sainz, R.M. Melatonin uptake through glucose transporters: A new target for melatonin inhibition of cancer. *J. Pineal Res.* **2015**, *58*, 234–250. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

137. Deng, D.; Xu, C.; Sun, P.; Wu, J.; Yan, C.; Hu, M.; Yan, N. Crystal structure of the human glucose transporter GLUT1. *Nature* **2014**, *510*, 121–125. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
138. Rumsey, S.C.; Kwon, O.; Xu, G.W.; Burant, C.F.; Simpson, I.; Levine, M. Glucose transporter isoforms GLUT1 and GLUT3 transport dehydroascorbic acid. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 18982–18989. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
139. Montel-Hagen, A.; Kinet, S.; Manel, N.; Mongellaz, C.; Prohaska, R.; Battini, J.L.; Delaunay, J.; Sitbon, M.; Taylor, N. Erythrocyte Glut1 triggers dehydroascorbic acid uptake in mammals unable to synthesize vitamin C. *Cell* **2008**, *132*, 1039–1048. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
140. Huo, X.; Wang, C.; Yu, Z.; Peng, Y.; Wang, S.; Feng, S.; Zhang, S.; Tian, X.; Sun, C.; Liu, K.; et al. Human transporters, PEPT1/2, facilitate melatonin transportation into mitochondria of cancer cells: An implication of the therapeutic potential. *J. Pineal Res.* **2017**, *62*, e12390. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
141. Miyamoto, K.I.; Shiraga, T.; Morita, K.; Yamamoto, H.; Haga, H.; Taketani, Y.; Tamai, I.; Sai, Y.; Tsuji, A.; Takeda, E. Sequence, tissue distribution and developmental changes in rat intestinal oligopeptide transporter. *Biochim. Biophys. Acta Gene Struct. Exp.* **1996**, *1305*, 34–38. [[CrossRef](#)]
142. Bailey, M.J.; Coon, S.L.; Carter, D.A.; Humphries, A.; Kim, J.S.; Shi, Q.; Gaildrat, P.; Morin, F.; Ganguly, S.; Hogenesch, J.B.; et al. Night/day changes in pineal expression of >600 genes: Central role of adrenergic/cAMP signaling. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 7606–7622. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
143. Milcou, I.; Nanu, L.; Marcean, R. Existence of a hypoglycemic pineal hormone synergistic with insulin. *Ann. Endocrinol. (Paris)* **1957**, *18*, 612–620. [[PubMed](#)]
144. Röjdmarm, S.; Wetterberg, L. Short-term fasting inhibits the nocturnal melatonin secretion in healthy man. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* **1989**, *30*, 451–457. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
145. Röjdmarm, S. Influence of short-term fasting on the pituitary-testicular axis in normal men. *Horm. Res.* **1987**, *25*, 140–146. [[PubMed](#)]
146. Röjdmarm, S.; Rössner, S.; Wetterberg, L. Effect of short-term fasting on nocturnal melatonin secretion in obesity. *Metabolism* **1992**, *41*, 1106–1109. [[CrossRef](#)]
147. Welker, H.A.; Vollrath, L. The effects of a number of short-term exogenous stimuli on pineal serotonin-*N*-acetyltransferase activity in rats. *J. Neural Transm.* **1984**, *59*, 69–80. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
148. Peschke, E.; Wolgast, S.; Bazwinsky, I.; Pönicke, K.; Mühlbauer, E. Increased melatonin synthesis in pineal glands of rats in streptozotocin induced type 1 diabetes. *J. Pineal Res.* **2008**, *45*, 439–448. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
149. Do Carmo Buonfiglio, C.; Peliciari-Garcia, R.A.; do Amaral, F.G.; Peres, R.; Araujo Nogueira, T.C.; Afeche, S.C.; Cipolla-Neto, J. Early-stage retinal melatonin synthesis impairment in streptozotocin-induced diabetic wistar rats. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2011**, *52*, 7416–7422. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
150. Peschke, E.; Frese, T.; Chankiewicz, E.; Peschke, D.; Preiss, U.; Schneyer, U.; Spessert, R.; Mühlbauer, E. Diabetic Goto Kakizaki rats as well as type 2 diabetic patients show a decreased diurnal serum melatonin level and an increased pancreatic melatonin-receptor status. *J. Pineal Res.* **2006**, *40*, 135–143. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
151. Frese, T.; Bach, A.G.; Mühlbauer, E.; Pönicke, K.; Brömme, H.J.; Welp, A.; Peschke, E. Pineal melatonin synthesis is decreased in type 2 diabetic Goto-Kakizaki rats. *Life Sci.* **2009**, *85*, 526–533. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
152. Corbalán-Tutau, D.; Madrid, J.A.; Nicolás, F.; Garaulet, M. Daily profile in two circadian markers “melatonin and cortisol” and associations with metabolic syndrome components. *Physiol. Behav.* **2014**, *123*, 231–235. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
153. Cano, P.; Jiménez-Ortega, V.; Larrad, Á.; Toso, C.F.R.; Cardinali, D.P.; Esquifino, A.I. Effect of a high-fat diet on 24-h pattern of circulating levels of prolactin, luteinizing hormone, testosterone, corticosterone, thyroid-stimulating hormone and glucose, and pineal melatonin content, in rats. *Endocrine* **2008**, *33*, 118–125. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
154. Bizot-Espiard, J.G.; Double, A.; Guardiola-Lemaitre, B.; Delagrangé, P.; Ktorza, A.; Penicaud, L. Diurnal rhythms in plasma glucose, insulin, growth hormone and melatonin levels in fasted and hyperglycaemic rats. *Diabetes Metab.* **1998**, *24*, 235–240. [[PubMed](#)]
155. Peschke, E.; Bähr, I.; Mühlbauer, E. Melatonin and pancreatic islets: Interrelationships between melatonin, insulin and glucagon. *Int. J. Mol. Sci.* **2013**, *14*, 6981–7015. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
156. Peschke, E. Melatonin, endocrine pancreas and diabetes. *J. Pineal Res.* **2008**, *44*, 26–40. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
157. Lardone, P.J.; Sanchez, N.; Guerrero, J.M. Melatonin and Glucose Metabolism: Clinical Relevance. *Curr. Pharm. Des.* **2014**, *20*, 4841–4853. [[PubMed](#)]

158. Qian, J.; Scheer, F.A.J.L. Circadian System and Glucose Metabolism: Implications for Physiology and Disease. *Trends Endocrinol. Metab.* **2016**, *27*, 282–293. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
159. Bailey, C.J.; Atkins, T.W.; Matty, A.J. Melatonin inhibition of insulin secretion in the rat and mouse. *Horm. Res. Paediatr.* **1974**, *5*, 21–28. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
160. Gorray, K.; Quay, W.; Ewart, R.B. Effects of Pinealectomy and Pineal Incubation Medium and Sonicates on Insulin Release by Isolated Pancreatic Islets In Vitro. *Horm. Metab. Res.* **1979**, *11*, 432–436. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
161. Diaz, B.; Blázquez, E. Effect of pinealectomy on plasma glucose, insulin and glucagon levels in the rat. *Horm. Metab. Res.* **1986**, *18*, 225–229. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
162. Lima, F.B.; Machado, U.F.; Bartol, I.; Seraphim, P.M.; Sumida, D.H.; Moraes, S.M.; Hell, N.S.; Okamoto, M.M.; Saad, M.J.; Carvalho, C.R.; et al. Pinealectomy causes glucose intolerance and decreases adipose cell responsiveness to insulin in rats. *Am. J. Physiol.* **1998**, *275*, E934–E941. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
163. Champney, T.H.; Brainard, G.C.; Richardson, B.A.; Reiter, R.J. Experimentally-induced diabetes reduces nocturnal pineal melatonin content in the Syrian hamster. *Comp. Biochem. Physiol. Part A Physiol.* **1983**, *76*, 199–201. [[CrossRef](#)]
164. Nagorny, C.L.F.; Sathanoori, R.; Voss, U.; Mulder, H.; Wierup, N. Distribution of melatonin receptors in murine pancreatic islets. *J. Pineal Res.* **2011**, *50*, 412–417. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
165. Mühlbauer, E.; Albrecht, E.; Hofmann, K.; Bazwinsky-Wutschke, I.; Peschke, E. Melatonin inhibits insulin secretion in rat insulinoma  $\beta$ -cells (INS-1) heterologously expressing the human melatonin receptor isoform MT2. *J. Pineal Res.* **2011**, *51*, 361–372. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
166. Bazwinsky-Wutschke, I.; Mühlbauer, E.; Albrecht, E.; Peschke, E. Calcium-signaling components in rat insulinoma  $\beta$ -cells (INS-1) and pancreatic islets are differentially influenced by melatonin. *J. Pineal Res.* **2014**, *56*, 439–449. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
167. She, M.; Laudon, M.; Yin, W. Melatonin receptors in diabetes: A potential new therapeutical target? *Eur. J. Pharmacol.* **2015**, *744*, 220–223. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
168. Zibolka, J.; Mühlbauer, E.; Peschke, E. Melatonin influences somatostatin secretion from human pancreatic  $\delta$ -cells via MT1 and MT2 receptors. *J. Pineal Res.* **2015**, *58*, 198–209. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
169. Stumpf, I.; Mühlbauer, E.; Peschke, E. Involvement of the cGMP pathway in mediating the insulin-inhibitory effect of melatonin in pancreatic  $\beta$ -cells. *J. Pineal Res.* **2008**, *45*, 318–327. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
170. Peschke, E.; Bach, A.G.; Mühlbauer, E. Parallel signaling pathways of melatonin in the pancreatic  $\beta$ -cell. *J. Pineal Res.* **2006**, *40*, 184–191. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
171. Li, Y.; Wu, H.; Liu, N.; Cao, X.; Yang, Z.; Lu, B.; Hu, R.; Wang, X.; Wang, J.; Li, Y.; et al. Melatonin exerts an inhibitory effect on insulin gene transcription via MTNR1B and the downstream Raf-1/ERK signaling pathway. *Int. J. Mol. Med.* **2018**, *41*, 955–961. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
172. Mssig, K.; Staiger, H.; MacHicao, F.; Hring, H.U.; Fritsche, A. Genetic variants in MTNR1B affecting insulin secretion. *Ann. Med.* **2010**, *42*, 387–393. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
173. Tam, C.H.T.; Ho, J.S.K.; Wang, Y.; Lee, H.M.; Lam, V.K.L.; Germer, S.; Martin, M.; So, W.Y.; Ma, R.C.W.; Chan, J.C.N.; et al. Common polymorphisms in MTNR1B, G6PC2 and GCK are associated with increased fasting plasma glucose and impaired beta-cell function in Chinese subjects. *PLoS ONE* **2010**, *5*, e11428. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
174. Sparsø, T.; Bonnefond, A.; Andersson, E.; Bouatia-Naji, N.; Holmkvist, J.; Wegner, L.; Grarup, N.; Gjesing, A.P.; Banasik, K.; Cavalcanti-Proença, C.; et al. G-allele of intronic rs10830963 in MTNR1B confers increased risk of impaired fasting glycemia and type 2 diabetes through an impaired glucose-stimulated insulin release: Studies involving 19,605 Europeans. *Diabetes* **2009**, *58*, 1450–1456. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
175. Tuomi, T.; Nagorny, C.L.F.F.; Singh, P.; Bennet, H.; Yu, Q.; Alenkvist, I.; Isomaa, B.; Östman, B.; Söderström, J.; Pesonen, A.K.; et al. Increased Melatonin Signaling Is a Risk Factor for Type 2 Diabetes. *Cell Metab.* **2016**, *23*, 1067–1077. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
176. Mulder, H. Melatonin signalling and type 2 diabetes risk: Too little, too much or just right? *Diabetologia* **2017**, *60*, 826–829. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
177. Simões, D.; Riva, P.; Peliciari-Garcia, R.A.; Cruzat, V.F.; Graciano, M.F.; Munhoz, A.C.; Taneda, M.; Cipolla-Neto, J.; Carpinelli, A.R. Melatonin modifies basal and stimulated insulin secretion via NADPH oxidase. *J. Endocrinol.* **2016**, *231*, 235–244. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

178. Park, J.H.; Shim, H.M.; Na, A.Y.; Bae, K.C.; Bae, J.H.; Im, S.S.; Cho, H.C.; Song, D.K. Melatonin prevents pancreatic  $\beta$ -cell loss due to glucotoxicity: The relationship between oxidative stress and endoplasmic reticulum stress. *J. Pineal Res.* **2014**, *56*, 143–153. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
179. Costes, S.; Boss, M.; Thomas, A.P.; Matveyenko, A.V. Activation of Melatonin Signaling Promotes  $\beta$ -Cell Survival and Function. *Mol. Endocrinol.* **2015**, *29*, 682–692. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
180. Li, T.; Ni, L.; Zhao, Z.; Liu, X.; Lai, Z.; Di, X.; Xie, Z.; Song, X.; Wang, X.; Zhang, R.; et al. Melatonin attenuates smoking-induced hyperglycemia via preserving insulin secretion and hepatic glycogen synthesis in rats. *J. Pineal Res.* **2018**, *64*, e12475. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
181. Mayo, J.C.; Hevia, D.; Quiros-Gonzalez, I.; Rodriguez-Garcia, A.; Gonzalez-Menendez, P.; Cepas, V.; Gonzalez-Pola, I.; Sainz, R.M. IGFBP3 and MAPK/ERK signaling mediates melatonin-induced antitumor activity in prostate cancer. *J. Pineal Res.* **2017**, *62*, e12373. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
182. Sharma, S.; Singh, H.; Ahmad, N.; Mishra, P.; Tiwari, A. The role of melatonin in diabetes: Therapeutic implications. *Arch. Endocrinol. Metab.* **2015**, *59*, 391–399. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
183. Lo, C.C.; Lin, S.H.; Chang, J.S.; Chien, Y.W. Effects of melatonin on glucose homeostasis, antioxidant ability, and adipokine secretion in ICR mice with NA/STZ-induced hyperglycemia. *Nutrients* **2017**, *9*, 1187. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
184. Rubio-Sastre, P.; Scheer, F.A.J.L.; Gómez-Abellán, P.; Madrid, J.A.; Garaulet, M. Acute Melatonin Administration in Humans Impairs Glucose Tolerance in Both the Morning and Evening. *Sleep* **2014**, *37*, 1715–1719. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
185. Rigas, A.N.; Bittles, A.H.; Hadden, D.R.; Montgomery, D.A. Circadian variation of glucose, insulin, and free fatty acids during long-term use of oral hypoglycaemic agents in diabetes mellitus. *Br. Med. J.* **1968**, *4*, 25–28. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
186. Gagliardino, J.J.; Hernández, R.E. Circadian variation of the serum glucose and immunoreactive insulin levels. *Endocrinology* **1971**, *88*, 1532–1534. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
187. Boden, G.; Ruiz, J.; Urbain, J.L.; Chen, X. Evidence for a circadian rhythm of insulin secretion. *Am. J. Physiol. Metab.* **1996**, *271*, E246–E252. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
188. Zibolka, J.; Bazwinsky-Wutschke, I.; Mühlbauer, E.; Peschke, E. Distribution and density of melatonin receptors in human main pancreatic islet cell types. *J. Pineal Res.* **2018**, *65*, e12480. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
189. Bouatia-Naji, N.; Bonnefond, A.; Cavalcanti-Proença, C.; Sparsø, T.; Holmkvist, J.; Marchand, M.; Delplanque, J.; Lobbens, S.; Rocheleau, G.; Durand, E.; et al. A variant near MTNR1B is associated with increased fasting plasma glucose levels and type 2 diabetes risk. *Nat. Genet.* **2009**, *41*, 89–94. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
190. Tilden, A.; McGann, L.; Schwartz, J.; Bowe, A.; Salazar, C. Effect of melatonin on hemolymph glucose and lactate levels in the fiddler crab *Uca pugilator*. *J. Exp. Zool.* **2001**, *290*, 379–383. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
191. Köhidai, L.; Vakkuri, O.; Keresztesi, M.; Leppäluoto, J.; Csaba, G. Melatonin in the unicellular *Tetrahymena pyriformis*: Effects of different lighting conditions. *Cell Biochem. Funct.* **2002**, *20*, 269–272. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]





## Research Paper

# GLUT1 protects prostate cancer cells from glucose deprivation-induced oxidative stress

Pedro Gonzalez-Menendez<sup>a</sup>, David Hevia<sup>a</sup>, Rebeca Alonso-Arias<sup>b</sup>, Alejandro Alvarez-Artime<sup>a</sup>, Aida Rodriguez-Garcia<sup>c</sup>, Sandrina Kinet<sup>d,e</sup>, Ivan Gonzalez-Pola<sup>a</sup>, Naomi Taylor<sup>d,e</sup>, Juan C. Mayo<sup>a,\*,1</sup>, Rosa M. Sainz<sup>a,\*,1</sup>

<sup>a</sup> Department of Morphology and Cell Biology, Redox Biology Unit. University Institute of Oncology of Asturias (IUOPA), University of Oviedo. Facultad de Medicina, Julián Clavería 6, 33006 Oviedo, Spain

<sup>b</sup> Department of Immunology, Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA), Avenida de Roma, 33011 Oviedo, Spain

<sup>c</sup> Department of Microbiology, Tumor, and Cell Biology (MTC), Karolinska Institute, Tomtebodavägen 12C, lastkajen, 171 65 Stockholm, Sweden

<sup>d</sup> Institut de Genetique Moleculaire de Montpellier, Centre National de la Recherche Scientifique UMR5535, Université de Montpellier 1 et 2, F-34293 Montpellier, France

<sup>e</sup> Laboratory of Excellence GR-Ex, Paris 75015, France

## ARTICLE INFO

## Keywords:

Glut1  
Prostate cancer  
Glucose deprivation  
Androgen receptor  
Glutathione  
Oxidative stress

## ABSTRACT

Glucose, chief metabolic support for cancer cell survival and growth, is mainly imported into cells by facilitated glucose transporters (GLUTs). The increase in glucose uptake along with tumor progression is due to an increment of facilitative glucose transporters as GLUT1. GLUT1 prevents cell death of cancer cells caused by growth factors deprivation, but there is scarce information about its role on the damage caused by glucose deprivation, which usually occurs within the core of a growing tumor. In prostate cancer (PCa), GLUT1 is found in the most aggressive tumors, and it is regulated by androgens. To study the response of androgen-sensitive and insensitive PCa cells to glucose deprivation and the role of GLUT1 on survival mechanisms, androgen-sensitive LNCaP and castration-resistant LNCaP-R cells were employed. Results demonstrated that glucose deprivation induced a necrotic type of cell death which is prevented by antioxidants. Androgen-sensitive cells show a higher resistance to cell death triggered by glucose deprivation than castration-resistant cells. Glucose removal causes an increment of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, an activation of androgen receptor (AR) and a stimulation of AMP-activated protein kinase activity. In addition, glucose removal increases GLUT1 production in androgen sensitive PCa cells. GLUT1 ectopic overexpression makes PCa cells more resistant to glucose deprivation and oxidative stress-induced cell death. Under glucose deprivation, GLUT1 overexpressing PCa cells sustains mitochondrial SOD2 activity, compromised after glucose removal, and significantly increases reduced glutathione (GSH). In conclusion, androgen-sensitive PCa cells are more resistant to glucose deprivation-induced cell death by a GLUT1 upregulation through an enhancement of reduced glutathione levels.

## 1. Introduction

Cancer cells usually show different metabolic requirements than healthy cells to satisfy the higher demand aimed for proliferation. This evidence was first described by Otto Warburg in the 20's, and it is already considered as one of the hallmarks of cancer [1,2]. Tumor cells usually increase their nutrients uptake, mainly glucose and glutamine. The increase in glycolytic flux, independent of oxygen concentration

(i.e. “aerobic glycolysis”), is employed to obtain NADPH as well as the required precursors for biosynthesis [3].

Besides the promotion of cell proliferation, glucose metabolism protects from cell death. Thus, an increase in glycolytic flux turn cells into a more resistant phenotype to apoptosis [4]. The inhibition of cell metabolism by nutrient deprivation has been proposed as an effective approach to kill tumor cells [5]. After glucose withdrawal, reactive oxygen species (ROS) are generated by mitochondrial dysfunction [6],

**Abbreviations:** 2DG, 2-deoxyglucose; AMPK, AMPK-activated protein kinase; AR, Androgen Receptor; CAT, Catalase; DHA, Dehydroascorbic Acid; G6PG, Glucose-6-phosphate dehydrogenase; GPX, Glutathione peroxidase; GSH, Reduced glutathione; GSSG, Oxidized glutathione; HTLV, Human lymphotropic virus; NAC, n-Acetylcysteine; NAMPT, Nicotinamide phosphoribosyltransferase; PCa, Prostate Cancer; PI3K, phosphoinositide 3-kinase; PSA, Prostate Specific Antigen; OXPHOS, Oxidative phosphorylation; RIPK1, Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1; SOD, Superoxide dismutase; TRX, Thioredoxin; TXNIP, Thioredoxin interacting protein

\* Correspondence to: Departamento de Morfología y Biología Celular, Facultad de Medicina, C/Julián Clavería 6, 33006 Oviedo, Spain.

E-mail addresses: [majojuan@uniovi.es](mailto:majojuan@uniovi.es) (J.C. Mayo), [sainzrosa@uniovi.es](mailto:sainzrosa@uniovi.es) (R.M. Sainz).

<sup>1</sup> Both authors contributed equally.

<https://doi.org/10.1016/j.redox.2018.03.017>

Received 22 February 2018; Received in revised form 20 March 2018; Accepted 26 March 2018

Available online 12 April 2018

2213-2317/ © 2018 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).



but sometimes cancer cells evolved to avoid this metabolic stress by mechanisms still unknown.

Glucose uptake is higher in tumor cells by an increase in protein production and membrane translocation of facilitative glucose transporters (GLUTs). Glucose uptake in cancer cells has been mainly associated with GLUT1, which is overexpressed by growth factors and usually correlates with cancer malignancy [7]. However, it may also involve other GLUTs [8–10]. In addition to a drop in oxygen levels, the core of a growing tumor also displays glucose starvation [11], and nutrient removal alters expression or location of GLUT transporters. It has been described that at least one of the GLUT isoforms is upregulated in response to glucose deprivation in cancer cells [12]. Moreover, when non-tumor cells are under growth factors deprivation, GLUT1 is usually internalized and degraded in lysosomes. Consequently, glucose uptake and metabolism dramatically decrease before cell death. Cancer cells often overexpress GLUT1 in response to the absence of growth factors, maintaining glucose metabolism and becoming resistant to apoptosis [13].

In prostate cancer (PCa), glucose metabolism plays a major role in progression [14]. Androgens can activate the metabolic regulator AMP-activated kinase (AMPK), promoting oxidative phosphorylation (OXPHOS) [15]. Besides, androgens increase GLUT1 [16], which overproduction has been described in the most aggressive tumors [17,18]. Recently, our group described that this transporter is regulated by compounds that block glucose uptake in PCa cells and prevent cancer progression [19].

This work aimed to study the sensitivity of androgen-sensitive and insensitive prostate cancer cells to nutrients deprivation and the possible role of GLUT1 on survival mechanisms of PCa cells after glucose deprivation, a situation that occurs in the core of tumors.

## 2. Material and methods

### 2.1. Cell culture, transfection, and reagents

Human androgen-sensitive LNCaP cells were purchased from European Collection of Cell Cultures (Catalog number 89110211, Salisbury, UK) and were cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 10% FBS, 2mM L-glutamine, 15 mM HEPES, 100 µg/ml ampicillin and 100 µg/ml kanamycin. PC-3 cells, a human androgen-insensitive cell line, were purchased from American Type Culture Collection (Catalog number CRL-1435, Manassas, VA, USA) and were grown in DMEM/F12 medium supplemented with 10% FBS, 2% L-glutamine and 1% antibiotic-antimycotic cocktail (100 U/ml penicillin, 10 µg/ml streptomycin and 0.25 µg/ml amphotericin B). Both cell lines were authenticated by short tandem repeat (STR) profiling. Jurkat cells were employed as a positive control in the study of GLUT1 surface levels [20]. Cells were maintained in complete RPMI-1640 and DMEM/F12, respectively. Cell lines were grown at 37 °C in a humidified 5% CO<sub>2</sub> environment.

LNCaP-R cells, a clone of castration-resistant LNCaP were achieved as previously described [21]. Briefly, LNCaP cells were grown in RPMI-1640 supplemented with foetal bovine serum FBS was stripped from small molecular weight molecules including steroids by incubation with charcoal/dextran. For this purpose, FBS was incubated with a mixture of 2.5% charcoal-activated plus 0.025% Dextran T70 overnight at 4 °C. Charcoal/dextran-stripped FBS (FBS<sub>chst</sub>) was added to the culture medium and filtered through a 0.22-µm sterile filter. Media plus FBS<sub>chst</sub> were changed every other day. After 2 weeks, a massive cell death was observed and only a small amount of cells survived. After a month, isolated colonies were selected, subcultured in small 24-well plates and left to grow all the time in the presence of FBS<sub>chst</sub> culture media. Androgen-resistant colonies were maintained and grew continuously for at least 6 months. AR production in LNCaP-R was confirmed (Supplementary Fig. S1A). AR cytosolic location and androgen-insensitivity of LNCaP-R cells was proved (data not shown)

LNCaP or PC-3 GLUT1-overexpressing cells were obtained by using FuGENE<sup>®</sup> HD (Promega Biotech Iberica S.L., Alcobendas, Madrid), following manufacturer's instructions. Plasmid pcDNA3.2/v5-DEST hGLUT1 catalog number 18,085 (Addgene Europe, Teddington, UK) nicely deposited by Wolf Frommer [22]. Cells were selected by incubation with 300 µg/ml G418 (Sigma-Aldrich Quimica SL, Madrid, Spain). GLUT1 overproduction in LNCaP<sup>GLUT1</sup> and PC-3<sup>GLUT1</sup> cells were confirmed (Supplementary Fig. S1B). The increase in glucose uptake of GLUT1-overexpressing cells was also confirmed (data not shown).

For all treatments, cells were left to attach for 48 h. Glucose concentration was always set at 2 g/L (11 mM). For glucose/glutamine deprivation assays, complete medium without glucose or glutamine was purchased (Lonza Biologics Porriño SL, Barcelona, Spain). Fructose or mannose (11 mM) were added in the absence of glucose, and 2-deoxyglucose (2DG) (10 mM) (Alfa Aesar-Thermo Fisher, Karlsruhe, Germany) was employed to disable glycolysis in the presence of glucose.

Cell death was assayed by using 10 µM of the inhibitor of caspases q-VD-OPH (Sigma-Aldrich Quimica SL, Madrid, Spain) was used to study apoptosis, 100 µM necrostatin-1 to Receptor-Interacting serine/threonine-Protein Kinase 1 (RIPK1)-dependent necroptosis, 25 µM necrostatin-7 to RIPK1-independent necroptosis, 2 µM ferrostatin-1 to ferroptosis and 2 mM 3-methyladenine (3MA) to inhibit autophagy (Cayman Chemical Hamburg, Germany). N-acetyl-cysteine (NAC) (Alfa Aesar-Thermo Fisher, Karlsruhe, Germany), catalase, dehydroascorbic acid (DHA) or (±)-6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethyl-chromane-2-carboxylic acid (Trolox) (Sigma-Aldrich Quimica SL, Madrid, Spain) were employed as antioxidants. Hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) was used as oxidant agent (Sigma-Aldrich Quimica SL, Madrid, Spain) and phloretin was employed to inhibit GLUT1 transporter. All vehicles were adjusted to the same concentration in each experimental group.

### 2.2. Trypan Blue exclusion

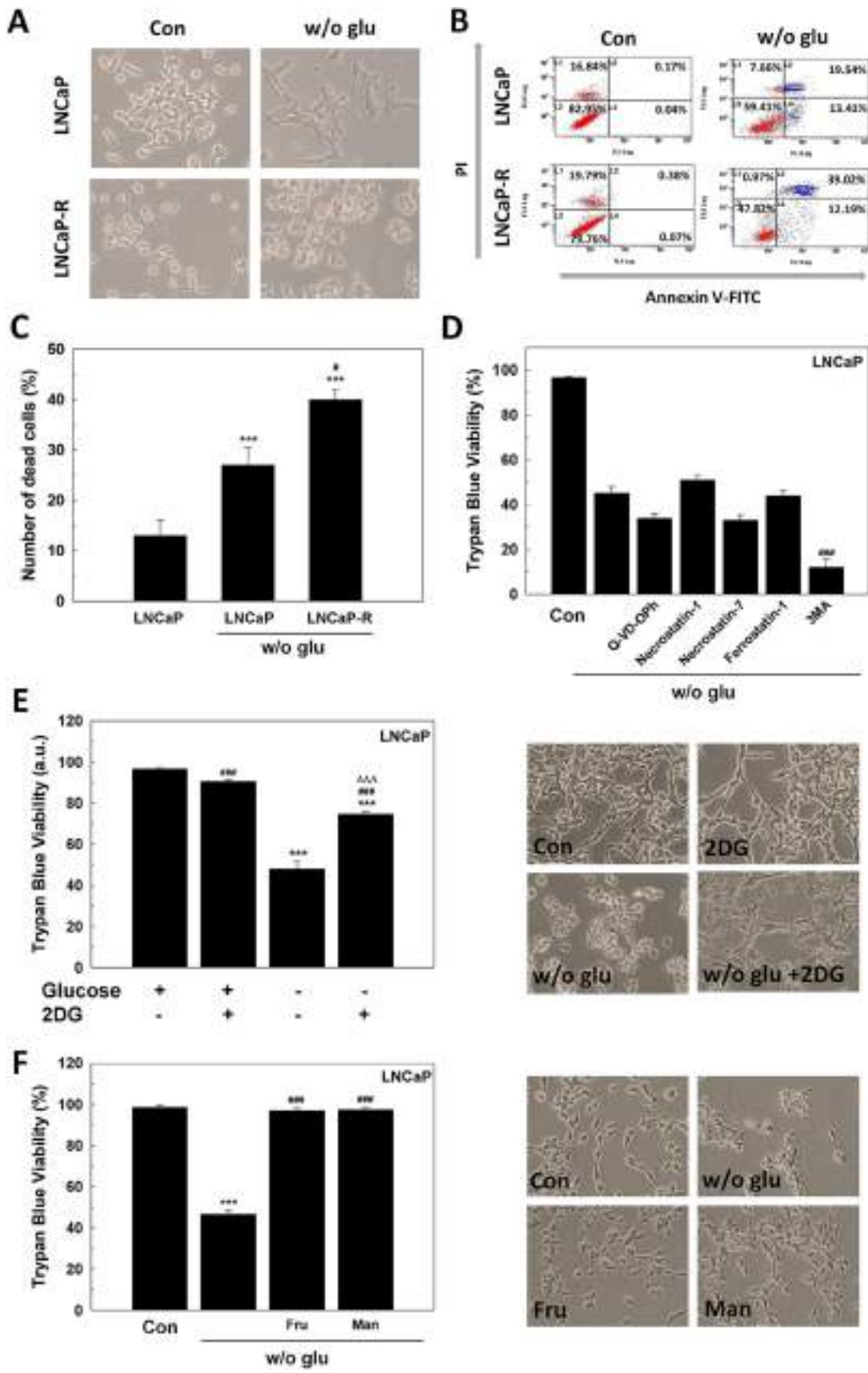
Cells were seeded in 6-well plates. After treatments, cells were collected by scraping, centrifuged at 300 × g for 5 min and then suspended in PBS. Total cells and dead cells were counted in 0.2% Trypan Blue solution after 5 min at RT.

### 2.3. Flow cytometry

Cell cycle was studied by staining with 50 µg/ml propidium iodide (PI) and analyzed by flow cytometry. Apoptosis was quantified by Annexin-V staining. Cells were reacted with annexin-V-fluorescein and PI for 10 min at RT following manufacturer's instructions (Immunostep SL, Salamanca, Spain) and then, cells were analyzed. The percentage of death cells corresponds to PI-positive cells and Annexin V/PI double positive cells.

The production of GLUT1 and AR was also studied by flow cytometry. For that, cells were fixed and permeability was performed by incubation in methanol for 10 min at RT. Cells were reacted against anti-GLUT1 and anti-AR at RT for 30 min (antibodies properties are collected in Sup. Table 1) and then, they were stained with rabbit secondary antibodies conjugated with Alexa Fluor 488 dye (Thermo Fisher Scientific, Madrid, Spain) [23]. To detect nuclear AR, cells were suspended in ice cold extraction buffer (320 mM sucrose, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM HEPES, 1% Triton X-100, pH 7.4) for 15 min to isolate nuclei. GLUT1 surface was monitored as a function of binding to the envelope glycoprotein of the human lymphotropic virus (HTLV) HTLV was fused to EGFP (H<sub>RBD</sub>EGFP, Metafora Biosystems, Montpellier, France), and it was added to cells at a concentration 1:10 in PBS with 2%FBS as previously reported [20].

All samples were analyzed in a Cytomics FC500 flow cytometer (Beckman Coulter), and data analysis was performed by using FlowJo and Kaluza software.



(caption on next page)

**Fig. 1. The response of LNCaP cells to glucose deprivation.** (A–C) Annexin-V/PI assay of LNCaP and LNCaP-R cells after 48 h since glucose withdrawal. Micrographs (A) and one representative experiment (B) are shown. Original magnification 200 $\times$ . Results are expressed as % PI-positive cells (dead cells) (C). (D) Trypan Blue results of LNCaP cells grown in absence of glucose and with 10  $\mu$ M of the inhibitor of caspases q-VD-OPH, 100  $\mu$ M of the inhibitor of necroptosis necrostatin-1, 25  $\mu$ M of the inhibitor of RIPK1-independent necroptosis necrostatin-7, 2  $\mu$ M of the inhibitor of ferroptosis ferrostatin-1 or 2 mM 3-methyladenine (3MA) to inhibit autophagy. DMSO was added as vehicle. (E) Trypan Blue assay was performed in LNCaP cells grown in the absence of glucose, with 10 mM 2DG or under both conditions for 48 h (left panel). Representative micrographs are shown (right panel). Original magnification 200 $\times$ . (F) Cell counting and viability by trypan blue of LNCaP cells grown with 11 mM (2 g/L) fructose (fru) or mannose (man) without glucose for 48 h. Representative micrographs are shown (right panel). Original magnification 200 $\times$ . Glucose concentration in control cells was always set at 2 g/L. Arbitrary 1.0 value was given to control cells. Results are expressed as mean  $\pm$  SEM (n = 3). \*p < 0.05 vs control; \*\*p < 0.01 vs control; \*\*\*p < 0.001 vs control; #p < 0.05 vs w/o glu; ###p < 0.001 vs w/o glu. <sup>^^^</sup>p < 0.001 vs 2DG.

#### 2.4. PAGE and immunoblotting

Total, cytoplasmic and nuclear proteins were obtained, separated and electrotransferred as previously described [24]. For total protein extraction, cells were lysed in RIPA lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.1% SDS, 1% Igepal C and 0.5% sodium deoxycholate) supplemented with 1 mM Dithiothreitol (DTT) and a protease inhibitor cocktail (10  $\mu$ g/ml leupeptin, 2  $\mu$ g/ml aprotinin A, 1  $\mu$ g/ml pepstatin, 200  $\mu$ M sodium orthovanadate, 1 mM sodium fluoride and 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride). To achieve cytoplasm and nuclear separation, cells were lysed in low-salt buffer (10 mM HEPES-KOH, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 15 mM NaCl, 0.1 mM EDTA) containing 1 mM DTT, protease inhibitors and 0.2% Igepal C for 20 min at 4 °C. Nuclear fractions were collected by centrifugation at 14,000 $\times$ g 5 min at 4 °C and supernatants (cytosolic fraction) were transferred to clean tubes. Nuclear pellet was incubated with high-salt lysis buffer (420 mM NaCl, 20 mM HEPES-KOH, 10 mM KCl, 1 mM EDTA and 20% glycerol) supplemented with 1 mM DTT and protease inhibitors. After incubation on ice for 15 min, nuclear extracts were clarified by centrifugation at 13,000 $\times$ g for 30 min at 4 °C. Protein concentration was estimated using Bradford protein assay (Bio-Rad Laboratories Inc., Madrid, Spain).

Antibodies (Sup. Table 1) were visualized by binding horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit or anti-mouse (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Tx, USA) secondary antibodies and detected with chemiluminescence substrate (Millipore, Merck Chemicals & Life Science SA, Madrid, Spain).

#### 2.5. Glucose and glutamine uptake and glucose measurement in cell culture medium

Glucose and glutamine uptake were assessed as described previously [25,26]. Briefly, 2DG uptake was initiated by the addition of labeled 2-deoxy-D[1-<sup>3</sup>H] glucose to a final concentration of 2  $\mu$ Ci (1 Ci = 37 GBq). Glutamine uptake was initiated by the addition of labeled L-2,3,4-<sup>3</sup>H glutamine (0.5  $\mu$ Ci). Incubation was performed for 10 min at RT. For standardization, cells were counted using a Neubauer hemocytometer chamber before each experiment.  $2.5 \times 10^5$  LNCaP or  $1.5 \times 10^5$  PC3 cells were employed in each assay.

#### 2.6. Immunocytochemistry

Cells were fixed in phosphate buffered 2% paraformaldehyde pH 7.4. Samples were blocked by incubation with TBS (Tris-HCl 20 mM pH 7.4, 150 mM NaCl) plus 1% Bovine Serum Albumin (BSA) or 3% goat serum and permeabilization was achieved by incubation with 0.15% Tween-20 (cytoplasmic) or 0.1% TritonX-100 (nuclear) for 20 min at RT. Samples were studied under a Leica TCS SP8 microscope [19].

#### 2.7. PSA levels

Prostate Specific Antigen (PSA) release was measured by ELISA following manufacturer's instructions (Human Diagnostics, Wiesbaden, Germany). Protein concentration was quantified by Bradford Assay for standardization (Bio-Rad Laboratories Inc, Madrid, Spain).

#### 2.8. ATP/AMP determination by HPLC

Cells were seeded in 100 mm plate and harvested by scrapping at 70% confluence. After centrifugation at 500 $\times$ g for 5 min 4 °C, cell pellets were dissolved in 0.3 M perchloric acid and incubated 5 min at 4 °C for protein precipitation. Samples were centrifuged at 9000 $\times$ g for 5 min, and supernatants were neutralized with 1 M KOH. HPLC was performed after centrifugation at 9000 $\times$ g for 10 min. Adenine nucleotides (ATP, ADP, and AMP) were separated in a 15 cm  $\times$  4.6 mm, 3 mm SUPELCOSIL LC-18-T column (SUPELCO, Sigma-Aldrich Quimica SL, Madrid, Spain) with a mobile phase composed of A mobile phase (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/tetrabutylammonium hydrogen sulfate -TBHS-, pH 6.0) and B mobile phase (MeOH + TBHS, pH 5.5). Flow rate was set at 1.2 ml in a gradient mode 0 min (0%B), 2.5 min (0%B), 7 min (20%B), 14 min (40%B), 19 min (100%B), 24 min (100%B), 27 min (0%B). Nucleotides were detected by UV absorption at 260 nm and identified and quantified by the comparison of retention time with standards. Protein concentration was quantified by Bradford Assay for standardization (Bio-Rad Laboratories Inc, Madrid, Spain).

#### 2.9. Detection of intracellular ROS levels

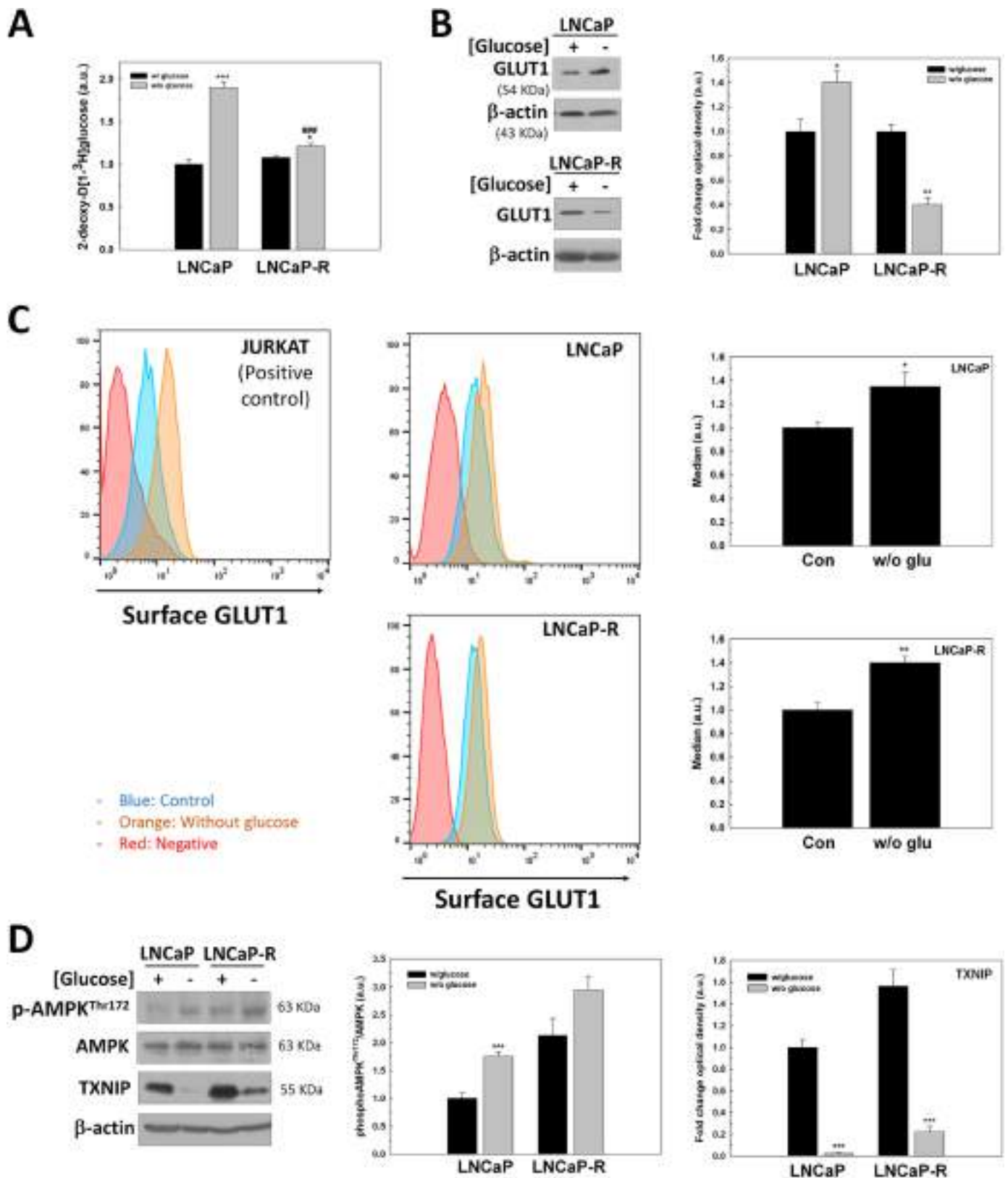
Cells were collected by trypsinization and washed twice with PBS. The number of cells was adjusted to  $5 \times 10^5$ /sample. Total ROS levels were measured incubating cells with 1  $\mu$ M H<sub>2</sub>DCFDA (Bioquochem SL, Llanera, Spain) for 15 min at 37 °C. Mitochondrial O<sub>2</sub><sup>-</sup> was measured by using MitoSOX (Fisher Scientific, Madrid, Spain). Cells were stained with 5  $\mu$ M MitoSOX at 37 °C for 15 min. Cells were analyzed using a Cytomics FC500 flow cytometer after staining. and data analysis was performed by using Kaluza software.

#### 2.10. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> determination

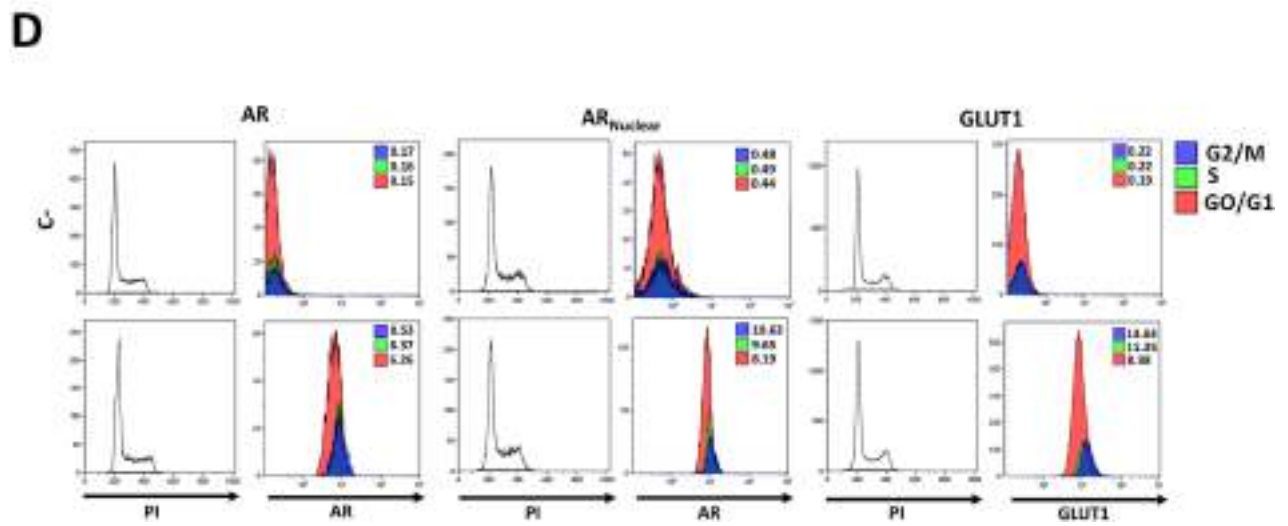
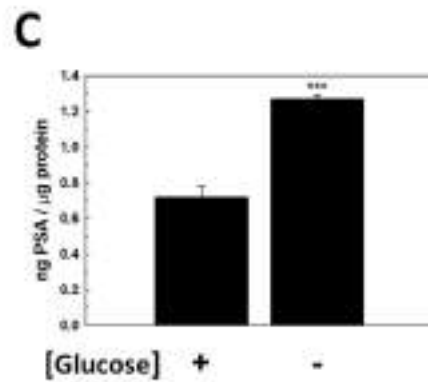
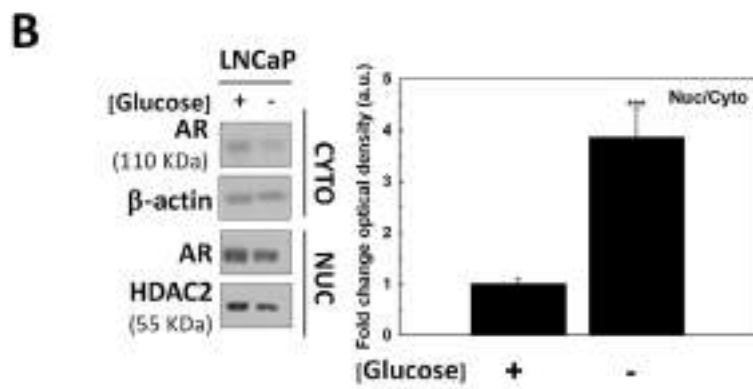
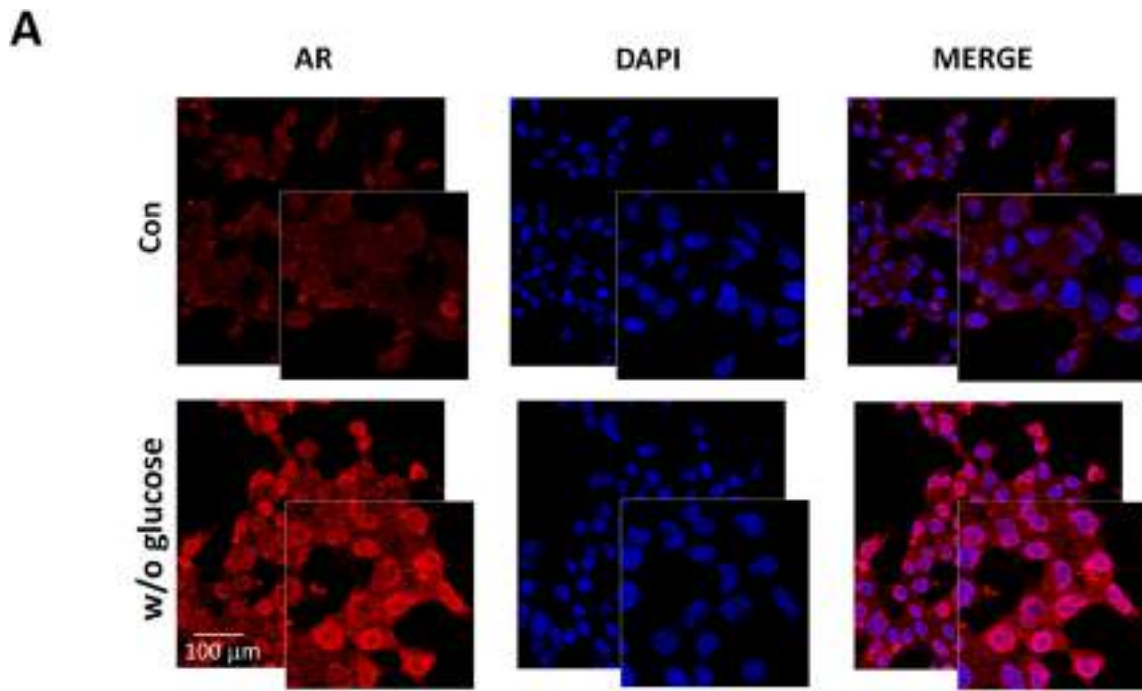
First, cells were seeded in 6-well plate, and cell culture medium was collected when cells reached at 70% confluence. Then, the medium was centrifuged to eliminate cell debris. An electro-oxidation and amperometric detection were employed for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> determination as previously described [24]. Screen-printed electrodes with co-phthalocyanine were used as electrochemical mediator (Bioquochem SL, Llanera, Spain). Intensity (mA) was registered for 200 s employing + 0.4 V as work potential. Each sample was measured before and after adding 25 units of catalase. Protein concentration was quantified by Bradford Assay for standardization (Bio-Rad Laboratories Inc, Madrid, Spain).

#### 2.11. SOD activity assay

Cell lysis was accomplished by freeze-thaw cycles in PBS and sonication. Proteins were cleaned by centrifugation (12,000 $\times$ g). Superoxide dismutase (SOD) activity was performed following manufacturer's instructions (Sigma-Aldrich Quimica SL, Madrid, Spain). Samples were treated with 5 mM potassium cyanide 30 min before the assay to inhibit the activity of cytosolic CuZnSOD (SOD1) in order to quantify mitochondrial SOD2 activity. Protein concentration was quantified by using Bradford Assay for standardization (Bio-Rad Laboratories Inc, Madrid, Spain).



**Fig. 2.** The regulation of GLUT1 under glucose deprivation in LNCaP cells. (A) 2DG uptake levels were evaluated in LNCaP and LNCaP-R cells grown in absence of glucose for 24 h. (B) GLUT1 protein expression was determined by western-blot under the same conditions. (C) GLUT1 surface expression was studied by flow cytometry. Levels were measured after 24 h since medium renewal. Jurkat cells were employed as a positive control. One representative experiment is shown. (D) TXNIP, phosphoAMPK<sup>Thr172</sup> and AMPK protein levels were also analyzed by western-blot in cells grown without glucose for 24 h. Glucose concentration in cell culture medium was always set at 2 g/L for control cells. In western-blot experiments, beta-actin was used as internal standard and one representative experiment is shown. Results are expressed as mean ± SEM (n = 3). \*p < 0.05 vs control; \*\*p < 0.01 vs control; \*\*\*p < 0.001 vs control.



(caption on next page)

**Fig. 3. The effect of glucose deprivation in AR signaling.** (A) Immunocytochemical analysis of AR in LNCaP cells glucose-deprived for 24 h. Cells were incubated with a secondary antibody conjugated with phycoerythrin (red fluorescence) and then counterstained with DAPI (blue fluorescence). A representative picture is shown. (B) Nuclear (Nuc) and cytoplasmic (Cyto) AR protein levels were determined by western-blot using the same experimental conditions. beta-actin was used as cytoplasmic internal standard while HDAC2 was used as a nuclear internal standard. Nuclear/cytoplasmic AR ratio was determined. One representative experiment is shown. The experiment was performed 3 times (C) PSA levels in culture medium without glucose were determined by ELISA measurement. Results were standardized to protein concentration (ng PSA/ $\mu$ g protein). (D) GLUT1, total AR and nuclear AR protein production along cell cycle. Cells were incubated with a secondary antibody conjugated with AlexaFluor488 and then with Propidium iodide (PI) are shown in lower panels. Negative controls (C-), unstained cells, are shown in upper panels. Fluorescence was measured by flow cytometry. One representative of three different experiments is shown. Glucose concentration was always set at 2 g/L in control cells. Arbitrary 1.0 value was given to control cells and results are expressed as mean  $\pm$  SEM (n = 3) in all experiments. \*\*\*p < 0.001 vs control.

### 2.12. Native gel for determination of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> depuration by catalase

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> depuration by catalase (CAT) was determined as previously described with minor modifications [27]. Briefly, protein samples were obtained by lysing cells using freeze-thaw cycles in PBS and sonication. Proteins were centrifuged (12,000  $\times$  g) and quantified by Bradford Assay (Bio-Rad Laboratories Inc, Madrid, Spain). 30  $\mu$ g of cell extracts were separated on a 6% native acrylamide gel, and CAT was determined by incubating with 0.003% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 10 min and then adding 2% FeCl<sub>3</sub> and 2% potassium ferrocyanurum.

### 2.13. Thiol and disulfide assay

Thiol and disulfide assay was employed to measure total reduced and oxidized glutathione (GSH and GSSG). Cells were seeded in 6-well plates and collected at 70% confluence. Cells were harvested by scraping, pelleted, and suspended in 50  $\mu$ l of deproteinization buffer (0.1% Triton X-100 in 5% sulfosalicylic). The assay was performed following manufacturer's instructions (Bioquochem, Llanera, Spain). Cell number was previously adjusted using a Neubauer counting chamber for standardization.

### 2.14. Statistical analysis

Data are presented as a mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM). Differences were assessed using one-way ANOVA, followed by a Student-Newman-Keuls (SNK) post-hoc 't' test.

## 3. Results

### 3.1. Androgen-sensitive PCa cells are more resistant to cell death induced by glucose deprivation than androgen-insensitive cells

Tumor heterogeneity is usually reflected by metabolic differences within cancer cells, including the response to the limited source of nutrients. Here, the response to glucose deprivation of androgen-sensitive and insensitive cells was studied. LNCaP was employed as a model of androgen-sensitive cells. Castration-resistant LNCaP-R, established from LNCaP cells by growing in the absence of androgens for at least 6 months, were used as a model of androgen-insensitive cells.

After glucose deprivation, cells showed morphological features distinctive of cell death (Fig. 1A). Cell death was evaluated by dual staining with fluorescent Annexin V and propidium iodide (PI) after 48 h of glucose removal. The number of Annexin V/PI positive cells are shown in Fig. 1B-C. Androgen-insensitive LNCaP-R showed a higher sensitivity to glucose deprivation compared to androgen-sensitive LNCaP cells.

To determine the type of cell death caused by glucose withdrawal in LNCaP cells, several pharmacologic compounds that inhibit different types of cell death were tested in LNCaP cells (Fig. 1D). First, the pan-caspase inhibitor q-VD-OPH was employed, but it was found that it did not prevent cell death suggesting that, though annexin-V staining increased after glucose removal, a type of caspase-independent cell death is occurring. Necrostatin-1, an inhibitor of necroptosis via receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1 (RIPK1), and necrostatin-7, an inhibitor of RIPK1-independent necroptosis, did not prevent cell

death. Ferrostatin-1, an inhibitor of ferroptosis, and 3-methyladenine, an inhibitor of autophagy, neither avoided cell death. Interestingly, blocking autophagy by 3MA, cell death was enhanced under the absence of glucose. These results suggested that glucose deprivation induces a non-apoptotic form of cell death as necrosis.

Once confirmed that cell death is driven by necrosis, it was studied whether this response might have been dependent on glucose availability or it was a general response to glycolysis interruption. Then, 2DG, an analog of glucose that does not follow glycolysis, was assayed in the presence of glucose. Fig. 1E shows that 2DG did not induce death in LNCaP cells. This result implies that the availability of glucose, and not a metabolite derived from glycolysis, is crucial for PCa survival.

Since glucose absence, but not the inhibition of glycolysis is responsible for cell death in LNCaP cells, it was studied whether another sugar source such as fructose or mannose would be able to prevent cell death. Cells cultivated in the presence of fructose and mannose did not die and still grew even under glucose deprivation (Fig. 1F), suggesting that it is sugar deprivation, the responsible for cell death.

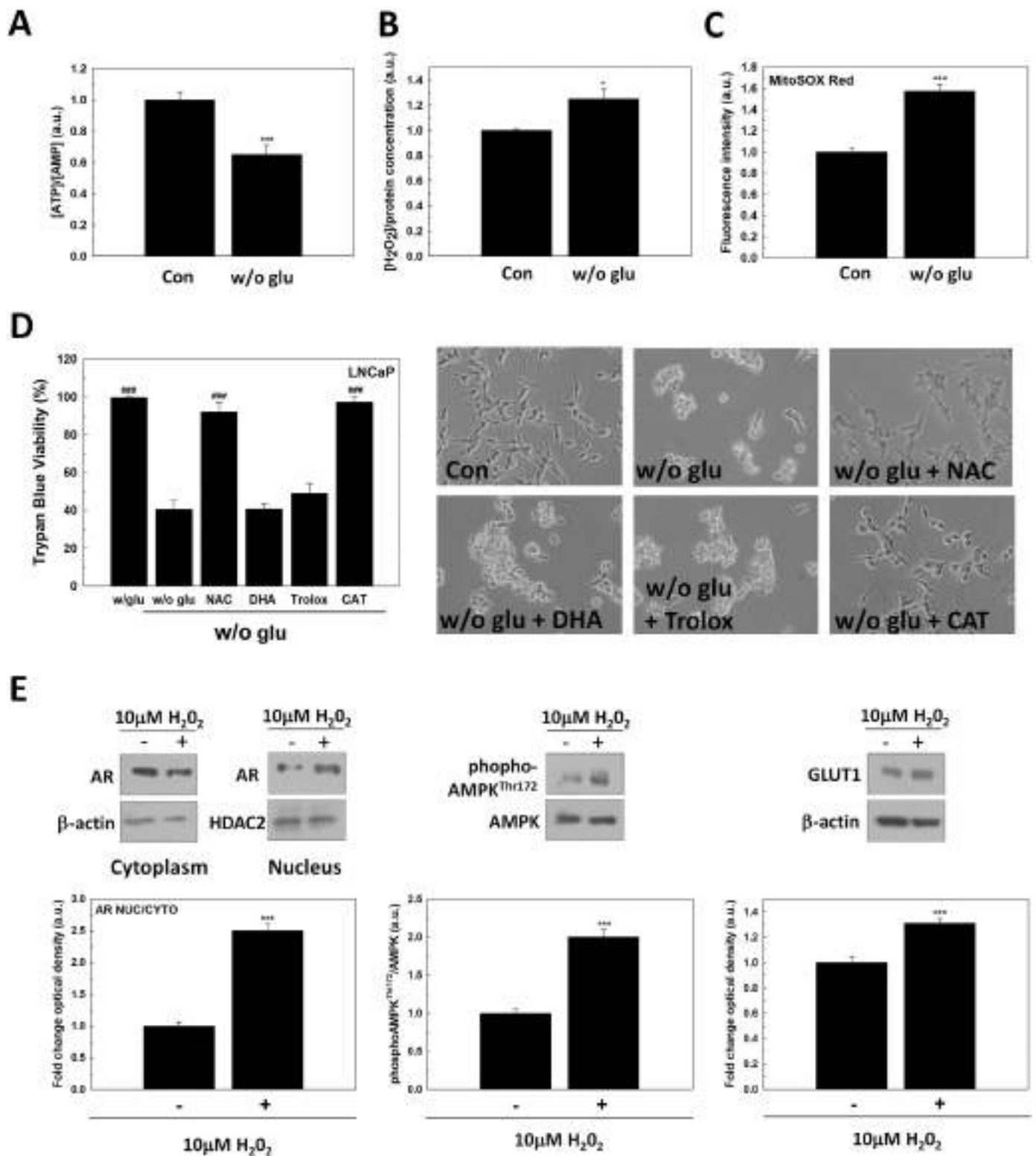
In addition to glucose, glutamine is one of the essential nutrients of PCa cells. First, the balance in the uptake of glutamine in the absence of glucose was studied. After glucose removal, an increase in glutamine uptake was not found in LNCaP cells, and it was significantly reduced in LNCaP-R cells (Supplementary Fig. S2A), suggesting that the absence of glucose did not affect to glutamine uptake. Moreover, the removal of glutamine did not have any significant relevance in cell survival, since cells did not die in the absence of glutamine when glucose is present (Supplementary Fig. S2B).

### 3.2. Glucose withdrawal upregulates GLUT1 in androgen-sensitive prostate cancer cells

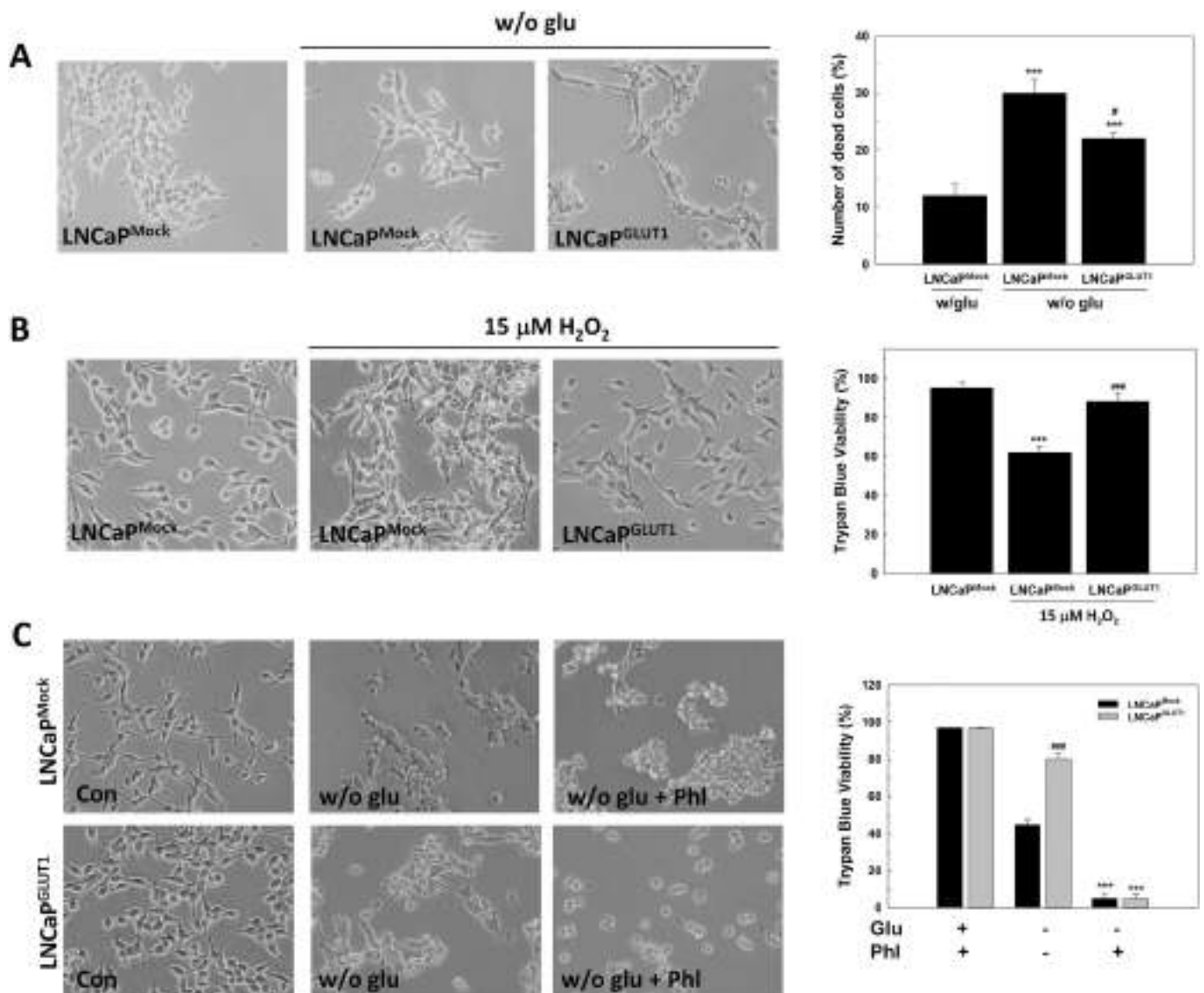
Since glucose uptake seemed to be essential for the survival of PCa cells, the role of glucose transportation in cell survival was studied. First, the rate of 2DG, an analog of glucose that enters the cell by using GLUT transporters and accumulates inside cells was examined. As shown, LNCaP cells significantly increased 2DG uptake after glucose removal (Fig. 2A) proposing an increment of GLUT transporters.

Since GLUT1 is the major transporter of glucose in PCa cells, we investigated whether an increment of total protein levels or an increase in the surface location of GLUT1 occurred after glucose removal. GLUT1 production increased in androgen-sensitive LNCaP cells, but it was significantly down-regulated by glucose deprivation in androgen-insensitive LNCaP-R cells (Fig. 2B). To confirm if the uptake increment was related to surface GLUT1 levels, FACS analysis was performed. Interestingly, glucose deprivation increased total surface GLUT1 in both LNCaP and LNCaP-R cells (Fig. 2C).

The increment of GLUT1 production in androgen-sensitive LNCaP cells suggested the participation of androgen signaling in the mechanism of cell response to glucose deprivation. To confirm a possible role of androgens in response to glucose deprivation, GLUT1 protein levels were studied in LNCaP cells when they were cultured after glucose removal for 24 h in a steroid-depleted medium FBS<sub>shst</sub>. Interestingly, GLUT1 levels decreased by half in LNCaP cells cultured in androgen-depleted media, and they did not increase after glucose deprivation contrary to the findings observed in complete media in the presence of androgens (Supplementary Fig. S3). These results suggested



**Fig. 4. The effect of glucose deprivation on redox balance.** (A) ATP/AMP ratio was determined by measuring ATP and AMP levels by HPLC in LNCaP after 24 h since glucose withdrawal. (B) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was measured in cell culture medium (left panel) and (C) mitochondrial superoxide was determined by MitoSOX Red<sup>®</sup> staining (right panel) in glucose-deprived LNCaP cells after 24 h since medium renewal. (D) Trypan Blue results (left panel) and representative micrographs (right panel) of LNCaP grown in absence of glucose for 48 h and with 5 mM N-acetylcysteine (NAC), 100 μM dehydroascorbic acid (DHA), 100 μM Trolox or 50 U/ml catalase (CAT). DMSO was added as vehicle. Original magnification 200 ×. (E) Nuclear (Nuc) and cytoplasmic (Cyto) AR protein levels were determined by western-blot in LNCaP treated with 10 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 24 h. Beta-actin was used as cytoplasmic internal standard while HDAC2 was used as a nuclear internal standard. Following the same conditions, phospho-AMPK<sup>Thr172</sup>, AMPK and GLUT1 were also analyzed by western-blot. Beta-actin was used as internal standard. One representative experiment is shown. Glucose concentration in control cells was always set at 2 g/L. Arbitrary 1.0 value was given to untreated cells. Results are expressed as mean ± SEM (n = 3). \*p < 0.05 vs control; \*\*\*p < 0.001 vs control; ###p < 0.001 vs. w/o glu.



**Fig. 5.** The effect of GLUT1 overexpression in glucose-deprived LNCaP cells. LNCaP<sup>Mock</sup> and LNCaP<sup>GLUT1</sup> cells were employed for all experiments. (A) Representative micrographs after 48 h since glucose withdrawal (left panel). Original magnification 200×. Cell death was analyzed by PI staining. Results are expressed as % PI-positive cells (dead cells). Glucose concentration in control cells was always set at 2 g/L. Arbitrary 1.0 value was given to control cells. Results are expressed as mean ± SEM (n = 3). (B) Trypan Blue assay in cells treated with 15 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 48 h (right panel). Representative micrographs are shown (left panel). Original magnification 200×. (C) Representative micrographs (left panel) and Trypan Blue assays of cells treated with 100 μM phl in cell culture medium without glucose for 48 h. \*p < 0.05 vs control; \*\*p < 0.01 vs control cells; \*\*\*p < 0.001 vs control cells; #p < 0.05 vs LNCaP<sup>Mock</sup> cells; ###p < 0.001 vs LNCaP<sup>Mock</sup> cells.

that androgens have to be present to increase GLUT1 after glucose removal.

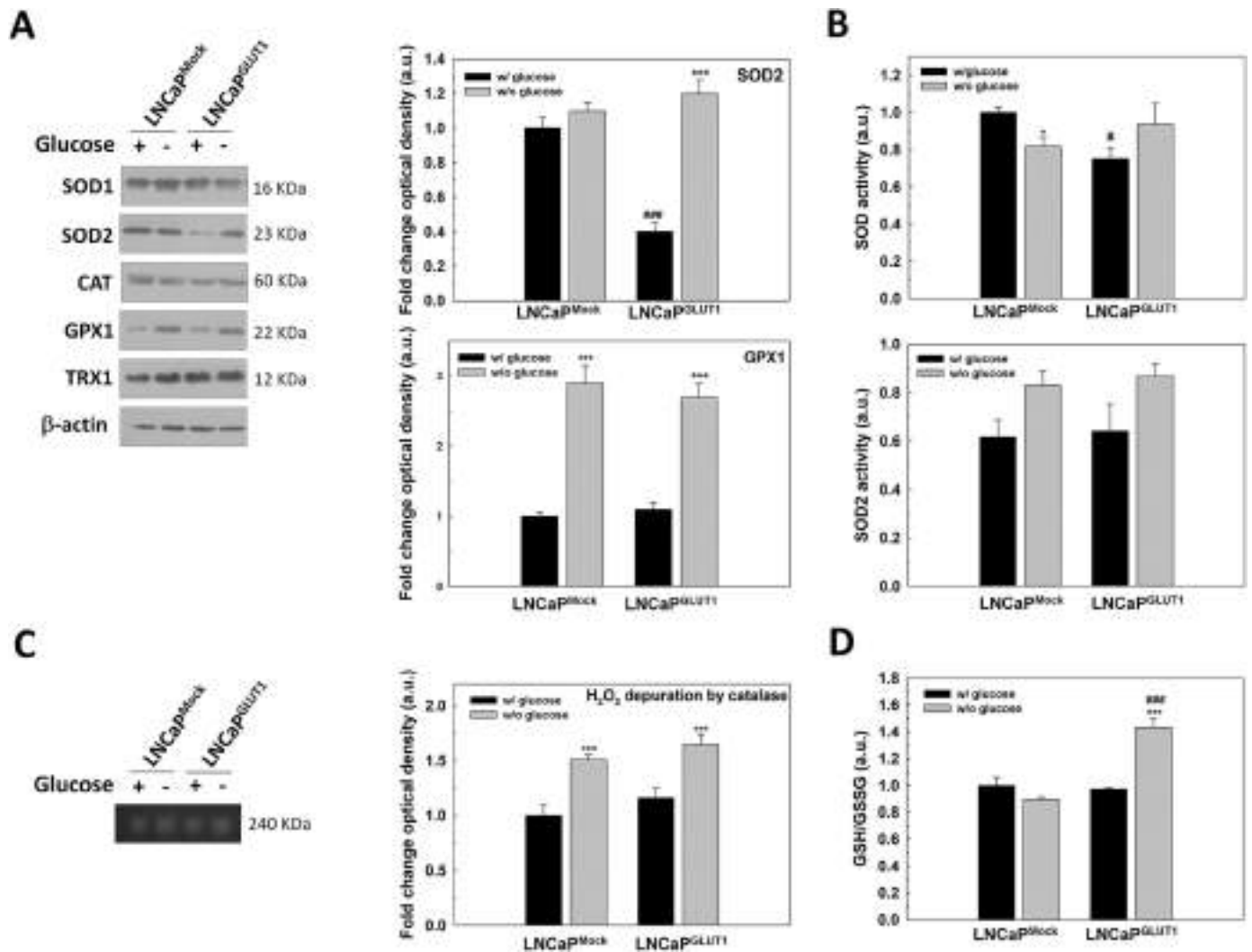
It has been previously described that AMP-activated protein kinase (AMPK) regulates production and membrane location of GLUT1 and it is activated by androgens. To explore whether AMPK would be related to the increment of GLUT1 production and membrane translocation after glucose withdrawal in androgen-sensitive cells, the phosphorylation of AMPK was studied in both androgen-sensitive and insensitive PCa cells. Phospho-AMPK<sup>Thr172</sup> levels were increased under glucose deprivation in androgen-sensitive LNCaP cells, but this increase was not significant in castration-resistant LNCaP-R cells (Fig. 2D). The production of Thioredoxin Interacting Protein (TXNIP), an AMPK-regulatory inhibitor described as a possible link between cellular redox state and metabolism, was also studied. Interestingly, TXNIP decreased under glucose deprivation in both cell types, being this reduction was much more significant in androgen-sensitive LNCaP cells.

### 3.3. Glucose removal increases AR activity

Since GLUT1 increased after glucose removal only in the presence of androgens, we assessed the role AR signaling on GLUT1 production. It was first found that glucose removal promoted an increment of AR mainly restricted to the nuclear compartment when observed under confocal microscopy (Fig. 3A) or analyzed by western-blot analysis (Fig. 3B). As expected, nuclear translocation was associated with a higher AR activity measured via the release of PSA (Fig. 3C).

Androgens and AR signaling are necessary for prostate maintenance and homeostasis, and they are the principal regulators of cancer cells proliferation in the prostate. Since AR activity was increased after glucose deprivation, GLUT1 and AR protein abundance across cell cycle were studied by flow cytometry (Fig. 3C). As expected total and nuclear AR increased in S and G2/M phases in LNCaP cells, but more importantly it correlated with GLUT1 because it is also enhanced in S and G2/M phases. These results suggested a concomitant overexpression of





**Fig. 6.** The role of GLUT1 overexpression in the response of glucose deprivation-induced oxidative stress in LNCaP cells. LNCaP<sup>Mock</sup> and LNCaP<sup>GLUT1</sup> cells were employed for all experiments. Cells were glucose-starved for 24 h. (A) SOD1, SOD2, CAT, GPX1 and TRX1 protein production were analyzed by western-blot. Beta-actin was employed as internal standard and one representative experiment is shown. Only proteins with significant differences are graphically represented. (B) Total SOD and SOD2 activity were determined by enzymatic assay. (C) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> depletion by catalase was determined by native acrylamide gel. One representative experiment is shown. (D) GSH/GSSG ratio was determined by enzymatic assay. Glucose concentration in control cells was set at 2 g/L. An arbitrary value of 1.0 was given to control cells. Results are expressed as mean ± SEM (n = 3). \*p < 0.05 vs control cells; \*\*\*p < 0.001 vs control cells; #p < 0.05 vs LNCaP<sup>Mock</sup> cells; ###p < 0.001 vs LNCaP<sup>Mock</sup> cells.

AR and GLUT1 along with cell cycle in androgen-sensitive prostate cancer cells.

**3.4. Cell death driven by glucose deprivation is dependent on oxidative stress in PCa cells**

Necrosis cell death is usually associated with a decrease of ATP production and an increase of free radicals. For this reason, the role of redox signaling in cell death caused by nutrients deprivation was considered. First, glucose deprivation significantly reduced ATP/AMP ratio as expected (Fig. 4A) and it also increased H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production (Fig. 4B) and mitochondrial superoxide (Fig. 4C). To confirm that an oxidative pathway contributed to cell death induced by glucose deprivation in LNCaP cells, N-acetyl-L-cysteine (NAC), 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (TROLOX), dehydroascorbic acid (DHA) or catalase (CAT) were added to cell culture medium after glucose removal. As shown in Fig. 4D, the incubation with NAC or catalase, significantly prevented cell death triggered by glucose deprivation. However, DHA or TROLOX did not have any effect. These results corroborate the involvement of oxidative pathways in nutrients

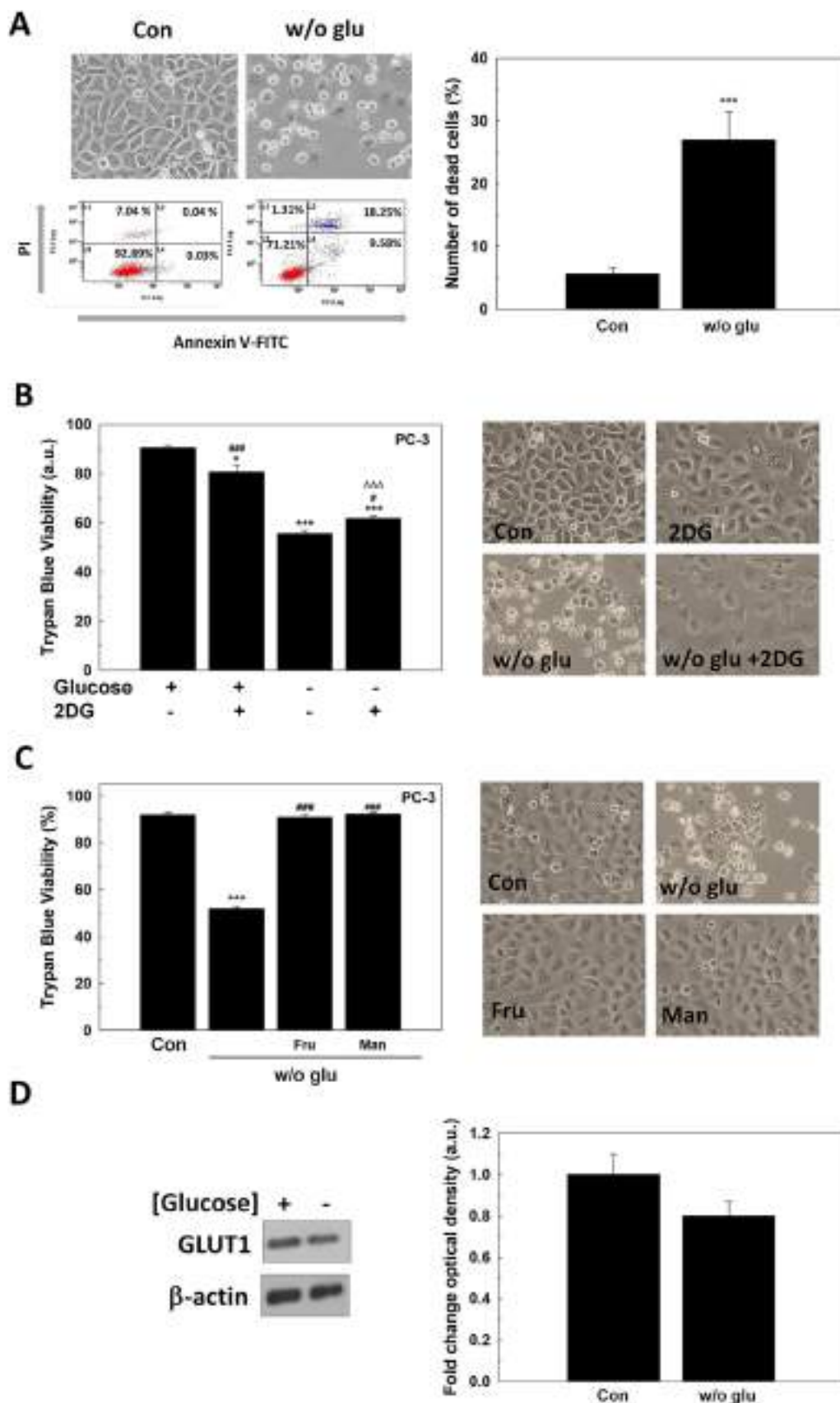
deprivation induced cell death of androgen-sensitive prostate cancer cells.

Given that glucose deprivation caused the upregulation of GLUT1 in LNCaP cells, the relation between free radicals and GLUT1 production in PCa cells was studied. LNCaP cells were incubated with 10 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 24 h. After treatment, translocation of AR, phosphorylation of AMPK and GLUT1 production was investigated. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> increased nuclear AR translocation as well as the activation of phosphor-AMPK<sup>Thr172</sup> and, then, it elevated GLUT1 production (Fig. 4E). Since after glucose removal H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> increased, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> might be responsible for AR activation and in turn, of the increment of GLUT1 after glucose withdrawal.

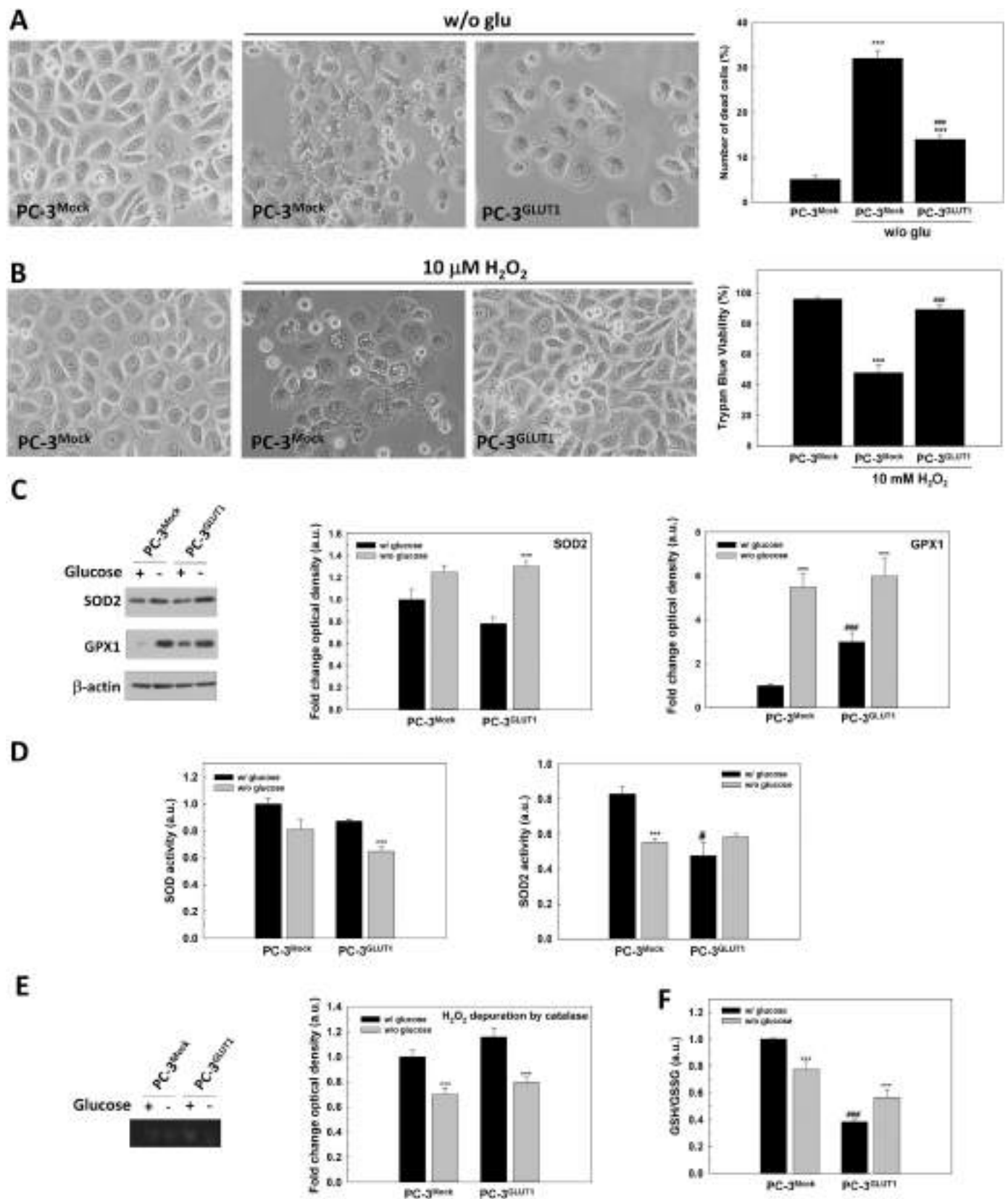
**3.5. GLUT1 overexpression protects from glucose deprivation-induced cell death in LNCaP cells**

To assess the role of GLUT1 in cell death after glucose deprivation in LNCaP cells, the sensitivity to glucose removal and free radicals after the overexpression of GLUT1 in LNCaP cells was studied.

We studied the redox phenotype of GLUT1-overexpressing LNCaP cells since they should consume more glucose and then, they should



**Fig. 7. The response of PC-3 cells to glucose deprivation.** (A) Annexin-V/PI assay of PC-3 cells after 48 h since glucose withdrawal. Micrographs and one representative experiment are shown (left panel). Original magnification 200 $\times$ . Results are expressed as % PI-positive cells (dead cells). (A) Trypan Blue results of PC-3 cells grown in the absence of glucose, with 10 mM 2DG or under both conditions for 48 h (left panel). Representative micrographs are shown (right panel). Original magnification 200 $\times$ . (B) Cell counting and viability by trypan blue of LNCaP and PC-3 cells grown with 11 mM (2 g/L) fructose (fru) or mannose (man) without glucose for 48 h. Representative micrographs are shown (right panel). Original magnification 200 $\times$ . (D) GLUT1 protein levels were determined by western-blot in PC-3 cells grown without glucose for 24 h. beta-actin was used as internal standard and one representative experiment is shown. Glucose concentration in control cells was always set at 2 g/L. Arbitrary 1.0 value was given to control cells. Results are expressed as mean  $\pm$  SEM (n = 3). \*p < 0.05 vs control; \*\*\*p < 0.001 vs control; ###p < 0.001 vs w/o glu. ^^^p < 0.001 vs 2DG.



**Fig. 8. The protective effect of GLUT1 overexpression in androgen-insensitive PC-3 cells.** PC-3<sup>Mock</sup> and PC-3<sup>GLUT1</sup> cells were employed for all experiments. (A) Representative micrographs of cells grown without glucose for 48 h are shown (original magnification 200×) (left panel). The percentage of death cells (PI positive) is compared (n = 3). (B) Trypan Blue assay in cells treated with 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 48 h. Representative micrographs are shown (original magnification 200×) (right panel). (C) SOD2 and GPX1 protein production were analyzed by western-blot. Beta-actin was employed as internal standard and one representative experiment is shown. (D) Total SOD and SOD2 activity were determined by enzymatic assay. (E) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> depletion by CAT was determined by native acrylamide gel. One representative experiment is shown. (F) GSH/GSSG ratio were determined by enzymatic assay. Glucose concentration in control cells was set at 2 g/L. An arbitrary value of 1.0 was given to control cells. Results are expressed as mean ± SEM (n = 3). \*\*\*p < 0.001 vs control cells; ###p < PC-3<sup>Mock</sup> cells.

have a more oxidative phenotype. Interestingly GLUT1 overexpression did not cause any increment of free radicals in LNCaP cells (Supplementary Fig. S4A, B). Moreover, it did not increase H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> or mitochondrial superoxide after glucose removal in LNCaP cells (Supplementary Fig. S4C, D).

LNCaP cells overexpressing GLUT1 showed a lower sensitivity to glucose removal than LNCaP cells, as showed in Fig. 5A. Moreover, GLUT1 overexpression protects cells from H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> toxicity. Thus, cells were incubated with 15 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 48 h, LNCaP<sup>GLUT1</sup> cells were more resistant to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> toxicity than LNCaP cells (Fig. 5B).

To confirm whether GLUT1 protection is due to an extracellular signal uptaken by the transporter or an intracellular signaling pathway promoted by GLUT1 overexpression, GLUT transporters were blocked by using phloretin, a natural product that has been used as a specific inhibitor of GLUT1 [19]. By blocking GLUT1 with phloretin cell death was enhanced in LNCaP and LNCaP<sup>GLUT1</sup> cells after glucose deprivation (Fig. 5C). Furthermore, LNCaP and LNCaP<sup>GLUT1</sup> cells were grown in low serum media to confirm whether a component of serum would participate in the role of glucose transporters in survival (Supplementary Fig. S5). Interestingly, as previously demonstrated, GLUT1 protected from cell death caused by depletion of growing factors induced by cultivation with 1% FBS even in the presence of glucose. However, under glucose removal in low serum incubation, ectopic overexpression of GLUT1 did not protect androgen-dependent prostate cancer cells.

### 3.6. GSH levels are stimulated in GLUT1-overexpressing LNCaP cells after glucose removal

Since the increment of GLUT1 makes cells more resistant to glucose deprivation and oxidative stress, the role of antioxidant pathways in survival after ectopic overexpression of GLUT1 was investigated.

First, total protein levels of the antioxidant enzymes SOD1, SOD2, CAT, glutathione peroxidase 1 (GPX1) and thioredoxin 1 (TRX1) were studied in LNCaP and LNCaP<sup>GLUT1</sup> cells. After glucose removal, SOD2 protein levels diminished significantly, and its levels recover to controls by GLUT1 overexpression. Also, GPX protein production was increased in both LNCaP and LNCaP<sup>GLUT1</sup> cells (Fig. 6A). However, no differences in SOD/SOD2 activity was found (Fig. 6C) and CAT activity increased in both LNCaP and LNCaP<sup>GLUT1</sup> cells (Fig. 6A, C). Of all parameters investigated, GLUT1 overexpression significantly increased reducing power of cells by increasing GSH/GSSG ratio in LNCaP<sup>GLUT1</sup> cells after glucose removal (Fig. 6D). This suggests that overexpression of GLUT1 might protect from glucose deprivation by increasing the reducing power inside cells.

### 3.7. GLUT1 also prevents cell death induced by glucose deprivation androgen-insensitive prostate cancer cells

To support that GLUT1 overexpression by itself has a role in the survival of PCa cells, we studied the answer to glucose deprivation of androgen-insensitive PC-3 cells, which do not produce AR or respond to androgens. First, it was found that PC-3 cells died after glucose deprivation (Fig. 7A). This effect was not dependent on glycolysis disruption since 2DG treatment did not alter cell viability, likewise androgen-sensitive LNCaP cells (Fig. 7B). Also, and also parallel to LNCaP, fructose and mannose supplementation in cell culture medium prevented cell death caused by glucose deprivation in PC-3 cells (Fig. 7C). However, contrary to LNCaP cells, GLUT1 protein levels did not increase in glucose-deprived cells (Fig. 7D). The fact that would confirm the necessity of an active form of AR to achieve an increment of GLUT1 production after glucose removal.

When we ectopically overexpressed GLUT1 in PC-3 cells, the death induced by glucose deprivation (Fig. 8A) and the toxicity of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> were also prevented. Besides, glucose removal also MitoSOX<sup>®</sup> staining in PC-3 cells confirming the increase of oxidative stress (data not shown).

In PC-3, after glucose removal there was an increased in GPX1 or

SOD2 production in both native or overexpressing GLUT1 cells and a significant decrease in SOD2 activity was also found in PC-3 after glucose removal. Contrary to LNCaP, androgen insensitive PC-3 and PC-3<sup>GLUT1</sup> cells showed a reduction of catalase activity after glucose removal.

Finally, after glucose deprivation, there was a significant reduction in GSH/GSSG balance in PC-3 cells that was recovered by GLUT1 overexpression (Fig. 8F).

Collectively, these data indicate that GLUT1 overexpression withstands glucose deprivation by a higher resistance to oxidative stress, events that might be directly related to a higher resistance to cell death.

## 4. Discussion

Cancer cells are characterized by an increase in glucose uptake and glycolysis. Therefore, targeting glucose metabolism is suggested as a promising approach in oncology. In this report, it is described for the first time that GLUT1 overproduction protects cells from cell death caused by glucose deprivation by an antioxidant mediated mechanism.

Glucose concentration inside the tumor core, away from blood vessels, vary from 0.25 to 2.5 mM [28], lower than in normal tissues. Together with hypoxia, glucose deprivation causes tumor cells to adapt their metabolism. Results shown here confirmed that cell death triggered by glucose deprivation does not follow the classical apoptotic response through caspase activation, necroptosis, ferroptosis or autophagy. We proved as previously demonstrated in other cell types that glucose removal activates necrosis [5]. Interestingly, we found that 2DG does not induce cell death in PCa cells, through glycolysis is not active. It would be possible that the treatment with 2DG could be promoting survival from autophagy in PCa, as it was previously described [29,30].

It is well known that glucose deprivation cytotoxicity is mediated by oxidative stress in other cell types [6]. Some studies proposed that ROS induced by glucose deprivation are due to a promotion of mitochondrial metabolism in detriment of glycolysis [31,32]. However, in some cell lines, cell death cannot be prevented with antioxidants [33,34]. Here, glucose starvation increases both, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and mitochondrial superoxide and antioxidants such as NAC or catalase can prevent cell death. NAC maintains reduced glutathione levels and catalase deperates H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. However, DHA does not prevent cell death in PCa, and this might be due to the cost in GSH since GSH is required by cells to regenerate ascorbic acid [35].

Although glucose metabolism has not been considered as important as lipid or protein metabolism in PCa, it has been confirmed that glucose is essential for cell proliferation and survival [36]. In addition to glucose, glutamine is necessary for cell growth and proliferation of PCa cells [37], but surprisingly LNCaP cells do not die after glutamine deprivation. Interestingly, other sugars like fructose or mannose, also internalized by GLUT transporters, prevent cell death and diminish proliferation under glucose withdrawal perhaps because they replace glucose at any other point in the metabolic network.

Glucose metabolism in PCa is different when compared to other carcinomas. In non-pathological tissue, the prostate gland is primarily glycolytic because of a defect in tricarboxylic acid (TCA) cycle [38]. However, at the beginning of carcinogenesis, the gland becomes OXPHOS-dependent and then, in more aggressive stages, tumors become again to turn to glycolysis [39]. Therefore, resistance to glucose deprivation in PCa cells is different at the beginning or later stages of the disease. In fact, castration-resistant LNCaP-R cells are more sensitive to glucose starvation than parental LNCaP cells, indicating their higher dependence on glucose [40]. It was previously reported that cells deficient in upregulating OXPHOS are more sensitive to glucose deprivation [41], which it may be related to our results.

In the absence of glucose, cells usually overexpress an isoform of GLUT transporters [12]. Here it is shown that PCa cells with functional AR increase the levels of GLUT1 after glucose deprivation. It was

previously described that GLUT1 regulation is dependent on AR activity [42]. Throughout carcinogenesis, the expression of this transporter is also differentially regulated. The healthy prostate produces GLUT1, decreasing its levels at early stages during tumor progression [43]. However, in most aggressive tumors, GLUT1 is found overexpressed, concomitant with a higher glycolytic activity and hypoxia [17].

Interestingly, when glucose is deleted in PCa cells, GLUT1 is increased. Also, AR is almost entirely located in the nucleus, correlating with the increment in GLUT1 levels. These results are in agreement with those reported by Vaz et al. [16]. They described an increase in GLUT1 after DHT stimulation [16]. Furthermore, glucose deprivation fails to enhance GLUT1 expression when cells are grown in the absence of androgens. Hyperglycemia downregulates AR levels in Type 2 diabetes. Interestingly, diabetes type 2 is inversely related to prostate cancer incidence [44]. On the other hand, low glucose stimulates GLUT1 production, which might be concerned with the promotion of more aggressive tumors. Nuclear AR translocation, and consequently GLUT1 enhancement, are directly associated with cell proliferation. Since both proteins are found during S and G2/M cell cycle phases, they could act synergistically to promote cell proliferation under androgenic stimulation or suppressing cell cycle arrest in the absence of glucose. On the contrary, it is known that glycolysis only affects cell cycle distribution from G1 to S [45].

In PCa, AMPK is considered a key metabolic regulator involved in proliferation and cell survival [46]. In PCa, androgens stimulate AMPK activation leading to OXPHOS [15]. AMPK is also able to induce GLUT1 expression and membrane translocation by inhibiting TXNIP [47], indicating that GLUT1 overexpression via AMPK can protect from cell death caused by glucose deprivation. More interestingly, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stimulates glucose uptake in cells overexpressing GLUT1 [48]. Accordingly, with these results, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> increases nuclear AR levels and GLUT1 production via AMPK in LNCaP cells. The protective activation of AMPK by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> has been already described, and recently it was proposed as a regulator of mitochondrial ROS [49,50].

In PCa cells that overexpress GLUT1, as expected, glucose consumption is higher than in parental cells. Recent studies showed that the overexpression of GLUT1 drives with an inflammatory response because of the increase of ROS in macrophages due to a higher glucose uptake [51,52]. Here it is shown that oxidative stress is enhanced in GLUT1-overexpressing cells in the presence of glucose, but not under glucose deprivation.

To determine the mechanism by which GLUT1 protects cells from glucose removal, and given the oxidative signal caused by glucose removal, we analyzed several antioxidant pathways. The activity of mitochondrial SOD2, that fall after glucose removal in LNCaP cells, is sustained under glucose deprivation in GLUT1-overexpressing cells. Recently, it was described a role of this enzyme in the survival of renal carcinoma cells, as well as, in the promotion of cell proliferation of lung cancer cells via AMPK [53,54].

Mainly GLUT1 overexpression increases reduced levels of glutathione. Since pentose phosphate pathway is not overstimulated after glucose withdrawal, the necessary NADPH to maintain GSH has to come from the mitochondria mainly. It was recently published that nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT), involved in NAD<sup>+</sup> biosynthesis, protects cells from glucose deprivation-induced oxidative stress and that it is also regulated by AMPK [55], which confirms the role of mitochondria as the source of reducing power.

The protective role of GLUT1 in PCa cells may come from the uptake of some compound included in culture medium or by the activation/inhibition of an intracellular signaling pathway. Besides glucose uptake, it is well-known that GLUT1 can transport other compounds. The treatment with phloretin, which is well-established as a GLUT blocker [56] enhances cell death by glucose deprivation, implying that this response is not only a consequence of intracellular signaling. The increase of cell death by serum deprivation strengthens this idea. Moreover, it was recently described that ROS production is enhanced in L6

myoblasts when GLUT1 is inhibited by phloretin, which it is in agreement with our results [57].

## 5. Conclusions

GLUT1 acts as an oncoprotein in several tumors. However, it does not only promote proliferation because of increasing glucose uptake; it has a significant protective role against nutrients deprivation. Glucose starvation rises oxidative stress that in turn activates AR activity and, as a consequence, AMPK signaling and GLUT1 production. After GLUT1 increment, GSH levels rise protecting PCa cells from cell death. In PCa, GLUT1 is usually overexpressed in highly aggressive tumors so that it might protect cancer cells from low glucose microenvironments. Altogether, these results show the importance of glucose availability and glucose transporter for PCa survival and its relation to redox signaling.

## Acknowledgements

We thank Marta Alonso-Guervos for her assistance with confocal microscopy. PGM thanks to European Association for Cancer Research for EACR travel fellowship. We also thank Dr. Cristina Muñoz-Pinedo for her help and advice in cell death studies.

## Declaration of interest

The authors have nothing to disclose.

## Funding

PGM thanks support to “Formación del Personal Universitario” grant from Ministerio de Educación, Cultura y Deporte, Gobierno de España (AP2012-4924) and IUOPA. DH is supported by Fundacion ONCE, SK by CNRS and NT by INSERM. This work was supported by Ministerio de Economía y Competitividad, Gobierno de España, co-funded by FEDER (MINECO-17-BFU2016-79139-R).

## Appendix A. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at <http://dx.doi.org/10.1016/j.redox.2018.03.017>.

## References

- [1] O. Warburg, On the origin of cancer cells, *Science* 123 (1956) 309–314.
- [2] D. Hanahan, R.A. Weinberg, Hallmarks of cancer: the next generation, *Cell* 144 (2011) 646–674, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>.
- [3] N.N. Pavlova, C.B. Thompson, The emerging hallmarks of cancer metabolism, *Cell Metab.* 23 (2016) 27–47, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2015.12.006>.
- [4] C. Muñoz-Pinedo, N. El Mjiyad, J.-E. Ricci, Cancer metabolism: current perspectives and future directions, *Cell Death Dis.* 3 (2012) e248, <http://dx.doi.org/10.1038/cddis.2011.123>.
- [5] N. El Mjiyad, A. Caro-Maldonado, S. Ramirez-Peinado, C. Muñoz-Pinedo, Sugar-free approaches to cancer cell killing, *Oncogene* 30 (2011) 253–264, <http://dx.doi.org/10.1038/onc.2010.466>.
- [6] Y. Liu, X.-D. Song, W. Liu, T.-Y. Zhang, J. Zuo, Glucose deprivation induces mitochondrial dysfunction and oxidative stress in PC12 cell line, *J. Cell. Mol. Med.* 7 (2003) 49–56, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1582-4934.2003.tb00202.x>.
- [7] M.L. Macheda, S. Rogers, J.D. Best, Molecular and cellular regulation of glucose transporter (GLUT) proteins in cancer, *J. Cell. Physiol.* 202 (2005) 654–662, <http://dx.doi.org/10.1002/jcp.20166>.
- [8] C.C. Barron, P.J. Bilan, T. Tsakiridis, E. Tsiani, Facilitative glucose transporters: implications for cancer detection, prognosis and treatment, *Metabolism* 65 (2016) 124–139, <http://dx.doi.org/10.1016/j.metabol.2015.10.007>.
- [9] N.J. Bryant, R. Govers, D.E. James, Regulated transport of the glucose transporter GLUT4, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3 (2002) 267–277, <http://dx.doi.org/10.1038/nrm782>.
- [10] J.A. Chavez, W.G. Roach, S.R. Keller, W.S. Lane, G.E. Lienhard, Inhibition of GLUT4 translocation by Tbc1d1, a Rab GTPase-activating protein abundant in skeletal muscle, is partially relieved by AMP-activated protein kinase activation, *J. Biol. Chem.* 283 (2008) 9187–9195, <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M708934200>.
- [11] C.J. De Saedeleer, P.E. Porporato, T. Copetti, J. Pérez-Escuredo, V.L. Payen,

- L. Brisson, O. Feron, P. Sonveaux, Glucose deprivation increases monocarboxylate transporter 1 (MCT1) expression and MCT1-dependent tumor cell migration, *Oncogene* 33 (2014) 4060–4068, <http://dx.doi.org/10.1038/ncr.2013.454>.
- [12] J. Hu, J.W. Locasale, J.H. Bielas, J. O'Sullivan, K. Sheahan, L.C. Cantley, M.G. Vander Heiden, D. Vitkup, Heterogeneity of tumor-induced gene expression changes in the human metabolic network, *Nat. Biotechnol.* 31 (2013) 522–529, <http://dx.doi.org/10.1038/nbt.2530>.
- [13] J.C. Rathmell, C.J. Fox, D.R. Plas, P.S. Hammerman, R.M. Cinalli, C.B. Thompson, Akt-directed glucose metabolism can prevent Bax conformation change and promote growth factor-independent survival, *Mol. Cell. Biol.* 23 (2003) 7315–7328.
- [14] P. Gonzalez-Menendez, D. Hevia, J.C. Mayo, R.M. Sainz, The dark side of glucose transporters in prostate cancer: are they a new feature to characterize carcinomas? *Int. J. Cancer* (2017), <http://dx.doi.org/10.1002/ijc.31165>.
- [15] J.B. Tennakoon, Y. Shi, J.J. Han, E. Tsouko, M.A. White, A.R. Burns, A. Zhang, X. Xia, O.R. Ilkayeva, L. Xin, M.M. Ittmann, F.G. Rick, A.V. Schally, D.E. Frigo, Androgens regulate prostate cancer cell growth via an AMPK-PGC-1 $\alpha$ -mediated metabolic switch, *Oncogene* 33 (2014) 5251–5261, <http://dx.doi.org/10.1038/ncr.2013.463>.
- [16] C.V. Vaz, R. Marques, M.G. Alves, P.F. Oliveira, J.E. Cavaco, C.J. Maia, S. Socorro, Androgens enhance the glycolytic metabolism and lactate export in prostate cancer cells by modulating the expression of GLUT1, GLUT3, PFK, LDH and MCT4 genes, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 142 (2016) 5–16, <http://dx.doi.org/10.1007/s00432-015-1992-4>.
- [17] G.D. Stewart, K. Gray, C.J. Pennington, D.R. Edwards, A.C.P. Riddick, J.A. Ross, F.K. Habib, Analysis of hypoxia-associated gene expression in prostate cancer: lysyl oxidase and glucose transporter-1 expression correlate with Gleason score, *Oncol. Rep.* 20 (2008) 1561–1567.
- [18] H. Xiao, J. Wang, W. Yan, Y. Cui, Z. Chen, X. Gao, X. Wen, J. Chen, GLUT1 regulates cell glycolysis and proliferation in prostate cancer, *Prostate* 78 (2018) 86–94, <http://dx.doi.org/10.1002/pros.23448>.
- [19] P. Gonzalez-Menendez, D. Hevia, A. Rodriguez-Garcia, J.C. Mayo, R.M. Sainz, Regulation of GLUT transporters by flavonoids in androgen-sensitive and -insensitive prostate cancer cells, *Endocrinology* 155 (2014) 3238–3250.
- [20] N. Manel, F.J. Kim, S. Kinet, N. Taylor, M. Sitbon, J.-L. Battini, The ubiquitous glucose transporter GLUT-1 is a receptor for HTLV, *Cell* 115 (2003) 449–459.
- [21] A. Rodriguez-Garcia, J.C. Mayo, D. Hevia, I. Quiros-Gonzalez, M. Navarro, R.M. Sainz, Phenotypic changes caused by melatonin increased sensitivity of prostate cancer cells to cytokine-induced apoptosis, *J. Pineal Res.* 54 (2013) 33–45, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-079X.2012.01017.x>.
- [22] H. Takanao, W.B. Frommer, Facilitative plasma membrane transporters function during ER transit, *FASEB J.* 24 (2010) 2849–2858, <http://dx.doi.org/10.1096/fj.09-146472>.
- [23] M. Rosner, K. Schipany, M. Hengstschläger, Merging high-quality biochemical fractionation with a refined flow cytometry approach to monitor nucleocytoplasmic protein expression throughout the unperturbed mammalian cell cycle, *Nat. Protoc.* 8 (2013) 602–626, <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2013.011>.
- [24] I. Quiros-Gonzalez, R.M. Sainz, D. Hevia, J.C. Mayo, MnSOD drives neuroendocrine differentiation, androgen independence, and cell survival in prostate cancer cells, *Free Radic. Biol. Med.* 50 (2011) 525–536, <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.10.715>.
- [25] A. Montel-Hagen, S. Kinet, N. Manel, C. Mongellaz, R. Prohaska, J.-L. Battini, J. Delaunay, M. Sitbon, N. Taylor, Erythrocyte Glut1 triggers dehydroascorbic acid uptake in mammals unable to synthesize vitamin C, *Cell* 132 (2008) 1039–1048, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2008.01.042>.
- [26] D. Klysz, X. Tai, P.A. Robert, M. Craveiro, G. Cretenet, L. Oburoglu, C. Mongellaz, S. Floess, V. Fritsch, M.I. Matias, C. Yong, J.C. Marie, J. Huehn, V. Zimmermann, S. Kinet, V. Dardalhon, N. Taylor, Glutamine-dependent  $\alpha$ -ketoglutarate production regulates the balance between T helper 1 cell and regulatory T cell generation, *Sci. Signal.* 8 (2015).
- [27] C.J. Weydert, J.J. Cullen, Measurement of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in cultured cells and tissue, *Nat. Protoc.* 5 (2010) 51–66, <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2009.197>.
- [28] A. Hirayama, K. Kami, M. Sugimoto, M. Sugawara, N. Toki, H. Onozuka, T. Kinoshita, N. Saito, A. Ochiai, H. Esumi, T. Soga, Quantitative metabolome profiling of colon and stomach cancer microenvironment by capillary electrophoresis time-of-flight mass spectrometry, *Cancer Res.* 69 (2009).
- [29] I. Ben Sahra, K. Laurent, S. Giuliano, F. Larbret, G. Ponzio, P. Gounon, Y. Le Marchand-Brustel, S. Giorgetti-Peraldi, M. Cormont, C. Bertolotto, M. Deckert, P. Auberger, J.-F. Tanti, F. Bost, Targeting cancer cell metabolism: the combination of metformin and 2-deoxyglucose induces p53-dependent apoptosis in prostate cancer cells, *Cancer Res.* 70 (2010) 2465–2475, <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-2782>.
- [30] M. Stein, H. Lin, C. Jeyamohan, D. Dvorzhinski, M. Gounder, K. Bray, S. Eddy, S. Goodin, E. White, R.S. DiPaola, Targeting tumor metabolism with 2-deoxyglucose in patients with castrate-resistant prostate cancer and advanced malignancies, *Prostate* 70 (2010) 1388–1394, <http://dx.doi.org/10.1002/pros.21172>.
- [31] S.-H. Chang, J. Garcia, J.A. Melendez, M.S. Kilberg, A. Agarwal, Haem oxygenase 1 gene induction by glucose deprivation is mediated by reactive oxygen species via the mitochondrial electron-transport chain, *Biochem. J.* 371 (2003) 877–885, <http://dx.doi.org/10.1042/BJ20021731>.
- [32] T.J. Schulz, K. Zarse, A. Voigt, N. Urban, M. Birringer, M. Ristow, Glucose restriction extends caenorhabditis elegans life span by inducing mitochondrial respiration and increasing oxidative stress, *Cell Metab.* 6 (2007) 280–293, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2007.08.011>.
- [33] C.L. Leon-Annicchiarico, S. Ramirez-Peinado, D. Domínguez-Villanueva, A. Gonsberg, T.J. Lampidis, C. Muñoz-Pinedo, ATF4 mediates necrosis induced by glucose deprivation and apoptosis induced by 2-deoxyglucose in the same cells, *FEBS J.* 282 (2015) 3647–3658, <http://dx.doi.org/10.1111/febs.13369>.
- [34] B. Ding, A. Parmigiani, A.S. Divakaruni, K. Archer, A.N. Murphy, A.V. Budanov, Sestrin2 is induced by glucose starvation via the unfolded protein response and protects cells from non-canonical necroptotic cell death, *Sci. Rep.* 6 (2016) 22538, <http://dx.doi.org/10.1038/srep22538>.
- [35] J. Yun, E. Mullarky, C. Lu, K.N. Bosch, A. Kavalier, K. Rivera, J. Roper, I.L.C. Chio, E.G. Giannopoulos, C. Rago, A. Muley, J.M. Asara, J. Paik, O. Elemento, Z. Chen, D.J. Pappin, L.E. Dow, N. Papadopoulos, S.S. Gross, L.C. Cantley, Vitamin C selectively kills KRAS and BRAF mutant colorectal cancer cells by targeting GAPDH, *Science* 350 (2015) 1391–1396, <http://dx.doi.org/10.1126/science.aaa5004> (80-).
- [36] G. Singh, C.L. Lakkis, R. Laucirica, D.E. Epner, Regulation of prostate cancer cell division by glucose, *J. Cell. Physiol.* 180 (1999) 431–438, [http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4652\(199909\)180:3<431::AID-JCP14>3.0.CO;2-O](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1097-4652(199909)180:3<431::AID-JCP14>3.0.CO;2-O).
- [37] Q. Wang, R.-A. Hardie, A.J. Hoy, M. van Geldermalsen, D. Gao, L. Fazli, M.C. Sadowski, S. Balaban, M. Schreuder, R. Nagarajah, J.J.-L. Wong, C. Metierre, N. Pinello, N.J. Otte, M.L. Lehman, M. Gleave, C.C. Nelson, C.G. Bailey, W. Ritchie, J.E. Rasko, J. Holst, Targeting ASCT2-mediated glutamine uptake blocks prostate cancer growth and tumour development, *J. Pathol.* 236 (2015) 278–289, <http://dx.doi.org/10.1002/path.4518>.
- [38] K.K. Singh, M.M. Desouki, R.B. Franklin, L.C. Costello, Mitochondrial aconitase and citrate metabolism in malignant and nonmalignant human prostate tissues, *Mol. Cancer* 5 (2006) 14, <http://dx.doi.org/10.1186/1476-4598-5-14>.
- [39] P.K. Vayalil, A. Landar, Mitochondrial oncobiogenic index: a potential biomarker to predict progression from indolent to aggressive prostate cancer, *Oncotarget* 6 (2015) 43065–43080, <http://dx.doi.org/10.18632/oncotarget.5487>.
- [40] C.V. Vaz, M.G. Alves, R. Marques, P.I. Moreira, P.F. Oliveira, C.J. Maia, S. Socorro, Androgen-responsive and nonresponsive prostate cancer cells present a distinct glycolytic metabolism profile, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 44 (2012) 2077–2084, <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocel.2012.08.013>.
- [41] K. Birsoy, R. Possemato, F.K. Lorbeer, E.C. Bayraktar, P. Thiru, B. Yucel, T. Wang, W.W. Chen, C.B. Clish, D.M. Sabatini, Metabolic determinants of cancer cell sensitivity to glucose limitation and biguanides, *Nature* 508 (2014) 108–112, <http://dx.doi.org/10.1038/nature13110>.
- [42] C.E. Massie, A. Lynch, A. Ramos-Montoya, J. Boren, R. Stark, L. Fazli, A. Warren, H. Scott, B. Madhu, N. Sharma, H. Bon, V. Zecchini, D.-M. Smith, G.M. DeNicola, N. Mathews, M. Osborne, J. Hadfield, S. MacArthur, B. Adryan, S.K. Lyons, K.M. Brindle, J. Griffiths, M.E. Gleave, P.S. Rennie, D.E. Neal, I.G. Mills, The androgen receptor fuels prostate cancer by regulating central metabolism and biosynthesis, *EMBO J.* 30 (2011) 2719–2733, <http://dx.doi.org/10.1038/emboj.2011.158>.
- [43] K. Reinicke, P. Sotomayor, P. Cisterna, C. Delgado, F. Nualart, A. Godoy, Cellular distribution of Glut-1 and Glut-5 in benign and malignant human prostate tissue, *J. Cell. Biochem.* 113 (2012) 553–562, <http://dx.doi.org/10.1002/jcb.23379>.
- [44] M. Grossmann, G. Wittert, Androgens, diabetes and prostate cancer, *Endocr. Relat. Cancer* 19 (2012) F47–F62, <http://dx.doi.org/10.1530/ERC-12-0067>.
- [45] I.O. Estévez-García, V. Córdoba-González, E. Lara-Padilla, A. Fuentes-Toledo, R. Falfán-Valencia, R. Campos-Rodríguez, E. Abarca-Rojano, Glucose and glutamine metabolism control by APC and SCF during the G1-to-S phase transition of the cell cycle, *J. Physiol. Biochem.* 70 (2014) 569–581, <http://dx.doi.org/10.1007/s13105-014-0328-1>.
- [46] H.U. Park, S. Suy, M. Danner, V. Dailey, Y. Zhang, H. Li, D.R. Hyduke, B.T. Collins, G. Gagnon, B. Kallakury, D. Kumar, M.L. Brown, A. Fornace, A. Dritschilo, S.P. Collins, AMP-activated protein kinase promotes human prostate cancer cell growth and survival, *Mol. Cancer Ther.* 8 (2009) 733–741, <http://dx.doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-08-0631>.
- [47] N. Wu, B. Zheng, A. Shaywitz, Y. Dagon, C. Tower, G. Bellinger, C.-H. Shen, J. Wen, J. Asara, T.E. McGraw, B.B. Kahn, L.C. Cantley, AMPK-dependent degradation of TXNIP upon energy stress leads to enhanced glucose uptake via GLUT1, *Mol. Cell.* 49 (2013) 1167–1175, <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2013.01.035>.
- [48] R.K. Prasad, F. Ismail-Beigi, Mechanism of stimulation of glucose transport by H2O2: role of phospholipase C, *Arch. Biochem. Biophys.* 362 (1999) 113–122, <http://dx.doi.org/10.1006/abbi.1998.1026>.
- [49] J.W. Zmijewski, S. Banerjee, H. Bae, A. Friggeri, E.R. Lazarowski, E. Abraham, Exposure to hydrogen peroxide induces oxidation and activation of AMP-activated protein kinase, *J. Biol. Chem.* 285 (2010) 33154–33164, <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M110.143685>.
- [50] R.C. Rabinovitch, B. Samborska, B. Faubert, E.H. Ma, S.-P. Gravel, S. Andrzejewski, T.C. Raissi, A. Pause, J. St Pierre, R.G. Jones, AMPK maintains cellular metabolic homeostasis through regulation of mitochondrial reactive oxygen species, *Cell Rep.* 21 (2017) 1–9, <http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2017.09.026>.
- [51] A.J. Freemeran, A.R. Johnson, G.N. Sacks, J.J. Milner, E.L. Kirk, M.A. Troester, A.N. Macintyre, P. Goraksha-Hicks, J.C. Rathmell, L. Makowski, Metabolic reprogramming of macrophages, *J. Biol. Chem.* 289 (2014) 7884–7896, <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M113.522037>.
- [52] D. Long, H. Wu, A.W. Tsang, L.B. Poole, B.K. Yoza, X. Wang, V. Vachharajani, C.M. Furdud, C.E. McCall, The oxidative state of cysteine thiol 144 regulates the SIRT6 glucose homeostat, *Sci. Rep.* 7 (2017) 11005, <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-11388-6>.
- [53] T. Isono, T. Chano, J. Yonese, T. Yuasa, Therapeutic inhibition of mitochondrial function induces cell death in starvation-resistant renal cell carcinomas, *Sci. Rep.* 6 (2016) 25669, <http://dx.doi.org/10.1038/srep25669>.
- [54] P.C. Hart, M. Mao, A.L.P. de Abreu, K. Ansenberger-Fricano, D.N. Ekoue, D. Ganini, A. Kajdacsy-Balla, A.M. Diamond, R.D. Minshall, M.E.L. Consolador, J.H. Santos, M.G. Bonini, MnSOD upregulation sustains the Warburg effect via mitochondrial

- ROS and AMPK-dependent signalling in cancer, *Nat. Commun.* 6 (2015) 6053, <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms7053>.
- [55] S.M. Hong, C.W. Park, S.W. Kim, Y.J. Nam, J.H. Yu, J.H. Shin, C.H. Yun, S.-H. Im, K.-T. Kim, Y.C. Sung, K.Y. Choi, NAMPT suppresses glucose deprivation-induced oxidative stress by increasing NADPH levels in breast cancer, *Oncogene* 35 (2016) 3544–3554, <http://dx.doi.org/10.1038/onc.2015.415>.
- [56] P.G. LeFevre, J.K. Marshall, The attachment of Phloretin and analogues to human erythrocytes in connection with inhibition of sugar transport, *J. Biol. Chem.* 234 (1959) 3022–3026.
- [57] S. Andrisse, R.M. Koehler, J.E. Chen, G.D. Patel, V.R. Vallurupalli, B.A. Ratliff, D.E. Warren, J.S. Fisher, Role of GLUT1 in regulation of reactive oxygen species, *Redox Biol.* 2 (2014) 764–771, <http://dx.doi.org/10.1016/j.redox.2014.03.004>.

