



TESIS DOCTORAL

**MELATONINA COMO
AGENTE COADYUVANTE DE
QUIMIOTERAPÉUTICOS EN
ESTUDIOS *IN VITRO***

Roberto Pariente Rodríguez

**Biología Molecular y Celular, Biomedicina y
Biotecnología**

Conformidad de los directores:

Fdo.: Ana Beatriz Rodríguez Moratinos

Fdo.: Ignacio Bejarano Hernando

Fdo.: Javier Espino Palma

2017



UNIVERSIDAD DE EXTREMADURA

FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA

D^a. ANA BEATRIZ RODRÍGUEZ MORATINOS, Catedrática de Universidad del Departamento de Fisiología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Extremadura, D. IGNACIO BEJARANO HERNANDO, Personal Investigador del Departamento de Fisiología de la Universidad de Extremadura y D. JAVIER ESPINO PALMA, Investigador Postdoctoral del Departamento de Fisiología de la Universidad de Extremadura,

CERTIFICAN:

Que la presente Tesis Doctoral, presentada por D. Roberto Pariente Rodríguez, con el título: “**MELATONINA COMO AGENTE COADYUVANTE DE QUIMIOTERAPÉUTICOS EN ESTUDIOS *IN VITRO***”, ha sido realizada bajo nuestra dirección, en el Departamento de Fisiología de la Universidad de Extremadura, y entendiendo que se encuentra finalizada y que reúne los requisitos de originalidad, autorizan su presentación para ser juzgada ante el tribunal correspondiente.

Y para que conste a los efectos oportunos, firman la presente en Badajoz, a 8 de Mayo de 2017.

Fdo.: Ana Beatriz Rodríguez Moratinos

Fdo.: Ignacio Bejarano Hernando

Fdo.: Javier Espino Palma

La realización de esta Tesis Doctoral se ha llevado a cabo gracias al apoyo económico de la Junta de Extremadura-Fondo Social Europeo de Desarrollo Regional (Fondos FEDER GR10003) grant BBB021- GR15051.



GOBIERNO DE EXTREMADURA

Consejería de Empleo, Empresa e Innovación



Agradecimientos

Quiero expresar mi más sincera gratitud a mis directores de esta Tesis Doctoral, la Dra. Ana Beatriz Rodríguez Moratinos, al Dr. Ignacio Bejarano Hernando, y al Dr. Javier Espino Palma por haberme iniciado en la investigación científica inculcándome valores de esfuerzo, trabajo, meticulosidad, rigurosidad, dedicación y entusiasmo. Gracias por vuestro ejemplo, y por todo lo que he aprendido de y con vosotros.

Al Dr. José Antonio Pariente Llanos por su incondicional ayuda, dedicación y apoyo constante.

A todos y cada uno de los miembros del grupo de investigación “Neuroinmunofisiología y Crononutrición” del Departamento de Fisiología de la Facultad de Ciencias de la UEx, un gran grupo científico y mejor equipo humano. Ha sido un auténtico placer compartir con vosotros estos años de trabajo y buenos ratos.

A Elena Circujano por estar siempre pendiente de todo y de todos, y preocuparse por facilitarnos el día a día.

Al servicio de Apoyo a la Investigación de la UEx (SAIUEx) y en especial a Alberto Álvarez Barrientos y Pilar Torralbo Jiménez por su estrecha colaboración en las medidas de citometría.

A todos y cada uno de los profesores del Grado de Biología (2010-2014) y del Master de Biotecnología Avanzada (2014-2015) que me transmitieron sus conocimientos y enseñanzas y que han dejado huella tanto en mi formación académica como humana.

Y por último a mi familia, ya que siempre han estado presentes en los momentos de alegría y sobre todo en los momentos difíciles, y porque gracias a ellos y al ser incondicionales he podido llegar hasta aquí.

AA-NAT: Serotonina N-acetil-transferasa

AFMK: N1-acetil-N2-formil-5-metoxi-quinurenamina

AIF: Factor inductor de apoptosis

AMK: N1-acetil-5-metoxi-quinurenamina

AMPc: Adenosínmonofosfato cíclico

ANT: Transportador de nucleótidos de adenina

Apaf-1: Proteasa apoptótica inducida por el factor 1

Ara-CTP: Citarabina-5-trifosfato

Bcl-2: Linfoma de células B 2

CARD: Dominio de reclutamiento de capasas

cDK: Quinasa dependiente de ciclina

COX-2: Ciclooxygenasa-2

CRD: Dominio rico en cisteínas

dCTP: Desoxicitidinatrifosfato

DD: Dominio de muerte

DED: Dominio efector de muerte

DISC: Complejo de señalización inductor de muerte

DMSO: Dimetilsulfóxido

DTT: DL-ditiotreitol

ERK: Quinasas reguladas por señales extracelulares

ERO: Especies reactivas de oxígeno

FADD: Dominio de muerte asociado a Fas

GMPc: Guanosínmonofosfato cíclico

HCIO: Ácido hipocloroso

HIOMT: Hidroxi-indol-O-metiltransferasa

IAP: Proteína inhibidora de apoptosis

MAPK: Proteína quinasa activada por mitógenos

MEK: Quinasa MAPK/ERK

MTT: Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol

NF-κB: Factor nuclear-kappaB

NK: Natural Killer

NO: Óxido nítrico

nNOS: Óxido nítrico sintasa neuronal

NQO2: Quinona oxidorreductasa 2

¹O₂: Singlete de oxígeno

O₂^{•-}: Anión superóxido

OH: Anión hidroxilo

ONOO⁻: Anión peroxinitrito

PARP: Poli ADP ribosa polimerasa

PI: Yoduro de propidio

PI3K: Fosfoinositol 3-quinasa

PKA: Proteína quinasa A

PKB: Proteína quinasa B

PLC: Fosfolipasa C

PPT: Poro de permeabilidad transitoria

PS: Fosfatidilserina

Raf: Factor activado por Ras

RE: Retículo endoplasmático

ROR/RZR: Retinoid Orphan
Receptors/Retinoid Z Receptors

TGF β -1: Factor de crecimiento
transformante beta-1

THD: Dominio de homología a TNF

TNF: Factor de necrosis tumoral

TPH: Triptófano-5-hidroxilasa

TRAIL: TNF-Related Apoptosis Inducing
Ligand

XIAP: X-linked Inhibitor of Apoptosis
Protein

VDAC: Canal de aniones dependiente de
voltaje

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Apoptosis o muerte celular programada	3
1.1.1 Maquinaria implicada en la muerte celular: Caspasas	5
1.1.2 Proteínas de la familia Bcl-2	8
1.1.3 Vías de inducción de la apoptosis	10
1.1.4 Implicaciones clínicas de la apoptosis en el cáncer	17
1.2 La melatonina	19
1.2.1 Estructura y síntesis	19
1.2.2 Mecanismos de acción	22
1.3 Melatonina y apoptosis	26
1.3.1 Efectos anti-apoptóticos de la melatonina	28
1.3.2 Efectos pro-apoptóticos de la melatonina	30
1.4 Quimioterápicos	36
1.4.1 Cisplatino	36
1.4.2 Citarabina	38
1.4.3 5-Fluorouracilo	39
1.4.4 Etopósido	41
1.4.5 Doxorrubicina	42
2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	45
3. MATERIALES Y MÉTODOS	51
3.1 Lista de reactivos	53
3.1.1 Líneas celulares y medios de cultivo	53
3.1.2 Quimioterápicos	53
3.1.3 Fluoróforos	54
3.1.4 Otros reactivos	54
3.2 Cultivos celulares	55
3.3 Diseño experimental	56
3.3.1 Tratamiento con agentes quimioterapéuticos	56
3.3.2 Tratamientos con melatonina y con agonistas y antagonistas de los receptores de melatonina	56

3.4 Viabilidad celular	57
3.5 Detección de la producción de especies reactivas del oxígeno (ERO) y activación de la caspasa-9	58
3.6 Detección de actividad caspasa-3	59
3.6.1 Actividad caspasa-3	59
3.6.2 Cuantificación de proteínas: método Bradford	60
3.7 Detección de la apoptosis	61
3.8 Detección de la fragmentación de ADN	62
3.9 Análisis del ciclo celular	63
3.10 Tratamiento estadístico	63
4. RESULTADOS	65
4.1 Melatonina sensibiliza las células HeLa de cáncer cervical humano frente a la citotoxicidad y la apoptosis inducidas por el cisplatino: efectos sobre el estrés oxidativo y la fragmentación del ADN	67
4.2 Melatonina incrementa el efecto quimioterapéutico inducido por 5-Fluorouracilo en células de adenocarcinoma colorrectal humano <i>in vitro</i>	77
4.3 Participación de los receptores MT3 de la melatonina en el efecto sinérgico de la melatonina sobre las acciones citotóxicas y apoptóticas inducidas por agentes quimioterápicos en las líneas celulares tumorales HT-29 y HeLa	87
5. DISCUSIÓN GENERAL	97
6. CONCLUSIONES	107
7. BIBLIOGRAFÍA	111
8. ANEXO	139

1. INTRODUCCIÓN

1.1. APOPTOSIS O MUERTE CELULAR PROGRAMADA

El término apoptosis, procedente del griego antiguo “apóptōsis”, significa “algo que se cae o se desprende”, como “los pétalos de las flores” o “las hojas de los árboles”. Dicho término fue sugerido por J. Cormack, profesor de griego de la Universidad de Aberdeen, aunque fueron J.F.R. Kerr, A.H. Wyllie y A.R. Currie quienes, en 1972, propusieron su introducción en el lenguaje biológico para designar el mecanismo de la muerte celular programada (Kerr y cols., 1972).

La apoptosis se define como un proceso fisiológico de muerte celular iniciado por estímulos del desarrollo o ambientales que activan un programa genético que controla, diseña e inicia una cascada de eventos que dirige la destrucción ordenada y silenciosa de la célula, por lo que también se denomina muerte celular programada. Este fenómeno es un proceso activo, con requerimientos de energía en forma de ATP, no se propaga indiscriminadamente a las células vecinas y, por tanto, no induce una respuesta inflamatoria en los tejidos subyacentes, permitiendo así la eliminación de la célula apoptótica de un determinado tejido sin modificar la arquitectura o fisiología del mismo (Strasser y cols., 2000).

La apoptosis es un mecanismo primordial para la homeostasis tisular, el desarrollo de órganos y la eliminación de células defectivas o potencialmente peligrosas en organismos superiores. Además, este proceso de autodestrucción o “suicidio celular” tiene un papel crucial en el desarrollo y función del sistema inmune, así como en la protección antitumoral (Wyllie, 1997). Puesto que el proceso apoptótico depende de la integración de múltiples señales extracelulares e intracelulares, de la amplificación de dichas señales por parte de segundos mensajeros celulares y, en última instancia, de la activación de proteasas efectoras que llevan a término la muerte celular, cualquier defecto en el control de la apoptosis puede contribuir a una amplia variedad de enfermedades (Thompson, 1995). Así, una alteración del equilibrio homeostático puede conducir a situaciones patológicas como el cáncer cuando la proliferación se encuentra aumentada, mientras que puede causar enfermedades neurodegenerativas y autoinmunes cuando la tasa de muerte celular está incrementada (Hetts, 1998).

La apoptosis se caracteriza por una serie de cambios bioquímicos y morfológicos (Wyllie y cols., 1980) como son la retracción de pseudópodos o la reducción del

volumen celular y nuclear (picnosis) debido a la condensación del citoplasma, por un lado, y a la compactación de la cromatina y fragmentación nuclear (cariorrhexis), por otro lado. Esto último provoca la aparición de densos agregados que se deslocalizan para situarse junto a la membrana nuclear y que, posteriormente, serán degradados en fragmentos oligonucleosomales de 180 pares de bases o múltiplos de éstos por la acción de endonucleasas. Paralelamente, tiene lugar la dilatación del retículo endoplasmático (RE) dando lugar a la formación de vesículas, aunque sin pérdida de su integridad, que confieren a la célula el fenotipo característico en forma de “burbujas” (zeiosis). Por último, la célula se fragmenta en los denominados cuerpos apoptóticos que son fagocitados por macrófagos y otras células circundantes, evitando así la liberación del material intracelular y su exposición al sistema inmunitario, lo cual conllevaría al desarrollo de una respuesta inflamatoria (Figura I). Las células fagocíticas pueden reconocer a las células apoptóticas ya que éstas exponen en su superficie marcadores como la fosfatidilserina, fosfolípido situado en la cara interna de la membrana plasmática que se transloca a la cara externa en la fase temprana de la apoptosis (Fadok y cols., 1992).

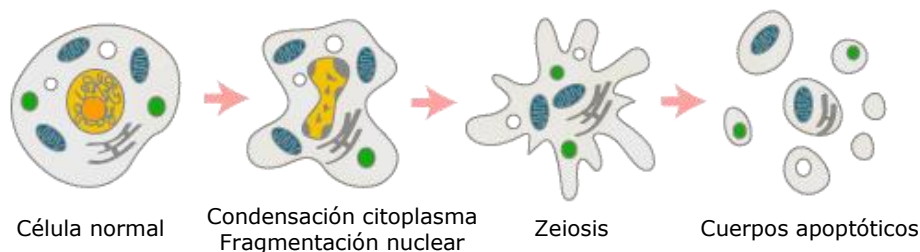


Figura I. Representación esquemática del proceso de muerte por apoptosis: condensación de los distintos orgánulos y fragmentación nuclear, formación de burbujas o “blebs” característicos de la apoptosis, fragmentación celular y formación de cuerpos apoptóticos.

De entre los mencionados eventos apoptóticos, la fragmentación del ADN y la externalización de la fosfatidilserina son dos características muy relevantes desde el punto de vista diagnóstico, ya que permiten detectar la activación de un programa apoptótico mediante una amplia variedad de técnicas moleculares. De hecho, la fosfatidilserina expuesta en la superficie celular funciona como una señal específica de reconocimiento, conocida como señal “*eat-me*”, que permite que los macrófagos

identifiquen y, posteriormente, degraden la célula apoptótica (Ravichandran, 2010). La pérdida de la asimetría de la membrana plasmática se detecta comúnmente mediante sondas fluorescentes unidas a proteínas que interaccionan específicamente con la fosfatidilserina, como es el caso de la anexina V (Boersma y cols., 2005), aunque en los últimos años se están desarrollando nuevas metodologías basadas en el uso de sondas ratiométricas (Demchenko, 2012).

1.1.1. Maquinaria implicada en la muerte celular: Caspasas

Las caspasas (acrónimo del inglés *Cysteine ASPartyl-specific proteASES*) constituyen una familia de enzimas muy conservadas en la evolución y son los componentes centrales de la maquinaria de inducción de apoptosis. Se trata de cisteín-proteasas, ya que presentan un residuo de cisteína en su centro catalítico, que median la ruptura de otras proteínas y se caracterizan por cortar sus sustratos al nivel de un residuo de aspártico, de donde deriva su nombre.

Las caspasas están constituidas por un prodominio N-terminal de longitud variable, seguido de una subunidad mayor de unos 20 kDa y una subunidad menor de unos 10 kDa en el extremo C-terminal (Figura II). El residuo de cisteína del centro activo forma parte de una secuencia pentapeptídica conservada, QACXG, y se encuentra en la subunidad mayor. Por su parte, los residuos que constituyen el sitio de unión para el sustrato se localizan tanto en la subunidad mayor como en la menor, si bien el residuo dominante para la especificidad de sustrato se halla en la subunidad menor (Wolf y Green, 1999).

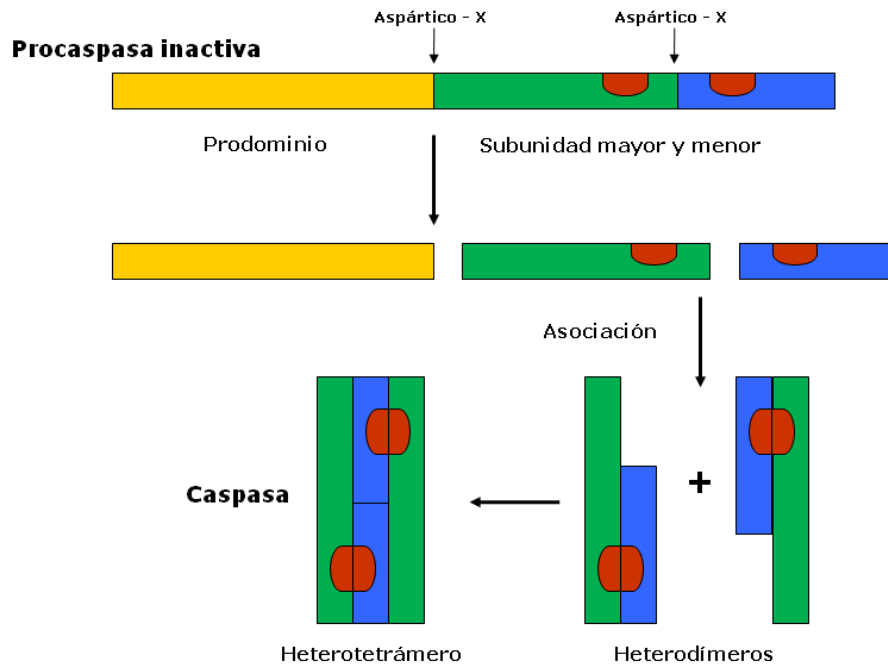


Figura II. Activación de las caspasas. La procaspasa contiene tres dominios: un prodominio, una subunidad mayor y otra menor. La procaspasa es inactiva y una vez que sufre dos roturas proteolíticas se separan las tres subunidades. La subunidad mayor y la menor forman un heterodímero por unión de sus centros activos. La unión de dos heterodímeros para formar un heterotetrámero activo tiene lugar entre las dos subunidades menores adyacentes rodeadas por las subunidades mayores.

La activación de las caspasas requiere de la escisión de las tres subunidades que las conforman, es decir, el prodominio, la subunidad mayor, y la subunidad menor. Debido a este procesamiento, se forma un tetrámero integrado por dos subunidades mayores y dos subunidades menores que presentará dos centros catalíticos (Wolf y Green, 1999). Esta proteólisis tiene lugar en dos fases: en la primera, la subunidad mayor, junto con el prodominio, se separa de la subunidad menor; en la segunda, el prodominio se escinde de la subunidad mayor (Figura II). La presencia de residuos de aspártico en los sitios de separación de las distintas subunidades se relaciona con la capacidad de las caspasas de auto-activarse o ser activadas por otras caspasas dentro de la cascada apoptótica.

El grupo de las **caspasas iniciadoras** está formado por la caspasa-2, -8, -9 y -10, y son las primeras en activarse tras un estímulo apoptótico. En realidad, este estímulo provoca el ensamblaje de lo que se denominan complejos de activación, que están integrados por las formas inactivas de las propias caspasas y por proteínas adaptadoras, y constituyen una plataforma para la activación de las citadas caspasas iniciadoras. Las

proteínas adaptadoras se unen de manera específica a dominios DED (acrónimo del inglés *Death Effector Domain*) o CARD (*CAspase Recruitment Domain*), los cuáles se sitúan en los prodominios de las caspasas. Existen varios complejos de activación para las caspasas iniciadoras (Figura III). Así, el complejo de señales inductoras de muerte o DISC (*Death-Inducing Signalling Complex*) recluta y activa a la caspasa-8 y -10 mediante los dominios DED (Juo y cols., 1998). Por su parte, el apoptosoma permite el reclutamiento y activación de la caspasa-9 a través de su dominio CARD (Liu y cols., 1999).

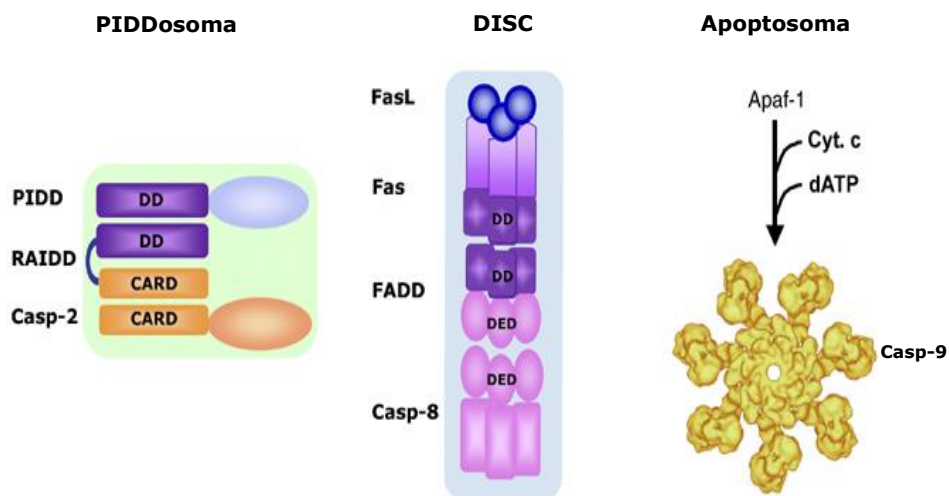


Figura III. Representación esquemática de los tres complejos de reclutamiento y activación de las caspasas iniciadoras (modificado de Bao y Shy, 2007).

El reclutamiento de las caspasas iniciadoras por proteínas adaptadoras, así como la formación de los complejos de activación, determinaron la aparición de la teoría de activación de dichas caspasas por un mecanismo de autocatálisis por proximidad (Salvesen, 1999).

El conjunto de **caspasas efectoras** está integrado por la caspasa-3, -6 y -7, que carecen de dominios DED y CARD y son activadas directamente por las caspasas iniciadoras. Las caspasas efectoras son las encargadas de degradar los distintos sustratos celulares que provocan los cambios morfológicos, estructurales y bioquímicos característicos de la muerte por apoptosis.

1.1.2. Proteínas de la familia Bcl-2

Como ya se ha mencionado anteriormente, miembros de la familia Bcl-2 regulan la permeabilización de la membrana mitocondrial externa (MME). Dentro de esta familia existen miembros anti-apoptóticos, los cuales preservan la integridad de la MME e impiden que se dispare el proceso de muerte celular por apoptosis, y miembros pro-apoptóticos, encargados de promover la permeabilización de la MME y todos los eventos mitocondriales que conducen a la muerte de la célula.

Los miembros de la familia Bcl-2 pueden clasificarse en tres grupos en función de su actividad pro- o anti-apoptótica, así como del número de dominios de homología a Bcl-2 que posean, denominados dominios BH (Figura IV).

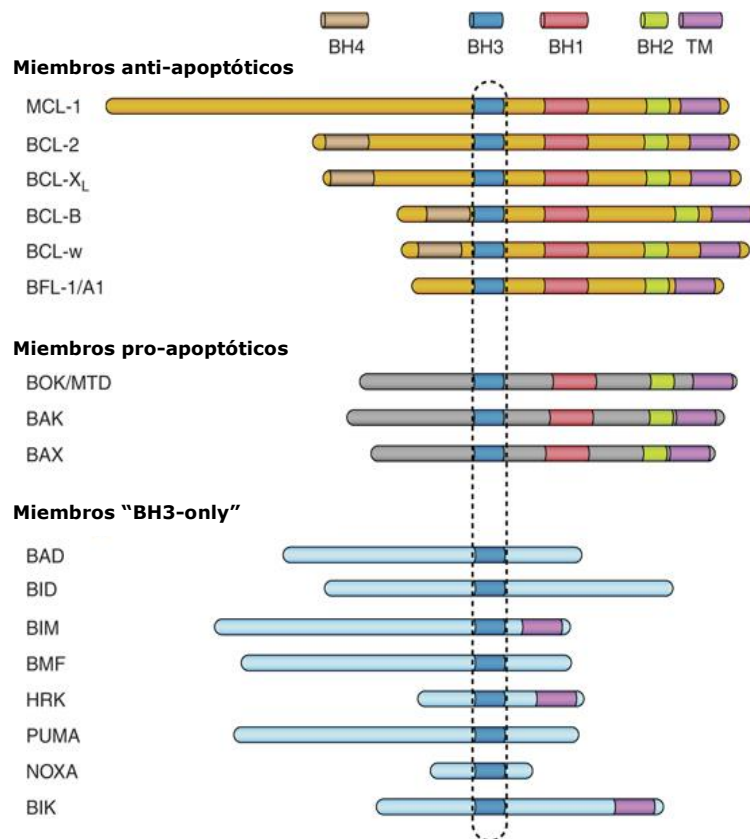


Figura IV. Clasificación de la familia de proteínas Bcl-2 basada en la organización de los dominios y en su función. Están resaltados los distintos dominios de homología a Bcl-2 (BH) así como el dominio transmembrana (TM) (modificado de Danial, 2009).

Miembros anti-apoptóticos: Las proteínas de esta clase presentan, por lo general, cuatro dominios de homología: BH1, BH2, BH3 y BH4. Dentro de este grupo se encuentran las proteínas Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Boo/Diva, y sus homólogos más divergentes Mcl-1 y Bfl-1/A1, que carecen de dominio BH4 (Figura IV) (Sattler y cols., 1997). Los cuatro dominios BH intervienen en las interacciones con otras proteínas de la familia y con moléculas que están localizadas en la cara citoplasmática de las membranas intracelulares, como por ejemplo la MME, la membrana del RE y la envuelta nuclear. Los dominios BH1, BH2 y BH3 de las proteínas anti-apoptóticas son los responsables de formar una región hidrofóbica de interacción con los dominios BH3 de las proteínas pro-apoptóticas, provocando su inhibición (Willis y Adams, 2005). La importancia de esta familia en la regulación de la muerte celular se hizo evidente a partir de estudios que mostraron que la sobreexpresión de Bcl-2 contribuía al desarrollo de determinados tipos de linfomas. Por este motivo, Bcl-2 da nombre a esta familia de proteínas (Leibowitz y Yu, 2010).

Miembros pro-apoptóticos: Son proteínas multiméricas y se caracterizan por presentar dominios BH1, BH2, y BH3. Dentro de esta clase se encuadran las proteínas Bax, Bak y Bok (Figura IV). Estas proteínas juegan un papel importante en la apoptosis ya que modifican el $\Delta\psi_m$ y la permeabilidad de la MME promoviendo, de este modo, la liberación de moléculas pro-apoptóticas tales como citocromo *c* y Smac/DIABLO (Letai y cols., 2002; López y cols., 2008). Las proteínas pro-apoptóticas multiméricas se expresan de forma constitutiva y sólo inducen la permeabilidad de la MME tras un estímulo apoptótico, lo que sugiere que permanecen inactivas hasta que la célula recibe un estímulo apoptótico (Wolter y cols., 1997). Estas proteínas también presentan un dominio transmembrana (TM) en su extremo carboxilo que les permite anclarse a las membranas celulares. Dicho dominio TM se encuentra plegado hacia el bolsillo hidrofóbico, constituido por los dominios BH1, BH2 y BH3, evitando así su inserción en las membranas. La retracción de este dominio TM tras un estímulo apoptótico resulta en la translocación e inserción de estas proteínas en la membrana mitocondrial (Nechushtan y cols., 2001). Una vez adheridos en la membrana mitocondrial, Bak y Bax oligomerizan y alteran la permeabilidad de la MME formando canales (Zamzami y Kroemer, 2001).

Miembros pro-apoptóticos “BH3-only”: Los miembros de esta clase comparten sólo, entre ellos y con el resto de miembros de la familia, el dominio BH3, de ahí su denominación. Dentro de este grupo se encuentran las proteínas Bad, Bim, Bid, Bmf, Bik, Noxa, Puma, Blk, Hrk, Nip3 y BNip3 (Figura IV). Estas proteínas pro-apoptóticas juegan un papel importante en la activación de Bax y Bak, aunque el mecanismo de activación no está completamente claro. La mayoría de miembros “BH3-only” lo que hacen es “desreprimir” o permitir la actividad intrínseca de Bax y Bak interaccionando e inhibiendo a los miembros anti-apoptóticos de la familia. Así, la proteína Bad, que se encuentra secuestrada en el citoplasma por proteínas 14-3-3, es activada por un estímulo apoptótico y se transloca a la MME donde se une a los miembros anti-apoptóticos de la familia inhibiendo su función (Zha y cols., 1997). Del mismo modo, Bmf permanece secuestrada en el citoplasma hasta que un estímulo apoptótico permite su liberación y unión a las proteínas anti-apoptóticas (Puthalakath y cols., 2001). Sin embargo, algunas proteínas “BH3-only” pueden unirse y activar Bax y Bak directamente. Este es el caso de Bid y Bim que pueden interaccionar a través del dominio BH3 con Bax y Bak, provocando su dimerización y activación (Puthalakath y Strasser, 2002), aunque también pueden activarlas indirectamente al unirse a las proteínas Bcl-2 o Bcl-xL, inhibiendo la función anti-apoptótica de estas últimas (Puthalakath y cols., 1999).

1.1.3. Vías de inducción de la apoptosis

Existen dos tipos generales de vías de señalización que conducen a la activación de la muerte celular programada: **1)** la ruta de los receptores de muerte o extrínseca, que implica la activación de determinados miembros de la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNF), y **2)** la ruta mitocondrial o intrínseca, inducida por distintas formas de estrés celular, como puede ser el causado por la privación de factores de crecimiento en el medio, pérdida de adhesión al sustrato, daño al ADN, estrés en el retículo endoplasmático (RE), activación de oncogenes, infección viral, radiaciones ionizantes, radiaciones ultravioletas, etc. Ambas vías producen la activación de las caspasas iniciadoras y convergen en la activación de las caspasas ejecutoras, responsables últimas de las características morfológicas de la apoptosis.

1.1.3.1. Vía extrínseca o de los receptores de muerte

Una célula normal o patológica puede entrar en apoptosis en respuesta al estímulo desencadenado por la unión de los denominados ligandos de muerte a sus receptores específicos. Los ligandos de muerte son proteínas transmembrana tipo II pertenecientes a la superfamilia del TNF, incluyendo FasL/CD95L, TRAIL (acrónimo del inglés *TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand*) o el propio TNF. Estos ligandos presentan dominios de homología a TNF (THD, *TNF Homology Domain*), a través de los cuales se asocian a sus receptores (Bodmer y cols., 2002). Dichos ligandos son expresados por distintas células del sistema inmunológico tales como linfocitos T, células NK (*Natural Killer*), monocitos y células dendríticas, permitiendo la eliminación de células que han cumplido su función, células infectadas, células autorreactivas y/o células metaplásicas (Yang y cols., 2001; Zhang y cols., 2004).

Los receptores de muerte a los que se unen estos ligandos son proteínas transmembrana tipo I de la superfamilia de receptores del TNF y reciben el nombre de receptores de muerte. Se caracterizan por presentar en su región intracelular los denominados dominios de muerte (DD, *Death Domain*), a través de los cuales se transmite el estímulo apoptótico. Existen, además, receptores anti-apoptóticos o “señuelo” para dichos ligandos, denominados así porque no transmiten la señal apoptótica (Gruss y Dower, 1995). Ambos tipos de receptores presentan en su región extracelular unos dominios ricos en cisteína (CRD, *Cysteine-Rich Domain*) que se asocian con las regiones THD de los ligandos de muerte por medio de puentes disulfuro, formando de este modo multímeros funcionales. La unión del ligando a su correspondiente receptor de muerte va a tener como consecuencia la trimerización del receptor y el reclutamiento de proteínas citoplasmáticas adaptadoras con dominios DD homólogos a los del receptor, entre las que destaca la proteína FADD. Estas proteínas, a su vez, reclutan a las caspasas iniciadoras (caspasa-8 y/o -10) a través de los dominios DED, conformando así el complejo DISC donde se activarán dichas caspasas (Kischkel y cols., 2000).

En función de las señales implicadas en la inducción de apoptosis tras la activación de los receptores de muerte, las células pueden clasificarse en tipo I, si el proceso apoptótico es independiente de la vía mitocondrial, o tipo II, si se requiere la

participación de dicho orgánulo (Scaffidi y cols., 1998). En las células de tipo I, las caspasas iniciadoras activadas a nivel del complejo DISC, a su vez, activan de forma directa a las caspasas efectoras que, en última instancia, provocan la muerte celular por apoptosis. Por el contrario, en las células de tipo II, las caspasas iniciadoras provocan la activación de las señales mitocondriales características de la ruta intrínseca (ver apartado 1.1.3.2.) que, posteriormente, activan a las caspasas efectoras (Figura V).

El TNF tiene un papel fundamental en inflamación e inmunidad. Se han descrito dos receptores para TNF: TNFR-1 y TNFR-2. Sólo TNFR-1 se considera un receptor de muerte, ya que TNFR-2 carece del dominio de muerte intracelular necesario para transmitir la señal apoptótica. A pesar de ello, TNFR-1 puede disparar la inducción de apoptosis o bien activar rutas de supervivencia celular, dependiendo del complejo de señalización que se active. Asimismo, la interacción de FasL/CD95L con su receptor de muerte Fas/CD95 da lugar, generalmente, a la inducción de apoptosis, aunque se han descrito algunas situaciones en las que Fas no tiene una acción citotóxica sino que induce proliferación, migración y producción de citoquinas (Aggarwal, 2003; Micheau y Tschopp, 2003).

Por otro lado, el ligando de muerte TRAIL puede unirse específicamente a cuatro receptores transmembrana (TRAIL-R1 a -R4) y, con menor afinidad, a un receptor soluble denominado osteoprotegerina (OPG), aunque se desconoce la relevancia de esta unión en condiciones fisiológicas (Almasan y Ashkenazi, 2003). Los receptores de membrana de TRAIL se clasifican en pro- y anti-apoptóticos, en función de su capacidad para inducir la activación de la cascada apoptótica. Los receptores TRAIL-R1/DR4 y TRAIL R2/DR5 son receptores de muerte pro-apoptóticos, pues presentan en su región intracelular los dominios DD necesarios para transmitir la señal de apoptosis tras la unión del ligando (Pan y cols., 1997; Cha y cols., 2000). Los receptores TRAIL-R3/DcR1 y TRAIL R4/DcR2 son receptores “señuelo” debido a su incapacidad para inducir apoptosis tras la unión del ligando. TRAIL-R3 carece de dominios transmembrana e intracitoplasmático, anclándose a la membrana a través de una cola de glicofosfatidil-inositol (Degli-Esposti y cols., 1997). Por el contrario, TRAIL-R4 presenta regiones citoplasmática y transmembrana, pero posee un dominio DD truncado que lo incapacita a la hora de ensamblar la maquinaria necesaria para la activación del proceso apoptótico, aunque le permite activar rutas de supervivencia

celular tras la unión de TRAIL. Esto último también se ha descrito tras la unión de TRAIL a sus receptores pro-apoptóticos (Chaudhary y cols., 1997).

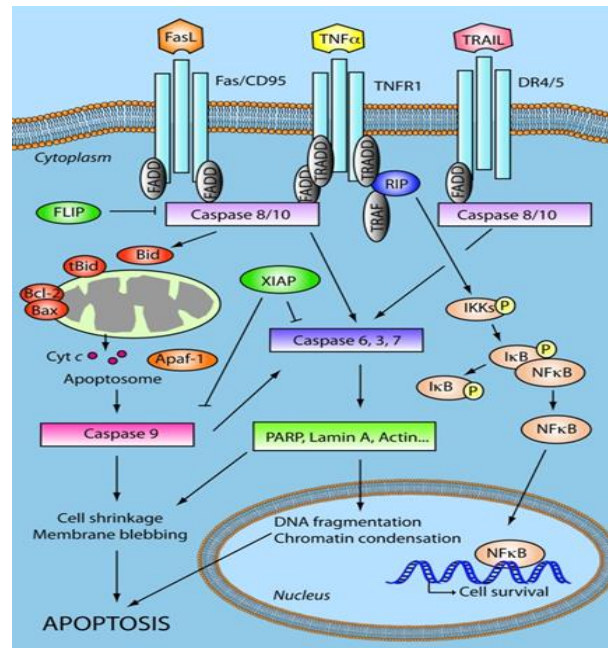


Figura V. Ruta extrínseca o mediada por receptores de la activación de la apoptosis.

1.1.3.2. Vía intrínseca o mitocondrial

Esta ruta de inducción de apoptosis es conocida también como ruta mitocondrial ya que la mitocondria es el principal orgánulo implicado en este tipo de muerte celular. La ruta intrínseca es activada por diferentes estímulos, incluyendo daño al ADN, radiación ultravioleta y drogas quimioterápicas. Las vías de señalización activadas por estos agentes estresantes provocan la permeabilización de la membrana mitocondrial externa (MME) y, en consecuencia, la liberación de proteínas solubles desde el espacio intermembrana al citoplasma. Estos factores pro-apoptóticos producen la activación de caspasas, aunque algunos de ellos también pueden conducir a una muerte celular independiente de caspasas (Rosado y cols., 2006).

Se han propuesto dos mecanismos para explicar la permeabilización de la MME, pudiendo funcionar uno u otro según el contexto, el estímulo o el tipo celular:

- El primero de ellos, en el que participa la membrana mitocondrial interna (MMI), implica la formación de un poro que recibe el nombre de poro de permeabilidad

transitoria (PPT). Este poro permite el paso de agua y moléculas de bajo peso molecular provocando la pérdida del equilibrio iónico, así como el incremento en el volumen de la matriz mitocondrial por exceso de hidratación, desencadenando de este modo la ruptura de la MME. El PTT en su conjunto, se ha determinado estar formado por dímeros de la FOF1 ATP sintasa, enzima encargada de la fosforilación oxidativa, y que por lo tanto desempeña una doble función. En cuanto a su regulación, se sabe que la ciclofilina D, que reside en la matriz mitocondrial, es un regulador esencial del PTT mediante la interacción con el tallo lateral de la ATP sintasa, a nivel del punto que le confiere sensibilidad a la oligomicina (Giorgio y cols., 2013)

- En el segundo caso, la permeabilidad de la MME se atribuye a la formación de canales proteicos constituidos por la oligomerización de miembros pro-apoptóticos de la familia Bcl-2 que actúan directamente sobre la MME, o bien debido a la asociación de las citadas proteínas pro-apoptóticas con distintos componentes lipídicos de la MME que provocan la aparición de grandes poros (Green y Kroemer, 2004).

En cualquier caso, una vez permeabilizada la MME, se producen una serie de eventos, todos ellos implicados en la muerte celular (Figura VI):

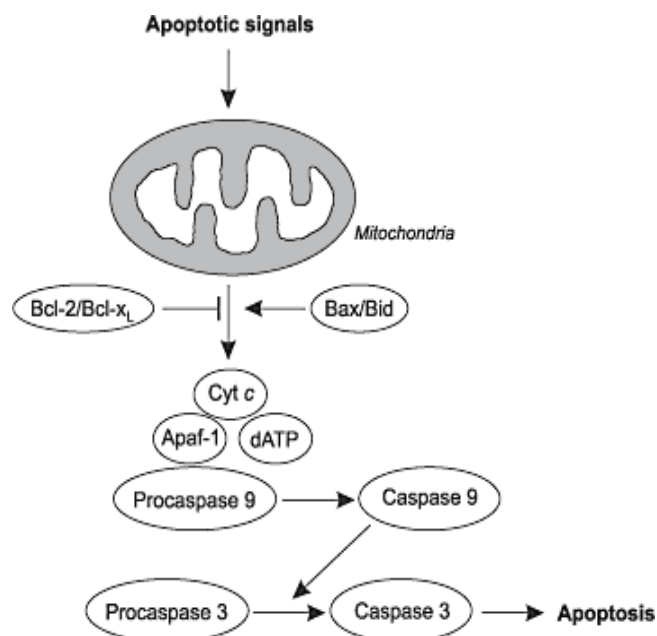


Figura VI. Ruta intrínseca o mitocondrial de activación de la apoptosis.

1) Liberación de proteínas del espacio intermembrana de la mitocondria. Estas proteínas pueden activar caspasas, nucleasas o pueden neutralizar la acción de ciertos inhibidores citosólicos del proceso apoptótico. Algunas de estas proteínas son:

- a) *Citocromo c*: Una vez que éste es liberado al citoplasma ante un estímulo apoptótico, se une a la proteína pro-apoptótica Apaf-1, en presencia de ATP. Apaf-1 presenta tres dominios funcionales. Una secuencia CARD en el extremo amino que tiene un alto grado de homología con la secuencia CARD de la caspasa-9, un dominio de unión de ATP en la zona central y, finalmente, en el extremo carboxilo presenta el dominio WD-40. Este último está considerado como un dominio de unión proteína-proteína a través del cual el citocromo *c* interacciona con Apaf-1 (Shi, 2002). La unión del citocromo *c* y la molécula de ATP facilita un cambio conformacional en la estructura de Apaf-1 que permite la oligomerización de éste con otras moléculas de Apaf-1 para formar un heptámero (ver Figura III). De este modo, se constituye el mencionado apoptosoma, que recluta a la procaspasa-9 a través de interacciones entre los dominios CARD presentes tanto en Apaf-1 como en la procaspasa-9 (Fan y cols., 2005). La activación de la procaspasa-9 dentro del apoptosoma se produce por una proteólisis autocatalítica.
- b) *AIF* (acrónimo del inglés *Apoptosis-Inducing Factor*): Es una flavoproteína que posee una señal de localización mitocondrial y otra nuclear. Normalmente se encuentra confinada en el espacio intermembrana de la mitocondria pero, una vez que es liberada al citoplasma en respuesta a estímulos apoptóticos, se transloca al núcleo produciendo fragmentación del ADN y condensación periférica de la cromatina. *AIF* también provoca otros cambios celulares característicos de la apoptosis, como la disipación del potencial de membrana mitocondrial o la exposición de la fosfatidilserina en la superficie celular.
- c) *Smac/DIABLO*: Esta proteína se une e inactiva a una serie de proteínas inhibitoras de caspasas que pertenecen a la familia de los IAPs (proteínas inhibitoras de apoptosis) (Du y cols., 2000). Además, se ha demostrado que

la proteína Smac/DIABLO tiene una capacidad pro-apoptótica independiente de su acción inhibidora sobre los IAPs (Fulda y cols., 2002).

- d) Omi/HtrA2: Es una serín-proteasa que interacciona con las proteínas IAPs citosólicas de manera similar a Smac/DIABLO. Por tanto, puede promover la activación indirecta de caspasas, como la caspasa-3 o -9. Sin embargo, Omi/HtrA2 también posee capacidad de inducir apoptosis de un modo independiente de la activación de caspasas o de su interacción con proteínas IAPs, gracias a su dominio catalítico serín-proteasa (Suzuki y cols., 2001).
- e) Endonucleasa G: Esta proteína, una vez liberada al citoplasma, se transloca al núcleo donde está involucrada en la fragmentación del ADN. Dicha fragmentación es independiente de la activación de caspasas. Asimismo, es probable que la endonucleasa G necesite de otras nucleasas o cofactores para poder realizar su función (Van Loo y cols., 2001).

2) Alteración de la cadena de transporte de electrones, de la fosforilación oxidativa y de la producción de ATP. El citocromo *c* transporta electrones del complejo III al complejo IV de la cadena de transporte electrónico, lo cual genera un potencial eléctrico a través de la MMI ($\Delta\psi_m$). Este potencial es utilizado por el complejo V para generar ATP a partir de ADP y fosfato libre procedente de la respiración aeróbica, y también se utiliza para importar proteínas así como para la biogénesis mitocondrial (Waterhouse y cols., 2001). La liberación del citocromo *c* desde el espacio intermembrana causa una pérdida transitoria de este potencial, aunque este hecho por sí solo es insuficiente para impedir completamente la fosforilación oxidativa y la producción de ATP. Sin embargo, cuando las caspasas se activan debido a la permeabilización de la MME, éstas cortan la subunidad p75 del complejo I de la cadena de transporte electrónico (Ricci y cols., 2004). Este hecho provoca una pérdida persistente del potencial de membrana y una alteración en la producción de ATP, principal forma de energía de la célula y esencial para el mantenimiento de la viabilidad, por lo que se ve afectada la supervivencia celular.

3) Alteración del potencial reducción-oxidación (redox) de la célula. La mitocondria es la principal fuente de producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) dentro de la célula. Como consecuencia de las alteraciones mitocondriales mencionadas, se genera un aumento en la producción de ERO que a su vez provoca modificaciones oxidativas en diferentes macromoléculas, incluyendo lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, que alteran su estructura y función. Este tipo de reacciones inducen la formación de agregados proteicos que facilitan la formación del PPT provocando, al mismo tiempo, la pérdida del $\Delta\psi_m$ y la liberación de proteínas pro-apoptóticas, como el citocromo *c*, y la consiguiente apoptosis o muerte celular programada (Brookes y cols., 2004; Uguz y cols., 2009; Bejarano y cols., 2011a). El citocromo *c* está cargado positivamente y se encuentra unido a la cardiolipina, cargada negativamente, en la cara exterior de la MMI. La salida de citocromo *c* requiere la peroxidación de la cardiolipina, un proceso mediado por las ERO, lo cual provoca un cambio en sus propiedades físicas que posibilita la ruptura de la unión entre el citocromo *c* y la cardiolipina (Ott y cols., 2002).

1.1.4. Implicaciones clínicas de la apoptosis en el cáncer

Las implicaciones clínicas de la apoptosis incluyen al sistema inmune, enfermedades neurológicas, hepatitis, patologías cardiovasculares y sepsis. En esta línea, el número de publicaciones ha ido creciendo exponencialmente en la última década, revelándose que muchas enfermedades están asociadas con alteraciones en la actividad apoptótica (Tabla I).

Más del 50% de las neoplasias presentan defectos en la maquinaria apoptótica. Entre los defectos mejor caracterizados se encuentran el aumento en la expresión de algunas proteínas anti-apoptóticas de la familia Bcl-2 y mutaciones en el gen supresor de tumores *TP53*, que codifica para la proteína pro-apoptótica p53 (Vaux y cols., 1988; Strasser y cols., 1990; Vazquez y cols., 2008). Este gen, llamado el “guardián del genoma”, inicia el proceso apoptótico en respuesta a daños en el ADN inducidos por radiación, agentes químicos, estrés oxidativo y otros agentes, mediante la activación transcripcional de una gran variedad de proteínas pro-apoptóticas tales como Puma, Noxa y Bax. Los defectos en el gen *TP53* heredados por la siguiente generación, como

en el caso del síndrome de Li-Fraumeni, resultan en la aparición de numerosos neoplasmas, incluyendo gliomas y sarcomas (Vazquez y cols., 2008).

Tabla I. Enfermedades asociadas con la alteración en la actividad apoptótica.

Enfermedades asociadas a la apoptosis	
Por inhibición de apoptosis	Por exceso de apoptosis
Cáncer <ul style="list-style-type: none"> - Colorrectal - Glioma - Hígado - Neuroblastoma - Leucemias y linfomas - Próstata 	Enfermedades neurodegenerativas <ul style="list-style-type: none"> - Enfermedad de Alzheimer - Esclerosis Lateral Amiotrófica - Enfermedad de Parkinson - Retinitis pigmentosa - Epilepsia
Enfermedades autoinmunes <ul style="list-style-type: none"> - Miastenia grave - Lupus eritematoso sistémico 	Enfermedades hematológicas <ul style="list-style-type: none"> - Anemia aplásica - Síndrome mielodisplásico - Linfocitopenia T CD4+ - Deficiencia G6PD
Enfermedades inflamatorias <ul style="list-style-type: none"> - Asma bronquial - Enfermedad inflamatoria intestinal - Inflamación pulmonar 	Daño tisular <ul style="list-style-type: none"> - Infarto de miocardio - Accidente cerebrovascular - Daño isquémico renal - Riñón poliquístico

La mayoría de agentes quimioterapéuticos induce la apoptosis de las células tumorales (Uguz y cols., 2012). Así, el fármaco imanitib, un inhibidor de la tirosina quinasa, se usa en el tratamiento de la leucemia mieloide crónica ya que provoca la muerte de las células tumorales incrementando los niveles de las proteínas pro-apoptóticas Bim y Bad (Kuroda y cols., 2006). Por otro lado, el inhibidor selectivo de las proteínas Bcl-2 y Bcl-XL, ABT-737, se ha mostrado altamente eficaz en el tratamiento de ciertos tumores tanto por sí sólo como en combinación con otros fármacos antineoplásicos (Lessene y cols., 2008; Cragg y cols., 2009). Asimismo, el fármaco ABT-263, un análogo de ABT-737, se ha usado en ensayos clínicos para el tratamiento de algunos tipos de leucemia y como terapia coadyuvante en tumores sólidos (Cragg y cols., 2009). Otros agentes quimioterapéuticos pro-apoptóticos que se emplean en ensayos clínicos están dirigidos contra las proteínas survivina y XIAP, inhibidores endógenos de la apoptosis (Tolcher y cols., 2008).

1.2. LA MELATONINA

En 1960, Lerner y colaboradores aislaron la que se considera la sustancia secretora más importante de la glándula pineal: la melatonina. Se denominó así debido a su acción blanqueadora cuando se aplicaba en algunas especies nocturnas de vertebrados inferiores. En mamíferos, no se han observado cambios diarios en el color, aunque la pineal y la melatonina se han relacionado con los cambios estacionales en la pigmentación cutánea.

La melatonina es un indol de bajo peso molecular presente de manera ubicua en todos los organismos vivos. A pesar de tener una estructura simple, es una molécula pleiotrópica con importantes funciones biológicas desde bacterias hasta mamíferos (Hardeland y cols., 2011). A este respecto, la melatonina ha demostrado ser un potente antioxidante y secuestrador de radicales libres (Bonnet-Rousselot y Collin, 2010). Además, este indol está implicado en el control de los ritmos biológicos (Arendt y Skene, 2005), en la regulación de la reproducción (Reiter y cols., 2009), y en la inmunomodulación (Guerrero y Reiter, 2002).

1.2.1. Estructura y síntesis

La melatonina es una molécula lipofílica principalmente sintetizada y secretada por la glándula pineal, un órgano de secreción interna que modula la producción y liberación rítmica de muchos compuestos bioactivos en función de la luz ambiental, como es el caso del indol melatonina (Reiter y cols., 2010). Este indol pineal se sintetiza siguiendo un patrón circadiano con niveles circulantes más elevados durante la fase oscura del fotoperiodo y mínimos durante la fase luminosa, de tal forma que mantiene informado al individuo de las variaciones luz/oscuridad (Vandewalle y cols., 2009).

La biosíntesis de melatonina (Figura VII) comienza con la captación de su precursor, el aminoácido esencial L-triptófano, que es tomado de la sangre por los pinealocitos, a través de un mecanismo de transporte activo que está bajo control adrenérgico (Romero y Axelrod, 1974). A continuación, el triptófano se transforma en 5-hidroxitriptófano mediante una hidroxilación llevada a cabo por la enzima triptófano-5-hidroxilasa (TPH). Posteriormente, el 5-hidroxitriptófano es descarboxilado por la

enzima 5-hidroxitriptófano descarboxilasa para producir serotonina. Los niveles de serotonina en la glándula pineal, que son de manera general mucho mayores que en el resto del cerebro, son especialmente elevados durante el día, y caen marcadamente durante la noche como consecuencia de su conversión a melatonina. Esta conversión nocturna implica un proceso enzimático de dos pasos. Inicialmente, la enzima serotonina N-acetiltransferasa (AA-NAT), que muestra un incremento de actividad de 30 a 70 veces mayor durante la noche, transforma la serotonina en N-acetilserotonina, aumentando ésta su concentración a valores entre 10 y 30 veces mayores de los que existen durante el día. Después, la enzima hidroxindol-O-metiltransferasa (HIOMT), que también incrementa su actividad durante la noche, metila la N-acetilserotonina para producir N-acetil-5-metoxitriptamina, más comúnmente conocida como melatonina.

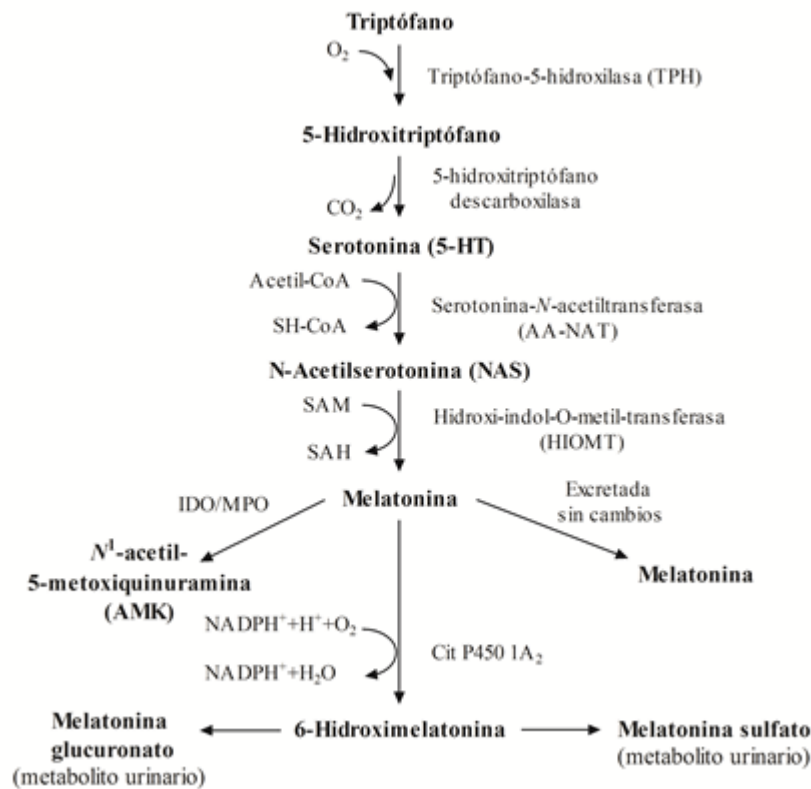


Figura VII. Ruta biosintética de la melatonina a partir del aminoácido triptófano. Acetil-CoA: acetil coenzima A; SH-CoA: coenzima A; SAM: S-adenosil metionina; SAH: S-adenosil homocisteína; IDO: indolamina 2,3-dioxigenasa; MPO: mieloperoxidasa.

La melatonina no se almacena en el lugar de síntesis, sino que se secreta directamente tanto al líquido cefalorraquídeo como al sistema cardiovascular (Reiter y cols., 2010). Además del ritmo diario secretor de esta hormona, aparecen cambios estacionales y circa-anales que la implican como un factor central en la regulación de

los procesos rítmicos (Reiter y cols., 2010). Así, si se invierten las condiciones de luz ambiental se invierten de modo paralelo las actividades enzimáticas y la biosíntesis pineal de la indolamina. Debido a su alto grado de solubilidad en lípidos, una gran cantidad de melatonina se libera a la circulación a medida que se sintetiza, probablemente a través de un mecanismo de difusión pasiva, aunque existen pruebas de la existencia de secreción pulsátil en alguna especie.

La síntesis de este indol no es exclusiva de la glándula pineal, sino que también existe producción de melatonina en la retina y el hipocampo (Cogburn y cols., 1987; Grace y cols., 1991), el cuerpo ciliado del iris (Aimoto y cols., 1985), la glándula lacrimal (Mhatre y cols., 1988), la glándula de Harder (Vakkuri y cols., 1985), el tejido ovárico (Itoh y cols., 1999), las plaquetas (Launay y cols., 1982), las células mononucleares periféricas (Finocchiaro y cols., 1995), las células de la médula ósea (Conti y cols., 2000), el aparato digestivo (Tan y cols., 1999), el sistema inmune (Barriga-Ibars y cols., 2005), y el sistema portal hepático (Huether y cols., 1992). Sin embargo, a diferencia de la melatonina sintetizada en la glándula pineal, la melatonina producida por estos tejidos no pasa a la sangre en cantidades significativas sino que funciona localmente como una señal autocrina o paracrina (Pandi-Perumal y cols., 2006), siendo los niveles tisulares de melatonina cientos de órdenes de magnitud mayores que los sanguíneos (Reiter y Tan, 2003).

La vida media de la melatonina circulante varía entre 20-40 minutos (Boutin y cols., 2005), lo que indica que es una hormona de acción rápida. Transcurrido este tiempo, la mayor parte de la melatonina circulante es inactivada mediante su conversión hepática en 6-hidroxi-melatonina y es excretada en la orina en forma de sulfatos (75%) o glucurónidos (5%) (Alonso, 1999). En la glándula pineal y cerebro también es posible su transformación en quinureninas, en presencia de la indolamina 2,3-dioxigenasa (Hirata y cols., 1974), o su transformación de forma no enzimática mediante la reacción con $\cdot\text{OH}$, $\text{O}_2^{\cdot-}$ o H_2O_2 (Tan y cols., 2000). Entre las quinureninas destacan la N1 acetil-N2-formil-5-metoxi-quinurenamina (AFMK) y la N1-acetil-5-metoxi-quinurenamina (AMK). Estas quinureninas, al igual que la melatonina, presentan importantes efectos como secuestradoras de radicales libres (Reiter y cols., 2008).

1.2.2. Mecanismos de acción

Una de las funciones mejor conocidas de la melatonina es quizás su habilidad de modular los ritmos circadianos y las respuestas estacionales. Sin embargo, numerosas investigaciones han destacado su papel en la regulación de otras muchas funciones fisiológicas y bioquímicas (Pandi-Perumal y cols., 2013). Algunas de estas acciones parecen depender de la potente capacidad antioxidante y secuestradora de radicales libres que posee la melatonina. No obstante, los mecanismos de acción de la melatonina en mamíferos también pueden ser mediados por la interacción de ésta con proteínas intracelulares, como la calmodulina, o por su unión a receptores específicos (Ekmekcioglu, 2006). Por este motivo, tanto los agonistas como los antagonistas de los receptores de melatonina son compuestos muy útiles para definir los múltiples mecanismos mediante los cuales la melatonina regula los procesos fisiológicos y patológicos. Desde 1994, cuando Reppert y colaboradores identificaron por primera vez la expresión de un receptor de alta afinidad para la melatonina en melanocitos de *Xenopus laevis* (Ebisawa y cols., 1994), se han descrito, clonado y estudiado en profundidad distintos receptores de melatonina tanto de membrana como citosólicos y nucleares.

Los receptores MT1 y MT2, anteriormente designados como Mel1a y Mel1b, son dos clases de receptores de membrana plasmática para la melatonina identificados en diversos tejidos humanos (sistema nervioso central, tracto gastrointestinal, intestino, piel, glándula adrenal, gónadas, riñón, corazón, vasos sanguíneos, tejido adiposo, neutrófilos, linfocitos y tejidos linfoides) (Dubocovich y Markowska, 2005). Además, su expresión se ha demostrado en distintas líneas tumorales de diferente origen (Chan y cols., 2002; Ramracheya y cols., 2008). Los receptores MT1 y MT2 pertenecen a una superfamilia de receptores acoplados a proteínas G constituidos por siete dominios transmembrana, que presentan un alto grado de homología en su secuencia de aminoácidos, y que difieren principalmente en su distribución y localización. La activación de estos receptores promueve la disociación de las proteínas G en los dímeros $G\alpha$ y $G\beta\gamma$, e inhibe la enzima adenilato ciclasa, reduciendo de este modo los niveles de adenosín monofosfato cíclico (AMPC) y activando la fosfolipasa C (PLC) (Dubocovich y Markowska, 2005). Asimismo, la activación del receptor MT1 incrementa la fosforilación de MEK1/2 y ERK1/2 (Pala y cols., 2013), potencia la

producción de ATP y prostaglandina F_{2α} (Barrett y cols., 2003), y regula las respuestas funcionales de la melatonina modulando los niveles intracelulares de calcio (Vanecek, 1998). Por su parte, el receptor MT₂ se asocia con la activación de las mismas vías de señalización, aunque parece estar mucho más relacionado con la inhibición del nucleótido guanósín monofosfato cíclico (GMPc) que con la inhibición de AMPc (Dubocovich y Markowska, 2005).

Aparte de los citados receptores de membrana, también se ha identificado un receptor putativo, denominado MT₃, en órganos de hámster. Dicho receptor presenta menor afinidad por la melatonina (rango nanomolar) y una rápida cinética de asociación/disociación (Nosjean y cols., 2000). Además, esta proteína presenta un 95% de homología con la quinona oxidoreductasa 2 (NQO2) humana, una enzima involucrada en la detoxificación de radicales libres, toxinas y metales pesados. No obstante, el papel fisiológico de este receptor MT₃ no se conoce aún por completo (Volkova y cols., 2012).

Debido a su habilidad de cruzar las membranas lipídicas, la melatonina es capaz de alcanzar directamente el núcleo, mediando sus acciones a través de un grupo de receptores nucleares hormonales, llamado ROR/RZR (acrónimo del inglés *Retinoid Orphan Receptors/Retinoid Z Receptors*) (Becker-Andre y cols., 1994). La estructura de esos receptores consiste de un dominio N-terminal, una secuencia de unión a ADN, y una región de unión al ligando en el dominio C-terminal (Becker-Andre y cols., 1994). Los diversos receptores ROR/RZR se distribuyen de un modo diferente dependiendo del subtipo al que pertenecen. Así, el receptor RZRβ se encuentra principalmente en los tejidos neurales, mientras que el receptor RZRα se distribuye más ampliamente y podemos encontrarlo en tejido adiposo, piel, testículos, cartílago, e hígado (Kobayashi y cols., 2003). Aunque la aparente interacción directa de la melatonina con estos receptores nucleares es un tema controvertido, el descubrimiento de una vía de señalización nuclear para la melatonina ha contribuido enormemente a la comprensión de los efectos tan variopintos y profundos que ostenta este indol. Por tanto, la activación de estas vías nucleares puede inducir la unión de la melatonina a regiones específicas de ciertos genes promoviendo de este modo la transcripción de genes diana involucrados en supervivencia, proliferación y diferenciación celular (Sánchez-Barceló y cols., 2003). Además, algunos estudios establecen una correlación entre los receptores nucleares para

la melatonina y las funciones de la melatonina en el sistema inmune (Steinhilber y cols., 1995). De hecho, a través de su interacción con el receptor $ROR\alpha$, la melatonina reprime la expresión de la enzima 5-lipooxigenasa en linfocitos B, una enzima clave en las reacciones alérgicas e inflamatorias (Steinhilber y cols., 1995).

Por otro lado, los mecanismos de acción de la melatonina pueden ser mediados por la interacción de ésta con proteínas intracelulares, como por ejemplo la calmodulina (Benítez-King y cols., 1993). Ésta es una interacción de baja afinidad que permite la regulación de la actividad de algunas proteínas quinasas. Mediante este mecanismo, la melatonina puede inhibir la actividad de la calmodulina quinasa II (Benítez-King y cols., 1996) y de la óxido nítrico sintasa neuronal (nNOS) (Pozo y cols., 1997), así como participar en la regulación del citoesqueleto (Benítez-King y Antón-Tay, 1993), aunque en esta última función también pueden estar involucrados los receptores de membrana (Benítez-King y cols., 2009). Por último, se ha descrito que la calreticulina, una proteína residente del RE que une calcio, parece constituir un sitio de unión de alta afinidad para la melatonina que puede estar involucrado en algunas funciones de la indolamina, incluyendo la regulación genómica (Macías y cols., 2003).

Adicionalmente, la melatonina posee acciones que no dependen de la interacción con sus receptores debido a su capacidad de secuestrar radicales libres y moléculas reactivas relacionadas. El mecanismo por el cual la melatonina detoxifica los radicales libres es la donación de electrones (Tan y cols., 2002). Las acciones relacionadas con su capacidad antioxidante únicamente requiere la proximidad de la melatonina al radical libre en el lugar y el momento en que éste es formado. Moléculas como el ADN nuclear, las proteínas y los lípidos son protegidas del estrés oxidativo gracias a la ubicua distribución de la melatonina. En concreto, se ha demostrado que la melatonina es capaz de neutralizar $\cdot\text{OH}$, anión peroxinitrito (ONOO^-), $\text{NO}\cdot$, singlete de oxígeno ($^1\text{O}_2$), $\text{O}_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , y ácido hipocloroso (HClO). Asimismo, ciertos metabolitos formados tras la interacción de la melatonina con los radicales libres, tales como AFMK y AMK, conservan una alta capacidad antioxidante y secuestradora de radicales libres (Galano y cols., 2013), algo que se conoce como cascada antioxidante de la melatonina (Tan y cols., 2002). Además de estas acciones, la melatonina incrementa la eficiencia del transporte electrónico entre los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial, uno de los principales focos de generación de ERO dentro de la célula, evitando así la

formación de ERO a este nivel (Hardeland, 2005). Adicionalmente, la melatonina actúa indirectamente como antioxidante ya que estimula la actividad de una gran cantidad de enzimas antioxidantes, como la catalasa o la superóxido dismutasa, que convierten los radicales libres en moléculas inocuas (Rodríguez y cols., 2004). Por último, la melatonina estimula la síntesis de glutatión, un importante antioxidante intracelular (Urata y cols., 1999), y presenta también efectos sinérgicos potenciando la capacidad de antioxidantes clásicos, como las vitaminas C y E (Tan y cols., 2013).

1.3. MELATONINA Y APOPTOSIS

La melatonina tiene una naturaleza altamente lipofílica que le permite cruzar las membranas celulares fácilmente y alcanzar cualquier compartimento subcelular, incluyendo la mitocondria. Es interesante el hecho de que esta molécula se acumule en altas concentraciones en la mitocondria (Martín y cols., 2000; León y cols., 2005), y es que parece ser que la mitocondria es un blanco intracelular fundamental para la melatonina. Recientemente se han localizado dos sitios de unión en la mitocondria, uno de ellos de relativa baja afinidad ($IC_{50}=0,8 \mu M$) y está asociado con la inhibición del poro de permeabilidad transitoria, efecto que induce la idea de que la melatonina previene la apoptosis (Andrabi y cols., 2002). El otro sitio de unión es de mucha más afinidad ($IC_{50} = 150 pM$) (Hardeland y Poeggeler, 2007) situado en la rampa anfipática del complejo I, donde modula en gran parte la agrupación hierro-azufre del complejo I (en uno de los puntos principales de liberación de electrones), evitando el cuello de botella que se forma para el flujo de electrones favoreciendo el paso de los mismos. Además, la indolamina modula el flujo en el complejo IV salvaguardando el potencial de membrana e incrementando la producción de ATP (Hardeland y cols., 2008). Esta indolamina tiene la capacidad de interactuar con las bicapas lipídicas estabilizando la membrana mitocondrial interna (García y cols., 1999), efecto que junto con las interacciones con los complejos I y IV podrían explicar, al menos en parte, la mejora de la eficiencia de la cadena de transporte de electrones (Acuña-Castroviejo y cols., 2001). Dicha mejora tanto en condiciones normales, como en condiciones de estrés oxidativo, produce un menor número de ERO, protegiendo a la célula de posibles daños oxidativos en lípido, proteínas y ADN que podrían iniciar los procesos apoptóticos en la célula, tanto activando caspasas, como causando fragmentación de ADN mediante ADNasas. Por otro lado, la disfunción mitocondrial conduce a la pérdida del potencial de membrana mitocondrial, disminución de ATP e iniciación de procesos apoptóticos incluida la apertura del PPT que confiere a la membrana externa la permeabilidad necesaria para las salidas de factores pro-apoptóticos. Petrosillo (Petrosillo y cols., 2009) describe como la melatonina puede proteger la apoptosis de cardiomiocitos tras un episodio de isquemia/reperfusión mediante la inhibición del PPT, además de inhibir la oxidación de cardiolipinas evitando la liberación del citocromo *c* y NAD^+ (Petrosillo y cols., 2009).

Un incremento en apoptosis celular está incluido en la etiopatogenia de ciertas enfermedades. Alzheimer, Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica, anemia aplásica, infarto de miocardio, daños por reperfusión, daño hepático por alcoholismo son, entre otras, afecciones originadas por un exceso de apoptosis en las cuales un aumento nocivo de ERO juega un papel fundamental. Se ha descrito que la melatonina es capaz de prevenir, retardar y/o mermar el desarrollo de estas enfermedades, esto es debido, al menos en parte, a proteger la mitocondria del daño oxidativo y la oxidación de sus componentes, de esta manera se puede explicar además los efectos beneficiosos de esta molécula en fisiopatologías mitocondriales (Paradies y cols., 2010). Espino y cols. (2011b) han demostrado que la melatonina retrasa la apoptosis inducida por estrés reticular debido a incrementos en la $[Ca^{2+}]$ citosólico, sabiendo que los incrementos de $[Ca^{2+}]$ en el citosol tiene una repercusión directa sobre la $[Ca^{2+}]$ mitocondrial, el papel protector de la indolamina es posible que sea desempeñado en la mitocondria de neutrófilos y linfocitos humanos (Espino y cols., 2011b). Adicionalmente, cuando leucocitos humanos tratados con movilizadores de calcio fueron preincubados con melatonina, los eventos apoptóticos que acompañaban el aumento de $[Ca^{2+}]_c$, como activación de Bax, liberación de citocromo c y la consecuente activación de las caspasas 9 y 3, fueron revertidos y se observó una recuperación de la viabilidad celular con respecto a aquellos leucocitos que no fueron pretratados con melatonina (Espino y cols., 2010b).

Por otro lado, diferentes estudios experimentales ponen de manifiesto que la melatonina es capaz de aumentar la señalización de las rutas de supervivencia de la célula, como la expresión de sirtuina 1 y NF-kappaB, además el factor antiapoptótico Bcl-xL o la acetilación de p53, hechos que se vieron aumentados tras el tratamiento con melatonina (Gutierrez-Cuesta y cols., 2008). Se ha observado que la administración de melatonina en ratas con colitis redujo el daño inflamatorio en el colon, debido a la regulación por inhibición de la molécula proinflamatoria NF-kappaB y bloqueo de la degradación de IkappaBalfa (inhibidor de NF-kappaB) (Li y cols., 2005). Evidencias experimentales recientes sugieren que la ruta de la calmodulina y los promotores de supervivencia MAPK (proteínas kinasas activadas por mitógeno) y ERK1/2 (kinasa regulada por señal extracelular) cumplen una función esencial en la protección de la mitocondria (Luchetti y cols., 2010). Aunque los mecanismos que utiliza la melatonina

para llevar a cabo el control de la apoptosis están aún por esclarecer, son cada vez más los efectos que favorecen la viabilidad celular de células sanas.

Durante los tratamientos contra el cáncer, la aplicación de la mayoría de agentes quimioterapéuticos o radiación terapéutica inducen un aumento de la producción de ERO, con el consecuente daño celular y tisular. Está ampliamente documentado que la melatonina protege a las células sanas contra los efectos nocivos de estas terapias (Sainz y cols., 2003b). De tal manera que tratamientos simultáneos con melatonina podrían considerarse para aumentar la tolerancia del paciente a una concentración mayor del agente anticancerígeno, aumentando así la efectividad del tratamiento y disminuyendo daños colaterales.

1.3.1. Efectos anti-apoptóticos de la melatonina

La apoptosis es un mecanismo fisiológico primordial para la homeostasis tisular, de manera que una desregulación del proceso apoptótico puede conducir a desórdenes hiperproliferativos (por una disminución en la tasa de apoptosis), como por ejemplo el cáncer, o hipoproliferativos (por un aumento en la tasa de apoptosis), como son las enfermedades neurodegenerativas y autoinmunes (Thompson, 1995).

Varios estudios han destacado el control que ejerce la melatonina sobre la apoptosis de las células inmunes, lo cual se considera una de las funciones no neurológicas más sorprendentes de esta indolamina (Miller y cols., 2006). Así, por ejemplo, los primeros estudios en esta área revelaron que la melatonina reduce la fragmentación de ADN inducida por glucocorticoides en timocitos en cultivo (Sainz y cols., 1995). El posible mecanismo para explicar el papel inhibitorio de la melatonina en la apoptosis inducida por glucocorticoides parece ser una reducción en los niveles de expresión del receptor de glucocorticoides, tal y como se demostró en timo y timocitos en cultivo (Sainz y cols., 1999). Posteriores estudios señalaron que la melatonina, además de inhibir la fragmentación de ADN, también impide la liberación del citocromo c desde la mitocondria al citoplasma en timocitos de ratón tratados con dexametasona. De hecho, la melatonina puede inhibir la vía mitocondrial de la

apoptosis, presumiblemente a través de la regulación de los niveles de la proteína pro-apoptótica Bax (Hoijsman y cols., 2004).

Aparte de estos estudios, diversos resultados han documentado la capacidad de la melatonina de modular la apoptosis inducida experimentalmente mediante una amplia gama de agentes farmacológicos. Así, la indolamina actúa como agente anti-apoptótico en células inmunes (Sainz y cols., 1995; 1999) y tejidos periféricos (Meki y cols., 2001), y previene la muerte celular neuronal en distintos modelos de párkinson (Chuang y Chen, 2004), alzhéimer (Lahiri y cols., 2004) y daño cerebral por isquemia-reperusión (Cheung, 2003). Los mecanismos mediante los cuales la melatonina inhibe la apoptosis parecen estar relacionados con sus propiedades antioxidantes y como secuestrador de radicales libres. Por ejemplo, la melatonina atenúa el daño por isquemia/reperusión disminuyendo el daño oxidativo mitocondrial mediante la activación de la vía de señalización JAK2/STAT3, la cual está implicada en la prevención del daño miocárdico por isquemia/reperusión (Yang y cols., 2013). Adicionalmente, la melatonina ejerce acciones anti-apoptóticas en células epiteliales de la retina disminuyendo la producción de ERO a nivel de la mitocondria y evitando, en última instancia, daños en el ADN mitocondrial y la liberación del citocromo *c* al citoplasma (Fu y cols., 2012).

El reciente descubrimiento de que las mitocondrias constituyen una diana para la melatonina ha abierto nuevas perspectivas en relación a los mecanismos de acción de la indolamina (Acuña-Castroviejo y cols., 2002). De hecho, la melatonina regula directamente la homeostasis mitocondrial (Martín y cols., 2002), lo cual podría explicar el efecto protector de esta indolamina en desórdenes como el párkinson, el alzhéimer, la epilepsia, la sepsis e, incluso, el envejecimiento; todos ellos debidos a una disfunción mitocondrial como causa primaria o secundaria (Acuña-Castroviejo y cols., 2001). En este sentido, se ha sugerido que los efectos anti-apoptóticos de la melatonina podrían explicarse por una interacción directa de la indolamina con el PPT de la mitocondria (Andrabi y cols., 2004). Además, estudios más minuciosos han puesto de manifiesto que los efectos inhibitorios de la melatonina sobre el PPT están probablemente relacionados con la habilidad de la indolamina de prevenir la peroxidación de la cardiolipina (Peng y cols., 2012), un lípido que se encuentra de forma exclusiva en la MMI y cuya oxidación parece desencadenar la permeabilización de la MME, quizá, a

través de su interacción con proteínas pro-apoptóticas de la familia Bcl-2 (Jiang y cols., 2008).

Por otro lado, diferentes estudios experimentales han revelado que la melatonina es capaz de promover rutas de supervivencia celular como otro mecanismo de modulación del proceso apoptótico. De este modo, se ha sugerido que la melatonina puede ejercer sus efectos citoprotectores a través de diferentes vías dependientes de las quinasas activadas por mitógenos (MAPK). Por ejemplo, se ha observado que la activación de la ruta de supervivencia Raf/MEK/ERK es necesaria para que la melatonina contrarreste la apoptosis inducida por luz ultravioleta en células inmunes (Luchetti y cols., 2009; 2010) o por H₂O₂ exógena en espermatozoides humanos (Espino y cols., 2010a; 2011a). Igualmente, las propiedades neuroprotectoras de la melatonina en cultivos primarios de astrocitos son mediadas a través de la activación de la vía de señalización de PI3K/Akt (Kong y cols., 2008). Además, el papel neuroprotector de la indolamina también parece estar relacionado con la activación de la ruta de las sirtuinas, desacetilasas de histonas involucradas en vías de supervivencia y protección celular (Tajes Orduña y cols., 2009). Finalmente, se ha observado que la administración de melatonina reduce el daño inflamatorio en ratas con colitis inhibiendo la activación de NF- κ B (Li y cols., 2005), así como en ratas con una pancreatitis aguda inducida por ceruleína (Carrasco y cols., 2013).

1.3.2. Efectos pro-apoptóticos de la melatonina

Durante la primera parte del siglo XX Engel y Bergmann (Engel, 1935; Bergmann y Engel, 1950), así como Hofstätter (1959) realizaron estudios pioneros tanto experimentales como clínicos en Viena abordando la capacidad antineoplásica de la glándula pineal bovina. Tras el descubrimiento de la melatonina por Lerner en 1958 estos resultados estaban ya casi olvidados. Vera Lapin en los años setenta los redescubrió, trabajando en el Centro de Investigación del Cáncer de Viena, revisó el tema glándula pineal y cáncer (Lapin, 1976) y llevó a cabo importantes estudios experimentales (Lapin y Ebels, 1976). Además Lapin (1981) organizó el primer workshop que relacionaba glándula pineal y cáncer. Allí, a través de los datos procedentes de diferentes autores se pudo concluir que el papel del indol pineal

melatonina era muy importante con respecto a la incidencia del desarrollo de tumores (Lapin y Ebels, 1981). Una conclusión central de los estudios de Lapin fue que la pinealectomía estimula el crecimiento del tumor primario y la formación de metástasis lo que conduce a la reducción de supervivencia (Lapin, 1974). Tal hallazgo estaba de acuerdo con las observaciones de otros investigadores, incluso con las de Bindoni (1971) quien observó que la pinealectomía estimula la división celular de los tejidos normales. Se planteó la cuestión general de cómo este efecto antiproliferativo de la glándula pineal puede ser explicado, y si se debe principalmente a la hormona pineal melatonina o no. Sin embargo, los mecanismos por los que la melatonina inhibe el crecimiento tumoral o induce apoptosis en células tumorales no han sido aún totalmente esclarecidos. Hoy se sigue investigando en la misma línea, evidencias experimentales muestran que el papel que desempeña la melatonina es de suma relevancia, ya que se ha observado que los pacientes con cáncer presentan niveles reducidos de melatonina en sangre (Bartsch y Bartsch, 1999).

El crecimiento tumoral debe ser visto como el resultado del desbalance entre la proliferación y la muerte celular. De este modo, tanto la modulación del ciclo celular como la inducción de la apoptosis son dos factores a tener en cuenta en el control del crecimiento del tumor (Mediavilla y cols., 2010). En contraste con la capacidad antiapoptótica en células no tumorales, la melatonina tiene un comportamiento muy diferente en células cancerosas, debido a que la melatonina induce apoptosis en una amplia variedad de células tumorales a través de diferentes mecanismos de señalización celular que comentaremos a continuación.

En células tumorales, la melatonina presenta dos efectos principales: inhibición de la proliferación celular y activación de la apoptosis. Aunque en determinados tipos de cáncer la melatonina puede producir ambos efectos, se asume de manera general que la melatonina, a bajas concentraciones (en el rango nanomolar y normalmente referidas como concentraciones “fisiológicas”), sólo podría ejercer una acción citostática; mientras que los efectos apoptóticos se observan a menudo a concentraciones más elevadas (Bizarri y cols., 2013; Rodríguez y cols., 2013).

Las bajas concentraciones de melatonina pueden inhibir de manera efectiva el crecimiento celular en un amplio rango de líneas celulares, aunque también se han

documentado algunas excepciones. Además, algunas líneas tumorales presentan baja o nula sensibilidad a concentraciones de melatonina en el rango nanomolar, mientras que la misma línea celular responde a mayores concentraciones de la indolamina reduciendo su tasa de proliferación. Así, tumores de próstata tanto sensibles (LNCaP) como insensibles (PC3) a andrógenos no responden a concentraciones de melatonina en el rango nanomolar, pero concentraciones milimolar inducen una significativa inhibición del crecimiento (Sainz y cols., 2005). Un patrón similar se ha demostrado para la línea celular de glioma de rata C6 (Martín y cols., 2006), para las células de glioblastoma humano A172 (Sánchez-Sánchez y cols., 2011), así como para el cáncer de ovario de hámster chino (Sainz y cols., 2003a) o el cáncer de colon (Farriol y cols., 2000).

De manera general, el efecto citotóxico de la melatonina a concentraciones del rango milimolar se ha observado tan sólo en un conjunto restringido de líneas tumorales. Sin embargo, este comportamiento no puede ser tomado como una regla, dado que la apoptosis puede ser inducida a concentraciones de melatonina en el rango nanomolar en líneas tumorales que previamente habían sido consideradas como insensibles a las bajas concentraciones de melatonina. De hecho, se ha demostrado que la melatonina, a bajas concentraciones (10^{-9} M), puede reducir de manera efectiva la viabilidad de células de cáncer de mama (MCF-7), activando una respuesta apoptótica bifásica (Proietti y cols., 2011). Asimismo, Jung-Hynes y colaboradores descubrieron que la melatonina, a través de la inhibición de la sirtuina-1, causa una reducción sustancial de la viabilidad de células de cáncer de próstata, tanto *in vivo* como *in vitro*, incluso a bajas concentraciones de la indolamina (Jung-Hynes y cols., 2011). Estos resultados son de suma importancia, puesto que proporcionan una base convincente para explicar los efectos antineoplásicos ejercidos *in vivo* por la melatonina a concentraciones fisiológicas, tal y como se ha recogido mediante estudios clínicos (Vijayalaxmi y cols., 2002) y epidemiológicos (Davis y Mirick, 2006).

A pesar de que la inhibición del crecimiento de células tumorales por parte de la melatonina es un fenómeno bastante aceptado, los mecanismos que regulan la apoptosis dependiente de melatonina en el cáncer aún deben ser esclarecidos. No obstante, las evidencias acerca de las vías de muerte activadas por la melatonina están aumentando notablemente en la actualidad (Rodríguez y cols., 2013). En relación a los diferentes cánceres hematológicos, la melatonina induce apoptosis en células de linfoma de Burkitt

mediante un mecanismo que implica la activación de caspasa-3, liberación del citocromo *c*, y desregulación de la proteína anti-apoptótica Bcl-2 (Trubiani y cols., 2005). Un efecto similar se ha observado en células de leucemia mieloide aguda tratadas con melatonina. En este caso particular, la indolamina incrementa significativamente la apoptosis, lo cual está asociado con una elevada liberación de citocromo *c*, activación de caspasas (-3 y -9) y Bax, así como una reducida expresión de Bcl-2 (Bejarano y cols., 2009). Por otro lado, Casado-Zapico y colaboradores (2011) llevaron a cabo un estudio con una amplia gama de tumores hematológicos (linfoma, leucemia mieloide aguda y crónica, y leucemia linfocítica aguda). En estas células, la melatonina causa un pronunciado aumento en la activación de la caspasa-8 y su sustrato molecular, la proteína pro-apoptótica Bid, que además está relacionado con un aumento paralelo en la expresión del receptor Fas y su ligando, Fas L. Todo esto sugiere que la vía extrínseca se activa de manera preferente durante la muerte celular inducida por la melatonina, al menos en determinados cánceres hematológicos (Casado-Zapico y cols., 2011). No obstante, estudios más recientes han observado que la melatonina induce apoptosis en células leucémicas Molt-3 mediante la activación de la vía intrínseca, sin participación de la caspasa-2, la caspasa-8 o la proteína Bid (Perdomo y cols., 2013). Además, Sánchez-Hidalgo y colaboradores han referido que la melatonina provoca un bloqueo en la fase G1 del ciclo celular y una reducción simultánea en la proporción de células en las fases S y G2/M, así como un aumento sustancial en la tasa de apoptosis a través de la activación de la caspasa-3 y el consiguiente procesamiento de la poli ADP ribosa polimerasa (PARP) en una amplia gama de tumores hematológicos (Sánchez-Hidalgo y cols., 2012).

Por otro lado, los efectos antitumorales de la melatonina se han descrito en tumores mamarios los cuales presentan mutado el receptor de estrógenos. De este modo, se ha observado que la melatonina, a concentraciones del rango nanomolar, induce una respuesta apoptótica bifásica en células MCF-7 (Cucina y cols., 2009). La apoptosis temprana inducida por la indolamina es un proceso independiente de caspasas fundamentalmente activado por la proteína AIF. Por el contrario, la apoptosis tardía (inducida tras 96 horas de tratamiento con melatonina) es el resultado de una vía de señalización más compleja, que implica una desregulación en el ratio Bcl-2/Bax así como la activación de caspasas (-9 y -7) y el consiguiente procesamiento de PARP.

Además, parece ser que la proteína p53 se activa durante la apoptosis temprana inducida por la melatonina, mientras que la proteína p73, el homólogo de p53, está involucrado en la apoptosis tardía dependiente de caspasas. Aparte de esto, investigaciones recientes indican que la indolamina también muestra propiedades pro-apoptóticas en líneas celulares de cáncer de mama insensibles a estrógenos (Wang y cols., 2012). De hecho, en células MDA-MB-231 (negativas para el receptor de estrógenos), las dosis farmacológicas de melatonina inhiben significativamente la expresión de la ciclooxigenasa-2 (COX-2) y la producción de prostaglandina E2, reducen drásticamente la actividad histona acetiltransferasa del cofactor p300 y la acetilación mediada por p300 del factor nuclear NF- κ B y, por tanto, bloquean la unión y reclutamiento de NF- κ B al promotor de COX-2. Asimismo, la melatonina inhibe marcadamente la fosforilación de las proteínas PI3K, Akt y la glucógeno sintasa quinasa-3 (GSK-3), inactivando de este modo la vía de señalización fosfoinositol 3-quinasa (PI3K)/Akt. En última instancia, la melatonina desencadena la activación de Apaf-1 y la consiguiente cascada de caspasas (Wang y cols., 2012).

En cuanto al cáncer de próstata, se ha demostrado que la indolamina activa el receptor MT1 para inhibir la proliferación de las células 22Rv1 (insensibles a andrógenos) mediante la sobreexpresión de la proteína p27Kip1, un inhibidor de ciclinas dependientes de quinasas implicado en la regulación del ciclo celular, a través de la activación simultánea de las vías de señalización de PKA (*Protein Kinase A*) y PKC (*Protein kinase C*) (Tam y cols., 2007). La estimulación de la apoptosis por acción de la melatonina también ha sido descrita en células de cáncer de próstata sensibles a andrógenos (LNCaP), lo cual implica la activación de la caspasa-8 y la reducción en el ratio Bcl-2/Bax (Kim y Yoo, 2010). En relación al cáncer de hígado, es muy probable que los efectos pro-apoptóticos de la melatonina estén mediados por diferentes vías de señalización, incluyendo la regulación positiva del factor de transcripción FoxO3A que induce la activación de la proteína pro-apoptótica Bim (Carbajo-Pescador y cols., 2012), la inhibición de la expresión de COX-2, la reducción de los niveles de Bcl-2, o la elevación de los niveles del factor de transcripción pro-apoptótico CHOP (Zha y cols., 2012). Distintos estudios han evaluado el papel de la melatonina como inductor de apoptosis en cánceres de páncreas experimentales. Leja-Szpak y colaboradores (2010) encontraron que la indolamina, a concentraciones

fisiológicas, presentaba acciones pro-apoptóticas en las células de cáncer de páncreas humano PANC-1 mediante la modulación del ratio Bcl-2/Bax y la activación de la caspasa-9. En contraposición, González y colaboradores (2011) describieron que la melatonina, a dosis en el rango milimolar, actuaba como inductor de apoptosis mediante una activación de la caspasa-3 dependiente de calcio en células de cáncer de páncreas de rata AR42J. Por último, en osteosarcoma, la melatonina incrementa la acetilación de la proteína p53 mediante la regulación negativa de la sirtuina-1. La acetilación de p53 evita su degradación proteasomal y activa la vía intrínseca de la apoptosis aumentando la expresión de Bax y citocromo *c*, y reduciendo los niveles de Bcl-2 (Cheng y cols., 2013).

Finalmente, puesto que la melatonina a altas concentraciones presenta propiedades antioxidantes, varios trabajos de investigación han intentado establecer una relación entre el efecto pro-apoptótico de la indolamina en células tumorales y el estado oxidativo de la célula. Frente a lo esperado, se observó un aumento temprano en el estrés oxidativo en aquellas células cancerosas donde la melatonina es capaz de inducir apoptosis, además del aumento tardío de oxidantes intracelulares asociado al proceso apoptótico en sí mismo. Así, Osseni y colaboradores determinaron que tan sólo 45 minutos después del tratamiento con melatonina (concentraciones superiores a 100 μM) se produjo un incremento en la producción de ERO y un descenso simultáneo en la viabilidad de células HepG2 (Osseni y cols., 2000). Por su parte, Buyukavci y colaboradores encontraron una correlación entre el incremento en la producción de ERO y la inducción de apoptosis por acción de la melatonina en varias líneas de cánceres hematológicos (Buyukavci y cols., 2006). También usando células leucémicas (HL-60 y K562), Bejarano y colaboradores observaron que el aumento en la generación de ERO dos horas después del tratamiento con melatonina (1 mM) se correspondía con el descenso en la viabilidad celular y la activación de la caspasa-9 y la caspasa-3. Todos estos cambios fueron prevenidos por antioxidantes como el trolox, la catalasa, el glutatión o la N-acetilcisteína (Bejarano y cols., 2011b)

1.4. QUIMIOTERÁPICOS

1.4.1. Cisplatino

El cisplatino es un fármaco de quimioterapia tumoral ("antineoplásico" o "citotóxico") que se usa para tratar el cáncer testicular, ovárico, vesical, esofágico, pulmonar, de mama, cervical, de estómago y próstata.

En 1965, Barnett Rosenberg, en una investigación llevada a cabo en la Universidad Estatal de Michigan, descubrió que un campo eléctrico producido con electrodos de platino (Pt) podía producir la inhibición de la división celular e inducir el crecimiento en filamentos en *Escherichia coli*. Aunque el crecimiento de la bacteria continuaba, la división celular disminuía considerablemente (Rosenberg, 1965). Por otra parte, Rosenberg pensó que no todas las variables eran el campo eléctrico, y lo que provocaba la inhibición del crecimiento podría ser un producto químico en el medio que era producido por el campo eléctrico. Descubrió que la electrolisis de los electrodos de Pt generaban un complejo que inhibía la fisión binaria de *Escherichia coli*. Aisló el complejo de Pt y reveló que necesitaba los iones de amonio, debido a que son necesarios para que la estructura del cisplatino esté completa, el cisplatino necesita restos de N ya que bioactivan los cationes. Con este descubrimiento se completó la estructura del cisplatino compuesto de coordinación de platino, concretamente, el cis-diamindicloroplatino (II) [PtCl₂(NH₃)₂] (Figura VIII).

Posteriormente, observó que este complejo era muy efectivo en la regresión de los sarcomas en ratas (Rosenberg, 1969). Además, el cisplatino ha sido aprobado para el tratamiento de cáncer de testículo y ovario por la Food and Drug Administration© en Estados Unidos el 19 de Diciembre de 1978 (Trzaska, 2005).

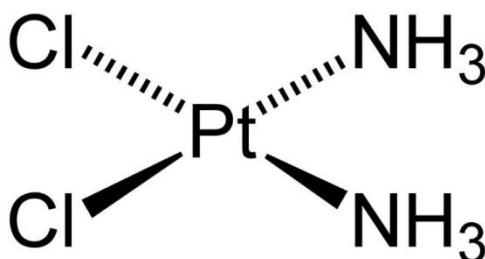


Figura VIII. Estructura química del cisplatino.

El cisplatino se inyecta vía intravenosa, y una vez en el suero sanguíneo, parte del cisplatino es absorbido por algunas proteínas, sobre todo, las que tienen grupos tioles, como por ejemplo la cisteína. El cisplatino entra en las células del tumor por difusión a través de la membrana celular. La concentración de Cl^- intracelular es muy baja, con lo cual, uno de los átomos de cloro del cisplatino se reemplaza por una molécula de agua, formando el catión $[\text{Pt}(\text{H}_2\text{O})(\text{NH}_3)_2\text{Cl}]^+$; haciendo que al estar cargada positivamente no pueda salir de la célula (Trzaska, 2005). Este catión es el que reacciona con una de las bases del ADN, formando enlaces cruzados intra o intercatenarios en el ADN, denominados aductos de cisplatino-ADN, que modifican estructuralmente la hélice, de tal forma que impiden la replicación y transcripción (Jamieson y cols., 1999). La mayoría de estos aductos de cisplatino son enlaces cruzados intracatenarios y surgen de un ataque nucleofílico del quimioterápico al N7 del anillo imidazol de dos bases púricas adyacentes, sobre todo de guaninas (Reedijk y cols., 1999).

Se ha analizado la composición de los aductos de cisplatino (Figura VIII) en una línea linfocitaria y resultó que en torno a un 65% eran aductos intracatenarios Guanina(G)-G entre dos guaninas adyacentes; sobre un 22% de enlaces cruzados intracatenarios Adenina(A)-G entre adenina y guanina; un 10% eran intracatenarios G-(N)-G entre dos guaninas no adyacentes y enlaces intercatenarios entre dos guaninas en cadenas opuestas, y un 2-3% correspondían a un monoadducto o aducto monofuncional de G (Jamieson y cols., 1999; Kartalou y Essigmann, 2001).

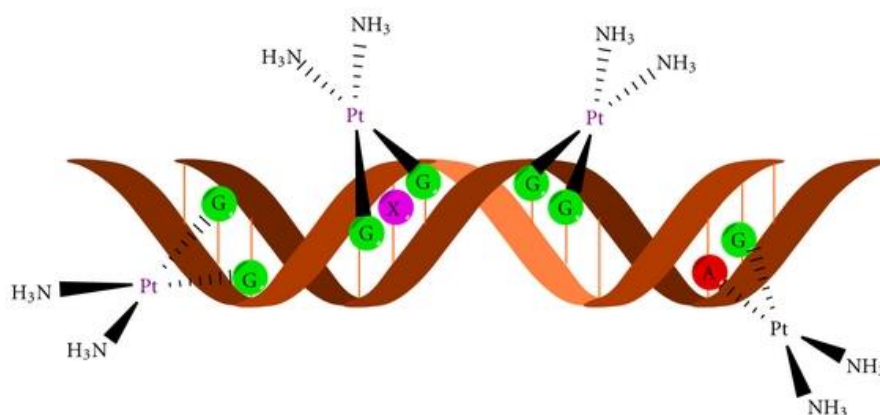


Figura IX. Representación gráfica de los aductos de ADN formados por el cisplatino.

Aunque el cisplatino también puede dar lugar a enlaces cruzados con proteínas, se demostró que son los aductos bifuncionales con el ADN los que generan citotoxicidad, en concreto son los enlaces cruzados intracatenarios G-G que forma en el ADN los que le confieren especialmente sus propiedades antitumorales (Jamieson y cols., 1999; Kartalou y Essigmann, 2001). Concretamente, estos aductos provocan un desplegamiento del ADN, que se inclina en la dirección del surco mayor (Pilch y cols., 2000). Se llegó a la conclusión de que todo esto provoca la inhibición de la replicación del ADN (Jamieson y cols., 1999), de lo cual deriva su poder citostático, especialmente en células tumorales, impidiendo la continua síntesis de ADN, necesaria para el crecimiento tumoral. Como consecuencia de lo anterior, el cisplatino termina causando apoptosis (Barckhausen y cols., 2013).

Recientemente, se ha demostrado que la apoptosis inducida por el cisplatino en las células del cáncer de colon humano depende de la serina-proteasa mitocondrial Omi/Htra2 (Pruefer y cols., 2008). Este funcionamiento sólo explica el comportamiento de las células del cáncer de colon, por lo que se desconoce si la proteína Omi/Htra2 participa en la apoptosis inducida por el cisplatino en los cánceres de otros tejidos.

1.4.2. Citarabina

La arabinosilcitosina o citarabina es un fármaco antineoplásico antimetabolito análogo de la pirimidina (Figura X). Es uno de los principales fármacos utilizados en el tratamiento de la leucemia mieloide aguda y otros linfomas desde hace más de tres décadas (Wang y cols., 1997). Asimismo, se encuentra actualmente en estudio para el tratamiento de otros tipos de cáncer, como el cáncer ovárico (Fernando y cols., 1998).

La citarabina es un agente antineoplásico específico que inhibe el ciclo celular, afectando sólo a las células durante la fase S de la división celular. La incorporación de la citarabina a la célula depende de su concentración plasmática (Rustum y Raymakers, 1992). En el interior de la célula, la citarabina es convertida en el metabolito activo, citarabina-5-trifosfato (ara-CTP), mediante la fosforilación por una quinasa dependiente de ciclina (cDK) (Plunkett y cols., 1987). Se cree que la citotoxicidad de ara-CTP es el resultado de una combinación de la inhibición de la ADN polimerasa y de

la incorporación de ara-CTP en el ADN, en competencia con desoxicitidina trifosfato (dCTP). Concentraciones celulares altas sostenidas de ara-CTP favorecen la incorporación del fármaco en la replicación de ADN, iniciando de este modo la muerte celular en células leucémicas (Major y cols., 1981; Gunji y cols., 1991).

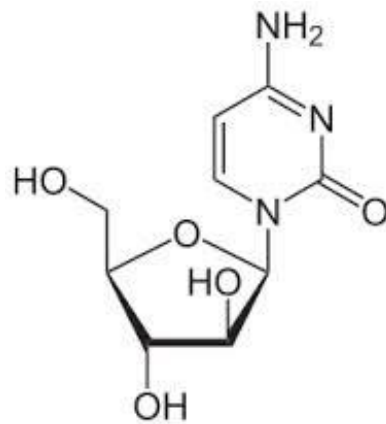


Figura X. Estructura química de la citarabina.

1.4.3. 5-Fluorouracilo

El fluoruracilo (5-FU) es una pirimidina fluorada que pertenece a la clase de los antimetabolitos antineoplásicos. Difiere del uracilo en un átomo de flúor añadido en la posición 5 (Figura XI). Desde hace muchos años, el 5-fluoruracilo se utiliza en combinación con otros fármacos en el tratamiento de muchos tumores sólidos, incluyendo los tumores de mama y cáncer colorectal. La toxicidad y eficacia del fluoruracilo depende de la forma de administración, siendo muy alta la variabilidad entre pacientes, y la vía y forma de administración.

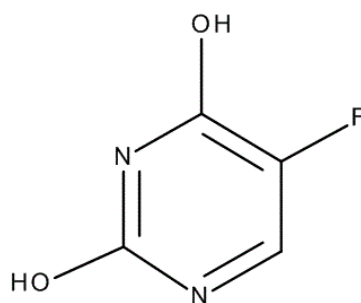


Figura XI. Estructura química del 5-fluorouracilo.

El 5-fluorouracilo es un antimetabolito que inhibe la timidilato sintasa y, por lo tanto, interfiere en la síntesis del ADN y, en cierto grado, en la formación del ARN. En cuanto a los efectos sobre el ADN, el 5-fluorouracilo puede ser transformado a fluorodeoxiuridina mediante la acción de la timidina fosforilasa y luego a fluorodeoxiuridina monofosfato a través de la timidina quinasa. Esta última es capaz de formar un enlace covalente con la timidilato sintasa, bloqueando la acción de la enzima y, por consiguiente, la síntesis de timidilato a partir de uracilo (Longley y cols., 2003). Además, tanto la fluorodeoxiuridina monofosfato como la fluorodeoxiuridina difosfato pueden ser convertidas a fluorodeoxiuridina que puede ser incorporada al ADN mediante la ADN polimerasa en lugar de la timidina trifosfato, ocasionando un ADN aberrante y, por tanto, activando la muerte celular (Figura XII).

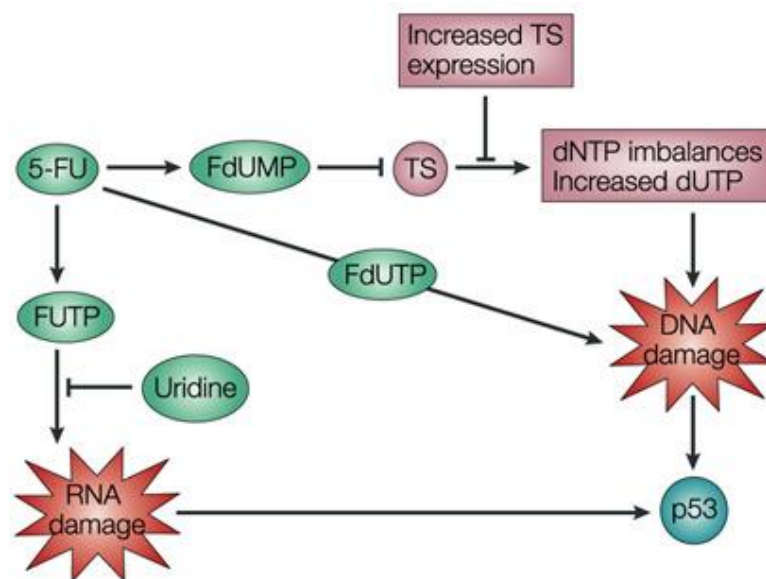


Figura XII. Representación esquemática del mecanismo de acción del 5-fluorouracilo (Longley y cols., 2003).

En cuanto a la citotoxicidad, durante las primeras 24 h de exposición al 5-fluorouracilo, se observa una citotoxicidad en la fase S del ciclo celular, probablemente debida a los efectos del fármaco sobre el DNA. A las 24 horas, la citotoxicidad tiene lugar en la fase G-1, probablemente a consecuencia de la incorporación del 5-FU en el RNA. La selectividad del 5-fluorouracilo hacia las células en división rápida se debe a que las concentraciones de timidilato sintasa son 20 veces mayores en las células en división que en las células no proliferantes.

1.4.4. Etopósido

El etopósido, también conocido como VP-16, es una podofilina semisintética derivada de la planta de podofilo *Podophyllum notatum*. Es un medicamento que se usa para el cáncer testicular, de vejiga, de próstata, de pulmón, de estómago y de útero, por su capacidad de inhibir la multiplicación de las células tumorales. El etopósido se incluye dentro del grupo de las epipodofilotoxinas y presenta la siguiente fórmula química $C_{29}H_{32}O_{13}$ (Figura XIII).

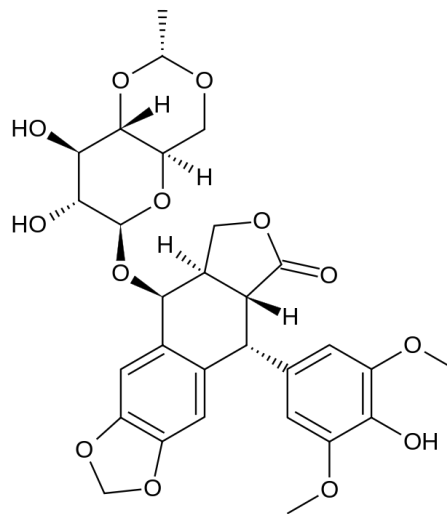


Figura XIII. Estructura química del etopósido.

El etopósido actúa inhibiendo la acción de la enzima denominada topoisomerasa II, la cual cumple diversas funciones en el núcleo celular: media el manejo y mantenimiento de la topología de la cromatina; e interviene en la transcripción génica, replicación, recombinación y segregación cromosómica (Wang, 1985). Esta enzima tiene la capacidad normal de cortar la doble cadena del ADN, pasar una hebra a través de la otra para relajar la molécula y de nuevo sellar dicha ruptura. El etopósido es un agente intercalante que se une directamente a la topoisomerasa II, estabilizando el complejo y atrapando a la enzima sobre el ADN. Esto impide que la enzima revierta los cortes en la molécula del ADN, con lo que conlleva a la muerte celular (Hande, 1998).

1.4.5. Doxorrubicina

La doxorrubicina (nombre comercial adriamicina) es un antibiótico de la familia de las antraciclinas, ampliamente utilizado en la quimioterapia del cáncer de mama, ovárico, testicular, de pulmón, leucemia aguda y sarcoma de tejidos. El primer antibiótico de la serie fue la daunorrubicina, obtenido de *Streptomyces peucetius*. Posteriormente, se obtuvo su derivado 14-hidroxilado, la doxorrubicina (adriamicina), y otros: epirrubicina (farmorrubicina), e idarrubicina (zavedos). Todos ellos están constituidos por una estructura tetracíclica cromófora unida por un enlace glucosídico a un aminoazúcar, la daunosamina (Figura XIV).

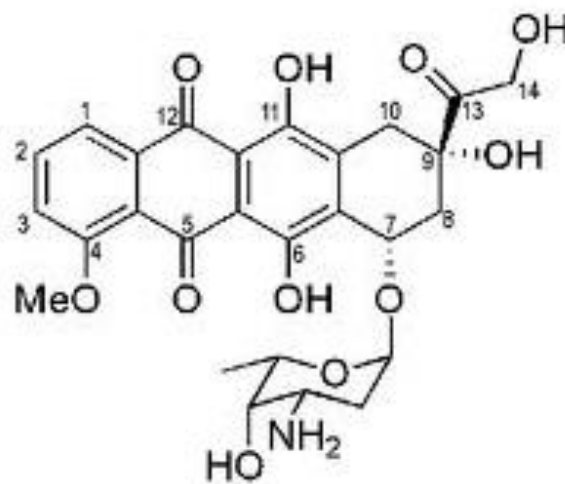


Figura XIV. Estructura química de la doxorrubicina.

El mecanismo de acción de la doxorrubicina es complejo y aún no está plenamente esclarecido, aunque se piensa que actúa mediante intercalación en el ADN (Tacar y cols., 2013). La doxorrubicina forma complejos con el ADN por intercalación entre los pares de bases, provocando el cambio de forma en la doble hélice. Este cambio en la conformación del ADN puede interferir con el avance de la polimerasa durante la replicación, provocando la inhibición de la misma; pudiendo también inhibir la síntesis de proteínas debido a los mismos efectos sobre la ARN polimerasa. En este sentido, se ha determinado que la doxorrubicina estabiliza el complejo topoisomerasa II-ADN, evitando que se libere la doble hélice y deteniendo así el proceso de replicación (Pommier y cols., 2010). Concretamente, La porción cromófora aromática planar de la molécula se intercala entre dos pares de bases consecutivas del ADN, en tanto que el

azúcar daunosamina se asienta en el surco menor, interactuando con los pares de bases situados a ambos lados del lugar donde se intercala, tal y como ha puesto de manifiesto la estructura cristalina (Frederick y cols., 1990).

Por otro lado, la doxorubicina también sufre la reducción de un electrón de oxígeno para formar radicales libres intermedios. Dichos radicales pueden inducir peroxidación lipídica de membranas celulares, escisión en la cadena de ADN y oxidación directa de bases púricas o pirimidínicas, tioles y aminas.

2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

La apoptosis, también conocida como “muerte celular programada”, es un mecanismo fisiológico regulado genéticamente a través del cual la célula induce su propia muerte. Este modo de muerte celular constituye un mecanismo primordial para la homeostasis tisular, el desarrollo de órganos y la eliminación de células aberrantes. Además, este proceso de “suicidio celular” tiene un papel crucial en el desarrollo y función del sistema inmune, así como en determinadas situaciones patológicas, como en la protección antitumoral.

Tradicionalmente, se han descrito dos vías generales en el proceso apoptótico. Una es conocida como vía extrínseca y se activa por la unión de un ligando de muerte extracelular, como puede ser FasL, a su receptor de muerte en la superficie celular, como es el receptor Fas (Ashkenazi y Dixit, 1998). La segunda vía se conoce como vía intrínseca y está mediada por alteraciones mitocondriales. Así, en respuesta a estímulos apoptóticos, diferentes proteínas son liberadas desde el espacio intermembrana de la mitocondria al citoplasma (Green y Reed, 1998). Entre las proteínas mejor caracterizadas se encuentra el citocromo *c*, involucrado en la activación de la caspasa-9 (Li y cols., 1997), lo cual dispara una cascada de activación de caspasas que incluye la caspasa-3 que, a su vez, promueve la autodestrucción de la célula.

La melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) es un indol de bajo peso molecular presente de manera ubicua en todos los organismos vivos, siendo el principal producto secretor de la glándula pineal. La melatonina es una molécula pleiotrópica y coordina múltiples funciones corporales, tales como la reproducción, la hibernación, el sueño, la termorregulación o la inmunomodulación. Es un potente secuestrador de radicales libres y en los últimos años, se ha puesto de manifiesto su acción antitumoral frente a su efecto protector en células sanas.

En términos de función inmune, el papel de la melatonina como inmunomodulador es ampliamente conocido (Rodríguez y cols., 1999; 2005; Barriga-Ibars y cols., 2005). Algunos resultados indican que la denominada vía intrínseca de la apoptosis podría representar la diana principal de la melatonina para modular el proceso apoptótico en células sanas (Radogna y cols., 2008; Espino y cols., 2010b), así como en modelos *in vivo* (Feng y Zhang, 2004; Acuña-Castroviejo y cols., 2007). De hecho, existen numerosas evidencias experimentales que establecen una relación entre la

melatonina y la mitocondria, incluyendo las propiedades anti-apoptóticas de la indolamina a través de su interacción con el poro de permeabilidad transitoria mitocondrial (Andrabi y cols., 2004; Jou, 2011). No obstante, la melatonina también puede ejercer sus acciones anti-apoptóticas mediante la interacción con sus receptores específicos, incluyendo los receptores de membrana MT1 y MT2 (Das y cols., 2010; Espino y cols., 2011a).

Sin embargo, en los últimos años, el interés por la melatonina ha crecido enormemente debido a su influencia sobre el proceso apoptótico en células tumorales. En este sentido, varios estudios han informado que la melatonina puede ser un candidato excelente como agente anticancerígeno o como terapia combinada debido a su actividad pro-oxidante, oncostática, y pro-apoptótica en las células tumorales (Reiter y cols., 2002). El papel pro-apoptótico ha sido evidenciado en diversos tipos de cáncer tales como el de páncreas, de hígado, cáncer de próstata y en leucemia (Bejarano y cols., 2009; 2010; 2011a; Joo y Yoo, 2009; Fan y cols., 2010; Leja-Szpak y cols., 2010; Uguz y cols., 2012), contrasta claramente con las acciones anti-apoptóticas en células normales (Espino y cols., 2010b; 2011b; 2011c). Todo ello podría indicar que la melatonina reiniciara un programa apoptótico sustituyéndolo por el de un crecimiento incontrolado en las células tumorales, lo cual supone un uso potencial de la melatonina en la muerte de células tumorales preservando así la función celular en células normales.

La quimioterapia es una de las modalidades terapéuticas más empleadas en el tratamiento del cáncer, que engloba a una gran variedad de fármacos. Su objetivo es destruir las células que componen el tumor, con el fin de lograr la reducción de la enfermedad. A los fármacos empleados en este tipo de tratamiento se les denomina fármacos antineoplásicos o quimioterápicos. Estos fármacos llegan prácticamente a todos los tejidos del organismo, y ahí es donde ejercen su acción, tanto sobre las células malignas como sobre las sanas. Debido a la acción de los quimioterápicos sobre estas últimas, pueden aparecer una serie de síntomas, más o menos intensos y generalmente transitorios, denominados efectos secundarios. En general, la quimioterapia actúa en la fase de división de la célula tumoral impidiendo su multiplicación, y destruyéndolas. Con el tiempo, esto se traduce en una disminución o desaparición del tumor maligno.

Por lo tanto, sería conveniente evaluar si la melatonina puede aumentar la eficacia de la quimioterapia en términos tanto de la tasa de regresión tumoral como del tiempo de supervivencia.

Conforme a lo expuesto anteriormente, el **Objetivo General** de la presente Tesis Doctoral ha sido estudiar los mecanismos implicados en las propiedades pro-apoptóticas de la melatonina en células tumorales humanas, como son la línea celular HeLa de cáncer cérvico-uterino así como en la línea celular HT-29 de adenocarcinoma colorrectal, valorando la participación de los receptores de membrana de la melatonina en dichos mecanismos, así como los posibles efectos de la indolamina sobre la acción de agentes quimioterápicos.

Este Objetivo General ha sido desglosado a su vez en los siguientes **Objetivos Específicos**:

1. Evaluar el efecto *in vitro* de la melatonina sobre las acciones citotóxicas y pro-apoptóticas de diversos agentes quimioterapéuticos en células HeLa de cáncer cervical humano.
2. Determinar si la melatonina puede aumentar la respuesta de las células de adenocarcinoma de colon humano HT-29 al tratamiento con quimioterapia *in vitro*.
3. Investigar la implicación de los receptores de melatonina en los tratamientos de la indolamina como coadyuvante junto con agentes quimioterápicos en las líneas tumorales humanas HeLa y HT-29.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. LISTA DE REACTIVOS

Los reactivos empleados en la realización de los experimentos son agrupados a continuación, según las características o la función que presentan en común.

3.1.1. Líneas celulares y medios de cultivo

- Línea celular HeLa (European Collection of Cell Cultures, ECACC; Salisbury, Reino Unido)
- Línea celular HT-29 (European Collection of Cell Cultures, ECACC; Salisbury, Reino Unido)
- Medio RPMI-1640 (Lonza Ibérica S.A.U., Barcelona, España)
- Medio DMEM (Lonza Ibérica S.A.U., Barcelona, España)
- Albumina de suero bovino (Lonza Ibérica S.A.U., Barcelona, España)
- Estreptomicina/Penicilina (Lonza Ibérica S.A.U., Barcelona, España)
- L-Glutamina (Lonza Ibérica S.A.U., Barcelona, España)
- Piruvato sódico (Lonza Ibérica S.A.U., Barcelona, España)
- Tripsina-EDTA (Lonza Ibérica S.A.U., Barcelona, España)

3.1.2. Quimioterápicos

- Citarabina (Sigma Aldrich S.A., Madrid, España)
- Cisplatino (Sigma Aldrich S.A., Madrid, España)
- Doxorubicina (Sigma Aldrich S.A., Madrid, España)
- Etopósido (Sigma Aldrich S.A., Madrid, España)
- 5-Fluorouracilo (Sigma Aldrich S.A., Madrid, España)

3.1.3. Fluoróforos

- 2',7'-Diclorodihidrofluoresceína diacetato (DCFH; Life Technologies, Barcelona, España)
- Anexina V-FITC Apoptosis, kit de detección (eBioscience Dx, Barcelona, España)
- Caspase-9 staining (Red), kit de detección (Abnova, Barcelona, España)
- Sustrato caspasa-3 (AC-DEVD-AMC) (Sigma Aldrich S.A., Madrid, España)

3.1.4. Otros reactivos

- 1-(4-Amino-6,7-dimetoxi-2-quinazolinil)-4-(2-furanilcarbonil) piperazina hidrocloreto (Prazosin; Tocris Bioscience, Madrid, España)
- 2-bencil-N-acetilriptamina (Luzindol; Tocris Bioscience, Madrid, España)
- 3-[(3-Colamidopropil)dimetilamonio]-1-propanosulfonato hidratado (Chaps; Sigma Aldrich S.A., Madrid, España)
- 4-cis-4-fenil-2-propionamidotetralin (4-P-PDOT; Tocris Bioscience, Madrid, España)
- 8-metoxi-2-propionamidotetralin (8-M-PDOT; Tocris Bioscience, Madrid, España)
- Acetato sódico (NaCH_3COO ; Panreac, Castellar del Vallés (Barcelona), España)
- Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT; Sigma Aldrich S.A., Madrid, España)
- Cloroformo (Panreac, Castellar del Vallés (Barcelona), España)
- Cloruro de sodio (NaCl ; Panreac, Castellar del Vallés (Barcelona), España)
- Cloruro de potasio (KCl ; Panreac, Castellar del Vallés (Barcelona), España)
- Dimetilsulfóxido (DMSO; Sigma Aldrich S.A., Madrid, España)
- DL-ditiotreitol (DTT; Sigma Aldrich S.A., Madrid, España)
- EDTA (Sigma Aldrich S.A., Madrid, España)
- Etanol 96% (Guiama S.L.V., Valencia, España)
- Fenol (Panreac, Castellar del Vallés (Barcelona), España)
- Fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4 ; Panreac, Castellar del Vallés (Barcelona), España)
- Fosfato sódico (Na_2HPO_4 ; Panreac, Castellar del Vallés (Barcelona), España)

- HEPES (Sigma Aldrich S.A., Madrid, España)
- Melatonina (Sigma Aldrich S.A., Madrid, España)
- N-[2-(6-cloro-5-metoxindol-3-yl)ethyl] acetamida (6-chloromelatonin; Tocris Bioscience, Madrid, España)
- Nonidet-P40 (Sigma Aldrich S.A., Madrid, España)
- PCR 100 bp Low Ladder (Sigma Aldrich S.A., Madrid, España)
- Proteínasa K (Life Technologies, Barcelona, España)
- Reactivo Bradford (Bio-Rad, Barcelona, España)
- RNAsa A (Life Technologies, Barcelona, España)
- Sacarosa (Sigma Aldrich S.A., Madrid, España)
- Staurosporina (Sigma Aldrich S.A., Madrid, España)
- Tris-HCl (Sigma Aldrich S.A., Madrid, España)
- Tritón X-100 (Sigma Aldrich S.A., Madrid, España)

3.2. CULTIVOS CELULARES

La **línea celular humana de cáncer cérvico-uterino HeLa** se sembró a una densidad de $1-0,5 \times 10^6$ células/mL en flasks de 25 cm² con medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) suplementado con 10% de suero bovino fetal, 2 mM de L-glutamina, 100 U/mL de estreptomycin/penicilina, y 1 mM de piruvato sódico. Por otra parte, la **línea celular humana de adenocarcinoma de colon HT-29** cultivadas en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) suplementado con 10% de suero bovino fetal, 2 mM de L-glutamina y 100 U/mL de estreptomycin/penicilina; siendo ambas incubadas a 37°C en una atmosfera húmeda que contenía 5% de CO₂. Los cultivos celulares crecieron en monocapa hasta alcanzar el 80% de confluencia, estimando el tiempo de duplicación en 24 horas aproximadamente.

El pasaje celular se llevó a cabo una vez alcanzado el 80% de confluencia. En condiciones de esterilidad, en una campana de flujo laminar, se retiraba por aspiración el medio de cultivo consumido por las células y se lavó con 3 mL de medio de lavado (RPMI-1640 sin suplementar). A continuación, se llevó a cabo una proteólisis ligera añadiendo 1 mL de tripsina, para desprender las células adheridas a la base del flask. Posteriormente, se inhibió la acción de la tripsina mediante la adición de 3 mL de medio

DMEM suplementado, ya que la presencia de suero bovino fetal inhibe la acción de la tripsina. El volumen resultante se pasaba a un Falcon de 15 mL el cual se centrifugaba 5 minutos a 150×g. Se retiraba el sobrenadante y se resuspendía el pellet celular en medio de cultivo fresco a la densidad inicial de cultivo.

3.3. DISEÑO EXPERIMENTAL

3.3.1. Tratamiento con agentes quimioterapéuticos

Se observó la dinámica de crecimiento de ambos cultivos celulares tratados con diferentes agentes quimioterapéuticos. Se realizó la siembra en placas de 6 o 12 pocillos (Greiner Bio-One). Tras 24 horas, cuando el cultivo monocapa crecía a ritmo exponencial, se inició el experimento, el cual se realizó por duplicado para los quimioterápicos y las concentraciones expuestas en la Tabla II. Para preparar las soluciones stock, los quimioterápicos se diluyeron en DMSO teniendo en cuenta que la concentración final del disolvente en las células fuese < 0,2% (v/v).

Tabla II. Concentraciones utilizadas de los quimioterápicos

	INÓCULO POR POCILLO	Concentración de trabajo
•Citarabina ([stock] = 1 mM)	1 μL	10 μM
•Cisplatino ([stock] = 5 mM)	4 μL	20 μM
•Doxorrubicina ([stock] = 1 mM)	1 μL	1 μM
•Etopósido ([stock] = 1 mM)	1 μL	10 μM
•5-Fluorouracilo ([stock] = 200 mM)	5 μL	1 mM

3.3.2. Tratamientos con melatonina y con agonistas y antagonistas de los receptores de melatonina.

También se observó la dinámica de crecimiento de los cultivos celulares mediante el tratamiento con melatonina. Se estudió la acción de los agentes quimioterapéuticos tanto en presencia como en ausencia de melatonina 1 mM (5 μL de

una solución stock 200 mM). Además, se utilizó un pocillo como control negativo, el cual fue tratado con el vehículo (DMSO < 0,2%, v/v).

Por otro lado, cuando fue necesario, los cultivos celulares se incubaron durante 48h en presencia de los agonistas de los receptores de melatonina 6-cloromelatonina (100 nM) o 8-M-PDOT (100 nM), o se preincubaron durante 30 min en presencia de los antagonistas luzindol (5 µM), 4-P-PDOT (50 nM) o prazosin (10 nM).

3.4. VIABILIDAD CELULAR

La viabilidad celular se evaluó por el método MTT, basado en la capacidad de las células viables de reducir metabólicamente el MTT, por la acción de la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa, en un compuesto de color azul (formazán). Esta reducción del MTT no se produce en las células muertas, por lo que permite determinar la funcionalidad mitocondrial de las células tratadas. La cantidad de células vivas será proporcional a la cantidad de formazán producido.

Las dos líneas celulares elegidas fueron incubadas en placas de 12 pocillos (Greiner Bio-One) en presencia de los tratamientos anteriormente descritos. Tras 24 o 48 horas de incubación y alcanzada una confluencia en torno al 70-80%, se retiró el medio de cultivo por aspiración. Posteriormente, se resuspendieron las células con 500 µL de RPMI-1640 (sin suplementar) conteniendo 50 µL de MTT ([stock] = 5 mg/mL), y se incubaron durante 60 minutos a 37°C. Tras dicha incubación se retiró el medio de cultivo nuevamente y se añadieron 500 µL de DMSO para disolver los cristales de formazán.

La densidad óptica fue medida en un lector de placas automático (Infinite M200; Tecan, Austria) a 530 nm, usando 630 nm como longitud de onda de referencia, y los datos fueron presentados como incrementos relativos con respecto al control (experimento/control).

3.5. DETECCIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO (ERO) Y ACTIVACIÓN DE LA CASPASA-9

Se determinó la activación enzimática de la caspasa-9 junto con la producción de ERO de los diferentes grupos experimentales de células, mediante el kit de detección Caspase-9 staining (Red) y la sonda fluorescente 2',7'-dichlorodihidrofluoresceína diacetato (DCFH), según las instrucciones del fabricante.

El kit Caspase-9 staining (Red) proporciona un medio ampliamente utilizado para la detección de caspasa-9 activada en las células vivas. El ensayo utiliza un inhibidor de la caspasa-9, LEHD-FMK, conjugado con sulforrodamina (Red-LEHD-FMK) como marcador fluorescente. El sustrato Red-LEHD-FMK es permeable a las células, no es tóxico, y se une irreversiblemente a la caspasa-9 activada en las células apoptóticas. Por otra parte, la sonda fluorescente DCFH es un indicador de ERO permeable a la célula, ampliamente utilizado. Dicho indicador, inicialmente no fluorescente, es oxidado y convertido en 2',7'-diclorofluoresceína (DCF), fluorescente, por la acumulación intracelular de ERO.

Tras 24 horas de incubación con los diferentes tratamientos y alcanzada una confluencia en torno al 70-80%, las células se tripsinizaron, se pasaron a diferentes eppendorfs, y se centrifugaron (5 minutos, 150×g). Posteriormente, se retiró el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 400 µl de PBS. A continuación, las células se tiñeron con 0,5 µl de sustrato de caspasa 9 y con 0,4 µM DCFH ([stock = 20 mM]), y se incubaron durante 30 minutos a 37°C, en oscuridad y agitación. Después, las células se lavaron 2 veces en tampón de lavado (5 minutos, 150×g) y, finalmente, se resuspendieron en 500 µl de tampón de lavado para ser analizadas por citometría de flujo (MACSQuant VYB, Miltenyi, Alemania). Se analizaron diez mil eventos utilizando los detectores FL-1 (verde, DCFH) y FL-3 (rojo, Red-LEHD-FMK). Cada muestra se ensayó de tres a cinco veces en experimentos independientes. Bajo todas las condiciones analizadas, se compararon principalmente los porcentajes de células DCFH positivas/Caspasa-9 negativas, DCFH positivas/Caspasa-9 positivas, y DCFH negativas/Caspasa-9 positivas.

3.6. DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD CASPASA-3

3.6.1. Actividad caspasa-3

Una vez se sometieron las células a los distintos tratamientos apoptóticos, y alcanzada una confluencia en torno al 70-80%, se retiró el medio de cultivo y a continuación se adicionaron 150 μL de tampón fosfato salino (PBS) (Tabla III) a cada pocillo. Seguidamente, se despegaron las células de cada pocillo mecánicamente con un rascador celular. La suspensión celular de cada pocillo se pasó a diferentes eppendorfs y posteriormente las células fueron lisadas por sonicación. El lisado de las células libera el contenido citosólico de las mismas para que sea accesible después al sustrato específico de la caspasa-3 (AC-DEVD-AMC).

Tabla III. Composición del PBS

	Concentración (M)
NaCl	0,1370
KCl	0,0027
Na₂HPO₄	0,0122
KH₂PO₄	0,0018

**pH ajustado a 7,4*

El lisado celular de cada eppendorf se distribuyó por duplicado en una placa de 96 pocillos (Greiner Bio-One), especial para medidas de fluorescencia, añadiendo 50 μL de la solución celular y 50 μL de tampón de ensayo de caspasa-3 (Tabla IV) por pocillo.

En el día del experimento, por cada 2,5 mL de tampón de ensayo, se añadieron en fresco 12,5 μL de DTT ([stock] = 1 M), 2,5 μL de NP-40 ([stock] = 1,56 mM), y 1 μL de sustrato de caspasa-3 AC-DEVD-AMC ([stock] = 100 mM).

Tabla IV: Composición del tampón de ensayo para la caspasa-3

	Concentración (mM)
HEPES	100,00
Sacarosa	292,14
Chaps	1,62
DTT	5,00
NP-40	$1,56 \times 10^{-3}$
Sustrato Caspasa 3	0,04

*pH ajustado a 7,5

La caspasa-3 tiene la capacidad de hidrolizar la unión del fluoróforo AMC (7-amino-4-metilcumarina) unido al aspártico de su péptido diana específico. La actividad caspasa se cuantifica de manera directamente proporcional a la fluorescencia que emite el fluoróforo AMC cuando es liberado por la hidrólisis. Dicha fluorescencia y, en concreto, la determinación de la actividad de la caspasa-3 se monitorizó mediante un lector de placas para fluorescencia (Infinite M200) con longitud de onda de excitación de 360 nm y de emisión a 460 nm. La cinética enzimática de la caspasa-3 se midió a 37°C durante 42 minutos en repeticiones cíclicas de 3 minutos, con lo que se obtuvo una curva de actividad en función del tiempo.

La actividad caspasa-3 fue estimada como la pendiente de la curva de cinética enzimática para cada tratamiento con respecto a la concentración de proteínas. Los datos se presentaron como incremento relativo al control (muestras sin tratar) (experimento/control).

3.6.2. Cuantificación de proteínas totales: método Bradford

La medida de la concentración de proteínas con el reactivo Bradford se basa en la unión de un colorante, Coomassie Blue G-250, a las proteínas. El colorante, en solución ácida, presenta dos formas: una de color azul y otra de color anaranjada. Las

proteínas se unen a la forma azul generando un complejo proteína-colorante con un coeficiente de extinción mayor que el colorante libre.

Partiendo de la solución de PBS con células lisadas por sonicación, utilizamos placas de 96 pocillos (Greiner Bio-One) en las cuales pipeteábamos 5 μL de la solución de células y 100 μL del reactivo Bradford por pocillo. Las mediciones de absorbancia se llevaron a cabo por duplicado en un lector de placas (Infinite M200) a una longitud de onda de 595 nm.

3.7. DETECCIÓN DE LA APOPTOSIS

Se evaluó la apoptosis de los diferentes grupos de células sometidas a diversos tratamientos mediante el kit comercial Anexina V-FITC Apoptosis, según las instrucciones del fabricante, y mediante la utilización de un citómetro de flujo (Cytomics FC500, Beckman Coulter, Viena, Austria).

Tras 24 horas de incubación con los diferentes tratamientos alcanzada una confluencia en torno al 70-80%, las células se tripsinizaron y se lavaron con PBS (5 minutos, 150 $\times g$). Posteriormente, las células se resuspendieron en 200 μL de tampón de unión conteniendo 5 μL de Anexina V-FITC, y se transfirieron a tubos eppendorf. La suspensión celular se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente en un agitador rotacional. Seguidamente, se lavaron las células (5 minutos, 150 $\times g$) y se resuspendieron finalmente en 200 μL de tampón de unión conteniendo 10 μl de yoduro de propidio (PI; [stock] = 20 $\mu\text{g/ml}$).

La Anexina V-FITC se une específicamente a los residuos de fosfatidil-serina en la cara externa de la membrana de las células apoptóticas. Por otro lado, el PI es un agente intercalante que se une al ADN de la célula una vez que la membrana de ésta se ha vuelto permeable. Las células fueron analizadas inmediatamente después de la incubación con las sondas mediante citometría de flujo. Se analizaron diez mil eventos utilizando los detectores FL-1 (verde, Anexina V-FITC) y FL-3 (rojo, PI). Cada muestra se ensayó de tres a cinco veces en experimentos independientes. Bajo todas las condiciones analizadas, se compararon principalmente los porcentajes de células Anexina V positivas/PI negativas, y Anexina V positivas/PI positivas.

3.8. DETECCIÓN DE LA FRAGMENTACIÓN DE ADN

Una de las características más importantes de la apoptosis es la condensación de la cromatina y la fragmentación del ADN en fragmentos de 200 pares de bases o múltiplos de ellos, es lo que se conoce como "escalera de ADN". Dicha fragmentación se utiliza en la actualidad como marcador de muerte celular por apoptosis.

Tras 24 horas de incubación con los diferentes tratamientos y alcanzada una confluencia en torno al 70-80%, las células se tripsinizaron y se lavaron con PBS (5 minutos, 150 ×g). Posteriormente, se resuspendieron en 100 µL de PBS, se añadieron 500 µl de 10 mM EDTA, 0.25% Triton X-100, 2,5 mM Tris-HCl (pH = 8,0), y se incubaron a 4°C durante 15 minutos en agitación.

A continuación, las muestras se centrifugaron a 500×g durante 10 minutos a 4°C, y el sobrenadante se recogió para volverlo a centrifugar a 14.000×g durante 1 hora a 4°C. El sobrenadante resultante se recogió y se le añadió 1 ml de etanol frío para, posteriormente, incubarlo a -80°C durante 2-3 horas. Transcurrido ese tiempo, las distintas muestras se descongelaron y centrifugaron a 14.000×g durante 45 minutos a 4°C. Tras esta centrifugación, se eliminó el sobrenadante y el precipitado se dejó secar a 37°C para después resuspenderlo en 200 µl de tampón Tris-EDTA (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH = 8,0).

Seguidamente, las muestras se incubaron 30 minutos a 37°C con 0,1 mg/mL RNAsa A. Después, las muestras se incubaron 2-3 horas con 0,25 mg/mL proteinasa K a 37°C. Tras dicha incubación, el ADN fue purificado mediante extracción con fenol-cloroformo y precipitado a -80°C tras la adición de 3 M acetato sódico (pH = 5,3) y 1 mL de etanol. El ADN precipitado se resuspendió en tampón Tris-EDTA junto con tampón de carga para separarlo en un gel de agarosa al 1,5%. Finalmente, el gel se visualizó y fotografió bajo luz UV con el equipo GelDoc (BioRad, Madrid, España).

3.9. ANÁLISIS DEL CICLO CELULAR

Después de la incubación con los distintos tratamientos, la células (1×10^6 cells/mL) fueron lavadas con PBS y fijadas en etanol 70% durante media hora a 4°C. Las células se lavaron de nuevo con PBS y se resuspendieron en 500 μ l de PBS que contenía PI (20 μ M) y RNAasa A (50 μ M). Las muestras se mantuvieron en oscuridad a 4°C durante 30 min y después se analizaron por citometría de flujo (Cytomics FC-500), con excitación a 488 nm y emisión medida a 560 - 640 nm (modo FL2).

3.10. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO

Los datos obtenidos se expresaron como la media \pm EEM (error estándar de la media). Para comparar entre los diferentes tratamientos, la significación estadística se calculó mediante el análisis de la varianza de una vía (ANOVA) seguido por el test de Dunnett para comparaciones múltiples. Los valores de $P \leq 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos.

4. RESULTADOS

4.1 Melatonina sensibiliza las células HeLa de cáncer cervical humano frente a la citotoxicidad y la apoptosis inducidas por el cisplatino: efectos sobre el estrés oxidativo y la fragmentación del ADN.

La Figura 1 muestra la viabilidad de células HeLa de carcinoma de cuello uterino humano tratadas con varios agentes quimioterapéuticos en ausencia y presencia de melatonina. La estimulación de células HeLa con 1 mM de melatonina durante 24 h indujo una ligera reducción de la viabilidad celular. Además, se observaron disminuciones notablemente significativas ($P < 0,05$) en la viabilidad celular por estimulación de células HeLa con 20 μM de CIS, 1 mM de 5-FU y 20 μM de DOX ($51,8 \pm 4,23\%$, $78,5 \pm 5,03\%$ y $73,0 \pm 3,96\%$, respectivamente) durante 24 h. Por el contrario, los tratamientos con 10 μM de citarabina o 10 μM de etopósido no afectaron la viabilidad celular.

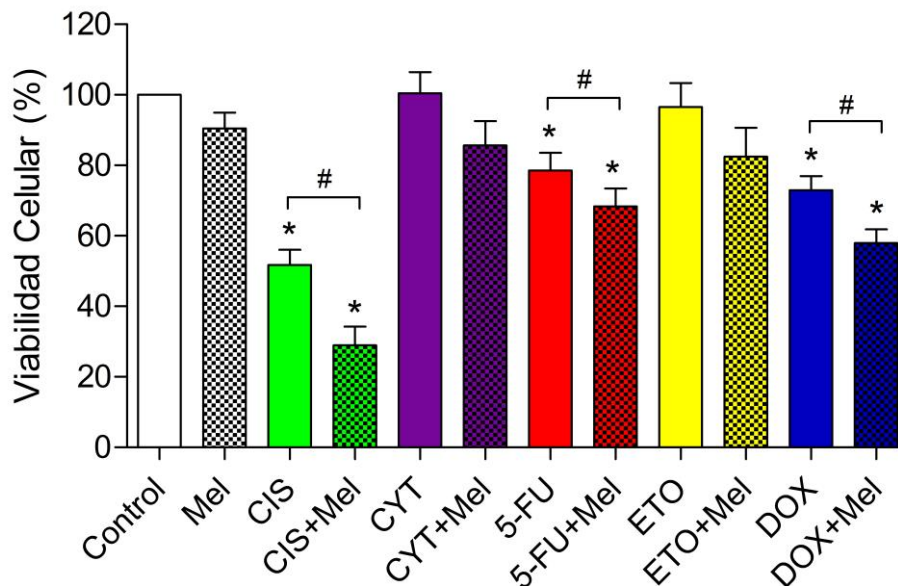


Figura 1. La melatonina mejora la citotoxicidad estimulada por quimioterapia en células HeLa. Las células fueron tratadas con 20 μM de cisplatino (CIS), 1 mM de 5-fluorouracilo (5-FU), 20 μM de doxorubicina (DOX), 10 μM de citarabina (CYT), 10 μM de etopósido (ETO), o el vehículo (control) en ausencia o presencia de 1 mM melatonina (Mel) durante 24 h. Los valores se presentan como media \pm EEM de seis experimentos independientes y se expresan como porcentaje de los valores de control (muestras no tratadas). * $P < 0,05$ en comparación con los valores de control. # $P < 0,05$ en comparación con su valor correspondiente en ausencia de melatonina.

Análogamente, se realizaron ensayos paralelos para examinar el posible efecto potenciador de la melatonina sobre la citotoxicidad inducida por los agentes quimioterapéuticos. Por lo tanto, cuando las células HeLa se incubaron con los agentes quimioterapéuticos durante 24 horas en presencia de 1 mM de melatonina, la

indolamina logró reducir aún más la viabilidad celular de las células HeLa estimuladas con quimioterapia, siendo este efecto estadísticamente significativo ($P < 0,05$) para las células tratadas con CIS ($29,0 \pm 5,26\%$), 5-FU ($68,3 \pm 5,10\%$) y DOX ($57,9 \pm 3,92\%$), mientras que fueron no significativos para células expuestas a citarabina ($85,6 \pm 6,97\%$) o etopósido ($82,5 \pm 5,9\%$).

Para examinar si el descenso de la viabilidad celular provocado por agentes quimioterapéuticos estaba relacionado con la muerte celular apoptótica, se analizó la activación de la caspasa-3 (un efector clave de la apoptosis) tanto en células tratadas como en estado basal (control). Para este propósito, las células sólo se incubaron con los agentes quimioterapéuticos que demostraron ser citotóxicos hacia la línea celular HeLa, es decir, CIS, 5-FU y DOX.

El tratamiento con 1 mM melatonina por sí sola durante 24 h produjo un claro aumento de la actividad caspasa-3 en el cultivo celular ($4,08 \pm 0,56$, $P < 0,05$; Figura 2). Además, los tratamientos con 20 μ M de CIS, 1 mM de 5-FU y 1 μ M de DOX durante 24 h también aumentaron significativamente ($P < 0,05$) la actividad de la caspasa-3 ($23,4 \pm 3,25$, $5,82 \pm 0,67$ y $12,12 \pm 4,21$ veces mayor, respectivamente; Figura 2). Es importante mencionar que el CIS fue el agente más eficaz en términos de activación de caspasa-3, siendo la estimulación 23 veces mayor que su actividad basal. Es importante destacar que la melatonina fue capaz de aumentar la activación de caspasa-3 inducida por quimioterapia. De hecho, las células HeLa tratadas con 20 μ M de CIS o 1 mM de 5-FU en presencia de 1 mM de melatonina durante 24 h desencadenó una mayor activación de la caspasa-3 ($42,6 \pm 4,58$ y $9,89 \pm 1,36$ veces mayor, respectivamente), en comparación con los tratamientos con cada agente quimioterapéuticos por sí solos ($P < 0,05$). Sin embargo, el tratamiento con melatonina junto con DOX sólo produjo un aumento leve, no significativo ($17,7 \pm 4,16$) de la actividad de la caspasa-3 en comparación con las células HeLa tratadas sólo con DOX (Figura 2).

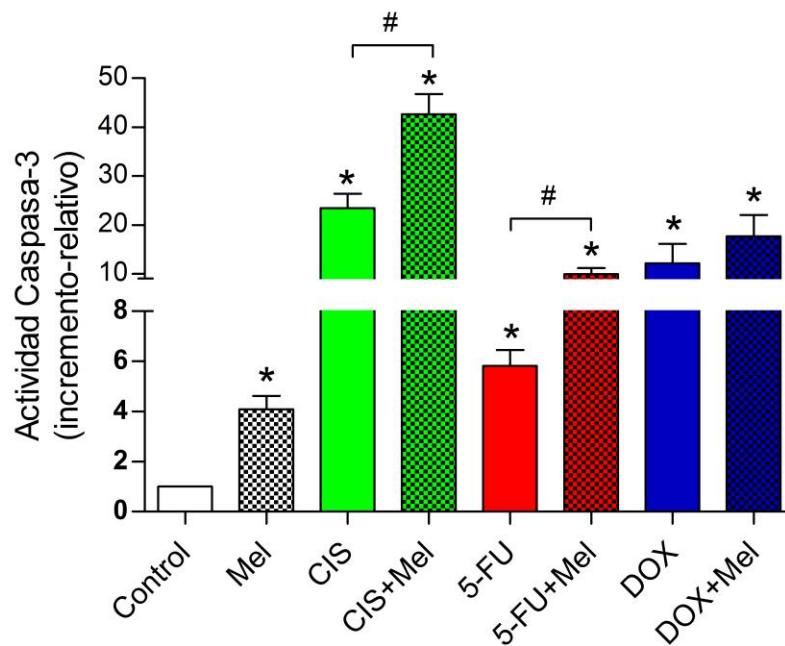


Figura 2. La activación de la caspasa-3 mediada por quimioterapia es potenciada por la melatonina en células HeLa. Las células fueron tratadas con 20 μ M de cisplatino (CIS), 1 mM de 5-fluorouracilo (5-FU), 20 μ M de doxorrubicina (DOX), o el vehículo (control), en ausencia o presencia de 1 mM de melatonina durante 24 h. Los valores se presentan como las medias \pm EEM de once experimentos independientes y se expresan como incremento relativo sobre el nivel de pretratamiento (experimental/control). * $P < 0,05$ en comparación con los valores de control. # $P < 0,05$ en comparación con su valor correspondiente en ausencia de melatonina.

Dado que la sobreproducción intracelular de ERO suele estar vinculado a la muerte celular apoptótica, y que la caspasa-9 es una caspasa iniciadora involucrada en los pasos iniciales de la apoptosis mitocondrial, se determinó la generación de ERO intracelular y la activación de caspasa-9 en células HeLa con el doble marcaje DCF+Red LEHD-FMK por citometría de flujo. Con este fin, las células sólo se incubaron junto con aquellos agentes quimioterapéuticos en los cuales se había observado el efecto sinérgico de la melatonina de acuerdo a los resultados obtenidos para la caspasa-3, es decir, CIS y 5-FU.

La Figura 3A representa los citogramas característicos de cada tratamiento ensayado. Cuando las células HeLa fueron estimuladas con 1 mM melatonina, el porcentaje de células DCF-/Caspasa-9- (intactas) disminuyó drásticamente ($35,4 \pm 6,8\%$; $P < 0,05$), mientras que la proporción de células estimuladas para la

producción de ERO ($28,3 \pm 4,73\%$; DCF+/Caspasa 9-) así como la cantidad de células que entran en la apoptosis mitocondrial debido a la sobreproducción de ERO ($29,5 \pm 3,27\%$; DCF+/Caspasa-9+) aumentaron considerablemente ($P < 0,05$; Figura 3B). En relación con el CIS, los tratamientos con $20 \mu\text{M}$ CIS durante 24 h indujeron un notable aumento ($P < 0,05$) en la proporción de células que entran en la apoptosis mitocondrial debido a una sobreproducción de ERO ($45,5 \pm 5,09\%$) a expensas del porcentaje de células intactas, el cual se redujo en gran medida ($30,5 \pm 7,07\%$; $P < 0,05$; Figura 3B, panel izquierdo). Curiosamente, los efectos pro-oxidantes y pro-apoptóticos del CIS fueron potenciados cuando $20 \mu\text{M}$ de CIS y 1 mM de melatonina fueron administrados conjuntamente durante 24 h. En concreto, el número de células apoptóticas tempranas (DCF-/caspasa-9+) fue significativamente mayor ($P < 0,05$) en comparación con las células HeLa tratadas sólo con CIS ($40,5 \pm 4,76\%$; Figura 3B, panel izquierdo). Estos hallazgos sugirieron que la melatonina intensifica los efectos del CIS, provocando una inducción más temprana de la apoptosis mitocondrial y que ésta sea ejecutada más rápidamente en las células co-estimuladas con ambos fármacos.

En cuanto al 5-FU, la estimulación de las células HeLa con 1-mM de dicho agente quimioterapéutico durante 24 h aumentó significativamente ($P < 0,05$) el porcentaje de células que entran en la apoptosis mitocondrial debido a la sobreproducción de ERO ($45,8 \pm 6,39\%$) a expensas de la cantidad de células intactas ($27,3 \pm 2,68\%$; Figura 3B, panel derecho). Del mismo modo, las acciones apoptóticas del 5-FU fueron acentuadas sólo moderadamente en presencia de 1 mM de melatonina, observándose una mayor reducción, no significativa, en la proporción de células intactas ($20,8 \pm 6,36\%$; Figura 3B, panel derecho).

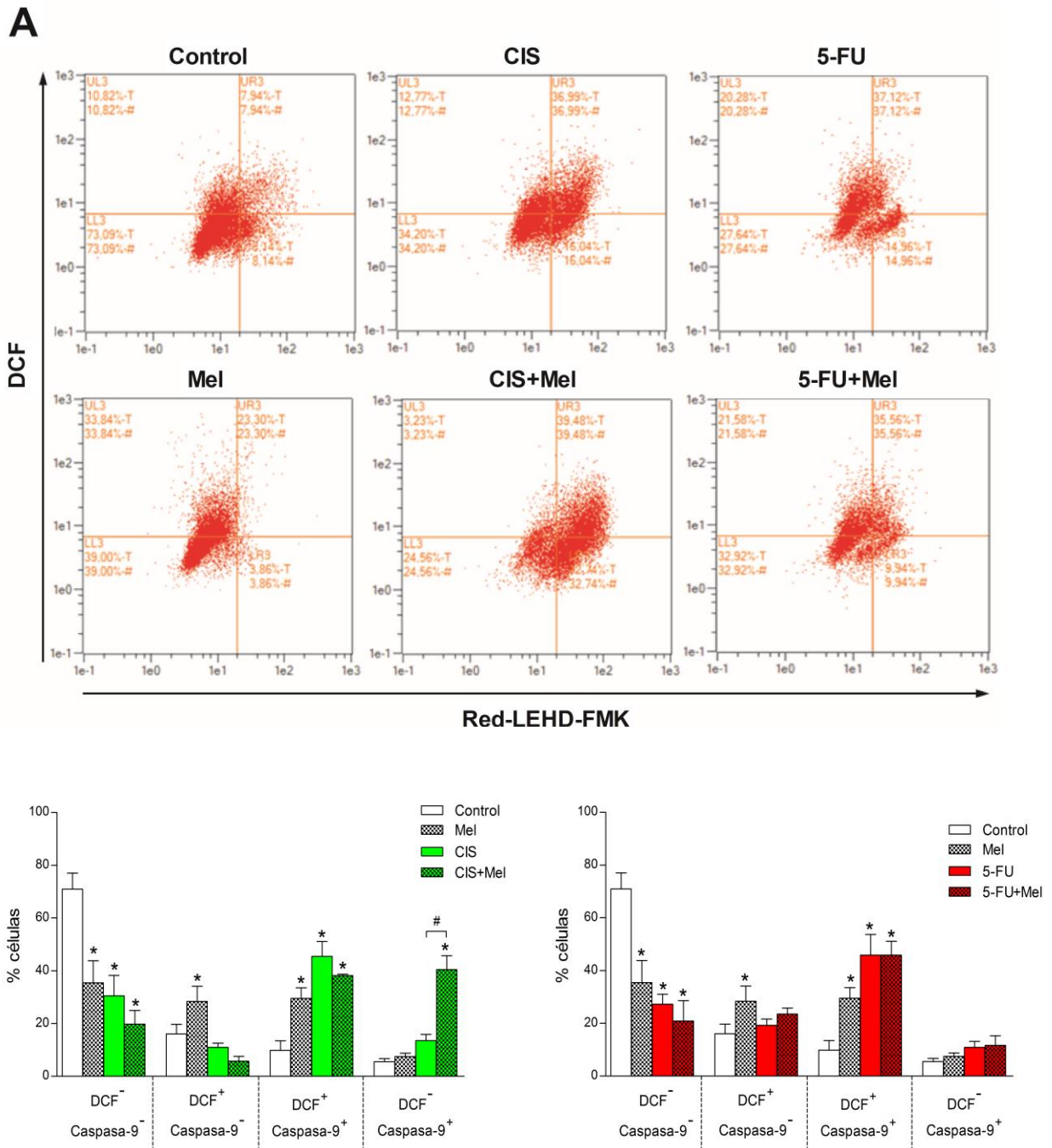


Figura 3. Efecto potenciador de la melatonina sobre la producción de ERO y la activación de caspasa-9 inducida por agentes quimioterapéuticos. Las células HeLa fueron tratadas con 20 μ M de cisplatino (CIS) o 1 mM de 5-fluorouracilo (5-FU), o con el vehículo (control), en ausencia o presencia de 1 mM de melatonina (Mel) durante 24 h. A) Citogramas representativos que muestran células estimuladas para la producción de ERO (DCF⁺/Caspasa-9⁻), células que entran en la apoptosis mitocondrial debido a sobreproducción de ERO (DCF⁺/Caspasa-9⁺), y células apoptóticas tempranas (células DCF⁻/Caspasa-9⁺) después de 24 horas de tratamiento con la combinación indicada de fármacos. B) Histogramas que muestran porcentajes de cada población de células. Los valores se presentan como media \pm EEM de cuatro experimentos independientes. * P < 0,05 en comparación con los valores de control. # P < 0,05 en comparación con su valor correspondiente en ausencia de melatonina.

Para evaluar las subpoblaciones de células apoptóticas después de la estimulación con CIS o 5-FU en ausencia y presencia de melatonina, se analizó la redistribución de la PS en presencia de PI mediante citometría de flujo.

La Figura 4A representa los citogramas característicos de cada tratamiento ensayado. La estimulación de células HeLa con 1 mM de melatonina durante 24 h produjo una ligera disminución en el porcentaje de células vivas ($80,3 \pm 4,19\%$; Anexina-/PI-), duplicó la proporción de células apoptóticas tempranas ($9,75 \pm 2,06\%$; Anexina+/PI-), y aumentó significativamente ($P < 0,05$) la cantidad de células apoptóticas tardías ($9,38 \pm 1,84\%$; Anexina+/PI+; Figura 4B). Los tratamientos con $20 \mu\text{M}$ de CIS durante 24 h causaron un incremento significativo ($P < 0,05$) en el porcentaje de células apoptóticas tempranas ($40,0 \pm 2,65\%$) y tardías ($13,34 \pm 3,47\%$) a expensas de la cantidad de células vivas, cuya población fue notablemente disminuida ($39,3 \pm 3,71\%$; $P < 0,05$; Figura 4B, panel izquierdo). Cabe destacar que la administración simultánea de $20 \mu\text{M}$ de CIS y 1 mM de melatonina durante 24 h provocó un mayor aumento ($P < 0,05$) en el número de células apoptóticas, tanto tempranas ($47,4 \pm 1,10\%$) como tardías ($26,3 \pm 4,08\%$), así como un descenso, también significativo ($P < 0,05$), en la proporción de células vivas ($17,3 \pm 8,16\%$; Figura 4B, panel izquierdo), en comparación con los valores en ausencia de melatonina. Estos resultados concuerdan con aquellos sobre la generación intracelular de ERO y la activación de caspasa-9, es decir, la melatonina aceleró la apoptosis inducida por el CIS.

En cuanto al 5-FU, la estimulación de las células HeLa con 1 mM de este agente quimioterapéutico durante 24 h redujo significativamente ($P < 0,05$) el porcentaje de células vivas ($77,0 \pm 4,01\%$) e incrementó la proporción de células apoptóticas tempranas ($15,0 \pm 2,80\%$; Figura 4B, panel derecho). Asimismo, se observó que el 5-FU fue capaz de aumentar ligeramente la proporción de células apoptóticas tardías ($4,91 \pm 0,66\%$). Además, el tratamiento conjunto con 5-FU 1 mM y melatonina 1 mM durante 24 h aumentó ligeramente la capacidad citotóxica de dicho quimioterápico (Figura 4B, panel derecho).

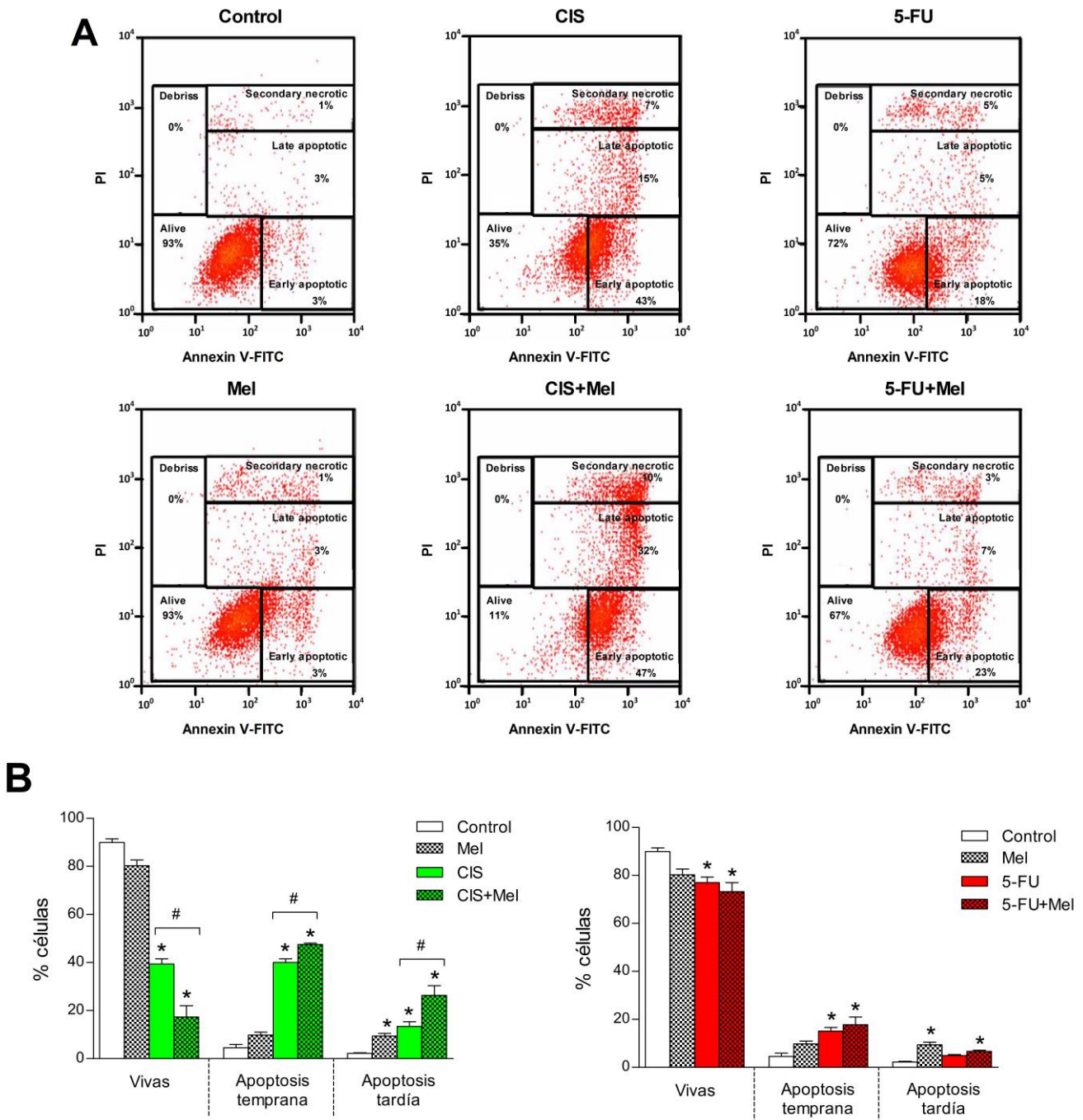


Figura 4. La muerte celular apoptótica desencadenada por agentes quimioterapéuticos es potenciada por acción de la melatonina. Las células HeLa fueron tratadas con 20 μ M de cisplatino (CIS), 1 mM de 5-fluorouracilo (5-FU), o el vehículo (control), en ausencia o presencia de 1 mM de melatonina (Mel) durante 24 h. A) Citogramas representativos en los que se expresa la redistribución de fosfatidilserina (tinción de anexina V) en presencia de yoduro de propidio (PI) después de 24 horas de tratamiento con la combinación indicada de fármacos. B) Histogramas que muestran los porcentajes de cada subpoblación de células. Los valores se presentan como media \pm EEM de cuatro experimentos independientes. * $P < 0,05$ en comparación con los valores de control. # $P < 0,05$ en comparación con su valor correspondiente en ausencia de melatonina.

Para confirmar los efectos potenciadores de la melatonina en la apoptosis mediada por CIS en células HeLa, se analizó cualitativamente la fragmentación del ADN mediante electroforesis en gel de agarosa. Dado que la estaurosporina es un agente inductor de apoptosis bien conocido, las células se estimularon con 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de estaurosporina durante 12 h como control positivo. Como se muestra en la Figura 5, la estaurosporina (calle 7) generó un patrón marcado de fragmentación del ADN, mientras que la melatonina sólo (calle 2) no fue capaz de inducir la degradación del ADN. De la misma manera, el tratamiento con 20 μM de CIS durante 24 h (calle 3) provocó un claro patrón de fragmentación del ADN, la cual se incrementó notablemente por la co-estimulación con 1 mM melatonina (calle 4). Finalmente, el tratamiento con 1 mM 5-FU durante 24 h no produjo daño apreciable del ADN, ni en ausencia ni en presencia de melatonina, lo que sugiere que este agente quimioterapéutico puede necesitar un tiempo de exposición más largo para ser eficaz contra células HeLa.

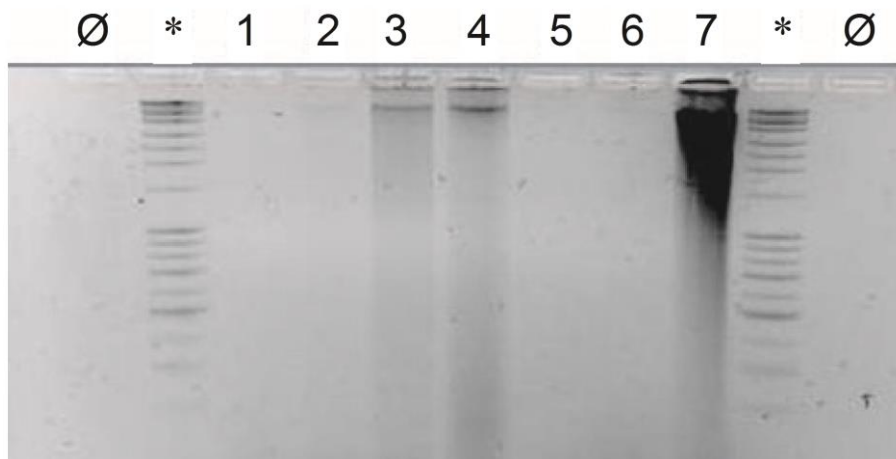


Figura 5. La melatonina incrementa la fragmentación del ADN inducida por cisplatino. Las células HeLa se trataron con 20 μM de cisplatino (CIS), 1 mM de 5-fluorouracilo (5-FU), o el vehículo (control), en ausencia o presencia de 1 mM de melatonina (Mel) durante 24 h. El tratamiento con 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de estaurosporina durante 12 h se usó como control positivo. (1) control, (2) melatonina, (3) cisplatino, (4) cisplatino + melatonina, (5) 5 fluorouracilo, (6) 5-fluorouracilo + melatonina, y (7) estaurosporina.

4.2 Melatonina incrementa el efecto quimioterapéutico inducido por 5-Fluorouracilo en células de adenocarcinoma colorrectal humano *in vitro*.

En primer lugar, se estudió el impacto del co-tratamiento con melatonina y CIS o 5-FU sobre la viabilidad de la línea celular HT-29 de cáncer colorrectal. Para ello, se evaluó la viabilidad celular a lo largo del tiempo (24-48-72 h) mediante el ensayo de MTT. Se observó que la estimulación de células HT-29 con 1 mM de melatonina durante 24 horas por sí sola, dio lugar a una disminución significativa ($P < 0,05$) de la viabilidad celular (Figura 6). Sin embargo, un tiempo de exposición a la indolamina más prolongado (48 o 72 h) no produjo un mayor descenso en la viabilidad celular. En cuanto a los agentes quimioterapéuticos, el tratamiento con 20 μM de CIS durante 24 h indujo un notable descenso ($P < 0,05$) en la viabilidad celular, el cual fue mucho más pronunciado después de 48 h de tratamiento (Figura 6). No obstante, no se observaron diferencias adicionales después de 72 h de estimulación con CIS. Curiosamente, se observó una reducción tiempo-dependiente en la viabilidad celular cuando las células HT-29 se incubaron con 1 mM de 5-FU, obteniéndose el efecto máximo después de 72 h de tratamiento (Figura 6).

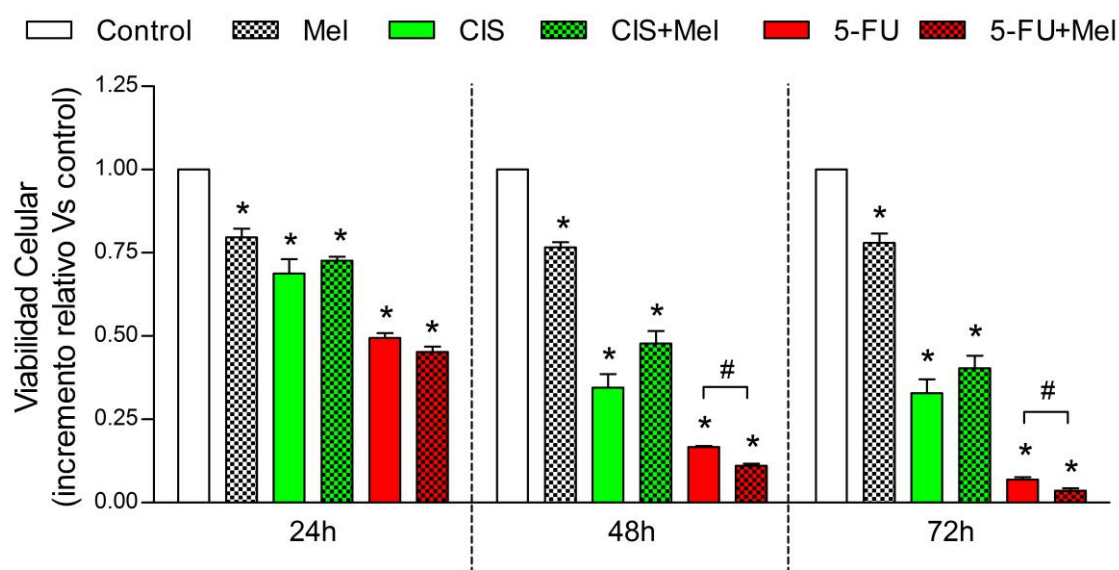


Figura 6. La melatonina mejora la citotoxicidad inducida por quimioterapia en las células HT-29. Las células fueron tratadas con 20 μM de cisplatino (CIS), 1 mM de 5-fluorouracilo (5-FU), o el vehículo (control), en ausencia o presencia de 1 mM de melatonina (Mel) durante 24, 48 y 72 h. Los valores se presentan como medias \pm EEM de cinco experimentos independientes y se expresan como aumento relativo respecto a los valores del control (muestras no tratadas). * $P < 0,05$ en comparación con los valores de control. # $P < 0,05$ en comparación con su valor correspondiente en ausencia de melatonina.

Para examinar el posible efecto potenciador de la melatonina, las células HT-29 se incubaron con ambos agentes quimioterapéuticos en presencia de 1 mM de melatonina. La indolamina no modificó la viabilidad de las células tratadas con CIS (Figura 6). Por el contrario, la melatonina fue capaz de potenciar las acciones citotóxicas del 5-FU, siendo este efecto estadísticamente significativo ($P < 0,05$) después de 48 y 72 h de estimulación (Figura 6).

Para evaluar si la reducción de la viabilidad celular inducida por los agentes quimioterapéuticos estaba relacionada con la muerte celular apoptótica, se analizó la redistribución de la PS en presencia de PI. La Figura 7A representa los citogramas característicos para cada tratamiento ensayado. La incubación de las células HT-29 con 1 mM de melatonina durante 24 h produjo una ligera disminución en el porcentaje de células vivas ($85,4 \pm 1,8\%$; Anexina-/PI-) y pequeños cambios no significativos en la cantidad de células apoptóticas tanto tempranas ($2,8 \pm 0,2\%$; Anexina+/PI-) como tardías ($2,7 \pm 0,4\%$; Anexina+/PI+; Figura 7B).

Los tratamientos con 20 μM de CIS durante 24 h provocaron una disminución significativa ($P < 0,05$) en el porcentaje de células vivas ($80,2 \pm 3,7\%$) que se correlacionó con pequeños incrementos en el número de células apoptóticas tempranas ($4,3 \pm 0,5\%$) y tardías ($2,8 \pm 0,7\%$; Figura 7B, panel izquierdo). La administración simultánea de CIS y melatonina durante 24 h no sensibilizó a las células HT-29 frente a la apoptosis inducida por CIS. Así, se observaron efectos moderados de quimiosensibilización, en términos de ligeros aumentos en la fracción de células apoptóticas tempranas, cuando se prolongó el tratamiento conjunto de CIS y melatonina hasta 48 h (datos no mostrados).

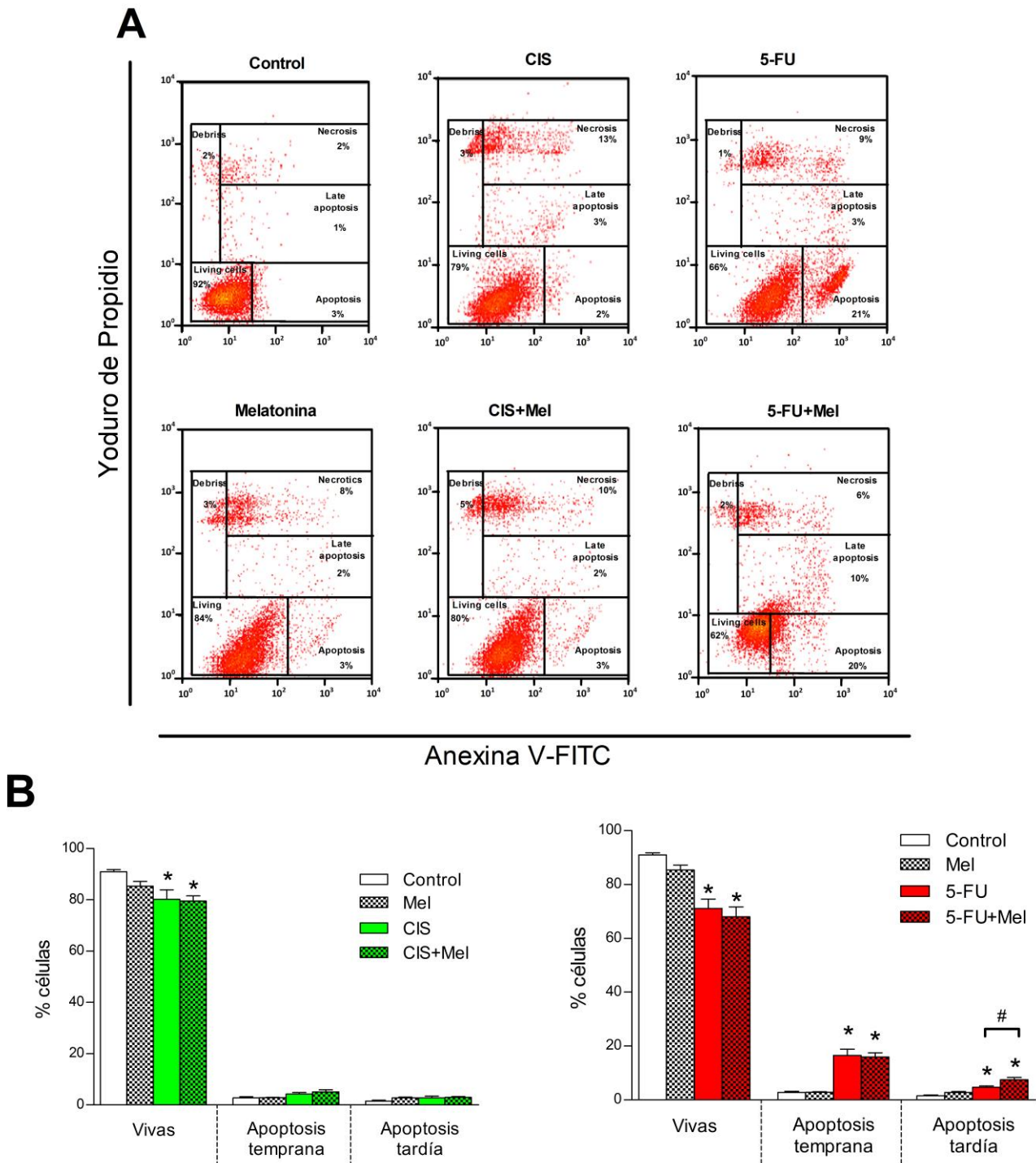


Figura 7. El co-tratamiento con 5-fluorouracilo y melatonina potencia la muerte celular apoptótica en células de cáncer colorrectal. Las células HT-29 se incubaron con 20 μ M de cisplatino (CIS), 1 mM de 5-fluorouracilo (5-FU), o el vehículo (control), en ausencia o presencia de 1 mM de melatonina (Mel) durante 24 h. A) Citogramas representativos que muestran la redistribución de la fosfatidilserina (tinción de anexina V) en presencia de yoduro de propidio después de 24 horas de tratamiento con la combinación indicada de fármacos. B) Histogramas que muestran los porcentajes de cada subpoblación de células. Los valores se presentan como media \pm EEM de siete experimentos independientes. * $P < 0,05$ en comparación con los valores de control. # $P < 0,05$ en comparación con su valor correspondiente en ausencia de melatonina.

En cuanto al tratamiento con 5-FU, cuando las células se incubaron con 1 mM de dicho agente durante 24 h, el porcentaje de células apoptóticas tempranas ($16,6 \pm 2,3\%$) y tardías ($4,6 \pm 0,5\%$) aumentó significativamente ($P < 0,05$) a expensas de la cantidad de células vivas, la cual se redujo notablemente ($71,1 \pm 3,4\%$; $P < 0,05$; Figura 7B, panel derecho). Es importante destacar que la administración simultánea de 1 mM de 5-FU y 1 mM de melatonina durante 24 h provocó un aumento adicional ($P < 0,05$) en el número de células apoptóticas tardías ($7,5 \pm 0,9\%$), así como un ligero decremento en la proporción de células vivas ($68,0 \pm 3,6\%$; Figura 7B, panel derecho). Este efecto potenciador de la indolamina fue aún más evidente cuando las células se trataron con 5-FU en presencia de melatonina durante 48 h, especialmente en la cantidad de células apoptóticas tempranas ($21,8 \pm 5,2\%$ frente a $14,5 \pm 6,0\%$ en células estimuladas sólo con 5-FU; datos no mostrados).

Una vez evidenciadas las acciones inductoras de la apoptosis de los agentes quimioterapéuticos, especialmente del 5-FU, posteriormente se analizó su efecto potencial sobre la progresión del ciclo celular en células de cáncer colorrectal. La estimulación de las células HT-29 con 1 mM de melatonina durante 24 h causó efectos marginales en la distribución de las diferentes fases del ciclo celular (Figura 8). Por el contrario, el tratamiento con 20 μM de CIS durante 24 h provocó una significativa ($P < 0,05$) acumulación de células en fase S a expensas del porcentaje de células en las fases G1/G0 y G2/M, que se redujeron en gran medida ($P < 0,05$; Figura 8). Del mismo modo, el CIS causó un aumento significativo ($P < 0,05$) en la proporción de células con contenido de ADN hipodiploide (población sub-G1), es decir, células apoptóticas. Por otra parte, cuando el cultivo de células HT-29 fue estimulado con 1 mM de 5-FU durante 24 h, se observó un notable aumento ($P < 0,05$) en el número de células apoptóticas y una consiguiente reducción ($P < 0,05$) en el número de células en fase G2/M (Figura 8). Sin embargo, la administración simultánea de melatonina y los agentes quimioterapéuticos durante 24 h no modificó ni el arresto en fase S inducido por CIS, ni las proporciones de células sub-G1 inducidas tanto por CIS como por 5-FU (Figura 8).

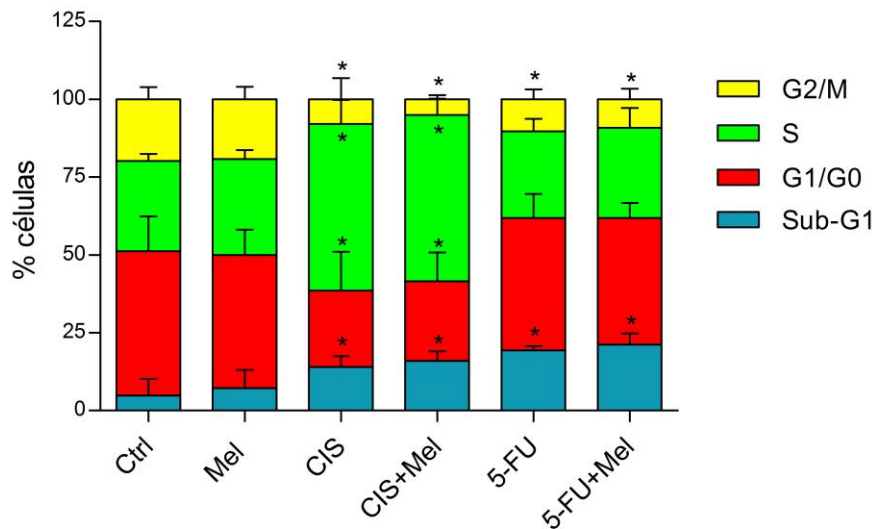


Figura 8. El cisplatino y el 5-fluorouracilo afectan de manera diferente a la distribución del ciclo celular. Las células HT-29 fueron tratadas con 20 μ M de cisplatino (CIS), 1 mM de 5-fluorouracilo (5-FU), o el vehículo (control), en ausencia o presencia de 1 mM de melatonina (Mel) durante 24 h. Los datos de la distribución del ciclo celular se resumieron y presentaron como porcentaje de células. La tasa de células con contenido de ADN hipodiploide (población sub-G1) se consideró apoptótica. Los valores se presentan como media \pm EEM de seis experimentos independientes. * $P < 0,05$ en comparación con su valor de control correspondiente.

A continuación, se estimó la contribución de la producción intracelular de ERO y la activación de la caspasa-9 a la muerte celular inducida por los agentes quimioterapéuticos. Para este propósito, se analizaron las células HT-29 con el doble marcaje DCF+Red-LEHD-FMK por citometría de flujo. La Figura 9A representa los citogramas característicos para cada tratamiento ensayado. La estimulación de células HT-29 con 1 mM de melatonina durante 24 h provocó una disminución en el porcentaje de células intactas ($69,4 \pm 2,1\%$; DCF-/Caspasa-9-), mientras que aumentó ligeramente la proporción tanto de células con altos niveles de ERO ($16,4 \pm 4,0\%$; DCF+/Caspasa 9-) como de células apoptóticas tempranas ($7,1 \pm 1,9\%$; DCF-/Caspasa-9+; Figura 9).

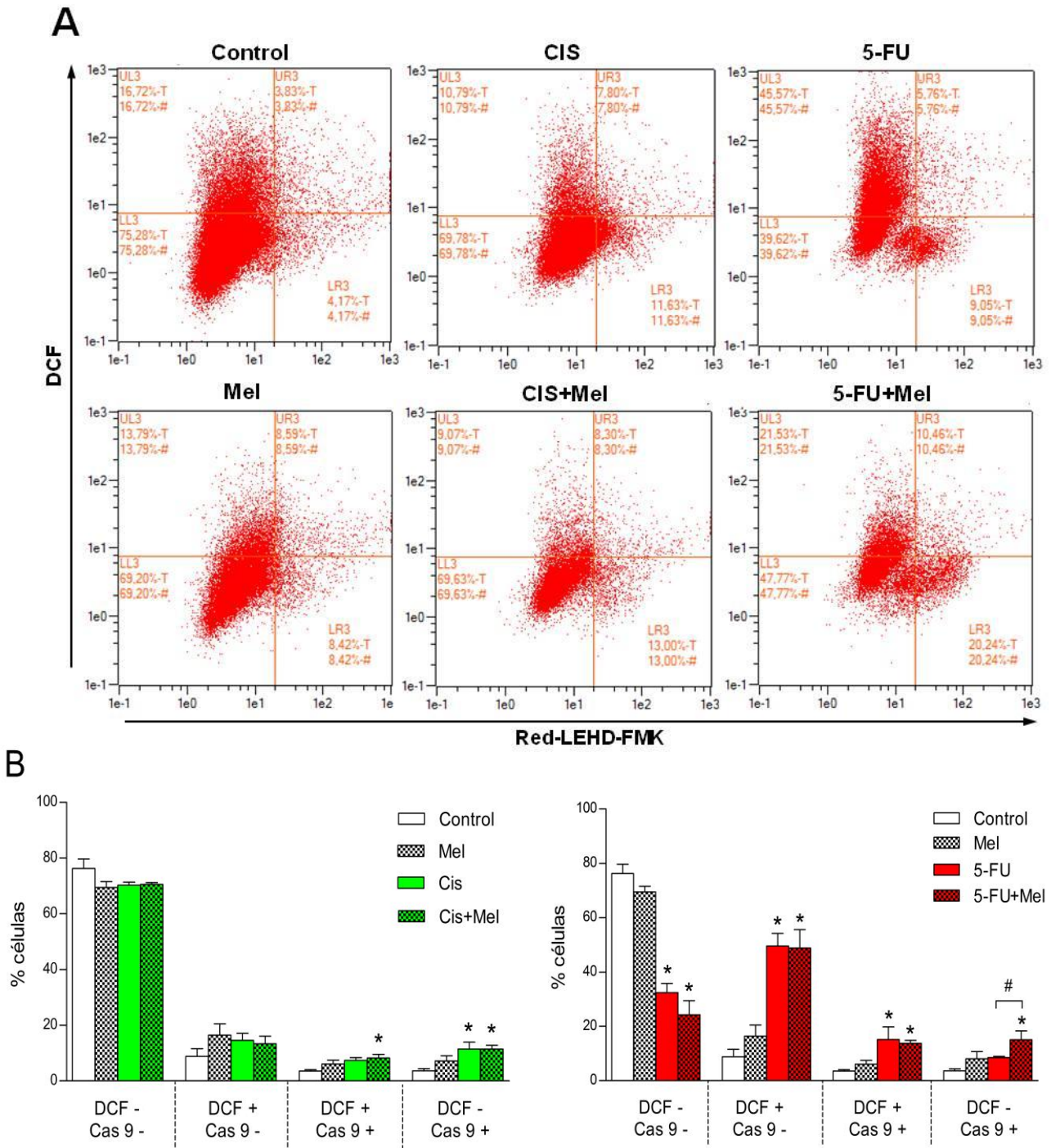


Figura 9. La melatonina potencia la apoptosis mediada por caspasa inducida por agentes quimioterapéuticos. Las células HT29 fueron tratadas con 20 μ M de cisplatino (CIS), 1 mM de 5-fluorouracilo (5-FU), o el vehículo (control), en ausencia o presencia de 1 mM de melatonina (Mel) durante 24 h. La producción de ERO y la activación de caspasa-9 se analizaron en células doblemente marcadas (DCF y Red-LEHD-FMK) por citometría de flujo, como se describe en Material y Métodos. A) Citogramas representativos que muestran células estimuladas para la producción de ERO (DCF+/Caspasa-9-), células que entran en la apoptosis mitocondrial debido a sobreproducción de ERO (DCF+/Caspasa-9+), y células apoptóticas tempranas (células DCF-/Caspasa-9+) después de 24 horas de

tratamiento con la combinación indicada de fármacos. B) Histogramas que muestran los porcentajes de cada subpoblación celular. Los valores se presentan como media \pm EEM de seis experimentos independientes. * $P < 0,05$ en comparación con los valores de control. # $P < 0,05$ en comparación con su valor correspondiente en ausencia de melatonina.

En relación con los agentes quimioterapéuticos, los tratamientos con 20 μM de CIS durante 24 h indujeron un aumento en la cantidad de células que entraron en la apoptosis mitocondrial debido a sobreproducción de ERO (DCF+/Caspasa-9+; $7,4 \pm 0,9\%$) y células apoptóticas tempranas ($11,3 \pm 2,5 \%$, $P < 0,05$) a expensas del porcentaje de células intactas, el cual se redujo ($70,2 \pm 1,0\%$; Figura 9B, panel izquierdo). El co-tratamiento con CIS y melatonina no potenció los efectos pro-oxidantes y pro-apoptóticos del CIS en el cultivo de células HT-29 (Figura 9B, panel izquierdo).

En cuanto al 5-FU, la estimulación de las células HT-29 con 1 mM de 5-FU durante 24 h aumentó notablemente ($P < 0,05$) el número de células con altos niveles de ERO ($49,6 \pm 4,5\%$) y la proporción de células que entran en apoptosis mitocondrial debido a la sobreproducción de las mismas ($15,1 \pm 3,3\%$), mientras que redujo drásticamente ($P < 0,05$) la cantidad de células intactas ($32,5 \pm 4,5\%$; Figura 9B, panel derecho). Curiosamente, los efectos pro-apoptóticos del 5-FU fueron potenciados en presencia de melatonina. De hecho, el número de células apoptóticas tempranas fue significativamente incrementado ($P < 0,05$) ($15,1 \pm 3,2\%$), en detrimento del porcentaje de células intactas, el cual disminuyó ($24,3 \pm 5,1\%$; Figura 9B, panel derecho), en comparación con células HT-29 tratadas únicamente con 5-FU.

Finalmente, se analizó la activación de la caspasa-3 en células HT-29 tratadas con ambos agentes quimioterapéuticos. El tratamiento con 1 mM de melatonina durante 24 h originó un gran aumento de la actividad de la caspasa-3 ($P < 0,05$; Figura 10). Por otra parte, los tratamientos con 20 μM CIS y 1 mM 5-FU durante 24 h también provocaron un notable incremento de la actividad de la caspasa-3 ($P < 0,05$; Figura 10). También cabe destacar que la melatonina fue capaz de mejorar la activación de la caspasa-3 inducida por ambos agentes quimioterápicos. De hecho, el tratamiento de las células HT-29 con 20 μM de CIS o 1 mM de 5-FU en presencia de 1 mM de melatonina durante 24 h potenció marcadamente ($P < 0,05$) la activación de la caspasa-3 (Figura 10).

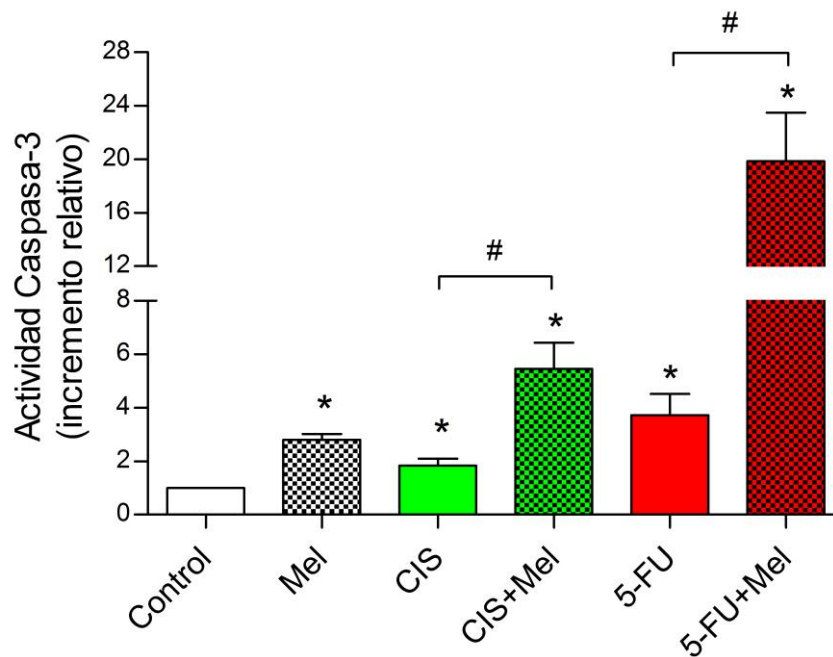


Figura 10. La melatonina potencia la activación de caspasa-3 inducida por agentes quimioterapéuticos. Las células HT-29 se trataron con 20 μ M de cisplatino (CIS), 1 mM de 5-fluorouracilo (5-FU), o el vehículo (control), en ausencia o presencia de 1 mM de melatonina (Mel) durante 24 h. Los valores se presentan como media \pm EEM de ocho experimentos independientes y se expresan como incremento relativo sobre el nivel de pretratamiento (experimental/control). * $P < 0,05$ en comparación con los valores de control. # $P < 0,05$ en comparación con su valor correspondiente en ausencia de melatonina.

4.3 Participación de los receptores MT3 de la melatonina en el efecto sinérgico de la melatonina sobre las acciones citotóxicas y apoptóticas inducidas por agentes quimioterápicos en las líneas celulares tumorales HT-29 y HeLa.

La figura 11 muestra la viabilidad de células humanas de cáncer colorectal HT-29 y de cáncer cervical uterino HeLa estimuladas con melatonina en ausencia y presencia de antagonistas de los receptores de la hormona. Como se puede observar en la figura 11, la estimulación de células HT-29 (Figura 11A y B) o células HeLa (Figura 11C y D) con melatonina 1 mM durante 48 horas indujo una reducción significativa ($P < 0,05$) de la viabilidad celular ($75,8 \pm 8,9 \%$ y $73,8 \pm 7,3 \%$, respectivamente), tal como se visualiza también en la microscopía de contraste de fase (Figuras 11B y D).

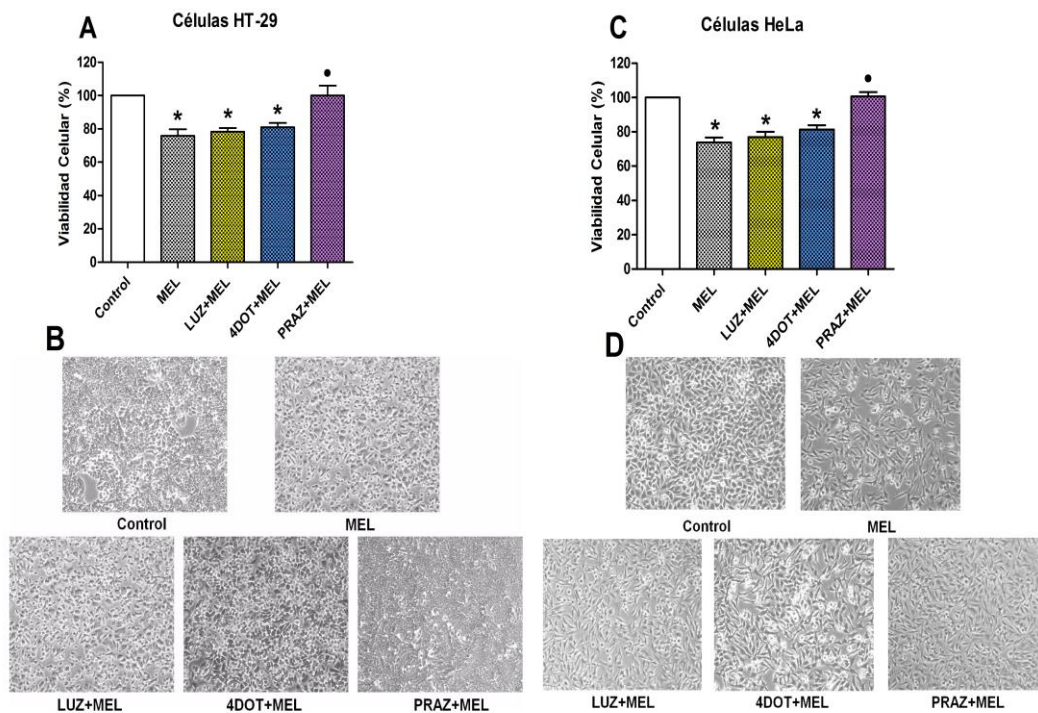


Figura 11. Efecto de los antagonistas de los receptores de melatonina sobre la viabilidad celular de las células HT-29 y HeLa. Las células se pretrataron durante 30 minutos con $5 \mu\text{M}$ de luzindol (LUZ), $50 \mu\text{M}$ de 4-P-PDOT-4 (4DOT) o con 10 nM de prazosin (PRAZ), o su vehículo correspondiente, en ausencia o presencia de 1 mM de melatonina (MEL) durante 48 h. (A y C) La viabilidad celular se evaluó mediante el ensayo MTT. Los valores se presentan como media \pm SEM de 4-5 experimentos independientes y se expresan como porcentaje con respecto a los valores del control (células no tratadas). (B y D) Las células se visualizaron bajo microscopía de contraste de fase, y se muestra un campo representativo de cada grupo experimental. * $P < 0,05$ comparado con los valores del control. • $P < 0,05$ comparado con su valor correspondiente en ausencia de prazosin.

Con objeto de examinar si este efecto de la melatonina sobre la viabilidad celular podría depender de los receptores de melatonina, analizamos el efecto de los antagonistas de los receptores de esta indolamina. Para este propósito, las células fueron

pretratadas con luzindol, que antagoniza específicamente la unión a la melatonina y la activación de los receptores MT1/MT2; 4-P-PDOT, que antagoniza selectivamente los receptores MT2; o prazosin, un antagonista de los receptores MT3. Los pretratamientos de las células HT-29 y HeLa durante 30 minutos con 5 μM de luzindol o 50 μM de 4-P-PDOT produjeron un ligero efecto no significativo sobre la viabilidad celular inducida por la melatonina ($78,2 \pm 6,1 \%$ y $81,0 \pm 6,8 \%$, respectivamente, Figura 11A; $77,0 \pm 6,4 \%$ y $81,5 \pm 5,7 \%$, respectivamente, Figura 11C), mientras que el pretratamiento de células durante 30 minutos con 10 nM de prazosin revirtió significativamente el efecto de la melatonina sobre la viabilidad celular ($100,1 \pm 5,8 \%$ en células HT-29, Figura 11A; $100,7 \pm 3,9 \%$ en células HeLa, Figura 11C; $P < 0,05$).

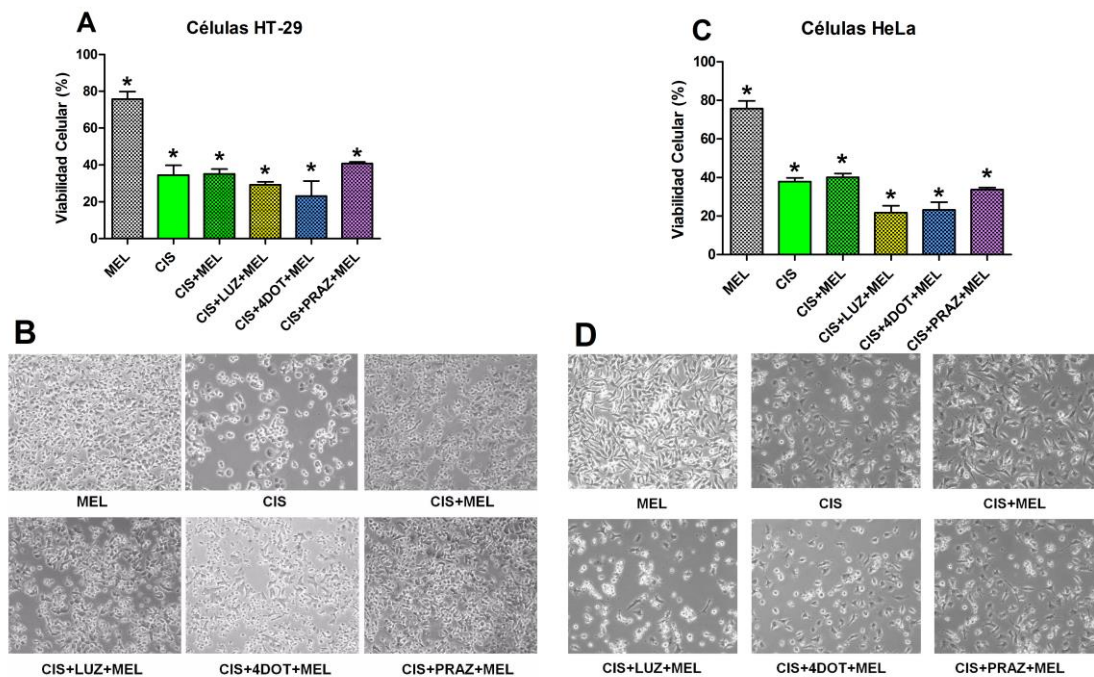


Figura 12. Efecto de la melatonina sobre la citotoxicidad inducida por cisplatino en células HT-29 y HeLa. Las células se pretrataron durante 30 minutos con 5 μM de luzindol (LUZ), 50 μM de 4-P-PDOT (4DOT) o 10 nM de prazosin (PRAZ), o el vehículo correspondiente, y luego se incubaron con 20 μM de cisplatino (CIS), o su vehículo (control), en ausencia o presencia de 1 mM de melatonina (MEL) durante 48 h. (A y C) La viabilidad celular se evaluó mediante el ensayo MTT. Los valores se presentan como media \pm SEM de 5 experimentos independientes y se expresan como porcentaje con respecto a los valores del control (células no tratadas). (B y D) Las células se visualizaron bajo microscopía de contraste de fase, y se muestra un campo representativo de cada grupo experimental. * $P < 0,05$ en comparación con los valores del control.

Ninguno de los antagonistas (luzindol, 4-P-PDOT o prazosin) por sí solo tuvo efecto alguno sobre la viabilidad de las células HT-29 o HeLa (datos no mostrados).

También analizamos los efectos del co-tratamiento de células HT-29 y HeLa con melatonina en presencia de dos agentes quimioterapéuticos, como el cisplatino (CIS) o el 5-fluorouracilo (5-FU). Se observaron disminuciones significativas ($P < 0,05$) en la viabilidad celular tras la estimulación de las células durante 48 horas con 20 μM de CIS (Figura 12) o con 1 mM de 5-FU (Figura 13) ($34,5 \pm 9,1$ % y $30,7 \pm 4,7$ %, respectivamente, en células HT-29; $37,9 \pm 8,4$ % y $22,7 \pm 3,9$ %, respectivamente, en células HeLa). Resultados similares observamos en las fotografías obtenidas con el microscopio de contraste de fase, donde se observa que el tratamiento con CIS (Figuras 12B y D) y 5-FU (Figuras 13B y D) reduce el número de células en cultivo y por lo tanto, la proliferación celular.

Además, se realizaron ensayos paralelos para examinar el posible efecto potenciador de la melatonina sobre la citotoxicidad inducida por los agentes quimioterápicos. Así, cuando las células HT-29 y HeLa se incubaron con los agentes quimioterapéuticos durante 48 horas en presencia de 1 mM de melatonina, la indolamina logró reducir aún más la viabilidad celular de las células HT-29 sometidas a quimioterápicos, siendo este efecto estadísticamente significativo ($P < 0,05$) para las células tratadas con 1 mM de 5-FU (Figura 13) ($11,1 \pm 1,3$ %, en células HT-29; $10,7 \pm 1,9$ %, en células HeLa), sin embargo, no se observaron diferencias adicionales después de 48 horas de estimulación de células con 20 μM de CIS (Figura 12).

También evaluamos el efecto de los antagonistas de los receptores de la melatonina sobre el efecto sinérgico de la indolamina sobre la citotoxicidad inducida por los agentes quimioterápicos. Como se muestra en las figuras 12 y 13, el bloqueo de los receptores MT1 y/o MT2 con 5 μM de luzindol o 50 μM de 4-P-PDOT fue incapaz de revertir los efectos de la melatonina sobre la citotoxicidad evocada por 20 μM de CIS y 1 mM de 5-FU; mientras que cuando los receptores MT3 se bloquearon con 10 nM de prazosin, el efecto sinérgico de la melatonina con los agentes quimioterápicos fue significativamente revertido ($P < 0,05$), particularmente en las células tratadas con 5-FU (Figura 13). Tomados en conjunto, estos resultados indican que el efecto potenciador de la melatonina sobre la actividad citotóxica de los agentes quimioterapéuticos está

mediado por la transducción de señales provocada por la estimulación del receptor MT3 de la melatonina.

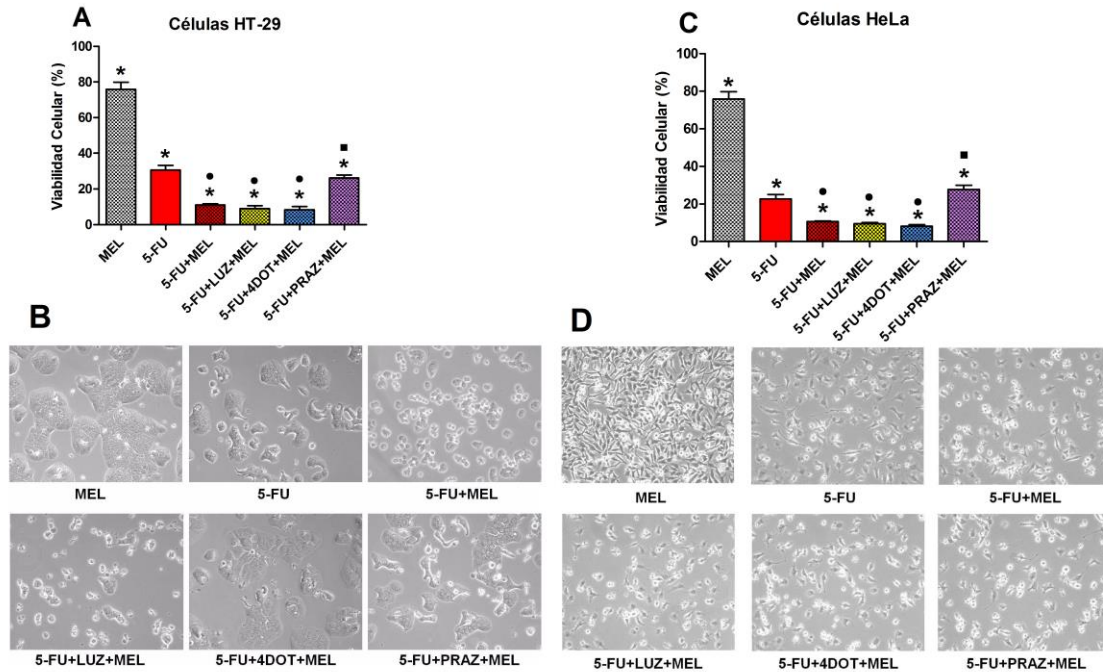


Figura 13. Efecto de la melatonina sobre la citotoxicidad inducida por 5-fluorouracilo en células HT-29 y HeLa. Las células se pretrataron durante 30 minutos con 5 μ M de luzindol (LUZ), 50 μ M de 4-P-PDOT o con 10 nM de prazosin (PRAZ), o el vehículo correspondiente, y luego se incubaron con 1 mM de 5-fluorouracilo (5-FU), o su vehículo (control), en ausencia o presencia de 1 mM de melatonina (MEL) durante 48 h. (A y C) La viabilidad celular se evaluó mediante el ensayo MTT. Los valores se presentan como media \pm SEM de 4-6 experimentos independientes y se expresan como porcentaje respecto de los valores del control (células no tratadas). (B y D) Las células se visualizaron bajo microscopía de contraste de fase, y se muestra un campo representativo de cada grupo experimental. * $P < 0,05$ en comparación con los valores del control. * $P < 0,05$ en comparación con su valor correspondiente en presencia de 5-FU solo. $\blacksquare P < 0,05$ en comparación con su valor correspondiente en presencia de 5-FU + MEL solos.

Por otra parte, y con el fin de verificar si los efectos sinérgicos de la melatonina con los agentes quimioterapéuticos sobre la actividad citotóxica estaban mediados por la activación solamente de los receptores MT3, las células fueron tratadas con 6-cloromelatonina (CLM) (un potente agonista con alta afinidad por los receptores MT1 y MT2 de la melatonina) o 8-M-PDOT (un agonista selectivo para el subtipo de receptor MT2 de la melatonina).

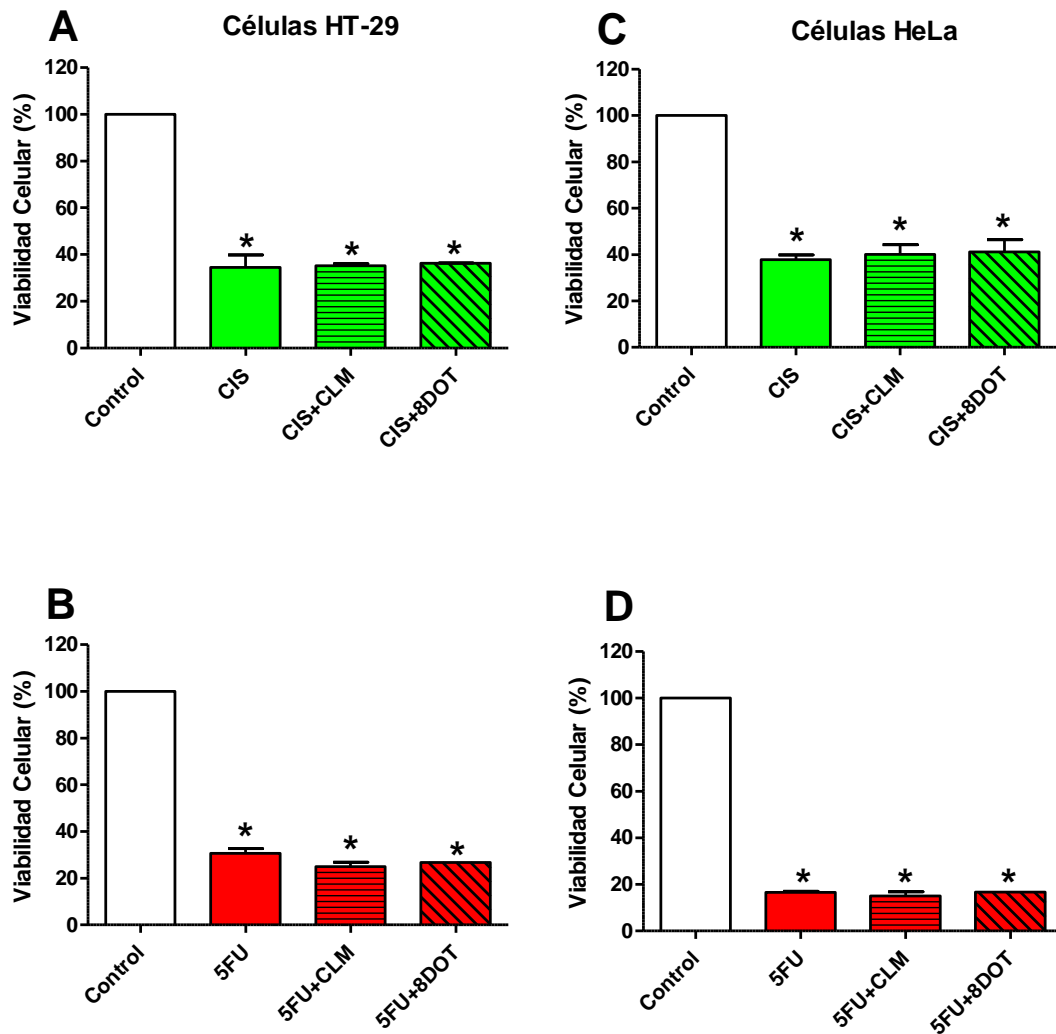


Figura 14. Efecto de agonistas de receptores de melatonina sobre la citotoxicidad mediada por los agentes quimioterápicos en células HT-29 y HeLa. Las células se trataron con 20 μM de cisplatino (CIS) (A y C) o 1 mM de 5-fluorouracilo (5-FU) (B y D) o con el vehículo correspondiente (control), en ausencia o presencia de 100 nM de 6-cloromelatonina (CLM) o 100 nM de 8-M-PDOT (8DOT) durante 48 h. La viabilidad celular se evaluó mediante el ensayo MTT. Los valores se presentan como media \pm SEM de 4 experimentos independientes y se expresan como porcentaje de los valores de control (células no tratadas). *P < 0,05 en comparación con los valores de control.

Como se muestra en la figura 14, el tratamiento de células HT-29 durante 48 horas con 100 nM de 6-cloromelatonina o 100 nM de 8-M-PDOT en presencia de 20 μM de CIS (Figura 14A) o de 1 mM 5-FU (Figura 14B) fueron incapaces de modificar el efecto citotóxico de ambos agentes quimioterapéuticos. Similares resultados se

obtuvieron en las células HeLa (Figura 14C y D), indicando que la estimulación de los receptores MT1 o MT2 con agonistas específicos no participan significativamente en el efecto potenciador de la melatonina sobre la acción citotóxica de los dos agentes quimioterápicos utilizados por nosotros. Ni la 6-cloromelatonina ni el 8-M-PDOT por sí solo tuvieron efecto sobre la viabilidad de las células HT-29 o HeLa (datos no mostrados).

Además, y con objeto de analizar si los efectos potenciadores de los receptores de la melatonina y los agentes quimioterapéuticos sobre la viabilidad celular estaban relacionados con una muerte celular inducida por apoptosis, se analizó la activación de la caspasa-3, tanto en células pretratadas con antagonistas de los receptores de melatonina como en células control. El tratamiento de las células HT-29 con 1 mM de melatonina durante 48 horas produjo un aumento significativo de la actividad de caspasa-3 ($2,8 \pm 0,2$ veces sobre el control, $P < 0,05$, Figura 15A y B). Además, los tratamientos con 20 μM de CIS o 1 mM de 5-FU durante 48 horas también incrementaron significativamente ($P < 0,05$) la actividad enzimática de la caspasa-3 ($2,3 \pm 0,4$ y $4,9 \pm 0,5$ veces sobre el control, respectivamente, Figura 15A y B). Es importante destacar que la melatonina fue capaz de aumentar la activación de caspasa-3 evocada por los agentes quimioterápicos. De hecho, el tratamiento de las células HT-29 durante 48 horas con 20 μM de CIS (Figura 15A) o con 1 mM de 5-FU (Figura 15B) en presencia de 1mM de melatonina potenció significativamente ($P < 0,05$) la actividad enzimática de la caspasa-3 ($5,4 \pm 1,6$ and $28,3 \pm 4,8$ veces sobre el control, respectivamente), con respecto a los tratamientos de cada agente quimioterapéutico cuando se administraban por separado. Vale la pena mencionar que el 5-FU en presencia de la melatonina fue el agente quimioterápico más eficaz en términos de activación enzimática de la caspasa-3, siendo la estimulación 23 veces mayor que la actividad basal de dicha caspasa (Figura 15B).

En el caso de las células HeLa, el tratamiento durante 48 horas tanto con la dosis de 1 mM de melatonina, como con 20 μM de CIS como con 1 mM de 5-FU también se mostraron eficaces de incrementar significativamente ($P < 0,05$) la actividad enzimática

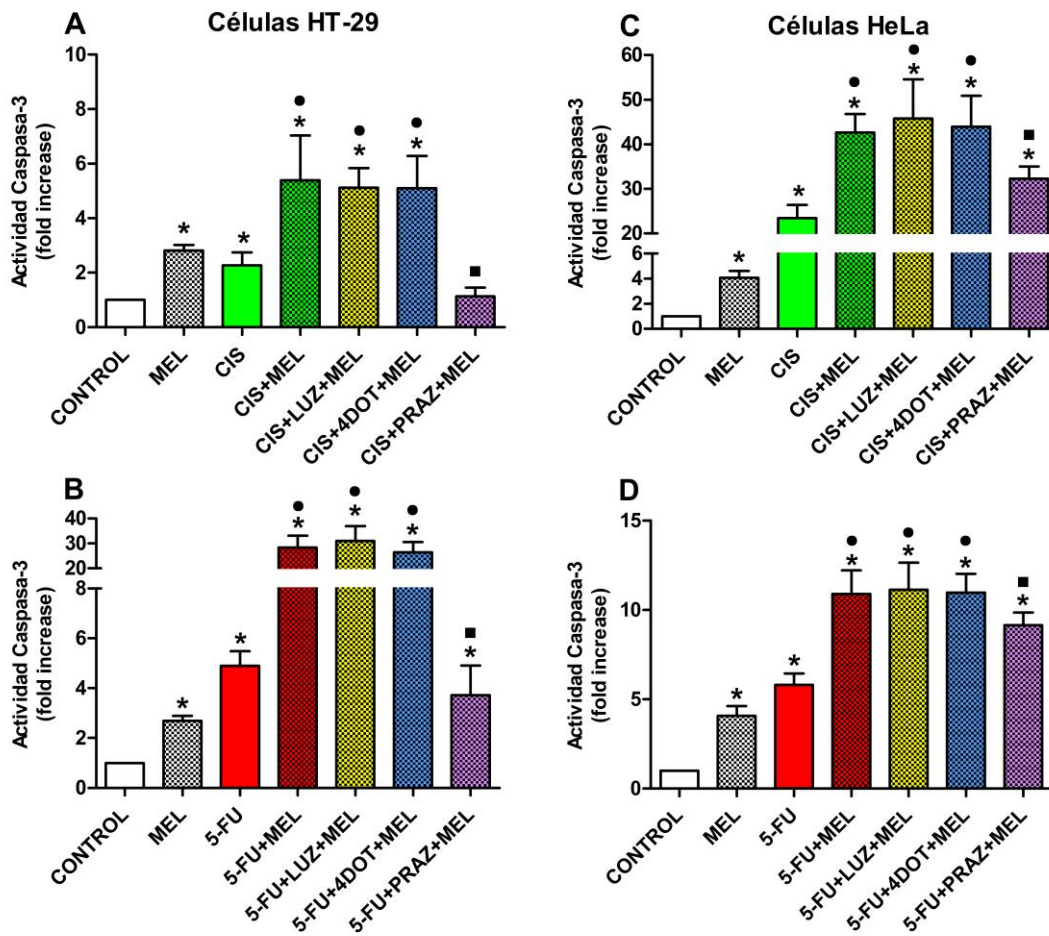


Figura 15. Efecto de la melatonina sobre la activación enzimática de la caspasa-3 mediada por los agentes quimioterapicos en HT-29 (A y B) y células HeLa (C y D). Las células se pretrataron durante 30 minutos con 5 μ M de luzindol (LUZ), 50 μ M de 4-PDOT (4DOT) o 10 nM de prazosin (PRAZ), o el vehículo correspondiente, y luego se incubaron con 20 μ M de cisplatino (CIS) o 1 mM de 5-fluorouracilo (5-FU), o el vehículo correspondiente (control), en ausencia o presencia de 1 mM de melatonina (MEL) durante 48 h. La actividad enzimática de la caspasa 3 se estimó como se describe en Material y métodos. Los valores se presentan como media \pm SEM de 6-7 experimentos independientes y se expresan como incrementos sobre pretratamiento (experimental/control). *P <0,05 en comparación con los valores de control. *P<0,05 en comparación con su valor correspondiente en presencia de CIS o 5-FU solo. *P<0,05 en comparación con su valor correspondiente en presencia de CIS o 5-FU + MEL solos.

de la caspasa-3 (Figura 15C y D), aunque en este caso las células HeLa mostraron mayor sensibilidad al tratamiento con CIS ($23,4 \pm 4,7$ veces sobre el control) que al de 5-FU ($5,8 \pm 1,0$ veces sobre el control). De una manera similar, el tratamiento durante 48 horas de las células HeLa con 1 mM de melatonina también potenció

significativamente ($P < 0,05$) la actividad enzimática de la caspasa-3 provocada por las dosis de 20 μM de CIS (Figura 15C) y 1 mM de 5-FU (Figura 15D).

Del mismo modo, también quisimos analizar el efecto de los antagonistas de los receptores de melatonina sobre la actividad enzimática caspasa-3 en presencia de melatonina y los dos agentes quimioterapéuticos utilizados por nosotros en este estudio. Como se muestra en la figura 15, los pretratamientos durante 30 minutos con 5 μM de luzindol (un antagonista de los receptores MT1/MT2) o 50 μM de 4-P-PDOT (que antagoniza selectivamente al receptor MT2) fueron incapaces de revertir los efectos potenciadores de la melatonina sobre la actividad caspasa-3 inducida por 20 μM de CIS o 1 mM de 5-FU; mientras que cuando los receptores MT3 se bloquearon por el pretratamiento durante 30 minutos con 10 nM de prazosin, el efecto sinérgico de la melatonina con los agentes quimioterápicos fue significativamente ($P < 0,05$) revertido (Figura 15), tanto en las células HT-29 (Figura 15A y B) como en las HeLa (Figura 15C y D).

5. DISCUSIÓN GENERAL

La apoptosis o muerte celular programada es un proceso fisiológico esencial que juega un papel crítico en el desarrollo embrionario y la homeostasis de los tejidos (Liu y cols., 1996; Strasser y cols., 2000). Sin embargo, cualquier defecto en el control de la apoptosis puede conducir a determinadas condiciones patológicas como el cáncer, cuando aumenta la proliferación celular de manera indiscriminada, es decir, cuando la tasa de apoptosis está disminuida; mientras que puede causar enfermedades neurodegenerativas y autoinmunes cuando la tasa de muerte celular está aumentada (Thompson 1995).

En cuanto a la melatonina, es una molécula multifuncional que emplea una amplia variedad de mecanismos para modular la fisiología y la biología molecular de las células (Reiter y cols., 2010). Sin embargo, en los últimos años, la melatonina ha atraído mucha atención debido a su influencia en el proceso apoptótico. El mecanismo preciso por el que la melatonina regula la apoptosis sigue siendo objeto de estudio, aunque se ha descrito que esta indolamina posee acciones tanto pro- como anti-apoptóticas dependiendo del tipo de célula (Sainz y cols., 2003b). Por otro lado, estudios recientes han demostrado que la quimioterapia combinada es útil para superar algunos tumores (Wang y cols., 2014) y, por lo tanto, el uso simultáneo de agentes quimioterápicos habituales junto a otros agentes proporcionaría un enfoque más eficaz para sensibilizar a las células tumorales frente a la quimioterapia. En este contexto, el uso de la melatonina como terapia adyuvante podría ser de gran interés, como ha sido sugerido previamente (Rodríguez-García y cols., 2013). Así mismo, en la presente Tesis Doctoral se ha investigado el posible efecto potenciador de la melatonina en la citotoxicidad y apoptosis inducida por diferentes agentes quimioterapéuticos, tanto en la línea celular HeLa de cáncer de cuello cérvico-uterino humano como en células HT-29 de cáncer colorrectal humano.

En primer lugar, observamos que la melatonina *per se* es capaz de mostrar actividad citotóxica, pro-oxidante y pro-apoptótica en estas dos líneas celulares. En este sentido, resultados previos de nuestro grupo de investigación habían indicado también un efecto pro-apoptótico en diversos tipos celulares tales como células tumorales de páncreas, de hígado, de cáncer de próstata y de leucemia (Bejarano y cols., 2009; 2010; 2011a; Uguz y cols., 2012), coincidiendo con resultados similares de otros grupos de investigación (Joo y Yoo, 2009; Fan y cols, 2010; Leja-Szpak y cols., 2010).

En cuanto a la línea celular HeLa, en esta Tesis Doctoral hemos demostrado que la indolamina es eficaz sobre la capacidad de diferentes agentes quimioterapéuticos para disminuir la viabilidad de dichas células tumorales. A pesar haber probado cinco agentes quimioterapéuticos, los resultados más sorprendentes fueron los relacionados con la estimulación paralela de células HeLa con cisplatino y melatonina, mientras que en las células HT-29 la melatonina mostró mayor eficacia potenciadora sobre la actividad del 5-fluorouracilo, el cual es el agente quimioterapéutico más efectivo y ampliamente utilizado en el tratamiento del cáncer colorectal. Por ejemplo, nuestros resultados han indicado que la melatonina logra potenciar la activación de la caspasa-3 inducida por cisplatino en células HeLa, siendo la estimulación unas 40 veces mayor que la actividad basal de la caspasa-3 (23 veces más alta que la actividad de caspasa-3 activada por cisplatino solo). Por otro lado, la melatonina sólo mostró efectos de quimiosensibilización leves o moderados en células HeLa tratadas con doxorubicina o 5-fluorouracilo, respectivamente; sin embargo, no fue capaz de sensibilizar significativamente a las células HeLa a citarabina y etopósido, dos agentes de quimioterapia generalmente utilizados para el tratamiento de la leucemia. En este sentido, estudios previos han demostrado que la melatonina refuerza el efecto de doxorubicina o puomicina en diversas líneas celulares tumorales, incluyendo células de cáncer de sarcoma de Ewing humano (Casado-Zapico y cols., 2010), líneas celulares de hepatoma humano (Fan y cols., 2010), línea celular de leucemia humana HL-60 (Koh y cols., 2011), así como en la línea celular A-549 de cáncer de pulmón humano (Fic y cols., 2007). Consideramos que la eficacia de la melatonina en la sensibilización de las células HeLa a 5-fluorouracilo o doxorubicina debe ser analizado más profundamente ya que la indolamina tiende a aumentar, aunque sea solo ligeramente, las acciones anticancerígenas de estos dos agentes de quimioterapia. Por tanto, tiempos de exposición más largos (72 y 96 horas) serían probablemente necesarios para que la melatonina quimiosensibilizara las células HeLa al 5-fluorouracilo o incluso doxorubicina. Los diferentes mecanismos genotóxicos involucrados en los efectos perjudiciales de todos estos fármacos de quimioterapia pueden explicar el hecho de que cisplatino, un agente de tipo alquilante que bloquea la replicación y transcripción del ADN por inducción de aductos de ADN, fue más eficaz que otros fármacos quimioterapéuticos en combinación con melatonina.

En las células HT-29 de cáncer colorrectal humano, pudimos comprobar que la melatonina incrementaba fundamentalmente la capacidad citotóxica y pro-apoptótica al 5-fluorouracilo, y en menor medida al cisplatino. Estas diferencias pueden ser explicadas en base a los diferentes mecanismos anti-cáncer ejercidos por ambos agentes quimioterapéuticos. Además, en relación a los efectos de la melatonina sobre la viabilidad tanto de las células HT-29 como de las HeLa, pudimos comprobar que este efecto dependía, por lo menos en parte, de la activación de los receptores citosólicos MT3 de la melatonina, ya que el efecto inhibitor de la melatonina solo se revertía en presencia de prazosin (un antagonista de los receptores MT3), mientras que no se modificaba cuando se antagonizaban los receptores MT1/MT2 por la presencia de luzindol o de 4-P-PDOT.

Por otro lado, en cuanto a los diversos tratamientos ensayados en la línea celular HT-29, destacar que la melatonina incrementó la capacidad citotóxica del 5-fluorouracilo, pero no sensibilizó de forma significativa a estas células tras los tratamientos con cisplatino, ni modificó el arresto del ciclo celular inducida por cisplatino. Estos hallazgos pueden explicarse sobre la base de los diferentes mecanismos que impulsan los efectos anticancerígenos del cisplatino y del 5-fluorouracilo. De hecho, el tratamiento con cisplatino generó principalmente acciones oncostáticas representados como la parada de la fase S del ciclo celular, que condujo a una reducción de la proliferación celular, mientras que 5-fluorouracilo de forma notable desencadenó apoptosis dependiente de especies reactivas de oxígeno lo cual a su vez dio lugar a una significativa disminución en la viabilidad celular. También vale la pena destacar que, aunque hay cierto consenso de que la melatonina es capaz de aumentar la eficacia de la quimioterapia (Kim y cols., 2012; Uguz y cols., 2012; Plaimee y cols., 2015; Pariente y cols., 2016), algunos estudios previos también han encontrado resultados contradictorios. De hecho, se ha descrito que la melatonina disminuye la fragmentación nuclear inducida por idarrubicina en células leucémicas K562 (Majsterek y cols., 2005) y atenúa las acciones anti-cáncer de cisplatino en células HepG2 de carcinoma de hígado (Bennukul y cols., 2014). Otros estudios también han demostrado que la combinación de melatonina con agentes quimioterapéuticos como la citarabina y el etopósido no logra beneficios adicionales en el tratamiento contra el cáncer (Büyükcavci y cols., 2011; Pariente y cols., 2016). Aun así, un número sustancial de

estudios proporciona pruebas de que la melatonina mitiga los efectos secundarios producidos por los agentes quimioterapéuticos (Kilic y cols., 2013; Madhu y cols., 2015; Demir y cols., 2015). En particular, se sugiere que la indolamina, que favorece la protección contra la oxidación mitocondrial (Espino y cols., 2011c), podría mejorar los efectos secundarios debido a un incremento de los procesos oxidativos inducidos por la quimioterapia (Kilic y cols., 2013; Madhu y cols., 2015; Demir y cols., 2015).

Por otra parte, la melatonina, además de su poderosa actividad antioxidante (Tan y cols., 2007; Zhang y Zhang 2014), también muestra acciones protectoras contra la quimioterapia, que puede ser debida, al menos en parte, a una reducción de la producción de especies reactivas de oxígeno en células normales no tumorales (Reiter y cols., 2002). Sin embargo, en los últimos años sorprendentes hallazgos han indicado que la melatonina parece comportarse como molécula pro-oxidante en células tumorales (Zhang y Zhang 2014; Bejarano y cols., 2010). En la presente Tesis Doctoral, hemos presentado pruebas experimentales de que la melatonina estimula la producción intracelular de especies reactivas de oxígeno, y por lo tanto conduce a un estrés oxidativo, en células HeLa de cáncer cervical humano, determinados por incrementos en la población de células DCF + / caspasa 9 +. No obstante, algunos estudios han sugerido que los endo-peróxidos derivados de la melatonina podrían ser las moléculas responsables del efecto pro-oxidante observado por la melatonina (Medina-Navarro y cols., 1999; Sánchez-Sánchez y cols., 2011). Otros autores también han indicado que la melatonina disminuye los niveles de mRNA de enzimas antioxidantes y los niveles celulares de GSH en algunos tipos de tumores, lo que pueden ser fácilmente relacionado con el aumento de la producción de especies reactivas de oxígeno (Sánchez-Sánchez y cols., 2011). Asimismo, se ha demostrado que la producción de especies reactivas de oxígeno mediada por melatonina está relacionada con la activación de NF- κ B, lo que indica que esta activación podría estar implicada en el efecto pro-oxidante de la melatonina (Cristofanon y cols.; 2009).

La producción de especies reactivas de oxígeno inducida con melatonina desencadenó posteriormente apoptosis mitocondrial dependiente de caspasa-9 en células HeLa, como muestra el aumento observado en la proporción de células DCF + / caspasa 9 +. En este sentido, Osseni y colaboradores (Osseni y cols., 2000) demostraron que había un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno y una disminución

simultánea en la viabilidad de las células HepG2 tras 45 minutos de estimulación con melatonina (a concentraciones superiores a 100 μM). Además, Buyukavci y colaboradores (2006) encontraron que la melatonina produjo una mejora en la producción de especies reactivas de oxígeno y así como un incremento simultáneo de la apoptosis en varias líneas de células de cáncer hematológico. Curiosamente, resultados de esta Tesis Doctoral indicaron que la melatonina potenció las acciones proapoptóticas de 5-fluorouracilo y, especialmente, de cisplatino en células HeLa. De hecho, cuando se comparó con los tratamientos únicamente con cisplatino, la incubación conjunta de cisplatino y melatonina rápidamente incrementó la activación de la caspasa-9 mediada por estrés oxidativo en células HeLa, además de incrementar notablemente la actividad enzimática de la caspasa-3, acelerando así el inicio de la apoptosis y conduciendo la fase apoptótica de las células, según lo determinado por aumentos significativos en la relación de células DCF + / caspasa 9 +. A pesar del hecho de que algunos autores han afirmado que la melatonina puede modular la apoptosis inducida por cisplatino o a través de la inactivación de las señales de supervivencia (Kim y cols., 2012) o bien a través de la regulación de la autofagia y sistemas de reparación del ADN (Bennukul y cols., 2014), los mecanismos responsables de los efectos potenciadores de la melatonina en la apoptosis mitocondrial mediada por cisplatino aún permanecen por aclararse. Es importante destacar que está claro que los efectos citotóxicos de cisplatino no son una mera consecuencia de su actividad genotóxica, sino que provienen de vías de señalización citoplasmática que pueden implicar: (i) la acumulación de especies reactivas de oxígeno y óxido nítrico, que no sólo agravan la genotoxicidad de cisplatino sino que también ejercen efectos citotóxicos directos favoreciendo la apertura del llamado complejo de poros de permeabilidad transitoria (PTPC); (ii) la transducción de una señal estimuladora de la permeabilidad de la membrana externa mitocondrial (MME) a través del miembro de la familia Bcl-2 proapoptótico Bak1, el canal aniónico dependiente de la tensión del componente PTPC 1 (VDAC1) y el homólogo Bak1 Bax; y (iii) la activación de un grupo citoplasmático de p53 que es capaz de promover la permeabilidad de la membrana externa mitocondrial a través de diversos mecanismos (Galluzzi y cols., 2014). En esta línea, se ha mostrado anteriormente que la melatonina estimula la producción intracelular de especies reactivas de oxígeno y la posterior apertura del poro de permeabilidad transitoria, induce activación y reclutamiento en la membrana externa de la mitocondria de

proteínas pro-apoptóticas tales como Bax, y mejora la función pro-apoptótica de p53. Estas evidencias experimentales apoyan el hecho de que tanto las señales pro-apoptóticas de melatonina y cisplatino convergen a nivel mitocondrial, y por lo tanto, es probable que las células entren en apoptosis mitocondrial más rápidamente.

Por otra parte, no podemos descartar la posibilidad de que parte de los efectos sinérgicos de la melatonina sobre la actividad de diferentes agentes quimioterápicos estén mediados por la estimulación de los receptores de la melatonina. La melatonina puede ejercer parte de sus acciones uniéndose a receptores específicos, tales como los receptores de la membrana plasmática acoplados a proteína G, como son los bien caracterizados receptores MT1 y MT2; o aquellos que están asociados a la enzima citosólica quinona reductasa II, que se han definido previamente como los receptores MT3 (Slominski y cols., 2012). Además, la melatonina también posee alta afinidad de unión para los receptores nucleares ROR α / RZR, que actúan como activadores transcripcionales (Wiesenbergy cols., 1998). Los resultados de esta Tesis Doctoral demuestran por primera vez la evidencia experimental de la participación de los receptores MT3 de la melatonina en el efecto sinérgico que ejerce la melatonina sobre las acciones citotóxicas y pro-apoptóticas inducidas por los agentes de quimioterapia cisplatino y 5-fluorouracilo. De hecho, cuando los receptores MT1 y/o MT2 fueron bloqueados por la administración de luzindol y 4-P-PDOT, no se observaron modificaciones en los efectos potenciadores de la melatonina con los agentes quimioterápicos cisplatino y 5-fluorouracilo, tanto sobre la actividad citotóxica como sobre la actividad de la caspasa-3; mientras que sólo en presencia de prazosin (un antagonista del receptor MT3 de la melatonina) las acciones sinérgicas de la melatonina con los agentes quimioterápicos fueron claramente revertidas. Estos resultados se confirmaron por los experimentos en presencia de agonistas de los receptores MT1 y MT2, donde los efectos de los agentes quimioterápicos cisplatino y 5-fluorouracilo no se modificaron cuando se estimularon los receptores MT1 y MT2 con 6-cloromelatonina, o con un agonista específico del subtipo de receptor MT2, como es el 8-M-PDOT. En conjunto, estos resultados indican claramente que los efectos potenciadores que la melatonina ejerce sobre la actividad citotóxica y pro-apoptótica de cisplatino y 5-fluorouracilo están mediados por la activación de los receptores MT3 de melatonina, al menos en células HT-29 y HeLa.

Finalmente, las acciones potenciadoras de la melatonina sobre la apoptosis estimulada por cisplatino en células HeLa se confirmaron adicionalmente en esta Tesis Doctoral, después de analizar las poblaciones de células apoptóticas a través de ensayos de Anexina V / PI y de la fragmentación del ADN. De esta manera, la administración simultánea de cisplatino y melatonina, en comparación con el tratamiento de cisplatino solo, produjo una mejora sustancial en el número de células apoptóticas tempranas (anexina + / PI-) y apoptóticas tardías (anexina + / PI +), así como una disminución simultánea en la proporción de células vivas (anexina V - / PI -). Además, nuestros hallazgos indicaron que la melatonina mejoró claramente la fragmentación del ADN mediada por cisplatino, determinada cualitativamente mediante electroforesis en gel de agarosa. En este sentido, estudios previos han verificado el efecto sinérgico de la melatonina en la citotoxicidad y la apoptosis inducida por quimioterapia en células AR42J de carcinoma pancreático en ratas (Uguz y cols., 2012). De forma similar, otros autores han mostrado recientemente el efecto sinérgico de la melatonina sobre la apoptosis evocada por doxorubicina en la línea de células de hepatoma humano HepG2 (Fan y cols., 2010).

En resumen, los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral muestran evidencias experimentales de que la melatonina *in vitro* aumenta significativamente la sensibilidad de las células HeLa de cáncer de cuello cérvico-uterino a cisplatino, mientras que en las células HT-29 la melatonina las sensibiliza fundamentalmente frente al 5-fluorouracilo. Este hecho parece estar relacionado con la capacidad de la indolamina para provocar que las células HeLa estimuladas por cisplatino ingresen rápidamente en una apoptosis mitocondrial dependiente de especies reactivas de oxígeno, lo que a su vez da como resultado aumentos en la proporción de células apoptóticas tardías y fragmentación del ADN. Hasta el momento, las acciones antitumorales sinérgicas de la melatonina siguen siendo controvertidas y parecen depender tanto del agente quimioterapéutico utilizado como del tejido de donde se derivan las células cancerosas. De hecho, se ha descrito que la melatonina, en oposición a lo que se espera, disminuye la fragmentación nuclear provocada por idarrubicina tanto en linfocitos sanos como en células leucémicas K562 (Majsterek y cols., 2005). Del mismo modo, se ha demostrado que la melatonina atenúa las acciones antitumorales de cisplatino en células HepG2 de carcinoma hepático humano a través de la modulación del equilibrio de las proteínas apoptóticas (Bennukul

y cols., 2014). Otros estudios también han indicado que la melatonina no interfiere con el efecto citotóxico de agentes quimioterapéuticos tales como citarabina, daunorrubicina y etopósido en diferentes líneas celulares leucémicas, incluyendo Jurkat, MOLT-4, Daudi, HL-60, CMK y K562 (Xiang y cols., 2015). A pesar de esto, se ha demostrado recientemente que la melatonina aumenta la citotoxicidad inducida por cisplatino en diferentes células de cáncer de ovario humano, tales como, SK-OV-3 (Kim y cols., 2012), HTOA y OVCAR-3 (Futagami y cols., 2001), que consistentemente concuerda con nuestros propios resultados en células HeLa de cáncer cervical humano. Por lo tanto, los hallazgos sobre el efecto de quimiosensibilización *in vitro* de la melatonina en cánceres malignos del tracto genital femenino parecen ser bastante consistentes, lo que sugiere que la indolamina podría ser potencialmente aplicada como agente coadyuvante para mejorar el efecto oncostático de la quimioterapia, particularmente de la terapia basada en cisplatino. Dado que también se ha informado que la melatonina inhibe el crecimiento tumoral y la progresión en modelos animales de cáncer (Paroni y cols., 2014), sería interesante realizar más estudios *in vivo* para corroborar los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral.

6. CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral en la que nos propusimos estudiar los mecanismos implicados en las propiedades pro-apoptóticas de la melatonina en células tumorales humanas HeLa (cervico-uterino) y HT-29 (colon), valorando la participación de los receptores de la melatonina en dichos mecanismos, así como los posibles efectos de la indolamina como coadyuvante de la acción de agentes quimioterapéuticos, podemos concluir que:

1. La melatonina *in vitro* aumenta notablemente la sensibilidad de las células de cáncer de cervico-uterino HeLa al tratamiento con cisplatino. Este hecho parece estar relacionado con la capacidad de la indolamina de inducir que las células HeLa estimuladas con cisplatino ingresen rápidamente en apoptosis mitocondrial dependiente de especies reactivas del oxígeno, lo que a su vez se traduce en aumentos en la proporción de células apoptóticas tardías y fragmentación del ADN.
2. En células HT-29, derivadas de adenocarcinoma de colon humano, la melatonina incrementó el efecto citotóxico y la apoptosis inducidos fundamentalmente por el agente quimioterapéutico 5-fluorouracilo, ejerciendo un efecto sinérgico sobre la producción intracelular de especies reactivas de oxígeno, así como sobre la actividad de las caspasas 3 y 9.
3. Los efectos de la melatonina sobre la actividad citotóxica y pro-apoptótica de cisplatino y 5-fluorouracilo en células HT-29 y HeLa parece depender de la activación de los receptores citosólicos MT3 de la indolamina.
4. Las acciones antitumorales sinérgicas de la melatonina con los agentes quimioterapéuticos parecen depender tanto del agente utilizado como del tejido de donde procedan las células tumorales ensayadas.

7. BIBLIOGRAFIA

Acuña-Castroviejo D, Martín M, Macías M, Escames G, León J, Khaldy H, Reiter RJ. Melatonin, mitochondria, and cellular bioenergetics. *J. Pineal Res.* 2001, 30: 65-74.

Acuña-Castroviejo D, Escames G, Carazo A, Leon J, Khaldy H, Reiter RJ. Melatonin, mitochondrial homeostasis and mitochondrial-related diseases. *Curr. Top. Med. Chem.* 2002, 2: 133-151.

Acuña-Castroviejo D, Escames G, Rodríguez MI, López LC. Melatonin role in the mitochondrial function. *Front. Biosci.* 2007, 12: 947-963.

Aggarwal BB. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat. Rev. Immunol.* 2003, 3: 745-756.

Aimoto T, Rohde BH, Chiou GC, Lauber JK. N-acetyltransferase activity and melatonin level in the eyes of glaucomatous chickens. *J. Ocul. Pharmacol.* 1985, 1: 149-160.

Almasan A, Ashkenazi A. Apo2L/TRAIL: apoptosis signaling, biology, and potential for cancer therapy. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2003, 14: 337-348.

Alonso R. La glándula pineal. *En: Fisiología Humana.* Tresguerres JAF, ed. McGraw-Hill-Interamericana. 1999, 894-901.

Andrabi SA, Sayeed I, Siemen D, Wolf G, Horn TF. Direct inhibition of the mitochondrial permeability transition pore: a possible mechanism responsible for anti-apoptotic effects of melatonin. *FASEB J.* 2002, 18:869–71.

Andrabi SA, Sayeed I, Siemen D, Wolf G, Horn TF. Direct inhibition of the mitochondrial permeability transition pore: a possible mechanism responsible for anti-apoptotic effects of melatonin. *FASEB J.* 2004, 18: 869-871.

Arendt J, Skene DJ. Melatonin as a chronobiotic. *Sleep Med. Rev.* 2005, 9: 25-39.

Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. *Science* 1998, 281: 1305-1308.

Bao Q, Shy Y. Apoptosome: a platform for the activation of initiator caspases. *Cell Death Differ.* 2007, 14:56-65.

Barckhausen C, Roos WP, Naumann SC y Kaina B. Malignant melanoma cells acquire resistance to DNA interstrand cross-linking chemotherapeutics by p53-triggered upregulation of DDB2/XPC-mediated DNA repair. *Oncogene.* 2013; 141:1964-1974.

Barrett P, Conway S, Morgan PJ. Digging deep--structure-function relationships in the melatonin receptor family. *J. Pineal Res.* 2003, 35: 221-230.

Barriga-Ibars C, Rodríguez-Moratinos AB, Esteban S, Rial RV. Interrelations between sleep and the immune status. *Rev. Neurol.* 2005, 40: 548-556.

Bartsch C, Bartsch H. Melatonin in cancer patients and in tumor-bearing animals. *Adv Exp Med Biol.* 1999, 467:247-64.

Becker-Andre M, Wiesenberg I, Schaeren-Wiemers N, Andre E, Missbach M, Saurat JH, Carlberg C. Pineal gland hormone melatonin binds and activates an orphan of the nuclear receptor superfamily. *J. Biol. Chem.* 1994, 269: 28531-28534.

Bejarano I, Redondo PC, Espino J, Rosado JA, Paredes SD, Barriga C, Reiter RJ, Pariente JA, Rodríguez AB. Melatonin induces mitochondrial-mediated apoptosis in human myeloid HL-60 cells. *J. Pineal Res.* 2009, 46: 392-400.

Bejarano I, Espino J, Barriga C, Reiter RJ, Pariente JA, Rodríguez AB. Pro-oxidant effect of melatonin in tumour leucocytes: relation with its cytotoxic and pro-apoptotic effects. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2010, 108(1):14-20.

Bejarano I, Espino J, Marchena AM, Barriga C, Paredes SD, Rodríguez AB, Pariente JA. Melatonin enhances hydrogen peroxide-induced apoptosis in human promyelocytic leukaemia HL-60 cells. *Mol. Cell. Biochem.* 2011a, 353: 167-176.

Bejarano I, Espino J, Barriga C, Reiter RJ, Pariente JA, Rodríguez AB. Pro-oxidant effect of melatonin in tumour leucocytes: relation with its cytotoxic and pro-apoptotic effects. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 2011b, 108: 14-20.

Benítez-King G, Antón-Tay F. Calmodulin mediates melatonin cytoskeletal effects. *Experientia* 1993, 49: 635-641.

Benítez-King G, Huerto-Delgadilo L, Antón-Tay F. Binding of 3H-melatonin to calmodulin. *Life Sci.* 1993, 53: 201-207.

Benítez-King G, Rios A, Martínez A, Antón-Tay F. In vitro inhibition of Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II activity by melatonin. *Biochem. Biophys. Acta* 1996, 1290: 191-196.

Bennukul K, Numkliang S, Leardkamolkarn V. Melatonin attenuates cisplatin-induced HepG2 cell death via the regulation of mTOR and ERCC1 expressions. *World J Hepatol.* 2014, 6(4): 230-242.

Bergmann W, Engel P. Über den Einfluß von Zirbelextrakten auf Tumoren bei weißen Mäusen und bei Menschen. *Wien Klin Wschr.* 1950, 62:79-82.

Bindoni M. Relationship between the pineal gland and the mitotic activity of some tissues. *Arch Sci Biol.* 1971, 55:3-21.

Bizarri M, Proietti S, Cucina A, Reiter RJ. Molecular mechanisms of the proapoptotic actions of melatonin on cancer: a review. *Expert Opin. Ther. Targets* 2013, 17: 1483-1496.

Bodmer JL, Schneider P, Tschopp J. The molecular architecture of the TNF superfamily. *Trends Biochem. Sci.* 2002, 27: 19-26.

Boersma HH, Kietselaer BL, Stolk LM, Bennaghmouch A, Hofstra L, Narula J, Heidendal GA, Reutelingsperger CP. Past, present, and future of annexin a5: From protein discovery to clinical applications. *J. Nucl. Med.* 2005, 46: 2035-2050.

Bonnefont-Rousselot D, Collin F. Melatonin: action as antioxidant and potential applications in human disease and aging. *Toxicology.* 2010, 278: 55-67.

Boutin JA, Audinot V, Ferry G, Delagrance P. Molecular tools to study melatonin pathways and actions. *Trends Pharmacol. Sci.* 2005, 26: 412-419.

Brookes PS, Darley-USmar VM. Role of calcium and superoxide dismutase in sensitizing mitochondria to peroxynitrite-induced permeability transition. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2004, 286: H39-H46.

Buyukavci M, Ozdemir O, Buck S, Stout M, Ravindranath Y, Savasan S. Melatonin cytotoxicity in human leukemia cells: relation with its pro-oxidant effect. *Fund. Clin. Pharmacol.* 2006, 20: 73-79.

Buyukavci M, Ozdemir O, Buck S. Effect of melatonin on the cytotoxicity of chemotherapeutic drugs in human leukaemia cells. *In Vivo* 2011; 25: 405–409.

Carbajo-Pescador S, Steinmetz C, Kashyap A, Lorenz S, Mauriz JL, Heise M, Galle PR, González-Gallego J, Strand S. Melatonin induces transcriptional regulation of Bim by FoxO3a in HepG2 cells. *Br. J. Cancer* 2012, 108: 442-449.

Carrasco C, Marchena AM, Holguín-Arévalo MS, Martín-Partido G, Rodríguez AB, Paredes SD, Pariente JA. Anti-inflammatory effects of melatonin in a rat model of caerulein-induced acute pancreatitis. *Cell Biochem. Funct.* 2013, 31: 585-590.

Casado-Zapico S, Rodriguez-Blanco J, Garcia-Santos G. Synergistic antitumor effect of melatonin with several chemotherapeutic drugs on human Ewing sarcoma cancer cells: potentiation of the extrinsic apoptotic pathway. *J Pineal Res.* 2010, 48:72-80.

Casado-Zapico S, Martín V, García-Santos G, Rodriguez-Blanco J, Sanchez-Sanchez AM, Luño E, Suarez C, García-Pedrero JM, Menendez ST, Antolín I, Rodríguez C. Regulation of the expression of death receptors and their ligands by melatonin in hematological cancer cell lines and in leukemia cells from patients. *J. Pineal Res.* 2011, 50: 345-355.

Cha SS, Sung BJ, Kim YA, Song YL, Kim HJ, Kim S, Lee MS, Oh BH. Crystal structure of TRAIL-DR5 complex identifies a critical role of the unique frame insertion in conferring recognition specificity. *J. Biol. Chem.* 2000, 275: 31171-31177.

Chan AS, Lai FP, Lo RK, Voyno-Yasenetskaya TA, Stanbridge EJ, Wong YH. Melatonin MT1 and MT2 receptors stimulate c-Jun N-terminal kinase via pertussis toxin-sensitive and -insensitive G proteins. *Cell Signal.* 2002, 14: 249-257.

Chaudhary PM, Eby M, Jasmin A, Bookwalter A, Murray J, Hood L. Death receptor 5, a new member of the TNFR family, and DR4 induce FADD-dependent apoptosis and activate the NF-kappaB pathway. *Immunity* 1997, 7: 821-830.

Cheng Y, Cai L, Jiang P, Wang J, Gao C, Feng H, Wang C, Pan H, Yang Y. SIRT1 inhibition by melatonin exerts antitumor activity in human osteosarcoma cells. *Eur. J. Pharmacol.* 2013, 715: 219-229.

Cheung RT. The utility of melatonin in reducing cerebral damage resulting from ischemia and reperfusion. *J. Pineal Res.* 2003, 34: 153-160.

Chuang JI, Chen TH. Effect of melatonin on temporal changes of reactive oxygen species and glutathione after MPP+ treatment in human astrocytoma U373MG cells. *J. Pineal Res.* 2004, 36: 117-125.

Cogburn LA, Wilson-Placentra S, Letcher LR. Influence of pinealectomy on plasma and extrapineal melatonin rhythms in young chickens (*Gallus domesticus*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 1987, 68: 343-356.

Conti A, Conconi S, Hertens E, Skwarlo-Sonta K, Markowska M, Maestroni JM. Evidence for melatonin synthesis in mouse and human bone marrow cells. *J. Pineal Res.* 2000, 28: 193-202.

Cragg MS, Harris C, Strasser A, Scott CL. Unleashing the power of inhibitors of oncogenic kinases through BH3 mimetics. *Nat. Rev. Cancer* 2009, 9: 321-326.

Cristofanon S, Uguccioni F, Cerella C, Radogna F, Dicato M, Ghibelli L, Diederich M. Intracellular prooxidant activity of melatonin induces a survival pathway involving NF- κ B activation. *Ann N Y Acad Sci.* 2009;1171: 472-478.

Cucina A, Proietti S, D'Anselmi F, Coluccia P, Dinicola S, Frati L, Bizzarri M. Evidence for a biphasic apoptotic pathway induced by melatonin in MCF-7 breast cancer cells. *J. Pineal Res.* 2009, 46: 172-180.

Daniel NN. BAD: undertaker by night, candyman by day. *Oncogene* 2009, 27: S53-S70.

Das A, McDowell M, Pava MJ, Smith JA, Reiter RJ, Woodward JJ, Varma AK, Ray SK, Banik NL. The inhibition of apoptosis by melatonin in VSC4.1 motoneurons exposed to oxidative stress, glutamate excitotoxicity, or TNF-alpha toxicity involves membrane melatonin receptors. *J. Pineal Res.* 2010, 48: 157-169.

Davis S, Mirick DK. Circadian disruption, shift work, and the risk of cancer: a summary of the evidence and studies in Seattle. *Cancer Causes Control* 2006, 17: 539-545.

Degli-Esposti MA, Smolak PJ, Walczak H, Waugh J, Huang CP, DuBose RF, Goodwin RG, Smith CA. Cloning and characterization of TRAIL-R3, a novel member of the emerging TRAIL receptor family. *J. Exp. Med.* 1997, 186: 1165-1170.

Demchenko AP. The change of cellular membranes on apoptosis: fluorescence detection. *Exp. Oncol.* 2012, 34:263-268.

Demir MG, Altıntoprak N, Aydın S, Kösemihal E, Başak K. Effect of Transtympanic Injection of Melatonin on Cisplatin-Induced Ototoxicity. *J Int Adv Otol.* 2015, 11: 202–6.

Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* 2000, 102: 33-42.

Dubocovich ML, Markowska M. Functional MT1 and MT2 melatonin receptors in mammals. *Endocrine* 2005, 27: 101-110.

Ebisawa T, Karne S, Lerner MR, Reppert SM. Expression cloning of a high-affinity melatonin receptor from *Xenopus* dermal melanophores. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 1994, 91: 6133-6137.

Engel P. Wachstumsbeeinflussende Hormone und Tumorwachstum. *Z Krebsforsch.* 1935, 41:488-496.

Ekmekcioglu C. Melatonin receptors in humans: biological role and clinical relevance. *Biomed. Pharmacother.* 2006, 60: 97-108.

Espino J, Bejarano I, Ortiz A, Lozano GM, García JF, Pariente JA, Rodríguez AB. Melatonin as a potential tool against oxidative damage and apoptosis in ejaculated human spermatozoa. *Fertil. Steril.* 2010a, 94: 1915-1917.

Espino J, Bejarano I, Redondo PC, Rosado JA, Barriga C, Reiter RJ, Pariente JA, Rodríguez B. Melatonin reduces apoptosis induced by calcium signaling in human leukocytes: Evidence for the involvement of mitochondria and Bax activation. *J Membr Biol.* 2010b, 233:105-18.

Espino J, Ortiz A, Bejarano I, Lozano GM, Monllor F, García JF, Rodríguez AB, Pariente JA. Melatonin protects human spermatozoa from apoptosis via melatonin receptor and extracellular signal-regulated kinase-mediated pathways. *Fertil. Steril.* 2011a, 95: 2290-2296.

Espino J, Bejarano I, Paredes SD, Barriga C, Reiter RJ, Pariente JA, Rodríguez AB. Melatonin is able to delay endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in leukocytes from elderly humans. *Age.* 2011b, 33(4):497-507.

Espino J, Bejarano I, Paredes SD, Barriga C, Rodríguez AB, Pariente JA. Protective effect of melatonin against human leukocyte apoptosis induced by intracellular calcium overload: relation with its antioxidant actions. *J Pineal Res.* 2011c, 51(2):195-206.

Fadok VA, Voelker DR, Campbell PA, Cohen JJ, Bratton DL, Henson PM. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J. Immunol.* 1992, 148: 2207-2216.

Fan LL, Sun GP, Wang ZG. Melatonin and doxorubicin synergistically induce cell apoptosis in human hepatoma cell lines. *World J Gastroenterol.* 2010, 16:1473-1481.

Fan TJ, Han LH, Cong RS, Liang J. Caspase family proteases and apoptosis. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)* 2005, 37: 719-727.

Farriol M, Venereo Y, Ona X, Castellanos JM, Segovia-Silvestre T. In vitro effects of melatonin on cell proliferation in a colon adenocarcinoma line. *J. Appl. Toxicol.* 2000, 20: 21-24.

Feng Z, Zhang JT. Protective effect of melatonin on beta-amyloid-induced apoptosis in rat astrogloma C6 cells and its mechanism. *Free Radic. Biol. Med.* 2004, 37: 1790-1801.

Fernando O, Récio MD, M. Steven Piver MD, Ronald E. Hempling MD, Deborah L, Driscoll BA. Five-Year Survival after Second-Line Cisplatin-Based Intraperitoneal Chemotherapy for Advanced Ovarian Cancer. *Gynecol Oncol.* 1998, 68: 267–273.

Fic M, Podhorska-Okolow M, Dziegiel P. Effect of melatonin on cytotoxicity of doxorubicin toward selected cell lines (human keratinocytes, lung cancer cell line A-549, laryngeal cancer cell line Hep-2). *In Vivo* 2007, 21:513–518.

Finocchiaro LM, Polack E, Nahmod VE, Glikin GC. Sensitivity of human peripheral blood mononuclear leukocytes to visible light. *Life Sci.* 1995, 57: 1097-1110.

Frederick CA, Williams LD, Ughetto G, van der Marel GA, van Boom JH, Rich A, Wang AH. Structural Comparison of Anticancer Drug-DNA Complexes: Adriamycin and Daunomycin. *Biochemistry* 1990, 29 (10): 2538-2549.

Fu Y, Tang M, Fan Y, Zou H, Sun X, Xu X. Anti-apoptotic effects of melatonin in retinal pigment epithelial cells. *Front. Biosci.* 2012, 17: 1461-1468.

Fulda S, Meyer E, Debatin KM. Inhibition of TRAIL-induced apoptosis by Bcl-2 overexpression. *Oncogene* 2002, 21: 2283-2294.

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.

Galano A, Tan DX, Reiter RJ. On the free radical scavenging activities of melatonin's metabolites, AFMK and AMK. *J. Pineal Res.* 2013, 54: 245-257.

Galluzzi L, Vitale I, Michels J, Brenner C, Szabadkai G, Harel-Bellan A, Castedo M, Kroemer G. Systems biology of cisplatin resistance: past, present and future. *Cell Death Dis.* 2014, 5: e1257.

García JJ, Reiter RJ, Pié J, Ortiz GG, Cabrera J, Sáinz RM, Acuña-Castroviejo D. Role of pinoline and melatonin in stabilizing hepatic microsomal membranes against oxidative stress. *J Bioenerg Biomembr.* 1999, 31:609-16.

Giorgio V, von Stockum S, Antoniel M, Fabbro A, Fogolari F, Forte M, Glick GD, Petronilli V, Zoratti M, Szabó I, Lippe G, Bernardi P. Dimers of mitochondrial ATP synthase form the permeability transition pore. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013, 110(15):5887-92.

González A, del Castillo-Vaquero A, Miro-Moran A, Tapia JA, Salido GM. Melatonin reduces pancreatic tumor cell viability by altering mitochondrial physiology. *J. Pineal Res.* 2011, 50: 250-260.

Grace MS, Cahill GM, Besharse JC. Melatonin deacetylation: retinal vertebrate class distribution and *Xenopus laevis* tissue distribution. *Brain Res.* 1991, 559: 56-63.

Green DR, Kroemer G. The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science* 2004, 305: 626-629.

Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science* 1998, 281: 1309-1311.

Gruss HJ, Dower SK. Tumor necrosis factor ligand superfamily: involvement in the pathology of malignant lymphomas. *Blood* 1995, 85: 3378-3404.

Guerrero JM, Reiter RJ. Melatonin-immune system relationships. *Curr. Top. Med. Chem.* 2002, 2: 167-179.

Gunji H, Kharbanda S, Kufe D. Induction of internucleosomal DNA fragmentation in human myeloid leukemia cells by 1-beta- D-arabinofuranosylcytosine. *Cancer Res.* 1991, 51: 741-743.

Gutierrez-Cuesta J, Tajés M, Jiménez A, Coto-Montes A, Camins A, Pallàs M. Evaluation of potential pro-survival pathways regulated by melatonin in a murine senescence model. *J Pineal Res.* 2008, 45:497-505.

Hande KR. Etoposide four decades of development of a topoisomerase II inhibitor. *Eur J Cancer.* 1998, 34 (10): 1514-21.

Hardeland R. Antioxidative protection by melatonin: multiplicity of mechanisms from radical detoxification to radical avoidance. *Endocrine* 2005, 27: 119-130.

Hardeland R, Poeggeler B. Actions of melatonin, its structural and functional analogs in the central nervous system and the significance of metabolism. *Cent Nerv Syst Agents Med Chem.* 2007, 7:289–303.

Hardeland R, Poeggeler B, Pappolla M A. New vistas on mitochondrial electron flux rates and aging. *Cell* 2008, 132:171-6.

Hardeland R, Cardinali DP, Srinivasan V, Spence DW, Brown GM, Pandi-Perumal SR. Melatonin – a pleiotropic, orchestrating regulator molecule. *Prog. Neurobiol.* 2011, 93: 350-384.

Hetts SW. To die or not to die: an overview of apoptosis and its role in disease. *JAMA* 1998, 279: 300-307.

Hirata F, Hayaishi O, Tokuyama T, Seno S. In vitro and in vivo formation of two new metabolites of melatonin. *J. Biol. Chem.* 1974, 249: 1311-1313.

Hofstätter R. Versuche der postoperativen Krebsbehandlung mit Zirbelstoffen. *Krebsarzt* 1959, 14:307-316.

Hojjman E, Rocha Viegas L, Keller Sarmiento MI, Rosenstein RE, Pecci A. Involvement of Bax protein in the prevention of glucocorticoid-induced thymocytes apoptosis by melatonin. *Endocrinology* 2004, 145: 418-425.

Huether G, Poeggeler B, Reimer A, George A. Effect of tryptophan administration on circulating melatonin levels in chicks and rats: evidence for

stimulation of melatonin synthesis and release in the gastrointestinal tract. *Life Sci.* 1992, 51: 945-953.

Itoh MT, 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.

Jamieson ER y Lippard SJ. *Structure, recognition, and processing of cisplatin-DNA adducts. Chemicals reviews.* 1999: 99:2467-2498.

Jiang J, Huang Z, Zhao Q, Feng W, Belikova NA, Kagan VE. Interplay between bax, reactive oxygen species production, and cardiolipin oxidation during apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2008, 368:145-150.

Joo SS, Yoo YM. Melatonin induces apoptotic death in LNCaP cells via p38 and JNK pathways: therapeutic implications for prostate cancer. *J. Pineal Res.* 2009, 47: 8-14.

Jou MJ. Melatonin preserves the transient mitochondrial permeability transition for protection during mitochondrial Ca(2+) stress in astrocyte. *J. Pineal Res.* 2011, 50: 427-435.

Jung-Hynes B, Schmit TL, Reagan-Shaw SR, Siddiqui IA, Mukhtar H, Ahmad N. Melatonin, a novel Sirt1 inhibitor, impairs antiproliferative effects against prostate cancer in vitro in culture and in vivo in TRAMP model. *J. Pineal Res.* 2011, 50: 140-149.

Juo P, Kuo CJ, Yuan J, Blenis J. Essential requirement for caspase-8/FLICE in the initiation of the Fas-induced apoptotic cascade. *Curr. Biol.* 1998, 8: 1001-1008.

Kartalou M y Essigmann JM. Mechanisms of resistance to cisplatin. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis.* 2001: 478:23-43.

Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implication in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* 1972, 26: 239-257.

Kilic U, Kilic E, Tuzcu Z, Tuzcu M, Ozercan I, Yilmaz O, Sahin F, Sahin K. Melatonin suppresses cisplatin-induced nephrotoxicity via activation of Nrf-2/HO-1 pathway. *Nutr Metab.* 2013, 10:7.

Kim CH, Yoo YM. Melatonin induces apoptotic cell death via p53 in LNCaP cells. *Korean J. Physiol. Pharmacol.* 2010, 14:365-369.

Kim J-H, Jeong S-J, Kim B. Melatonin synergistically enhances cisplatin-induced apoptosis via the dephosphorylation of ERK/p90 ribosomal S6 kinase/heat shock protein 27 in SK-OV-3 cells. *J Pineal Res.* 2012, 52: 244–252.

Kischkel FC, Lawrence DA, Chuntharapai A, Schow P, Kim KJ, Ashkenazi A. Apo2L/TRAIL-dependent recruitment of endogenous FADD and caspase-8 to death receptors 4 and 5. *Immunity* 2000, 12: 611-620.

Kobayashi Y, Itoh MT, Kondo H, Okuma Y, Sato S, Kanishi Y, Hamada N, Kiguchi K, Ishizuka B. Melatonin binding sites in estrogen receptor-positive cells derived from human endometrial cancer. *J. Pineal Res.* 2003, 35: 71-74.

Koh W, Jeond SJ, Lee HJ. Melatonin promotes puromycin-induced apoptosis with activation of caspase-3 and 5'-adenosine monophosphate-activated kinase- α in human leukaemia HL-60 cells. *J Pineal Res.* 2011, 50: 367–373.

Kong PJ, Byun JS, Lim SY, Lee JJ, Hong SJ, Kwon KJ, Kim SS. Melatonin induces Akt phosphorylation through melatonin receptor- and PI3K-dependent pathways in primary astrocytes. *Korean J. Physiol. Pharmacol.* 2008, 12: 37-41.

Kuroda J, Puthalakath H, Cragg MS, Kelly PN, Bouillet P, Huang DC, Kimura S, Ottmann OG, Druker BJ, Villunger A, Roberts AW, Strasser A. Bim and Bad mediate imatinib-induced killing of Bcr/Abl+ leukemic cells, and resistance due to their loss is overcome by a BH3 mimetic. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 2006, 103: 14907-14912.

Lahiri DK, Chen D, GE YW, Bondy SC, Sharman EH. Dietary supplementation with melatonin reduces levels of amyloid beta-peptides in the murine cerebral cortex. *J. Pineal Res.* 2004, 36: 224-231.

Lapin V. Pineal gland and malignancy. *Österreich Zeitschr Onkologie* 1976, 3:51-59.

Lapin V. Influence of simultaneous pinealectomy and thymectomy on the growth and formation of metastases of the Yoshida sarcoma in rats. *Exp Pathol.* 1974, 9:108-112.

Lapin V, Ebels I. Effects of some low molecular weight sheep pineal fractions and melatonin on different tumors in rats and mice. *Oncology* 1976, 33:110-113.

Lapin V, Ebels I. The role of the pineal gland in neuroendocrine control mechanisms of neoplastic growth. *J Neural Transm.* 1981, 50:275-82.

Launay JM, Lamaitre BJ, Husson HP, Dreux C, Hartmann L, Da Prada M. Melatonin synthesis by rabbit platelets. *Life Sci.* 1982, 31: 1487-1494.

Leibowitz B, Yu J. Mitochondrial signaling in cell death via the Bcl-2 family. *Cancer Biol. Ther.* 2010, 9: 417-422.

Leja-Szpak A, Jaworek J, Pierzchalski P, Reiter RJ. Melatonin induces proapoptotic signaling pathway in human pancreatic carcinoma cells (PANC-1). *J. Pineal Res.* 2010, 49: 248-255.

León J, Acuña-Castroviejo D, Escames G, Tan DX, Reiter RJ. Melatonin mitigates mitochondrial malfunction. *J Pineal Res.* 2005, 38:1-9.

Lerner AB, Case JD, Takahashi Y et al. Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes. *J Amer Chem Soc.* 1958, 80:2587.

Lerner AB, Case JD, Takahashi Y. Isolation of melatonin and 5-methoxy-indole-3-acetic acid from bovine pineal gland. *J. Biol. Chem.* 1960, 235: 1992-1997.

Lessene G, Czabotar PE, Colman PM. BCL-2 family antagonists for cancer therapy. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2008, 7: 989-1000.

Letai A, Bassik MC, Walensky LD, Sorcinelli MD, Weiler S, Korsmeyer SJ. Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics. *Cancer Cell* 2002, 2: 183-192.

Li J, Yen C, Liaw D, Podsypanina K, Bose S, Wang SI, Puc J, Miliarensis C, Rodgers L, McCombie R, Bigner SH, Giovanella BC, Ittmann M, Tycko B, Hibshoosh H, Wigler MH, Parsons R. PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science* 1997, 275: 3284-3289.

Li JH, Yu JP, YU HG, Xu XM, Yu LL, Liu J, Luo HS. Melatonin reduces inflammatory injury through inhibiting NF-kappaB activation in rats with colitis. *Mediators Inflamm.* 2005, 2005:185-193.

Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R, Wang X. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* 1996, 86: 147-157.

Liu X, Zou H, Widlak P, Garrard W, Wang X. Activation of the apoptotic endonuclease DFF40 (caspase-activated DNase or nuclease). Oligomerization and direct interaction with histone H1. *J. Biol. Chem.* 1999, 274: 13836-13840.

Longley DB, Harkin DP, Johnston PG. 5-fluorouracil: mechanism of action and clinical strategies. *Nat. Rev. Cancer* 2003, 3: 330-338.

López JJ, Salido GM, Pariente JA, Rosado JA. Thrombin induces activation and translocation of Bid, Bax and Bak to the mitochondria in human platelets. *J. Thromb. Haemost.* 2008, 6: 1780-1788.

Luchetti F, Betti M, Canonico B, Arcangeletti M, Ferri P, Galli F, Papa S. ERK MAPK activation mediates the antiapoptotic signaling of melatonin in UVB-stressed U937 cells. *Free Radic. Biol. Med.* 2009, 46: 339-351.

Luchetti F, Canonico B, Betti M, Arcangeletti M, Pilolli F, Piroddi M, Canesi L, Papa S, Galli F. Melatonin signaling and cell protection function. *FASEB J.* 2010, 24: 3603-3624.

Macías M, Escames G, Leon J, Coto A, Sbihi Y, Osuna A, Acuña-Castroviejo D. Calreticulin-melatonin. An unexpected relationship. *Eur. J. Biochem.* 2003, 270: 832-840.

Madhu P, Reddy KP, Reddy PS. Melatonin reduces oxidative stress and restores mitochondrial function in the liver of rats exposed to chemotherapeutics. *J Exp Zool A Ecol Genet Physiol.* 2015, 323: 301-3088.

Major PP, Egan EM, Beardsley GP, Minden MD, Kufe DW. Lethality of human myeloblasts correlates with the incorporation of arabinofuranosylcytosine into DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1981, 78: 3235-3239.

Majsterek I, Gloc E, Blasiak J, Reiter RJ. A comparison of the action of amifostine and melatonin on DNA-damaging effects and apoptosis induced by idarubicin in normal and cancer cells. *J Pineal Res.* 2005, 38: 254-63.

Martín M, Macías M, Escames G, Reiter RJ, Agapito MT, Ortiz GG, Acuña-Castroviejo D. Melatonin-induced increased activity of the respiratory chain complexes I and IV can prevent mitochondrial damage induced by ruthenium red in vivo. *J Pineal Res.* 2000, 28:242-8.

Martín M, Macías M, León J, Escames G, Khaldy H, Acuña-Castroviejo D. Melatonin increases the activity of the oxidative phosphorylation enzymes and the production of ATP in rat brain and liver mitochondria. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 2002, 34: 348-357.

Martín V, Herrera F, Carrera-González P, García-Santos G, Antolín I, Rodríguez-Blanco J, Rodríguez C. Intracellular signaling pathways involved in the cell growth inhibition of glioma cells by melatonin. *Cancer Res.* 2006, 66: 1-8.

Mediavilla MD, Sanchez-Barcelo EJ, Tan DX, Manchester L, Reiter RJ. Basic mechanisms involved in the anti-cancer effects of melatonin. *Curr Med Chem.* 2010, 17:4462-81.

Meki AR, Abdel-Ghaffar SK, EL-Gibaly I. Aflatoxin B1 induces apoptosis in rat liver: protective effect of melatonin. *Neuroendocrinol. Lett.* 2001, 22: 417-426.

Mhatre MC, Van Jaarsveld AS, Reiter RJ. Melatonin in the lacrimal gland: first demonstration and experimental manipulation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1988, 153: 1186-1192.

Micheau O, Tschopp J. Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell* 2003, 114: 181-190.

Miller SC, Pandi-Perumal SR, Esquifino AI, Cardinali DP, Maestroni GJ. The role of melatonin in immunoenhancement: potential application in cancer. *Int. J. Exp. Pathol.* 2006, 87: 81-87.

Nechushtan A, Smith CL, Lamensdorf I, Yoon SH, Youle RJ. Bax and Bak coalesce into novel mitochondria-associated clusters during apoptosis. *J. Cell Biol.* 2001, 153: 1265-1276.

Nosjean O, Ferro M, Coge F, Beauverger P, Henlin JM, Lefoulon F, Fauchere JL, Delagrangre P, Canet E, Boutin JA. Identification of the melatonin-binding site MT3 as the quinone reductase 2. *J. Biol. Chem.* 2000, 275: 31311-31317.

Osseni RA, Rat P, Bogdan A, Warnet JM, Touitou Y. Evidence of prooxidant and antioxidant action of melatonin on human liver cell line HepG2. *Life Sci.* 2000, 68: 387-399.

Ott M, Robertson JD, Gogvadze V, Zhivotovsky B, Orrenius S. Cytochrome c release from mitochondria proceeds by a two-step process. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 2002, 99: 1259-1263.

Pala D, Lodola A, Bedini A, Spadoni G, Rivara S. Homology models of melatonin receptors: challenges and recent advances. *Int. J. Mol. Sci.* 2013, 14: 8093-8121.

Pan G, Ni J, Wei YF, Yu G, Gentz R, Dixit VM. An antagonist decoy receptor and a death domain-containing receptor for TRAIL. *Science* 1997, 277: 815-818.

Pandi-Perumal SR, Srinivasan V, Maestroni GJM, Cardinali DP, Poeggeler B, Hardeland R. Melatonin: nature's most versatile biological signal? *FEBS J.* 2006, 273: 2813-2838.

Pandi-Perumal SR, BaHammam AS, Brown GM, Spence DW, Bharti VK, Kaur C, Hardeland R, Cardinali DP. Melatonin antioxidative defense: therapeutical

implications for aging and neurodegenerative processes. *Neurotox. Res.* 2013, 23: 267-300.

Paradies G, Petrosillo G, Paradies V, Reiter RJ, Ruggiero FM. Melatonin, cardiolipin and mitochondrial bioenergetics in health and disease. *J Pineal Res.* 2010, 48:297-310.

Pariente R, Pariente JA, Rodríguez AB, Espino J. Melatonin sensitizes human cervical cancer HeLa cells to cisplatin-induced cytotoxicity and apoptosis: effects on oxidative stress and DNA fragmentation. *J Pineal Res.* 2016, 60(1):55-64.

Paroni R, Terraneo L, Bonomini F, Finati E, Virgili E, Bianciardi P, Favero G, Frascini F, Reiter RJ, Rezzani R, Samaja M. Antitumour activity of melatonin in a mouse model of human prostate cancer: relationship with hypoxia signaling. *J Pineal Res.* 2014, 57: 43-52.

Peng TI, Hsiao CW, Reiter RJ, Tanaka M, Lai YK, Jou MJ. mtDNA T8993G mutation-induced mitochondrial complex V inhibition augments cardiolipin-dependent alterations in mitochondrial dynamics during oxidative, Ca(2+), and lipid insults in NARP cybrids: a potential therapeutic target for melatonin. *J. Pineal Res.* 2012, 53: 93-106.

Perdomo J, Cabrera J, Estévez F, Loro J, Reiter RJ, Quintana J. Melatonin induces apoptosis through a caspase-dependent but reactive oxygen species-independent mechanism in human leukemia Molt-3 cells. *J. Pineal Res.* 2013, 55: 195-206.

Petrosillo G, Colantuono G, Moro N, Ruggiero FM, Tiravanti E, Di Venosa N, Fiore T, Paradies G. Melatonin protects against heart ischemia-reperfusion injury by inhibiting mitochondrial permeability transition pore opening. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2009, 297:H1487-93.

Pilch DS, Dunham SU, Jamieson ER, Lippard SJ y Breslauer KJ. DNA sequence context modulates the impact of a cisplatin 1, 2-d (GpG) intrastrand cross-link on the conformational and thermodynamic properties of duplex DNA. *Journal of Molecular Biology.* 2000: 296:803-812.

Plaimée P, Weerapreeyakul N, Barusrux S, Johns NP. Melatonin potentiates cisplatin-induced apoptosis and cell cycle arrest in human lung adenocarcinoma cells. *Cell Prolif.* 2015, 48: 67–77.

Plunkett W, Liliemark JO, Estey E, Keating MJ. Saturation of ara-CTP accumulation during high-dose ara-C therapy: pharmacologic rationale for intermediate-dose ara-C. *Sem. Oncol.* 1987, 14: 159–166.

Pommier Y, Leo E, Zhang H, Marchand C. DNA topoisomerases and their poisoning by anticancer and antibacterial drugs. *Chem. Biol.* 2010, 17(5): 421-433.

Pozo D, Reiter RJ, Calvo JR, Guerrero JM. Inhibition of cerebellar nitric oxide synthase and cyclic GMP production by melatonin via complex formation with calmodulin. *J. Cell. Biochem.* 1997, 65: 430-442.

Proietti S, Cucina A, D'Anselmi F, Dinicola S, Pasqualato A, Lisi E, Bizzarri M. Melatonin and vitamin D3 synergistically down-regulate Akt and MDM2 leading to TGFβ1-dependent growth inhibition of breast cancer cells. *J. Pineal Res.* 2011, 50: 150-158.

Pruefer FG, Lizarraga F, Maldonado V, Melendez-Zajgla J. Participation of Omi Htra2 serine-protease activity in the apoptosis induced by cisplatin on SW480 colon cancer cells. *Journal of Chemotherapy.* 2008, 20(3): 348-354.

Puthalakath H, Strasser A. Keeping killers on a tight leash: transcriptional and post-translational control of the pro-apoptotic activity of BH3-only proteins. *Cell Death Differ.* 2002, 9: 505-512.

Puthalakath H, Huang DC, O'Reilly LA, King SM, Strasser A. The proapoptotic activity of the Bcl-2 family member Bim is regulated by interaction with the dynein motor complex. *Mol. Cell* 1999, 3: 287-296.

Radogna F, Cristofanon S, Paternoster L, D'Alessio M, De Nicola M, Cerella C, Dicato M, Diederich M, Ghibelli L. Melatonin antagonizes the intrinsic pathway of apoptosis via mitochondrial targeting of Bcl-2. *J. Pineal Res.* 2008, 44: 316-325.

Ramracheya RD, Muller DS, Squires PE, Brereton H, Sugden D, Huang GC, Amiel SA, Jones PM, Persaud SJ. Function and expression of melatonin receptors on human pancreatic islets. *J. Pineal Res.* 2008, 44: 273-279.

Ravichandran KS. Find-me and eat-me signals in apoptotic cell clearance: Progress and conundrums. *J. Exp. Med.* 2010, 207: 1807-17.

Reedijk J. Why does cisplatin reach guanine-N7 with competing s-donor ligands available in the cell?. *Chemicals Reviews.* 1999, 99:2499-2510.

Reiter RJ, Tan DX, Sainz R et al. Melatonin: reducing the toxicity and increasing the efficacy of drugs. *J Pharm Pharmacol.* 2002, 54:1299–1321.

Reiter RJ, Tan DX. What constitutes a physiological concentration of melatonin? *J. Pineal Res.* 2003, 34: 79-80.

Reiter RJ, Tan DX, Jou MJ, Korkmaz A, Manchester LC, Paredes S.D. Biogenic amines in the reduction of oxidative stress: melatonin and its metabolites. *Neuroendocrinol. Lett.* 2008, 29: 391-398.

Reiter RJ, Tan DX, Manchester LC, Paredes SD, Mayo JC, Sainz RM. Melatonin and reproduction revisited. *Biol. Reprod.* 2009, 81: 445-456.

Reiter RJ, Tan DX, Fuentes-Broto L. Melatonin: a multitasking molecule. *Prog. Brain Res.* 2010, 181: 127-151.

Ricci JE, Munoz-Pinedo C, Fitzgerald P, Bailly-Maitre B, Perkins GA, Yadava N, Scheffler IE, Ellisman MH, Green DR. Disruption of mitochondrial function during apoptosis is mediated by caspase cleavage of the p75 subunit of complex I of the electron transport chain. *Cell* 2004, 117: 773-786.

Rodríguez AB, Marchena JM, Nogales G, Durán J, Barriga C. Correlation between melatonin, phagocytosis and superoxide anion levels in ring dove heterophils. *J. Pineal Res.* 1999, 26: 35-42.

Rodríguez AB, Barriga C, Paredes SD, Terrón MP. Age, melatonin and the immune system. En: Pandalai SG (ed.) Recent research developments in cellular and molecular biochemistry. Research Signpost, Kerale, 2005, pp. 255-287.

Rodríguez C, Mayo JC, Sainz RM, Antolín I, Herrera F, Martín V, Reiter RJ. Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. *J. Pineal Res.* 2004, 36: 1-9.

Rodríguez C, Martín V, Herrera F, García-Santos G, Rodríguez-Blanco J, Casado-Zapico S, Sánchez-Sánchez AM, Suárez S, Puente-Moncada N, Anítua MJ, Antolín I. Mechanisms involved in the pro-apoptotic effect of melatonin in cancer cells. *Int. J. Mol. Sci.* 2013, 14: 6597-6613.

Rodríguez-García A, Mayo JC, Hevia D, Quiros-Gonzalez I, Navarro M, Sainz RM. Phenotypic changes caused by melatonin increased sensitivity of prostate cancer cells to cytokine-induced apoptosis. *J Pineal Res.* 2013, fan54(1):33-45.

Romero JA, Axelrod J. Pineal beta-adrenergic receptor: diurnal variation in sensitivity. *Science.* 1974, 184: 1091-1092.

Rosado JA, López JJ, Gómez-Arteta E, Redondo PC, Salido GM, Pariente JA. Early caspase-3 activation independent of apoptosis is required for cellular function. *J. Cell. Physiol.* 2006, 209:142-152.

Rosenberg B, Van Camp L y Krigas T.Inhibition of Cell Division in Escherichia coli by Electrolysis Products from a Platinum Electrode. *Nature.* 1965, 205:698-699.

Rosenberg B. Platinum Compounds: a New Class of Potent Antitumour Agents. *Nature.* 1969, 222:385-386.

Rustum YM, & Raymakers RA. 1-Beta-arabinofuranosylcytosine in therapy of leukemia: preclinical and clinical overview. *Pharmacol Ther,* 1992, 56: 307-321.

Sainz RM, Mayo JC, Uria H, Kotler M, Antolín I, Rodríguez C, Menendez-Pelaez A. The pineal neurohormone melatonin prevents *in vivo* and *in vitro* apoptosis in thymocytes. *J. Pineal Res.* 1995, 19: 178-188.

Sainz RM, Mayo JC, Reiter RJ, Antolin I, Esteban MM, Rodriguez C. Melatonin regulates glucocorticoid receptor: an answer to its antiapoptotic action in thymus. *FASEB J.* 1999, 13: 1547-1556.

Sainz RM, Mayo JC, Tan DX, López-Burillo S, Natarajan M, Reiter RJ. Antioxidant activity of melatonin in Chinese hamster ovarian cells: changes in cellular proliferation and differentiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003a, 302: 635-634.

Sainz RM, Mayo JC, Rodríguez C, Tan DX, López-Burillo S, Reiter RJ. Melatonin and cell death: differential actions on apoptosis in normal and cancer cells. *Cell. Mol. Life Sci.* 2003b, 60: 1407-1426

Sainz RM, Mayo JC, Tan DX, León J, Manchester L, Reiter RJ. Melatonin reduces prostate cancer cell growth leading to neuroendocrine differentiation via a receptor and PKA independent mechanism. *Prostate* 2005, 63: 29-43.

Salvesen GS. Caspase 8: igniting the death machine. *Structure* 1999, 7: R225-R229.

Sánchez-Barceló EJ, Cos S, Fernandez R, Mediavilla MD. Melatonin and mammary cancer: a short review. *Endocr. Relat. Cancer* 2003, 10: 153-159.

Sánchez-Hidalgo M, Lee M, de la Lastra CA, Guerrero JM, Packham G. Melatonin inhibits cell proliferation and induces caspase activation and apoptosis in human malignant lymphoid cell lines. *J. Pineal Res.* 2012, 53: 366-373.

Sánchez-Sánchez AM, Martín V, García-Santos G, Rodríguez-Blanco J, Casado-Zapico S, Suarez-Garnacho S, Antolín I, Rodríguez C. Intracellular redox state as determinant for melatonin antiproliferative vs. cytotoxic effects in cancer cells. *Free Radic. Res.* 2011, 45: 1333-1341.

Sattler M, Liang H, Nettesheim D, Meadows RP, Harlan JE, Eberstadt M, Yoon HS, Shuker SB, Chang BS, Minn AJ, Thompson CB, Fesik SW. Structure of Bcl xL-Bak peptide complex: recognition between regulators of apoptosis. *Science* 1997, 275: 983 986.

Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A, Friesen C, Li F, Tomaselli KJ, Debatin KM, Krammer PH, Peter ME. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J.* 1998, 17: 1675-1687.

Shi Y. Apoptosome: The cellular engine for the activation of caspase-9. *Structure (Camb.)* 2002, 10: 285-288.

Slominski RM, Reiter RJ, Schlabritz-Loutsevitch N, Ostrom RS, Slominski AT. Melatonin membrane receptors in peripheral tissues: Distribution and functions. *Mol Cell Endocrinol.* 2012, 351: 152-166.

Steinhilber D, Brungs M, Werz O, Wiesenberg I, Danielsson C, Kahlen JP, Nayeri S, Schröder M, Carlberg C. The nuclear receptor for melatonin represses 5-lipoxygenase gene expression in human B lymphocytes. *J. Biol. Chem.* 1995, 270: 7037-7040.

Strasser A, Harris AW, Bath ML, Cory S. Novel primitive lymphoid tumours induced in transgenic mice by cooperation between myc and bcl-2. *Nature* 1990, 348: 331-333.

Strasser A, O'Connor L, Dixit VM. Apoptosis signaling. *Ann. Rev. Biochem.* 2000, 69: 217-245.

Suzuki Y, Imai Y, Nakayama H, Takahashi K, Takio K, Takahashi R. A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death. *Mol. Cell* 2001, 8:613-621.

Tacar O, Sriamornsak P, Dass CR. Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems. *J. Pharm. Pharmacol.* 2013, 65(2): 157-70.

Tajes Orduña M, Pelegrí Gabalda C, Vilaplana Hortensi J, Pallàs Lliberia M, Camins Espuny A. An evaluation of the neuroprotective effects of melatonin in an in vitro experimental model of age-induced neuronal apoptosis. *J. Pineal Res.* 2009, 46: 262-267.

Tam CW, Mo CW, Yao K, Shiu SY. Signaling mechanisms of melatonin in antiproliferation of hormone-refractory 22Rv1 human prostate cancer cells: implications for prostate cancer chemoprevention. *J. Pineal Res.* 2007, 42: 191-202.

Tan DX, Manchester LC, Reiter RJ, Qi W, Hanes MA, Farley NJ. High physiological levels of melatonin in the bile of mammals. *Life Sci.* 1999, 65: 2523-2529.

Tan DX, Reiter RJ, Manchester LC, Yan MT, El-Sawi M, Sainz RM, Mayo JC, Kohen R, Allegra M, Hardeland R. Chemical and physical properties and potential mechanisms: melatonin as a broad spectrum antioxidant and free radical scavenger. *Curr. Top. Med. Chem.* 2002, 2: 181-197.

Tan DX, Manchester LC, Terron MP, Flores LJ, Reiter RJ. One molecule, many derivatives: a never-ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species? *J Pineal Res.* 2007, 42: 28-42.

Tan DX, Manchester LC, Liu X, Rosales-Corral SA, Acuña-Castroviejo D, Reiter RJ. Mitochondria and chloroplasts as the original sites of melatonin synthesis: a hypothesis related to melatonin's primary function and evolution in eukaryotes. *J. Pineal Res.* 2013, 54: 127-138.

Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 1995, 267: 1456-1462.

Tolcher AW, Mita A, Lewis LD, Garrett CR, Till E, Daud AI, Patnaik A, Papadopoulos K, Takimoto C, Bartels P, Keating A, Antonia S. Phase I and pharmacokinetic study of YM155, a small-molecule inhibitor of survivin. *J. Clin. Oncol.* 2008, 26: 5198-5203.

Trubiani O, Recchioni R, Moroni F, Pizzicannella J, Caputi S, Di Primio R. Melatonin provokes cell death in human B-lymphoma cells by mitochondrial dependent apoptotic pathway activation. *J. Pineal Res.* 2005, 39: 425-431.

Trzaska S. Cisplatin. *Chem. Engin. News* 2005, Vol. 83, N° 25, 1-162.

Uguz AC, Naziroglu M, Espino J, Bejarano I, González D, Rodríguez AB, Pariente JA. Selenium modulates oxidative stress-induced cell apoptosis in human myeloid HL-60 cells through regulation of calcium release and caspase-3 and -9 activities. *J. Membrane Biol.* 2009, 232: 15-23.

Uguz AC, Cig B, Espino J, Bejarano I, Naziroglu M, Rodríguez AB, Pariente JA. Melatonin potentiates chemotherapy-induced cytotoxicity and apoptosis in rat pancreatic tumor cells. *J. Pineal Res.* 2012, 53: 91-98.

Urata Y, Honma S, Goto S, Todoroki S, Iida T, Cho S, Honma K, Kondo T. Melatonin induces gamma-glutamylcysteine synthase mediated by activator protein-1 in human vascular endothelial cells. *Free Radical Biol. Med.* 1999, 27: 838-847.

Vakkuri O, Rintamaki H, Leppaluoto J. Presence of immunoreactive melatonin in different tissues of the pigeon (*Columba livia*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 1985, 58: 69-75.

Van Loo G, Schotte P, van Gorp M, Demol H, Hoorelbeke B, Gevaert K, Rodriguez I, Ruiz-Carrillo A, Vandekerckhove J, Declercq W, Beyaert R, Vandenameele P. Endonuclease G: a mitochondrial protein released in apoptosis and involved in caspase-independent DNA degradation. *Cell Death Differ.* 2001, 8: 1136-1142.

Vandewalle G, Maquet P, Dijk DJ. Light as a modulator of cognitive brain function. *Trends Cogn. Sci.* 2009, 13: 429-438.

Vanecek J. Cellular mechanisms of melatonin action. *Physiol. Rev.* 1998, 78: 687-721.

Vaux DL, Cory S, Adams JM. Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature* 1988, 335: 440-442.

Vazquez A, Bond EE, Levine AJ, Bond GL. The genetics of the p53 pathway, apoptosis and cancer therapy. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2008, 7: 979-987.

Vijayalaxmi, Thomas CR Jr, Reiter RJ, Herman TS. Melatonin: from basic research to cancer treatment clinics. *J. Clin. Oncol.* 2002, 20: 2575-2601.

Volkova MS, Jensen KC, Lozinskaya NA, Sosonyuk SE, Proskurnina MV, Mesecar AD, Zefirov NS. Synthesis of novel MT3 receptor ligands via an unusual Knoevenagel condensation. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2012, 22: 7578-7581.

Wang LH, Li Y, Yang SN, Wang FY, Hou Y, Cui W, Chen K, Cao Q, Wang S, Zhang TY, Wang ZZ, Xiao W, Yang JY, Wu CF. Gambogic acid synergistically potentiates cisplatin-induced apoptosis in non-small-cell lung cancer through suppressing NF- κ B and MAPK/HO-1 signalling. *Br J Cancer*. 2014, 110(2):341-52.

Wang J, Xiao X, Zhang Y, Shi D, Chen W, Fu L, Liu L, Xie F, Kang T, Huang W, Deng W. Simultaneous modulation of COX-2, p300, Akt, and Apaf-1 signaling by melatonin to inhibit proliferation and induce apoptosis in breast cancer cells. *J. Pineal Res*. 2012, 53: 77-90.

Wang JC. DNA Topoisomerases. *Annu. Rev. Biochem*. 1985, 54: 664-697.

Wang WS, Tzeng CH, Chiou TJ, Liu JH, Hsieh RK, Yen CC. High-dose cytarabine and mitoxantrone as salvage therapy for refractory non-Hodgkin's lymphoma. *Japanese Journal of Clinical Oncology*. 1997, 27: 154-157.

Waterhouse NJ, Goldstein JC, von Ashen O, Schuler M, Newmeyer DD, Green DR. Cytochrome c maintains mitochondrial transmembrane potential and ATP generation after outer mitochondrial membrane permeabilization during the apoptotic process. *J. Cell Biol*. 2001, 153: 319-328.

Wiesenberg L, Missbach M, Carlberg C. The potential role of the transcription factor RZR/ROR as a mediator of nuclear melatonin signaling. *Restor Neurol Neurosci*. 1998, 12: 143-150.

Willis SN, Adams JM. Life in the balance: how BH3-only proteins induce apoptosis. *Curr. Opin. Cell Biol*. 2005, 17: 617-625.

Wolf BB, Green DR. Suicidal tendencies: apoptotic cell death by caspase family proteinases. *J. Biol. Chem*. 1999, 274: 20049-20052.

Wolter KG, Hsu YT, Smith CL, Nechushtan A, Xi XG, Youle RJ. Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis. *J. Cell Biol*. 1997, 139: 1281-1292.

Wyllie AH. Apoptosis: on overview. *Br. Med. Bull*. 1997, 53: 245-254.

Wyllie AH, Kerr JFR, Currie AR. Cell death: the significance of apoptosis. *Int. Rev. Cytol.* 1980, 68: 251-306.

Xiang S, Dauchy RT, Hauch A, Mao L, Yuan L, A-Wren M, P-Belancio V, Mondal D, Frach T, E-Blask D, Hill S. Doxorubicin resistance in breast cancer is driven by light at night induced disruption of the circadian melatonin signal. *J Pineal Res.* 2015, 59: 60-69.

Yang Y, Duan W, Jin Z, Yi W, Yan J, Zhang S, Wang N, Liang Z, Li Y, Chen W, Yi D, Yu S. JAK2/STAT3 activation by melatonin attenuates the mitochondrial oxidative damage induced by myocardial ischemia/reperfusion injury. *J. Pineal Res.* 2013, 55: 275-286.

Yang R, Xu D, Zhang A, Gruber A. Immature dendritic cells kill ovarian carcinoma cells by a Fas/FasL pathway, enabling them to sensitize tumor-specific CTLs. *Int. J. Cancer* 2001, 94: 407-413.

Zamzami N, Kroemer G. The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2001, 2: 67-71.

Zha L, Fan L, Sun G, Wang H, Ma T, Zhong F, Wei W. Melatonin sensitizes human hepatoma cells to endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *J. Pineal Res.* 2012, 52: 322-331.

Zha J, Harada H, Osipov K, Jockel J, Waksman G, Korsmeyer SJ. BH3 domain of BAD is required for heterodimerization with BCL-XL and pro-apoptotic activity. *J. Biol. Chem.* 1997, 272: 24101-24104.

Zhang HM, Zhang Y. Melatonin: a well-documented antioxidant with conditional pro-oxidant actions. *J. Pineal Res.* 2014, 57: 131-146.

Zhang JQ, Okumura C, McCarty T, Shin MS, Mukhopadhyay P, Hori M, Torrey TA, Naghashfar Z, Zhou JX, Lee CH, Roopenian DC, Morse CH, Davidson WF. Evidence for selective transformation of autoreactive immature plasma cells in mice deficient in FasL. *J. Exp. Med.* 2004, 200: 1467-1478.

8. ANEXO

Este apartado recoge la producción científica conseguida hasta el momento con los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral:

○ **COMUNICACIONES EN CONGRESOS**

❖ **ORALES**

1. “Melatonin, Apoptosis and Calcium Signaling”.
J.A. Pariente, I. Bejarano **R. Pariente**.
1st INTERNATIONAL MEETING ON REPROGRAMING CANCER CELLS VIA ANAKOINOSIS AS A NOVEL ANTICANCER APPROACH: FACTS, EXPECTATIONS AND OPEN QUESTIONS.
Roma (Italia) 7-8 de Marzo 2016.
Carácter. Internacional

2. “Melatonin as enhancer of chemotherapy treatment in human colorectal adenocarcinoma”.
R. Pariente, I. Bejarano, J.A. Pariente, A.B. Rodríguez y J. Espino.
XXXVIII CONGRESO DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE CIENCIAS FISIOLÓGICAS (SECF).
Zaragoza, 13-17 Septiembre 2016.
Carácter: Nacional.
Publicación (ISSN/ISBN): 1138-7548, J. Physiol. Biochem. 72: S59, O8-06 (2016).

❖ **POSTER**

1. “Melatonin potentiates chemotherapy-induced cytotoxicity and apoptosis in human cervical cancer HeLa cells”.
R. Pariente, I. Bejarano, J.A. Pariente, A.B. Rodríguez, J. Espino.
XXXVII CONGRESO DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE CIENCIAS FISIOLÓGICAS.
Granada 24-26 Septiembre 2014.
Abstract nº P077. Carácter: Nacional.
Publicación (ISSN/ISBN): 1748-1708, Acta Physiologica 212(698): 75 (2014).

2. “Melatonina frente a la quimioresistencia en células HeLa de cáncer de ovario”.

R. Pariente, J.A. Pariente, A.B. Rodríguez y J. Espino.

IV JORNADAS VETERINARIAS DE ESTUDIANTES Y III
JORNADAS DE CIENCIAS DE LA SALUD.

Cáceres, 16-18 de Abril 2015.

Abstract nº 2. Carácter: Nacional

3. “Análisis del Estrés Oxidativo y de la activación de Caspasa 9 por Citometría de Flujo, en células HeLa tratadas con antitumorales”.

R. Pariente, J. Espino, P. Torralbo, R. Carrillo, I. Haut, A. Álvarez.

XIV CONGRESS IBERIAN CYTOMETRY SOCIETY

Las Palmas de Gran Canaria (España) 4-6 Junio 2015.

Poster nº 001 Carácter: Nacional.

4. “Effect of Heat Shock Proteins (HSP) on cell viability and caspases activation in human epitheloid cervix carcinoma HeLa cells”

I.S. Ovey, **R. Pariente**, I. Bejarano, A.B. Rodríguez, M. Naziroglu, J.A. Pariente.

6th WORLD CONGRESS OF OXIDATIVE STRESS, CALCIUM
SIGNALING AND TRP CHANNELS.

Isparta (Turquía) 24-27 Mayo 2016.

Poster nº 18 Carácter: Internacional.

Publicación (ISSN/ISBN): 2149-7222, J. Cell. Neuros. Oxidat. Stress 8:
510-511 (2016).

5. “Melatonin potentiates chemotherapy-induced apoptosis in HeLa”

R. Pariente, I. Bejarano, J.A. Pariente, A.B. Rodríguez, J. Espino.

6th WORLD CONGRESS OF OXIDATIVE STRESS, CALCIUM
SIGNALING AND TRP CHANNELS.

Isparta (Turquía) 24-27 Mayo 2016.

Poster nº 17 Carácter: Internacional.

Publicación (ISSN/ISBN): 2149-7222, J. Cell. Neuros. Oxidat. Stress 8:
510 (2016).

6. "Effect of heat shock proteins on cell viability and caspases activation in HeLa cells"

I.S. Ovey, **R. Pariente**, I. Bejarano, A.B. Rodríguez, M. Naziroglu, J.A. Pariente.

XXXVIII CONGRESO DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE CIENCIAS FISIOLÓGICAS.

Zaragoza 13-17 Septiembre 2016.

Abstract nº P1-22 Caracter: Nacional.

Publicación (ISSN/ISBN): 1138-7548, J. Physiol. Biochem. 72: S70 (2016).

○ **TRABAJOS**

1. "Melatonin sensitizes human cervical cancer HeLa cells to cisplatin-induced cytotoxicity and apoptosis: effects on oxidative stress and DNA fragmentation"

Pariente R., Pariente J.A., Rodríguez A.B., Espino J.

Journal of Pineal Research 60: 55-64 (2016)

ISSN: 0742-3098.

Editorial: Wiley-Blackwell.

País de publicación: Dinamarca.

Journal Citation Reports (índice de impacto) (2015): 9.314

Número de veces citado: 14

2. "Melatonin strengthens 5-fluorouracil-based chemotherapy in human colorectal adenocarcinoma cells in vitro"

Pariente R., Bejarano I., Rodríguez A.B., Pariente J.A., J. Espino.

Hormones and Cancer (*En revisión*)

3. "Melatonin potentiates chemotherapy-induced cytotoxicity and apoptosis in human in tumor cell lines: Participation of melatonin MT3 receptors"

Pariente R., Bejarano I., Espino J., Rodríguez A.B., Pariente J.A.

(*En fase de redacción*)

Melatonin sensitizes human cervical cancer HeLa cells to cisplatin-induced cytotoxicity and apoptosis: effects on oxidative stress and DNA fragmentation

Abstract: Melatonin has antitumor activity via several mechanisms including its antiproliferative and pro-apoptotic effects as well as its potent antioxidant actions, although recent evidence has indicated that melatonin may perform pro-oxidant actions in tumor cells. Therefore, melatonin may be useful in the treatment of tumors in association with chemotherapy drugs. This study was intended to evaluate the *in vitro* effect of melatonin on the cytotoxic and pro-apoptotic actions of various chemotherapeutic agents in cervical cancer HeLa cells. Herein, we found that both melatonin and three of the chemotherapeutic drugs tested, namely cisplatin (CIS), 5-fluorouracil (5-FU), and doxorubicin, induced a decrease in HeLa cell viability. Furthermore, melatonin significantly increased the cytotoxic effect of such chemotherapeutic agents. Consistently, costimulation of HeLa cells with any chemotherapeutic agent in the presence of melatonin further increased caspase-3 activation, particularly in CIS- and 5-FU-challenged cells. Likewise, concomitant treatments with melatonin and CIS significantly enhanced the ratio of cells entering mitochondrial apoptosis due to reactive oxygen species (ROS) overproduction, substantially augmented the population of apoptotic cells, and markedly enlarged DNA fragmentation compared to the treatments with CIS alone. Nonetheless, melatonin only displayed moderate chemosensitizing effects in 5-FU-stimulated HeLa cells, as suggested by slight increments in the percentage of cells stimulated for ROS production and in the proportion of early apoptotic cells compared to the treatments with 5-FU alone. In summary, our findings provided evidence that *in vitro* melatonin strongly enhances CIS-induced cytotoxicity and apoptosis in HeLa cells and, hence, the indoleamine could be potentially applied to cervical cancer treatment as a powerful synergistic agent.

Roberto Pariente, José A. Pariente, Ana B. Rodríguez and Javier Espino

Department of Physiology
(Neuroimmunophysiology and Chrononutrition
Research Group), Faculty of Science, University
of Extremadura, Badajoz, Spain

Key words: apoptosis, cervical cancer,
chemotherapy, melatonin, oxidative stress

Address reprint requests to Javier Espino,
Department of Physiology, Faculty of Science,
University of Extremadura, 06006 Badajoz,
Spain.

E-mail: jespino@unex.es

Received August 10, 2015;

Accepted October 8, 2015.

Introduction

Cervical cancer is the second most common cause of female-specific cancer after breast cancer accounting for around 8% of both total cancer cases and total cancer deaths in women. Currently, surgery, radiotherapy, and cisplatin (CIS)-based chemotherapy are the primary methods for treating cervical cancer. Actually, neoadjuvant chemotherapy reduces the gross tumor volume, extends the 5-yr survival rate, decreases the recurrence rate, and has thus attracted extensive attention for various studies [1–3]. Nonetheless, drug resistance of tumor cells to chemotherapy influences the clinical application and efficacy of treatments and, therefore, developing targeted treatment methods for reversing drug resistance is crucial for successfully treating cervical cancer.

Melatonin (*N*-acetyl-5-methoxytryptamine) is a low molecular weight indoleamine ubiquitously present in all living organisms. In the human, as in other vertebrates, melatonin is mainly synthesized in the pineal gland, although many other cells have now been shown to

produce melatonin [4]. In the reproductive system, the ovary and the placenta produce melatonin using the same enzymatic machinery as that in the pineal gland [5].

Despite its simple chemical structure, melatonin is a pleiotropic molecule with remarkable biological functions from bacteria to mammals [6]. In fact, this indoleamine governs biological rhythms [7], regulates reproduction [8], modulates the immune response [9, 10], and controls the life/death balance of both tumor and normal cells [11–13], the latter is mostly due to its ability to trigger apoptosis- and survival-promoting mechanisms, respectively. Moreover, not only melatonin but also its secondary, tertiary, and quaternary metabolites have proven to be powerful antioxidants and free radical scavengers, a cascade reaction that is referred to as melatonin's antioxidant cascade [14, 15].

So far, various studies have reported that melatonin may be an excellent candidate as anticancer agent or for combined therapy owing to its pro-oxidant, oncostatic, and pro-apoptotic activities in tumor cells [16]. Indeed, it has been previously described that treatment with the

chemotherapeutic drug etoposide in combination with melatonin resulted in increased elimination of leukemia cells derived from a patient with acute myeloid leukemia [17]. Preliminary clinical studies in patients with cancer also demonstrated the benefits of melatonin in association with cancer chemotherapeutic agents [18, 19]. Moreover, a recent study has reported that melatonin acts as both a tumor metabolic inhibitor and circadian-regulated kinase inhibitor to promote the sensitivity of breast tumors to doxorubicin (DOX) and drive tumor regression [20]. Therefore, melatonin may enhance the effectiveness of chemotherapy in terms of both tumor regression rate and survival time.

Few data are available on the effects of therapeutic synergy of chemotherapy agents together with melatonin on human cervical cancer cells. Hence, the present study investigated the *in vitro* effect of melatonin on chemotherapy-induced cytotoxicity and apoptosis in human cervical cancer HeLa cells. We found that the chemotherapy agents CIS, 5-fluorouracil (5-FU), and DOX succeeded in promoting cytotoxic and apoptosis-like actions toward HeLa cells. Interestingly, melatonin proved to be effective in enhancing the sensitivity of cervical cancer cells to all three agents, and especially to CIS, most likely due to the fact that the indoleamine triggers reactive oxygen species (ROS)-mediated initiator caspases activation, thus rapidly promoting apoptotic cell death and driving HeLa cells' apoptotic stage forward.

Materials and methods

Reagents

HeLa cell line (ECACC No. 93021013) derived from human epithelial cervix carcinoma was purchased from The European Collection of Cell Cultures (ECACC) (Dorset, UK). Fetal bovine serum (FBS) and penicillin/streptomycin were acquired from HyClone (Aalst, Belgium). L-Glutamine and Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) were obtained from Lonza (Basel, Switzerland). Doxorubicin hydrochloride, 5-fluorouracil, cisdiammineplatinum (II) dichloride (cisplatin), etoposide, cytarabine hydrochloride, melatonin, staurosporine, *N*-acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-7-amino-4-methylcoumarin (AC-DEVD-AMC), nonidet-P-40 substitute (NP40), HEPES, CHAPS, dithiothreitol (DTT), and 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) were bought from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain). Dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) was purchased from Life Technologies (Madrid, Spain). Annexin V-FITC apoptosis detection kit was acquired from eBioscience (Barcelona, Spain). Caspase-9 staining kit (Red) was obtained from Abnova (Barcelona, Spain). All other reagents were of analytical grade.

Cell culture and treatment protocol

Human epitheloid cervix carcinoma (HeLa) cell line was grown in DMEM supplemented with 2 mM L-glutamine, 1 mM sodium pyruvate, 10% heat-inactivated FBS, 100 U/mL penicillin, and 10 µg/mL streptomycin. Cells

were cultured under a humidified atmosphere containing 95% air and 5% CO₂ at 37°C. Cells were routinely plated into 12-well plates, unless otherwise indicated, at a density of 0.1×10^6 cells/mL, and the viability was >95% in all experiments as assayed by the trypan blue exclusion method.

Cells were treated with 20 µM cisplatin (CIS), 1 mM 5-fluorouracil (5-FU), 20 µM DOX, 10 µM cytarabine or 10 µM etoposide, or the vehicle, in the absence or presence of 1 mM melatonin for 24 hr. Ethanol was used as a vehicle and the final ethanol concentration did not exceeded 0.1% (v/v). These particular concentrations of drugs were selected because they were previously reported to be effective in inducing cell death [11, 21–23].

Cell viability assay

Cell viability was evaluated using the MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay, which is based on the ability of viable cells to convert a water-soluble, yellow tetrazolium salt into a water-insoluble, purple formazan product. The enzymatic reduction of the tetrazolium salt happens only in living, metabolically active cells, but not in dead cells. Cells were seeded in 12-well plates at a density of 0.1×10^6 cells per well, and subsequently, exposed to the appropriate treatment at 37°C. After the treatments, the medium was removed and MTT was added into each well, and then incubated for 60 min at 37°C, as previously described [24]. The supernatant was discarded, and DMSO was added to dissolve the formazan crystals. Treatments were carried out in triplicate. Optical density was measured in an automatic microplate reader (Infinite M200, Tecan Austria GmbH, Groedig, Austria) at a test wavelength of 490 nm and a reference wavelength of 650 nm to nullify the effect of cell debris. Data are presented as percentage above control (untreated samples).

Assay for caspase-3 activity

To determine caspase-3 activity, stimulated or resting cells (1.2×10^6 cells/mL) were sonicated and cell lysates were incubated with 2 mL of substrate solution (20 mM HEPES, pH 7.4, 2 mM EDTA, 0.1% CHAPS, 5 mM DTT, and 8.25 µM caspase-3 substrate) for 1 hr at 37°C as previously described [25]. The activity of caspase-3 was calculated from the cleavage of the specific fluorogenic substrate (AC-DEVD-AMC). Substrate cleavage was measured with an automatic microplate reader (Infinite M200) with excitation wavelength of 360 nm and emission at 460 nm. Preliminary experiments reported that caspase-3 substrate cleaving was not detected in the presence of the inhibitor of caspase-3, DEVD-CMK. Data were calculated as fluorescence units/mg protein and presented as fold increase over the pretreatment level (experimental/control).

Detection of ROS production and caspase-9 activation in double-stained HeLa cells

On the one hand, caspase-9 activation was determined using a caspase-9 staining kit (Red). This assay utilizes a

caspase-9 inhibitor, LEHD-FMK, conjugated to sulforhodamine (Red-LEHD-FMK) as the fluorescent marker. Red-LEHD-FMK is cell permeable, nontoxic, and irreversibly binds to activated caspase-9 in apoptotic cells. On the other hand, DCFH-DA is a nonfluorescent dye that easily penetrates cell membrane. Once inside the cell, ROS production was analyzed using the probe DCFH-DA, which becomes fluorescent upon oxidation to yield dichlorofluorescein (DCF), fluorescence thus being proportional to ROS generation.

Briefly, stimulated or resting cells were harvested by trypsinization (1.2×10^6 cells/mL), washed twice with PBS, and centrifuged at 500 g for 5 min; then, the supernatant was discarded, and the pellet was resuspended in 400 μ L of PBS containing 0.5 μ L of caspase-9 substrate (Red-LEHD-FMK) and 0.4 μ M DCFH (stock = 20 mM). Cells were incubated for 30 min at 37°C while the tubes were shaking in the darkness. Then, cells were washed twice, resuspended in 500 μ L of PBS, and immediately analyzed by flow cytometry (MACSQuant VYB; Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). Ten thousand events were analyzed using the FL-1 (green; DCF) and FL-3 (red; Red-LEHD-FMK) detectors. Each sample was tested from three to five times in independent experiments. Under all conditions tested, the percentages of DCF⁺/caspase-9⁻ (cells stimulated for ROS production), DCF⁺/caspase-9⁺ (cells entering mitochondrial apoptosis due to ROS overproduction), and DCF⁻/caspase-9⁺ cells (early apoptotic cells) were mainly compared.

Determination of apoptosis

Induction of apoptosis was determined using an annexin V-FITC apoptosis detection kit, according to the manufacturer's instructions. Briefly, stimulated or resting cells were harvested by trypsinization (1.2×10^6 cells/mL), washed twice with phosphate-buffered saline (PBS), and centrifuged at 500 g for 5 min; then, the supernatant was discarded, and the pellet was resuspended in 200 μ L binding buffer containing 5 μ L of annexin V-FITC. Cells were incubated for 10 min at room temperature, washed twice, and finally resuspended in 200 μ L binding buffer containing 10 μ L of propidium iodide (PI). The cells were immediately analyzed after incubation with the probes by flow cytometry (Cytomics FC500; Beckman Coulter, Viena, Austria). Ten thousand events were analyzed using the FL-1 (green; annexin V-FITC) and FL-3 (red; PI) detectors. Each sample was tested from three to five times in independent experiments. Under all conditions tested, the percentages of annexin⁺/PI⁻ (early apoptotic) and annexin⁺/PI⁺ cells (late apoptotic) were mainly compared [26].

Detection of DNA fragmentation

Formation of DNA fragments of oligonucleosomal size (180–200 bp) is a hallmark of apoptosis in many cell types. DNA fragmentation was qualitatively analyzed by agarose gel electrophoresis. Briefly, stimulated or resting cells were harvested by trypsinization (about 3×10^6 cells), washed twice with PBS, and centrifuged at 500 g for 5 min.

Subsequently, cells were resuspended in 10 mM EDTA, 0.25% Triton X-100, 2.5 mM Tris-HCl (pH = 8.0) and incubated at 4°C for 15 min while the tubes were shaking. Cells were spun down at 14,000 g for 1 hr at 4°C, and the supernatant was then transferred into 1 mL of ice-cold 70% ethanol and stored at -80°C for 3 hr. Next, samples were thawed and centrifuged at 14,000 g for 45 min at 4°C. The ethanol was then thoroughly removed, and the pellet was left to dry at 37°C and finally resuspended in 200 μ L of Tris-EDTA (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH = 8.0). Samples were subsequently incubated with 0.1 mg/mL of RNase A for 30 min at 37°C and then exposed to 0.25 mg/mL of proteinase K for 2 hr at 37°C. Finally, samples were mixed with loading buffer (0.25% bromophenol blue, 30% glycerol; v/v) and loaded on a 1.5% agarose gel. The gel was run at 4 V/cm for about 4 hr, and the DNA was detected by ethidium bromide under UV light (GelDoc; Bio-Rad, Madrid, Spain).

Statistical analysis

Data are presented as mean \pm standard error of mean (S.E.M) for each group. To compare the different treatments, statistical significance was calculated by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by post hoc Tukey test. $P < 0.05$ was considered to indicate a statistically significant difference.

Results

Fig. 1 shows the viability of human cervix carcinoma HeLa cells challenged with several chemotherapy agents in the absence and presence of melatonin. Stimulation of HeLa cells with 1 mM melatonin alone for 24 hr resulted in slight reduction in cell viability. Moreover, remarkably significant ($P < 0.05$) decreases in cell viability were observed upon stimulation of HeLa cells with 20 μ M CIS,

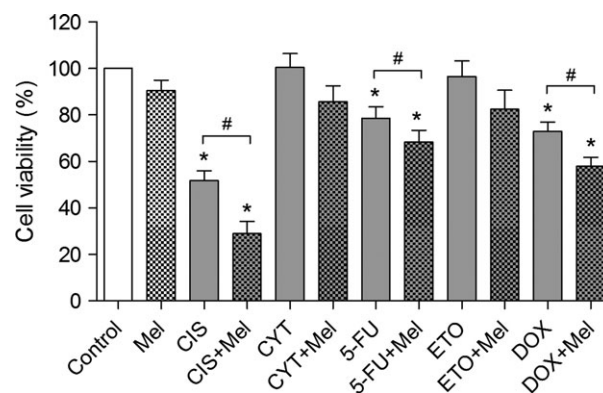


Fig. 1. Melatonin improves chemotherapy-stimulated cytotoxicity in HeLa cells. Cells were treated with 20 μ M cisplatin (CIS), 1 mM 5-fluorouracil (5-FU), 20 μ M doxorubicin (DOX), 10 μ M cytarabine (CYT) or 10 μ M etoposide (ETO), or the vehicle (control), in the absence or presence of 1 mM melatonin (Mel) for 24 hr. Cell viability was evaluated by means of the MTT assay. Values are presented as means \pm S.E.M of six independent experiments and expressed as percentage of control values (untreated samples). * $P < 0.05$ compared to control values. # $P < 0.05$ compared to their corresponding value in the absence of melatonin.

1 mM 5-FU, and 20 μ M DOX ($51.8 \pm 4.23\%$, $78.5 \pm 5.03\%$ and $73.0 \pm 3.96\%$, respectively) for 24 hr, whereas treatments with 10 μ M cytarabine or 10 μ M etoposide produced negligible effects on cell viability. Likewise, parallel assays were carried out to examine the putative potentiating effect of melatonin on chemotherapy-induced cytotoxicity. Thus, when HeLa cells were incubated with the chemotherapy agents for 24 hr in the presence of 1 mM melatonin, the indoleamine managed to further lower the cell viability of chemotherapy-challenged HeLa cells, this effect being statistically significant ($P < 0.05$) for CIS- ($29.0 \pm 5.26\%$), 5-FU- ($68.3 \pm 5.10\%$), and DOX-treated cells ($57.9 \pm 3.92\%$), and nonsignificant for cytarabine- ($85.6 \pm 6.97\%$) and etoposide-exposed cells ($82.5 \pm 8.23\%$).

To examine whether the cell viability drop evoked by chemotherapy agents was linked to apoptotic cell death, we analyzed caspase-3 (a key downstream effector of apoptosis) activation in both treated and resting (control) cells. For this purpose, cells were only incubated with those chemotherapy agents that proved to be cytotoxic toward HeLa cell line, that is, CIS, 5-FU, and DOX. Treatment of cells with 1 mM melatonin alone for 24 hr gave rise to clear increase in caspase-3 activity (4.08 ± 0.56 ; $P < 0.05$; Fig. 2). Additionally, treatments with 20 μ M CIS, 1 mM 5-FU, and 1 μ M DOX for 24 hr also noticeably ($P < 0.05$) enhanced caspase-3 activity (23.4 ± 3.25 -, 5.82 ± 0.67 -, and 12.12 ± 4.21 -fold increase, respectively; Fig. 2). It is worth mentioning that CIS was the most effective chemotherapy agent in terms of caspase-3 activation, the stimulation being 23-fold higher than caspase basal activity. Importantly, melatonin was able to enlarge chemotherapy-evoked caspase-3 activation. In fact, treatment of HeLa cells with 20 μ M CIS or 1 mM 5-FU in the presence

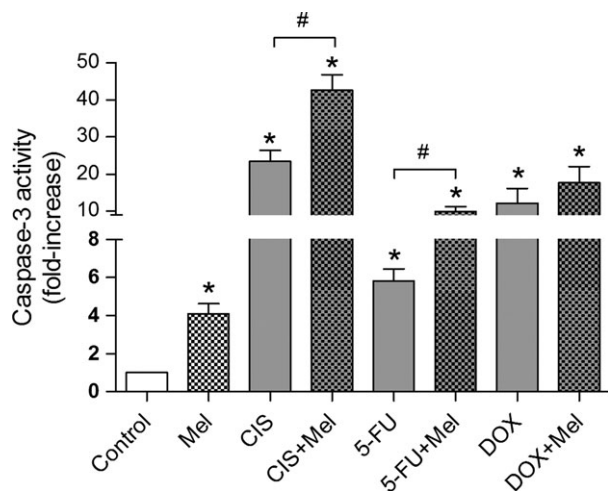


Fig. 2. Chemotherapy-mediated caspase-3 activation is enhanced by melatonin in HeLa cells. Cells were treated with 20 μ M cisplatin (CIS), 1 mM 5-fluorouracil (5-FU), or 20 μ M doxorubicin (DOX), or the vehicle (control), in the absence or presence of 1 mM melatonin (Mel) for 24 hr. Caspase-3 activity was estimated as described under Material and Methods. Values are presented as means \pm S.E.M of eleven independent experiments and expressed as fold increase over the pretreatment level (experimental/control). * $P < 0.05$ compared to control values. # $P < 0.05$ compared to their corresponding value in the absence of melatonin.

of 1 mM melatonin for 24 hr markedly ($P < 0.05$) triggered caspase-3 activation (42.6 ± 4.58 - and 9.89 ± 1.36 -fold increase, respectively), compared to the treatments with each chemotherapy agent alone. Nonetheless, melatonin together with DOX only produced a mild, nonsignificant rise (17.7 ± 4.16) in caspase-3 activity compared to DOX-treated HeLa cells (Fig. 2).

Given that intracellular ROS overproduction is usually linked to apoptotic cell death and caspase-9 is an initiator caspase involved in the initial steps of mitochondrial apoptosis, we determined both intracellular ROS generation and caspase-9 activation in double-stained (DCF and Red-LEHD-FMK) HeLa cells by flow cytometry. To this end, cells were only challenged with those chemotherapy agents displaying a putative synergism with melatonin according to the findings on caspase-3 activation, that is, CIS and 5-FU. Fig. 3A depicts representative cytograms for each treatment assayed. When HeLa cells were challenged with 1 mM melatonin alone, the percentage of DCF⁻/caspase-9⁻ (intact) cells fell dramatically ($35.4 \pm 6.8\%$; $P < 0.05$), while the proportion of cells stimulated for ROS production (DCF⁺/caspase-9⁻; $28.3 \pm 4.73\%$) as well as the amount of cells entering mitochondrial apoptosis due to ROS overproduction (DCF⁺/caspase-9⁺; $29.5 \pm 3.27\%$) considerably raised ($P < 0.05$; Fig. 3B). In relation to CIS, treatments with 20 μ M CIS for 24 hr induced a noticeable ($P < 0.05$) enhancement in the proportion of cells entering mitochondrial apoptosis due to ROS overproduction ($45.5 \pm 5.09\%$) at the expense of the percentage of intact cells, which was largely reduced ($30.5 \pm 7.07\%$; $P < 0.05$; Fig. 3B, left panel). Interestingly, the pro-oxidant and pro-apoptotic effects of CIS were potentiated when 20 μ M CIS and 1 mM melatonin were concomitantly administered for 24 hr. Actually, the number of early apoptotic cells (DCF⁻/caspase-9⁺) was significantly ($P < 0.05$) improved compared to CIS-treated HeLa cells ($40.5 \pm 4.76\%$; Fig. 3B, left panel). These findings suggested that melatonin gave a boost to CIS-stimulated cells, thereby allowing them to enter mitochondrial apoptosis faster and driving their apoptotic stage forward. As for 5-FU, stimulation of HeLa cells with 1 mM 5-FU for 24 hr significantly ($P < 0.05$) increased the percentage of cells entering mitochondrial apoptosis due to ROS overproduction ($45.8 \pm 6.39\%$) at the expense of the amount of intact cells ($27.3 \pm 2.68\%$; Fig. 3B, right panel). Likewise, the apoptotic actions of 5-FU were only moderately strengthened in the presence of melatonin, which was indicated by a further nonsignificant reduction in the proportion of intact cells ($20.8 \pm 6.36\%$; Fig. 3B, right panel).

To evaluate cells' apoptotic stage following stimulation with CIS or 5-FU in the absence and the presence of melatonin, we analyzed the redistribution of phosphatidylserine (PS) in the presence of PI. Fig. 4A portrays representative cytograms for each treatment assayed. Stimulation of HeLa cells with 1 mM melatonin alone for 24 hr produced a slight diminution in the percentage of alive cells (annexin⁻/PI⁻; $80.3 \pm 4.19\%$), doubled the proportion of early apoptotic cells (annexin⁺/PI⁻; $9.75 \pm 2.06\%$), and greatly ($P < 0.05$) improved the amount of late apoptotic cells (annexin⁺/PI⁺; $9.38 \pm 1.84\%$; Fig. 4B). Treatments

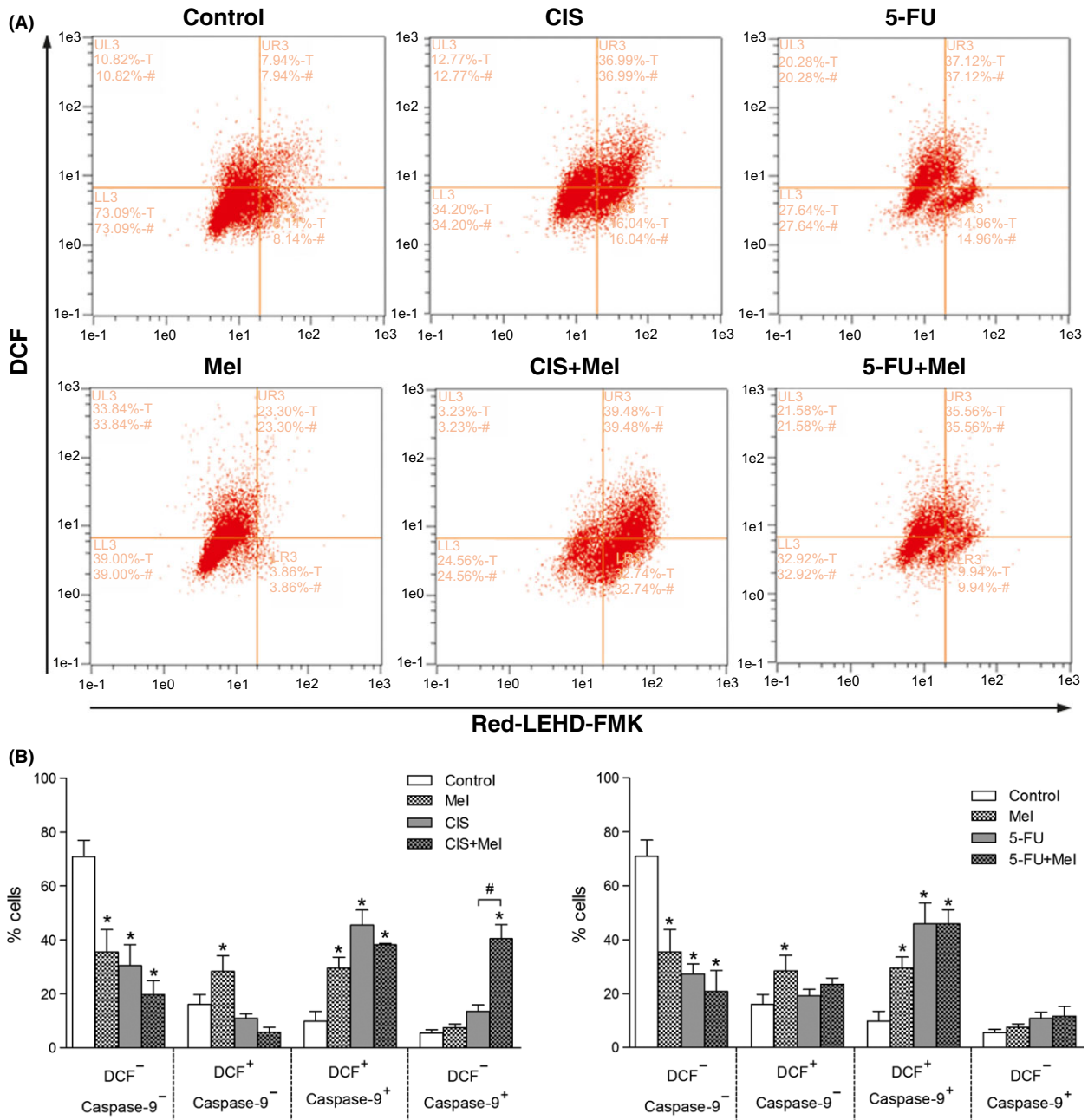


Fig. 3. Potentiating effect of melatonin on ROS production and caspase-9 activation induced by chemotherapy agents. HeLa cells were treated with 20 μ M cisplatin (CIS) or 1 mM 5-fluorouracil (5-FU), or the vehicle (control), in the absence or presence of 1 mM melatonin (Mel) for 24 hr. ROS production and caspase-9 activation were analyzed in double-stained cells (DCF and Red-LEHD-FMK) by flow cytometry, as described under Material and Methods. (A) Representative cytograms displaying cells stimulated for ROS production (DCF⁺/caspase-9⁻), cells entering mitochondrial apoptosis due to ROS overproduction (DCF⁺/caspase-9⁺), and early apoptotic cells (DCF⁻/caspase-9⁺) after 24 hr of treatment with the indicated combination of drugs. (B) Histograms showing percentages of each cell population. Values are presented as means \pm S.E.M. of four independent experiments. * $P < 0.05$ compared to their corresponding value in the absence of melatonin. # $P < 0.05$ compared to control values.

with 20 μ M CIS for 24 hr caused a significant ($P < 0.05$) increment in the percentage of early apoptotic ($40.0 \pm 2.65\%$) and late apoptotic cells ($13.34 \pm 3.47\%$) at the expense of the amount of alive cells, which was remarkably decreased ($39.3 \pm 3.71\%$; $P < 0.05$; Fig. 4B, left panel). Of note, simultaneous administration of 20 μ M CIS and 1 mM melatonin for 24 hr brought about a fur-

ther augmentation ($P < 0.05$) in the number of early apoptotic ($47.4 \pm 1.10\%$) and late apoptotic cells ($26.3 \pm 4.08\%$) as well as a concomitant decrement in the proportion of alive cells ($17.3 \pm 8.16\%$; Fig. 4B, left panel). These results are in agreement with our previous findings on intracellular ROS generation and caspase-9 activation, that is, melatonin somehow accelerated

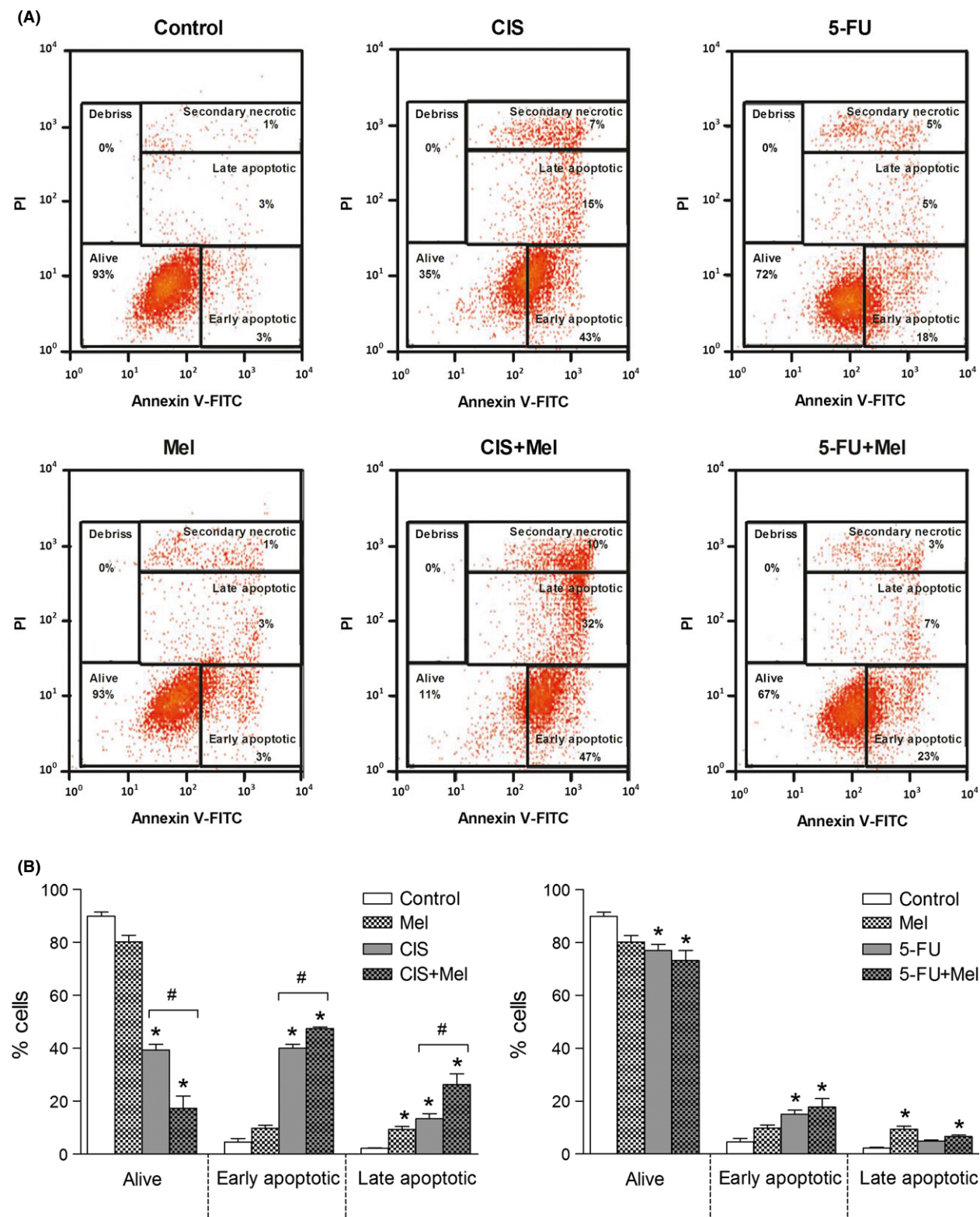


Fig. 4. Apoptotic cell death triggered by chemotherapy agents is strengthened by their combination with melatonin. HeLa cells were treated with 20 μ M cisplatin (CIS) or 1 mM 5-fluorouracil (5-FU), or the vehicle (control), in the absence or presence of 1 mM melatonin (Mel) for 24 hr. Apoptotic populations were detected by flow cytometry, as described under Material and Methods. (A) Representative plots depicting the redistribution of phosphatidylserine (annexin V staining) in the presence of propidium iodide (PI) after 24 hr of treatment with the indicated combination of drugs. (B) Histograms showing percentages of each cell population. Values are presented as means \pm S.E.M of four independent experiments. * $P < 0.05$ compared to control values. # $P < 0.05$ compared to their corresponding value in the absence of melatonin.

CIS-induced apoptosis. As far as 5-FU is concerned, stimulation of HeLa cells with 1 mM 5-FU for 24 hr significantly ($P < 0.05$) modified the percentage of alive ($77.0 \pm 4.01\%$) and early apoptotic cells ($15.0 \pm 2.80\%$; Fig. 4B, right panel). Also, it was observed that 5-FU was able to slightly improve the proportion of late apoptotic cells ($4.91 \pm 0.66\%$). Moreover, concomitant stimulation of HeLa cells with 1 mM 5-FU and 1 mM melatonin for 24 hr slightly enhanced the killing ability of 5-FU (Fig. 4B, right panel).

To further confirm the potentiating effects of melatonin on CIS-mediated apoptosis in HeLa cells, DNA fragmentation was qualitatively analyzed by agarose gel electrophoresis. Given that staurosporine is a well-known apoptosis-inducing agent, cells were stimulated with 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ staurosporine for 12 hr as positive control. As shown in Fig. 5, staurosporine (lane 7) generated a marked pattern of DNA fragmentation, while melatonin alone (lane 2) was unable to induce DNA degradation. In the same way, treatment with 20 μM CIS for 24 hr (lane 3) clearly caused DNA fragmentation, which was noticeably enhanced by the costimulation of HeLa cells with 1 mM melatonin (lane 4). Finally, treatment with 1 mM 5-FU for 24 hr did not produce appreciable DNA damage neither in the absence nor in the presence of melatonin, thereby suggesting that this chemotherapy agent may need longer exposure time to be effective against HeLa cells.

Discussion

Apoptosis or programmed cell death is a fundamental physiological process that plays a major role in tissue homeostasis, organ development, and elimination of defective or potentially dangerous cells [27, 28]. However, any

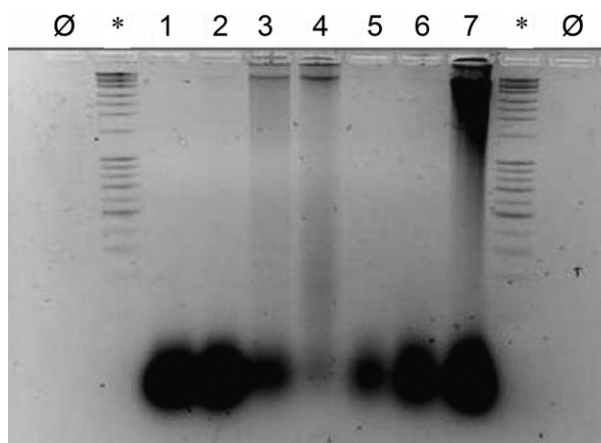


Fig. 5. Melatonin enhances cisplatin-evoked DNA fragmentation. HeLa cells were treated with 20 μM cisplatin (CIS) or 1 mM 5-fluorouracil (5-FU), or the vehicle (control), in the absence or presence of 1 mM melatonin (Mel) for 24 hr. Stimulation with 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ staurosporine for 12 hr was used as a positive control. DNA fragmentation was evaluated as described under Material and methods. (Ø) empty lane, (*) molecular weight marker (PCR 100 bp low ladder), (1) control, (2) melatonin, (3) cisplatin, (4) cisplatin + melatonin, (5) 5-fluorouracil, (6) 5-fluorouracil + melatonin, and (7) staurosporine.

defect in the control of apoptosis may lead to pathological conditions such as cancer when proliferation is increased, that is, when the rate of apoptosis is downregulated, while it may cause neurodegenerative and autoimmune diseases when the rate of cell death is upregulated [29]. As for melatonin, it is a multitasking molecule that employs a variety of mechanisms to modulate the physiology and molecular biology of cells [30]. Nonetheless, in the last few years, melatonin has attracted much attention due to its influence on the apoptotic process. The precise mechanism whereby melatonin regulates apoptosis still remains unknown, although it has been described that the indoleamine possesses both pro- and anti-apoptotic actions depending on cell type [31].

Herein, we investigated the putative potentiating effect of melatonin on chemotherapy-induced cytotoxicity and apoptosis in human cervical cancer HeLa cells. Thus, we reported that melatonin per se is able to display cytotoxic, pro-oxidant, and pro-apoptotic actions toward HeLa cells. Most importantly, the indoleamine proved to be effective in improving the tumor killing abilities of different chemotherapy agents. In spite of the fact that we tested five chemotherapy agents in the present work, the most striking results were those related to the parallel stimulation of HeLa cells with CIS and melatonin, as implied above. For instance, we observed that the indoleamine managed to further enhance CIS-induced caspase-3 activation, the stimulation being 42-fold higher than caspase basal activity (20-fold higher than CIS-triggered caspase-3 activity). Apart from this, melatonin only displayed mild or moderate chemosensitizing effects in DOX- or 5-FU-challenged HeLa cells, respectively; however, it was unable to significantly sensitize HeLa cells to cytarabine and etoposide, two chemotherapy agents generally used for leukemia management. In this sense, previous studies have proved that melatonin strengthens the effect of DOX or puromycin in various tumor cell lines, including human Ewing sarcoma cancer cells [32], human hepatoma cell lines [33], human leukemia cell line HL-60 [34], as well as human lung cancer cell line A-549 [35]. To our mind, the effectiveness of melatonin in sensitizing HeLa cells to 5-FU or DOX needs to be thoroughly tested because the indoleamine clearly tends to potentiate the anticancer actions of these two chemotherapy agents. Thus, longer exposure times (48, 72, and 96 hr) would be most likely required for melatonin to chemosensitize HeLa cells toward 5-FU or even DOX. The different genotoxic mechanisms involved in the detrimental effects of all these chemotherapy drugs may account for the fact that CIS, an alkylating-like agent that blocks DNA replication and transcription by inducing DNA adducts, was more effective than other chemotherapeutic drugs in combination with melatonin.

Melatonin, as a powerful antioxidant [14, 15], displays protective actions against chemotherapy which may be due, at least in part, to a reduction in the overproduction of ROS in healthy cells [16]. Nevertheless, stunning findings have recently indicated that melatonin may behave as pro-oxidant molecule in tumor cells [15, 24]. In the current study, we have provided evidence that melatonin stimulates intracellular ROS overproduction, and hence oxida-

tive stress, in cervical cancer HeLa cells, as ascertained by increments in the population of DCF⁺/caspase-9⁻ cells. As yet, the premises determining the pro-oxidant effects of melatonin in cellular systems as well as the underlying mechanisms of action still remain elusive. Nevertheless, some studies have suggested melatonin-derived endoperoxides to be responsible molecules for the observed pro-oxidant effect of melatonin [36, 37]. Other authors have also reported that melatonin decreases antioxidant mRNA and cellular GSH levels in some tumor types, which can be easily related to the increased ROS production [37]. Likewise, it has been shown that melatonin-mediated ROS production is concomitant to NF- κ B activation, thus indicating that this activation might be involved in the pro-oxidant effect of melatonin [38].

Melatonin-evoked ROS production subsequently triggered caspase-9-dependent mitochondrial apoptosis in HeLa cells, as shown by rises in the proportion of DCF⁺/caspase-9⁺ cells. In this line, Osseni and coworkers [39] demonstrated that there was an increase in ROS production and a simultaneous decrease in the viability of HepG2 cells as early as 45 min after melatonin stimulation (above 100 μ M concentrations). Moreover, Buyukavci and colleagues [40] found that melatonin produced an enhancement in ROS production and a concomitant promotion of apoptosis in several hematologic cancer cell lines. Interestingly, melatonin potentiated the pro-apoptotic abilities of 5-FU and, especially, of CIS. In fact, when compared to CIS alone, concomitant stimulation with CIS and melatonin rapidly promoted oxidative burst-mediated activation of caspase-9 in HeLa cells, thus boosting the onset of apoptosis and driving cells' apoptotic stage forward, as determined by meaningful augmentations in the ratio of DCF⁺/caspase-9⁺ cells. Despite the fact that some authors have claimed that melatonin may modulate CIS-induced apoptosis through either the inactivation of pro-survival signals [41] or the regulation of autophagy and DNA repair systems [42], the mechanisms responsible for melatonin's potentiating effects on CIS-triggered mitochondrial apoptosis remain to be deciphered. Importantly, it is now clear that the cytotoxic effects of CIS do not represent a mere consequence of its genotoxic activity, but originate from cytoplasmic signaling pathways that may involve (i) the accumulation of ROS and nitric oxide, which not only exacerbate CIS genotoxicity but also exert direct cytotoxic effects by favoring the opening of the so-called permeability transition pore complex (PTPC); (ii) the transduction of a mitochondrial outer membrane permeability (MOMP)-stimulatory signal via the pro-apoptotic Bcl-2 family member Bak1, the PTPC component voltage-dependent anion channel 1 (VDAC1) and the Bak1 homolog Bax; and (iii) the activation of a cytoplasmic pool of p53 that is capable of promoting MOMP via various mechanisms (for review, see [43]). In this line, melatonin has been previously reported to stimulate intracellular ROS production and subsequent PTPC opening, induce activation and recruitment into MOM of pro-apoptotic proteins such as Bax, and enhance p53 pro-apoptotic function [44]. This evidence supports the notion that both melatonin and

CIS pro-apoptotic signals converge at the mitochondria level, thus likely allowing cells to enter mitochondrial apoptosis faster.

Finally, the potentiating actions of melatonin on CIS-stimulated apoptosis in HeLa cells were further confirmed after analyzing the populations of apoptotic cells via annexin V/PI and DNA laddering assays. In this way, when compared to CIS alone, simultaneous administration of CIS and melatonin brought about a substantial improvement in the number of early apoptotic (annexin⁺/PI⁻) and late apoptotic cells (annexin⁺/PI⁺) as well as a concomitant decrement in the proportion of alive cells (annexin⁻/PI⁻). Moreover, our findings indicated that the indoleamine distinctly enhanced CIS-mediated DNA fragmentation, as qualitatively measured by agarose gel electrophoresis. In this regard, previous studies have verified the synergistic effect of melatonin on chemotherapy-induced cytotoxicity and apoptosis in rat pancreatic carcinoma AR42J cells [21]. Similarly, other authors have recently highlighted the synergistic effect of melatonin on DOX-evoked apoptosis in the human hepatoma cell line HepG2 [33].

To sum up, our findings provided evidence that in vitro melatonin strongly enhanced the sensitivity of cervical cancer cells to CIS. This fact seems to be linked to the ability of the indoleamine to make CIS-challenged HeLa cells rapidly enter ROS-dependent mitochondrial apoptosis which, in turn, resulted in rises in the ratio of late apoptotic cells and DNA fragmentation. So far, synergistic antitumor actions of melatonin are still controversial and seem to be dependent on the chemotherapy agent used and the tissue where cancer cells were derived from. In fact, it has been described that melatonin, in opposition to what is expected, lessens idarubicin-elicited nuclear fragmentation in both healthy lymphocytes and leukemic K562 cells [45]. Likewise, melatonin has been proven to attenuate antitumor actions of CIS in human liver carcinoma HepG2 cells via the modulation of the balance of apoptotic proteins [42]. Other studies have also indicated that melatonin does not interfere with the cytotoxic effect of chemotherapy agents such as cytarabine, daunorubicin, and etoposide in different leukemia cell lines, including Jurkat, MOLT-4, Daudi, HL-60, CMK, and K562 [20]. Despite this, it has been recently demonstrated that melatonin enhances cisplatin-induced cytotoxicity in different human ovarian cancer cells, namely SK-OV-3 [41], HTOA, and OVCAR-3 [46], which consistently agrees with our own results in human cervical cancer HeLa cells. Therefore, findings on the in vitro chemosensitizing effect of melatonin in female genital tract malignancies seem to be pretty consistent, thereby suggesting that the indoleamine could be potentially applied as coadjuvant agent to improve the curative effect of chemotherapy, particularly of platinum-based therapy, on tumors affecting the female reproductive system. Given that melatonin has been also reported to inhibit tumor growth and progression in animal models of cancer [47], it would be thus interesting to perform further in vivo studies so as to corroborate the results obtained in the present research.

Acknowledgements

This work was supported by Gobierno de Extremadura grants (GR10003 and IB13072). J. Espino holds a research postdoctoral fellowship from Gobierno de Extremadura (jointly financed by the European Regional Development Fund (ERDF); ref. PO14011). The authors appreciate the technical and human support provided by Facility of Bioscience Applied Techniques of SAIUEX (financed by UEx, Junta de Extremadura, MICINN, FEDER, and FSE).

Author contributions

RP and JE carried out the experiments. JE performed the statistical analysis and drafted the manuscript. ABR and JAP designed and conceived the study, interpreted the data, and discussed the results. All authors read and approved the final manuscript.

References

- HAMED AH, SHEPARD MK, MAGLINTE DD et al. Neoadjuvant chemotherapy followed by simultaneous robotic radical trachelectomy and reversal of tubal sterilization in stage IB2 cervical cancer. *JSL - J Soc Laparoend* 2012; **16**:650–653.
- LAI JC, CHOU YJ, HUANG N et al. Survival analysis of Stage IIA1 and IIA2 cervical cancer patients. *Taiwan J Obstet Gynecol* 2013; **52**:33–38.
- OKAZAWA M, MABUCHI S, ISOHASHI F et al. Impact of the addition of concurrent chemotherapy to pelvic radiotherapy in surgically treated stage IB1-IIB cervical cancer patients with intermediate-risk or high-risk factors: a 13-year experience. *Int J Gynecol Cancer* 2013; **23**:567–575.
- REITER RJ, TAN DX, ROSALES-CORRAL SA et al. The universal nature, unequal distribution and antioxidant functions of melatonin and its derivatives. *Mini-Rev Med Chem* 2013; **13**:373–384.
- REITER RJ, TAN DX, TAMURA H et al. Clinical relevance of melatonin in ovarian and placental physiology. *Gynecol Endocrinol* 2014; **30**:83–89.
- HARDELAND R, CARDINALI DP, SRINIVASAN V et al. Melatonin – a pleiotropic, orchestrating regulator molecule. *Prog Neurobiol* 2011; **93**:350–384.
- ARENDT J, SKENE DJ. Melatonin as a chronobiotic. *Sleep Med Rev* 2005; **9**:25–39.
- REITER RJ, TAN DX, MANCHESTER LC et al. Melatonin and reproduction revisited. *Biol Reprod* 2009; **81**:445–456.
- GUERRERO JM, REITER RJ. Melatonin-immune system relationships. *Curr Top Med Chem* 2002; **2**:167–179.
- CALVO JR, GONZALEZ-YANES C, MALDANADO MD. The role of melatonin in the cells of the innate immunity: a review. *J Pineal Res* 2013; **55**:103–120.
- BEJARANO I, REDONDO PC, ESPINO J et al. Melatonin induces mitochondrial-mediated apoptosis in human myeloid HL–60 cells. *J Pineal Res* 2009; **46**:392–400.
- ESPINO J, BEJARANO I, REDONDO PC et al. Melatonin reduces apoptosis induced by calcium signaling in human leukocytes: evidence for the involvement of mitochondria and Bax activation. *J Membr Biol* 2010; **233**:105–118.
- ESPINO J, ORTIZ A, BEJARANO I et al. Melatonin protects human spermatozoa from apoptosis via melatonin receptor- and extracellular signal-regulated kinase-mediated pathways. *Fertil Steril* 2011; **95**:2290–2296.
- TAN DX, MANCHESTER LC, TERRON MP et al. One molecule, many derivatives: a never-ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species? *J Pineal Res* 2007; **42**:28–42.
- ZHANG HM, ZHANG Y. Melatonin: a well-documented antioxidant with conditional pro-oxidant actions. *J Pineal Res* 2014; **57**:131–146.
- REITER RJ, TAN DX, SAINZ R et al. Melatonin: reducing the toxicity and increasing the efficacy of drugs. *J Pharm Pharmacol* 2002; **54**:1299–1321.
- BUYUKAVCI M, OZDEMIR O, BUCK S et al. Effect of melatonin on the cytotoxicity of chemotherapeutic drugs in human leukaemia cells. *In Vivo* 2011; **25**:405–409.
- CHINERY R, BROCKMAN JA, PEERLER MO et al. Antioxidants enhance the cytotoxicity of chemotherapeutic agents in colorectal cancer. *Nat Med* 1997; **3**:1233–1237.
- LISSONI P. Biochemotherapy with standard chemotherapies plus the pineal hormone melatonin in the treatment of advanced solid neoplasms. *Pathol Biol* 2007; **55**:201–204.
- XIANG S, DAUCHY RT, HAUCH A et al. Doxorubicin resistance in breast cancer is driven by light at night induced disruption of the circadian melatonin signal. *J Pineal Res* 2015; **59**:60–69.
- UGUZ AC, CIG B, ESPINO J et al. Melatonin potentiates chemotherapy-induced cytotoxicity and apoptosis in rat pancreatic tumor cells. *J Pineal Res* 2012; **53**:91–98.
- LEE SB, TONG SY, KIM JJ et al. Caspase-independent autophagic cytotoxicity in etoposide-treated CaSki cervical carcinoma cells. *DNA Cell Biol* 2007; **26**:713–720.
- WANG LM, WHITE JC, CAPIZZI RL. The effect of ara-C-induced inhibition of DNA synthesis on its cellular pharmacology. *Cancer Chemother Pharmacol* 1990; **25**:418–424.
- BEJARANO I, ESPINO J, BARRIGA C et al. Pro-oxidant effect of melatonin in human leukocytes: relation with its cytotoxic and pro-apoptotic effects. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2011; **108**:14–20.
- ESPINO J, BEJARANO I, PAREDES SD et al. Protective effect of melatonin against human leukocyte apoptosis induced by intracellular calcium overload: relation with its antioxidant actions. *J Pineal Res* 2011; **51**:195–206.
- ESPINO J, RODRÍGUEZ AB, PARIENTE JA. The inhibition of TNF- α -induced leukocyte apoptosis by melatonin involves membrane receptor MT1/MT2 interaction. *J Pineal Res* 2013; **54**:442–452.
- LIU X, KIM CN, YANG J et al. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* 1996; **86**:147–157.
- STRASSER A, O'CONNOR L, DIXIT VM. Apoptosis signaling. *Ann Rev Biochem* 2000; **69**:217–245.
- THOMPSON CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 1995; **267**:1456–1462.
- REITER RJ, TAN DX, FUENTES-BROTO L. Melatonin: a multitasking molecule. *Prog Brain Res* 2010; **181**:127–151.
- SAINZ RM, MAYO JC, RODRÍGUEZ C et al. Melatonin and cell death: differential actions on apoptosis in normal and cancer cells. *Cell Mol Life Sci* 2003; **60**:1407–1426.
- CASADO-ZAPICO S, RODRIGUEZ-BLANCO J, GARCIA-SANTOS G. Synergistic antitumor effect of melatonin with several chemotherapeutic drugs on human Ewing sarcoma cancer cells: potentiation of the extrinsic apoptotic pathway. *J Pineal Res* 2010; **48**:72–80.

33. FAN LL, SUN GP, WANG ZG. Melatonin and doxorubicin synergistically induce cell apoptosis in human hepatoma cell lines. *World J Gastroenterol* 2010; **16**:1473–1481.
34. KOH W, JEOND SJ, LEE HJ. Melatonin promotes puromycin-induced apoptosis with activation of caspase-3 and 5'-adenosine monophosphate-activated kinase-alpha in human leukaemia HL-60 cells. *J Pineal Res* 2011; **50**:367–373.
35. FIC M, PODHORSKA-OKOLOW M, DZIEGIEL P et al. Effect of melatonin on cytotoxicity of doxorubicin toward selected cell lines (human keratinocytes, lung cancer cell line A-549, laryngeal cancer cell line Hep-2). *In Vivo* 2007; **21**:513–518.
36. MEDINA-NAVARRO R, DURAN-REYES G, HICKS JJ. Prooxidating properties of melatonin in the in vitro interaction with the singlet oxygen. *Endoc Res* 1999; **25**:263–280.
37. SÁNCHEZ-SÁNCHEZ AM, MARTÍN V, GARCÍA-SANTOS G et al. Intracellular redox state as determinant for melatonin antiproliferative vs cytotoxic effects in cancer cells. *Free Radical Res* 2011; **45**:1333–1341.
38. CRISTOFANON S, UGUCCIONI F, CERELLA C et al. Intracellular prooxidant activity of melatonin induces a survival pathway involving NF- κ B activation. *Ann N Y Acad Sci* 2009; **1171**:472–478.
39. OSSENI RA, RAT P, BOGDAN A et al. Evidence of prooxidant and antioxidant action of melatonin on human liver cell line HepG2. *Life Sci* 2000; **68**:387–399.
40. BUYUKAVCI M, OZDEMIR O, BUCK S et al. Melatonin cytotoxicity in human leukemia cells: relation with its pro-oxidant effect. *Fund Clin Pharmacol* 2006; **20**:73–79.
41. KIM JH, JEONG SJ, KIM B et al. Melatonin synergistically enhances cisplatin-induced apoptosis via the dephosphorylation of ERK/p90 ribosomal S6 kinase/heat shock protein 27 in SK-OV-3 cells. *J Pineal Res* 2012; **52**:244–252.
42. BENNUKUL K, NUMKLIANG S, LEARDKAMOLKARN V. Melatonin attenuates cisplatin-induced HepG2 cell death via the regulation of mTOR and ERCC1 expressions. *World J Hepatol* 2014; **6**:230–242.
43. GALLUZZI L, VITALE I, MICHELS J et al. Systems biology of cisplatin resistance: past, present and future. *Cell Death Dis* 2014; **5**:e1257.
44. BIZZARRI M, PROIETTI S, CUCINA A et al. Molecular mechanisms of the pro-apoptotic actions of melatonin in cancer: a review. *Expert Opin Ther Targets* 2013; **17**:1483–1496.
45. MAJSTEREK I, GLOCK E, BLASIAK J et al. A comparison of the action of amifostine and melatonin on DNA-damaging effects and apoptosis induced by idarubicin in normal and cancer cells. *J Pineal Res* 2005; **38**:254–263.
46. FUTAGAMI M, SATO S, SAKAMOTO T et al. Effects of melatonin on the proliferation and cis-diamminedichloroplatinum (CDDP) sensitivity of cultured human ovarian cancer cells. *Gynecol Oncol* 2001; **82**:544–549.
47. PARONI R, TERRANELO L, BONOMINI F et al. Antitumour activity of melatonin in a mouse model of human prostate cancer: relationship with hypoxia signaling. *J Pineal Res* 2014; **57**:43–52.