



Facultad de Ciencias

MELATONINA Y APOPTOSIS

Máster Universitario en Biotecnología Avanzada

Memoria de Trabajo Fin de Máster

Jorge Alvarado Valiente

Badajoz, 2023

José Antonio Pariente Llanos, profesor del Departamento de Fisiología de la Universidad de Extremadura.

INFORMA:

Que D. Jorge Alvarado Valiente ha realizado bajo su dirección el Trabajo Fin de Máster y considera que la memoria reúne los requisitos necesarios para su evaluación.

Badajoz, 27 de noviembre de 2023

Fdo. Jose Antonio Pariente Llanos

AGRADECIMIENTOS

Quería agradecer a mi familia, en especial a mis padres, y a todas aquellas personas que ya no están por apoyarme y animarme siempre, tanto en los buenos como en los malos momentos. Gracias a vosotros he llegado hasta aquí.

ABREVIATURAS

AA-NAT: Arilalquilamina-N-acetiltransferasa

Apaf-1: Factor activador de proteasas de la apoptosis

ASMT: Acetilserotonina-O-metiltransferasa

clAP1: IAP1 celular

clAP2: IAP2 celular

COX-2: Ciclooxygenasa 2

CVB3: Coxsackievirus B3

DAMP: Patrones moleculares asociados a daño tisular

DISC: Complejo de señalización inductor de muerte

FADD: Proteína con dominio de muerte asociado a Fas

IAP: Inhibidores de la apoptosis

JNK: Quinasa c-Jun N-terminal

LH: Hormona luteinizante

Mnf2: Mitofusina 2

NSQ: Núcleo supraquiasmático

PVN: Núcleo paraventricular

QR2: Quinona reductasa 2

PARP: Poli ADP-ribosa polimerasa

PI3K: Fosfatidilinositol 3 quinasa

RHDV: Virus de la enfermedad hemorrágica del conejo

ROS: Especies reactivas de oxígeno

TRADD: Proteína con dominio de muerte asociado con el receptor del TNF

TRAIL: Ligando inductor de la apoptosis relacionado con el TNF

VEEV: Virus de la encefalitis equina venezolana

XIAP: IAP ligado al cromosoma X

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1. Esquema de la metodología empleada para realizar este Trabajo Fin de Máster.	12
Figura 3.1. Síntesis de la melatonina a partir de triptófano.	17
Figura 3.2. Receptores de la noradrenalina y sus efectos (Fuente: Vasey et al., 2021).	18
Figura 3.3. Ruta neuroanatómica del estímulo luminoso hasta la glándula pineal (Fuente: Vasey et al., 2021).	19
Figura 3.4. Mecanismo de acción de los receptores MT ₁ y MT ₂ (creado en Biorender).	23
Figura 3.5. Proteínas pertenecientes a la familia Bcl-2 y sus dominios (Fuente: Chan y Yu, 2004).	27
Figura 3.6. Cascada de señalización de la vía intrínseca y extrínseca de la apoptosis (Fuente: D'Arcy, 2019).	29
Figura 3.7. Regulación del apoptosoma y de las caspasa 3 a través de los inhibidores de la apoptosis ligados al cromosoma X (Fuente: Berthelet y Dubrez, 2013).	30
Figura 3.8. Vía de señalización de la necroptosis (Fuente: D'Arcy, 2019).	32
Figura 3.9. Vía de la apoptosis inducida por un estado de obesidad que es inhibida por la acción de la melatonina sobre la mitofusina 2 (Fuente: Stacchiotti et al., 2014).	34
Figura 3.10. Se observa un incremento del número de células teñidas con TUNEL durante la infección con coxsackievirus B3 en comparación con el grupo control (Cont), mientras que el tratamiento con melatonina durante la infección (MEL+CVB3) reduce el número de células apoptóticas (Fuente: Ouyang et al., 2019).	39
Figura 3.11. Durante la infección con coxsackievirus B3 se incrementa la activación de la caspasa 9, mientras que al tratar los cardiomiocitos con melatonina (MEL+CVB3) se produce una disminución de la activación de esta caspasa (Fuente: Ouyang et al., 2019).	40

ÍNDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN	6
ABSTRACT	7
CAPÍTULO 1. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	8
CAPÍTULO 2. METODOLOGÍA	10
CAPÍTULO 3. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS	13
1. MELATONINA	14
1.1. Historia.....	14
1.2. Ritmos circadianos	15
1.3. Metabolismo de la melatonina	16
1.3.1. Síntesis de melatonina endógena	16
1.3.2. Metabolismo de la melatonina en la glándula pineal	19
1.3.3. Metabolismo de la melatonina en fuentes extrapineales	20
1.4. Efectos fisiológicos de la melatonina	21
1.5. Receptores de la melatonina	22
1.6. Melatonina exógena	24
2. MUERTE CELULAR	24
2.1. Muerte celular no programada: Necrosis	25
2.2. Muerte celular programada	26
2.2.1. Apoptosis	26
2.2.2. Piroptosis	30
2.2.3. Necroptosis	31
3. EFECTOS DE LA MELATONINA EN LA APOPTOSIS	33
3.1. Melatonina y cáncer	33
3.2. Melatonina e infecciones virales	38
3.3. Melatonina y otras alteraciones	40

CAPÍTULO 4. CONCLUSIONES	42
BIBLIOGRAFÍA	44

RESUMEN

La melatonina es una hormona secretada, principalmente, por la glándula pineal y su precursor es el aminoácido triptófano. Su secreción sigue un ritmo circadiano, incrementando su producción durante las horas de oscuridad y disminuyendo cuando hay luz. Fue descubierta en 1958 y ejerce una gran diversidad de funciones, como regular el sistema inmune y los ritmos circadianos, proteger las células frente al estrés oxidativo y nitrosativo, capacidad anti-apoptótica, etc.

La muerte celular interviene en la renovación de las células en los organismos multicelulares. Existen dos tipos de muerte celular, una que se denomina muerte no programada o necrosis y otra conocida como muerte celular programada. Dentro de este último tipo se encuentra la apoptosis, que puede comenzar por la vía intrínseca o por la vía extrínseca. En ambos caminos intervienen las proteínas de la familia Bcl-2 y las enzimas caspasas, que van a degradar los cromosomas, las proteínas nucleares y del citoesqueleto para que los fagocitos eliminen los cuerpos apoptóticos que se han formado.

El objetivo principal del presente estudio es hacer una extensa y actualizada revisión bibliográfica científica de la relación que existe entre la melatonina con la apoptosis. Se ha visto en diversos estudios que esta hormona es capaz de sensibilizar las células cancerígenas a la apoptosis mediada por la quimio y radioterapia, al mismo tiempo que protege a las células sanas de estos tratamientos. También se ha utilizado en infecciones virales para evitar la apoptosis e incrementar la supervivencia del animal, o en enfermedades degenerativas como el Alzheimer y la osteoartritis.

Palabras clave: Melatonina, Apoptosis, Muerte celular

ABSTRACT

Melatonin is a hormone secreted, mainly, by the pineal gland and its precursor is the amino acid tryptophan. Its secretion follows a circadian rhythm, increasing its production during the darkness and decreasing when there is light. It was discovered in 1958 and performs a great diversity of functions, such as regulating the immune system and circadian rhythms, protecting cells against oxidative and nitrosative stress, anti-apoptotic capacity, etc.

Cell death is involved in cell renewal in multicellular organism. There are two types of cell death, one that is called unprogrammed death or necrosis and another called programmed cell death. Within this last type is apoptosis, that it can begin by the intrinsic pathway or through the extrinsic pathway. In both paths, the proteins of the Bcl-2 family and caspase enzymes are involved, which will favor the degradation of chromosomes, nuclear proteins and the cytoskeleton so the phagocytes eliminate the apoptotic bodies that have been formed.

The main objective of the present study is to make an extensive and updated scientific literature review of the relationship between melatonin and apoptosis. It has been seen in various studies that this hormone is able to sensitize cancer cells to apoptosis mediated by chemo and radiotherapy, while protecting healthy cells from these treatments. It has also been used in viral infections to prevent apoptosis and increase animal survival, or in degenerative diseases such as Alzheimer's disease and osteoarthritis.

Keywords: Melatonin, Apoptosis, Cell death

CAPÍTULO 1. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

La melatonina es una hormona secretada durante la noche por la glándula pineal con numerosas actividades biológicas. Además de intervenir en la regulación de los ritmos circadianos o en el estado de ánimo, investigaciones epidemiológicas han descubierto efectos apoptóticos, angiogénicos, oncostáticos, antiproliferativos tanto *in vitro* como *in vivo*, reduciendo la invasividad de diferentes tipos de cáncer. Al mismo tiempo, es capaz de reducir la resistencia a los medicamentos anticancerígenos y los efectos secundarios provocados por los tratamientos de quimioterapia y radioterapia (Bhattacharya *et al.*, 2019; Talib *et al.*, 2021; Targhazeh *et al.*, 2022). También se ha visto que en determinadas alteraciones en las que se produce la apoptosis de las células, como en procesos virales (Montiel *et al.*, 2015; Ouyang *et al.*, 2019), en enfermedades degenerativas (Hossain *et al.*, 2021), en la toxicidad provocada por diversos compuestos (Fernández *et al.*, 2015; Sharma *et al.*, 2014) o en el estrés por calor en los espermatozoides (Bejarano *et al.*, 2014), la melatonina tiene efectos anti-apoptóticos sobre este tipo de muerte celular.

El presente Trabajo Fin de Máster se centra en realizar una revisión bibliográfica actualizada que nos permita ampliar los conocimientos sobre la melatonina y sus efectos sobre la muerte celular. Su capacidad de eliminar las ROS, de incrementar o reducir las proteínas pro-apoptóticas y anti-apoptóticas o de aumentar la expresión de receptores de muerte celular la hacen una posible herramienta para ser utilizada en determinados tratamientos.

Por tanto, teniendo en cuenta todo esto, los objetivos que se plantean en este estudio son los siguientes:

1. Realizar una extensa y actualizada revisión bibliográfica acerca de la melatonina y sus efectos sobre la apoptosis.
2. Analizar los efectos anti-apoptóticos y pro-apoptóticos que ejerce esta hormona durante el cáncer en células tumorales y en células sanas.
3. Relacionar su capacidad de evitar la apoptosis de las células en diferentes enfermedades y alteraciones.

CAPÍTULO 2. METODOLOGÍA

Para realizar esta revisión bibliográfica se ha llevado a cabo una búsqueda asistida por ordenador desde el mes de febrero hasta el mes de julio de 2023. Para ello se ha empleado PubMed, un buscador que permite acceder a la información biomédica que se encuentra en la base de datos de MEDLINE y de otras revistas científicas, además de SCOPUS, una plataforma de la editorial Elsevier que contiene publicaciones del ámbito científico, y de Google Scholar, un buscador de literatura de investigación.

Para realizar los apartados 1 y 2 del Capítulo 3 se ha realizado una búsqueda en estos buscadores tanto de artículos como de revisiones científicas y capítulos de libros publicados en los últimos 20 años. Las palabras clave empleadas para encontrar las publicaciones han sido: “melatonin”, “melatonin history”, “circadian rhythms and melatonin”, “extrapineal sources melatonin”, “melatonin effects”, “cell death”, “apoptosis” y “Bcl-2 proteins” (Fig. 2.1).

Sin embargo, en la realización del apartado 3 del Capítulo 3 se acotó los años de publicación a los últimos 10 años, es decir, entre 2013 y 2023, para que los resultados fuesen actualizados y recientes. En esta búsqueda los términos utilizados fueron “melatonin”, “melatonin and apoptosis” y “melatonin and cell death” (Fig. 2.1).

Las publicaciones encontradas de artículos, revisiones y capítulos de libros de ambas búsquedas se eligieron, en primera instancia, en función de su título y su resumen y, posteriormente, según su contenido.

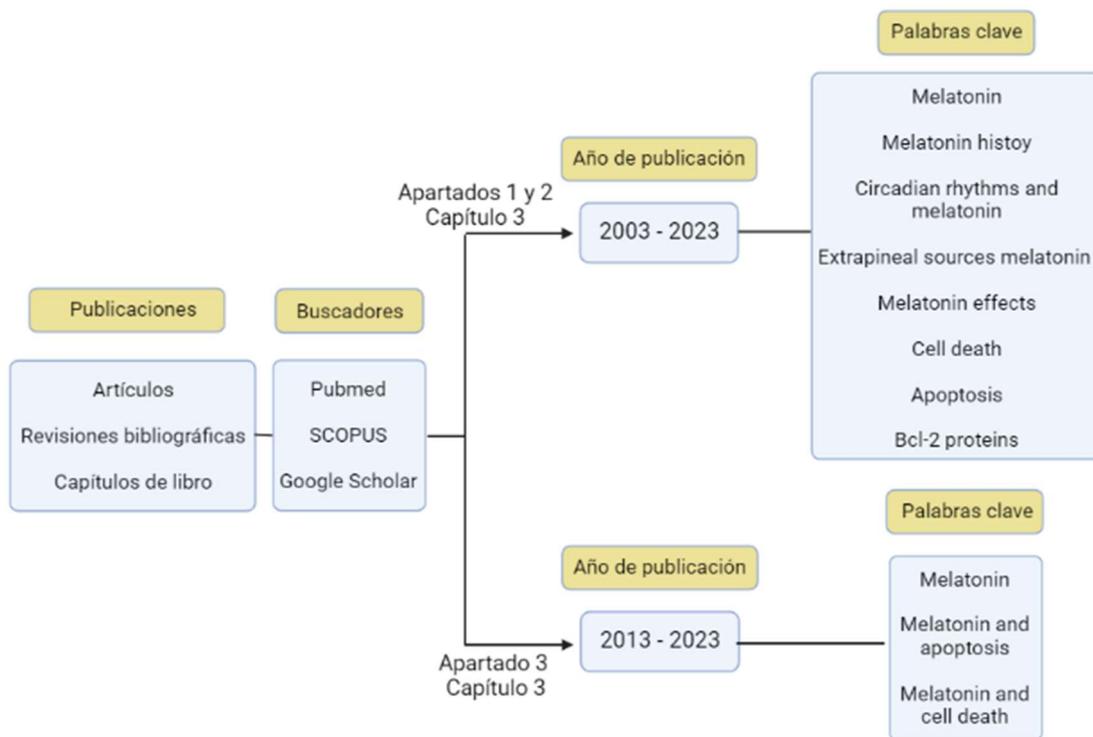


Figura 2.1. Esquema de la metodología empleada para realizar este Trabajo Fin de Máster.

CAPÍTULO 3. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

1. MELATONINA

La melatonina, también conocida como *N*-acetil-5-metoxitriptamina, es la hormona secretada por la glándula pineal (Tordjman *et al.*, 2017). Fue caracterizada en el año 1958 y su peso molecular es de 232,3 g/mol. Esta indolamina anfifílica procede del aminoácido triptófano (Trp), presenta una gran actividad antioxidante debido a su capacidad de captar radicales libres y de estimular las enzimas antioxidantes en diferentes tejidos (Cipolla-Neto y Amaral, 2018). Por otro lado, este compuesto interviene en la regulación del sueño y de los ritmos circadianos (Vasey *et al.*, 2021).

Su papel antioxidante se ha propuesto como la principal función y se ha conservado a lo largo de la evolución, debido a que este efecto ocurre en numerosos organismos que se encuentran en distintos taxones, incluyendo a las cianobacterias, dinoflagelados, hongos, platelmintos, insectos, levaduras, plantas, peces, anfibios, aves, mamíferos... (Cipolla-Neto y Amaral, 2018).

La glándula pineal produce melatonina de forma circadiana, influyendo en la cronobiología de las actividades del organismo, como son los ritmos endocrinos y no endocrinos. Esta hormona alcanza bajas concentraciones durante el día y eleva sus niveles durante la noche. Mediante la activación de sus receptores acoplados a proteínas G coordina tanto los ritmos circadianos como los procesos neuroendocrinos (Acuña-Castroviejo *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2016).

Además de la glándula pineal, también existen otras células y tejidos que sintetizan melatonina, a los que se les denominan fuentes extrapineales, como son la retina, células de la médula ósea, plaquetas, piel, linfocitos, glándula de Harder, cerebelo y, sobre todo, el tracto gastrointestinal de los vertebrados (Tordjman *et al.*, 2017). En estos tejidos actúa de manera autocrina y/o paracrina, mientras que la sintetizada por la glándula pineal presenta un efecto endocrino (Cipolla-Neto y Amaral, 2018).

1.1. Historia

La primera vez que se aisló e identificó esta hormona fue en el año 1958 en el tejido de la glándula pineal bovina por parte del investigador Aaron Lerner y su equipo. Su nombre se debe a que la primera función descubierta era aclarar la piel de los

renacuajos, al agregar la melanina en torno al núcleo de los melanocitos de estos anfibios (Argüelles y Bonmatí, 2015; Tan *et al.*, 2015).

Años más tarde, se empezaron a descubrir otras funciones. En la década de 1960, Hoffman y Reiter observaron que el tiempo que permanecen elevados los niveles de melatonina en sangre podían estar relacionados con las alteraciones en la capacidad reproductiva de los mamíferos. En las siguientes décadas, se han descrito otros efectos tales como la sincronización de los ritmos circadianos, la regulación de los ciclos de sueño y vigilia, intervención en la oncostasis y en la inmunomodulación, efecto antiinflamatorio... y también se considera un potente agente antioxidante (Argüelles y Bonmatí, 2015).

Aunque la melatonina se descubrió en ovejas, es decir, en mamíferos, también se ha observado en prácticamente todos los taxones, desde bacterias, protozoos y hongos hasta plantas e invertebrados. Se ha sugerido la hipótesis de que la función originaria de esta hormona consistía en proteger del estrés oxidativo, debido a que es capaz de reaccionar con las especies reactivas de oxígeno (ROS) y de nitrógeno (Argüelles y Bonmatí, 2015).

1.2. Ritmos circadianos

Los ritmos circadianos son ciclos biológicos que controlan una gran parte de los procesos fisiológicos y que tienen una periodicidad de 24 horas (Vasey *et al.*, 2021). La presencia de los ritmos circadianos es una característica que va desde organismos unicelulares hasta los seres humanos. En los mamíferos, estos ritmos están regulados por diferentes tipos de sincronizadores. El núcleo supraquiasmático (NSQ) del hipotálamo es el principal oscilador central, capaz de ajustar el ciclo de 24 horas de luz-oscuridad ambiental con los ritmos circadianos. De esta manera, la temperatura corporal, la alimentación, los efectos neuroendocrinos o el ciclo de sueño y vigilia van a conseguir una periodicidad de 24 horas, coincidiendo con la luz u oscuridad del entorno y, al mismo tiempo, mantener un orden temporal interno. El principal estímulo para que el NSQ se coordine con el entorno es la luz. Otros osciladores corresponden con los genes reloj. Estos genes codifican unos factores de transcripción que se denominan proteínas reloj, cuyas concentraciones se elevan o disminuyen siguiendo patrones cíclicos (Vasey *et al.*, 2021; Zisapel, 2018).

Los ritmos circadianos también están influidos por sincronizadores externos, como el horario de las comidas, rutinas sociales, ejercicio físico o fármacos, y por factores propios del individuo, como la edad o el sexo (Montaruli *et al.*, 2021).

El ritmo circadiano de la melatonina en los vertebrados da lugar a picos en las concentraciones de esta hormona por la noche y a una disminución de los niveles durante el día. De esta manera, la concentración sérica que se alcanza durante la noche oscila entre 80 y 120 pg/ml, mientras que durante el día disminuye y se sitúa entre 10 y 20 pg/ml. Este patrón de secreción la convierte en una molécula capaz de proporcionar información a los órganos internos acerca de los ciclos periódicos de luz ambiental, alcanzando su máxima concentración sanguínea con la ausencia de luz. En función de la estación del año se producen cambios en la producción de melatonina. Durante el invierno, las noches son más largas, haciendo que el pico se sostenga durante un mayor tiempo, mientras que en estaciones estivales este pico nocturno se acorta. Estos cambios son empleados por animales fotoperiódicos para ajustar comportamientos, como la reproducción o la hibernación, a la estación apropiada (Tan *et al.*, 2015; Tordjman *et al.*, 2017).

1.3. Metabolismo de la melatonina

1.3.1. Síntesis de melatonina endógena

La mayoría de las investigaciones acerca de la síntesis de melatonina se han llevado a cabo en mamíferos (ratas, ratones y hámsteres). En todos ellos, el precursor de esta hormona es el Trp, que es un aminoácido esencial (Tan *et al.*, 2015). La melatonina endógena es el producto final de las rutas biosintéticas del Trp y de la serotonina, siendo sintetizada en el pinealocito y otros tejidos (Vasey *et al.*, 2021).

El primer paso consiste en transportar el Trp al interior de la célula para que la enzima triptófano-5-hidroxilasa lo hidroxile y se obtenga 5-hidroxitriptófano, que sufrirá una descarboxilación por la 5-hidroxitriptófano descarboxilasa para dar serotonina. Esta serotonina se acetila para formar *N*-acetilserotonina mediante la enzima arilalquilamina-*N*-acetiltransferasa (AA-NAT). Finalmente, sufre una metilación a través de la acetilserotonina-*O*-metiltransferasa (ASMT) para dar lugar a la melatonina (Fig. 3.1). En

este proceso, la enzima limitante es la AA-NAT, por lo que es un sitio probable para regular la síntesis de esta hormona. Una vez sintetizada, es liberada al líquido cefalorraquídeo y a la circulación sistémica para que llegue a los diferentes tejidos diana (Cipolla-Neto y Amaral, 2018; Tordjman *et al.*, 2017; Vasey *et al.*, 2021).

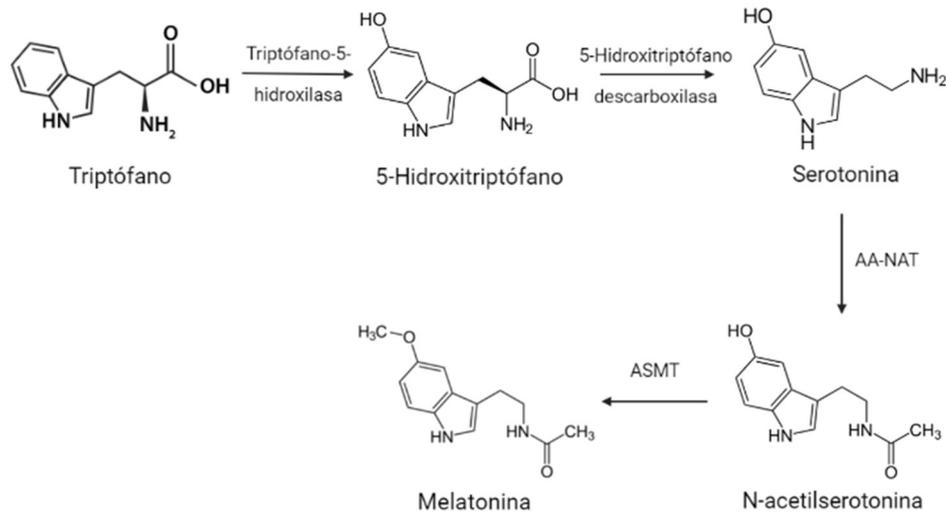


Figura 3.1. Síntesis de la melatonina a partir de triptófano.

En la glándula pineal, la síntesis de melatonina comienza por acción de la noradrenalina. Las neuronas adrenérgicas que proceden del ganglio cervical superior liberan norepinefrina para que actúe sobre los receptores adrenérgicos β_1 y α_1 de los pinealocitos. La unión de los receptores β_1 con su ligando provoca que la adenilato ciclasa incremente los niveles del AMPc citosólicos para que se produzca la activación de la proteína quinasa A dependiente de AMPc (PKA). Esta quinasa da lugar a una cascada de señalización que acaba en la síntesis de AA-NAT. Por otra lado, los receptores α_1 conducen a un aumento de la concentración citosólica de calcio. Se desconoce el efecto del incremento de este ión, pero se ha planteado que interviene en la diversificación de la traducción de señales adrenérgicas que actúan sobre la AA-NAT (Fig. 3.2) (Vasey *et al.*, 2021).

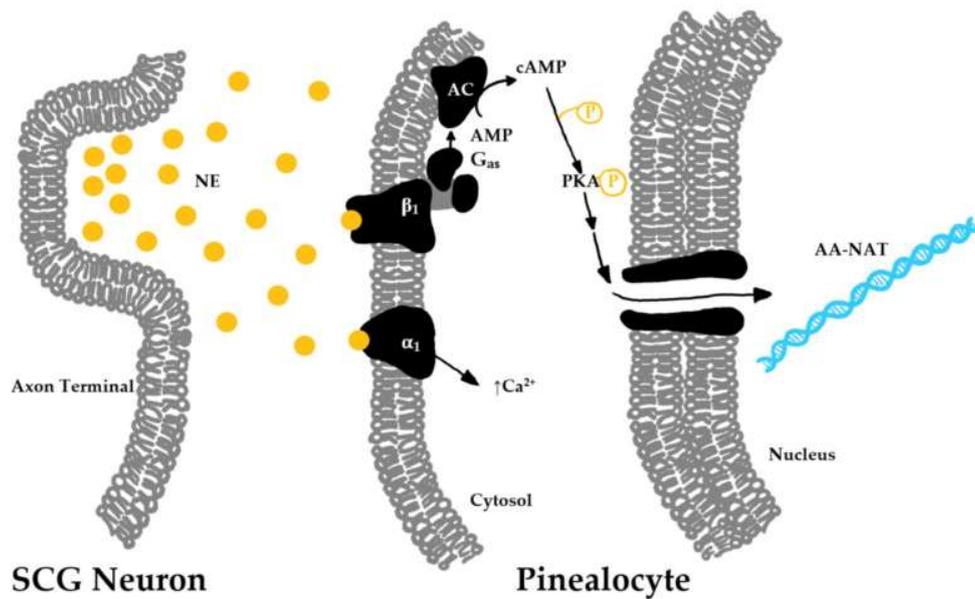


Figura 3.2. Receptores de la noradrenalina y sus efectos (Fuente: Vasey et al., 2021).

Este proceso ocurre en ausencia de luz, por lo que el incremento de la señal lumínica desemboca en una reducción de la síntesis de melatonina. Las neuronas adrenérgicas dejan de liberar norepinefrina, lo que impide que se formen segundos mensajeros en el pinealocito y se inhiba la transcripción del gen de la enzima AA-NAT (Vasey et al., 2021). Los receptores α_1 estimulan la producción de melatonina, pero cuando heterodimerizan con los receptores D4 de la dopamina se produce un bloqueo en la síntesis. Por ello, este tipo de receptor de la dopamina puede impedir la modulación de los ciclos circadianos controlados por esta hormona (Acuña-Castroviejo et al., 2014).

Los niveles en sangre varían con la edad del individuo. Un ejemplo son los bebés, que antes de los 3 meses de vida secretan poca melatonina. Durante la etapa del desarrollo infantil, la secreción se vuelve circadiana y aumentan sus niveles séricos (Tordjman et al., 2017). Algunos estudios, como el de Joseph et al. (2015), sugieren que el ritmo de la melatonina se establece en torno a los 3 meses de edad.

1.3.2. Metabolismo de la melatonina en la glándula pineal

El metabolismo de la melatonina comienza cuando el NSQ estimula a la glándula pineal mediante una vía neural. Para que tenga lugar esta ruta, el estímulo lumínico es detectado por las células ganglionares retinales intrínsecamente fotosensibles, que van a enviar información acerca de la longitud de onda y de la intensidad del estímulo al tracto retinohipotalámico, que llega hasta el NSQ y, a su vez, éste está conectado con el núcleo paraventricular (PVN) del hipotálamo. Ahora, siguiendo proyecciones hipotalámicas descendentes, el PVN envía la información a la médula espinal, concretamente a los niveles T1, T2 y T3, que se proyecta hacia los ganglios cervicales superiores, los cuales inervan de manera simpática a la glándula pineal a través de fibras postsinápticas simpáticas (Fig. 3.3). Cuando desaparece el estímulo luminoso, es decir, durante la noche, se libera noradrenalina desde estas fibras postsinápticas simpáticas, desembocando en la conversión del Trp en melatonina y su liberación al torrente sanguíneo (Cipolla-Neto y Amaral, 2018; Vasey *et al.*, 2021).

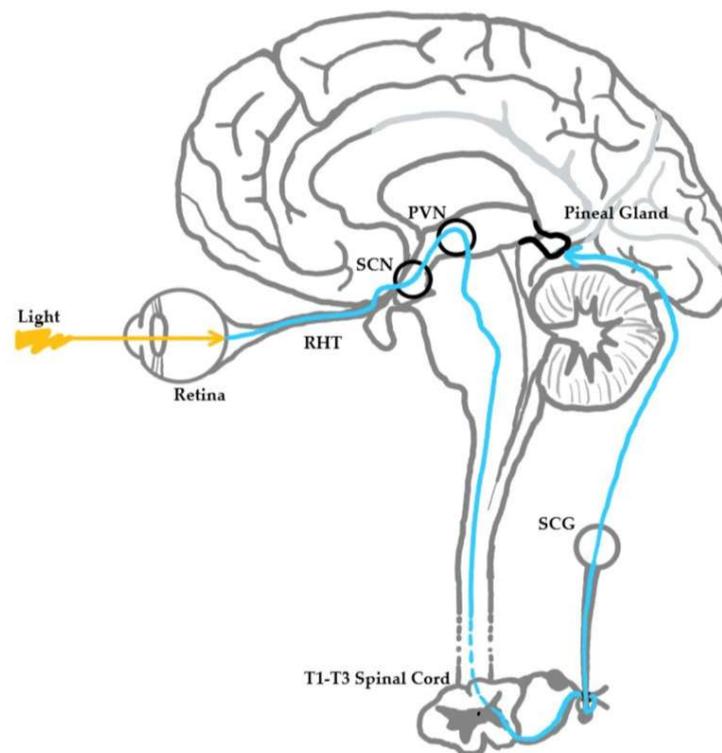


Figura 3.3. Ruta neuroanatómica del estímulo luminoso hasta la glándula pineal
(Fuente: Vasey *et al.*, 2021).

1.3.3. Metabolismo de la melatonina en fuentes extrapineales

El primer tejido en el que se detectó la presencia de la enzima ASMT fuera de la glándula pineal fue en la retina. Poco tiempo después, se demostró que esta enzima también se encontraba en la glándula de Harder de las ratas, al mismo tiempo que se comprobó la existencia de melatonina en esta misma glándula, en la retina y en el cerebelo de ratas pinealectomizadas, sugiriendo que estos tejidos podían sintetizar melatonina. También se ha detectado melatonina en la mucosa intestinal, concretamente en las células enterocromafines. Aproximadamente, la concentración era 400 veces superior que en la glándula pineal, y entre 10 y 100 veces mayor que en el plasma. Esta melatonina del tracto gastrointestinal no sufre un control por parte de los fotoperiodos, sino que depende de la ingesta de alimentos (Acuña-Castroviejo *et al.*, 2014).

Actualmente, mediante técnicas de biología molecular más específicas se ha comprobado la expresión de ARNm de las enzimas AA-NAT y ASMT en diferentes tejidos y órganos, por lo que es probable que en ellos se sintetice melatonina. En este grupo se encuentran (Acuña-Castroviejo *et al.*, 2014):

- Timo y bazo
- Corazón
- Musculo esquelético
- Hígado
- Estomago e intestino
- Testículos y ovarios
- Corteza adrenal
- Cuerpo estriado

En muchas de estas fuentes extrapineales, la concentración que se alcanza es superior a la del plasma y no se libera a la circulación. Esto sugiere que la melatonina actúa de manera local, protegiéndolos del daño oxidativo. Las células de estos órganos tienen la capacidad de producirla como mecanismo adaptativo para contrarrestar los metabolitos del metabolismo aeróbico (Acuña-Castroviejo *et al.*, 2014).

1.4. Efectos fisiológicos de la melatonina

Esta hormona interviene en una gran cantidad de fenómenos que ocurren en el ser humano. Participa en el desarrollo puberal, en la adaptación a la estación meteorológica del año y en la regulación del sistema inmune y de diferentes ritmos, como el de sueño-vigilia, neuroendocrinos o el de la temperatura corporal. También está relacionada con la memoria y con el control del equilibrio y de la postura corporal. Afecta a las neuronas que se encuentran en el hipocampo, por lo que actúa en la formación de la memoria. La ingesta de melatonina a través de la dieta induce fatiga, somnolencia y disminuye la latencia de sueño (Emet *et al.*, 2016; Tordjman *et al.*, 2017).

La melatonina tiene efectos contra la depresión, ansiedad, miedo e inflamación, además de modular el dolor, efecto antitumoral y reducir la presión de las arterias y retinas. Por otro lado, influye en la fisiología ovárica, diferenciación de osteoblastos y en la protección contra el estrés oxidativo y nitrosativo. También afecta a la masa corporal y ósea de los mamíferos, previniendo un aumento de la grasa corporal con la edad y promoviendo la diferenciación de células osteoblásticas y la síntesis de colágeno al mismo tiempo que evita la resorción ósea (Emet *et al.*, 2016; Tordjman *et al.*, 2017).

Su efecto antioxidante se debe a su capacidad de eliminar de forma directa los radicales libres, estimular tanto la transcripción como la actividad de las enzimas antioxidantes e inhibir la producción del radical hidroxilo al unirse a metales de transición (Carrasco *et al.*, 2014). Se encuentra a altas concentraciones en la mitocondria para proteger a los lípidos, proteínas y ADN presentes en este orgánulo, debido a que la respiración celular da lugar a los radicales libres (Cipolla-Neto y Amaral, 2018).

Asimismo, puede tener efectos directos sobre el desarrollo glial y neuronal, la placenta y la ontogénesis al establecer los ritmos diurnos y sincronizar el reloj biológico del feto. Debido a esto, se puede decir que está involucrada en la etapa temprana del desarrollo fetal, dado que se han encontrado durante el primer trimestre de gestación las enzimas AA-NAT y ASMT en la placenta. En los humanos, la melatonina regula la función placentaria de manera paracrina y/o autocrina y es capaz de atravesar esta barrera para llegar al embrión (Tordjman *et al.*, 2017).

Algunos estudios, como el de Espino *et al.* del año 2012, indican que la administración exógena favorece la producción de células de la respuesta inmune

innata, como son las células NK, macrófagos y monocitos, para destruir las células que están infectadas por virus y detener el crecimiento neoplásico.

Por último, presenta efectos fisiológicos en la reproducción y maduración sexual de los mamíferos, regulando de manera negativa la síntesis de la hormona liberadora de gonadotropina, cuya función es controlar la secreción de la hormona luteinizante (LH) y la hormona folículo estimulante. La melatonina influye en el fotoperíodo que controla la secreción pulsátil de LH, modificando las fluctuaciones estacionales de la reproducción (Tordjman *et al.*, 2017).

1.5. Receptores de la melatonina

En los mamíferos, existen varios receptores a través de los cuales la melatonina produce sus efectos por unión a (Emet *et al.*, 2016):

- proteínas intracelulares
- receptores de membrana plasmática
- receptores nucleares

Esta hormona es capaz de interactuar con diferentes proteínas intracelulares, como la calmodulina, calreticulina o la tubulina. En la calmodulina impide la unión a calcio, pudiendo ejercer un efecto antiproliferativo en el cáncer (Emet *et al.*, 2016).

Sus receptores de membrana son (Emet *et al.*, 2016):

- ML1
- MT3

En los receptores ML1, cuando la melatonina se une a ellos en las células diana inhiben la adenilato ciclasa a través de su interacción con proteínas G. Existen dos subtipos de receptores dentro de este grupo y son los Mel1a o MT₁ y Mel1b o MT₂. Los MT₁ se sitúan en el NSQ, tálamo, glándula pituitaria, núcleo accumbens, sustancia negra, hipocampo, cerebelo, córnea y retina (Emet *et al.*, 2016; Tordjman *et al.*, 2017). Se encuentran acoplados a la proteína G_i para inhibir a la adenilato ciclasa y que disminuyan los niveles de AMPc para evitar la fosforilación de CREB (Fig. 3.4). Por otro lado, provocan un aumento en la fosforilación de las MAPK y del paso de potasio a

través de los canales Kir (Liu *et al.*, 2016). Los MT₂ se distribuyen por la retina, hipocampo, PVN y cerebelo. Este receptor, además de disminuir la concentración de AMPc mediante la inhibición de la adenilato ciclasa a través de su unión a proteínas Gi (Fig. 3.4), inactiva la guanilil ciclasa soluble y está involucrado en la fisiopatología y farmacología de los trastornos del sueño, ansiedad, depresión, dolor y en la enfermedad de Alzheimer (Emet *et al.*, 2016; Tordjman *et al.*, 2017). Otros mecanismos son la activación de la proteína quinasa C (PKC) en el sistema nervioso central y en la retina reducen la liberación de dopamina dependiente de calcio (Liu *et al.*, 2016).

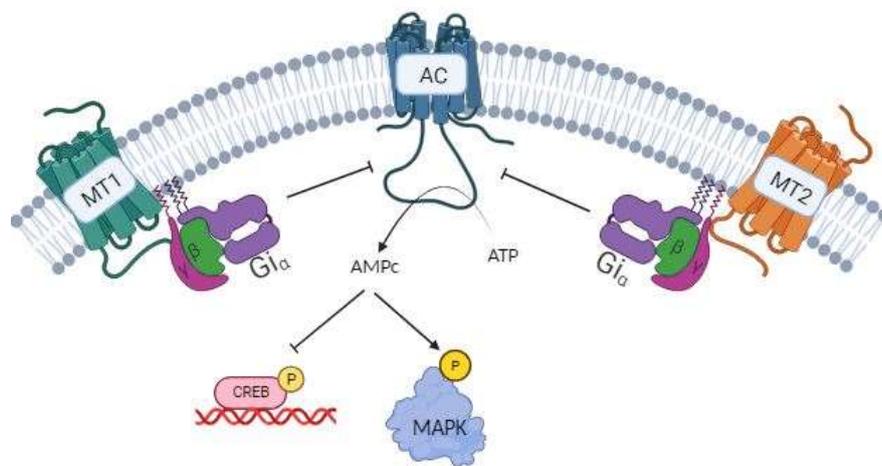


Figura 3.4. Mecanismo de acción de los receptores MT₁ y MT₂ (creado en Biorender).

El grupo de los receptores MT₃, también denominados ML₂, corresponden con la enzima quinona reductasa 2 (QR2). La actividad de la QR2 consiste en hidrolizar el inositol fosfato y previene del estrés oxidativo, al impedir la transferencia de electrones que ocurre en las quinonas. Se localiza en el hígado, corazón, intestino, pulmón, riñón, músculo y tejido adiposo pardo (Emet *et al.*, 2016; Tordjman *et al.*, 2017).

Dentro de las células, la melatonina puede unirse a receptores nucleares de retinoides, concretamente a RZR y a RORα. Esta interacción permite a la hormona unirse a factores de transcripción en el núcleo. La capacidad inmunomoduladora se produce a través de esta ruta, siendo capaz de sintetizar la IL-2 y la IL-6 (Emet *et al.*, 2016).

1.6. Melatonina exógena

La melatonina se puede encontrar en diferentes tipos de alimentos, como en la carne, huevos, leche y productos lácteos, cereales o en la fruta, aunque el contenido en ellos difiere de una especie a otra. Dentro de un mismo animal o planta la concentración no es homogénea en sus órganos y tejidos debido a sus diferentes características biofísicas. Por ejemplo, las semillas y la hojas contienen mayores niveles de melatonina que la fruta (Meng *et al.*, 2017).

En los alimentos de origen animal, la carne presenta una concentración de melatonina menor en comparación con los huevos y el pescado. Igualmente, se encuentra en la leche tanto de seres humanos como la de animales, mostrando un ritmo circadiano en el que los niveles son mayores por la noche (Meng *et al.*, 2017).

Dentro de las frutas destacan las cerezas, fresas y uvas como las que tienen mayor cantidad de melatonina. Se puede encontrar en muchas de las verduras, destacando los tomates y los pimientos por tener los niveles más altos, al contrario que las patatas y remolacha en las que no se detecta o es muy baja su concentración. También está en muchas legumbres y semillas, como las de mostaza blanca y negra, en las que su germinación puede aumentar significativamente los niveles de melatonina. En el grupo de los frutos secos, el pistacho es el que tiene el mayor contenido. Por todo esto, en muchas de las bebidas que derivan de estos alimentos se detecta la melatonina, como ocurre en la cerveza, vino, café, cacao o vinagres balsámicos, pero no se encuentra en el té (Meng *et al.*, 2017).

En los aceites de linaza refinada, soja, aceite de oliva y de girasol se encuentra esta indolamina, disminuyendo en aquellos que están refinados. En los productos de la industria del alcohol y panadera se detecta melatonina porque las levaduras, en particular *Saccharomyces cerevisiae*, presentan este compuesto (Meng *et al.*, 2017).

2. MUERTE CELULAR

Los organismos multicelulares mantienen un equilibrio entre el número de nuevas células que surgen de la mitosis y la proporción de aquellas que están dañadas y son

eliminadas (D'Arcy, 2019). Cada día, los fagocitos eliminan rápidamente los millones de células que mueren. Este mecanismo de renovación es necesario en múltiples procesos como, por ejemplo, para un correcto desarrollo embrionario y para la selección inmunitaria de linfocitos T y B (Bertheloot *et al.*, 2021). Existen dos patrones de muerte celular, la no programada y la programada. La muerte celular no programada sucede cuando hay un daño físico a los tejidos, mientras que la programada se inicia por señales moleculares precisas (Cruz Martín del Campo *et al.*, 2020).

2.1. Muerte celular no programada: Necrosis

La necrosis es una muerte accidental provocada por un estrés excesivo e incontrolable que sufren las células como consecuencia de que factores externos superan las condiciones fisiológicas. Las infecciones, inflamación crónica o el daño tisular estimulado por frío, calor, estímulos mecánicos, sustancias químicas y radiaciones ionizantes o ultravioletas provocan la muerte de un alto número de células de manera imprevista. En este estado, las células sufren un hinchamiento de los orgánulos, dilatan el retículo endoplásmico y se produce una ruptura de la membrana plasmática, lo que desemboca en la liberación al espacio extracelular de moléculas que actúan como patrones moleculares asociados a daño tisular (DAMP). La presencia de DAMP en el medio extracelular da lugar a una respuesta del sistema inmune para reclutar fagocitos y otras células inmunitarias, con el objetivo de eliminar la amenaza y promover la reparación de los tejidos (Bertheloot *et al.*, 2021; Cruz Martín del Campo *et al.*, 2020).

La muerte necrótica se caracteriza por el incremento del calcio intracelular, aumento de las ROS, disfunción de las mitocondrias y la proteólisis promovida por las enzimas calpaínas y catepsinas. Además, no requiere de síntesis *de novo* de proteínas y utiliza una pequeña cantidad de energía (Cruz Martín del Campo *et al.*, 2020).

2.2. Muerte celular programada

Las células pueden modificar las consecuencias de su muerte a través de regular o programar este proceso y así adaptar la respuesta inmunitaria. Los principales tipos de muerte celular programada son la apoptosis, necroptosis y la piroptosis. Existen otros tipos que ocurren durante estados de toxicidad provocados por fármacos (Bertheloot *et al.*, 2021). Un gran número de genes intervienen en los mecanismos de regulación de la mitosis, detección de anomalías e inicio de la muerte celular programada. Si la proliferación celular se descontrola puede desarrollarse el cáncer, pero que si se produce un exceso de muerte de las células pueden aparecer la enfermedad de Alzheimer, Parkinson o artritis reumatoide (D'Arcy, 2019).

2.2.1. Apoptosis

La muerte celular programada más estudiada es la apoptosis y se encuentra conservada en todo el reino animal. En este proceso, la célula detiene tanto el crecimiento como la división y acaba muriendo sin liberar su contenido al medio extracelular. La apoptosis se caracteriza por la liberación al citoplasma del citocromo C de las mitocondrias, el desequilibrio entre las proteínas anti-apoptóticas y pro-apoptóticas que pertenecen a la familia Bcl-2 y la acción de las proteínas caspasas. En la apoptosis, la membrana plasmática no se fragmenta hasta que se forman los cuerpos apoptóticos, que van a contener el material que se encuentra en el interior celular con el fin de evitar que se induzca la muerte de otras células. Estos cuerpos son reconocidos por los fagocitos, principalmente los macrófagos. De esta manera, no se genera un proceso inflamatorio, al contrario de lo que ocurre con la necrosis (Bertheloot *et al.*, 2021; Cruz Martín del Campo *et al.*, 2020; D'Arcy, 2019).

Las proteínas que pertenecen a la familia Bcl-2 se dividen en anti-apoptóticas y pro-apoptóticas, pero todas ellas tienen dominios conservados que se denominan BH1, BH2, BH3 y BH4. Las anti-apoptóticas son las proteínas Bcl-2, Bcl-XL, Mcl-1 y Bcl-W y presentan homología en estos 4 dominios. Por otro lado, las que tienen funciones pro-apoptóticas son Bax y Bak entre otras, y sus dominios BH1-3 son homólogos. El dominio BH3 es necesario para la función pro-apoptótica a pesar de que se encuentre en algunas

anti-apoptóticas, pero en ellas el resto de los dominios impiden su función. Todas ellas, independientemente de su cometido, presentan un dominio TM que permite su anclaje a las membranas intracelulares (Fig. 3.5) (Chan y Yu, 2004). Dentro de las proapoptóticas hay algunas que son activadoras (Bim, Bid y Puma) y otras que actúan como sensibilizadores. Las activadoras se unen a Bax y Bak para que sufran cambios conformacionales, oligomericen y creen poros en la membrana de la mitocondria. La función de las sensibilizadoras es inhibir a las proteínas anti-apoptóticas. Por otro lado, las proteínas Bcl-2 anti-apoptóticas inhiben la apoptosis mediante el secuestro de las proteínas activadoras y sensibilizadoras o de los complejos Bax-Bak. Por lo tanto, existe un equilibrio entre estas proteínas para regular la apoptosis (Bertheloot *et al.*, 2021).

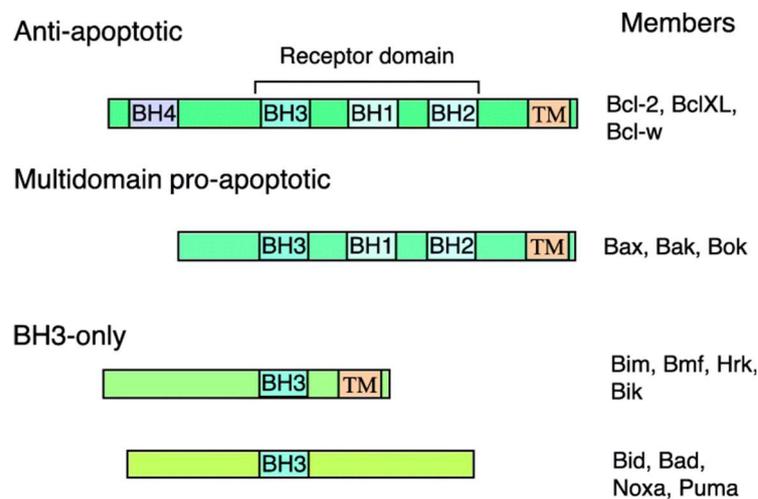


Figura 3.5. Proteínas pertenecientes a la familia Bcl-2 y sus dominios (Fuente: Chan y Yu, 2004).

Las caspasas son proteasas que contienen un residuo de cisteína catalítica en su centro activo para hidrolizar enlaces peptídicos y segmentar proteínas después de ciertos residuos de ácido aspártico. Dentro de esta familia existen dos tipos, las caspasas iniciadoras (caspasa 8 y 9) y las caspasas efectoras (caspasa 3, 6 y 7). Inicialmente, se encuentran como procaspasas monoméricas inactivas formadas por una subunidad mayor, una menor y un predominio, por lo que para su activación tienen que dimerizar y escindir el predominio. Cuando las caspasas iniciadoras activan a las efectoras, comienza una cascada que desemboca en la fragmentación del ADN, destrucción de proteínas nucleares y del citoesqueleto, expresión de ligandos de células

fagocíticas y termina en la formación de cuerpos apoptóticos (Bertheloot *et al.*, 2021; Cruz Martín del Campo *et al.*, 2020; D'Arcy, 2019; McIlwain *et al.*, 2013).

El proceso de apoptosis puede comenzar por 2 vías diferentes: intrínseca o extrínseca. La vía intrínseca, también conocida como mitocondrial, comienza cuando se desregula o se altera el equilibrio de la homeostasis intracelular provocado por daños en el ADN, agentes tóxicos, ROS, virus o por la ausencia de factores de crecimiento, hormonas y citoquinas. Esto desemboca en la apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial, provocando que la membrana externa de la mitocondria se permeabilice y se produzca la liberación al citoplasma del citocromo C, de la proteína Smac/DIABLO, HtrA2/Omi... que son pro-apoptóticas. Estas proteínas junto con el factor activador de proteasas de la apoptosis (Apaf-1) y deoxiATP van a formar un complejo multimolecular llamado apoptosoma, en cuyo centro varios dominios reclutan la procaspasa 9, que se encuentra en el citosol, para convertirla en su forma activa. A este proceso se le denomina punto de no retorno de la apoptosis debido a que la célula no puede volver a las condiciones normales. En la permeabilización de la membrana externa mitocondrial intervienen las proteínas pro-apoptóticas Bax y Bak, que sufren cambios conformacionales para permitir su oligomerización y la formación de poros en la membrana mitocondrial. Una vez que la caspasa 9 es funcional va a activar a la procaspasa 3, 6 y 7 que activan la condensación de la cromatina, destruyen la lámina nuclear y las proteínas del citoesqueleto e inhiben a la Poli ADP-ribosa polimerasa (PARP), enzima implicada en la reparación de los daños en el ADN (Bertheloot *et al.*, 2021; Cruz Martín del Campo *et al.*, 2020; D'Arcy, 2019; García y Vecino, 2003).

La vía extrínseca o vía del receptor de muerte de la apoptosis comienza cuando se activan los receptores de muerte que se encuentran en la superficie de las células. Estos receptores son el TNFR1/2, Fas, DR4 y DR5, mientras que sus ligandos respectivos son TNF α , Fas-L y el ligando inductor de la apoptosis relacionado con el TNF (TRAIL), que son producidos por las células NK o por los macrófagos. La interacciones con sus ligandos provoca la oligomerización de los receptores para atraer proteínas adaptadoras y constituir el complejo de señalización inductor de muerte (DISC). El complejo DISC está formado por una proteína que tiene un dominio de muerte asociado a Fas (FADD), otra con dominio de muerte asociado con el receptor del factor de necrosis tumoral (TRADD), RIPK1 y FLIP. Estas proteínas reclutan un grupo de monómeros de procaspasa 8 para que dimericen y activen a la caspasa 3. La caspasa 8 también es capaz de activar a Bid, una de las proteínas pro-apoptóticas de la familia Bcl-2, que se localiza en el citoplasma de manera inactiva. Al activarse, se transloca al interior de la

mitocondria y permite la liberación del citocromo C al citosol. Este proceso va a producir la activación de la caspasa 9 y, por tanto, se amplifican los mecanismos que se habían iniciado anteriormente (Bertheloot *et al.*, 2021; D'Arcy, 2019; García y Vecino, 2003).

Tanto en la vía intrínseca como en la extrínseca se acaba produciendo la activación de la caspasa 3 que va a estimular la acción de las endonucleasas para la degradación cromosómica, al mismo tiempo que se degradan las proteínas nucleares y del citoesqueleto a través de las proteasas. Finalmente, se producen los cuerpos apoptóticos que serán eliminados por los fagocitos (Fig. 3.6) (D'Arcy, 2019).

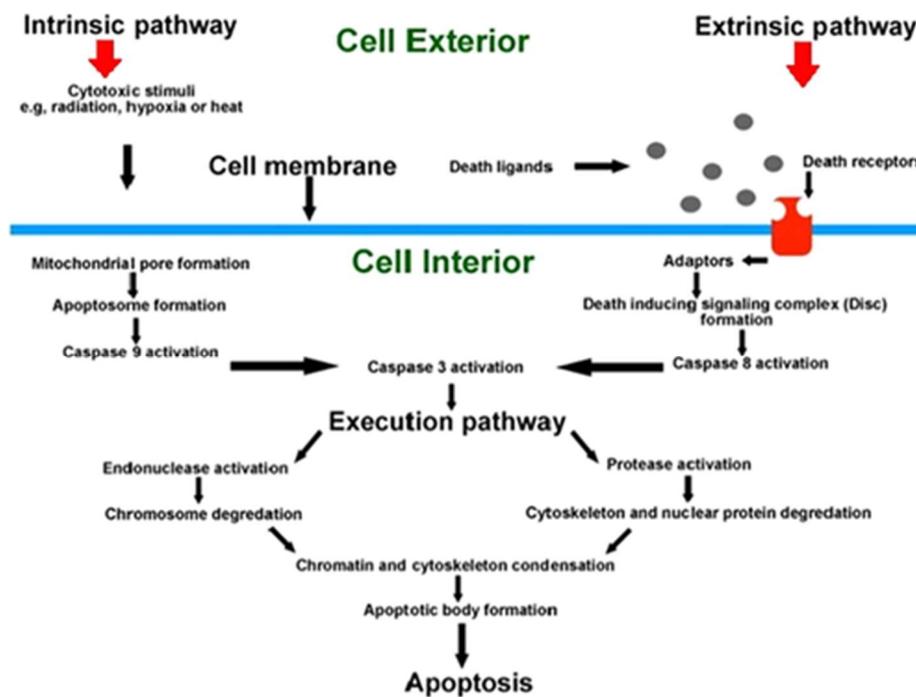


Figura 3.6. Cascada de señalización de la vía intrínseca y extrínseca de la apoptosis (Fuente: D'Arcy, 2019).

La apoptosis constituye un mecanismo importante en la defensa contra los virus. Sin embargo, estos organismos han desarrollado habilidades para evitar la apoptosis, consiguiendo replicarse y propagarse. Al analizar las proteínas virales que evaden la muerte de las células infectadas por los virus, se descubrió la existencia de inhibidores de la apoptosis (IAP) en células de insectos. Tiempo después se identificaron homólogos de los IAP en diferentes organismos, como levaduras, nematodos, peces y mamíferos. Sin embargo, muchos de los miembros de los IAP no presentan funciones

apoptóticas y solo algunos regulan la muerte celular. En los mamíferos, el IAP ligado al cromosoma X (XIAP), el IAP1 celular (cIAP1) y el IAP2 celular (cIAP2) se unen a caspasas y a antagonistas de IAP que se liberan de la mitocondria por el poro de permeabilidad transitoria. Es probable que XIAP participe en la regulación del apoptosoma mediante la inhibición de la caspasa 9 de este complejo a través de su dominio BIR3 e impide la activación de otras procaspasas 9. La capacidad de XIAP de regular a esta caspasa está influida por el nivel de la Apaf-1 y por la actividad del apoptosoma. Además, se puede unir directamente a las caspasas 3 y 7 para impedir el acceso al sustrato (Fig. 3.7), pero este proceso no parece necesario para evitar la apoptosis. Las cIAP1/2 también se unen a estas caspasas efectoras para que se degraden por acción de los proteosomas al favorecer su ubiquitinización (Berthelet y Dubrez, 2013).

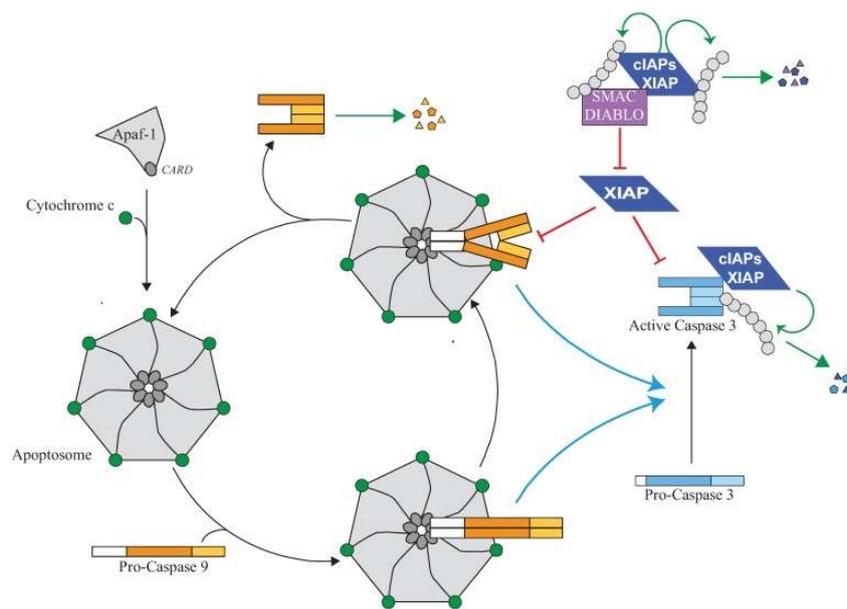


Figura 3.7. Regulación del apoptosoma y de la caspasa 3 a través de los inhibidores de la apoptosis ligados al cromosoma X (Fuente: Berthelet y Dubrez, 2013).

2.2.2. Piroptosis

En la apoptosis los elementos intracelulares se almacenan en compartimentos para su eliminación sin que se produzca daños en los tejidos. Sin embargo, existe un tipo de apoptosis que es proinflamatoria a la que se denomina piroptosis. Se caracteriza por la pérdida de la membrana plasmática y activación de una serie de sensores del

inflammasoma, que son los receptores tipo Nod, el receptor AIM2 y el receptor Pyrin. Estos se encargan de detectar los DAMP y los patrones moleculares asociados a patógenos que son liberados por el estrés celular o por agentes infecciosos, destacando el lipopolisacárido de las bacterias Gram negativas como uno de los mayores activadores (Bertheloot *et al.*, 2021; D'Arcy, 2019).

El primer paso de la piroptosis es la activación de receptores del sistema inmune innato para que se induzca la activación del factor nuclear $\kappa\beta$, que va a aumentar la transcripción de los genes que codifican para las procaspasas y para las proformas de IL-1 β y de la IL-8. El siguiente paso es la oligomerización de los inflamasomas, que favorecen la maduración de estas dos interleucinas y de la caspasa 1. El sustrato de la caspasa 1 es la proteína gasdermina D, cuyo extremo amino va a formar poros en la membrana plasmática que permiten el paso de los iones, de manera que se iguala el gradiente iónico entre el medio interno y externo, se hincha la célula por la entrada de agua y se produce su lisis. Esta destrucción de la célula provoca liberación de citoquinas proinflamatorias al medio extracelular (Cruz Martín del Campo *et al.*, 2020; D'Arcy, 2019).

Con la piroptosis se evita que los microorganismos se propaguen y se eliminan aquellas células estresadas, con el inconveniente de desarrollar una inflamación. Este tipo de muerte celular se ha observado en macrófagos infectados con sp *Salmonella* o *Shigella* y no se produce en las células que carecen de la caspasa 1 (Bertheloot *et al.*, 2021; D'Arcy, 2019).

2.2.3. Necroptosis

La necroptosis es un tipo de muerte celular con características similares a la necrosis, pero está altamente regulada por ligandos y proteínas, cuya función es detectar patógenos y favorecer la reparación de los tejidos. La activación de este tipo de muerte celular se produce a través receptores de muerte, dentro de los cuales destaca el TNFR1, aunque los receptores de TRAIL y de Fas-L también la pueden activar, al igual que los receptores TLR3 y TLR4. Una vez que han reconocido su ligando, la proteína FADD, la caspasa 8, la caspasa 10 y RIPK1 forman un complejo. Cuando la caspasa 8 se inactiva por acción de fármacos o agentes infecciosos, RIPK1 se autofosforila y fosforila a RIPK3 para constituir el complejo ripoptosoma. Este nuevo complejo se

encarga de fosforilar a MLKL para conformar el necrosoma, que va a comprometer la integridad de la célula por dos caminos. El primero consiste en abrir los canales iónicos de calcio o de sodio, mientras que la segunda vía se basa en que el necrosoma migra a la membrana plasmática para formar poros (Fig. 3.8). En ambos casos, se produce un desequilibrio en las concentraciones internas de los iones, un hinchamiento de la célula y acaba rompiéndose la membrana plasmática, al mismo tiempo que se libera el contenido intracelular y mediadores inflamatorios al exterior. También se conoce que durante este proceso la mitocondria se ve afectada y se incrementa la síntesis de ROS. La necroptosis está altamente regulada, dado que inicialmente la RIPK1 está poliubiquitinada y tiene que sufrir una desubiquitinización para que pueda fosforilar a RIPK3 y formar el ripoptosoma (Bertheloot *et al.*, 2021; Cruz Martín del Campo *et al.*, 2020; D'Arcy, 2019).

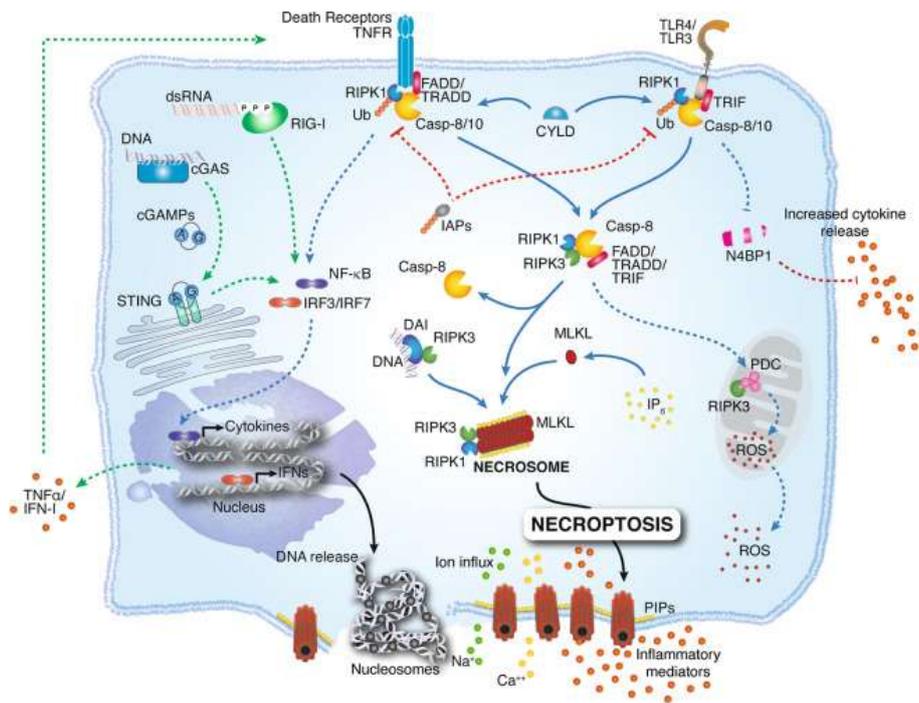


Figura 3.8. Vía de señalización de la necroptosis (Fuente: D'Arcy, 2019).

3. EFECTOS DE LA MELATONINA EN LA APOPTOSIS

3.1. Melatonina y cáncer

El cáncer es una de las principales causas de muerte en todo el mundo y las cifras van en aumento. A pesar de que el cáncer en humanos presenta heterogeneidad en cuanto al sitio anatómico afectado y las mutaciones involucradas, todos ellos, o la mayoría, muestran una serie de características comunes, como el descontrol en el crecimiento, angiogénesis o evasión de la apoptosis. El equilibrio entre la supervivencia y la muerte de las células se mantiene mediante la apoptosis en la que intervienen proteínas de la familia Bcl-2 y caspasas, evitando la aparición del cáncer y otras enfermedades (Talib *et al.*, 2021).

Durante los tratamientos con quimio y radioterapia se produce la muerte masiva de células por todo el organismo. Sin embargo, esta toxicidad afecta también a los tejidos sanos, dando lugar a linfopenia, xerostomía o mucositis. Se ha estudiado que la melatonina protege a las células de los tejidos sanos frente al estrés oxidativo de estos tratamientos. El carácter lipofílico de esta hormona le permite penetrar en las células y eliminar las ROS del tipo del ácido hipocloroso, triclorometilperoxilo, peróxido de hidrógeno o el radical hidroxilo, además de inhibir a las enzimas prooxidantes y estimular la acción de aquellas que son antioxidantes, como la glutatión peroxidasa, superóxido dismutasa o catalasa (Bhattacharya *et al.*, 2019; Mortezaee *et al.*, 2019). De esta manera, se evita que las ROS produzcan una mutación o la rotura del ADN mitocondrial, la peroxidación de los lípidos, etc., que acaba en una disfunción de la mitocondria y la inducción de la vía intrínseca de la apoptosis (Zhang *et al.*, 2022).

Debido a su carácter lipofílico, la melatonina atraviesa con facilidad las membranas celulares y las de los orgánulos. Esto permite que interaccione con la membrana mitocondrial y mejore la cadena transportadora de electrones debido a que mantiene la actividad del complejo I y del complejo III de esta cadena. Igualmente, inhibe la apertura de los poros de permeabilidad transitoria, lo que impide la salida del citocromo C y otros compuestos pro-apoptóticos (Promsan y Lungkaphin, 2020). También se ha comprobado que en personas obesas la melatonina inhibe la acción de la mitofusina 2 (Mnf2), que es una proteína que se encuentra en la membrana mitocondrial externa y está relacionada con el reclutamiento de Bax hacia estos orgánulos (Fig. 3.9) (Stacchiotti *et al.*, 2014). Por ello, la melatonina es capaz de evitar que se desarrolle la apoptosis por la vía intrínseca en las células normales.

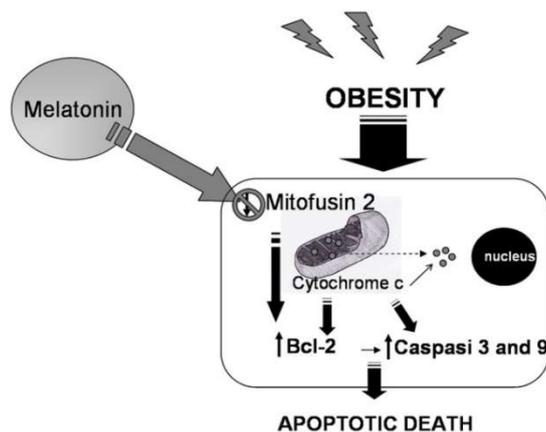


Figura 3.9. Vía de la apoptosis inducida por un estado de obesidad que es inhibida por la acción de la melatonina sobre la mitofusina 2 (Fuente: Stacchiotti et al., 2014).

En diversos tejidos de ratones, como en la médula ósea, bazo o intestino, se ha observado que, tras una exposición a radiaciones ionizantes, un suplemento de esta neurohormona disminuye la relación que existe entre las proteínas pro-apoptóticas y anti-apoptóticas de la familia Bcl-2 al incrementar la expresión de estas últimas (Mortezaee et al., 2019). Al mismo tiempo, se ha visto en estos animales que la melatonina puede proteger a los ovarios de la apoptosis inducida por la toxicidad del quimioterápico cisplatino al mejorar la actividad de las mitocondrias y atenuar los niveles de las ROS y de la caspasa 3 (Yan et al., 2022).

Cuando se produce un daño endógeno o exógeno en el ADN, la melatonina también es capaz de prevenir la apoptosis potenciando a las enzimas que se encargan de reparar el ADN y modulando la expresión de diversos genes que participan en la muerte de las células. Se encarga de favorecer la fosforilación de la proteína p53 para que active a las enzimas que reparan los daños en el ADN, evitando así la muerte celular (Mortezaee et al., 2019). Además, es capaz de favorecer la corrección de los daños en las moléculas de material genético por otros mecanismos, como la reparación por escisión de bases, por recombinación homóloga, por desajustes o por unión final no homóloga (Majidinia et al., 2017).

Además del efecto anti-apoptótico que ejerce sobre las células normales, la melatonina presenta efectos pro-apoptóticos en muchas células cancerosas a través del incremento de ROS, daños en el ADN, cambios en la mitocondrias y aumento de los receptores de apoptosis (Mortezaee et al., 2019). Un ejemplo de ello es el tratamiento con melatonina en la línea celular de leucemia HL-60, en la que las células sufren una

despolarización de la membrana mitocondrial, apertura del poro de permeabilidad transitoria e incremento de la expresión y activación de las caspasas 3 y 9. En esta misma línea celular también induce la activación de las proteínas Bax y Bak, para que liberen el citocromo C y se active la vía intrínseca de la apoptosis (Targhazeh *et al.*, 2022).

Dentro de la familia MAPK de serina/treonina quinasa se encuentran la quinasa c-Jun N-terminal (JNK), ERK y p38, que regulan diferentes mecanismos como la proliferación y la apoptosis mediante la interacción con otras vías como la PI3K/AKT. Diversas investigaciones proponen que intervienen en la resistencia de algunos tumores frente a radio y quimioterapia. Por ello, se ha estudiado cómo la melatonina interviene en la cascada de las MAPK y en la vía PI3K/AKT (Mortezaee *et al.*, 2019). En la línea celular de cáncer gástrico humano SGC-7901, el tratamiento con melatonina aumenta la expresión de las proteínas p38 y JNK involucradas en la inducción de la apoptosis, al mismo tiempo que disminuye la proteína p65 que está implicada en la evasión de la apoptosis (Li *et al.*, 2017). En la línea celular MIA PaCa-2 de cáncer de páncreas humano, esta indolamina incrementó la fosforilación de JNK y de ERK, lo que desemboca en una activación de la caspasa 3 y en un incremento de la fosforilación de Bax (Li *et al.*, 2016). En las células de las líneas Eca109 y KYSE-150, después de tratarlas con melatonina, se observó una inhibición de ERK y MEK a través de su fosforilación. El bloqueo de esta vía incrementa la apoptosis en estas células tumorales (Lu *et al.*, 2016).

En la vía extrínseca de la apoptosis interviene Fas-L, que es el ligando del receptor de muerte Fas, y se expresa en la superficie de los linfocitos T CD8+ o citotóxicos y en las células NK para que induzcan la apoptosis en las células tumorales. En ocasiones, el tumor puede escapar de la acción de estas células si presenta una baja expresión de este receptor. El tratamiento con melatonina en células de sarcoma de Ewing aumenta la expresión de Fas en estas células y de Fas-L en linfocitos citotóxicos y células NK, lo que favorece la activación de la caspasa 8. El mismo efecto se observa en varias líneas celulares de cáncer hematológico humano, en las que la melatonina incrementa la expresión de los receptores de muerte, incluido Fas (Mortezaee *et al.*, 2019).

La mutación del gen p53 se encuentra en una gran cantidad de tumores debido a que su atenuación se asocia con la evasión de la apoptosis por parte de las células malignas. La proteína p53 interviene en las dos vías de apoptosis, dado que regula la expresión de Fas-L, de la caspasa 8 y de la proteína Bcl-2. Además, permite que la vía extrínseca progrese al bloquear los IAP (Mortezaee *et al.*, 2019). La radiación disminuye la

expresión de la proteína p53 y en las células de cáncer de mama humano MCF-7 la administración de melatonina, a dosis fisiológicas antes de la radiación, desemboca en un mayor incremento de la expresión de esta proteína (Alonso-González *et al.*, 2016). Lo mismo ocurre en estas mismas células cuando se utiliza trióxido de arsénico, en las que la indolamina mejora el incremento de la expresión de p53 (Nooshinfar *et al.*, 2016).

La melatonina también influye en las mitocondrias de las células tumorales. En tumores hipofisarios secretores de prolactina en ratas, esta hormona provoca una disfunción mitocondrial que induce la muerte celular al bloquear los cuatro complejos mitocondriales (B.-Q. Wang *et al.*, 2013). En este orgánulo se puede incrementar la producción de ROS, lo que conlleva al inicio de la apoptosis por la vía intrínseca, como se ha visto en células de cáncer colorrectal y de cáncer neural tras un tratamiento con melatonina. Cuando se combinan medicamentos de quimioterapia, como el cisplatino o la doxorubicina, con un tratamiento con melatonina se consigue amplificar la despolarización de la membrana mitocondrial y la producción de ROS, reduciendo la viabilidad celular en tumores de páncreas de roedores (Mortezaee *et al.*, 2019).

También se ha visto este efecto pro-apoptótico de la melatonina sobre las células tumorales de la línea de cáncer colorrectal HT-29 y sobre las células de carcinoma de cuello uterino humano de la línea HeLa. Además, al combinar esta hormona con cisplatino o con 5-fluorouracilo se incrementa la citotoxicidad de estos compuestos al disminuir la viabilidad de las células de ambas líneas, como consecuencia de la transducción de señales mediada por el receptor MT3 y un incremento en la activación de la caspasa 3 (Pariente *et al.*, 2017). Igualmente, en la línea HeLa, esta indolamina incrementa la activación de la caspasa 9 y la fragmentación del ADN promovido por el cisplatino y estimula la producción intracelular de ROS y la apertura del poro de permeabilidad transitoria (Pariente *et al.*, 2016).

Las células tumorales presentan una mayor expresión de NF- κ B en comparación con las células normales, promovido por los efectos de la quimio y radioterapia. Cuando se activa, el complejo NF- κ B-p65 se transloca al núcleo para que se produzca la expresión de genes que codifican proteínas que evitan la apoptosis y estimulan la inflamación, invasión y proliferación celular. Este mecanismo muestra un proceso de retroalimentación positiva al favorecer la producción de citoquinas inflamatorias, que incrementan la expresión de este factor nuclear. El NF- κ B proporciona resistencia a la apoptosis en estas células a través de varios mecanismos, como la supresión de la vía TRAIL a través de su subunidad c-Rel, capacidad de activar a los IAP, reducción de la entrada de la proteína Bax en las mitocondrias, inhibición de la formación del

apoptosoma en la vía intrínseca o favoreciendo la producción de proteínas anti-apoptóticas del tipo Bcl-2 o Bcl-XL. Sin embargo, la melatonina contrarresta los efectos de este factor inhibiendo la regulación positiva de los genes aguas arriba de NF- κ B, evitando la fosforilación y degradación de sus inhibidores e inhibiendo la translocación al núcleo. De esta manera, un tratamiento combinado con melatonina y diferentes fármacos incrementa la tasa de muerte por apoptosis en aquellos cáncer con una alta expresión de NF- κ B, al mismo tiempo que también las sensibiliza al efecto de la radiación ionizante (Li *et al.*, 2016; Mortezaee *et al.*, 2019).

En la resistencia de las células tumorales a la muerte celular participa la fosfatidilinositol 3 quinasa (PI3K), que activa a NF- κ B para incrementar la concentración de las proteína anti-apoptóticas Bcl-2. Al mismo tiempo, también induce la activación de XIAP, cIAP-1 y cIAP-2. Se ha comprobado que la melatonina va a disminuir la cantidad de IAP al inhibir la PI3K en las células SW480 y en las células LoVo, que corresponden a cáncer de colon humano. En estas líneas celulares, un tratamiento en el que se combina 5-fluorouracilo con esta hormona incrementa los niveles de las caspasas pro-apoptóticas y de la enzima PARP, favoreciendo la activación de la vía intrínseca de la apoptosis (Gao *et al.*, 2017; Mortezaee *et al.*, 2019).

Aparte de PI3K, las proteínas AKT se pueden estimular e incrementar por otras vías. La regulación positiva de AKT está asociada directamente con la mutación de PTEN, que es un gen supresor de tumores y cuya mutación es la más frecuente en el cáncer por detrás de p53. Cuando el carcinoma de células escamosas de esófago se trata con melatonina se produce una inhibición de AKT al bloquear a la glucógeno sintasa quinasa-3. Este mecanismo provoca un aumento de la caspasas pro-apoptóticas (Mortezaee *et al.*, 2019).

La ciclooxigenasa 2 (COX-2) se encarga de sintetizar prostaglandinas partiendo del ácido araquidónico y se ha comprobado que interviene en la resistencia de los tumores frente a la quimio y radioterapia cuando su expresión se incrementa. La sobreexpresión de COX-2 está asociado a un incremento de las IAP, concretamente de la XIAP y Survivin. En células de carcinoma hepatocelular de las líneas HepG2 y SMMC-7721 que se habían tratado con melatonina, se observó que en la vía COX-2/PI3K/AKT se produjo un aumento de la fosforilación de las proteínas AKT de forma dependiente de la dosis, desembocando en una disminución de la regulación de los genes de los IAP. Este mecanismo confirmó que la melatonina sensibiliza las células del carcinoma hepatocelular a la apoptosis a través de la inhibición de COX-2 (Fan *et al.*, 2013).

Otro proceso por el cual las células tumorales evaden los tratamientos de quimioterapia y radioterapia es la hipoxia. Este ambiente disminuye la expresión de TRAIL, que interviene en la vía extrínseca de la apoptosis. La melatonina en células de cáncer de colon provoca una inhibición de PI3K y de NF- κ B, lo que aumenta el nivel de apoptosis al incrementar la expresión de TRAIL, llegando a contrarrestar por completo la resistencia inducida por la falta de oxígeno. Al mismo tiempo, también inhibe el factor 1 inducido por hipoxia, que se encarga de regular genes que promueven la angiogénesis y la resistencia a fármacos, por lo que se facilita la apoptosis de las células de este cáncer al incrementarse la actividad de p53 y la introducción de Bax en las mitocondrias (Mortezaee *et al.*, 2019).

Estos estudios experimentales demuestran que en las células de los tumores se pueden disminuir los mecanismos antioxidantes y de supervivencia. No obstante, esto no ocurre en todos los tipos de cáncer, debido a que la melatonina puede proteger a las células de cáncer de próstata LNCaP de la radiación ionizante al incrementar la concentración de glutatión (Mortezaee *et al.*, 2019).

3.2. Melatonina e infecciones virales

La melatonina también ejerce efectos beneficiosos durante las infecciones virales, como ocurre con el virus de la encefalitis equina venezolana (VEEV). Este virus es transmitido por los mosquitos y afecta, principalmente, a humanos y equinos, en los que la infección cerebral induce la apoptosis de las células a través del estrés oxidativo y procesos inflamatorios. Al tratar ratones infectados con VEEV con melatonina se consigue disminuir el número de células apoptóticas e incrementar la supervivencia de los roedores, debido a la capacidad de esta indolamina de reducir el estrés oxidativo y la cantidad de TNF- α . Al igual que ocurre en estos ratones, en cultivos celulares de neuroblastoma infectados con VEEV se produce un aumento de la apoptosis a través de la vía intrínseca como consecuencia de la peroxidación lipídica, pero al tratarlos con melatonina se produce una disminución de este tipo de muerte celular (Montiel *et al.*, 2015).

La enfermedad hemorrágica del conejo es una infección viral causada por el virus con este mismo nombre (RHDV). En los conejos causa una hepatitis necrosante severa y una coagulación intravascular en diferentes órganos, como en el riñón, hígado y bazo,

y presenta una letalidad bastante alta. De manera dependiente de la dosis, la melatonina incrementa las proteínas Bcl-2 y Bcl-XL y reduce la expresión de Bax, la liberación del citocromo C al citosol y la activación de la caspasa-9 en estos animales, evitando la apoptosis hepática provocada por el RHDV (Bahrapour Juybari *et al.*, 2020).

La miocarditis es una inflamación del músculo cardíaco y puede estar causada por una infección viral. Existen diferentes virus cardiotrópicos responsables de esta alteración, como el coxsackievirus B3 (CVB3), el virus del herpes humano 6 o el parvovirus B19. El CVB3 favorece la activación de la proteína quinasa R y provoca un estrés en el retículo endoplásmico, desembocando en la apoptosis de los cardiomiocitos. Además, este virus estimula el daño a las mitocondrias, incrementando el proceso apoptótico de estas células. Durante la infección por CVB3 se reduce la viabilidad de las células cardíacas, pero se puede revertir al utilizar un tratamiento con melatonina, lo que incrementa la supervivencia celular. Este efecto se observa en la cantidad de la enzima citoplasmática lactato deshidrogenasa que se libera al exterior, disminuyendo al emplear esta hormona en comparación con la infección, o al utilizar la tinción de TUNEL, que pone de manifiesto que el número de células apoptóticas era menor al tratar con melatonina la infección (Fig. 3.10). Del mismo modo, se produce una disminución de la actividad de la caspasa 3 durante el tratamiento de las células *in vitro* (Ouyang *et al.*, 2019).

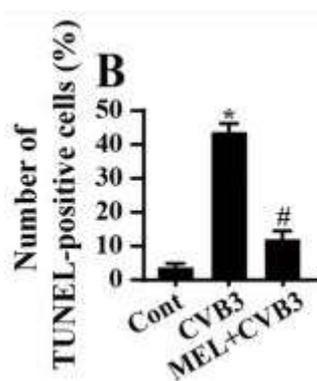


Figura 3.10. Se observa un incremento del número de células teñidas con TUNEL durante la infección con coxsackievirus B3 en comparación con el grupo control (Cont), mientras que el tratamiento con melatonina durante la infección (MEL+CVB3) reduce el número de células apoptóticas (Fuente: Ouyang *et al.*, 2019).

El CVB3 provoca la disfunción de las mitocondrias al incrementar la permeabilidad de la membrana de este orgánulo, lo que contribuye a la apertura del poro de permeabilidad transitoria y a la salida del citocromo C al citosol para activar a la caspasa 9. Sin embargo, al añadir melatonina a los cardiomiocitos *in vitro* se produce el cierre del poro, disminuye la cantidad de citocromo C en el citoplasma y se inhibe la activación de la caspasa 9 provocada por el CVB3 (Fig. 3.11) (Ouyang *et al.*, 2019).

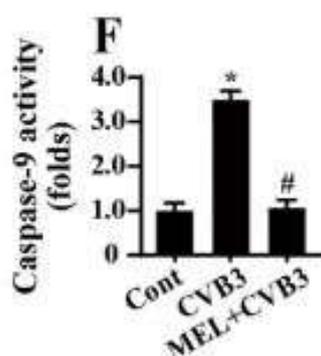


Figura 3.11. Durante la infección con coxsackievirus B3 se incrementa la activación de la caspasa 9, mientras que al tratar los cardiomiocitos con melatonina (MEL+CVB3) se produce una disminución de la activación de esta caspasa (Fuente: Ouyang *et al.*, 2019).

3.3. Melatonina y otras alteraciones

La hemorragia intracerebral es una alteración cerebrovascular que presenta una alta mortalidad y morbilidad. Esta enfermedad provoca, entre otros efectos, la muerte celular en los tejidos cerebrales. No obstante, al tratar *in vitro* las células con melatonina se consigue aumentar el ratio entre Bcl-2 y Bax y disminuir los niveles de expresión de la caspasa 3, cuyos valores se habían elevado durante la enfermedad. Al mismo tiempo, este tratamiento también es capaz de reducir la salida de citocromo C al citosol, porque favorecer el cierre del poro de permeabilidad transitoria de las mitocondrias en las neuronas *in vitro* (Z. Wang *et al.*, 2018).

Por lo que se refiere a los problemas de infertilidad, la melatonina también puede utilizarse para solventarlos. Después del cáncer y de las enfermedades cardiovasculares, la infertilidad es la enfermedad más frecuente. Aquellas parejas infértiles pueden quedar embarazadas mediante las técnicas de reproducción asistida,

en las que la calidad del semen juega un papel importante dado que el daño oxidativo disminuye la capacidad reproductiva y activa la apoptosis intrínseca de los espermatozoides. El estrés por calor provoca un incremento en la producción de ROS en las mitocondrias, lo que provoca la fragmentación del ADN que acaba en la muerte de las células. Al tratar a los espermatozoides con melatonina antes de sufrir el estrés térmico, se previene la apoptosis al evitar que se pierda el potencial de la membrana mitocondrial, impidiendo que se generen ROS en este orgánulo y se active la apoptosis (Bejarano *et al.*, 2014; Zhao *et al.*, 2021).

Por otro lado, la melatonina también es capaz de disminuir la neurotoxicidad provocada por el arsénico. Este metaloide induce la muerte de las neuronas del cerebro y del ganglio de la raíz dorsal, pero al tratar las ratas con melatonina se consigue inhibir la liberación del citocromo C, por lo que no se produce la apoptosis de las neuronas (Fernández *et al.*, 2015). También se evita la inmunotoxicidad provocada por el herbicida atrazina, que disminuye el número de células inmunes. Al tratar a los ratones con melatonina, después de exponerlos a este herbicida, se consigue disminuir la apoptosis intrínseca y extrínseca de los esplenocitos al reducir la expresión de Fas y su ligando Fas-L y la relación entre Bax y Bcl-2 (Sharma *et al.*, 2014).

Por último, se ha comprobado que la melatonina previene la apoptosis inducida por enfermedades degenerativas como la osteoartritis o el Alzheimer. Los condrocitos son las únicas células que se encuentran en el cartílago y la apoptosis de este tipo celular es una de las principales causas de la progresión de la osteoartritis. Las mitocondrias de los condrocitos sufren daños en su ADN debido a la presencia de citoquinas proinflamatorias y de TNF- α . Al utilizar un tratamiento con melatonina se observa una atenuación de la apoptosis *in vitro* debido a que se reducen los niveles de la proteína Bax y de caspasa 3 y se produce una regulación positiva de las proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 y Bcl-XL (Zhang *et al.*, 2022). Por lo que se refiere al Alzheimer, la melatonina es capaz de detoxificar el óxido nítrico y el peróxido de hidrógeno en la corteza cerebral, que están involucrados en el estrés oxidativo, evitando la disfunción mitocondrial, el deterioro en la reparación del ADN y el daño celular (Hossain *et al.*, 2021).

CAPÍTULO 4. CONCLUSIONES

Una vez analizado cómo la melatonina influye en la apoptosis de las células, las conclusiones que se pueden extraer son las siguientes:

1. La melatonina es una hormona que es capaz de modular la cantidad de proteínas de la familia Bcl-2, de incrementar o reducir la activación de las caspasas, de regular la apertura del poro de permeabilidad transitoria o de inhibir la síntesis de IAP, por lo que favorece o evita la apoptosis en función de si este efecto es o no beneficioso para el organismo.
2. Se pueden desarrollar estrategias en las que la melatonina se utilice como adyuvante en tratamientos de quimio y radioterapia en algunos tipos de cáncer, debido a su capacidad de sensibilizar las células tumorales a la apoptosis y proteger las células sanas de la toxicidad de estos tratamientos.
3. Como consecuencia de su actividad anti-apoptótica durante las infecciones virales, se podría utilizar la melatonina en personas infectadas para reducir el número de células que mueren durante estos procesos.
4. Debido a que la mayoría de los estudios se han realizado en líneas celulares o en animales de experimentación, se requiere de más ensayos para poder extrapolar estos beneficios que presenta la melatonina para su uso en aplicaciones clínicas generalizadas en humanos, como el incremento de la calidad seminal o disminución de la neurotoxicidad de algunos compuestos.

BIBLIOGRAFÍA

- Acuña-Castroviejo, D., Escames, G., Venegas, C., Díaz-Casado, M. E., Lima-Cabello, E., López, L. C., Rosales-Corral, S., Tan, D.-X., & Reiter, R. J. (2014). Extrapineal melatonin: sources, regulation, and potential functions. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 71(16), 2997–3025. <https://doi.org/10.1007/s00018-014-1579-2>
- Alonso-González, C., González, A., Martínez-Campa, C., Menéndez-Menéndez, J., Gómez-Arozamena, J., García-Vidal, A., & Cos, S. (2016). Melatonin enhancement of the radiosensitivity of human breast cancer cells is associated with the modulation of proteins involved in estrogen biosynthesis. *Cancer Letters*, 370(1), 145–152. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2015.10.015>
- Argüelles, R., & Bonmatí, M. Á. (2015). Melatonina, la hormona de la noche. *Revista Eubacteria*, 33, 16–21. https://www.um.es/eubacteria/cronobiologia_melatonina.pdf
- Bahrampour Juybari, K., Pourhanifeh, M. H., Hosseinzadeh, A., Hemati, K., & Mehrzadi, S. (2020). Melatonin potentials against viral infections including COVID-19: Current evidence and new findings. *Virus Research*, 287, 198108. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2020.198108>
- Bejarano, I., Monllor, F., Marchena, A. M., Ortiz, A., Lozano, G., Jiménez, M. I., Gaspar, P., García, J. F., Pariente, J. A., Rodríguez, A. B., & Espino, J. (2014). Exogenous melatonin supplementation prevents oxidative stress-evoked DNA damage in human spermatozoa. *Journal of Pineal Research*, 57(3), 333–339. <https://doi.org/10.1111/jpi.12172>
- Berthelet, J., & Dubrez, L. (2013). Regulation of Apoptosis by Inhibitors of Apoptosis (IAPs). *Cells*, 2(1), 163–187. <https://doi.org/10.3390/cells2010163>
- Bertheloot, D., Latz, E., & Franklin, B. S. (2021). Necroptosis, pyroptosis and apoptosis: an intricate game of cell death. *Cellular & Molecular Immunology*, 18(5), 1106–1121. <https://doi.org/10.1038/s41423-020-00630-3>
- Bhattacharya, S., Patel, K. K., Dehari, D., Agrawal, A. K., & Singh, S. (2019). Melatonin and its ubiquitous anticancer effects. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 462(1–2), 133–155. <https://doi.org/10.1007/s11010-019-03617-5>
- Carrasco, C., Rodríguez, A. B., & Pariente, J. A. (2014). Effects of melatonin on the oxidative damage and pancreatic antioxidant defenses in cerulein-induced acute pancreatitis in rats. *Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International: HBPD INT*, 13(4), 442–446. [https://doi.org/10.1016/s1499-3872\(14\)60271-x](https://doi.org/10.1016/s1499-3872(14)60271-x)
- Chan, S.-L., & Yu, V. C. (2004). Proteins of the bcl-2 family in apoptosis signalling: from mechanistic insights to therapeutic opportunities. *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology*, 31(3), 119–128. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2004.03975.x>
- Cipolla-Neto, J., & Amaral, F. G. do. (2018). Melatonin as a Hormone: New Physiological and Clinical Insights. *Endocrine Reviews*, 39(6), 990–1028.

<https://doi.org/10.1210/er.2018-00084>

- Cruz Martín del Campo, S. L., González Espinosa, C., Ruiz Quiñonez, A. K., & Carranza Aguilar, C. J. (2020). Tipos de muerte celular y sus implicaciones clínicas. *El Residente*, 15(3), 97–112. <https://doi.org/10.35366/95960>
- D’Arcy, M. S. (2019). Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biology International*, 43(6), 582–592. <https://doi.org/10.1002/cbin.11137>
- Emet, M., Ozcan, H., Ozel, L., Yayla, M., Halici, Z., & Hacimuftuoglu, A. (2016). A Review of Melatonin, Its Receptors and Drugs. *The Eurasian Journal of Medicine*, 48(2), 135–141. <https://doi.org/10.5152/eurasianjmed.2015.0267>
- Espino, J., Pariente, J. A., & Rodríguez, A. B. (2012). Oxidative stress and immunosenescence: therapeutic effects of melatonin. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2012, 670294. <https://doi.org/10.1155/2012/670294>
- Fan, L., Sun, G., Ma, T., Zhong, F., & Wei, W. (2013). Melatonin overcomes apoptosis resistance in human hepatocellular carcinoma by targeting survivin and XIAP. *Journal of Pineal Research*, 55(2), 174–183. <https://doi.org/10.1111/jpi.12060>
- Fernández, A., Ordóñez, R., Reiter, R. J., González-Gallego, J., & Mauriz, J. L. (2015). Melatonin and endoplasmic reticulum stress: relation to autophagy and apoptosis. *Journal of Pineal Research*, 59(3), 292–307. <https://doi.org/10.1111/jpi.12264>
- Gao, Y., Xiao, X., Zhang, C., Yu, W., Guo, W., Zhang, Z., Li, Z., Feng, X., Hao, J., Zhang, K., Xiao, B., Chen, M., Huang, W., Xiong, S., Wu, X., & Deng, W. (2017). Melatonin synergizes the chemotherapeutic effect of 5-fluorouracil in colon cancer by suppressing PI3K/AKT and NF- κ B/iNOS signaling pathways. *Journal of Pineal Research*, 62(2). <https://doi.org/10.1111/jpi.12380>
- García, M., & Vecino, E. (2003). Vías de señalización intracelular que conducen a la apoptosis de las células de la retina . In *Archivos de la Sociedad Española de Oftalmología* (Vol. 78, pp. 351–364). scieloes .
- Hossain, M. F., Wang, N., Chen, R., Li, S., Roy, J., Uddin, M. G., Li, Z., Lim, L. W., & Song, Y.-Q. (2021). Exploring the multifunctional role of melatonin in regulating autophagy and sleep to mitigate Alzheimer’s disease neuropathology. *Ageing Research Reviews*, 67, 101304. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2021.101304>
- Joseph, D., Chong, N. W., Shanks, M. E., Rosato, E., Taub, N. A., Petersen, S. A., Symonds, M. E., Whitehouse, W. P., & Wailoo, M. (2015). Getting rhythm: how do babies do it? *Archives of Disease in Childhood. Fetal and Neonatal Edition*, 100(1), F50-4. <https://doi.org/10.1136/archdischild-2014-306104>
- Li, W., Wang, Z., Chen, Y., Wang, K., Lu, T., Ying, F., Fan, M., Li, Z., & Wu, J. (2017). Melatonin treatment induces apoptosis through regulating the nuclear factor- κ B and mitogen-activated protein kinase signaling pathways in human gastric cancer SGC7901 cells. *Oncology Letters*, 13(4), 2737–2744. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.5785>
- Li, W., Wu, J., Li, Z., Zhou, Z., Zheng, C., Lin, L., Tan, B., Huang, M., & Fan, M. (2016). Melatonin induces cell apoptosis in Mia PaCa-2 cells via the suppression of nuclear

factor-kB and activation of ERK and JNK: A novel therapeutic implication for pancreatic cancer. *Oncology Reports*, 36(5), 2861–2867. <https://doi.org/10.3892/or.2016.5100>

Liu, J., Clough, S. J., Hutchinson, A. J., Adamah-Biassi, E. B., Popovska-Gorevski, M., & Dubocovich, M. L. (2016). MT1 and MT2 Melatonin Receptors: A Therapeutic Perspective. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 56, 361–383. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010814-124742>

Lu, Y.-X., Chen, D.-L., Wang, D.-S., Chen, L.-Z., Mo, H.-Y., Sheng, H., Bai, L., Wu, Q.-N., Yu, H.-E., Xie, D., Yun, J.-P., Zeng, Z.-L., Wang, F., Ju, H.-Q., & Xu, R.-H. (2016). Melatonin enhances sensitivity to fluorouracil in oesophageal squamous cell carcinoma through inhibition of Erk and Akt pathway. *Cell Death & Disease*, 7(10), e2432. <https://doi.org/10.1038/cddis.2016.330>

Majidinia, M., Sadeghpour, A., Mehrzadi, S., Reiter, R. J., Khatami, N., & Yousefi, B. (2017). Melatonin: A pleiotropic molecule that modulates DNA damage response and repair pathways. *Journal of Pineal Research*, 63(1). <https://doi.org/10.1111/jpi.12416>

McIlwain, D. R., Berger, T., & Mak, T. W. (2013). Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(4), a008656. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a008656>

Meng, X., Li, Y., Li, S., Zhou, Y., Gan, R.-Y., Xu, D.-P., & Li, H.-B. (2017). Dietary Sources and Bioactivities of Melatonin. *Nutrients*, 9(4). <https://doi.org/10.3390/nu9040367>

Montaruli, A., Castelli, L., Mulè, A., Scurati, R., Esposito, F., Galasso, L., & Roveda, E. (2021). Biological Rhythm and Chronotype: New Perspectives in Health. *Biomolecules*, 11(4). <https://doi.org/10.3390/biom11040487>

Montiel, M., Bonilla, E., Valero, N., Mosquera, J., Espina, L. M., Quiroz, Y., & Álvarez-Mon, M. (2015). Melatonin decreases brain apoptosis, oxidative stress, and CD200 expression and increased survival rate in mice infected by Venezuelan equine encephalitis virus. *Antiviral Chemistry & Chemotherapy*, 24(3–4), 99–108. <https://doi.org/10.1177/2040206616660851>

Mortezaee, K., Najafi, M., Farhood, B., Ahmadi, A., Potes, Y., Shabeeb, D., & Musa, A. E. (2019). Modulation of apoptosis by melatonin for improving cancer treatment efficiency: An updated review. *Life Sciences*, 228, 228–241. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.05.009>

Nooshinfar, E., Bashash, D., Safaroghli-Azar, A., Bayati, S., Rezaei-Tavirani, M., Ghaffari, S. H., & Akbari, M. E. (2016). Melatonin promotes ATO-induced apoptosis in MCF-7 cells: Proposing novel therapeutic potential for breast cancer. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*, 83, 456–465. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.07.004>

Ouyang, H., Zhong, J., Lu, J., Zhong, Y., Hu, Y., & Tan, Y. (2019). Inhibitory effect of melatonin on Mst1 ameliorates myocarditis through attenuating ER stress and mitochondrial dysfunction. *Journal of Molecular Histology*, 50(5), 405–415. <https://doi.org/10.1007/s10735-019-09836-w>

- Pariante, R., Bejarano, I., Espino, J., Rodríguez, A. B., & Pariante, J. A. (2017). Participation of MT3 melatonin receptors in the synergistic effect of melatonin on cytotoxic and apoptotic actions evoked by chemotherapeutics. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 80(5), 985–998. <https://doi.org/10.1007/s00280-017-3441-3>
- Pariante, R., Pariante, J. A., Rodríguez, A. B., & Espino, J. (2016). Melatonin sensitizes human cervical cancer HeLa cells to cisplatin-induced cytotoxicity and apoptosis: effects on oxidative stress and DNA fragmentation. *Journal of Pineal Research*, 60(1), 55–64. <https://doi.org/10.1111/jpi.12288>
- Promsan, S., & Lungkaphin, A. (2020). The roles of melatonin on kidney injury in obese and diabetic conditions. *BioFactors (Oxford, England)*, 46(4), 531–549. <https://doi.org/10.1002/biof.1637>
- Sharma, S., Sarkar, J., Haldar, C., & Sinha, S. (2014). Melatonin Reverses Fas, E2F-1 and Endoplasmic Reticulum Stress Mediated Apoptosis and Dysregulation of Autophagy Induced by the Herbicide Atrazine in Murine Splenocytes. *PloS One*, 9(9), e108602. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108602>
- Stacchiotti, A., Favero, G., Giugno, L., Lavazza, A., Reiter, R. J., Rodella, L. F., & Rezzani, R. (2014). Mitochondrial and metabolic dysfunction in renal convoluted tubules of obese mice: protective role of melatonin. *PloS One*, 9(10), e111141. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111141>
- Talib, W. H., Alsayed, A. R., Abuawad, A., Daoud, S., & Mahmud, A. I. (2021). Melatonin in Cancer Treatment: Current Knowledge and Future Opportunities. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 26(9). <https://doi.org/10.3390/molecules26092506>
- Tan, D.-X., Manchester, L. C., Esteban-Zubero, E., Zhou, Z., & Reiter, R. J. (2015). Melatonin as a Potent and Inducible Endogenous Antioxidant: Synthesis and Metabolism. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 20(10), 18886–18906. <https://doi.org/10.3390/molecules201018886>
- Targhazeh, N., Reiter, R. J., Rahimi, M., Qujeq, D., Yousefi, T., Shahavi, M. H., & Mir, S. M. (2022). Oncostatic activities of melatonin: Roles in cell cycle, apoptosis, and autophagy. *Biochimie*, 200, 44–59. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2022.05.008>
- Tordjman, S., Chokron, S., Delorme, R., Charrier, A., Bellissant, E., Jaafari, N., & Fougrou, C. (2017). Melatonin: Pharmacology, Functions and Therapeutic Benefits. *Current Neuropharmacology*, 15(3), 434–443. <https://doi.org/10.2174/1570159X14666161228122115>
- Vasey, C., McBride, J., & Penta, K. (2021). Circadian Rhythm Dysregulation and Restoration: The Role of Melatonin. *Nutrients*, 13(10). <https://doi.org/10.3390/nu13103480>
- Wang, B.-Q., Yang, Q.-H., Xu, R.-K., & Xu, J.-N. (2013). Elevated levels of mitochondrial respiratory complexes activities and ATP production in 17- β -estradiol-induced prolactin-secreting tumor cells in male rats are inhibited by melatonin in vivo and in vitro. *Chinese Medical Journal*, 126(24), 4724–4730.
- Wang, Z., Zhou, F., Dou, Y., Tian, X., Liu, C., Li, H., Shen, H., & Chen, G. (2018). Melatonin Alleviates Intracerebral Hemorrhage-Induced Secondary Brain Injury in

Rats via Suppressing Apoptosis, Inflammation, Oxidative Stress, DNA Damage, and Mitochondria Injury. *Translational Stroke Research*, 9(1), 74–91. <https://doi.org/10.1007/s12975-017-0559-x>

Yan, F., Zhao, Q., Li, Y., Zheng, Z., Kong, X., Shu, C., Liu, Y., & Shi, Y. (2022). The role of oxidative stress in ovarian aging: a review. *Journal of Ovarian Research*, 15(1), 100. <https://doi.org/10.1186/s13048-022-01032-x>

Zhang, Y., Liu, T., Yang, H., He, F., & Zhu, X. (2022). Melatonin: A novel candidate for the treatment of osteoarthritis. *Ageing Research Reviews*, 78, 101635. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2022.101635>

Zhao, F., Whiting, S., Lambourne, S., Aitken, R. J., & Sun, Y.-P. (2021). Melatonin alleviates heat stress-induced oxidative stress and apoptosis in human spermatozoa. *Free Radical Biology & Medicine*, 164, 410–416. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2021.01.014>

Zisapel, N. (2018). New perspectives on the role of melatonin in human sleep, circadian rhythms and their regulation. *British Journal of Pharmacology*, 175(16), 3190–3199. <https://doi.org/10.1111/bph.14116>