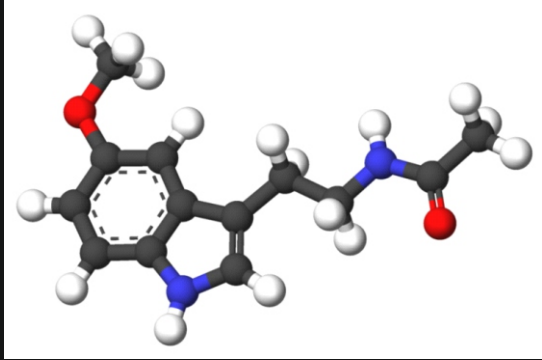




UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS
DE GRAN CANARIA



La melatonina es una indolamina sintetizada principalmente en la glándula pineal que presenta un amplio repertorio de actividades biológicas. Su naturaleza lipofílica posibilita que atraviese fácilmente las membranas biológicas, alcanzando su máxima concentración en el torrente circulatorio durante el periodo nocturno. Aunque durante mucho tiempo se consideró que la glándula pineal era el único órgano encargado de su síntesis, actualmente se sabe que otros tejidos como la retina, las células del sistema inmune, la médula ósea y la piel también expresan la maquinaria biosintética y son responsables de la producción a nivel local. Entre las propiedades fisiológicas de la melatonina destaca su papel en la regulación del ritmo circadiano, la modulación del sistema inmune y como agente antioxidante. Un creciente número de estudios en los últimos años sugiere que además, puede inhibir la proliferación de las células tumorales e inducir apoptosis, un tipo de muerte celular que ocurre de forma natural en los organismos como mecanismo para la eliminación de células defectuosas sin provocar una respuesta inflamatoria.

El objetivo inicial de la presente tesis doctoral ha sido evaluar el efecto de la melatonina sobre la viabilidad de las células leucémicas humanas, utilizando como modelo experimental la línea tumoral de origen linfoblástica Molt-3. Los resultados del presente estudio claramente han puesto de manifiesto que presenta propiedades antiproliferativas. La reducción del número de células vivas y el incremento paralelo de células no viables sugieren un efecto citotóxico más que citostático, además de incrementar el porcentaje de células con contenido de ADN hipodiploide y provocar cambios ultraestructurales característicos de la muerte celular por apoptosis.

EFEECTO CITOTÓXICO DE LA MELATONINA EN CÉLULAS DE LEUCEMIA HUMANA MOLT -3



UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS
DE GRAN CANARIA

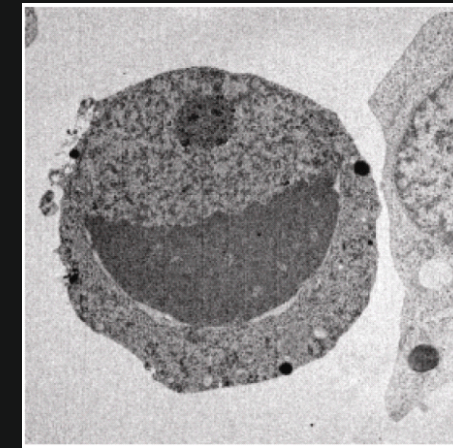
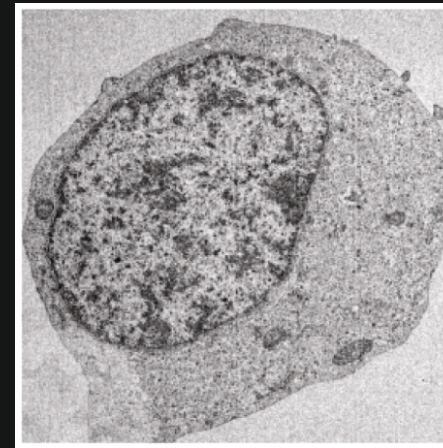
Departamento de Patología Animal, Producción Animal,
Ciencia y Tecnología de los Alimentos

y

Departamento de Ciencias Clínicas

TESIS DOCTORAL

EFEECTO CITOTÓXICO DE LA MELATONINA
EN CÉLULAS DE LEUCEMIA HUMANA MOLT -3



JUAN PERDOMO DIAZ

Las Palmas de Gran Canaria

2013

*No es necesario apagar la luz del otro
para que brille la nuestra.*

Gandhi

A la memoria de mamá Yeya y papá Nono.

A la memoria de Gregorio y Benita.

A toda mi familia.

Este trabajo ha sido financiado por:

- Agencia Canaria de Investigación, Innovación y Sociedad de la Información del Gobierno de Canarias. PI 2007/045.
- Ministerio de Ciencia e Innovación / Fondo para el Desarrollo Regional Europeo. SAF2010-21380.
- Instituto Canario de Investigación del Cáncer. ICIC-G.I. N° 08/2012

Ilustración de la portada: microfotografías de dos células Molt-3, normal (izquierda) y en apoptosis (derecha).

Ilustración de la contraportada: estructura química de la melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina).

Indice

Indice	1
Agradecimientos	5
Abreviaturas	9
Figuras	15
Introducción	19
Melatonina: naturaleza química y biosíntesis	21
Amplio espectro de acción biológica de la melatonina	23
Acción antiapoptótica y protección celular	27
Mecanismos de acción de la melatonina en su acción anticancerígena	30
Objetivos	45
Material y métodos	47
Resultados	59
Discusión	81
Conclusiones	89
Bibliografía	93
Anexos	111

Agradecimientos

En primer lugar, quiero expresar el mayor de mis agradecimientos y consideración a mis directores de tesis, Dr. José Quintana Aguiar y Dr. Francisco Estévez Rosas por la dedicación y el entusiasmo mostrados a la hora de dirigir esta tesis y contribuir con ello a la materialización de uno de mis mayores anhelos.

También he de manifestar mi gratitud al Dr. Enrique Castro del Departamento de Bioquímica de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria y al Dr. Manuel Rodríguez del Departamento de Fisiología de la Universidad de la Laguna por haberme dado la oportunidad de dar mis primeros pasos en mi carrera investigadora.

Quiero agradecer a mis compañeros en el laboratorio Mayte Marrero, Gledy Negrín, Dr. Fernando Torres, Mercedes Said, Elisa Hernández, Cristina Hernández, Olga Burmistrova y a la Dra. Sara Rubio el haber contribuido a hacer más ameno mi trabajo en el mismo y por su inestimable ayuda.

He de agradecer también al Dr. Juan Francisco Loro, al Dr. Javier Cabrera, a la Dra. Pino Santana, a la Dra. Inmaculada Hernández, al Dr. Ignacio González, al Dr. Carlos Tabraue, al Dr. Germán Gallardo y a la Dra. Luisa Fernanda Fanjul por la ayuda prestada durante todo este tiempo.

También debo mostrar mi agradecimiento a la Familia Megías Martínez y a la Fundación de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria por la ayuda en cuanto a financiación de parte de mi trabajo de investigación en esta Universidad.

Gracias a mis amigos, con los que entre todos formamos una fraternal y sólida cadena de unión, por los ánimos y el apoyo mostrado en todo momento. Un TAF: para todos ellos.

Por supuesto, también he de agradecer la paciencia y el cariño de mis padres, hermanos y toda mi familia durante este tiempo, además de agradecer a mi profesora Doña Maribel Sosa Segura por su cariño y por la influencia que ha ejercido en mí, sin la cual este trabajo no habría comenzado.

Abreviaturas

Ac-DEVD-*p*na N-Acetil-Asp-Glu-Val-Asp-*p*-nitroanilina

Ac-IETD-*p*NA Ac-IleGlu-Thr-Asp-*p*-nitroanilina

ADN Ácido desoxirribonucleico

AIF Factor inductor de apoptosis

APAF-1 Factor activador de proteasas apoptóticas

ARN Ácido ribonucleico

BAD Proteína pro-apoptótica. Inductor de muerte asociado a Bcl-2

BAX Proteína X asociada a Bcl-2

BCL-2 Proteína anti-apoptótica

BID Proteína pro-apoptótica

BIR Dominio de interacción proteína- proteína presente en las proteínas IAPs

CARD Dominio de reclutamiento de caspasa

CREB Factor de transcripción

DAG Diacilglicerol

DCF Diacetato 2',7'-diclorofluoresceína

DD Dominio (de) muerte

DED Dominio efector (de) muerteDISC Complejo inductor de muerte

DMSO Dimetilsulfóxido

DNA-PK Proteína quinasa dependiente de ADN

DTT Ditioneitol

EDTA Ácido etilen-diamin-tetra-acético

EGTA Ácido etilenglicol-bis-N,N'-tetraacético

Elk-1 Factor de transcripción nuclear

ERK1/2 Proteína quinasa regulada por señales extracelulares 1 y 2

FADD Dominio (de) muerte asociado a Fas

Fas Receptor de muerte, también llamado Apo1 o CD95

FasL Ligando del receptor (de) muerte Fas

FBS Suero bovino fetal

H₂DCF-DA Diacetato dihidro-diclorofluoresceína

HEPES N-[2-hidroxietyl] piperazino N'-[2-etanosulfanílico]

IAP Proteína inhibidora de apoptosis

IP Yoduro de propidio

JC-1 Yodurode5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolcarbocianina

MOM Membrana mitocondrial externa

m-TOR Proteína quinasa de la familia de la PI3K

MTT Bromuro de 3-[4,5- Dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio

Myc Factor de transcripción nuclear

NF-κB Factor nuclear –κB (nuclear factor κB)

P53 Proteína supresora de tumores

PARP-1 Poli (ADPribosa) polimerasa-1

PBS Tampón fosfato salino

PMSF Fluoruro de metilsulfonilfenilo

PP1 Proteína fosfatasa 1

PP2A Proteína fosfatasa 2A

PTP Poro de transición de permeabilidad

PVDF Fluoruro de Poli-vinilideno

RING Dominio interacción proteína-proteína

ROS Especies reactivas de Oxígeno

SDS Dodecil sulfato sódico

Smac Segundo activador de caspasas derivado de la mitocondria

TNF Factor de necrosis tumoral

TNFR Receptor de muerte de TNF- α

TNFR1 Receptor 1 del factor necrótico tumoral

TNF-α Factor de necrosis tumoral- α

TRADD Dominio de muerte asociado al TNFR

TRAF2 Factor asociado a al receptor de TNF

TRAIL Ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF

VDAC Proteína de canal aniónico dependiente de voltaje

VEGF Factor de crecimiento endotelial vascular

Figuras

- Figura 1. Estructura química de la melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina). P21
- Figura 2. Ruta de la biosíntesis de la melatonina a partir del aminoácido triptófano. P22
- Figura 3. Diferentes receptores de muerte. Activación de caspasa 8/10 por los receptores de muerte. P33
- Figura 4. Vía intrínseca o mitocondrial. P35
- Figura 5. Regulación de la apoptosis por la familia Bcl-2. P37
- Figura 6. Miembros antiapoptóticos de la familia Bcl-2. P38
- Figura 7. Miembros proapoptóticos de la familia Bcl-2. P39
- Figura 8. Viabilidad de las células Molt-3 mediante el ensayo de MTT tras el tratamiento con diferentes concentraciones de melatonina durante 72 horas. P61
- Figura 9. Efecto de la melatonina sobre el número de células Molt-3. P62
- Figura 10. Microfotografías de contraste de fase de células control y células tratadas con melatonina 1 mM durante 48 horas. P64
- Figura 11. Determinación de los subtipos de receptores de membrana para melatonina expresados en células Molt-3. P65
- Figura 12. Evaluación del papel de los receptores de membrana en el efecto antiproliferativo de la melatonina en células Molt-3. P66
- Figura 13. Efecto de la melatonina sobre el ciclo celular en células Molt-3. P67
- Figura 14. Efecto de la melatonina sobre la externalización de fosfatidilserina en células Molt-3. P68
- Figura 15. Evaluación del efecto de la melatonina a nivel ultraestructural en células Molt-3. P68
- Figura 16. Efecto de la melatonina sobre la actividad caspasa en células Molt-3. P69
- Figura 17. Análisis de la expresión de las caspasas en células Molt-3 tratadas con melatonina. P70
- Figura 18. Efecto de la melatonina sobre la expresión de algunos miembros de la familia de Bcl-2 y sobre la liberación del citocromo c al citosol. P71
- Figura 19. Efecto de la melatonina sobre el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) en células Molt-3. P72
- Figura 20. Efecto de los inhibidores de caspasas sobre la muerte celular por apoptosis inducida por melatonina. P73
- Figura 21. Estudio del efecto del inhibidor general de caspasas z-VAD-fmk sobre la viabilidad de células Molt-3 tratadas con melatonina (1 mM). P74
- Figura 22. Estudio del efecto del inhibidor general de caspasas z-VAD-fmk sobre la apoptosis inducida por melatonina en células Molt-3. P75
- Figura 23. Efecto de la melatonina sobre la generación de ROS en células Molt-3. P76
- Figura 24. Efecto de los inhibidores de la cadena transportadora de electrones mitocondrial y del inhibidor de la NADPH oxidasa sobre la generación de ROS en respuesta a melatonina. P77
- Figura 25. Efecto de los antioxidantes sobre los niveles de especies reactivas del oxígeno la reducción de la proliferación de células Molt-3 y la apoptosis inducida por melatonina. P78

Introducción

Melatonina: naturaleza química y biosíntesis

La melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina), es una indolamina cuya estructura química fue puesta de manifiesto en 1960 por Aaron Lerner y sus colaboradores (1), quienes demostraron que se trataba del factor de despigmentación descrito por vez primera en 1917 por McCord y Allen, en la piel de los peces y anfibios. Precisamente esta primera función descrita para la melatonina sirvió para dar nombre a la misma. Así, de acuerdo con la definición dada por Lerner y sus colaboradores, se trata de una molécula que actúa como un antagonista de la hormona estimulante de los melanocitos- α (α -MSH) en peces y anfibios. Sin embargo, teniendo en cuenta que la alteración en la coloración de la piel no era aplicable a los mamíferos, cuyos melanocitos no contienen melanosomas móviles controlados fisiológicamente, esta propiedad era del interés solamente de unos pocos especialistas, con lo que no se profundizó en su estudio hasta algunos años más tarde.

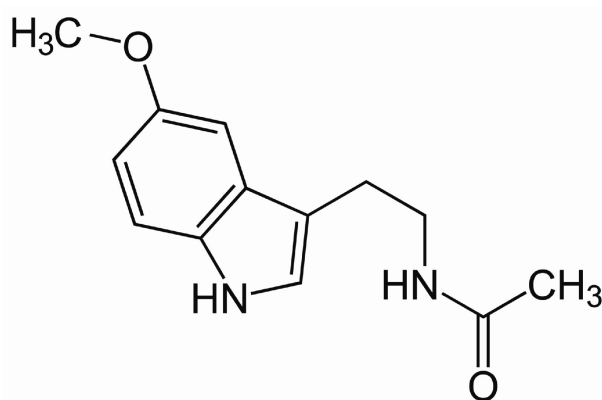


Figura 1. Estructura química de la melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina).

El interés en esta molécula aumentó a partir de los años 80 a raíz de las investigaciones de Redman (2) y Armstrong (3), donde se pone de manifiesto que la melatonina regula y reinicia los ritmos circadianos en mamíferos, estando involucrada en la percepción de la duración del día en especies animales que responden a cambios fotoperiódicos, una variable ambiental que condiciona el ritmo estacional de la reproducción, el metabolismo y el comportamiento. (4-8). Los efectos que esta molécula ejerce directamente en regiones del sistema nervioso central (SNC) con una elevada densidad de receptores como el núcleo supraquiasmático (SCN) o el pars tuberalis (PT), las cuales controlan el ritmo circadiano y estacional, hace que sea considerada por muchos investigadores como su principal función fisiológica. Sin embargo, su acción no está restringida a zonas con una elevada densidad de receptores de la misma. En la década de los 90 se describe que la melatonina no sólo se encuentra en los vertebrados, sino que está presente en invertebrados, bacterias, algas, eucariotas unicelulares y plantas, indicando que esta molécula ha ido adquiriendo funciones adicionales en el curso de la evolución. (9-12).

Llevó algún tiempo hasta que pudo establecerse por completo la ruta biosintética de la melatonina, consistiendo ésta en un proceso en el que intervienen hasta cinco enzimas y que comienza con la hidroxilación del aminoácido aromático L-triptófano transformándose en 5-hidroxitriptófano por la enzima triptófano hidroxilasa (TPH), la cual necesita la 6-tetrahidrobiopterina (6-BH₄) como un cofactor esencial (13), (14). El 5-hidroxitriptófano es transformado posteriormente en serotonina (5-hidroxitriptamina) por la enzima aminoácido aromático descarboxilasa (AAD) (15), siendo ésta convertida en N-acetil-serotonina por la enzima arilalquil N-acetiltransferasa (AANAT) (16). El paso final en la síntesis de la melatonina es la transformación de la N-acetilserotonina por la enzima hidroxindol-O-metiltransferasa (HIOMT), aunque la correcta designación de esta última enzima es serotonin-N-acetiltransferasa (ASMT) (17). En todo este proceso se considera que la AANAT y la HIOMT son los pasos limitantes en la síntesis de melatonina, aunque algunos investigadores consideran que la HIOMT no es un paso limitante en dicha síntesis (18-20). También se ha documentado que la serotonina puede ser acetilada a N-acetilserotonina por una enzima alternativa, probablemente la arilamina N-acetiltransferasa (NAT1) (19, 20).

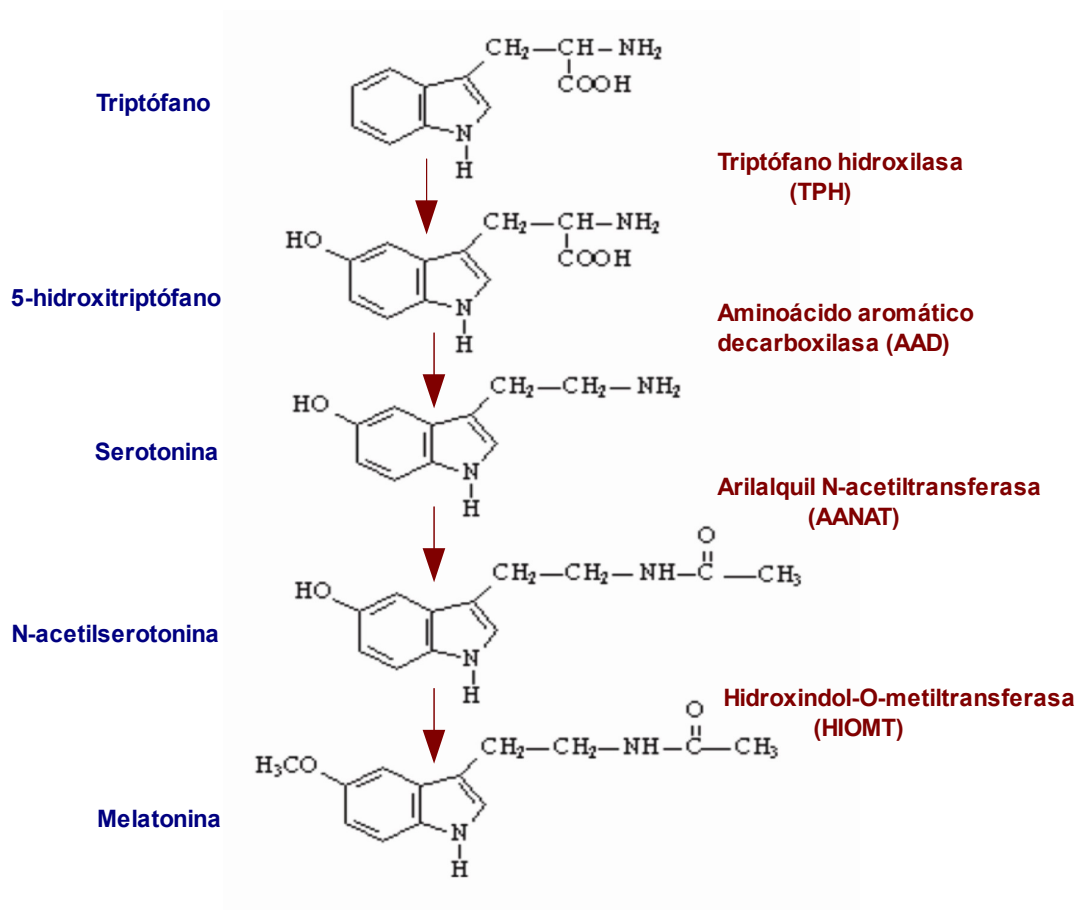


Figura 2. Ruta de la biosíntesis de la melatonina a partir del triptófano

Amplio espectro de acción biológica de la melatonina

Ya desde la década de los 70 se observó que tanto en mamíferos como en otros vertebrados, la síntesis de melatonina no se limitaba sólo a la glándula pineal o estructuras relacionadas como la retina, sino que también se daba en un número considerable de órganos o células. Eso incluye el tracto gastrointestinal, la médula ósea, los leucocitos, la cóclea, la piel y otras áreas del cerebro (21-26).

Se ha detectado la existencia de receptores de melatonina en numerosos tejidos. En investigaciones iniciales, esto fue revelado mediante el uso de melatonina marcada con tritio (33) y subsecuentemente 2-iodomelatonina marcada con ^{125}I (34). Posteriormente, después de la caracterización de los receptores unidos a membrana MT1 y MT2, (35, 36) se obtuvieron datos de expresión a nivel de RNAm y de proteínas. En muchas especies de mamífero han sido identificados receptores de melatonina distribuidos por varios tejidos y órganos, como por ejemplo en diferentes áreas del sistema nervioso central y en órganos periféricos como el tracto gastrointestinal, el hígado, pulmón, piel, glándula adrenal, gónadas y órganos sexuales accesorios masculinos, tejidos mamarios, riñón, corazón, vasos sanguíneos, tejido adiposo, neutrófilos y linfocitos (37-40).

Está erróneamente asumido que la concentración de melatonina en todo el cuerpo es la misma que en la sangre. Por esta razón, los investigadores sostienen sin tener en cuenta los fluidos, tejidos u organismo con el que están trabajando, que los niveles fisiológicos de melatonina están en el rango de picomolar a nanomolar. Revisando la bibliografía se puede observar que la melatonina en otros fluidos corporales y células no está necesariamente en equilibrio con la existente en la sangre. Esto se enfatizó cuando se encontró que en la bilis y en el líquido cefalorraquídeo del tercer ventrículo, las concentraciones de melatonina son varios órdenes de magnitud superiores a los de la sangre (41, 42, 43). De hecho, esos son los niveles fisiológicos de melatonina para esos tejidos. También hay evidencias de que los niveles de melatonina en los fluidos foliculares del folículo de Graff humano exceden a aquellos en el suero (44).

La concentración en los tejidos también puede no depender exclusivamente de la concentración existente en la sangre. Mientras esto es cierto para células que producen melatonina, por ejemplo células de la glándula pineal y retina (45), esto puede ser también el caso de otras células. Por ejemplo, algunas células de la médula ósea contienen altas concentraciones de melatonina (46) y hay evidencias de que tienen la maquinaria biosintética para producirla (47). Células en el tracto gastrointestinal también contienen melatonina en altas concentraciones (48,49). Otros tejidos con la capacidad para generar melatonina son la cóclea, el cristalino y la piel (50-52), y por lo tanto,

pueden tener concentraciones elevadas en relación con la existente en la sangre. Dentro de los orgánulos celulares también, las concentraciones de melatonina pueden variar. Por ejemplo, Martin y sus colaboradores (53) demostraron que los niveles de melatonina en la mitocondria puede exceder significativamente a los existentes en el suero.

Los niveles fisiológicos varían de acuerdo con el organismo que es objeto de estudio. En el dinoflagelado unicelular *Gonyaulax polyedra* y en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (54,55) por ejemplo, las concentraciones de melatonina son excepcionalmente altas, pero a pesar de ello, fisiológicas. Podría por lo tanto existir muchos otros organismos y/o células que por varias razones, contengan mayores concentraciones de melatonina que las encontradas normalmente en la sangre de los mamíferos. En la bibliografía publicada se menciona a menudo que, si los niveles de melatonina exceden el rango picomolar o nanomolar, las concentraciones se consideran farmacológicas. Esto obviamente no es el caso ya que, como se ha comentado anteriormente, las concentraciones de melatonina difieren en diferentes fluidos corporales, en diferentes células, en diferentes orgánulos celulares y en diferentes organismos. Por lo tanto, cuando se hace mención al término fisiológico para describir una concentración de melatonina, debe definirse en referencia a un compartimento específico en un organismo pluricelular o para una especie dada.

La melatonina despliega una excepcional multiplicidad de acciones, como se verá en detalle. Esto puede entenderse únicamente en base a un papel integrador por el cual la melatonina se distingue de otras muchas e importantes moléculas señalizadoras. Deficiencias en la producción de melatonina o en la expresión de sus receptores y el descenso en los niveles de melatonina como aquellos asociados con el envejecimiento, son probablemente los causantes de numerosas disfunciones. En esos casos cantidades insuficientes de melatonina o una pobre señalización melatoninérgica puede estar asociada con una multitud de cambios fisiopatológicos.

El amplio espectro de acción biológica de la melatonina debe ser analizada a diferentes niveles, desde los lugares de síntesis y dinámicas locales, distribución de los receptores y otros lugares de unión en órganos diana, diferencias específicas de cada tipo celular en la señalización como es la relacionada con la presencia de variantes de la proteína G, y otros efectos intracelulares (con particular atención en la acción mitocondrial), hasta los numerosos cambios secundarios inducidos por la influencia sobre otras hormonas, neurotransmisores, neurotrofinas y demás moléculas señalizadoras. En términos funcionales, la melatonina exhibe un gran número de efectos que pueden estar bajo el control del núcleo supraquiasmático (SCN) y puede ejercer también efectos directos en numerosos órganos periféricos. En particular, la melatonina está involucrada en la iniciación del

sueño, control vasomotor, función adrenal, acciones antiexcitatorias, inmunomodulación incluyendo propiedades antiinflamatorias, acciones antioxidantes y sobre el metabolismo energético. También puede influir en el flujo electrónico mitocondrial, en la permeabilidad del poro de transición mitocondrial y la biogénesis mitocondrial. (25,31,32).

El receptor MT1 fue clonado por primera vez en ranas (35), y posteriormente en mamíferos a partir de ovejas y humanos (36). Consta de unos 350 aminoácidos y está acoplado a una proteína Gi, específicamente $G_{i\alpha 2}$, $G_{i\alpha 3}$ y $G_{q/11}$. Se expresa en el cerebro, en el sistema cardiovascular (incluyendo vasos sanguíneos periféricos, aorta y corazón), sistema inmune, testículo, ovario, piel, hígado, riñón, corteza adrenal, placenta, mama, retina, páncreas y bazo (37-39). En el cerebro se encuentra predominantemente en el hipotálamo, cerebelo, hipocampo, en la substantia nigra y en el área ventral tegmental (39). Existe un receptor huérfano llamado MMR o GPR50 que tiene un 45% de homología aminoacídica con los receptores de melatonina, pero a pesar de esta homología, la melatonina no se une a él, y la identidad de su ligando no se ha esclarecido aún (36). Sin embargo, el GPR50 puede heterodimerizar con el receptor MT1 e inhibir su actividad.

-La ruta de transducción de la señal para los receptores de melatonina parece variar entre los diferentes tejidos y tipos celulares. Se ha demostrado que el receptor de melatonina MT1 está acoplado a diferentes proteínas G que median la inhibición de la enzima adenilato ciclasa y la activación de la fosfolipasa $C\beta$. De esta forma, la melatonina tiene efectos inhibitorios en la cascada de transducción de la señal del AMPc, incluyendo el descenso en la actividad de la proteína quinasa A y en la fosforilación del factor nuclear CREB (cAMP responsive element binding protein). El receptor MT2se acopla a varias rutas de transducción de señal incluyendo la producción de fosfoinositol, la inhibición de la adenilato ciclasa y la inhibición de la ruta de la guanilato ciclasa soluble (96-98).

Los receptores de membrana no representan los únicos sitios de unión de la melatonina. Una proteína de unión adicional resultó ser la enzima citosólica quinona reductasa II (QR2) (94,95). Existen niveles elevados en el hígado y el riñón, y cantidades moderadas en el corazón, tejido adiposo y cerebro (95,100). Entre sus propiedades se incluyen: tiene una baja afinidad por el 2-iodomelatonina, al contrario que los receptores MT1 y MT2 (36); no está acoplado a proteínas G; La melatonina inhibe la actividad enzimática de QR2, aunque en el rango micromolar (98). La N-acetil-5-hidroxitriptamina es un ligando de similar afinidad (99) y el resveratrol se mostró más potente en este aspecto. A pesar del desarrollo de varios ligandos de QR2, y de la descripción de varios efectos, su papel no debería ser buscado en la iniciación de las rutas de señalización, sino

más bien en el campo de los mecanismos de detoxificación de los compuestos aromáticos. En muchos casos se demostró que QR2 elimina las quinonas de estrógenos carcinogénicas. La ventaja de una inhibición permanece sin embargo poco clara de momento. A pesar de ello, esta enzima sensible a los estados de redox parece ser de cierta importancia.

También se han descrito como lugares de unión de la melatonina, al menos a otras tres proteínas ubicuamente expresadas, las cuales son de gran relevancia en el metabolismo del calcio como son la calmodulina (CaM), la calreticulina y la tubulina. Los primeros estudios sobre la CaM indicaron que su afinidad por la melatonina podría ser suficiente para unirse a ella a elevadas concentraciones fisiológicas, pero evidencias más recientes sugieren que la afinidad es mucho menor. A pesar de ello, no se puede descartar un papel fisiológico, ya que la afinidad determinada para el complejo CaM/CaM kinasa II es considerablemente mayor que para la CaM sola. La importancia de la interacción de la melatonina con la calreticulina y la tubulina no está del todo clara y en caso de ser funcionalmente importante, podría implicar otro amplio espectro de acciones. No obstante, hay otros efectos de la melatonina sobre la estructura del citoesqueleto que incluyen la reorganización de la tubulina transmitidas por otras rutas de señalización. (101-103).

Se conocen hasta 200 genes activados por receptores nucleares. Entre ellos la melatonina podría mediar sus efectos a través del grupo de los receptores retinoides ROR/RZR. Las subfamilias que, de acuerdo con algunos autores unen melatonina incluyen: ROR α 1, ROR α 2, RZR α y RZR β (104–105d). La estructura de los receptores nucleares consiste en un dominio N-terminal, un dominio de unión al DNA que contiene un doble dedo de zinc, una región bisagra y un dominio de unión del ligando incluido en el extremo C-terminal. La cuestión acerca de si la melatonina interacciona directamente con esos receptores nucleares ha sido una fuente de controversia. Algunos investigadores cuestionan la capacidad de la melatonina de unirse al receptor nuclear ROR α y activarlo directamente, proponiendo que la melatonina regula indirectamente los receptores nucleares a través de su unión al receptor de membrana MT1 (105e). Otros investigadores en el campo de los receptores nucleares llegan incluso a cuestionar la hipótesis de que la melatonina sea un ligando nativo de los receptores ROR (104). A nivel de esos receptores nucleares, la amplitud de la acción biológica de la melatonina es incluso más obvia que en el caso de los receptores de membrana. Los dos subtipos ROR α están ubicuamente expresadas en los tejidos de mamíferos. Niveles relativamente altos fueron detectados especialmente en linfocitos T y B, neutrófilos y monocitos. Una particular relevancia funcional podría existir en huesos, piel, incluyendo folículos pilosos, y células endoteliales. Los niveles de expresión de ROR α dependen frecuentemente del

estado de diferenciación de las células o pueden variar dentro del ciclo celular. El receptor RZR β se expresa en cerebro, glándula pineal y retina, encontrándose también en el bazo (104-107).

Acción antiapoptótica y protección celular

Las propiedades citoprotectoras de la melatonina se han convertido en un importante campo de investigación. Han sido estudiadas varias acciones relevantes en diversos órganos expuestos a diferentes tratamientos como exposición a oxidotoxinas, isquemia-reperfusión, trauma, radiación ionizante, estímulos proapoptóticos y proinflamatorios (108-110). Un área de particular interés y relevancia se refiere a las acciones neuroprotectoras (111), que van desde la neutralización frente a los desórdenes neurodegenerativos y los procesos de envejecimiento normal e intervenciones que promueven la biogénesis mitocondrial e incluso la neurogénesis (112).

Se ha descrito la capacidad de la melatonina como agente secuestrador de radicales. Las primeras observaciones en este sentido se obtuvieron a través de sistemas fotocatalíticos y otros generadores de radicales, indicando que esta molécula es un potente neutralizador del radical hidroxilo, el cual es particularmente reactivo, destructivo, mutagénico y carcinogénico. A partir de ahí se sucedieron numerosos estudios sobre la protección contra radicales libres, que indicaron que la melatonina es mucho más específica que sus análogos estructurales en las reacciones que llevan a la terminación de las reacciones en cadena de los radicales y en evitar los intermediarios prooxidantes (113-115).

La toxicidad de los radicales puede ser mitigada por agentes neutralizantes de los mismos (vitamina E, ácido ascórbico, β -caroteno, glutatión, etc.) o por la acción de antioxidantes indirectos como algunas enzimas (superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa, glutatión reductasa, catalasa, etc). Numerosos estudios han puesto de manifiesto los efectos detoxificadores de la melatonina, pudiendo actuar como un agente neutralizador de radicales o como un antioxidante indirecto. La melatonina ha demostrado capacidad para reducir el daño oxidativo en una variedad de procesos neurológicos experimentales (116-119). La primera observación sobre el papel de la melatonina como agente neutralizador de radicales libres se debe a Ianas y sus colaboradores (134) en estudios realizados *in vitro*, quienes sostienen que la misma posee actividad tanto antioxidante como prooxidativa, una característica común con otras moléculas así llamadas también antioxidantes. Posteriormente se probó que la melatonina es altamente efectiva en la detoxificación del altamente reactivo radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$). Cuando la melatonina es administrada en animales de experimentación tanto oralmente como por vía intravenosa, su concentración en sangre aumenta

rápida. Poco tiempo después es asimilada por los tejidos, donde alcanza concentraciones que superan varias veces a la existente en sangre. Debido a su solubilidad tanto en agua como en lípidos, no existe una barrera que impida su entrada a los distintos tejidos y células o incluso orgánulos intracelulares. Intracelularmente, la melatonina tampoco está distribuida uniformemente. Al ser administrada en concentraciones farmacológicas en animales, las mayores concentraciones de la misma se encontraron en el núcleo de las células. Examinando la distribución subcelular de dicha molécula en varios tejidos de ratón, se vio que la cantidad aparente de melatonina en el citosol y el núcleo de las células fluctuaba en función del ciclo celular (122).

La reactividad del anión radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) en células de mamífero se considera que es baja, aunque en las mitocondrias puede inactivar el complejo de la NADH dehidrogenasa de la cadena de transporte de electrones (121). No hay muchas evidencias de la acción directa de la melatonina tanto con el radical $O_2^{\cdot-}$ como con su forma protonada $HO_2^{\cdot-}$. Lo que sí se ha observado es que la melatonina aumenta los niveles de expresión del RNAm de la enzima superóxido dismutasa (SOD), la familia de enzimas que juega un mayor protagonismo en la dismutación del radical $O_2^{\cdot-}$ (122), disminuyendo por lo tanto su concentración en la célula y convirtiéndolo en H_2O_2 menos tóxico. En general la toxicidad del H_2O_2 , al igual que la del $O_2^{\cdot-}$ se asume que es debida a la reacción de Fenton y Haber-Weiss por la cual ambas especies químicas son convertidas a $\cdot OH$. Se ha demostrado que la melatonina no reacciona de una manera directa con el H_2O_2 (115). Las células poseen enzimas que convierten el H_2O_2 en productos no tóxicos y por lo tanto reducen la formación del radical $\cdot OH$. Estas enzimas que llevan a cabo esto son la catalasa y la glutatión peroxidada (Gpx). Esta última requiere glutatión (GSH) en la descomposición del H_2O_2 y es estimulada por la administración exógena de melatonina (123). De esta manera, se esperaría que la melatonina reduzca tanto los niveles intracelulares de H_2O_2 como la generación del radical $\cdot OH$. Una vez que el glutatión es oxidado a GSSG, este vuelve a convertirse en su forma reducida mediante la enzima glutatión reductasa, otra importante enzima antioxidativa, cuya actividad al igual que la GPx es estimulada por la melatonina (124). Finalmente, un cofactor requerido para la actividad de la glutatión reductasa, el NADPH, se genera por la actividad de la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, la cual también es estimulada por la melatonina (125). También se ha observado que la melatonina estimula la expresión de otra enzima implicada en la metabolización

del H_2O_2 como es la catalasa (126).

En la detoxificación del radical $\cdot\text{OH}$, se cree que la melatonina actúa mediante la donación de un electrón, convirtiéndose ella misma en otro radical (catión indolil), del cual podrían haber varias isoformas (127). De esta manera el catión indolil podría a su vez secuestrar O^- (precursor del radical $\cdot\text{OH}$) y por lo tanto reducir el número de radicales $\cdot\text{OH}$ (114), por lo que cada molécula de melatonina aparentemente tiene la capacidad de detoxificar dos radicales. Otro proceso en el que tiene una particular importancia el papel de la melatonina es en la peroxidación lipídica. Dicho fenómeno es altamente devastador teniendo en cuenta que se trata de un proceso el cual una vez iniciado se retroalimenta debido a la acción de radical peroxil ($\text{LOO}\cdot$). En dicho proceso se produce la “mutilación” oxidativa de los lípidos, perturbando por lo tanto la estabilidad de la membrana plasmática. Como se ha descrito anteriormente, la melatonina es capaz de secuestrar varias especies reactivas de oxígeno, las cuales son iniciadoras de este proceso de peroxidación lipídica. No obstante, también se ha puesto de manifiesto la capacidad de la melatonina para neutralizar al propio radical $\text{LOO}\cdot$ (129) comparándose su efectividad con la de la vitamina E.

La melatonina inhibe la actividad de la forma inducible de la enzima oxido nítrico sintasa (iNOS) a concentraciones fisiológicas, por lo que disminuye la formación de $\text{NO}\cdot$ y por lo tanto también la unión de este con el O_2^- así como la formación del anión peroxinitrito (ONOO^-). Se piensa que la supresión de la actividad de la iNOS por la melatonina se debe a su unión a la calmodulina, la cual es necesaria para la activación de dicha enzima. Algunos autores han manifestado también que la melatonina es capaz de unirse directamente al anión ONOO^- . El anión ONOO^- no sólo inicia la reacción de peroxidación lipídica, sino que también reduce la respiración mitocondrial, disminuye los niveles de glutatión celular y causa daños en el ADN. Según estos autores, la melatonina es tan eficaz como agente secuestrante del anión ONOO^- como el GSH y la cisteína. Estos estudios realizados *in vitro* fueron corroborados por estudios *in vivo* (130-133).

Por otra parte y aunque parezca paradójico, se ha visto en diferentes líneas celulares, tanto normales como tumorales, que la melatonina es capaz de producir especies reactivas de oxígeno (ROS) de una forma rápida y transitoria, sin que esto provocase un aumento en el stress oxidativo. Según algunos autores, la producción de ROS es independiente de receptores de membrana MT1 y MT2, aunque sí depende de la unión de la melatonina con la proteína intracelular calmodulina dado que fue inhibido por clorpromazine. Alguno de estos autores atribuyen la producción de ROS a la

reacción de Fenton. En células normales en las que se ha observado un aumento de ROS, no se vio afectada su viabilidad ni su capacidad de proliferación. (135).

Mecanismos de acción de la melatonina en su acción anticancerígena

En el año 1977 se celebra el primer congreso internacional en el que se trata la relación entre la glándula pineal y el cáncer, el cual sirvió para sistematizar todo el conocimiento al respecto. A partir de entonces son muchos los trabajos que ponen de manifiesto las propiedades oncostáticas de la melatonina en una amplia variedad de tumores, especialmente en aquellos que son dependientes de hormona. Los efectos de la melatonina se han estudiado en numerosos tipos de tumores incluyendo cáncer de próstata, sarcomas, cáncer colorrectal, hepatocarcinomas, melanomas, tumores neuronales, cáncer de laringe, piel, ovario, mama, cérvix, endometrio, pulmón, linfomas y leucemias. La mayoría de esos estudios han sido realizados in vitro, usando líneas celulares derivadas de tumores humanos, aunque también hay estudios con modelos de tumores en ratones (136).

El estrés oxidativo, definido como una perturbación en el equilibrio entre la producción de especies reactivas de oxígeno y su inactivación por los sistemas antioxidantes, está involucrado en la etiología de muchas enfermedades, incluyendo las neoplasias (137). El daño oxidativo del ADN constituye la base de los efectos carcinogénicos de las especies reactivas de oxígeno. Teniendo en cuenta que el estrés oxidativo puede participar en las tres etapas de la carcinogénesis (iniciación, progresión y metástasis) (138), los antioxidantes pueden proteger contra el cancer en los tres estadios de su desarrollo.

La acción anticancerígena de la melatonina está relacionada en parte con sus propiedades antioxidativas y secuestradoras de radicales libres. Esto ha sido demostrado en diferentes modelos experimentales de carcinogénesis inducidos por agentes causantes de daño oxidativo en los cuales la melatonina ejerce efectos protectores (139). La carcinogénesis hormonal merece una especial consideración debido a la relevancia de esos tumores de entre el amplio espectro de dicha enfermedad. El 17β -estradiol (E2), una hormona natural, está clasificada como un carcinógeno por la Agencia Internacional para la Investigación del Cancer (IARC). Los efectos carcinogénicos de E2 dependen en parte, de la estimulación de las células en proliferación en diferentes tejidos por dicho esteroide, incrementando así la probabilidad de replicación del ADN mutado como resultado de diferentes causas. Muchos de los efectos carcinogénicos de los estrógenos sin embargo, están relacionados con el estrés oxidativo dependiente de alguno de sus metabolitos.

Los estrógenos son metabolizados por la enzima citocromo P450 a productos hidroxilados tales como el 2- y el 4- α -hidroxiestradiol. Ambos son oxidados a semiquinonas, que en presencia de oxígeno molecular, son oxidadas a quinonas con la formación de radicales anión superóxido y radicales hidroxilo, los cuales son los responsables de la carcinogenicidad de esos esteroides (140). Usando como modelo el riñón de hamster para inducir carcinogénesis por E2, Karbownik y sus colaboradores (140) demostraron que la melatonina previene el aumento en la oxidación de las bases guanina causada por el E2, y por lo tanto evita el daño en el ADN y la potencial supresión del cancer mediado por estrógenos.

Otro aspecto interesante en las propiedades antioxidantes de la melatonina en el campo de la terapia contra el cancer es su utilidad como un adyuvante en tratamientos de quimio y radioterapia. Muchas drogas quimioterapéuticas usadas para combatir las células cancerígenas, además de la radioterapia, inducen la formación de ROS que en muchos casos son fuente de indeseables efectos secundarios. Esta es la base para el uso de antioxidantes como suplemento para reducir la toxicidad de la quimioterapia (141). Un reciente análisis, incluyendo 33 estudios realizados entre 1996 y 2007, y que comprendía una población de 2446 casos, documentó que la melatonina disminuyó la neurotoxicidad, la mielosupresión, la astenia, la caquexia y la diarrea en tratamientos quimioterapéuticos para diferentes tipos de tumores (141).

El crecimiento tumoral debe considerarse como el resultado de un equilibrio entre la proliferación celular y la muerte celular. Consecuentemente, la modulación del ciclo celular y la inducción de la apoptosis pueden considerarse como dos mecanismos para el control del crecimiento tumoral. La melatonina aumenta la duración del ciclo celular en células de cáncer de mama MCF-7, células mieloides humanas HL-60, y células de hepatocarcinoma HespG2, expandiendo la fase G1 y retrasando la entrada de las células en la fase S, o manteniendo las mismas en la fase G2/M. La prolongación de la fase G1 reduce la proliferación celular y permite el rescate celular en la fase G0, llevándola a la diferenciación; además una prolongada fase G1 permite la reparación del ADN dañado. La prolongación de la fase G1 podría ser explicada, al menos en parte, por el aumento en la expresión de las proteínas p53 y p21 descrita en diferentes líneas celulares. El retraso en la entrada en la fase S puede explicar la disminución en la síntesis de ADN descrito en las células MCF-7 tratadas con melatonina. Un estudio más reciente indica que la inhibición transcripcional de la ciclina D1 como un evento molecular clave para la actividad antiproliferativa de la melatonina y proporciona una evidencia indirecta de su efecto sobre el promotor de la ciclina D1 es mediado por las proteínas c-jun y ATF-2. Esos hallazgos establecen por primera vez, una conexión molecular entre la melatonina y sus efectos sobre el ciclo celular, proporcionando al mismo tiempo una razón para su uso como adyuvante quimioterapéutico.

Los numerosos mecanismos que regulan la diferenciación celular durante el desarrollo normal también están involucrados en la tumorigénesis. La relación entre la progresión tumoral y su estado de diferenciación son bien conocidos. Los tumores bien diferenciados están generalmente menos avanzados y llevan un mejor pronóstico que los poco diferenciados que son generalmente más agresivos y llevan un peor pronóstico. La melatonina induce la diferenciación celular en diferentes líneas de células normales y tumorales, incluyendo células de neuroblastoma , células MCF-7 células de cáncer de próstata , células troncales mesenquimales humanas adultas y células troncales neuronales (136). El incremento en la duración del ciclo celular, por la expansión de la fase G0-G1 y retraso en la entrada en la fase S, es un medio por el cual la melatonina permite a las células tumorales alcanzar una mayor diferenciación. Ese efecto citodiferenciador ha sido considerado como un posible mecanismo por el cual la melatonina incrementa el tiempo de supervivencia y mejora la calidad de vida de los pacientes afectados por glioblastomas y tratados con radioterapia (136).

Mientras algunas condiciones causan que las células que entran en la fase G0 se diferencien, otras, tales como la existencia de una significativa cantidad de ADN dañado, disparan la apoptosis, llevando a las células a una pérdida progresiva de funciones y de estructuras celulares y por lo tanto a la muerte celular.

La melatonina, ha demostrado proteger a las células normales de la apoptosis, e inducir apoptosis en varias células cancerosas, incluyendo células mieloides humanas HL-60, células de linfomas B humanas, células de tumores mamarios humanos MCF-7, células de cáncer colorectal humano HT-29, células de tumor secretoras de prolactina de pituitaria de rata, células de cáncer de próstata LNCaP, y células de hepatocarcinoma humano HepG2 (136).

Los organismos pluricelulares dependen de la apoptosis para un desarrollo apropiado y un mantenimiento de sus tejidos. El fenómeno apoptótico permite la eliminación de las células que no están en su sitio, que no se necesitan o que están dañadas de manera irreparable (142). Se puede definir la apoptosis como un conjunto de reacciones bioquímicas que tienen lugar en la célula, que concluyen con la muerte de la célula de una forma ordenada, sin producir ningún tipo de alteración en el resto del tejido. La apoptosis es un proceso de autodestrucción celular controlada, que permite al organismo su correcta morfogénesis y la eliminación de las células que amenacen su supervivencia, además de ser necesaria para evitar la sobreproducción celular. Este proceso es de vital importancia, tanto durante el desarrollo embrionario como en la vida adulta, y puede observarse su aparición en algunas reacciones del sistema inmune, o cuando las células son dañadas por alguna enfermedad o por la acción de algún agente nocivo.

Existe una gran variedad de estímulos y condiciones, fisiológicas o patológicas, que pueden llevar a que se desencadenen los mecanismos apoptóticos: ligandos que actúan sobre receptores específicos (TRAIL o TNF), carencia de factores de crecimiento, la radiación ultravioleta, la hipoxia, toxinas, fármacos, la presencia de radicales libres, una infección vírica o bacteriana, o el desprendimiento de la célula del tejido del que forma parte. Pero no todas las células mueren irremediablemente en respuesta a estos estímulos. Los corticoesteroides inducen apoptosis en algunas células como los timocitos, mientras que otras células no se ven afectadas. La sensibilidad de la célula a un estímulo dependerá del equilibrio entre la expresión de proteínas pro y antiapoptóticas, de la intensidad del estímulo y del momento del ciclo celular en el que esta se encuentre.

El papel crítico que desempeña la apoptosis en la regulación de la homeostasis tisular tiene importantes implicaciones en la salud. Excesivos niveles de apoptosis contribuyen al desarrollo de múltiples patologías, como el SIDA, trastornos neurodegenerativos como el Alzheimer y la enfermedad de Huntington, isquemia cardíaca y daño renal, mientras que la deficiencia en la apoptosis es clave en el desarrollo de enfermedades autoinmunes y del cáncer. Esto hace que todos los estudios que contribuyan al conocimiento y manipulación de la apoptosis tengan una gran importancia. Durante la apoptosis, la célula va a sufrir una serie de cambios bioquímicos que afectan en último término a la morfología celular. Se produce una hidrólisis de determinadas proteínas, teniendo una especial relevancia el papel de las caspasas y una fragmentación del material genético. También se produce la externalización de la fosfatidilserina hacia la cara externa de la membrana citoplasmática, actuando como molécula señalizadora que permite el reconocimiento por los fagocitos del sistema inmune y la eliminación de la célula cancerígena. Aumentan los niveles del calcio iónico en estado libre dentro de la célula, a lo que se une una deshidratación de la misma.

Al comienzo de la apoptosis se puede observar una contracción celular y la condensación y fragmentación de la cromatina del núcleo. Las células comienzan a menguar, el citoplasma por lo tanto se hace más denso y los orgánulos están más aglutinados dentro de la célula. En la membrana plasmática empiezan a formarse evaginaciones, se fragmenta el núcleo y se forman los llamados cuerpos apoptóticos, los cuales son fragmentos de la membrana que retienen citoplasma junto con orgánulos densamente empaquetados con o sin fragmentos nucleares. Estos cuerpos apoptóticos son rápidamente fagocitados por macrófagos o por células vecinas debido a la exposición de marcadores de fagocitosis en la superficie celular como la fosfatidilserina, evitando la exposición del material intracelular al sistema inmune que podría desencadenar una respuesta inflamatoria.

Existen dos vías de señalización distintas aunque interrelacionadas que controlan la activación de la apoptosis: la vía extrínseca o vía de los receptores de muerte celular y la vía intrínseca o vía mitocondrial.

La activación de la vía extrínseca se inicia mediante la unión de unos ligandos específicos a sus receptores, provocando la agregación del receptor y el reclutamiento de proteínas adaptadoras, que mediante la interacción proteína-proteína transmiten la señal de muerte hasta las moléculas efectoras. Los receptores de muerte pertenecen a la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral (TNF), cuyos miembros tienen en común un dominio extracelular rico en cisteína y un dominio intracelular que permite al receptor acoplarse con el resto de la maquinaria apoptótica. Los receptores de muerte mejor caracterizados y sus correspondientes ligandos son: TNFR1/TNF- α , FasR/FasL, DR3/Apo3L, DR4/TRAIL y DR5/TRAIL.

Una vez que se unen las subunidades FasR y FasL se produce la trimerización del complejo ligando-receptor, reclutando otras moléculas adaptadoras asociadas al dominio de muerte como FADD (proteína con dominio de muerte asociado a Fas) o RIP (proteína de interacción con el receptor). Estas últimas, a su vez promueven el reclutamiento de las procaspasas iniciadoras-8 y -10, formándose así el complejo inductor de muerte DISC.

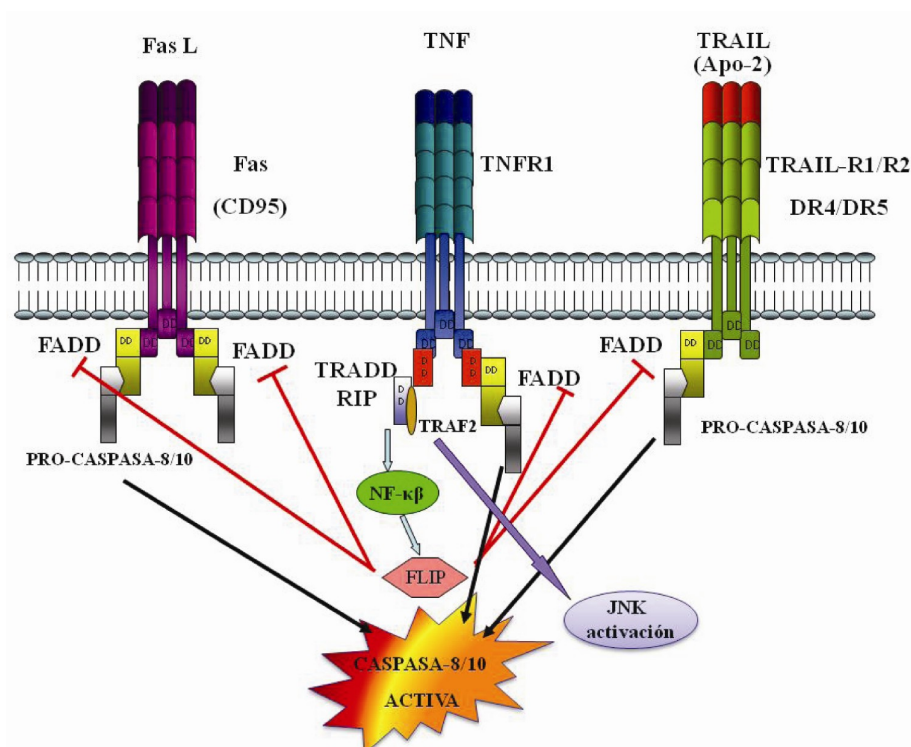


Figura 3. Diferentes receptores de muerte. Activación de caspasa 8/10 por los receptores de muerte.

En la vía extrínica existen dos mecanismos de señalización intracelular, que dependen del tipo celular:

Tipo I: la activación de la caspasa-8 es suficiente para activar las caspasas efectoras (-3, -6 y -7) y llevar a la célula a su muerte por apoptosis. Este tipo de inducción no precisa de la mitocondria y por tanto no está inhibida por factores antiapoptóticos como Bcl-2 o Bcl-XL, ya que no requiere la amplificación de la señal mediante factores pro-apoptóticos mitocondriales.

Tipo II: la activación de la caspasa-8 no es suficiente para activar eficientemente otras caspasas y se hace necesaria la amplificación de la señal. En estas células la caspasa-8 provoca la activación proteolítica de BID, que se trasloca a la mitocondria e interacciona con moléculas pro-apoptóticas de la familia Bcl-2 como son Bax y Bak, induciendo la liberación de citocromo c y otros factores pro-apoptóticos al citosol. Aquí el citocromo c se une al dominio C-terminal de la proteína Apaf-1 (factor de activación de la apoptosis) y esta unión produce un cambio conformacional en Apaf-1 que lo hace más flexible, y facilitando de esta manera la unión del ATP a sus dominios de unión a nucleótidos. Se forma de esta manera el apoptosoma, que consiste en un complejo formado por siete moléculas de Apaf-1 interaccionando por los extremos N-terminal, a las que se une dATP, citocromo c, y finalmente la caspasa-9 en su zona central por la interacción de dominios CARD (dominios de reclutamiento de caspasas), provocando un cambio conformacional a una forma activa, capaz de activar a las caspasas ejecutoras -3, -6 y -7.

El receptor de TNF-1 (TNFR1) es una proteína de aproximadamente 55 kDa que se expresa en la mayoría de las líneas celulares. Comparte con CD95 los tres subdominios ricos en cisteína situados en la región extracelular, pero a diferencia de la pareja formada por CD95/CD95L, el par TNFR1/TNF-1 es capaz de transmitir a la célula dos tipos de señales muy distintas entre sí. Tras la unión de TNF-1 a su receptor, el dominio intracelular es reconocido por una molécula que lleva un dominio de muerte asociado, TRADD, la cual puede unirse a FADD, RIP o a TRAF-2 (TNF-R-asociado al factor 2). FADD se une a la caspasa-8/-10 activándola mediante autoproteólisis e induciendo apoptosis. TRAF2 recluta proteínas inhibidoras de la apoptosis como cIAP-1 y cIAP-2, aunque también puede activar MAPKs. Si TRADD se une a la proteína RIP se induce la transcripción de los factores NF- κ B y AP-1 promoviendo la inducción de genes de carácter proinflamatorio e inmunomodulador, oponiéndose a la acción proapoptótica del TNF. La unión del ligando al receptor puede dar lugar a dos tipos de complejos: i) Complejo I, formado por TRADD unido a RIP y a TRAF-2 que dará lugar a la señalización de NF- κ B. ii) Complejo II, formado por TRADD unido a FADD que induce la autoproteólisis de caspasa -8/-10 promoviendo la apoptosis.

Los niveles de c-FLIP van a determinar la activación de una vía u otra. En el caso de TNFR1, la unión de su ligando sólo induce apoptosis en algunas líneas celulares cuando la síntesis de proteínas ha sido bloqueada. De ahí se deduce la existencia de algún factor que bloquea las señales apoptóticas derivadas de TNFR1, por lo que se podría sugerir que la expresión de este factor estará probablemente controlada a través de NF- κ B y JNK/AP-1 (78). Además TNFR1, como se verá más adelante, puede activar dos tipos de esfingomielinasas (Smasas) (79) que a su vez podrían activar una serie de MAP-quinasas que activan la ruta de las caspasas.

La vía intrínseca puede ser activada por una gran variedad de estímulos, como compuestos citotóxicos, radiación, estrés celular o la ausencia de factores de crecimiento (80), que actúan directamente sobre la mitocondria o a través de moléculas mediadoras. Además, la mitocondria, puede ser esencial en la amplificación de la señal apoptótica de la vía extrínseca. Esta vía es controlada por el equilibrio entre los miembros pro- y anti-apoptóticos de la familia de proteínas Bcl-2.

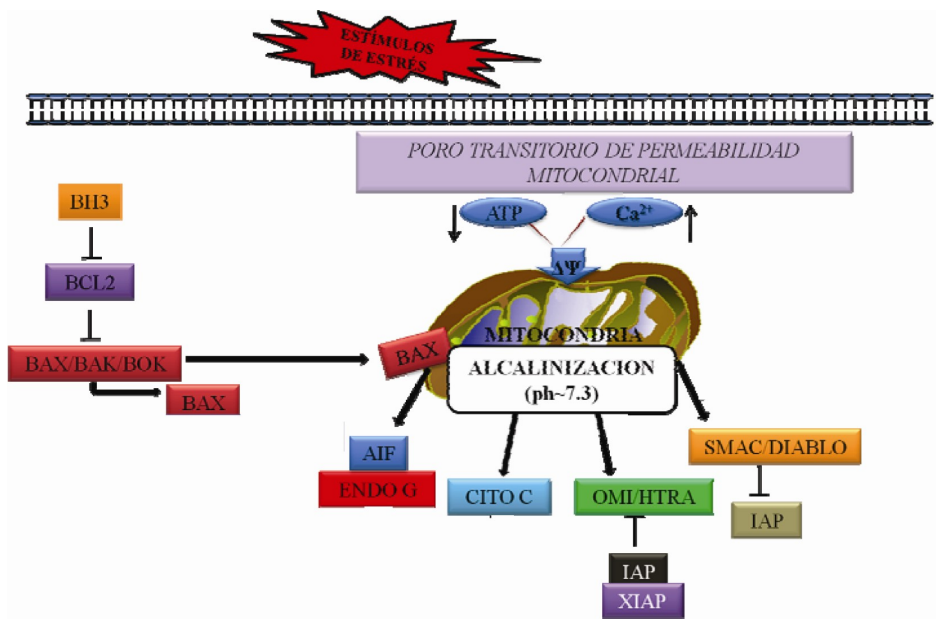


Figura 4. Vía intrínseca o mitocondrial.

Los miembros proapoptóticos pueden inducir la permeabilización de la membrana mitocondrial externa y liberar moléculas solubles al citosol como:

- Citocromo c, el cual estimula la formación del apoptosoma, seguida de la activación de la caspasa-9 e hidrólisis de las caspasas efectoras -3, -6 y -7 (81).

- Smac/DIABLO, el cual se une a las proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAPs), impidiendo su unión a las caspasas (82).
- Endonucleasa G, que es la principal nucleasa responsable de la degradación del ADN, la cual se transloca al núcleo tras su liberación de la mitocondria, y junto con exonucleasas y la ADNasa I producen el típico patrón en escalera vistos en electroforésis en gel de agarosa (83).
- Htr/Omi, una serín-proteasa que funciona también como inhibidor de IAPs, mediante la inactivación por corte (84).

Como resultado se produce la ruptura de la cadena de transporte de electrones mitocondrial, la liberación de iones superóxido (85,86) y la hiperpolarización de la membrana mitocondrial interna (que puede terminar con la dilatación de la matriz y la rotura de la membrana). Además, se abren los poros mitocondriales permitiendo la entrada de agua y solutos a la matriz, produciéndose un choque osmótico y la liberación del factor inductor de la apoptosis (AIF), que se transloca al núcleo y provoca la condensación y fragmentación del ADN en trozos de alto peso molecular. A nivel de la membrana celular, AIF activa a la flipasa e inhibe a la translocasa haciendo que la fosfatidilserina que en células normales se encuentran en la cara interna de la membrana se exponga ahora al exterior (87). La actividad de AIF es inhibida por la sobreexpresión de Bcl-2, pero no por los inhibidores de caspasas, es decir, su efecto es independiente de las caspasas (88). También se induce la activación de Bax que puede formar un canal en la membrana mitocondrial.

Además de estas dos vías, existen señales apoptóticas que tienen su origen en el núcleo celular. La más importante es la proteína supresora de tumores p53, que se activa en el contexto de un daño celular irreparable en respuesta a diferentes tipos de estrés. Esta proteína nuclear puede inducir la expresión de numerosos factores proapoptóticos (ej. Puma, noxa, Bax, Apaf-1, Fas y DR5) (89).

Proteínas reguladoras de la apoptosis:

Proteínas de la familia Bcl-2

El primer miembro y que da nombre a la familia, Bcl-2, fué clonado a partir del punto de corte en la translocación cromosomal t(14:18), presente en el 85% de los linfomas foliculares de células B humanas, y se caracteriza por inhibir la muerte celular por apoptosis (80). Posteriormente, fué identificada toda una familia de proteínas relacionadas por su homología de secuencia y su participación en el control de la apoptosis. Los factores Bcl-XL, Bcl-w, Mcl-1, Bcl-B y Bfl-1 comparten con Bcl-2 una actividad anti apoptótica y una homología estructural en cuatro regiones

α -hélice homólogas a Bcl-2, BH1, BH2 y BH3. Finalmente, Bid, Bim, Bad, Bik, Puma, Noxa, Bmf, Hrk, Bk1, BNIP3 y Skiipe, sólo poseen el dominio BH3 necesario y suficiente para promover la apoptosis (90).

Los miembros de la familia Bcl-2 interactúan de forma dinámica para regular la apoptosis, mediante homo/hetero dimerización o mediante fosforilación y desfosforilación. Los miembros que sólo poseen el dominio BH3, necesitan heterodimerizar para ejercer su acción, uniéndose a las proteínas anti apoptóticas. Además, los miembros pro apoptóticos como Bax pueden heterodimerizar con los factores anti-apoptóticos como Bcl-2 o Bcl-xl y bloquear su actividad anti-apoptótica. Cuando Bcl-2 está en exceso, las células están protegidas de la muerte celular, y cuando Bax está en exceso, la célula está avocada a entrar en apoptosis. Por tanto, la relación de los niveles de expresión entre los miembros pro- y anti apoptóticos de la familia Bcl-2 determina el destino celular (80).

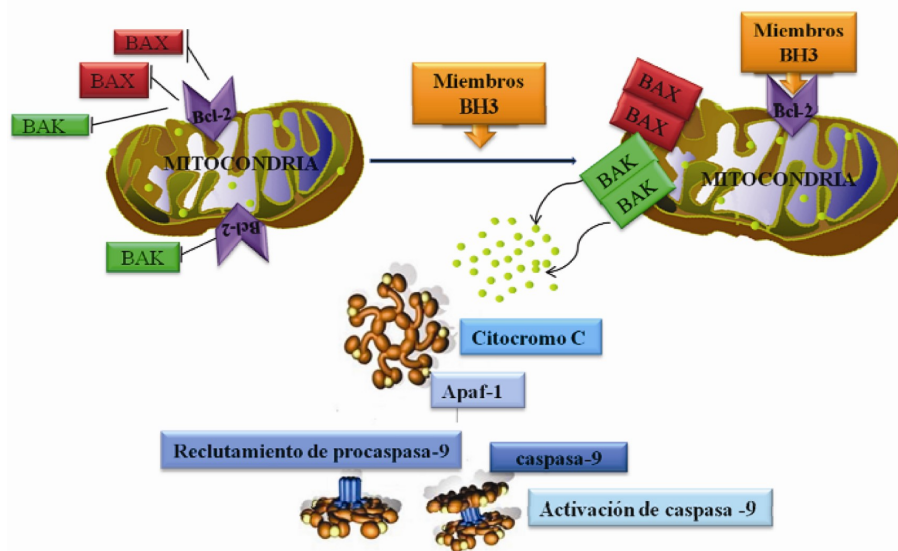


Figura 5. Regulación de la apoptosis por la familia Bcl-2.

Estas proteínas, poseen localizaciones subcelulares diferentes. Los miembros anti-apoptóticos suelen aparecer como proteínas integrales en las membranas del núcleo, del retículo endoplásmico y fundamentalmente de la mitocondria, estabilizando la membrana mitocondrial y evitando la liberación de citocromo c. En cambio los miembros pro-apoptóticos se encuentran en el citosol o asociados al citoesqueleto. En respuesta a un estímulo de muerte estos sufren un cambio conformacional que les permite integrarse en la membrana mitocondrial externa donde interactúan

con los miembros anti apoptóticos, inhibiéndolos, permeabilizando la membrana mitocondrial externa y activando la apoptosis (91).

Bcl-2: es la proteína prototipo de la familia, su peso molecular es de 26 kDa y posee los cuatro dominios que la definen (BH1-BH4). Es una proteína integral y forma una estructura similar a un poro, pudiendo modificar el flujo de moléculas o proteínas pequeñas de un lado a otro de la membrana. Su sobreexpresión puede evitar o retrasar la muerte celular inducida por la carencia de factores de crecimiento, irradiación, glucocorticoides y drogas quioterapéuticas, y promover la tumorigénesis mediante la prevención de la muerte celular (92).

Bcl-XL: es una proteína muy similar a Bcl-2, tanto en su estructura como en su función. Posee los cuatro dominios BH y su peso molecular es de 30 kDa. Su sobreexpresión puede mediar una resistencia significativa a la muerte celular por apoptosis dependiente de una carencia de factores de crecimiento. Bcl-XL puede ejercer su acción antiapoptótica mediante la interacción con moléculas proapoptóticas como Bax. Además, puede regular la permeabilidad de la membrana mitocondrial impidiendo la liberación del citocromo c al citosol (93).

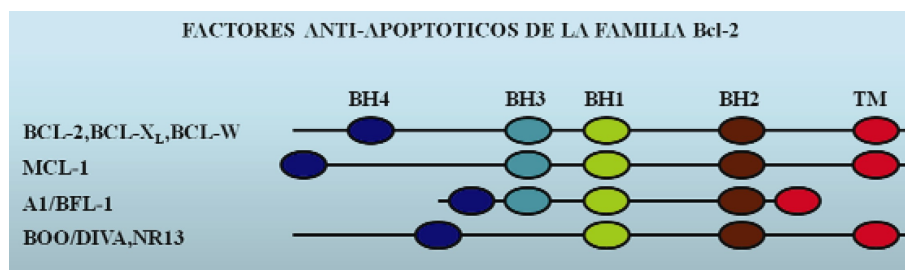


Figura 6. Miembros antiapoptóticos de la familia Bcl-2.

Subfamilia Bax: Bax es uno de los miembros proapoptóticos más importantes, su peso molecular es de 21 kDa y posee los dominios BH1, BH2 y BH3, aunque son BH1 y BH2 los que guardan una estrecha homología con Bcl-2. En condiciones normales, Bax se encuentra en el citosol o en el citoesqueleto en forma monomérica, y en respuesta a estímulos apoptóticos se transloca a la membrana mitocondrial externa o interna, formando homo o hetero-oligómeros con Bak, y puede ser que con otros factores. No está claro su mecanismo pero sí que su regulación se lleva a cabo mediante fosforilación, y que su sobreexpresión acelera la apoptosis mediante la permeabilización de la membrana mitocondrial externa.

Subfamilia BH3: son proteínas proapoptóticas, que solo muestran homología con Bcl-2 por su dominio BH3. Para ejercer su actividad pueden formar heterodímeros con los miembros antiapoptóticos de la familia Bcl-2 y Bcl-XL. Para ello, el dominio BH3 de los miembros de este grupo puede introducirse en el hueco hidrofóbico formado por la asociación de las regiones BH1, BH2 y BH3 de los miembros antiapoptóticos. Bad se activa mediante desfosforilación, y cuando está fosforilada se encuentra inactiva en el citosol pudiendo estar unida a la proteína 14-3-3. La hidrólisis de la proteína 14-3-3 durante la apoptosis promueve la muerte celular mediante la liberación de Bad, facilitando su translocación a la mitocondria y su interacción con Bcl-XL. Bid y Bik pueden actuar sobre la mitocondria, induciendo la liberación de citocromo c. Bid y Bim inducen la permeabilización de la membrana mitocondrial en un modelo dependiente de Bax y/o Bak, induciendo su oligomerización. Bid es la proteína que interrelaciona las dos vías apoptóticas (vía extrínseca e intrínseca), la activación de la caspasa-8 induce la hidrólisis de Bid formando un fragmento truncado (tBid) que se transloca a la membrana mitocondrial e induce la liberación de citocromo c.

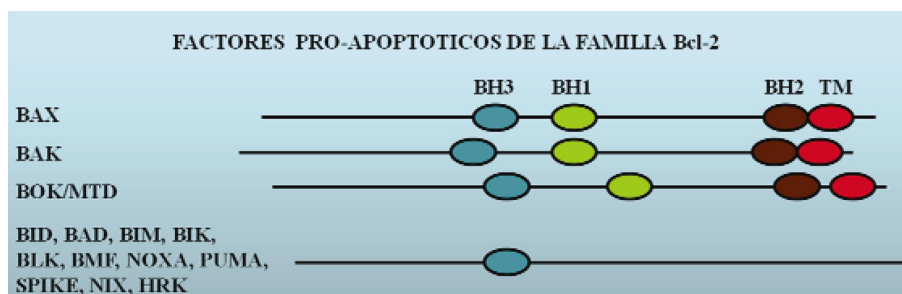


Figura 7. Miembros proapoptóticos de la familia Bcl-2.

La pérdida de la regulación sobre los miembros de la familia Bcl-2 está estrechamente vinculada a la tumorigénesis, los miembros antiapoptóticos parecen funcionar como oncoproteínas y los proapoptóticos como supresores de tumores.

Proteínas de la familia de las caspasas.

Las caspasas (cisteín-proteasas específicas de aspartato), poseen funciones centrales en las vías de señalización de la apoptosis y de la inflamación. La familia de las caspasas se compone de 15 miembros en mamíferos que se agrupan en dos grandes subfamilias: las caspasas relacionadas con la inflamación y las apoptóticas.

En humanos se han descrito 12 caspasas (Casp-1-Caspasa-10, Casp-12 y Casp-14). Todas ellas se encuentran en forma de zimógenos o proenzimas con una estructura bien definida:

a) un dominio N-terminal muy variable tanto en su secuencia como en su longitud, con funciones de regulación y activación.

b) una región catalítica formada por dos dominios, uno grande de 20 kDa y otro pequeño de 10 kDa, que darán lugar a las dos subunidades de la enzima una vez activada.

Las caspasas se dividen en dos grupos según la longitud de su región reguladora N-terminal o prodominio. Las caspasas con prodominio largo son la casp-1, -2, -4, -5, -8, -9 y -10, y están involucradas en funciones de regulación de la activación de la cascada (iniciadoras). Las procaspasas -8 y -10 contienen en sus prodominios repeticiones de una secuencia de interacción proteína-proteína llamada dominio efector de muerte (DED), mientras que las procaspasas -1, -2, -4, -5 y -9 contienen dominios de reclutamiento de caspasas (CARDs); estos dominios facilitan la interacción con proteínas que contienen los mismos dominios. Las caspasas con prodominio corto (efectoras) son las caspasas -3, -6 y -7, son activadas por alguna de las caspasas iniciadoras e hidrolizan numerosas proteínas celulares. Las caspasas -1, -4, -5 y -12 están implicadas en la regulación de señales inflamatorias, mientras que las caspasas -2, -3, -6, -7, -8, -9 y -10 están más implicadas en la apoptosis.

El inicio de la activación de las caspasas puede ocurrir a través de la vía intrínseca de la apoptosis, formándose el apoptosoma y activándose la caspasa-9 debido a un cambio conformacional, o a través de la vía extrínseca que puede inducir la activación de la caspasa-8 (Tipo I) de forma directa, o a través de la activación de caspasa-9 (Tipo II). La activación de las caspasas se inicia por un procesamiento proteolítico entre sus dominios mayor y menor, que puede ser llevado a cabo por ellas mismas o por otras caspasas, formando un heterodímero y dando lugar a una conformación activa. Luego, estas caspasas iniciadoras son capaces de activar a otras caspasas. Para ejercer su función, normalmente se produce la dimerización de dos caspasas heterodímeras formando heterotetrámeros. Una caspasa activa a la otra cortando entre sus dominios, amplificándose así la señal proapoptótica y culminando con la activación de las caspasas efectoras que inducen la proteólisis que acaba con la célula por apoptosis.

Además de estas vías principales de activación de caspasas, también se pueden activar vía retículo endoplásmico, inducida por agentes que perturban la homeostasis del ión calcio, provocando la translocación de la caspasa-7 a la superficie del retículo endoplásmico, que a su vez activa la caspasa-12, activando a la caspasa-9 que activa las caspasas efectoras -3, -6 y -7, sin producirse la liberación de citocromo c. En los linfocitos T citotóxicos y las células Natural Killer, se puede inducir la activación de caspasas vía Granzima B, proteína que es capaz de hidrolizar a las caspasas -3 y -7, iniciando la apoptosis.

Las caspasas organizan de forma coordinada la destrucción de las estructuras y orgánulos de las células mediante la hidrólisis de sustratos específicos. En conjunto, estos eventos proteolíticos inducen en la célula los cambios fenotípicos característicos de la apoptosis. Se conocen más de 200 sustratos hidrolizados por las caspasas y pueden clasificarse en: proteínas citoplasmáticas (actina, gelsolina, componentes de unión a B-cateninas), proteínas nucleares (lámina -A, -B, receptor de lámina-B, proteínas nucleares del aparato mitótico, proteínas asociadas a ribonucleoproteínas, proteínas de unión a la estructura del cromosoma), proteínas relacionadas con el metabolismo y reparación del ADN (PARP, DNA-PKCS, proteínas de replicación del ADN, ADN-topoisomerasas), proteínquinas (PKC y sus isoformas, MAPK, ERK, Akt, Weel), proteínas implicadas en las vías de señalización (citoquinas, pro-interleukinas y fosfolipasas), proteínas del ciclo celular y proliferación celular (p21, p27, pRb y ubiquitinas).

También existen proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAPs) constituyendo una familia de factores proteicos que son liberados por la mitocondria y ejercen su acción inhibiendo directamente a las caspasas. Se han identificado cinco IAPs en humanos: NAIP, XIAP, c-IAP1, c-IAP2 y ML-IAP. Todas ellas pueden presentar: i) al menos un dominio BIR, mediante el que se unen a las caspasas inhibiendo su acción, ii) dominios RING, que actúan como una ubiquitín-ligasa induciendo su autodegradación y la degradación de la caspasa unida a él por el proteasoma, iii) dominios CARD, que pueden permitir la regulación de la degradación de las caspasas por interacción entre dominios de este tipo.

Los inhibidores XIAP, cIAP1 y cIAP2 suprimen la actividad de las caspasas-3, -7 y -9. Dentro de esta familia de proteínas, la mejor estudiada es XIAP. Su estructura está formada por tres dominios BIR y un dominio RING. El dominio BIR2 inhibe las caspasas-3 y -7, mientras que el dominio BIR3 inhibe la caspasa-9. Los antagonistas de XIAP (Smac/DIABLO, Omi/HtrA2) pueden unirse a BIR2, bloquear su efecto inhibitor y activar directamente a la caspasa-3, que a su vez activa a las caspasas-8 y -9 como consecuencia del bucle de amplificación de la señal apoptótica. Además, el efecto apoptótico inducido por el antagonista de XIAP sólo se observa en células tumorales, debido a que sus niveles de expresión son mayores que en las células normales. La proteína survivina sólo posee un dominio BIR, y aunque fue considerada como una IAP, no inhibe a las caspasas directamente, sino que es una proteína nuclear importante en la mitosis celular (96).

La proteína c-FLIPL posee dos regiones homólogas a los dominios DED efectores de muerte en su extremo amino, asemejándose a la estructura de las caspasas-8 y -10. Esto le permite impedir la formación del complejo inductor de muerte, y también mediante la unión a la caspasa-8 por sus dominios DED formar un heterodímero caspasa-8/c-FLIPL, que promueve la proteólisis parcial de ambos. Esta proteólisis incompleta mantiene a las dos proteínas unidas al receptor, impidiendo la liberación de la forma activa de la caspasa-8 (100).

Las caspasas pueden ser además modificadas covalentemente por fosforilación. Por ejemplo Akt, quinasa involucrada en la supervivencia celular y mediador de la fosfatidil inositol-3-kinasa (PI3K), fosforila el centro activo de la caspasa-9 inhibiendo su función (101).

Objetivos

En base a lo anteriormente expuesto y dado que los estudios sobre las propiedades antitumorales de la melatonina en células sanguíneas es bastante limitado, nos planteamos como objetivo general estudiar el efecto antitumoral de la melatonina en células Molt-3, una línea celular de naturaleza linfoide que ha demostrado ser un buen modelo celular para este tipo de estudios. Más concretamente, los objetivos específicos planteados son:

1. Evaluar el efecto de la melatonina sobre la proliferación y la viabilidad celular.
2. Determinar si la melatonina induce activación de las vías apoptóticas.
3. Valorar el papel que desempeñan las caspasas.
4. Explorar si la melatonina induce generación de especies reactivas y determinar el papel de estas últimas.

Material y métodos

Productos y material fungible

El medio de cultivo RPMI 1640, el suero bovino fetal (FBS), la tripsina, el HEPES (N-[2-hidroxietil] piperazino N'-[2-etanosulfanílico]), la L-glutamina, el azul de tripán, el bicarbonato sódico y los antibióticos (estreptomina, gentamicina y penicilina G), fueron adquiridos a Sigma Chemical Co. (St. Louise, MO, USA). Las botellas de cultivo de 75 cm² y las placas de 48 y 96 pocillos estériles, así como el resto del material estéril utilizado fueron de Becton-Dickinson. El yoduro de propidio, la RNasa A y la proteinasa K, fueron adquiridos a Sigma Chemical Co. La agarosa se obtuvo de BioRad (Madrid, España) y el bromuro de etidio de Sigma/Aldrich (España). La anexina V se obtuvo de BD PharmigenTM (Anexin V-FITC Apoptosis Detection Kit). Las sondas fluorescentes H2-DCF-DA (diacetato 2',7'-dicloro-dihidro-fluoresceína) y JC-1 (yoduro de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetil-benzimidazol-carbocianina) se obtuvieron de Molecular Probes (Invitrogen Corporation Carlsbad, CA). Los inhibidores de caspasas: z-VAD-fmk (benziloxycarbonil-Val-Ala-Asp (OME)-fluoro metil cetona), z-DEVD-fmk (benziloxycarbonil-Asp-Glu-Val-Asp-(OME) fluorometil cetona), z-LEHD-fmk (benziloxycarbonil-Leu-Glu-His-Asp-(OME) fluorometil cetona), z-IETD-fmk (benziloxycarbonil-Val-Asp-Val-Ala-Asp-(OME) fluorometil cetona), fueron obtenidos de Sigma, mientras que los inhibidores z-YVAD-fmk (benziloxycarbonil-Tyr-Val-Ala-Asp-(OME) fluorometil cetona) y z-VEID-fmk (benziloxycarbonil-Val-Glu-Ile-Asp-(OME) fluorometil cetona), fueron obtenidos de Calbiochem. Trolox, N-acetil-L-cisteína (NAC), Antimicina A, Rotenone, catalasa (CAT) y superóxido dismutasa (SOD), ditioneitol (DTT), y el resto de inhibidores fueron obtenidos de Sigma Chemical Co. Los sustratos colorimétricos DEVD-pNA, ZETD-pNA y LEHD-pNA utilizados para determinar la actividad caspasa fueron obtenidos de Sigma Chemical Co. La acrilamida (bis N,N'-metilen-bis-acrilamida), persulfato amónico, TEMED (N,N,N,N,-tetrametil-etilendiamina), SDS (dodecil sulfato sódico) y los marcadores de pesos moleculares se obtuvieron de Bio-Rad. El azul de bromofenol, el BSA (albúmina de suero bovino) y el β-mercaptoetanol fueron de Sigma. Las membranas (PVDF) y el sustrato de revelado por quimioluminiscencia se obtuvo de Millipore (Billerica, MA, USA). Las placas para autorradiografía se adquirieron de Kodak. Los anticuerpos anti PARP, caspasa-3, caspasa-6, caspasa-7, caspasa-8, caspasa-9, caspasa-2, citocromo c, Bcl-2, Bax, Bid y β-actina se obtuvieron de Beckton Dickinson. El agua desionizada y bidestilada se obtuvo con un equipo Milli-Q (Water Purification System, Millipore Ibérica, Madrid, España). El dimetilsulfóxido (DMSO), EDTA, EGTA, NaCl, glicerol, tris base, MTT (bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio), la sacarosa, tween 20, hidróxido de sodio y ácido clorhídrico se adquirieron de Sigma Chemical Co.

El resto de reactivos utilizados se obtuvieron de Sigma Chemical Co.

Cultivo celular

Para este trabajo el modelo experimental elegido fue la línea celular de leucemia humana Molt-3, las cuales se obtuvieron de la colección europea de cultivos celulares (European Collection of Cell Cultures, ECACC) y se cultivaron en medio RPMI 1640 suplementado con un 10% (v/v) de suero bovino fetal (FBS) inactivado por calor y antibiótico (100 unidades/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomycin) en una atmósfera humidificada (37°C y 5% CO₂) y a una densidad no superior a 0,5 x 10⁶ células/ml [150,151]. A las células se les cambió el medio de cultivo tres veces por semana con una tasa de duplicación de 24 horas aproximadamente. Las células se contaron en un hematocitómetro y la viabilidad siempre fue superior al 95% utilizando el método de exclusión de azul de tripán.

Evaluación de la proliferación y viabilidad celular

Las células se cultivaron en placas de 96 pocillos por triplicado, a una densidad de 10⁴ células por pocillo en 0,2 ml de medio de cultivo y en presencia de diferentes concentraciones de melatonina durante los tiempos indicados en cada experimento. Una vez transcurrido el tiempo de experimentación, las placas se centrifugaron (500 g, 10 min) a temperatura ambiente y se les eliminó el medio de cultivo mediante aspiración. A cada pocillo se le añadió 100 µl de MTT (0,5 mg/ml en medio de cultivo con antibiótico pero sin suero) y las placas se incubaron durante 4 horas a 37°C. Una vez transcurrido dicho tiempo, se paró la reacción añadiendo 100 µl de SDS (20%) con HCl 0,02N e incubando la mezcla hasta la mañana siguiente. La cuantificación de la conversión del MTT (color amarillo) en su forma reducida (color púrpura) debido a la actividad de la enzima deshidrogenasa mitocondrial se determinó en un lector de microplacas (modelo 680 de Bio-Rad) a una longitud de onda de 570 nm, usando como blancos tres pocillos en los que no se cultivaron células y a los que se les añadió el medio con MTT. Esta técnica consiste en un ensayo de la reducción metabólica del bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio (MTT) debido a la actividad de la enzima deshidrogenasa mitocondrial [152]. Los datos se analizaron con el programa informático Prism 4.0 (GraphPad). Además, el número de células se determinó por el método de exclusión de azul-tripán (152).

Análisis del ciclo celular por citometría de flujo

Esta técnica cuantitativa está basada en la fluorescencia emitida por diferentes fluorocromos capaces de unirse al ADN (ioduro de propidio en este caso). Se puede detectar el porcentaje de células en cada fase del ciclo celular en función de su contenido en ADN. Las células en la fase G_1 forman el primer pico, en la fase S las células están sintetizando ADN y en la fase G_2/M las células presentan doble contenido en ADN que una célula normal y aparecerán como un segundo pico. Las células que contienen ADN hipodiploide (menor contenido en ADN que el contenido diploide de las células normales) son consideradas como células apoptóticas, y se localizan a la izquierda del pico G_1 constituyendo la fracción $SubG_1$ [150]. Una vez finalizados los correspondientes tratamientos, las células se lavaron con PBS frío y se fijaron durante al menos una hora en etanol al 70% a -20°C . A continuación se lavaron dos veces con PBS, se centrifugaron a 500 g durante 10 minutos y se incubaron con 1 ml de una mezcla de 100 $\mu\text{g/ml}$ de Rnasa A y 50 $\mu\text{g/ml}$ de ioduro de propidio en PBS durante 1 hora a 37°C en oscuridad. Una vez transcurrido el periodo de incubación, las muestras se analizaron en un citómetro de flujo Coulter Epics XL-MCL (Beckman Coulter), siendo estimuladas con una longitud de onda de 488 nm y detectándose la fluorescencia emitida por el complejo propidio-ADN a una longitud de onda de 617 nm mediante el detector FL3 (620 \pm 15nm) que incorpora el aparato. Se evaluaron 10^4 células en cada muestra. Los resultados se analizaron con el software EXPO 32 ADC SoftwareTM (Beckman Coulter) [153].

Determinación de la externalización de fosfatidilserina

La fosfatidilserina es un fosfolípido que normalmente se encuentra en la cara interna de la membrana plasmática y se transloca a la cara externa en los estadios tempranos del proceso de apoptosis. La proteína anexina V tiene afinidad por la fosfatidilserina en presencia de Ca^{2+} y permite detectar las células apoptóticas por citometría de flujo, previa incubación de las células con anexina V unida a un fluorocromo (FITC). De esta manera distinguimos: a) células viables, las cuales no unen anexina V al tener la membrana citoplasmática intacta y por este mismo motivo no permiten la entrada de ioduro de propidio (anexina V negativas / ioduro de propidio negativas); b) células en un estado de apoptosis temprana que permiten la unión de anexina V al tener parte de la fosfatidilserina translocada al espacio extracelular, pero sin embargo no permiten la entrada de ioduro de propidio puesto que la membrana citoplasmática no llega a ser permeable aún a dicho

compuesto (anexina V positivas / ioduro de propidio negativas); c) células en apoptosis tardía, las cuales unen anexina V e incorporan ioduro de propidio (anexina V positivas / ioduro de propidio positivas); d) células necróticas que unen anexina V e incorporan ioduro de propidio o solamente incorporan ioduro de propidio. Cuando las células en cultivo sufren apoptosis, al no ser fagocitadas alcanzan un estadio de necrosis secundaria al proceso apoptótico, por lo cual puede aumentar el número de células que dan positivo con ioduro de propidio. Las células (1×10^6 por muestra) una vez tratadas se lavaron con PBS frío y se resuspendieron en tampón 10 mM HEPES/NaOH (pH 7.4), conteniendo 140 mM NaCl, 2.5 mM CaCl_2 . Se transfirió 100 μl de la suspensión (10^5 células) a un tubo de cultivo de 5 ml, y se le añadió 5 μl de anexina V-FITC y 5 μl de ioduro de propidio. Se mezclaron suavemente las células y se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente (25°C) en oscuridad. Posteriormente se añadió 400 μl del tampón anterior a cada tubo y se analizó cada muestra por citometría de flujo.

Microscopía electrónica de transmisión (MET)

Para el procesado de muestras por microscopía electrónica de transmisión, las células se centrifugaron, se resuspendieron y se fijaron en glutaraldehído al 2,5% en tampón fosfato (0.1 M, pH 7,2) durante 24 horas. La postfijación se realizó en tetróxido de osmio (OsO_4) al 1% en tampón fosfato. Las células se deshidrataron utilizando concentraciones crecientes de etanol. El pellet se incluyó en una resina EMBED 812 que polimerizó a 70°C . Los cortes para el procesado de las muestras se realizaron con un ultramicrotomo Reichert Ultracut seica. Los cortes semifinos fueron teñidos con azul de touloidina, mientras que los ultrafinos fueron contrastados con acetato de uranilo y plomo. Las fotografías fueron tomadas en un microscopio electrónico de transmisión Zeiss EM 910 (Carl ZEISS, Germany) equipado con cámara digital Proscan Slow-scan CCD-Camera for TAM (Fa. Proscan Elektronische Systeme GmbH, Germany) y software Soft Imaging System (Germany) en el Servicio de Microscopía Electrónica de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.

Determinación de la actividad caspasa

Una vez las células fueron tratadas, se centrifugaron a 1.000 g durante 10 minutos a 4 °C, se lavaron con PBS y se incubaron en hielo. A continuación se resuspendieron en tampón de lisis [50 mM HEPES (pH 7,4), 1 mM de dithiothreitol, 0.1 mM EDTA, 0.1% CHAPS] y se dejaron 5 minutos en hielo. A continuación se centrifugaron durante 10 minutos a 16.000 g y 4 °C y posteriormente se determinó la concentración de proteínas en los sobrenadantes mediante el método de Bradford. Las muestras se almacenaron a -20 °C hasta que fueron usadas para el estudio de la actividad enzimática de las caspasas. Cantidades equivalente de proteínas (~ 20 µg) fueron utilizadas. El incremento de la absorbancia a 405 nm después de la incubación a 37 °C durante 1 hora fue indicativo de la actividad enzimática de las caspasas. Los sustratos colorimétricos utilizados en el ensayo para las actividades caspasa-3, caspasa-9 y caspasa-8 fueron DEVD-pNA, ZETD-pNA y LEHD-pNA respectivamente.

Inmunodetección de proteínas (western blot)

Después de los correspondientes tratamientos las células ($1-10 \times 10^6$) fueron recolectadas, centrifugadas (500 g, 10 minutos, 4 °C) y lavadas dos veces con PBS. En función de los objetivos experimentales las muestras se procesaron de diferente forma. Obtención de lisados celulares: el precipitado celular se resuspendió en 100 µl de tampón de lisis [Tris-HCl (pH 7,4), 2 mM EDTA, 137 mM NaCl, 10% glicerol, 1% Tritón X-100, 2 mM de pirofosfato de sodio, 20 mM de glicerofosfato de sodio, 10 mM de fluoruro sódico, 2 mM de ortovanadato sódico, 1 mM PMSF, 5 µg/ml leupeptina, 5 µg/ml pepstatina A, 5 µg/ml aprotinina] y se incubó durante 15 minutos a 4°C. Los lisados se sonicaron (cuatro ciclos de 5 segundos) y se centrifugaron a 11.000 g durante 10 minutos a 4 °C. El sobrenadante se guardó a -20 °C hasta su utilización [150,152]. Obtención de fracciones subcelulares: el precipitado celular se resuspendió en 100 µl de tampón de homogeneización [20 mM HEPES-KOH (pH 7,5), 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 250 mM sacarosa] con inhibidores de proteasas (0.1 mM PMSF, 10 µg/ml leupeptina, 10 µg/ml aprotinina, 10 µg/ml pepstatina A), y se incubó durante 15 minutos a 4°C. Las células se lisaron usando una aguja de 21 G y el extracto resultante se centrifugó a 1.000 g durante 10 minutos a 4°C. El precipitado (fracción nuclear) se resuspendió en 100 µl de tampón de homogeneización y se sonicó 3 veces durante 10 segundos a 4°C. El sobrenadante resultante se centrifugó a 22.000 g durante 10 minutos a 4°C. El precipitado (fracción mitocondrial) se

resuspendió en 50 µl de tampón de homogeneización mientras que el sobrenadante fue utilizado como fracción citosólica. Las diferentes fracciones se congelaron a -20 °C hasta su utilización [150]. La concentración de proteínas se determinó por el método de Bradford, y todas las muestras se ajustaron a la misma concentración utilizando el tampón anterior. Los lisados celulares se hirvieron en tampón de electroforesis [50 mM Tris-HCl (pH 6,8), 15% sacarosa, 2 mM EDTA, 3% SDS, 5 mM β-mercaptoetanol y 0.01% azul de bromofenol] a 100 °C durante 10 minutos [150]. Las muestras se sometieron a electroforesis en un gel de poliacrilamida con porcentajes de la misma que van desde 7.5% hasta 15% dependiendo del peso molecular de la proteína a estudiar, conteniendo 0.1% SDS y se transfirieron a membranas de PVDF. Las membranas se bloquearon con leche desnatada al 10% en tampón TBST [20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 137 mM NaCl, 0.1 % Tween-20] durante 1 hora a temperatura ambiente, seguido de una incubación con el anticuerpo específico. Los anticuerpos utilizados en este estudio se diluyeron en TBST conteniendo 3% de leche desnatada y las membranas se incubaron en presencia del anticuerpo de interés con agitación suave a 4°C durante 24 horas. Para asegurar que se cargó la misma cantidad de proteína en todas las muestras se analizó la expresión de la proteína β-actina con su anticuerpo específico. Las membranas se lavaron con TBST tres veces durante 15 minutos cada vez y se incubaron con el anticuerpo secundario apropiado durante 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente las membranas se lavaron nuevamente con TBST en las mismas condiciones anteriores y la detección de las proteínas específicas se determinó por emisión de quimioluminiscencia utilizando un kit comercial y posterior exposición de las membranas sobre películas de autorradiografía. Las imágenes fueron capturadas con un escáner y analizadas con el programa Adobe Photoshop 7.0.

Determinación de la generación de especies reactivas de oxígeno intracelular.

La generación de especies reactivas de oxígeno intracelular (ROS) se midió fluorimétricamente usando la sonda diacetato 2',7'-dicloro-dihidro-fluoresceína (H₂-DCF-DA). Las células fueron expuestas a los tratamientos correspondientes y se incubaron con 8 µM de la sonda durante los últimos 30 minutos a 37°C en oscuridad. Inmediatamente después las muestras se analizaron mediante citometría de flujo con el equipo Coulter Epics XL-MCL (Beckman Coulter), excitando la sonda con un láser de argón a 488 nm y recogiendo la emisión fluorescente de la diclorofluoresceína (529 nm), con el detector FL1 (525 +/- 20 nm). La distinta intensidad de la emisión fluorescente indica la mayor o menor presencia de ROS en el interior de la célula. Los resultados se analizaron con el programa Flowing software 2.5 [154,155].

Determinación del potencial de la membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$)

Las células (1×10^6 por muestra) se incubaron con la sonda JC-1 (10 $\mu\text{g/ml}$) a 37°C en oscuridad durante los últimos 30 minutos antes del tratamiento, y se analizaron mediante citometría de flujo utilizando el canal FL1 (527 nm) para detectar la fluorescencia verde de los monómeros de la sonda y el canal FL2 (590 nm) para la fluorescencia roja de los agregados. La cuantificación de la despolarización mitocondrial ($\Delta\psi_m$) se obtuvo a partir de la representación gráfica de los datos recogidos por el detector FL1 frente a los recogidos por el detector FL2. La división de las gráficas en cuadrantes permite estimar el porcentaje de células con potencial de membrana intacto (cuadrantes superiores izquierdos) de aquellas que sufren despolarización mitocondrial (resto de cuadrantes). El ionóforo de protones carbonil cianuro m-clorofenil hidrazona (CCCP) se utilizó como control positivo de la disipación del potencial de membrana. La despolarización de la membrana mitocondrial inducida por CCCP (10 μM) se ve reflejada por un incremento del número de células que emiten mayor fluorescencia verde y menos roja respecto a las células control y que se sitúan en el cuadrante inferior derecho. Para el análisis se usó el citómetro Coulter Epics XL-MCL (Beckman Coulter).

Análisis mediante RT-PCR de la expresión génica de los receptores de melatonina

Para el estudio de la expresión génica de los receptores de melatonina a partir de 3×10^6 células se extrajo el ARN total usando el reactivo Trizol (Sigma) siguiendo las instrucciones del fabricante. A continuación se tomó 1 μg de ARN y se realizó la transcripción inversa del mismo durante 75 minutos a 42°C usando 5 unidades de AMV transcriptasa inversa en 20 μl de tampón de reacción que contenía 50 mM de KCl, 10 mM de Tris-HCl (pH 9), 0.1% de Tritón X-100, 5 mM de MgCl_2 , 1 mM dNTP, 0.5 μg de oligo (dT) 12-15 y 20 unidades de inhibidor de ribonucleasas RNasín. La reacción se paró calentando durante 5 minutos a 95°C y se añadió un volumen de agua tratada con dietil-pirocarbonato hasta llegar a los 80 μl . Se tomaron 10 μl de cada cDNA diluido y se completó hasta 25 μl con una mezcla que contenía 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 9), 0.1% Tritón X-100, 1.5 mM MgCl_2 , 0.2 mM dNTP, 0.7 unidades de Taq DNA polimerasa (Promega, Madison, WI, USA) y 15 pmoles de los respectivos pares de oligonucleótidos correspondientes a cada uno de los receptores. Las secuencias de las parejas de oligonucleótidos elegidos abarcan regiones que contienen al menos un intrón en los correspondientes genes. Las secuencias para el par de oligonucleótidos utilizados para amplificar los genes de los receptores MT1 y MT2 fueron: [5'-TCAACCGCTACTGCTACATC-3'] y [5'-TCATCAGTGGAGACGGTTTC-3'], que se

corresponden con las posiciones 400-419 y 1011-1031 respectivamente de la secuencia U14108 de GenBank, para generar un fragmento de PCR de 632 pb. [5'-TCATCGGCTCTGTCTTCAATA-3'] y [5'-ACTGGGTGCTGGCGGTCTGGA-3'], que se corresponden con las posiciones 383-402 y 592-611 respectivamente de la secuencia U25341 de GenBank para generar un fragmento de PCR de 229 pb. Como control interno se amplificó la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (G3PDH) con los oligonucleótidos [5'-TTCATTGACCTCAACTACAT-3'] y [5'-TCATTGACCTCAAC-TACAT-3'] que se corresponden con la posición 184-203 y 607-626 de la secuencia NM_002046 de GenBank respectivamente, generando un producto de PCR de 443 pb. Como control para la contaminación por DNA genómico de las preparaciones de RNA, la región amplificada contenía al menos un intrón. Las muestras fueron recubiertas con aceite mineral (50 µl) y las amplificaciones se realizaron durante 25 ciclos (G3PDH) o 30 ciclos (MT1 y MT2) usando una temperatura de desnaturalización de 94°C durante un minuto, una temperatura de hibridación de 58°C durante 1.5 minutos y una temperatura de extensión de 72°C durante 1.5 minutos. Las muestras se extrajeron con cloroformo y alícuotas de 10 µl se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa al 1.8% con tampón TAE [40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA (pH 8,0)]. El gel se tiñó con bromuro de etidio (0,5 µg/ml) y los productos de la reacción se visualizaron utilizando un transiluminador de luz ultravioleta.

Métodos estadísticos.

En todos los casos las determinaciones para cada grupo experimental se realizaron por triplicado o cuadruplicado y los valores representados se corresponden a datos de tres experimentos como mínimo (Media +/- S.E.M.). La comparación entre los distintos tratamientos se realizó por el método de la t de Student o análisis de la varianza, considerando significativos los valores de $P < 0,05$.

Resultados

Para determinar el efecto de la melatonina sobre el crecimiento de las células linfoides humanas Molt-3, las células se incubaron durante 72 horas en presencia de concentraciones crecientes de melatonina y se evaluó la capacidad de reducir el MTT. Como se muestra en la figura 9, un claro descenso en la reducción de MTT fue observado en presencia de concentraciones crecientes (0.01-1mM) de melatonina. De esta manera, la menor actividad mitocondrial, aproximadamente 25-30% sobre los valores de control, se observó en el grupo incubado con 1 mM de la indolamina. No se detectó un efecto de la melatonina sobre la capacidad de las células para reducir el MTT a concentraciones que están próximas a los niveles fisiológicos en sangre (en el rango nanomolar) en comparación con los controles. Por lo tanto, los experimentos posteriores fueron realizados con la concentración de melatonina que mostró mayor efecto sobre la supresión en el crecimiento celular.

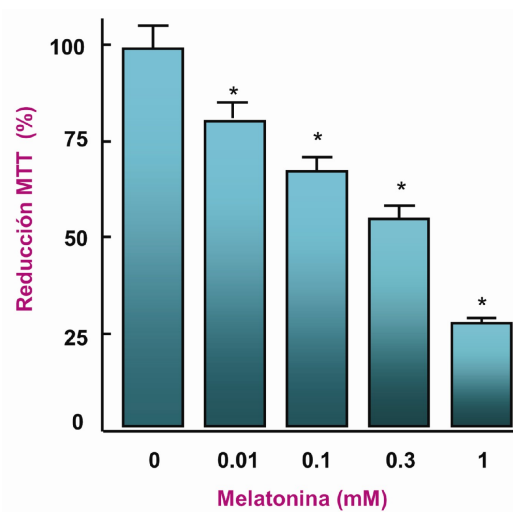


Figura 8. Efecto de la melatonina sobre la reducción del MTT en células Molt-3. Las células fueron tratadas con las concentraciones indicadas de melatonina durante 72 horas y la capacidad de las mismas para reducir el sustrato cromogénico MTT se determinó como se describe en material y métodos. * $P < 0,05$; diferencia significativa respecto al grupo control.

Como un descenso en la reducción del MTT puede indicar inhibición en la proliferación celular, incremento en la muerte celular o ambos procesos, también se evaluó el efecto de la melatonina sobre el número de células con el método de exclusión del azul de tripan. Como se muestra en la figura 9, el tratamiento con la indolamina disminuyó el número de células viables, efecto que fue más evidente con tiempos de incubación prolongados (48 – 72 horas). Teniendo en cuenta esos resultados, el ensayo de reducción de MTT se consideró un método apropiado para estudiar la inhibición de la proliferación celular en respuesta a la melatonina en este tipo de células.

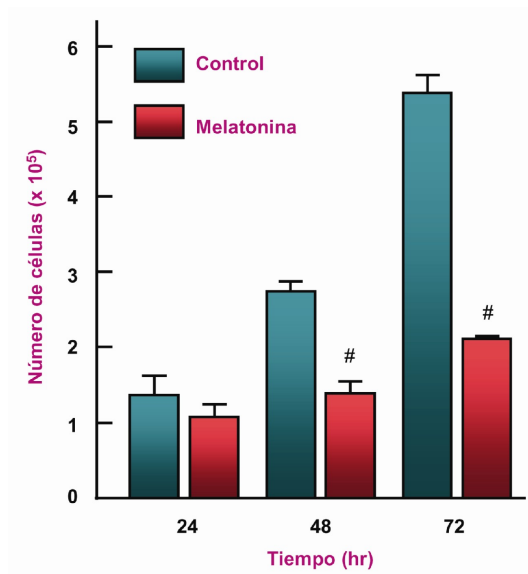


Figura 9. Efecto de la melatonina sobre el número de células Molt-3. Las Molt-3 se incubaron en ausencia (control) o presencia de 1 mM de melatonina durante los tiempos indicados. El número de células viables se determinó mediante el método de exclusión del azul de tripán. # $P < 0,05$; diferencia significativa respecto al grupo tratado con melatonina.

La melatonina ejerce propiedades antiproliferativas en diferentes tipos de células cancerosas mediante efectos tanto citotóxicos como citostáticos. La inducción de la muerte celular por apoptosis y la inducción de diferenciación celular han sido observados en diversos modelos celulares. Usando el colorante vital azul de tripan, hemos observado evidencias de citotoxicidad en las células Molt-3 ya que el porcentaje de células muertas (con color azul) fue mayor en el grupo tratado con melatonina en comparación con el grupo control (20% frente a 4%) en el intervalo de tiempo de 24-72 horas. Consistente con los resultados anteriores, al observar al microscopio de contraste de fase las células tratadas con melatonina a las 72 horas, fueron apreciados evidentes signos de daño celular. Una observación más detallada de las microfotografías revelaron un número significativamente menor de células en el grupo tratado con melatonina que en el grupo control (fig. 10), confirmando la acción antiproliferativa de la indolamina.

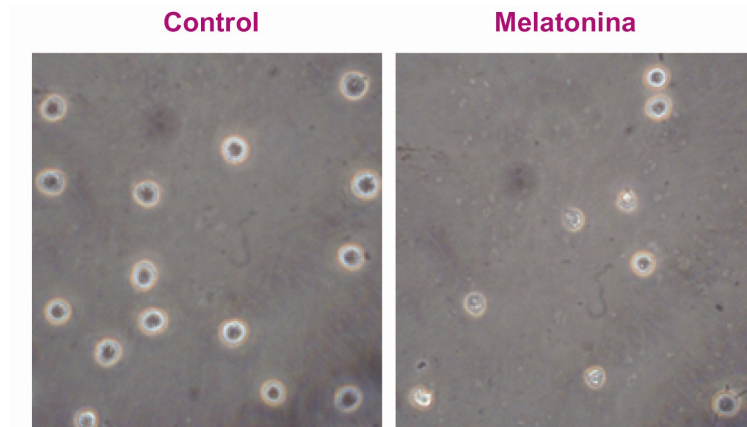


Figura 10. Las células Molt-3 se incubaron en ausencia (control) o presencia de 1 mM de melatonina durante 72 horas y se analizaron por microscopía de contraste de fase.

Globalmente, estos resultados sugieren que la reducción en el número de células Molt-3 se debe a una acción citotóxica de la melatonina más que a un posible efecto citostático.

La melatonina se une a los subtipos de receptores de membrana acoplados a proteína G sensibles a la toxina pertúsica MT1 y MT2, y su activación se ha demostrado que está involucrada en las propiedades antiproliferativas de esta indolamina en células de cáncer de colon humano (143), en cáncer de mama (144), en cáncer de próstata (145) y en melanoma (146). Por lo tanto, para comprobar si los receptores de membrana de melatonina se expresan en las células Molt-3, se empleó la técnica de RT-PCR usando parejas de oligonucleótidos específicos para los receptores MT1 y MT2 humanos y se analizaron las muestras mediante electroforesis en gel de agarosa. Como se muestra en la figura 11, los productos de PCR con los tamaños esperados para ambos receptores (632 pb para MT1 y 229 pb para MT2) fueron detectados.



Figura 11. Determinación de los subtipos de receptores de membrana para melatonina expresados en células Molt-3. Se extrajo el RNA y utilizando oligonucleótidos específicos para los receptores MT1 y MT2, alícuotas de cDNA se sometieron a RT-PCR. Las muestras se analizaron por electroforesis en gel de agarosa y tinción del DNA amplificado con bromuro de etidio.

Para examinar si el efecto inhibitorio de la melatonina sobre el crecimiento celular estaba mediado por los receptores MT1/MT2, las células se preincubaron en presencia de la toxina pertúsica (PTX, 50 ng/ml), un inhibidor de la subfamilia Gi de las proteínas G acopladas a receptor, o en presencia de dos antagonistas de receptores de melatonina, el luzindol (10 μ M) y el 4P-PDOT (0.1 μ M). Los resultados demuestran que ni la toxina pertúsica (Fig. 12A) ni los antagonistas de los receptores (Fig. 12B) fueron capaces de prevenir el efecto inhibitorio de la melatonina sobre la proliferación celular. Estos resultados sugieren que la disminución en la proliferación celular es independiente de los receptores de membrana acoplados a la proteína G.

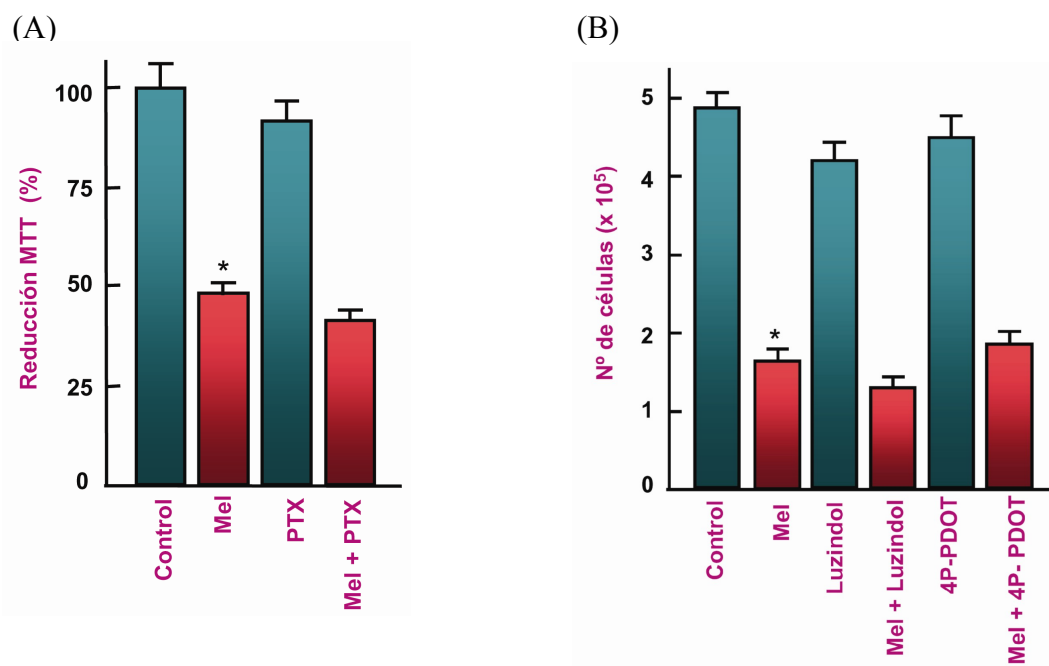


Figura 12. Evaluación del papel de los receptores de membrana en el efecto antiproliferativo de la melatonina en células Molt-3. (A) Las células fueron preincubadas en ausencia o presencia de PTX (50 ng/ml) durante 16 horas, y posteriormente se incubaron en presencia de melatonina (1 mM) durante 48 horas. La capacidad de las células de reducir el MTT como indicador de la actividad metabólica se determinó como se indica en material y métodos. (B) Las células se preincubaron en ausencia o presencia de luzindol (10 μ M) o 4P-PDOT (0,1 μ M) durante 48 horas. El número de células viables se determinó siguiendo el método de azul de tripan.

En los siguientes experimentos, evaluamos si la inhibición en el crecimiento mediada por la melatonina estaba asociada con la inducción de apoptosis. Para ello, las células Molt-3 fueron tratadas con 1 mM de melatonina durante diferentes tiempos (24, 48 y 72 horas) y se analizó el contenido en ADN hipodiploide, la externalización de fosfatidilserina y los cambios morfológicos ultraestructurales. Como se ve en la figura 13A, un claro incremento en el número de células hipodiploides (pico sub-G1) fue observado en el grupo tratado con melatonina mediante citometría de flujo. El porcentaje de células hipodiploides aumentó tres veces en el grupo tratado con melatonina en comparación con el grupo control (15% frente a 5%) a las 24 horas mientras que el incremento fue de unas seis veces (30% frente a 5%) en los tratamientos más prolongados (fig. 13B).

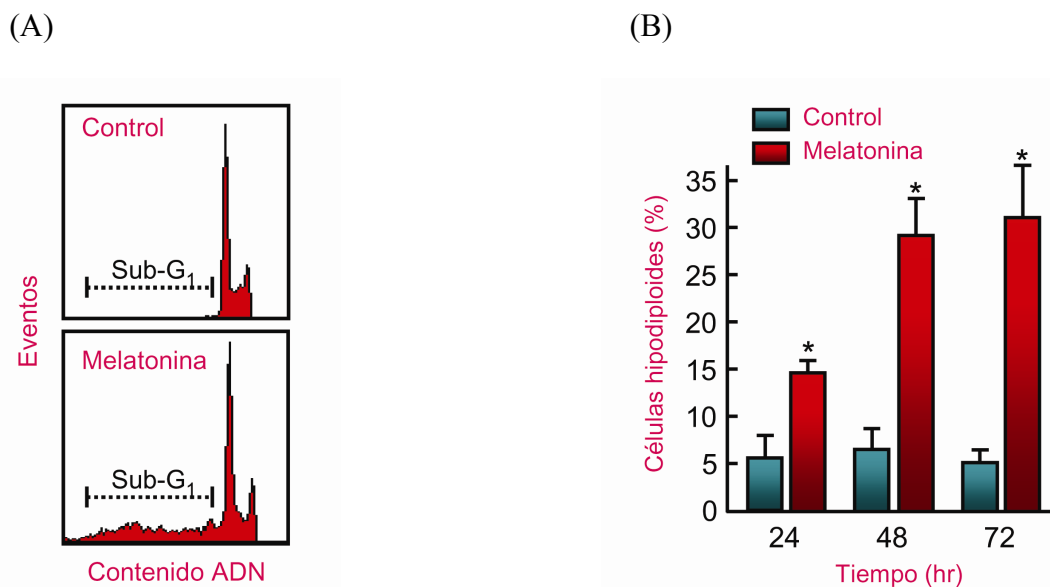


Figura 13. Efecto de la melatonina sobre el ciclo celular en células Molt-3. Las células se incubaron en ausencia (control) o presencia de melatonina (1 mM) durante 48 horas (A) o durante los tiempos indicados (B) y se analizan por citometría de flujo tal y como se detalla en material y métodos.

La externalización de la fosfatidilserina es un evento bioquímico temprano durante la activación de la apoptosis y el que aparezca este fosfolípido en la superficie celular prepara a las células que están muriéndose para ser digeridas y eliminadas por los fagocitos. Para determinar si la melatonina induce externalización de la fosfatidilserina, las células Molt-3 fueron incubadas en presencia de la indolamina durante 24 o 48 horas y analizadas posteriormente por citometría de flujo. La determinación del número de células positivas para anexina V (fig. 14), mostró que el porcentaje de células apoptóticas incrementó tres veces (10% en el grupo tratado con melatonina frente a 3.2% en el grupo control) y unas cinco veces (15.4% frente a 3.2%) después de un tratamiento durante 24 y 48 horas respectivamente. De esta manera, también se observó un incremento de unas 3 veces en el porcentaje de células positivas para anexina V e yoduro de propidio (células necróticas primarias o apoptóticas tardías / células necróticas secundarias) en el grupo tratado con melatonina (fig. 14). Además, también se visualizaron cambios ultraestructurales en las células mediante microscopía electrónica de transmisión como son la fragmentación nuclear y la condensación de la cromatina en respuesta al tratamiento con melatonina (fig. 15). Globalmente, estos resultados demuestran que la melatonina promueve mediante apoptosis la muerte de las células Molt-3.

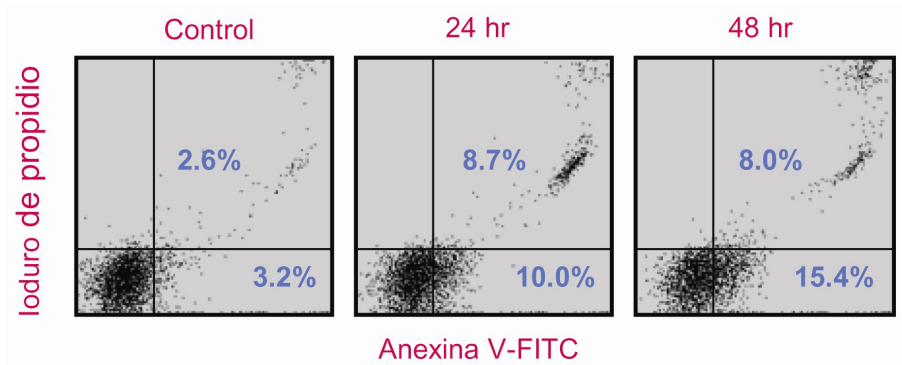


Figura 14. Efecto de la melatonina sobre la externalización de fosfatidilserina en células Molt-3. Las células se incubaron en ausencia (control) o presencia de melatonina (1 mM) durante los tiempos señalados, se lavaron con PBS y se analizaron por citometría de flujo en presencia de yoduro de propidio y anexina V-FITC, tal y como se describe en material y métodos.

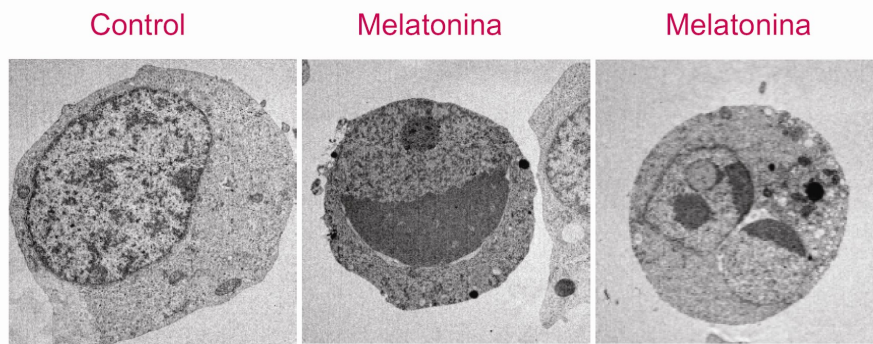


Figura 15. Las células Molt-3 se cultivaron en ausencia (control) o presencia de melatonina (1 mM) durante 48 horas y se analizaron por microscopía electrónica.

Uno de los más prominentes marcadores moleculares de apoptosis lo constituye la activación masiva de las caspasas, una clase específica de cisteín-proteasas que juegan un papel clave en la inducción de la apoptosis, tanto en células normales como en células tumorales, y que pueden ser activadas a través de dos rutas diferentes. La caspasa-8 es la principal iniciadora de la apoptosis en la vía extrínica mientras que la caspasa-9 juega un papel similar en la ruta intrínseca (también conocida como vía mitocondrial). Ambas caspasas activan a la caspasa-3, la principal proteasa ejecutora, la cual a continuación hidroliza a una variedad de sustratos y también puede activar a otras caspasas, desencadenando la apoptosis. Para determinar el papel de las caspasas en la citotoxicidad inducida por melatonina, las células se incubaron con 1 mM de la indolamina durante diferentes periodos de tiempo y los lisados celulares se ensayaron en presencia de los sustratos para

caspasa-3 (DEVD-pNA), caspasa-9 (LEHD-pNA) y caspasa-8 (IETD-pNA). Como se observa en la figura 16, la actividad de las caspasas -3 y -9 aumentó a las 6 horas en las células tratadas con melatonina, en comparación con sus respectivos controles, y la máxima actividad se alcanzó a las 12 horas de tratamiento para ambas (4,6 veces para la caspasa-3 y 2,4 veces para la caspasa-9). Se observó un ligero aumento de la actividad de la caspasa-8 (1,4 veces) a las 12 horas en las células tratadas con melatonina, similar al aumento observado cuando las células fueron tratadas durante tiempos más prolongados (24 ó 48 horas; 1,6 veces).

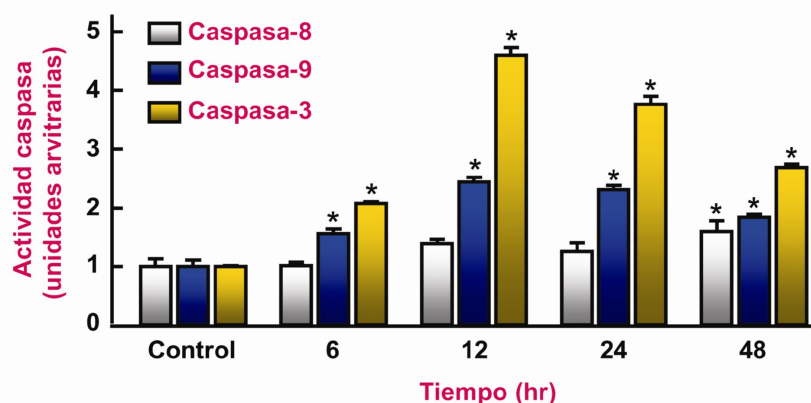


Figura 16. Efecto de la melatonina sobre la actividad caspasa en células Molt-3. Las células se incubaron en ausencia (control) o presencia de melatonina (1 mM) durante los tiempos indicados. Se obtuvieron las fracciones citosólicas y se evaluó la actividad caspasa de las mismas utilizando sustratos colorimétricos para caspasa-8 (IETD-pNA), caspasa-9 (LEHD-pNA) y caspasa-3 (DEVD-pNA). Las muestras se analizaron a 405 nm en un lector de microplacas. * $P < 0,05$; diferencia significativa respecto al grupo control.

El efecto de la melatonina sobre la activación de las caspasas también se evaluó mediante inmunoblot. En este estudio se incluyeron además caspasa-2, caspasa-6 y caspasa-7. La especificidad de la actividad proteasa de caspasa-2, caspasa-3 y caspasa-7 se solapan en gran medida, con una secuencia consenso de hidrólisis DEVD↓G; de esta manera, el péptido sustrato DEVD-pNA puede ser hidrolizado tanto por la caspasa-3 como por la caspasa-7 y probablemente por la caspasa-2. Además de la caspasa-3 y la caspasa-7, la caspasa-6 también puede desempeñar un papel como caspasa ejecutora como se ha descrito en algunos modelos celulares. Como se ve en la figura 17, un descenso en los niveles de pro-caspasa-3, pro-caspasa-7 y pro-caspasa-6 (indicativo de su activación) se observó a las 3 horas de tratamiento con melatonina, mientras que la reducción de la pro-caspasa-2 (y el subsiguiente incremento en el fragmento de 30 kDa) requirió un mayor periodo de incubación (48 horas). De acuerdo con los resultados anteriores, el incremento en la

actividad de la caspasa-3 también está asociado con cambios bioquímicos tempranos ya que la hidrólisis e inactivación de su substrato específico poli(ADP)ribosa-polimerasa (PARP), una enzima nuclear de 116 kDa normalmente involucrada en la reparación y estabilidad del ADN y otros eventos celulares, ya fue detectada a las 3 horas de tratamiento. La activación de la caspasa-3 y la digestión en paralelo de PARP para dar un fragmento de 85 kDa fue dependiente del tiempo de tratamiento con melatonina. Sin embargo, no se observaron cambios en la expresión de la pro-caspasa-8 por inmunoblot a ninguno de los tiempos evaluados, lo cual está en consonancia con los resultados de la figura 16. En cambio, la activación de la caspasa-9 también fue detectada de manera temprana (3 horas), como se pone de manifiesto por la aparición del fragmento proteolítico de 35 kDa. En conjunto, estos resultados sugieren un papel principal de la vía intrínseca en la activación de la apoptosis inducida por melatonina en las células Molt-3.

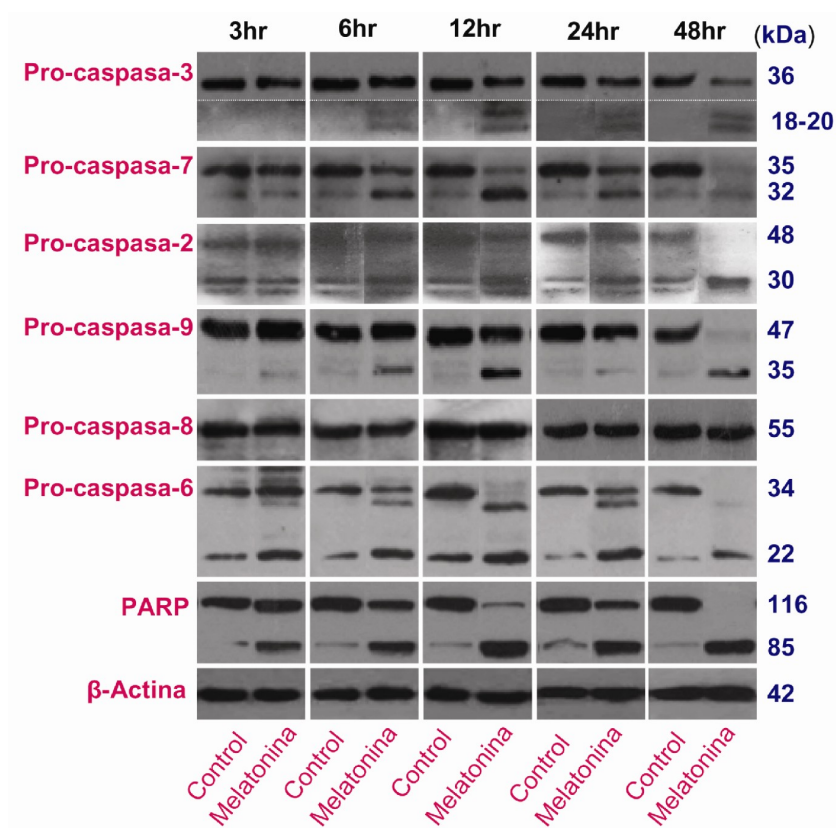


Figura 17. Análisis de la expresión de las caspasas en células Molt-3 tratadas con melatonina. Las células se incubaron en ausencia (control) o presencia de melatonina (1 mM) durante los tiempos indicados en la figura, se sonicaron y cantidades equivalentes de proteínas se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS. Las proteínas se transfirieron a membranas de PVDF y la presencia de las caspasas se determinó por inmunodetección. La β -actina se determinó para confirmar que se cargó la misma cantidad de proteínas en cada canal.

La liberación del citocromo c mitocondrial al citosol es un evento central en la señalización de la apoptosis. Para determinar si en la activación de la caspasa-9 está involucrado el citocromo c, las

células fueron incubadas con melatonina durante diferente periodos de tiempo y los extractos citosólicos fueron analizados por inmunoblot. Como se observa en la figura 18, el citocromo c no fue visible en la fracción citosólica de los grupos control, al contrario de lo que ocurrió con los grupos tratados con melatonina; la liberación de citocromo c fue dependiente del tiempo de tratamiento, detectándose a las 3 horas de tratamiento. Como la ruta intrínseca está controlada por la familia de Bcl-2, también se evaluó la expresión de las proteínas Bax, Bcl-2 y Bcl-X_L por inmunoblot. Como se ve en la figura 18, la indolamina también estimuló la expresión del factor proapoptótico Bax a medida que aumentaba el tiempo de exposición, observándose los mayores niveles de esta proteína a las 6 horas de tratamiento, coincidiendo con la máxima liberación de citocromo c al citosol. En cambio, la expresión de las proteínas antiapoptóticas Bcl-2 y Bcl-X_L no se vió afectada con el tratamiento. Es conocido que Bax puede jugar un papel crucial en el proceso apoptótico a través de diferentes mecanismos. Por ejemplo, Bcl-2 o Bcl-X_L contrarrestan los efectos de Bax formando heterodímeros con él. Estudios previos han mostrado que la relación entre las familias proapoptótica y antiapoptótica de Bcl-2 juega un papel crucial en la determinación de la susceptibilidad de las células al estímulo apoptótico. Además, un fragmento de 18 kDa generado de la hidrólisis de Bax (21 kDa) también fue detectado a las 12 horas de tratamiento con melatonina, el cual aumentó con el tiempo de incubación.

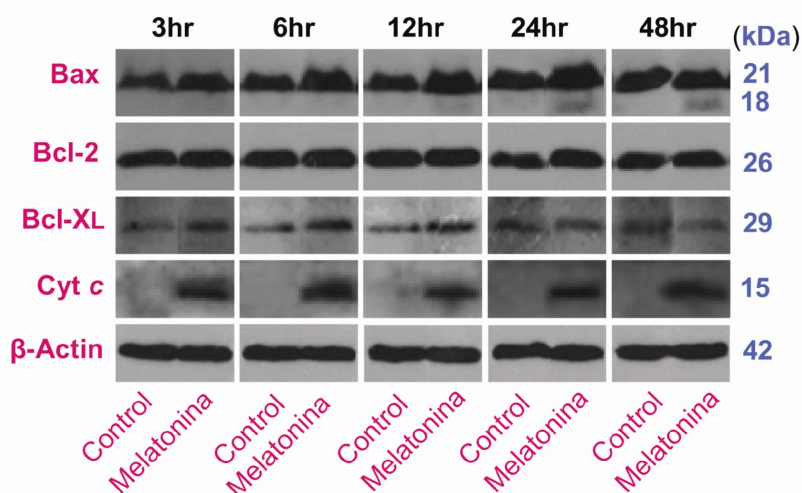


Figura 18. Efecto de la melatonina sobre la expresión de algunos miembros de la familia de Bcl-2 y sobre la liberación del citocromo c al citosol. Las células fueron incubadas en presencia de melatonina (1 mM) a diferentes tiempos y los lisados celulares (para analizar Bax, Bcl-2 y Bcl-X_L) o extractos citosólicos (para determinar citocromo c) se analizaron mediante western blot tal y como se describe en material y métodos. La β -actina se determinó para confirmar que se cargó la misma cantidad de proteínas en cada canal.

Para determinar si la liberación de citocromo c está asociado con una perturbación en el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$), las células fueron tratadas con melatonina durante 3, 6, 12 y 24

horas y analizadas por citometría de flujo en presencia del fluoróforo JC-1. Los resultados indican que el $\Delta\psi_m$ no disminuyó en el periodo de tiempo investigado, lo cual sugiere que la disrupción del potencial de membrana mitocondrial no está involucrado en la apoptosis inducida por melatonina (fig. 19). Incluso, en algunos experimentos la melatonina causó un ligero incremento en la fluorescencia derivada de JC-1. En este estudio el protonóforo CCCP (10 μ M), el cual se sabe que promueve la disipación del $\Delta\psi_m$, se usó como control positivo.

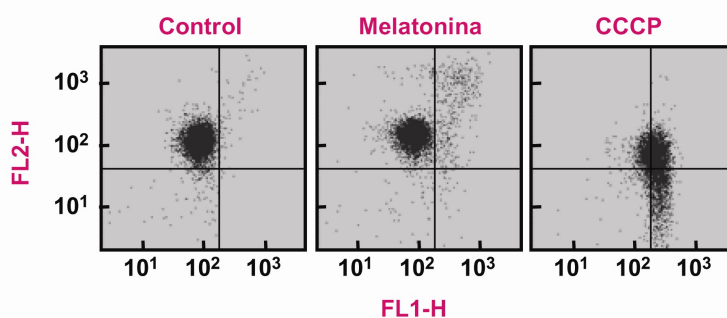
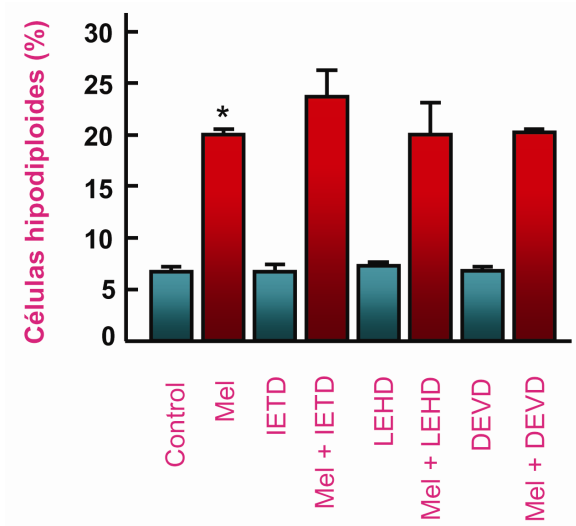


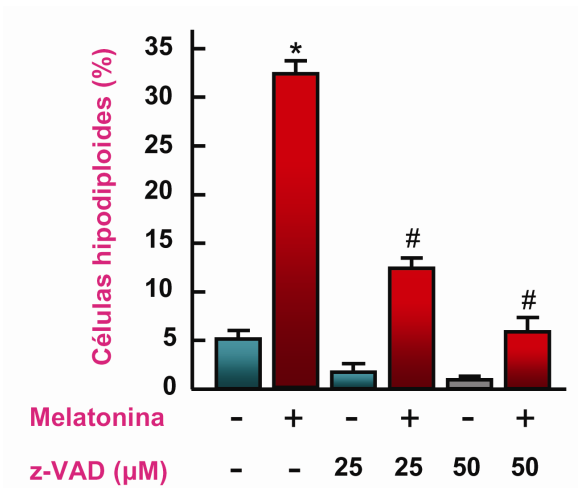
Figura 19. Efecto de la melatonina sobre el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) en células Molt-3. Las células se incubaron en ausencia (control) o presencia de melatonina (1 mM) durante 24 horas, y se analizaron por citometría de flujo utilizando la sonda fluorescente JC-1 como se detalla en material y métodos. El protonóforo CCCP se utilizó como control positivo en la disipación del potencial de la membrana mitocondrial.

Para identificar qué caspasas son importantes en la mediación del efecto citotóxico de la melatonina, las células fueron preincubadas en presencia de inhibidores específicos para las mismas y se determinó el número de células hipodiploides por citometría de flujo. El estudio incluyó a los inhibidores de caspasas z-IETD-fmk (inhibidor de caspasa-8), z-LEHD-fmk (inhibidor de caspasa-9) y z-DEVD-fmk (inhibidor de caspasa-3/7). Como se muestra en la figura 20A, ninguno de los inhibidores usados fue capaz de reducir la apoptosis inducida por melatonina. Sin embargo, cuando las células fueron preincubadas en las mismas condiciones pero esta vez con el inhibidor de caspasas de amplio espectro z-VAD-fmk, el número de células hipodiploides se vió reducido en función de la concentración de inhibidor empleada (fig. 20B). De hecho, la muerte celular por apoptosis (fig. 20B) y la hidrólisis de PARP (fig. 20C), fueron suprimidas completamente con la concentración mayor de dicho inhibidor (50 μ M).

(A)



(B)



(C)



Figura 20. Efecto de los inhibidores de las caspasas sobre la muerte celular por apoptosis inducida por melatonina. (A) Las células Molt-3 fueron pretratadas con 50 μM de los inhibidores específicos de caspasa-8, caspasa-3/7 o caspasa-9 (z-IETD-fmk, z-DEVD-fmk y z-LEHD-fmk, respectivamente) durante dos horas y a continuación se incubaron en ausencia o presencia de melatonina (1mM) durante 48 horas y se determinó el número de células hipodiploides tal y como se describe en material y métodos. (B) Las células se preincubaron con las concentraciones indicadas del inhibidor de caspasa de amplio espectro (z-VAD) durante dos horas y posteriormente se incubaron en ausencia o presencia de melatonina (1mM) durante 48 horas y a continuación se determinó el número de células hipodiploides. (C) Las células Molt-3 fueron preincubadas con el inhibidor de caspasa de amplio espectro (z-VAD 50 μM) durante 2 horas, tratadas con melatonina (1 mM) durante 24 horas y los lisados celulares fueron analizados para evaluar la hidrólisis de PARP por inmunoblot tal y como se describe en material y métodos. * P< 0,05; diferencia significativa respecto al control. # P<0,05; diferencia significativa respecto al tratamiento con melatonina.

Para determinar si la reducción en el número de células apoptóticas por z-VAD-fmk está correlacionada con un incremento en el número de células viables, las células fueron pretratadas con el inhibidor y a continuación incubadas con melatonina. Inesperadamente, se encontró que z-VAD-fmk fue incapaz de atenuar la muerte celular inducida por melatonina, determinado por el método de exclusión del azul tripan (fig. 21). Las concentraciones de z-VAD-fmk usadas no fueron citotóxicas.

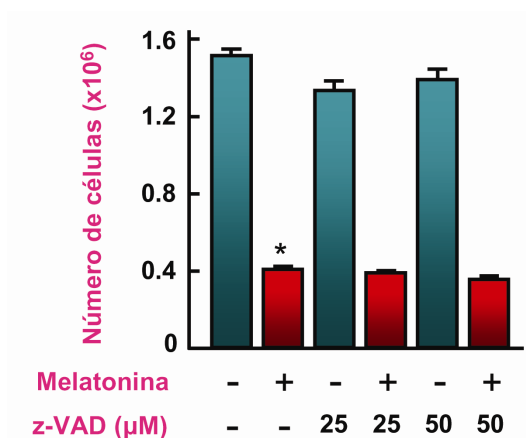


Figura 21. Estudio del efecto del inhibidor general de caspasas z-VAD-fmk sobre la viabilidad de células Molt-3 tratadas con melatonina (1 mM). Las células fueron pretratadas durante 2 horas con las concentraciones especificadas del inhibidor de caspasa de amplio espectro z-VAD-fmk y a continuación se incubaron con melatonina (1mM) durante 48 horas. El número de células se determinó mediante el método de exclusión de azul de tripan tal y como se describe en material y métodos. * P< 0,05; diferencia significativa respecto al control.

Para clarificar el efecto del inhibidor general de caspasas, las células fueron incubadas con melatonina durante 24 horas en ausencia o presencia de z-VAD-fmk, teñidas con anexina V-FITC y con ioduro de propidio, y analizadas por citometría de flujo. Como se muestra en la figura 22, el porcentaje de células positivas para anexina V y negativas para ioduro de propidio (células apoptóticas tempranas) incrementó cuatro veces en las células tratadas con melatonina en comparación con las células no tratadas (9.1% frente a 2.3%, respectivamente). Sin embargo, las células tratadas con melatonina que previamente se preincubaron con z-VAD-fmk presentaron unos valores para anexina V positivas e ioduro de propidio negativas cercanos a los niveles de los grupo control (3.8% frente a 2.3%, respectivamente) y el porcentaje de células positivas para anexina V y

positivas para para ioduro de propidio (células necroticas primarias o apoptóticas tardías / células necróticas secundarias) incrementó al doble (18.3% frente a 7.9%). Tomado en su conjunto, estos resultados indican que el inhibidor general de caspasas z-VAD-fmk reduce la muerte celular apoptótica inducida por melatonina (células anexina V positivas- ioduro de propidio negativas) y promueve la muerte celular por necrosis inducida por melatonina.

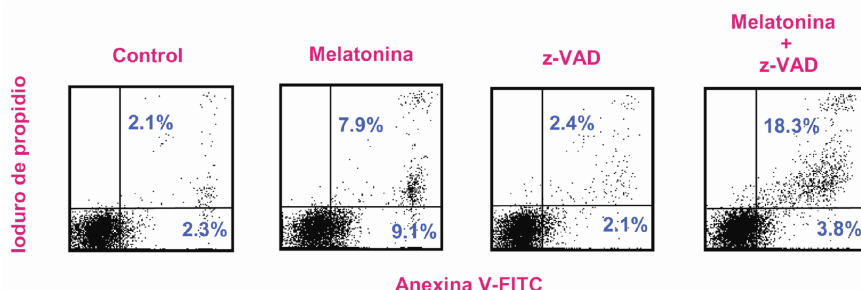


Figura 22. Estudio del efecto del inhibidor general de caspasas z-VAD-fmk sobre la apoptosis inducida por melatonina en células Molt-3. Las células fueron preincubadas con el inhibidor de caspasa de amplio espectro z-VAD-fmk 50 μ M durante 2 horas e incubadas posteriormente en presencia de melatonina (1 mM) durante 48 horas. Las células fueron analizadas por citometría de flujo después de ser teñidas con anexina V-FITC junto con ioduro de propidio, tal y como se describe en material y métodos.

La melatonina y sus metabolitos pueden actuar tanto como agentes neutralizantes de radicales como antioxidantes indirectos (147), y por lo tanto reducen el daño oxidativo. Los niveles de radicales tóxicos son normalmente mas elevados en células tumorales que en células normales y pueden actuar como segundos mensajeros promoviendo la proliferación celular. Aunque en un principio se pensó que la propiedad como neutralizador de radicales de la melatonina era la responsable de la inducción de la apoptosis en células tumorales, un creciente número de estudios indican que esta indolamina puede también estimular la producción de especies reactivas de oxígeno. Para determinar si la muerte celular está mediada por la modulación de ROS, las células Molt-3 se incubaron en presencia de melatonina durante diferentes periodos de tiempo y la acumulación intracelular de esas especies químicas se evaluó con la sonda fluorescente H₂-DCF-DA por citometría de flujo. Los resultados muestran que el tratamiento con melatonina induce la generación de ROS (fig. 23A), alcanzándose la máxima producción a los 30 minutos aproximadamente, 2.5 veces superior a los valores para el control (fig. 23B). Aunque los niveles de ROS disminuyeron con el tiempo de incubación (fig. 23B), estos permanecieron elevados sobre los niveles del control durante al menos 24 horas. La producción de ROS inducida por melatonina fue dependiente de la concentración utilizada (fig. 24), aunque concentraciones en el rango nanomolar y picomolar demostraron ser inefectivas.

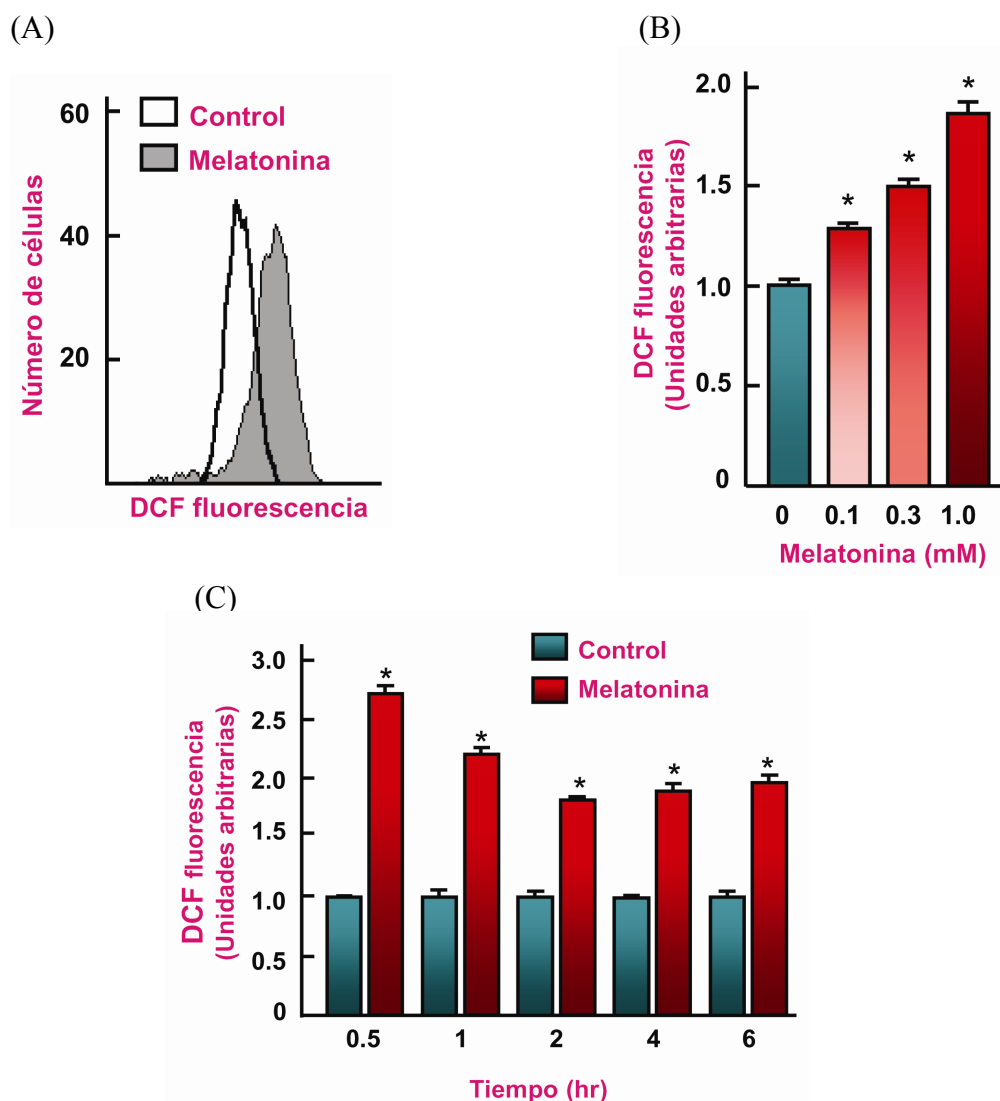


Figura 23. Efecto de la melatonina sobre la generación de ROS en células Molt-3. (A) Las células fueron tratadas con melatonina (1mM) durante una hora y la fluorescencia de la sonda H₂-DCF oxidada se determinó mediante citometría de flujo tal y como se describe en material y métodos (se muestra un histograma). (B) Las células fueron incubadas en presencia de las concentraciones indicadas de melatonina durante dos horas y se evaluó la fluorescencia de la sonda H₂-DCF oxidada por citometría de flujo. (C) Las células se incubaron con melatonina (1mM) durante los tiempos indicados y analizados tal y como se describe anteriormente; los niveles de ROS se determinaron de los histogramas resultantes. * P< 0,05; diferencia significativa respecto al control.

A continuación se determinó si la formación de ROS inducida por melatonina está mediada por la cadena de transporte de electrones mitocondrial y/o por la NADPH oxidasa, dos fuentes principales de ROS en las células. Para ello, las células fueron preincubadas durante 1 hora con los inhibidores de la cadena respiratoria rotenona (inhibidor del complejo II) y antimicina A (inhibidor del complejo III) o con los inhibidores de la NADPH oxidasa difenil yoduro (DPI) y apocinina. Como se muestra en la figura 24, la producción de ROS estimulada por melatonina se vió reducida por rotenona (2 μ M) y antimicina A (2 μ g/ml), y completamente inhibida por apocinina (300 μ M); sin embargo, el inhibidor específico de la NADPH oxidasa DPI (10 μ M) fue menos efectivo. Tomados en conjunto,

estos datos sugieren que la cadena de transporte de electrones mitocondrial y la NADPH oxidasa son las principales fuentes de producción de ROS en las células Molt-3 tratadas con melatonina.

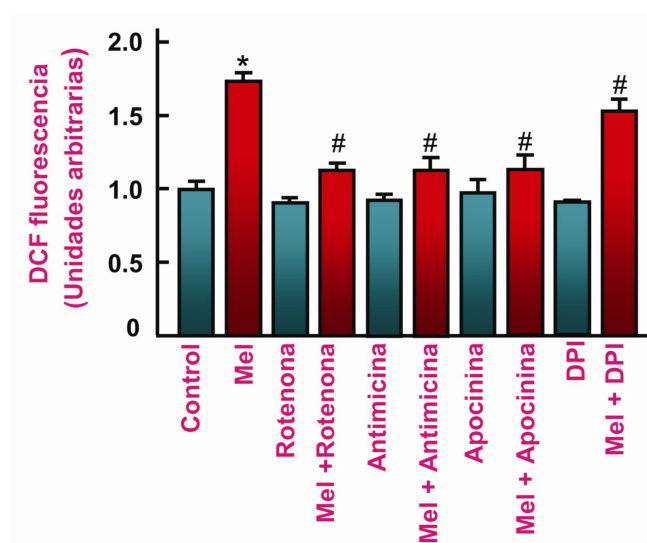
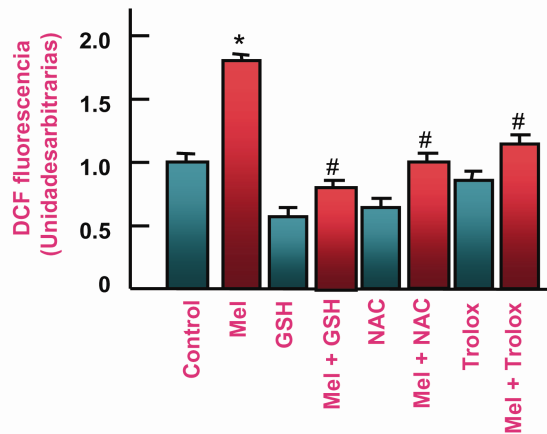


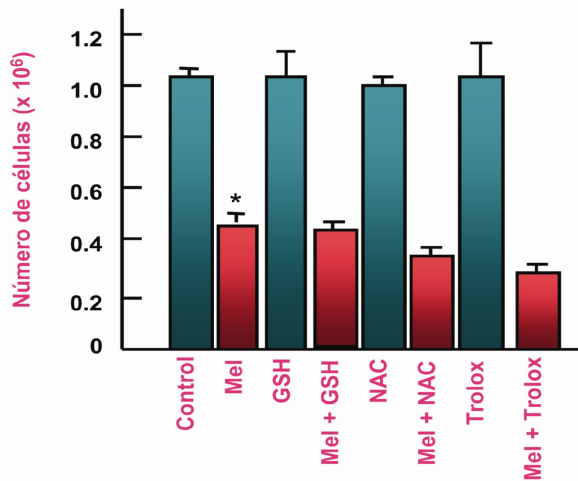
Figura 24. Efecto de los inhibidores de la cadena transportadora de electrones mitocondrial y del inhibidor de la NADPH oxidasa sobre la generación de ROS en respuesta a melatonina. Las células fueron preincubadas con rotenona (2 μ M), antimicina A (2 μ g/ml), apocinina (300 μ M) o difenil iodinio (10 μ M) durante dos horas y a continuación se incubaron con melatonina (1mM) durante dos horas, analizándose a continuación la producción de ROS tal y como se describe en material y métodos. * $P < 0,05$; diferencia significativa respecto al control. # $P < 0,05$; diferencia significativa respecto al tratamiento con melatonina.

Para clarificar si ROS juega un papel importante en la muerte celular, las células Molt-3 fueron preincubadas durante 1 hora con diversos antioxidantes como el glutatión (GSH, 5 mM), la N-acetil-L-cisteína (NAC, 10 mM) o el análogo hidrosoluble de la vitamina E trolox (300 μ M) y tratados a continuación con melatonina durante 48 horas. Como se muestra en la figura 25, los antioxidantes disminuyeron la formación intracelular de ROS inducida por melatonina, sin embargo, todos ellos fueron incapaces de revertir la inhibición de la proliferación celular (fig. 26A) o la muerte celular por apoptosis (fig. 26B) provocada por la indolamina. Al contrario de otros estudios en los que se ha demostrado que las especies reactivas de oxígeno están involucradas como mediadores en la citotoxicidad inducida por melatonina (148,149), nuestros resultados sugieren que la melatonina reduce la proliferación celular e induce apoptosis en las células Molt-3 a través de un mecanismo que es independiente de la generación de ROS.

(A)



(B)



(C)

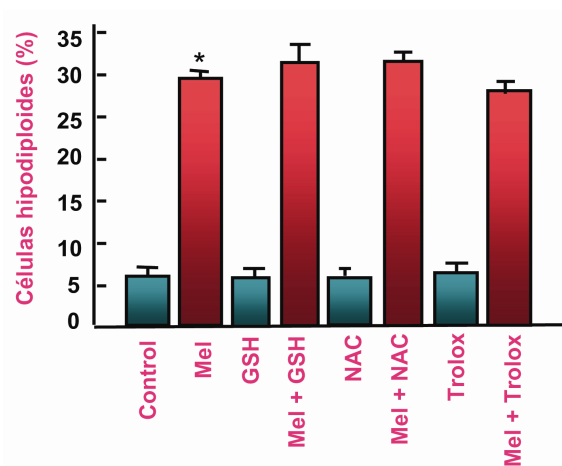


Figura 25. Los antioxidantes reducen los niveles de especies reactivas del oxígeno inducido por melatonina en células Molt-3. (A) Las células fueron preincubadas con L-glutation (GSH, 5 mM), N-acetil-L-cisteina (NAC, 10 mM) o trolox (300 μ M) durante dos horas y a continuación tratadas con melatonina durante dos horas. La generación de ROS se determinó por citometría de flujo tal y como se describe en material y métodos.* $P < 0,05$; diferencia significativa respecto al control. # $P < 0,05$; diferencia significativa respecto al tratamiento con melatonina. (B) Las células fueron preincubadas con L-glutation (GSH, 5 mM), N-acetil-L-cisteina (NAC, 10 mM) o trolox (300 μ M) durante dos horas y a continuación tratadas con melatonina durante 48 horas. El número de células viables fue evaluado por el método de exclusión del azul de tripán, tal y como se describe en material y métodos. (C) Las células fueron preincubadas con L-glutation (GSH, 5 mM), N-acetil-L-cisteina (NAC, 10 mM) o Trolox (300 μ M) durante dos horas y a continuación tratadas con melatonina durante 48 horas. El porcentaje de células hipodiploides se obtuvo mediante citometría de flujo tras ser teñidas con yoduro de propidio, tal y como se describe en material y métodos. * $P < 0,05$; diferencia significativa respecto al control.

Discusión

La melatonina posee un amplio espectro de actividades biológicas, entre las que se encuentran las propiedades antitumorales. El objetivo del presente estudio fue investigar el efecto de la melatonina sobre las células de leucemia humana Molt-3, una línea celular linfóide maligna que es especialmente sensible a la acción citotóxica de compuestos naturales y que mantiene funcionales tanto la ruta apoptótica intrínseca como la extrínseca (150). En este trabajo se demuestra que el tratamiento con melatonina reduce la proliferación celular de las células Molt-3. Como la mayoría de los estudios realizados en células cancerígenas, los efectos antiproliferativos de la melatonina se observaron con concentraciones elevadas ($>10 \mu\text{M}$) en comparación con las encontradas en la circulación sanguínea durante la noche ($\sim 0,1 \text{ nM}$). Sin embargo, existen evidencias de que la concentración intracelular de melatonina puede ser varios órdenes de magnitud superior a la existente en la circulación sanguínea (151).

La melatonina posee receptores de membrana (MT1 y MT2) acoplados a las proteínas G sensibles a la toxina pertúsica, los cuales se expresan tanto juntos como por separado (152) y que han demostrado estar involucrados en la inhibición de la proliferación en de las células cancerosas (153-157). Los experimentos de RT-PCR demostraron la existencia de transcritos para ambos subtipos de receptores, aunque los niveles del receptor MT1 fueron significativamente superiores que los de MT2; además, el tratamiento con melatonina aumentó la expresión de los mismos, lo cual sugiere un acoplamiento funcional del complejo melatonina-receptor.

Mientras las concentraciones de melatonina próximas a la K_d para los receptores de melatonina (en el rango nanomolar) no tuvieron un efecto significativo sobre la proliferación de las células Molt-3, se realizaron experimentos para clarificar la posible participación de los receptores de membrana en el efecto antiproliferativo de las altas concentraciones de melatonina en esta línea celular. Tales experimentos incluyeron el cotratamiento con la indolamina y la toxina pertúsica además de dos antagonistas bien caracterizados de los receptores de membrana, el luzindol y el 4-P-PDOT. Los resultados sugieren que la unión a sus receptores de membrana no está implicada en la inhibición de la proliferación en células Molt-3, al contrario de lo descrito en otras líneas celulares humanas de próstata (158), de colon (159) o de células linfoides (160-162).

Numerosos estudios avalan que la melatonina reduce la proliferación de las células cancerosas a través de mecanismos que inducen la diferenciación (163) o la muerte celular por apoptosis (164). En el presente estudio se muestra que la melatonina despliega propiedades antiproliferativas en la línea celular de leucemia humana Molt-3, efecto que está asociado con alteraciones en la progresión del ciclo celular. Una significativa acumulación en el número de células en la fase G1, a expensas

de la fase S y la G2-M, fue observada a las 12 horas de tratamiento con melatonina, seguido de un incremento en el número de células hipodiploides en comparación con las células control. Los efectos proapoptóticos de la melatonina sobre las células Molt-3 fueron confirmados posteriormente mediante análisis por citometría de flujo de células marcadas doblemente con anexina V-FITC y con yoduro de propidio, y también por microscopia electrónica de transmisión. Esta forma de muerte celular puede ocurrir con o sin la activación de las caspasas, una familia de cisteína proteasas que juegan un papel crítico en la apoptosis o en la activación proteolítica de citoquinas en los mamíferos. Así, la utilización de esos mecanismos es dependiente del tipo de estímulo y del tipo celular.

Se conocen dos vías apoptóticas bien caracterizadas en las células de mamíferos, denominadas como la ruta de los receptores de muerte (extrínseca, mediada por caspasa-8) y la ruta mitocondrial (intrínseca, mediada por caspasa-9). Ambas son consideradas como las responsables de si la mayoría, si no de todos los procesos apoptóticos dependientes de caspasas. Un ligero incremento en la actividad de la caspasa-8 se detectó a las 12 horas en las células Molt-3 tratadas con melatonina. Sin embargo, la hidrólisis de la procaspasa-8 fue difícilmente apreciable por inmunoblot y la generación de tBid (Bid truncado) a partir de Bid (21 kDa), un sustrato bien caracterizado de la caspasa-8, no fue observado. Estos resultados sugieren que la vía extrínseca no está involucrada en la iniciación del proceso apoptótico. En contraste, la melatonina indujo una temprana activación (3-6 horas) de las caspasas -3, -7, -6 y -9. La caspasa-3 es considerada como la principal caspasa ejecutora la cual reconoce e hidroliza un gran número de proteínas con diversas funciones. La hidrólisis de PARP, una proteína nuclear involucrada en la reparación del ADN, si es considerada como un marcador de la muerte celular por apoptosis y un sustrato de la caspasa-3, también fue observada tempranamente. Esto indica procesamiento de la caspasa-3 y activación posterior de la misma; así, la activación de la caspasa-3 parece que involucra a la vía apoptótica intrínseca ya que el procesamiento de la procaspasa-9 y el incremento en la actividad de la caspasa-9 también fue un evento temprano.

Los resultados claramente demuestran que la melatonina estimula el procesamiento proteolítico de otras caspasas ejecutoras como las caspasas -7 y -6 para dar lugar a sus formas activas. Estudios previos han demostrado que esas caspasas participan en la activación posterior de la caspasa-9, pero no son tan esenciales como la caspasa-3 (165). La activación de la caspasa-9 es un evento citosólico que normalmente requiere la presencia de citocromo c, una proteína que normalmente reside en el espacio intermembrana de la mitocondria. Por lo tanto, la mitocondria juega un papel principal en la

muerte celular cuando sus membranas se vuelven permeables. La permeabilización de la membrana externa mitocondrial está controlada por diferentes miembros de la familia Bcl-2, lo cual constituye un punto de control celular crítico en la vía intrínseca de la apoptosis (166). Los resultados en el presente estudio sugieren que la melatonina induce la permeabilización de la membrana externa mitocondrial, puesto de manifiesto por una redistribución del citocromo c en el citosol, apreciado desde las 3 horas de tratamiento. Para dilucidar los mecanismos moleculares involucrados en la liberación de citocromo c de la mitocondria, los niveles de los factores antiapoptóticos (Bcl-2 y Bcl-XL) y proapoptóticos (Bax) fueron analizados por inmunoblot en las células Molt-3. Interesantemente, la melatonina incrementó la expresión de Bax mientras que los niveles de Bcl-2 y Bcl-XL no sufrieron cambios. Así, el ratio de las moléculas anti y proapoptóticas constituye un regulador que establece el límite de susceptibilidad a la apoptosis para la vía intrínseca, la cual utiliza la mitocondria para amplificar la señal de muerte (167). Aunque la activación de Bax durante la apoptosis normalmente no requiere un incremento en la expresión de la proteína, se ha demostrado que varios agentes quimioterapéuticos elevan sus niveles mediante regulación transcripcional. Por ejemplo, todos los agentes quimioterapéuticos del grupo de las antraciclinas ejercen su efecto contra el cáncer a través del aumento de Bax (168). El incremento en la expresión de Bax en respuesta a la melatonina ha sido previamente demostrado en células de carcinoma pancreático humano (169), en células de leucemia HL-60 (170) y en células de hepatocarcinoma HepG2 (171), y aumenta la utilidad de la melatonina para promover la permeabilización mitocondrial en células cancerosas donde Bcl-2 está sobreexpresado, confiriéndoles resistencia a la quimioterapia (172). No obstante, está por dilucidar si el efecto de la melatonina sobre los niveles de Bax implica regulación transcripcional, un incremento en la vida media de la proteína o ambos factores. Es interesante señalar que la melatonina también indujo la hidrólisis de Bax para generar un fragmento de 18 kDa, del cual se sabe que muestra una capacidad mayor que la proteína completa para promover la permeabilidad de la membrana mitocondrial (173).

En este trabajo también se muestran evidencias de que la liberación de citocromo c en las células Molt-3 no está asociada con una disipación del potencial de membrana mitocondrial. A este respecto, estudios previos han demostrado que no son necesarios cambios en el $\Delta\Psi_m$ sobre la permeabilización de la membrana externa mitocondrial para una completa liberación de citocromo c (174). Este efecto tardío ocurre como consecuencia de la activación de Bax y/o Bak y la formación de poros en la membrana externa (175). Al contrario, en algunos experimentos realizados se ha observado un ligero incremento en la fluorescencia de JC-1 en las células tratadas con melatonina,

efecto que ha sido interpretado por algunos autores como un incremento en el $\Delta\Psi_m$ o en el volumen mitocondrial (176).

Para precisar el papel de las caspasas activadas por melatonina en las células Molt-3, se usaron inhibidores de caspasas tanto específicos como de amplio espectro. Los resultados indican que la muerte celular por apoptosis inducida por la melatonina depende de la activación de las caspasas ya que la apoptosis fue inhibida por el inhibidor general de caspasas z-VAD-fmk. En contraposición, los inhibidores específicos para caspasa-3/7, caspasa-8 o caspasa-9 fueron incapaces de bloquear la muerte celular, lo cual sugiere un incremento compensatorio en la activación de otras caspasas cuando la actividad de una caspasa particular es suprimida (177). Por ejemplo, z-DEVD-fmk es un inhibidor más potente para la caspasa-3 que para la caspasa-7 (178), por lo tanto en ausencia de actividad de caspasa-3 tanto la caspasa-7 como la caspasa-6 podrían incrementar su contribución (como caspasas ejecutoras) en la apoptosis inducida por melatonina. La mejor protección proporcionada por z-VAD-fmk frente a z-LEHD-fmk probablemente está causada por su mejor accesibilidad a la caspasa-9 (179). En este contexto, la caspasa-2 exhibe características tanto de una caspasa iniciadora como de una ejecutora (180) y la melatonina indujo el procesamiento del zimógeno a las 48 horas. Sin embargo, será necesario realizar más estudios para determinar si la hidrólisis de la caspasa-2 está asociada con un incremento de la actividad y también si está involucrada en la inducción de apoptosis por la melatonina. En este contexto, es interesante notar que la activación de las caspasas se observó desde las 3 horas y que la máxima actividad de la caspasa-3 se alcanzó a las 12 horas de tratamiento, pero se necesitó periodos de tratamiento mayores (48-72 horas) para alcanzar el mayor porcentaje de células apoptóticas.

Nuestros resultados también demuestran que la melatonina tiene la capacidad para activar una muerte celular independiente de caspasas. El pretratamiento de las células Molt-3 con el inhibidor general de caspasas z-VAD-fmk bloqueó la apoptosis inducida por melatonina, pero no atenuó la reducción en el número de células viables estimulada por la melatonina. De esta manera, estudios de citometría de flujo revelaron un incremento significativo en la población de células positivas para anexina V y para ioduro de propidio después del tratamiento con melatonina mas z-VAD-fmk, lo cual sugiere que la melatonina podría inducir una muerte celular regulada por necrosis (181). Existen evidencias de que la muerte celular independiente de caspasas podría estar iniciada por una cascada apoptótica (182,183), aunque los mediadores apoptóticos normalmente inhiben la ruta de muerte celular independiente de caspasas. Como la muerte celular por apoptosis no siempre constituye un objetivo terapéuticamente deseable (184), los compuestos que inducen una modalidad

alternativa de muerte celular como la melatonina podrían constituir una valiosa herramienta terapéutica.

La melatonina ha demostrado ser capaz de neutralizar eficientemente los radicales y de estimular las defensas antioxidantes en células normales, lo cual explica su papel protector en los tejidos. Paradójicamente también puede inducir la generación de especies reactivas de oxígeno, particularmente en células tumorales (185-187). Los resultados obtenidos en las células Molt-3 demuestran que la melatonina induce una persistente y aguda generación de ROS, probablemente a través de un mecanismo independiente de receptor ya que el efecto fue detectado solo con concentraciones suprafisiológicas. La rotenona y la antimicina A, dos inhibidores bien caracterizados de la cadena de transporte de electrones de la mitocondria, además de la apocinina y el DPI (en menor grado) como inhibidores de la NADPH oxidasa, redujeron la producción de ROS inducida por melatonina. En un estudio reciente, Zang y sus colaboradores (188) demostraron que la antimicina A, pero no la rotenona, bloqueó la producción de ROS estimulada por la melatonina en células de riñón humanas. En cambio, Radogna y colaboradores (189), observaron que la rotenona no disminuye la capacidad de la melatonina de generar ROS en células leucémicas humanas U937 y que la generación de ROS citosólico está mediada por la unión de la melatonina a la calmodulina; sin embargo, el papel del complejo III de la cadena transportadora de electrones mitocondrial (si lo hay) en la producción de ROS no se definió. A pesar del creciente número de referencias sobre la producción de ROS inducida por melatonina en células cancerígenas, los mecanismos que lo llevan a cabo no se conocen. La mayoría de los agentes inductores de apoptosis estimulan la producción de ROS, el cual se considera uno de los mediadores indispensables de la señalización apoptótica. También se ha demostrado por otros investigadores que la producción de ROS en células leucémicas puede llevar a la muerte celular mediante la activación de la proteína quinasa activada por mitógeno (186). Aunque la generación de ROS intracelular en las células Molt-3 se observó desde los 30 minutos de exposición con melatonina, diferentes antioxidantes fueron incapaces de evitar la muerte celular. Estos resultados indican que las especies reactivas de oxígeno no están involucradas en la apoptosis estimulada por melatonina, a diferencia del papel desempeñado por esas especies químicas en otras líneas celulares de leucemia (189-191). Parece claro que las especies reactivas del oxígeno son generadas a partir de diversas fuentes intracelulares en respuesta a la melatonina y que pueden desempeñar diferentes papeles dependiendo del tipo celular y del contexto celular. Si la rápida producción de ROS estimulada por la melatonina en las células Molt-3 ejerce algún efecto sobre el metabolismo celular está aún por dilucidar.

Conclusiones

En este estudio se demuestra que la melatonina induce apoptosis en la línea celular de leucemia humana Molt-3 mediante un mecanismo que es dependiente de caspasas pero independiente de ROS, involucrando la permeabilización de la membrana mitocondrial externa y la liberación de citocromo c. La inhibición de las caspasas reveló que la melatonina también activa de forma paralela una muerte celular independiente de caspasas. Ya que numerosos estudios hasta ahora han demostrado que la melatonina es segura en un rango de concentraciones muy amplio (191,192), la capacidad de la melatonina para inducir diferentes modalidades de muerte celular sugieren que esta podría ser útil en el tratamiento del cáncer individualmente o en combinación con otras conocidas moléculas quimioterapéuticas para mejorar la eficacia de agentes citotóxicos convencionales.

Bibliografía

- 1 Lerner, A.B., Case, J.D., Takahashi, Y., 1960. Isolation of melatonin and 5-methoxyindole-3-acetic acid from bovine pineal glands. *J. Biol. Chem.* 235, 1992–1997.
- 2 Redman, J., Armstrong, S., Ng, K.T., 1983. Free-running activity rhythms in the rat: Entrainment by melatonin. *Science* 219, 1089–1090
- 3 Armstrong, S.M., Cassone, V.M., Chesworth, M.J., Redman, J.R., Short, R.V., 1986. Synchronization of mammalian circadian rhythms by melatonin. *J. Neural Transm. Suppl.* 21, 375–394.
- 4 Arendt, J., 1986. Role of the pineal gland and melatonin in seasonal reproductive function in mammals. *Oxf. Rev. Reprod. Biol.* 8, 266–320.
- 5 Tamarkin, L., Westrom, W.K., Hamill, A.L., Goldman, B.D., 1976. Effect of melatonin on the reproductive systems of male and female Syrian hamsters: a diurnal rhythm in sensitivity to melatonin. *Endocrinology* 99, 1534–1541.
- 6 Tamarkin, L., Baird, C.J., Almeida, O.F., 1985. Melatonin: a coordinating signal for mammalian reproduction? *Science* 227, 714–720
- 7 Reiter, R.J., 1991. Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. *Endocr. Rev.* 12, 151–180
- 8 Reiter, R.J., 1993b. The melatonin rhythm: both a clock and a calendar. *Experientia* 49, 654–664.
- 9 Hardeland, R., Fuhrberg, B., 1996. Ubiquitous melatonin—Presence and effects in unicells, plants and animals. *Trends Comp. Biochem. Physiol.* 2, 25–45.
- 10 Hardeland, R., Poeggeler, B., 2003. Non-vertebrate melatonin. *J. Pineal Res.* 34, 233–241.
- 11 Hardeland, R., Poeggeler, B., 2007. Actions of melatonin, its structural and functional analogs in the central nervous system and the significance of metabolism. *Cent. Nerv. Syst. Agents Med. Chem* 7, 289–303.
- 12 Hardeland, R., Poeggeler, B., 2008. Melatonin beyond its classical functions. *Open Physiol. J.* 1, 1–23.
- 13 Lovenberg, W., Weissbach, H., Udenfriend, S., 1962. Aromatic L-amino acid decarboxylase. *J. Biol. Chem.* 237, 89–93.
- 14 Lovenberg, W., Jequier, E., Sjoerdsma, A., 1967. Tryptophan hydroxylation: measurement in pineal gland, brainstem, and carcinoid tumor. *Science* 155, 217–219.
- 15 Weissbach, A., 1960. A novel system for the incorporation of amino acids by extracts of *E. coli* B. *Biochim. Biophys. Acta* 41, 498–509.

16 Stehle, J.H., Saade, A., Rawashdeh, O., Ackermann, K., Jilg, A., Sebesteny, T., Maronde, E., 2011. A survey of molecular details in the human pineal gland in the light of phylogeny, structure, function and chronobiological diseases.

J. Pineal Res. 51,17–73.

17 Brydon, L., Roka, F., Petit, L., de Coppet, P., Tissot, M., Barrett, P., Morgan, P.J., Nanoff, C., Strosberg, A.D., Jockers, R., 1999. Dual signaling of human Mel1a melatonin receptors via G(i2), G(i3), and G(q/11) proteins.

Mol. Endocrinol. 13, 2025–2038

18 Liu, T., Borjigin, J., 2005. N-Acetyltransferase is not the rate-limiting enzyme of melatonin synthesis at night. *J. Pineal Res.* 39, 91–96.

19 Reiter, R.J., 1991c. Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. *Endocr. Rev.* 12, 151–180.

20 Slominski, A., Pisarchik, A., Semak, I., Sweatman, T., Wortsman, J., 2003. Characterization of the serotonergic system in the C57BL/6 mouse skin. *Eur. J. Biochem.* 270, 3335–3344.

21 Raikhlin, N.T., Kvetnoi, I.M., 1974. Biological identification of melatonin in enterochromaffin cells (in Russian). *Dokl. Akad. Nauk SSSR* 215, 731–732.

22 Kvetnoi, I.M., Raikhlin, N.T., Tolkachev, V.N., 1975. Chromatographic detection of melatonin (5-methoxy-N-acetyltryptamine) and its biological precursors in enterochromaffin cells (in Russian). *Dokl. Akad. Nauk SSSR* 221, 226–227.

23 Tan, D.-X., Manchester, L.C., Hardeland, R., Lopez-Burillo, S., Mayo, J.C., Sainz, R.M., Reiter, R.J., 2003. Melatonin: a hormone, a tissue factor, an autocoid, a paracoid, and an antioxidant vitamin. *J. Pineal Res.* 34, 75–78

23 Jimenez-Jorge, S., Guerrero, J.M., Jimenez-Caliani, A.J., Naranjo, M.C., Lardone, P.J., Carrillo-Vico, A., Osuna, C., Molinero, P., 2007. Evidence for melatonin synthesis in the rat brain during development. *J. Pineal Res.* 42, 240–246.

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

25 Hardeland, R., Poeggeler, B., 2008. Melatonin beyond its classical functions. *Open Physiol. J.* 1, 1–23.

26 Hardeland, R., Tan, D.-X., Reiter, R.J., 2009. Kynuramines, metabolites of melatonin and other indoles: the resurrection of an almost forgotten class of biogenic amines. *J. Pineal Res.* 47, 109–126.

- 27 Huether, G., Poeggeler, B., Reimer, A., George, A., 1992. 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.* 51, 945–953.
- 28 Huether, G., 1993. The contribution of extrapineal sites of melatonin synthesis to circulating melatonin levels in higher vertebrates. *Experientia* 49, 665–670.
- 29 Huether, G., 1994. Melatonin synthesis in the gastrointestinal tract and the impact of nutritional factors on circulating melatonin. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 719, 146–158.
- 30 Bubenik, G.A., 2002. Gastrointestinal melatonin: localization, function, and clinical relevance. *Dig. Dis. Sci.* 47, 2336–2348.
- 31 Pandi-Perumal, S.R., Srinivasan, V., Maestroni, G.J.M., Cardinali, D.P., Poeggeler, B., Hardeland, R., 2006. Melatonin: nature's most versatile biological signal? *FEBS J.* 273, 2813–2838.
- 32 Hardeland, R., Coto-Montes, A., 2010. New vistas on oxidative damage and aging. *Open Biol. J.* 3, 39–52.
- 33 Cardinali, D.P., Vacas, M.I., Boyer, E.E., 1979. Specific binding of melatonin in bovine brain. *Endocrinology* 105, 437–441.
- 34 Vaneček, J., Pavlík, A., Illnerová, H., 1987. Hypothalamic melatonin receptor sites revealed by autoradiography. *Brain Res.* 435, 359–362.
- 35 Reppert, S.M., Weaver, D.R., Ebisawa, T., 1994. Cloning and characterization of a mammalian melatonin receptor that mediates reproductive and circadian responses. *Neuron* 13, 1177–1185.
- 36 Reppert, S.M., Godson, C., Mahle, C.D., Weaver, D.R., Slaugenhaupt, S.A., Gusella, J.F., 1995. Molecular characterization of a second melatonin receptor expressed in human retina and brain: the Mel1b melatonin receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 92, 8734–8738.
- 37 Dubocovich, M.L., Markowska, M., 2005. Functional MT1 and MT2 melatonin receptors in mammals. *Endocrine* 27, 101–110.
- 38 Sallinen, P., Saarela, S., Ilves, M., Vakkuri, O., Leppäluoto, J., 2005. The expression of MT1 and MT2 melatonin receptor mRNA in several rat tissues. *Life Sci.* 76, 1123–1134.
- 39 Pandi-Perumal, S.R., Trakht, I., Srinivasan, V., Spence, D.W., Maestroni, G.J.M., Zisapel, N., Cardinali, D.P., 2008b. Physiological effects of melatonin: role of melatonin receptors and signal transduction pathways. *Prog. Neurobiol.* 185,335–353.
- 40 Ishii, H., Tanaka, N., Kobayashi, M., Kato, M., Sakuma, Y., 2009. Gene structures, biochemical characterization and distribution of rat melatonin receptors. *J. Physiol. Sci.* 59, 37–47.

41. Tan DX, Manchester LC, Reiter RJ et al. High physiological levels of melatonin in bile of mammals. *Life Sci* 1999; 65:2523–2529.
42. Skinner DC, Malpoux B. High melatonin concentrations in third ventricular cerebrospinal fluid are not due to Galen vein blood recirculating through the choroid plexus. *Endocrinology* 1999; 140:4399–4405.
43. Tricoire H, Locatelli A, Chemineau P et al. Melatonin enters cerebrospinal fluid through the pineal recess. *Endocrinology* 2002; 143:184–190.
44. Brzezinski A, Seibel MM, Lynch HJ et al. Melatonin in human preovulatory follicular fluid. *J Clin Endocrinol Metab* 1987; 64:865–867.
45. Faillace MP, Cutrera R, Keller-Sarmiento MI et al. Evidence for local synthesis of melatonin in golden hamster retina. *Neuro Rep* 1995; 6:2093–2095.
46. Tan DX, Manchester LC, Reiter RJ et al. Identification of highly elevated levels of melatonin in bone marrow: its origin and significance. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1472:206–214.
47. Conti A, Conconi S, Hertens E et al. Evidence for melatonin synthesis in mouse and human bone marrow cells. *J Pineal Res* 2000; 28:193–202.
48. Bubenik GA, Ayles HL, Friedship M et al. Relationship between melatonin levels in plasma and gastrointestinal tissues and the incidence and severity of gastric ulcers in pigs. *J Pineal Res* 1998; 24:62–66.
49. Huether G, Poeggeler B, Reimier A et al. 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; 52:945–953.
50. Lopez-Gonzalez MA, Guerrero JM, Delgado F. Presence of the pineal hormone in rat cochlea: Its variations with lighting conditions. *Neurosci Lett* 1997; 238:81–83.
51. Abe M, Itoh MT, Miyata M et al. Circadian rhythm of serotonin N-acetyltransferase activity in rat lens. *Exp Eye Res* 2000; 70:805–808.
52. Slominski A, Pisarchik A, Semak I et al. Serotonergic and melatonergic systems are fully expressed in human skin. *FASEB J* 2002; 16:896–898.
53. Martin M, Macias M, Escames G et al. Melatonin but not vitamins C and E maintains glutathione homeostasis in t-butyl hydroperoxide-induced mitochondrial oxidative stress. *FASEB J* 2000; 14:1677–1679.
54. Antolin I, Obst B, Burkhardt S et al. Antioxidant protection in a high-melatonin organism: the dinoflagellate *Gonyaulax polyedra* is rescued from lethal oxidative stress by strongly elevated, but physiologically possible concentrations of melatonin. *J Pineal Res* 1997; 23:182–190.

55. Spenger J, Hardeland R, Fuhrberg B et al. Melatonin and other 5-methoxylated indoles in yeast: presence in high concentrations and dependence on tryptophan availability. *Cytologia* 1999; 64:209–213.
- 56 Sjöblom, M., Jedstedt, G., Flemström, G., 2001. Peripheral melatonin mediates neural stimulation of duodenal mucosal bicarbonate secretion. *J. Clin. Invest.* 108, 625–633.
- 57 Sjöblom, M., Safsten, B., Flemström, G., 2003. Melatonin-induced calcium signaling in clusters of human and rat duodenal enterocytes. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 284, G1034–G1044.
- 58 Flemström, G., Sjöblom, M., Jedstedt, G., Akerman, K.E., 2003. Short fasting dramatically decreases rat duodenal secretory responsiveness to orexin A but not to VIP or melatonin. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 285, G1091–G1096.
- 59 Flemström, G., Bengtsson, M.W., Mäkelä, K., Herzig, K.H., 2010. Effects of short-term food deprivation on orexin-A-induced intestinal bicarbonate secretion in comparison with related secretagogues. *Acta Physiol. (Oxf.)* 198, 373–380.
- 60 Flemström, G., Sjöblom, M., 2005. Epithelial cells and their neighbors. II. New perspectives on efferent signaling between brain, neuroendocrine cells, and gut epithelial cells. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 289, G377–G380.
- 61 Sjöblom, M., 2005. The duodenal mucosal bicarbonate secretion. *Ups. J. Med. Sci.* 110, 115–149
- 62 Poon, A.M., Mak, A.S., Luk, H.T., 1996. Melatonin and 2[125I]iodomelatonin binding sites in the human colon. *Endocr. Res.* 22, 77–94.
- 63 Poon, A.M., Chow, P.H., Mak, A.S., Pang, S.F., 1997. Autoradiographic localization of 2[125I]iodomelatonin binding sites in the gastrointestinal tract of mammals including humans and birds. *J. Pineal Res.* 23, 5–14.
- 64 Aust, S., Thalhammer, T., Humpeler, S., Jaeger, W., Klimpfner, M., Tucek, G., Obrist, P., Marktl, W., Penner, E., Ekmekcioglu, C., 2004. The melatonin receptor subtype MT1 is expressed in human gallbladder epithelia. *J. Pineal Res.* 36, 43–48.
- 65 Aras, H.C., Ekström, J., 2008. Melatonin-evoked in vivo secretion of protein and amylase from the parotid gland of the anaesthetised rat. *J. Pineal Res.* 45, 413–421
- 66 Aust, S., Jaeger, W., Kischner, H., Klimpfner, M., Thalhammer, T., 2008. Pancreatic stellate/myofibroblast cells express G-protein-coupled melatonin receptor 1. *Wien. Med. Wochenschr.* 158, 575–578.

- 67 Muhlbauer, E., Peschke, E., 2007. Evidence for the expression of both the MT1- and in addition, the MT2-melatonin receptor, in the rat pancreas, islet and b-cell. *J.Pineal Res.* 42, 105–106.
- 68 Ramracheya, R.D., Muller, D.S., Squires, P.E., Brereton, H., Sugden, D., Huang, G.C., Amiel, S.A., Jones, P.M., Persaud, S.J., 2008. Function and expression of melatonin receptors on human pancreatic islets. *J. Pineal Res.* 44, 273–279
- 69 Lyssenko, V., Nagorny, C.L., Erdos, M.R., Wierup, N., Jonsson, A., Spe' gel, P., Bugliani, M., Saxena, R., Fex, M., Pulizzi, N., Isomaa, B., Tuomi, T., Nilsson, P., Kuusisto, J., Tuomilehto, J., Boehnke, M., Altshuler, D., Sundler, F., Eriksson, J.G., Jackson, A.U., Laakso, M., Marchetti, P., Watanabe, R.M., Mulder, H., Groop, L., 2009. Common variant in MTNR1B associated with increased risk of type 2 diabetes and impaired early insulin secretion. *Nat. Genet.* 41, 82–88.
- 70 Mulder, H., Nagorny, C.L., Lyssenko, V., Groop, L., 2009. Melatonin receptors in pancreatic islets: good morning to a novel type 2 diabetes gene. *Diabetologia* 52,1240–1249
- 71 Slominski, A., Pisarchik, A., Semak, I., Sweatman, T., Wortsman, J., Szczesniewski, A., Slugocki, G., McNulty, J., Kauser, S., Tobin, D.J., Jing, C., Johansson, O., 2002. Serotonergic and melatonergic systems are fully expressed in human skin. *FASEB J.* 16, 896–898.
- 72 Slominski, A., Pisarchik, A., Semak, I., Sweatman, T., Wortsman, J., 2003. Characterization of the serotonergic system in the C57BL/6 mouse skin. *Eur. J. Biochem.* 270, 3335–3344.
- 73 Slominski, A., Pisarchik, A., Wortsman, J., 2004. Expression of genes coding melatonin and serotonin receptors in rodent skin. *Biochim. Biophys. Acta* 1680, 67–70.
- 74 Dillon, D.C., Easley, S.E., Asch, B.B., Cheney, R.T., Brydon, L., Jockers, R., Winston, J.S., Brooks, J.S., Hurd, T., Asch, H.L., 2002. Differential expression of high-affinity melatonin receptors (MT1) in normal and malignant human breast tissue. *Am. J. Clin. Pathol.* 118, 451–458.
- 75 Schlabritz-Loutsevitch, N., Hellner, N., Middendorf, R., Muller, D., Olcese, J., 2003. The human myometrium as a target for melatonin. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 88, 908–913.
- 76 Sharkey, J.T., Cable, C., Olcese, J., 2010. Melatonin sensitizes human myometrial cells to oxytocin in a protein kinase Ca/extracellular-signal regulated kinasedependent manner. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 95, 2902–2908.
- 77 Lanoix, D., Ouellette, R., Vaillancourt, C., 2006. Expression of melatonergic receptors in human placental choriocarcinoma cell lines. *Hum. Reprod.* 21, 1981–1989.
- 78 Yie, S.M., Niles, L.P., Younglai, E.V., 1995. Melatonin receptors on human granulosa cell membranes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 80, 1747–1749.
- 79 Niles, L.P., Wang, J., Shen, L., Lobb, D.K., Younglai, E.V., 1999. Melatonin receptor mRNA expression in human granulosa cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* 156, 107–110.

- 80 Wu, C.C., Chiao, C.W., Hsiao, G., Chen, A., Yen, M.H., 2001. Melatonin prevents endotoxin-induced circulatory failure in rats. *J. Pineal Res.* 30, 147–156.
- 81 Tamura, H., Nakamura, Y., Korkmaz, A., Manchester, L.C., Tan, D.-X., Sugino, N., Reiter, R.J., 2009. Melatonin and the ovary: physiological and pathophysiological implications. *Fertil. Steril.* 92, 328–343.
- 82 Williams, L.M., Drew, J.E., Bunnett, N.W., Grady, E., Barrett, P., Abramovich, D.R., Morris, A., Slater, D., 2001. Characterization of an antibody to the human melatonin mt1 receptor. *J. Neuroendocrinol.* 13, 94–101
- 83 Ekmekcioglu, C., Haslmayer, P., Philipp, C., Mehrabi, M.R., Glogar, H.D., Grimm, M., Thalhammer, T., Marktl, W., 2001. 24 h variation in the expression of the mt1melatonin receptor subtype in coronary arteries derived from patients with coronary heart disease. *Chronobiol. Int.* 18, 973–985.
- 84 Ekmekcioglu, C., Thalhammer, T., Humpeler, S., Mehrabi, M.R., Glogar, H.D., Ho" lzenbein, T., Markovic, O., Leibetseder, V.J., Strauss-Blasche, G., Marktl, W., 2003. The melatonin receptor subtype MT2 is present in the human cardiovascular system. *J. Pineal Res.* 35, 40–44.
- 85 Savaskan, E., Olivieri, G., Brydon, L., Jockers, R., Kra" uchi, K., Wirz-Justice, A., Mu" ller-Spahn, F., 2001. Cerebrovascular melatonin MT1-receptor alterations in patients with Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.* 308, 9–12.
- 86 Ekmekcioglu, C., 2006. Melatonin receptors in humans: biological role and clinical relevance. *Biomed. Pharmacother.* 60, 97–108.
- 87 Vacas, M.I., Del Zar, M.M., Martinuzzo, M., Cardinali, D.P., 1992. Binding sites for [3H]-melatonin in human platelets. *J. Pineal Res.* 13, 60–65.
- 88 Konakchieva, R., Kyurkchiev, S., Kehayov, I., Taushanova, P., Kanchev, L., 1995. Selective effect of methoxyindoles on the lymphocyte proliferation and melatonin binding to activated human lymphoid cells. *J. Neuroimmunol.* 63, 125–132.
- 89 Garc' a-Pergan" eda, A., Pozo, D., Guerrero, J.M., Calvo, J.R., 1997. Signal transduction for melatonin in human lymphocytes: involvement of a pertussis toxin-sensitive G protein. *J. Immunol.* 159, 3774–3781.
- 90 Pozo, D., Garc' a-Maurin" o, S., Guerrero, J.M., Calvo, J.R., 2004. mRNA expression of nuclear receptor RZR/ROR α , melatonin membrane receptor MT1, and hydroxyindole-O-methyltransferase in different populations of human immune cells. *J.Pineal Res.* 37, 48–54.
- 91 Carrillo-Vico, A., Garc' a-Pergan" eda, A., Naji, L., Calvo, J.R., Romero, M.P., Guerrero, J.M., 2003. Expression of membrane and nuclear melatonin receptor mRNA and protein in the mouse immune system. *Cell. Mol. Life Sci.* 60, 2272–2278.
- 92 Lardone, P.J., Carrillo-Vico, A., Molinero, P., Rubio, A., Guerrero, J.M., 2009. A novel interplay between membrane and nuclear melatonin receptors in human lymphocytes: significance in IL-2 production. *Cell. Mol. Life Sci.* 66, 516–525.

93 Nosjean, O., Ferro, M., Cogé, F., Beauverger, P., Henlin, J.M., Lefoulon, F., Fauchère, J.L., Delagrangé, P., Canet, E., Boutin, J.A., 2000. Identification of the melatonin binding site MT3 as the quinone reductase 2. *J. Biol. Chem.* 275, 31311–31317.

94 Nosjean, O., Nicolas, J.P., Klupsch, F., Delagrangé, P., Canet, E., Boutin, J.A., 2001. Comparative pharmacological studies of melatonin receptors: MT1, MT2 and MT3/QR2. Tissue distribution of MT3/QR2. *Biochem. Pharmacol.* 61, 1369–1379.

95 Mailliet, F., Ferry, G., Vella, F., Berger, S., Cogé, F., Chomar, P., Mallet, C., Guenin, S.P., Guillaumet, G., Viaud-Massuard, M.C., Yous, S., Delagrangé, P., Boutin, J.A., 2005. Characterization of the melatonergic MT3 binding site on the NRH:quinone oxidoreductase 2 enzyme. *Biochem. Pharmacol.* 71, 74–88.

96 Brydon, L., Roka, F., Petit, L., de Coppet, P., Tissot, M., Barrett, P., Morgan, P.J., Nanoff, C., Strosberg, A.D., Jockers, R., 1999. Dual signaling of human Mel1a melatonin receptors via Gi2, Gi3, and Gq/11 proteins. *Mol. Endocrinol.* 13, 2025–2038

97 Morgan, P.J., Barrett, P., Howell, H.E., Helliwell, R., 1994. Melatonin receptors: localization, molecular pharmacology and physiological significance. *Neurochem. Int.* 24, 101–146.

98 Boutin, J.A., Audinot, V., Ferry, G., Delagrangé, P., 2005. Molecular tools to study melatonin pathways and actions. *Trends Pharmacol. Sci.* 26, 412–419.

99 Paul, P., Lahaye, C., Delagrangé, P., Nicolas, J.P., Canet, E., Boutin, J.A., 1999. Characterization of 2-[125I]iodomelatonin binding sites in Syrian hamster peripheral organs. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 290, 334–340.

100 Nosjean, O., Nicolas, J.P., Klupsch, F., Delagrangé, P., Canet, E., Boutin, J.A., 2001. Comparative pharmacological studies of melatonin receptors: MT1, MT2 and MT3/QR2. Tissue distribution of MT3/QR2. *Biochem. Pharmacol.* 61, 1369–1379.

101 Benitez-King, G., Anton-Tay, F., 1993. Calmodulin mediates melatonin cytoskeletal effects. *Experientia* 49, 635–641.

102 Macias, M., Escames, G., Leon, J., Coto, A., Sbihi, Y., Osuna, A., Acuña-Castroviejo, D., 2003. Calreticulin-melatonin. An unexpected relationship. *Euro. J. Biochem.* 270, 832–840.

103 Cardinali, D.P., Freire, F., 1975. Melatonin effects on brain. Interaction with microtubule protein, inhibition of fast axoplasmic flow and induction of crystalloid and tubular formations in the hypothalamus. *Mol. Cell Endocrinol.* 2, 317–330.

104 Jetten, A.M., 2009. Retinoid-related orphan receptors (RORs): critical roles in development, immunity, circadian rhythm, and cellular metabolism. *Nucl. Recept. Signal.* 7, e003.

105 Smirnov, A.N., 2001. Nuclear melatonin receptors. *Biochemistry (Moscow)* 66, 19–26.

105b Becker-Andre, M., Wiesenberg, I., Schaeren-Wiemers, N., Andre, E., Missbach, M., Saurat, J.H., Carlberg, C., 1994. Pineal gland hormone melatonin binds and activates an orphan of the nuclear receptor superfamily. *J. Biol. Chem.* Vol 269; 28531-28534.

105c Carlberg, C., Hooft van Huijsduijnen, R., Staple, J.K., DeLamarter, J.F., Becker-Andre, M., 1994. RZR α s, a new family of retinoid-related orphan receptors that function as both monomers and homodimers. *Mol. Endocrinol.* Vol 8; 757-770.

105d Wiesenberg, I., Missbach, M., Kahlen, J.P., Schrader, M., Carlberg, C., 1995. Transcriptional activation of the nuclear receptor RZR α by the pineal gland hormone melatonin and identification of CGP 52608 as a synthetic ligand. *Nucleic Acids Res.* Vol 23; 327-333.

105 e Dai, J., Ram, P.T., Yuan, L., Springgs, L.L., Hill, S.M., 2001. Transcriptional repression of ROR α activity in human breast cancer cells by melatonin. *Mol. Cell. Endocrinol.* Vol 176; 111-120.

105 f Ram, P.T., Dai, J., Yuan, L., Dong, C., Kiefer, T.L., Lai, L., Hill, S.M., 2002. Involment of the MT1 melatonin receptor in human breast cancer. *Cancer Lett.* Vol. 179; 141-150.

106 Carrillo-Vico, A., Guerrero, J.M., Lardone, P.J., Reiter, R.J., 2005. A review of the multiple actions of melatonin on the immune system. *Endocrine* 27, 189–200

107 Carlberg, C., Hooft van Huijsduijnen, R., Staple, J.K., DeLamarter, J.F., Becker-Andre, M., 1994. RZR α s, a new family of retinoid-related orphan receptors that function as both monomers and homodimers. *Mol. Endocrinol.* 8, 757–770

108 Bubenik, G.A., Blask, D.E., Brown, G.M., Maestroni, G.J.M., Pang, S.F., Reiter, R.J., Viswanathan, M., Zisapel, N., 1998. Prospects of the clinical utilization of melatonin. *Biol. Signals Recept.* 7, 195–219.

109 Karbownik, M., Reiter, R.J., 2000. Antioxidative effects of melatonin in protection against cellular damage caused by ionizing radiation. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 225, 9–22

110 Reiter, R.J., Tan, D.-X., Sainz, R.M., Mayo, J.C., 2002c. Melatonin protects the heart against both ischemia/reperfusion injury and chemotherapeutic drugs. *Cardiovasc. Drugs Ther.* 16, 5–6.

111 Reiter, R.J., 1998. Oxidative damage in the central nervous system: protection by melatonin. *Prog. Neurobiol.* 56, 359–384.

112 Hardeland, R., Poeggeler, B., Pappolla, M.A., 2009. Mitochondrial actions of melatonin—an endeavor to identify their adaptive and cytoprotective mechanisms. *Abh. Sächs. Akad. Wiss. Math.-Nat. Kl.* 65 (Pt. 3), 14–31.

113 Ianas, O., Olivescu, R. and Badescu, I. (1991) Melatonin involvement in oxidative processes. *Rom. J. Endocrin.* 29, 117±123.

- 114 a Hardeland, R., Fuhrberg, B., Behrmann, G., Balzer, I., 1993. Sleep-latency reducing pineal hormone melatonin as a scavenger of free radicals: hemin-catalysed formation of N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine. *Sleep Res.* 22, 621.
- 114 b Hardeland, R., Reiter, R.J., Poeggeler, B., Tan, D.-X., 1993. The significance of the metabolism of the neurohormone melatonin: antioxidative protection and formation of bioactive substances. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 17, 347–357.
- 115 Tan, D.-X., Chen, L.-D., Poeggeler, B., Manchester, L.C., Reiter, R.J., 1993. Melatonin: a potent, endogenous hydroxyl radical scavenger. *Endocr. J.* 1, 57–60.
- 116 Reiter, R. J. (1995a) Oxidative processes and antioxidative defense mechanisms in the aging brain. *FASEB J.* 9, 526±533.
- 117 Reiter, R. J. (1995b) Functional pleiotropy of the neurohormone melatonin: antioxidant protection and neuroendocrine regulation. *Front. Neuroendocrinol.* 16, 385±415.
- 118 Reiter, R. J. (1995c) Oxygen radical detoxification processes during aging: the functional importance of melatonin. *Aging Exp. Clin. Res.* 7, 340±351.
- 119 Reiter, R. J. (1997a) Antioxidant actions of melatonin. *Adv. Pharmac.* 38, 103±117.
- 120 Reiter, R. J. (1997b) Aging and oxygen toxicity: relation to changes in melatonin. *Age.*
- 121 Zhang, Y., Marcillat, O., Giulivi, C., Eymster, L. and Davis, K. J. (1990) The oxidative inactivation of mitochondrial electron transport chain components of ATPase. *J. Biol. Chem.* 265, 16330±16336.
- 122 Antolin, I., Rodriguez, C., Sainz, R. M., Mayo, J. C., Aria, H., Kotter, M., Rodriguez-Colungo, M. J., Tolivia, D. and Menendez-Pelaez, A. (1996) Neurohormone melatonin prevents cell damage: effect on gene expression for antioxidant enzymes. *FASEB J.* 10, 882±890.
- 123 Barlow-Walden, L. R., Reiter, R. J., Abe, M., Pablos, M. I., Chen, L. D. and Poeggeler, B. (1995) Melatonin stimulates brain glutathione peroxidase activity. *Neurochem. Int.* 26, 497±502.
- 124 Pablos, M. I., Guerrero, J. M., Ortiz, G. G., Agapito, M. T. and Reiter, R. J. (1997a) Both melatonin and a putative nuclear melatonin receptor agonist CGP 52608 stimulate glutathione peroxidase and glutathione reductase activities in mouse brain in vivo. *Neuroendocrin. Lett.* 18, 49±58.
- 125 Pierre®che, G. and Laborit, H. (1995) Oxygen radicals, melatonin and aging. *Exp. Gerontol.* 30, 213±227
- 126 Montilla, P., Tunez, I., Muñoz, M. C., Soria, J. V. and Lopez, A. (1997) Antioxidative effect of melatonin in rat brain oxidative stress induced by adriamycin. *J. Physiol. Biochem.* 53, 301±306.
- 127 Stasica, P., Ulanski, P. and Rosiak, J. M. (1998) Melatonin as a hydroxyl radical scavenger. *J. Pineal Res.*

- 128 Cagnoli, C. M., Atabay, C., Kharlamova, E. and Manev, H. (1995) Melatonin protects neurons from singlet oxygen-induced apoptosis. *J. Pineal Res.* 18, 222±226.
- 129 Pieri, C., Marra, M., Moroni, F., Recchioni, R. and Marcheselli, F. (1994) Melatonin: a peroxy radical scavenger more effective than vitamin E. *Life Sci.* 55, PL271±PL276.
- 130 Pozo, D., Reiter, R. J., Calvo, J. R. and Guerrero, J. M. (1994) Physiological concentrations of melatonin inhibit nitric oxide synthase in rat cerebellum. *Life Sci.* 55, PL455±PL460.
- 131 Pozo, D., Reiter, R. J., Calvo, J. R. and Guerrero, J. M. (1997) Inhibition of cerebellar nitric oxide synthase and cyclic GMP production by melatonin via complex formation with calmodulin. *J. Cell. Biochem.* 65, 430±442
- 132 Gilad, E., Cuzzocrea, S., Zingarelli, B., Salzman, A. L. and Szabo, C. (1997) Melatonin is a scavenger of peroxynitrite. *Life Sci.* 60, PL169±PL174.
- 133 Cuzzocrea, S., Zingarelli, B., Gilad, E., Hake, P., Salzman, A. L. and Szabo, C. (1997) Protective effect of melatonin in carrageenan-induced models of local inflammation: relationship to its inhibitory effect on nitric oxide production and its peroxynitrite scavenging activity. *J. Pineal Res.* 23, 106±116.
- 134 Ianas, O., Olivescu, R. and Badescu, I. (1991) Melatonin involvement in oxidative processes. *Rom. J. Endocrin.* 29, 117±123.
- 135 Radogna F., Paternoster L., De Nicola M., Cerella C., Ammendola S., Bedini A., Tarzia G., Aquilano K., Ciriolo M., Ghibelli L. (2009) Rapid and transient stimulation of intracellular reactive oxygen species by melatonin in normal and tumor leukocytes. *Toxicology and Applied Pharmacology* 239, 37-45
- 136 Mediavilla M.D., Sánchez-Barceló E.J., Tan D.X., Manchester L., Reiter R.J. (2010) Basic mechanisms involved in the anti-cancer effects of melatonin. *Current Medical Chemistry* 17, 4462-4481
- 137 Dreher D., Junot A.F., (1996) Role of oxygen free radicals in cancer development. *Eur. J. Cancer* 32A, 30-38
- 138 Klaunig JE, Xu Y., Isenberg JS, Bachowski, S., Kolaja KL., Jiang J., Stevenson DE., Walborg EF., (1999) The role of oxidative stress in chemical carcinogenesis. *Environ. Health Perspect*, 106, 289-295
- 139 Karbownik, M., Lewinski, A., Reiter, RJ. (2001) Anticarcinogenic actions of melatonin which involve antioxidative processes: comparison with other antioxidants. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 33, 735-753
- 140 Karbownik, M.; Reiter, RJ; Burkhardt S; Gitto E; Tan DX; Lewinski A. (2001). Melatonin attenuates estradiol-induced oxidative damage to DNA: relevance for cancer prevention. *Exp. Biol. Med.*, 226, 707-712

- 141 Block KI; Koch AC, Mead, MN; Tothy, PK; Newman, RA; Gyllenhaal, C. (2008). Impact of antioxidant supplementation on chemotherapeutic toxicity: a systematic review of the evidence from randomized controlled trials. *Int. J. Cancer.* 123, 1227-1239
- 142 Elmore S. (2007) Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 35, 495-516.
- 143 García-Navarro A, González-Puga C, Escames G et al. Cellular mechanisms involved in the melatonin inhibition of HT-29 human colon cancer cell proliferation in culture. *J Pineal Res* 2007; 43:195–205.
- 144 Ram PT, Dai J, Yuan L et al. Involvement of the mt1 melatonin receptor in human breast cancer. *Cancer Lett* 2002; 179:141–150.
- 145 Tam CW, Mo CW, Yao KM, 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.
- 146 Souza AV, Visconti MA, Castrucci AM. Melatonin biological activity and binding sites in human melanoma cells. *J Pineal Res* 2003; 34:242–248.
- 147 Lanoix D, Lacasse AA, Reiter RJ et al. Melatonin: the smart killer: the human trophoblast as a model. *Mol Cell Endocrinol* 2012; 348:1-11.
- 148 Bejarano I, Espino J, Barriga C et al. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2011; 108:14-20. Pro-oxidant effect of melatonin in tumour leucocytes: relation with its cytotoxic and pro-apoptotic effects.
- 149 Casado-Zapico S, Rodriguez-Blanco J, García-Santos G et al. 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.
- 150 Marrero MT, Estévez S, Negrín G et al. Ayanin diacetate-induced cell death is amplified by TRAIL in human leukemia cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2012; 428:116-120.
- 151 Reiter RJ, Tan DX. What constitutes a physiological concentration of melatonin? *J Pineal Res* 2003; 34:79–80
- 152 Pandi-Perumal SR, Trakht I, Srinivasan V et al. Physiological effects of melatonin: role of melatonin receptors and signal transduction pathways. *Prog Neurobiol* 2008; 85:335–353.
- 153 García-Navarro A, González-Puga C, Escames G et al. Cellular mechanisms involved in the melatonin inhibition of HT-29 human colon cancer cell proliferation in culture. *J Pineal Res* 2007; 43:195–205.
- 154 Ram PT, Dai J, Yuan L et al. Involvement of the mt1 melatonin receptor in human breast cancer. *Cancer Lett* 2002; 179:141–150.

- 155 Tam CW, Mo CW, Yao KM, 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.
- 156 Souza AV, Visconti MA, Castrucci AM. Melatonin biological activity and binding sites in human melanoma cells. *J Pineal Res* 2003; 34:242–248
- 157 Santoro R, Mori F, Marani M et al. Blockage of melatonin receptors impairs p53-mediated prevention of DNA damage accumulation. *Carcinogenesis* 2013; doi: 10.1093/carcin/bgt025.
- 158 Sainz RM, Mayo JC, Tan DX et al. Melatonin reduces prostate cancer cell growth leading to neuroendocrine differentiation via a receptor and PKA independent mechanism. *Prostate* 2005; 63:29–43.
- 159 García-Navarro A, González-Puga C, Escames G et al. Cellular mechanisms involved in the melatonin inhibition of HT-29 human colon cancer cell proliferation in culture. *J Pineal Res* 2007; 43:195–205.
- 160 Sánchez-Hidalgo M, Lee M, de la Lastra CA et al. Melatonin inhibits cell proliferation and induces caspase activation and apoptosis in human malignant lymphoid cell lines. *J Pineal Res* 2012; 53:366-373
- 161 Sánchez-Hidalgo M, Guerrero JM, Villegas I et al. Melatonin, a natural programmed cell death inducer in cancer. *Curr Med Chem* 2012; 19:3805-3821.
- 162 Guerrero AD, Chen M, Wang J. Delineation of the caspase-9 signaling cascade. *Apoptosis*. 2008; 13:177-186.
- 163 Tait SW, Green DR. Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010; 11:621-632.
- 164 Danial NK, Korsmeyer SJ. Cell death: critical control points. *Cell* 2004; 116:205–219.
- 165 Lu Y, Yagi T. Apoptosis of human tumor cells by chemotherapeutic anthracyclines is enhanced by Bax overexpression. *J Radiat Res* 1999; 40:263-272
- 166 Leja-Szpak A, Jaworek J, Pierzchalski P et al. Melatonin induces pro-apoptotic signaling pathway in human pancreatic carcinoma cells (PANC-1). *J Pineal Res* 2010; 49:248-255.
- 167 Martín-Renedo J, Mauriz JL, Jorquera F et al. Melatonin induces cell cycle arrest and apoptosis in hepatocarcinoma HepG2 cell line. *J Pineal Res* 2008; 45:532-540.
- 168 Chipuk JE, Bouchier-Hayes L, Green DR. Mitochondrial outer membrane permeabilization during apoptosis: the innocent bystander scenario. *Cell Death Differ* 2006; 13:1396-402.
- 169 Wood DE, Newcomb EW. Cleavage of Bax enhances its cell death function. *Exp Cell Res* 2000; 256:375-382.

- 170 Bossy-Wetzel E, Newmeyer DD, Green DR. Mitochondrial cytochrome c release in apoptosis occurs upstream of DEVD-specific caspase activation and independently of mitochondrial transmembrane depolarization. *EMBO J* 1998; 17:37-49.
- 171 Goldstein JC, Munoz-Pinedo C, Ricci J-E et al. Cytochrome c is released in a single step during apoptosis. *Cell Death Differ* 2005; 12:453-462.
- 172 Kowaltowski AJ, Cosso RG, Campos CB et al. Effect of Bcl-2 overexpression on mitochondrial structure and function. *J Biol Chem* 2002; 277:42802-428017.
- 173 Zheng TS, Hunot S, Kuida K et al. Deficiency in caspase-9 or caspase-3 induces compensatory caspase activation. *Nat Med* 2000; 6:1241-1247.
- 174 Margolin N, Raybuck SA, Wilson KP et al. Substrate and inhibitor specificity of interleukin-1 β -converting enzyme and related caspases. *J Biol Chem* 1997; 272:7223-7228.
- 175 Scoltock AB, Cidlowski JA et al. Activation of intrinsic and extrinsic pathways in apoptotic signaling during UV-C-induced death of Jurkat cells: the role of caspase inhibition. *Exp. Cell Res* 2004; 297:212-223.
- 176 Troy CM, . Shelanski ML Caspase-2 redux. *Cell Death Differ* 2003; 10:101-107.
- 177 Hitomi J, Christofferson DE, Ng A et al. Identification of a molecular signaling network that regulates a cellular necrotic cell death pathway. *Cell* 2008; 135:1311-1323.
- 178 Chipuk JE, Green DR. Do inducers of apoptosis trigger caspase independent cell death? *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005; 6:268-275.
- 179 Vercammen D, Beyaert R, Denecker G et al. Inhibition of caspases increases the sensitivity of L929 cells to necrosis mediated by tumor necrosis factor. *J Exp Med* 1998; 187:1477-1485.
- 180 Huang Q, Li F, Liu X et al. Caspase 3-mediated stimulation of tumor cell repopulation during cancer radiotherapy. *Nat Med* 2011; 17:860-866.
- 181 Bejarano I, Espino J, Barriga C et al. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2011; 108:14-20. Pro-oxidant effect of melatonin in tumour leucocytes: relation with its cytotoxic and pro-apoptotic effects.
- 182 Casado-Zapico S, Rodriguez-Blanco J, García-Santos G et al. 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.
- 183 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 Radic Res* 2011; 45:1333-1341.
- 184 Pelicano H, Carney D, Huang P. ROS stress in cancer cells and therapeutic implications. *Drug Resist Updat* 2004; 7:97-110.

185 Zhang Hm, Zhang Y, Zhang Bx. The role of mitochondrial complex III in melatonin-induced ROS production in cultured mesangial cells. *J Pineal Res* 2011; 50:78-82.

186 Radogna F, Paternoster L, De Nicola M et al. Rapid and transient stimulation of intracellular reactive oxygen species by melatonin in normal and tumor leukocytes. *Toxicol Appl Pharmacol* 2009; 239:37-45.

187 Sánchez Y, Calle C, de Blas E et al. Modulation of arsenic trioxide-induced apoptosis by genistein and functionally related agents in U937 human leukaemia cells. Regulation by ROS and mitogen-activated protein kinases. *Chem Biol Interact* 2009; 182:37-44.

188 Bejarano I, Espino J, Barriga C et al. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2011; 108:14-20. Pro-oxidant effect of melatonin in tumour leucocytes: relation with its cytotoxic and pro-apoptotic effects

189 Bejarano I, Espino J, Marchena AM et al. Melatonin enhances hydrogen peroxide-induced apoptosis in human promyelocytic leukaemia HL-60 cells. *Mol Cell Biochem* 2011; 353:167-176.

190 Koh W, Jeong SJ, Lee HJ et al. Melatonin promotes puromycin-induced apoptosis with activation of caspase-3 and 5'-adenosine monophosphate-activated kinase-alpha in human leukemia HL-60 cells. *J Pineal Res* 2011; 50:367-373.

191 Jahnke G, Marr M, Myers C et al. Maternal and developmental toxicity evaluation of melatonin administered orally to pregnant Sprague-Dawley rats. *Toxicol Sci* 1999; 50:271-279.

192 Seabra ML, Bignotto M, Pinto LR Jr et al. Randomized, double-blind clinical trial, controlled with placebo, of the toxicology of chronic melatonin treatment. *J Pineal Res* 2000; 29:193-200.

Anexos

Los resultados obtenidos en la presente tesis doctoral han dado origen a una publicación en la revista *Journal of Pineal Research* (índice de impacto según JCR de 5,8) y a una comunicación en el 6th European Congress of Pharmacology, celebrado en Granada del 17 al 20 de julio de 2012.

Melatonin induces apoptosis through a caspase-dependent but ROS-independent mechanism in human leukemia Molt-3 cells

Juan Perdomo¹, Javier Cabrera ^{2,3}, Francisco Estévez ^{1,3}, Juan Loro ^{2,3}, Russel J. Reiter ⁴ and José Quintana ^{1,3}

¹Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Fisiología, Genética e Inmunología, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria; ²Departamento de Ciencias Clínicas, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Spain; ³Instituto Canario de Investigación del Cáncer (ICIC, Canary Islands, Spain); ⁴Department of Cellular and Structural Biology, The University of Texas Health Science at San Antonio, San Antonio, TX, USA

Running title: melatonin-induced cell growth inhibition on Molt-3 cells

Key words: melatonin, cell proliferation, ROS, caspases, Molt-3, antioxidants

Corresponding author:

Dr José Quintana

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Fisiología, Genética e Inmunología

Facultad de Ciencias de la Salud

Universidad de Las Palmas de Gran Canaria

Plaza Dr Pasteur s/n

35016 Las Palmas de Gran Canaria

Spain

E-mail: jquintana@dbbf.ulpgc.es

Melatonin decreases cell proliferation and induces apoptotic cell death in human leukemia molt-3 cells

J. Perdomo, J. Cabrera, J. Francisco Loro, F. Estévez, J. Quintana

6th European Congress of Pharmacology. EPHAR 2012. July, 17-20. Granada/ Spain