



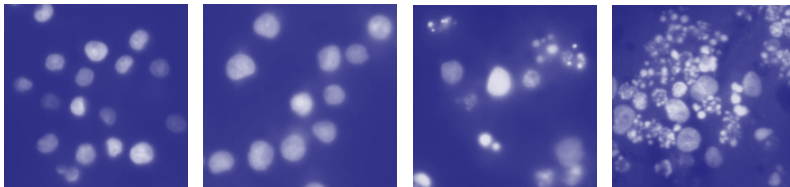
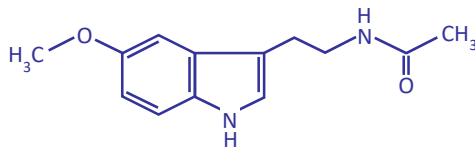
**UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA**

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular,  
Fisiología, Genética e Inmunología  
Instituto Universitario de Investigaciones  
Biomédicas y Sanitarias

**TESIS DOCTORAL**

Programa de Doctorado:  
Investigación Aplicada a las Ciencias Sanitarias

**Estudio de la influencia de la melatonina sobre la  
actividad citotóxica de la hipertermia  
en células leucémicas humanas**



**CARLOS QUINTANA RAMÍREZ**

Las Palmas de Gran Canaria

2023







**UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA**

ESCUELA DE DOCTORADO DE LA UPLGC

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular,

Fisiología, Genética e Inmunología

Instituto de Investigaciones Biomédicas y Sanitarias

**PROGRAMA DE DOCTORADO**

Investigación Aplicada a las Ciencias Sanitarias por la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, la Universidad de León y la Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

Título de la Tesis:

**Estudio de la influencia de la melatonina sobre la actividad citotóxica de la hipertermia en células leucémicas humanas**

presentada por D. Carlos Quintana Ramírez para optar al grado de Doctor

Dirigida por el Dr. José Martín Quintana Aguiar y el Dr. Francisco Estévez Rosas

**El Doctorando**

**El Director**

**El Director**

Las Palmas de Gran Canaria, a 20 de junio de 2023



**D. JOSÉ MARTÍN QUINTANA AGUIAR Y D. FRANCISCO ESTÉVEZ ROSAS, CATEDRÁTICOS DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR DE LA UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA**

CERTIFICAN:

Que el trabajo de investigación titulado “Estudio de la influencia de la melatonina sobre la actividad citotóxica de la hipertermia en células leucémicas humanas”, ha sido realizado por D. Carlos Quintana Ramírez, en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Fisiología, Genética e Inmunología y en el Instituto de Investigaciones Biomédicas y Sanitarias (IUIBS) de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Unidad Asociada al Consejo Superior de Investigaciones Científicas, bajo su dirección y asesoramiento científico y técnico, y que una vez revisada la presente memoria, la encuentran apta para su defensa ante tribunal.

Y para que así conste y surta los efectos oportunos, extienden la presente certificación en Las Palmas de Gran Canaria a 20 de junio de 2023

El Director

El Director





Esta Tesis ha sido realizada en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Fisiología, Genética e Inmunología de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Unidad Asociada al CSIC, bajo la dirección de los Catedráticos Dr. D. Francisco Estévez Rosas y Dr. D. José Quintana Aguiar, a quienes expreso mi más profundo agradecimiento.



## ABREVIATURAS

AADC	Descarboxilasa de aminoácidos aromáticos.
AIF	Factor inductor de apoptosis.
AKT	Proteína quinasa involucrada en la supervivencia celular.
APAF-1	Apoptotic peptidase activating factor 1. Factor activador de proteasas apoptóticas.
ASMT	<i>N</i> -Acetil-serotonina- <i>O</i> -metiltransferasa.
BAD	<i>BCL-2 associated agonist of cell death</i> . Proteína proapoptótica de la familia BCL-2.
BAK	<i>BCL-2 antagonist killer 1</i> . Proteína proapoptótica de la familia BCL-2.
BAX	<i>BCL-2 associated X</i> . Proteína proapoptótica de la familia BCL-2.
BCL-2	<i>B-cell leukemia/lymphoma 2</i> . Proteína antiapoptótica de la familia BCL-2.
BCL-2-A1	Proteína antiapoptótica de la familia BCL-2, también conocida como A1 o BFL-1.
BCL-x <sub>L</sub>	<i>B-cell lymphoma extra-large</i> . Proteína antiapoptótica de la familia BCL-2.
BCL-w	Proteína antiapoptótica de la familia BCL-2.
BID	<i>BH3 interacting domain death agonist</i> . Proteína proapoptótica de la familia BCL-2.
BIK	Proteína proapoptótica de la familia BCL-2.
BIM	<i>BCL2-interacting mediator of cell death</i> . Proteína proapoptótica de la familia BCL-2.
BMF	<i>BCL-2 modifying factor</i> . Proteína proapoptótica de la familia BCL-2.
BOK	<i>BCL-2-related ovarian killer</i> . Proteína proapoptótica de la familia BCL-2.
CARD	<i>Caspase-recruitment domain</i> . Dominio de reclutamiento de caspasa.
CCCP	Carbonil cianuro <i>m</i> -clorofenil-hidrazona.
c-FLIP	<i>Cellular FLICE-inhibitory protein</i> . Proteína inhibidora de la autoactivación de caspasa-8.

CREB	<i>Cyclic AMP response element binding protein</i> . Factor de transcripción activado por AMPc. Proteína de unión al elemento de respuesta al AMP cíclico.
DCF	Diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína.
DD	<i>Death domain</i> . Dominio de muerte.
DED	<i>Death effector domain</i> . Dominio efector de muerte.
DISC	<i>Death-inducing signaling complex</i> . Complejo de señalización inductor de muerte.
DMSO	Dimetilsulfóxido.
DTT	Ditiotreitol.
EDTA	Ácido etilen-diamin-tetra-acético.
EGTA	Ácido etilenglicol-bis- <i>N,N'</i> -tetraacético.
ERK1/2	<i>Extracellular regulated kinase 1/2</i> . Isoformas 1 y 2 de la proteína quinasa regulada por señales extracelulares.
FADD	<i>Fas-associating protein with a novel death domain</i> . Proteína adaptadora asociada a FAS con dominio de muerte.
FAS	Receptor de muerte, también denominado APO1 o CD95.
FASL	<i>FAS ligand</i> . Ligando del receptor de muerte FAS.
FBS	Suero bovino fetal.
GLOBOCAN	Observatorio Global del Cáncer; plataforma web interactiva desarrollada por la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC), dependiente de la Organización Mundial de la Salud, y que presenta las estadísticas globales del cáncer para informar sobre el control y la investigación sobre esta enfermedad.
GPCR	<i>G-protein coupled receptor</i> . Receptor asociado a proteína G.
HEPES	Ácido 2-[4-(2-hidroxietil)piperazin-1-il]etanosulfónico.
HSP70	<i>70 kDa Heat shock protein</i> . Proteína perteneciente a la familia de proteínas del choque térmico.
HRK	<i>Harakiri</i> . Proteína proapoptótica de la familia BCL-2.
HSF1	<i>Heat shock factor 1</i> . Factor de transcripción del choque térmico.

HT	Hipertermia.
JC-1	Ioduro de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolocarboanina.
JNK	<i>Jun N-terminal kinase</i> . Proteína quinasa N-terminal de Jun.
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinases</i> . Proteínas quinasas activadas por mitógenos.
MCL-1	<i>Myeloid cell leukemia sequence 1</i> . Proteína antiapoptótica de la familia BCL-2.
MEL	Melatonina.
MOMP	<i>Mitochondrial outer membrane permeabilization</i> . Permeabilización de la membrana mitocondrial externa.
MPT	<i>Mitochondrial permeability transition</i> . Permeabilidad mitocondrial transitoria.
MTT	Bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio.
NOXA	Proteína proapoptótica de la familia BCL-2.
PBS	Tampón fosfato salino.
PKA	Proteína quinasa A.
PKC	Proteína quinasa C.
PLA <sub>2</sub>	Fosfolipasa A <sub>2</sub> .
PLC	Fosfolipasa C.
PMSF	Fluoruro de metilsulfonilfenilo.
PUMA	<i>P53-upregulated modulator of apoptosis</i> . Proteína proapoptótica de la familia BCL-2.
PVDF	Fluoruro de poli-vinilideno.
ROS	Especies reactivas de oxígeno.
SDS	Dodecil sulfato sódico.
SMAC	<i>Second mitochondria-derived activator of caspase</i> . Factor proteico conocido también como DIABLO que bloquea a las proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAP).
SNAT	Serotonina N-acetil-transferasa.
TBST	Tampón Tris salino con Tween-20.
TEMED	N,N,N,N-tetrametil-etilendiamina.

TNF	Factor necrótico tumoral.
TPH	Triptófano hidroxilasa.
TRAIL	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i> . Ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF.
XIAP	<i>X-Linked inhibitor of apoptosis</i> . Proteína inhibidora de la apoptosis de la familia IAP.

# ÍNDICE DE CONTENIDOS

<b>I. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<i>La melatonina, una molécula endógena con multitud de propiedades biológicas .....</i>	<b>1</b>
<i>La hipertermia como tratamiento prometedor en la lucha contra el cáncer .....</i>	<b>7</b>
<i>La hipertermia induce muerte celular por apoptosis .....</i>	<b>9</b>
<i>Activación de la apoptosis por la vía intrínseca .....</i>	<b>11</b>
<i>Activación de la apoptosis por la vía extrínseca .....</i>	<b>16</b>
<b>II. OBJETIVOS .....</b>	<b>19</b>
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>21</b>
<b>REACTIVOS .....</b>	<b>21</b>
<i>Reactivos y material para los cultivos celulares .....</i>	<b>21</b>
<i>Reactivos para la determinación de la actividad caspasa .....</i>	<b>21</b>
<i>Reactivos para el análisis por inmunoblot .....</i>	<b>21</b>
<i>Reactivos para el análisis por citometría de flujo y microscopía de fluorescencia .....</i>	<b>22</b>
<i>Otros reactivos .....</i>	<b>22</b>
<b>INFRAESTRUCTURA UTILIZADA .....</b>	<b>23</b>
<b>MÉTODOS .....</b>	<b>24</b>

<i>Cultivos celulares .....</i>	<b>24</b>
<i>Tratamiento con hipertermia .....</i>	<b>25</b>
<i>Análisis de la morfología nuclear por microscopía de fluorescencia .....</i>	<b>27</b>
<i>Cuantificación de las células apoptóticas por citometría de flujo: fases del ciclo celular .....</i>	<b>27</b>
<i>Evaluación de la morfología ultraestructural por microscopía electrónica de transmisión .....</i>	<b>28</b>
<i>Determinación de la actividad caspasa .....</i>	<b>29</b>
<i>Análisis de la expresión, procesamiento y translocación de las proteínas por inmunoblot .....</i>	<b>30</b>
<i>Análisis del potencial de la membrana mitocondrial por citometría de flujo .....</i>	<b>33</b>
<i>Determinación del número de células y de la viabilidad celular</i>	<b>34</b>
<i>Valoración de la actividad metabólica por reducción del MTT</i>	<b>35</b>
<i>Análisis estadístico .....</i>	<b>36</b>
<b>IV. RESULTADOS</b>	<b>37</b>
<i>La melatonina potencia el efecto citotóxico de la hipertermia en las células leucémicas U-937 .....</i>	<b>37</b>
<i>La melatonina incrementa la apoptosis activada por la hipertermia en células U-937.....</i>	<b>38</b>
<i>Efecto diferencial de la melatonina sobre la apoptosis activada por la hipertermia en células leucémicas humanas</i>	<b>42</b>
<i>El procesamiento y la actividad catalítica de las caspasas promovidos por la hipertermia es favorecido por melatonina en células U-937 .....</i>	<b>46</b>



<i>Las caspasas son esenciales en la inducción de la apoptosis por la hipertermia y en el aumento de la citotoxicidad por la melatonina .....</i>	<b>49</b>
<i>La apoptosis inducida por la hipertermia y su potenciación por la melatonina es dependiente de la vía extrínseca.....</i>	<b>51</b>
<i>La melatonina potencia la activación de la vía intrínseca de la apoptosis sin perturbar el potencial de la membrana mitocondrial .....</i>	<b>52</b>
<i>La melatonina incrementa las propiedades citotóxicas de la hipertermia en células que expresan niveles elevados del factor de supervivencia BCL-2 .....</i>	<b>57</b>
<i>El efecto potenciador de la melatonina sobre las propiedades citotóxicas de la hipertermia es independiente del vehículo utilizado .....</i>	<b>60</b>
<b>V. DISCUSIÓN .....</b>	<b>63</b>
<b>VI. CONCLUSIONES .....</b>	<b>73</b>
<b>VII. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>75</b>
<b>VIII. ANEXOS .....</b>	<b>93</b>



### ***La melatonina, una molécula endógena con multitud de propiedades biológicas***

La melatonina (*N*-acetil-5-metoxi-triptamina) se aisló por primera vez de la glándula pineal bovina [1] y desde entonces se ha convertido en una de las moléculas biológicas más ampliamente estudiadas. Su papel ha sido investigado en mamíferos, aves, anfibios, reptiles y peces, y recientemente también en los vegetales [2].

La primera función atribuida a la melatonina estaba relacionada con la regulación del ciclo reproductivo en los mamíferos sensibles al fotoperiodo. Actualmente se sabe que se trata de una molécula que exhibe un gran espectro de acciones biológicas, destacando sus propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, la regulación del sueño, la regulación del peso, su papel como antidiabético y su función antitumoral, entre otras [3-8].

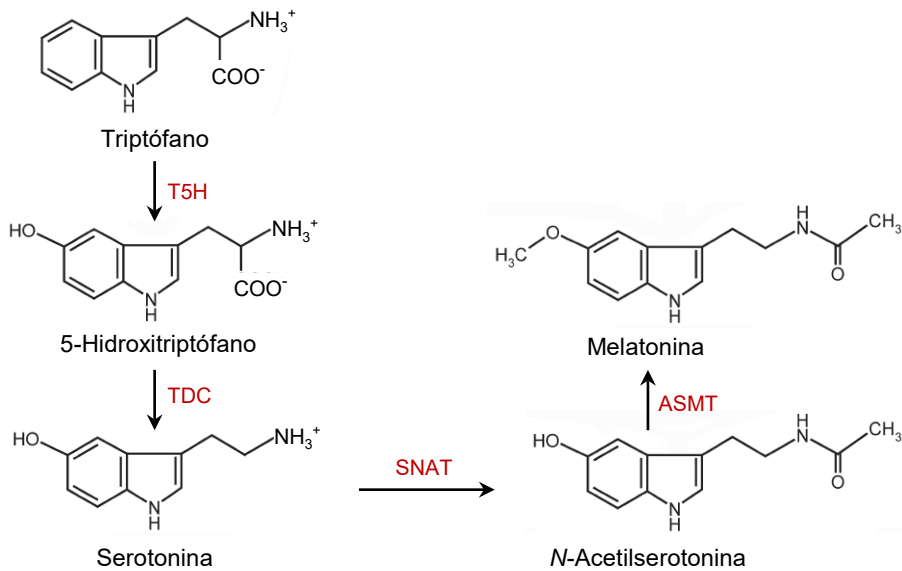
En la gran mayoría de organismos estudiados, la síntesis de melatonina ocurre durante la noche y la duración de la biosíntesis está directamente relacionada con la longitud del periodo de oscuridad [9]. Debido a esto, la melatonina es referida habitualmente como la expresión química de la oscuridad [10].

En todas las especies de mamíferos, la glándula pineal sintetiza y libera la melatonina siguiendo un ritmo circadiano, de modo que durante la noche los niveles en circulación son más elevados que durante el día. La ruta primaria de secreción de la melatonina pineal es directamente al fluido cerebroespinal más que directamente al torrente circulatorio [11]. Se piensa que los niveles elevados de melatonina en el fluido cerebroespinal pueden proteger al cerebro del daño oxidativo frente a las especies reactivas del oxígeno (ROS). Se calcula que aproximadamente el 4% del oxígeno consumido por los organismos durante el metabolismo aeróbico es reducido parcialmente y transformado en estas especies químicas tóxicas [12,13].

La biosíntesis de la melatonina tiene lugar a partir del triptófano, un aminoácido aromático esencial en animales que las células obtienen de la circulación tras la ingesta de alimentos. La vía metabólica está constituida por cuatro etapas enzimáticas y la serotonina [5-hidroxitriptamina) es un intermediario necesario (Figura 1). Para la formación de la melatonina, el triptófano, en primer lugar, es hidroxilado mediante la enzima *triptófano hidroxilasa* (TPH) y transformado en 5-hidroxitriptófano; este, a continuación, es descarboxilado por la enzima *descarboxilasa de aminoácidos aromáticos* (AADC), originando serotonina [14]. La transformación de este intermediario en el producto final, melatonina, implica otras dos reacciones enzimáticas. La serotonina es *N*-acetilada y transformada en *N*-acetil-serotonina por la *serotonina N-acetil-transferasa* (SNAT, también conocida como AANAT) y a continuación la *N*-acetil-serotonina es transformada en melatonina mediante la metilación del grupo hidroxilo, reacción catalizada por la enzima *N-acetil-serotonina O-metiltransferasa* (ASMT) [15].

Aunque inicialmente se pensó que la síntesis de melatonina era un proceso citosólico, las investigaciones más recientes avalan un modelo en el que la mitocondria desempeña el papel más relevante y eficiente [16]. Además de su capacidad biosintética, la mitocondria tiene capacidad para concentrar la melatonina exógena mediante la participación del transportador de oligopéptidos PET 1/2 y explica la mayor concentración de melatonina observada en este orgánulo en comparación con el citosol o la circulación [17,18]. Dado el papel que desempeña también como antioxidante su alta concentración intramitocondrial favorece la neutralización del exceso de radicales libres generados por la cadena transportadora de electrones [19].

La melatonina posiblemente está presente en todos los organismos vivos, incluyendo bacterias, levaduras y hongos. En las plantas, la biosíntesis de melatonina tiene lugar en las mitocondrias y también en los cloroplastos; la existencia de dos orgánulos productores de melatonina explicaría los mayores niveles encontrados en las células vegetales en comparación con las células animales [3,20].



**Figura 1. Biosíntesis de la melatonina en las células animales.** El triptófano es transportado a la matriz mitocondrial donde es transformado en 5-hidroxitriptófano mediante hidroxilación. Este, a su vez, es convertido en serotonina (5-hidroxitriptamina) a través de su descarboxilación. La serotonina es posteriormente acetilada formándose *N*-acetilserotonina que, tras la metilación de su grupo hidroxilo, es finalmente transformada en melatonina. Las enzimas implicadas en esta vía metabólica son: triptófano 5-hidroxilasa (T5H), triptófano descarboxilasa (TDC), serotonina *N*-acetil transferasa (SNAT; también conocida como arilquilamina *N*-acetil transferasa, AANAT) y la *N*-acetilserotonina metiltransferasa (ASMT).

En la dieta humana los vegetales constituyen una fuente exógena importante de melatonina. El esquema general de la biosíntesis de melatonina en vegetales y en microorganismos es muy similar a la descrita en animales ya que el triptófano es el precursor y la serotonina un intermediario obligatorio; no obstante, existen importantes diferencias en las reacciones individuales durante la conversión del triptófano en serotonina y la posterior transformación de este intermediario en melatonina.

La gran mayoría de las células, tejidos y órganos en vertebrados contienen melatonina y están equipadas con la maquinaria enzimática para llevar a cabo su síntesis. Los tejidos que más cantidad de melatonina producen son el intestino y la piel, y los mecanismos

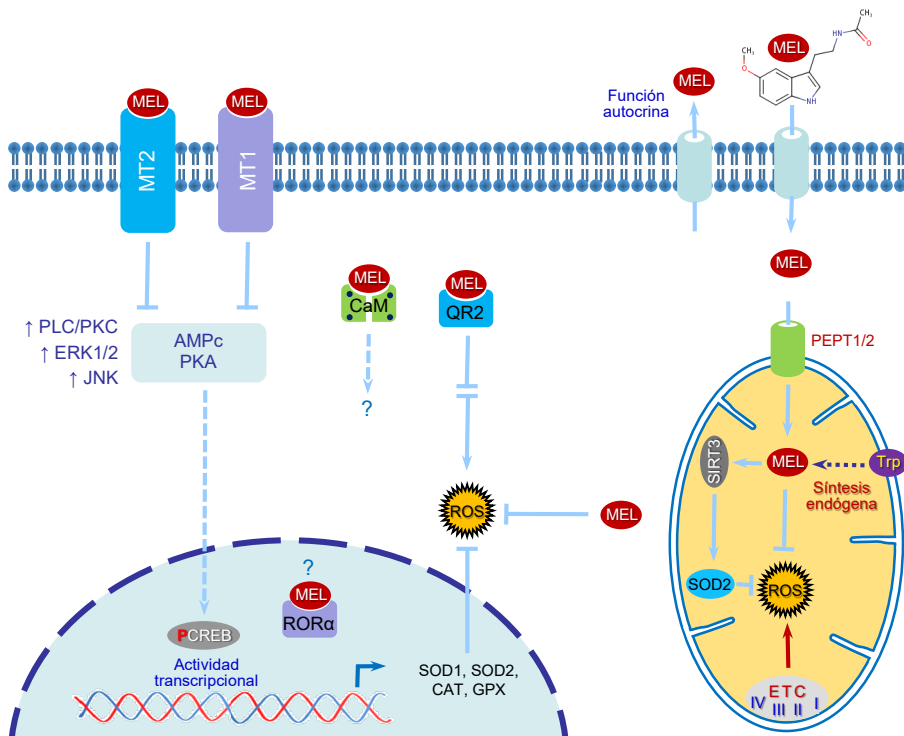
reguladores de la producción de melatonina extrapineal (excepto en la retina) posiblemente sean distintos que los descritos en la glándula pineal. En estos tejidos, la producción de melatonina no responde a los ciclos de luz-oscuridad y su regulación parece estar sujeta a la demanda local de los tejidos [4,21].

Muchos de los efectos fisiológicos de la melatonina son atribuidos a su interacción con dos receptores de membrana muy bien caracterizados, conocidos como MT1 y MT2, y que pertenecen a la familia de receptores con siete dominios transmembrana acoplados a proteínas G [22]. Estos receptores presentan un 60% de homología, están ampliamente distribuidos por todo el cuerpo y su expresión varía entre los distintos órganos y tejidos. La activación de los receptores MT1 y MT2 frecuentemente conlleva la reducción en la formación AMP cíclico (AMPC) mediante la inhibición de la adenilato ciclasa vía acoplamiento con  $G_i$ , y la consecuente disminución de la actividad proteína quinasa A (PKA) y de los niveles del factor de transcripción P-CREB [9]. Además de esta vía, otras vías de señalización como fosfolipasa C/proteína quinasa C (PLC/PKC), proteínas quinasas activadas por señales extracelulares (ERK1/2), canales de calcio y de potasio, pueden también ser activadas por melatonina, a través del acoplamiento vía  $G_q$  [9,23,24]. Específicamente, durante la activación de MT2 se ha descrito la inhibición de la formación de GMPc a través de una vía dependiente guanilato ciclasa soluble (Figura 2).

Aunque la afinidad de la melatonina por los receptores MT1 y MT2 es muy similar, existen importantes diferencias en la formación del complejo ternario con la proteína G. Además, estos receptores pueden coexistir en el mismo tejido y formar homodímeros y heterodímeros, pudiendo generar efectos fisiológicos mucho más potentes que el observado con los receptores individuales por separado [25]. La señalización mediada por los receptores MT1 y MT2 es, por tanto, más compleja y diversa que la imaginada inicialmente [9].

Además de los efectos fisiológicos atribuidos a la activación de los receptores de membrana, algunos de los efectos genómicos de la melatonina descritos podrían estar asociados con la interacción de

esta indolamida con el receptor huérfano relacionado con el ácido retinoico (ROR), principalmente los subtipos ROR $\alpha$  y ROR $\gamma$ . Además, en el citosol, la melatonina puede unirse a la calmodulina [26-28] y modular vías de señalización dependientes del calcio, y a altas concentraciones (>100  $\mu$ M) puede también unirse e inhibir a la enzima *quinona reductasa 2* (conocida también como MT3) y disminuir, por tanto, la generación de las especies reactivas de oxígeno producidas como consecuencia de la metabolización de las quinonas [29].



**Figura 2. Señalización mediada por la melatonina en las células animales.** Muchos procesos fisiológicos debidos a la melatonina dependen de su unión a receptores en la superficie celular (MT1, MT2) e inhibición de la producción del segundo mensajero AMPc, modificando de esta manera la señalización de PKA y la actividad transcripcional de P-CREB. Otras vías de señalización como PLC/PKC, ERK1/2 y JNK pueden también ser activadas por melatonina. Además, la melatonina tiene capacidad para unirse a proteínas citosólicas como calmodulina (CaM), *quinona reductasa 2* (QR2) o a factores de transcripción nucleares (ROR $\alpha$ ). En las células normales la melatonina desempeña una función esencial en la homeostasis mitocondrial al proteger a este orgánulo del daño oxidativo que pueden ocasionar

las especies reactivas del oxígeno (ROS), generadas principalmente por la actividad de los complejos I y III de la cadena transportadora de electrones (ETC). Esto lo consigue directamente, neutralizando a esas especies químicas tóxicas, o bien indirectamente, a través del aumento de la actividad de las enzimas antioxidantes como *superóxido dismutasa* (SOD1, SOD2), *catalasa* (CAT) o *glutación peroxidasa* (GPX). En la matriz mitocondrial la principal enzima antioxidante es SOD2 y su actividad aumenta por desacetilación, proceso catalizado por la deacetilasa *Sirtuin 3* (SIRT3) y cuya actividad es estimulada por la melatonina. Además, la melatonina contribuye también en determinadas circunstancias a la inhibición de la formación de ROS al unirse al sitio catalítico y bloquear la actividad enzimática de la *quinona reductasa 2*, implicada en procesos de destoxificación. En contraposición con este modelo, en gran variedad de células tumorales la melatonina exhibe propiedades prooxidantes que puede estimular la muerte celular; estos efectos se alcanzan normalmente con concentraciones elevadas, en el rango de micromolar a milimolar, descartando por tanto la participación de receptores de alta afinidad como MT1 y MT2. Aunque la función fisiológica de la unión de melatonina a calmodulina (CaM) no se conoce bien, en ciertas células tumorales parece estar relacionado con el aumento de ROS al favorecer la activación de *fosfolipasa A<sub>2</sub>* (PLA<sub>2</sub>). Existen evidencias que la melatonina podría utilizar los transportadores de glucosa GLUT-1 y GLUT-4 para entrar en la célula y que posteriormente se concentra en la matriz mitocondrial mediante la participación del transportador de oligopéptidos PEPT1/2.

Un gran número de estudios avalan un papel muy importante de la melatonina como agente antitumoral, influyendo en procesos celulares como la proliferación, la diferenciación, la autofagia y la apoptosis [30-32]. En este contexto se ha demostrado que específicamente puede activar las diferentes vías que desencadenan la muerte celular por apoptosis en diversos tipos de células cancerígenas [33-36]. Además, esta molécula potencia la eficacia de compuestos quimioterapéuticos tales como la puromicina, el cisplatino, la vincristina, la ifosfamida, el etopósido, el sorafenib (inhibidor multiquinasas de superficie) o el ligando inductor de apoptosis relacionado con el factor de necrosis tumoral (TRAIL) y de la radiación ionizante, en diferentes tipos de células tumorales humanas [37-43], al mismo tiempo que puede proteger al organismo de los efectos adversos de la quimioterapia y la radioterapia debido a sus propiedades inmunomoduladoras y a su baja toxicidad incluso a concentraciones muy elevadas [44].



### ***La hipertermia como tratamiento prometedor en la lucha contra el cáncer***

Según la Organización Mundial de la Salud cáncer es un término genérico utilizado para designar un amplio grupo de enfermedades que puede afectar a cualquier parte del organismo. El cáncer se caracteriza por la multiplicación rápida de células anormales, pudiendo invadir tejidos adyacentes o propagarse a otros órganos en un proceso que se denomina metástasis.

Se han identificado diez capacidades biológicas adquiridas por las células cancerígenas que van a favorecer el crecimiento del tumor y la diseminación de las células tumorales [45,46]. Estas son: i) inmortalidad replicativa, ii) independencia de señales de crecimiento, iii) insensibilidad a inhibidores del crecimiento, iv) evasión de la apoptosis, v) inducción de angiogénesis, vi) capacidad de invasión y metástasis, vii) reprogramación del metabolismo energético, viii) evasión del sistema inmune, ix) contribución al mantenimiento de un microambiente inflamatorio, x) inestabilidad y mutación genómica.

A pesar de los notables avances en la prevención, el diagnóstico precoz y en los tratamientos, la incidencia del cáncer continúa aumentando. De acuerdo con los datos publicados por GLOBOCAN, en el 2020 se diagnosticaron en todo el planeta 19.3 millones de nuevos casos y casi 10 millones de fallecimientos. Se estima que en el 2040 la incidencia será de 30.2 millones y la mortalidad asociada aumentará hasta los 16.3 millones [47]. Debido al aumento de la esperanza de vida se espera que la prevalencia de la enfermedad aumente también gradualmente.

El cáncer sigue siendo una enfermedad devastadora a pesar de los grandes esfuerzos que se han hecho con el fin de desarrollar modalidades terapéuticas alternativas. Los tratamientos más comunes son la cirugía, la quimioterapia y la radioterapia. Otras opciones más recientes y en desarrollo incluyen la terapia dirigida, la inmunoterapia y la hipertermia o termoterapia.

La hipertermia es una opción terapéutica frente al cáncer en la que un área específica del cuerpo, o bien el cuerpo entero, es expuesto a una fuente de energía con el fin de incrementar la temperatura por encima de los valores fisiológicos, normalmente en el intervalo de 39-45 °C, con el fin de conseguir efectos terapéuticos [48,49]. La utilización de esta tecnología en clínica implica la disponibilidad de equipamiento especializado que consigue la elevación controlada de la temperatura mediante la radiación electromagnética, los ultrasonidos, la perfusión o la conductividad [50].

El efecto terapéutico depende de la temperatura y de la duración de la exposición, lo que se conoce como dosis térmica. A mayor temperatura y dosis térmica la eficacia es más alta, pero también se asocia con niveles más elevados de toxicidad térmica. Habitualmente la temperatura elegida es de 43 °C y la duración del tratamiento suele ser de sesenta minutos como máximo [51]. La hipertermia ha demostrado ser una potente modalidad de tratamiento frente al cáncer cuando se combina con quimioterapia o radioterapia [52-55]. El tratamiento se aplica típicamente una o dos veces por semana y la combinación ha demostrado potenciar el efecto terapéutico [50].

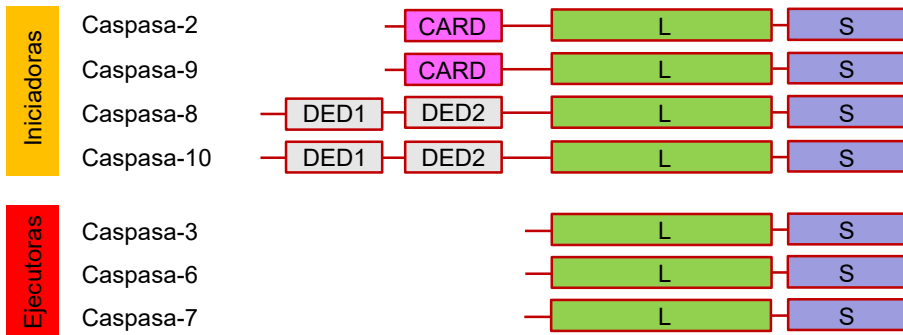
La hipertermia influye en el efecto de los agentes antitumorales a través de varios mecanismos. El microambiente de los tumores sólidos, en comparación con el tejido sano, se caracteriza por presentar hipoxia y pH ácido, consecuencia de una vascularización anómala y del aumento en la glucólisis. Esa vascularización aberrante favorece el calentamiento selectivo del tumor respecto al tejido sano circundante debido a que el flujo sanguíneo, responsable de la disipación del calor, es menor en el tumor [56,57]. Diversos estudios señalan, además, que durante la hipertermia aumenta el flujo sanguíneo y la oxigenación del tejido tumoral, lo que puede ser beneficioso: i) para el acceso al tejido enfermo de los agentes quimioterapéuticos o inmunoterapéuticos [58,59] y ii) para mejorar la eficacia de la radioterapia o quimioterapia, ya que la formación de especies reactivas del oxígeno que desencadenan estos tratamientos aumenta notablemente cuando los niveles de O<sub>2</sub> se elevan, lo que a su vez deriva en un mayor daño del DNA [49]. Actualmente se investiga

el uso de nanopartículas con propiedades magnéticas para conseguir incrementar la temperatura localmente y específicamente dentro del tumor [60,61].

### ***La hipertermia induce muerte celular por apoptosis***

A nivel celular, la hipertermia interfiere con los mecanismos encargados de la reparación del DNA [62]. La respuesta de las células a la hipertermia depende en gran medida de la intensidad y de la duración del tratamiento. La exposición de las células a una situación de estrés térmico conduce a la activación de varias vías de señalización, algunas implicadas en la supervivencia celular como es la biosíntesis de las proteínas del choque térmico (HSPs) y otras con la activación de la muerte celular, habitualmente mediante apoptosis [63].

La muerte celular, independientemente de la modalidad, se manifiesta con alteraciones morfológicas. En la apoptosis, estos cambios consisten en la reducción del volumen celular, la condensación de la cromatina, la fragmentación nuclear y la formación de evaginaciones en la membrana celular que terminan transformándose en vesículas que son fagocitadas en condiciones fisiológicas. Todas estas alteraciones son la manifestación de los cambios bioquímicos que ocurren durante la apoptosis. Los mediadores moleculares fundamentales de este proceso son las caspasas (Figura 3), un grupo de cisteín-proteasas que promueve la fragmentación de una gran variedad de proteínas con funciones diversas y en sitios específicos. En general, la secuencia reconocida finaliza en aspartato y la rotura es inmediatamente después de este aminoácido [64].

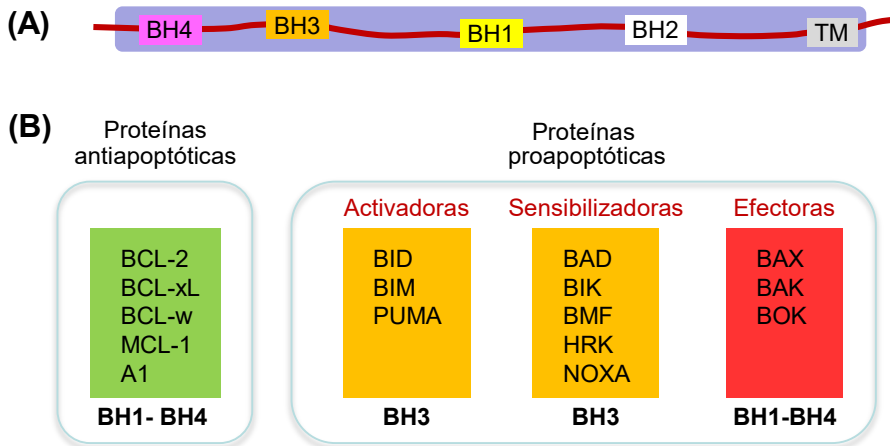


**Figura 3. Organización estructural y clasificación funcional de las caspasas de mamíferos involucradas en la apoptosis.** Todas las procaspasas presentan tres regiones denominadas prodominio, subunidad larga (L) y subunidad corta (S). Las dos últimas regiones están separadas por uno o varios sitios sensibles a la rotura por la propia caspasa una vez activada (rotura autocatalítica) o por otra proteasa, usualmente por otra caspasa. Las caspasas iniciadoras presentan prodominios largos que contienen regiones (DED1, DED2 o CARD) que interactúan con proteínas adaptadoras. Por el contrario, las caspasas ejecutoras tienen prodominios cortos que carecen de sitios de interacción con otras proteínas. Las caspasas iniciadoras preexisten en las células como monómeros inactivos y se activan mediante dimerización. La fragmentación autoproteolítica posterior va a favorecer que el dímero activo sea mucho más estable. Las caspasas responsables de ejecutar la apoptosis preexisten en las células como dímeros inactivos que son activados por la rotura hidrolítica entre las subunidades grande y pequeña. Se presenta un esquema simplificado de la estructura lineal de las diferentes caspasas, la longitud y la posición relativa de las diferentes regiones pueden diferir.

En condiciones fisiológicas las células apoptóticas conservan la integridad de la membrana plasmática y cierto grado de actividad metabólica mientras el proceso avanza, lo que permite que sean rápidamente eliminadas por macrófagos y otras células fagocíticas. Por el contrario, en los cultivos celulares, salvo que las células presenten actividad fagocítica, la membrana de las células apoptóticas terminan por romperse lo que conduce a una morfología necrótica, proceso conocido como necrosis secundaria [65]. La apoptosis puede iniciarse a través de dos vías que han sido ampliamente estudiadas. Son las denominadas vía intrínseca, también conocida como vía mitocondrial dado el papel central que desempeña este orgánulo, y la vía extrínseca, denominada así porque la activación del proceso es dependiente de los receptores de muerte presentes en la membrana celular [66].

**Activación de la apoptosis por la vía intrínseca**

La vía intrínseca es iniciada por perturbaciones en el microambiente intracelular o extracelular, tales como daño en el DNA, estrés del retículo endoplasmático, aumento de las especies reactivas de oxígeno, alteraciones en los microtúbulos, defectos en la mitosis o déficit de factores de crecimiento. El aumento de la permeabilidad de la membrana mitocondrial externa (MOMP) es la etapa más crítica en la vía intrínseca, proceso controlado por un grupo de proteínas reguladoras de la apoptosis con propiedades antiapoptóticas o proapoptóticas pertenecientes a la familia BCL-2 (Figura 4).



**Figura 4. Organización estructural y funcional de las proteínas de la familia BCL-2.** (A) Representación esquemática de la organización estructural de las proteínas de la familia BCL-2, identificándose las regiones con homología BCL-2 (BH1, BH2, BH3 y BH4), enumeradas por orden cronológico de identificación, y la región transmembrana (TM). (B) Las proteínas de la familia BCL-2 se clasifican en antiapoptóticas y proapoptóticas. Las tres clases de proteínas proapoptóticas son las activadoras, las sensibilizadoras y las efectoras. Todas las activadoras y sensibilizadoras presentan solamente la región 3 con homología BCL-2, por lo que se les conoce también como proteínas solo BH3. Las proteínas efectoras y las proteínas antiapoptóticas comparten las cuatro regiones con homología BCL-2 (BH1-BH4).

Las proteínas de esta familia presentan similitud estructural con la proteína BCL-2, el prototipo de inhibidor de la apoptosis y originariamente descrito como el producto de un protooncogén. Todas ellas presentan al menos una región con homología con algunos de los cuatro dominios característicos de la proteína BCL-2 y que se conocen como BH1, BH2, BH3 y BH4 [67,68].

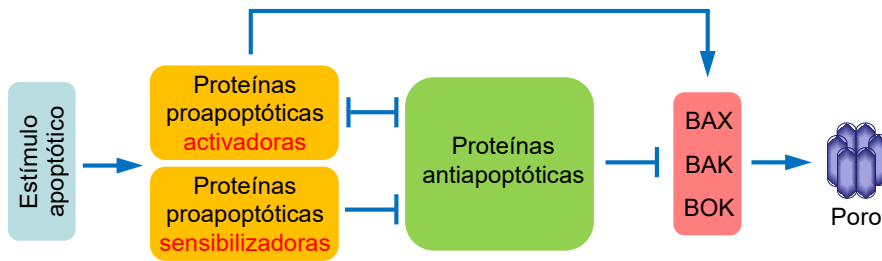
Las proteínas antiapoptóticas y las proapoptóticas con capacidad para formar poros, denominadas efectoras, contienen los cuatro dominios (BH1-BH4) y adoptan una estructura terciaria altamente conservada en la que el dominio BH3 forma parte de una hendidura que actúa como receptor para el dominio BH3 de los otros miembros de la familia. Se han propuesto varios modelos de competición para explicar cómo las proteínas de la familia BCL-2 interactúan entre sí en la membrana mitocondrial externa para controlar la permeabilidad de la misma. El destino final de la célula va a depender de una compleja red de interacciones entre los miembros de la familia BCL-2, que está condicionada por la abundancia de los distintos factores y la afinidad que presentan entre ellos [69,70].

En condiciones fisiológicas la membrana mitocondrial externa es permeable a moléculas de tamaño inferior a 5 kDa y durante la permeabilización se forman poros que permiten el paso al citosol de proteínas de hasta 100 kDa [67,71]. En respuesta a un estímulo apoptótico, el aumento de la permeabilidad mitocondrial está mediado por BAX, BAK y BOK, únicos miembros de la familia BCL-2 que han demostrado capacidad para formar poros en la membrana mitocondrial externa y posiblemente en otras membranas intracelulares [70]. No obstante, si se compara con BAX o con BAK, la relevancia de BOK en la apoptosis no es tan evidente ya que ha sido muy poco estudiado.

En condiciones normales la localización de BAX oscila entre la membrana mitocondrial externa y el citosol, proceso conocido como retrotranslocación. Por el contrario, BAK reside mayoritariamente en la membrana mitocondrial externa a través de la interacción de la

hélice  $\alpha$ -9 en el extremo C-terminal con la bicapa lipídica (es más hidrofóbica que la hélice  $\alpha$ -9 de BAX). Una vez iniciada la apoptosis, la retrotranslocación se detiene. En la membrana mitocondrial, BAX y BAK son activadas por las proteínas proapoptóticas solo BH3, directamente (activadoras) o indirectamente (sensibilizadoras) [72,73]. Las proteínas activadoras son BID, BIM y PUMA, y tienen la capacidad de interactuar transitoriamente con BAX y con BAK en la membrana mitocondrial externa. Como consecuencia de los contactos BAX y BAK sufren cambios conformacionales que tienen las siguientes consecuencias: i) liberación de las proteínas activadoras, ii) homodimerización (y en menor medida heterodimerización), iii) oligomerización a partir de los dímeros y iv) formación del poro mitocondrial [74].

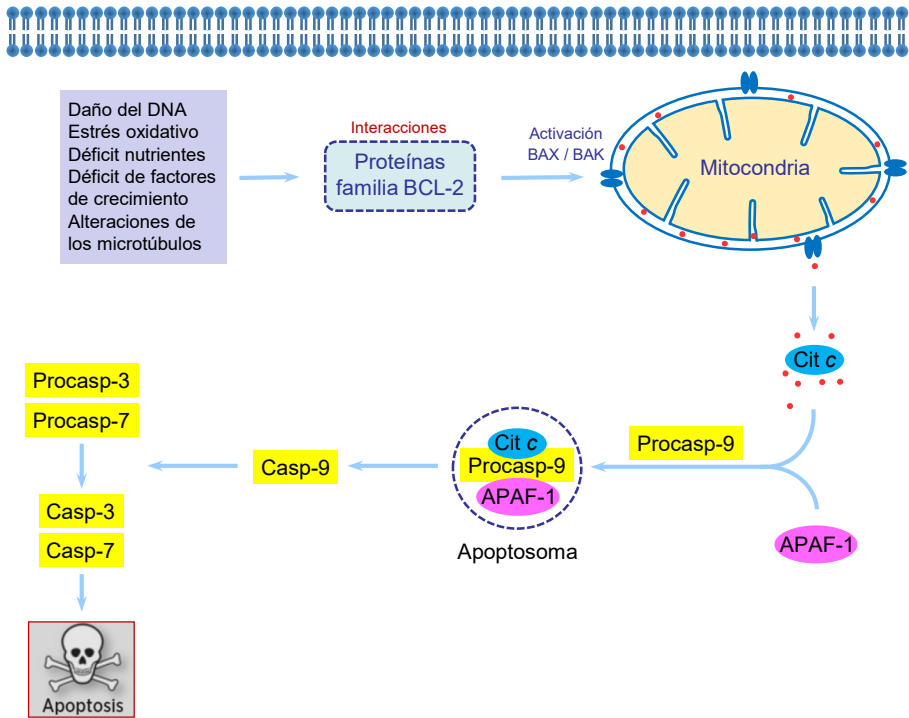
El aumento de la permeabilidad de la membrana mitocondrial externa es antagonizado/neutralizado por los miembros antiapoptóticos de la familia BCL-2 como son BCL-2, BCL-xL, BCL-w, BCL-2-A1 (también conocido como BFL-1) y MCL-1. Todos estos factores contienen los cuatro dominios BH, se encuentran generalmente insertados en la membrana mitocondrial externa o en la del retículo endoplasmático a través de la hélice  $\alpha$ 9 de la región transmembrana y se unen y neutralizan a los miembros proapoptóticos. La mayoría de los factores antiapoptóticos inhiben la capacidad de BAX y BAK para oligomerizar y formar poros en la mitocondria a través de una acción directa (secuestrándolos en la membrana mitocondrial externa) o bien indirecta (secuestrando a los activadores BH3 proapoptóticos). En el caso de BCL-xL, su función antiapoptótica la ejerce mediante retrotranslocación de BAX y BAK desde la mitocondria al citosol, lo que consigue reducir los niveles de estos últimos en la membrana mitocondrial externa [75]. Es importante destacar que algunas de las proteínas BH3 proapoptóticas como BAD, BMF y HRK, promueven MOMP en ausencia de contacto físico con BAX o con BAK. Estas proteínas, conocidas como sensibilizadoras, actúan uniéndose a las proteínas antiapoptóticas de modo que la disponibilidad de estas últimas para secuestrar a BAX, BAK o a sus activadoras con dominio BH3 se vea comprometida (Figura 5).



**Figura 5. Activación de la vía intrínseca de la apoptosis.** Las proteínas antiapoptóticas protegen a la célula frente a la apoptosis secuestrando a las proteínas activadoras y neutralizando directamente a las proteínas efectoras. La vía se activa con el aumento de los niveles de las proteínas proapoptóticas activadoras y sensibilizadoras, en respuesta a estímulos como el daño en el DNA (radiación, agentes químicos) o en los orgánulos, inhibición de vías de señalización, falta de nutrientes o de factores de crecimiento, etc. El cambio en la proporción de proteínas proapoptóticas frente a las antiapoptóticas conlleva que se altere la red de interacciones entre los distintos factores. En estas condiciones, las proteínas proapoptóticas activadoras interaccionan directamente con las proteínas efectoras formadoras de poro (BAX y BAK) y secuestran a las proteínas antiapoptóticas. A diferencia de las activadoras, las proteínas sensibilizadoras inducen la formación de poros de manera indirecta ya que se unen a las proteínas antiapoptóticas e inducen la liberación y activación de las proteínas efectoras que, en forma libre, oligomerizan en la membrana mitocondrial externa y promueven el aumento de la permeabilidad.

El aumento de la permeabilidad de la membrana mitocondrial externa promueve el acceso al citosol de factores apoptogénicos que residen en el espacio intermembrana. Entre estas proteínas mitocondriales están el citocromo *c* (12 kDa), SMAC (22 kDa) y AIF (67 kDa) y ello está favorecido por la remodelación de las crestas mitocondriales [76]. El citocromo *c* citosólico se une a APAF-1, procaspasa-9 y dATP para formar un complejo molecular denominado apoptosoma, que es el responsable de la activación y posterior maduración autocatalítica de procaspasa-9. Una vez activada, la caspasa-9 cataliza la activación proteolítica de la caspasa-3 y la caspasa-7, las enzimas encargadas de la demolición celular durante la apoptosis en las células de mamíferos, por lo que se las conoce como caspasas ejecutoras (Figura 6).



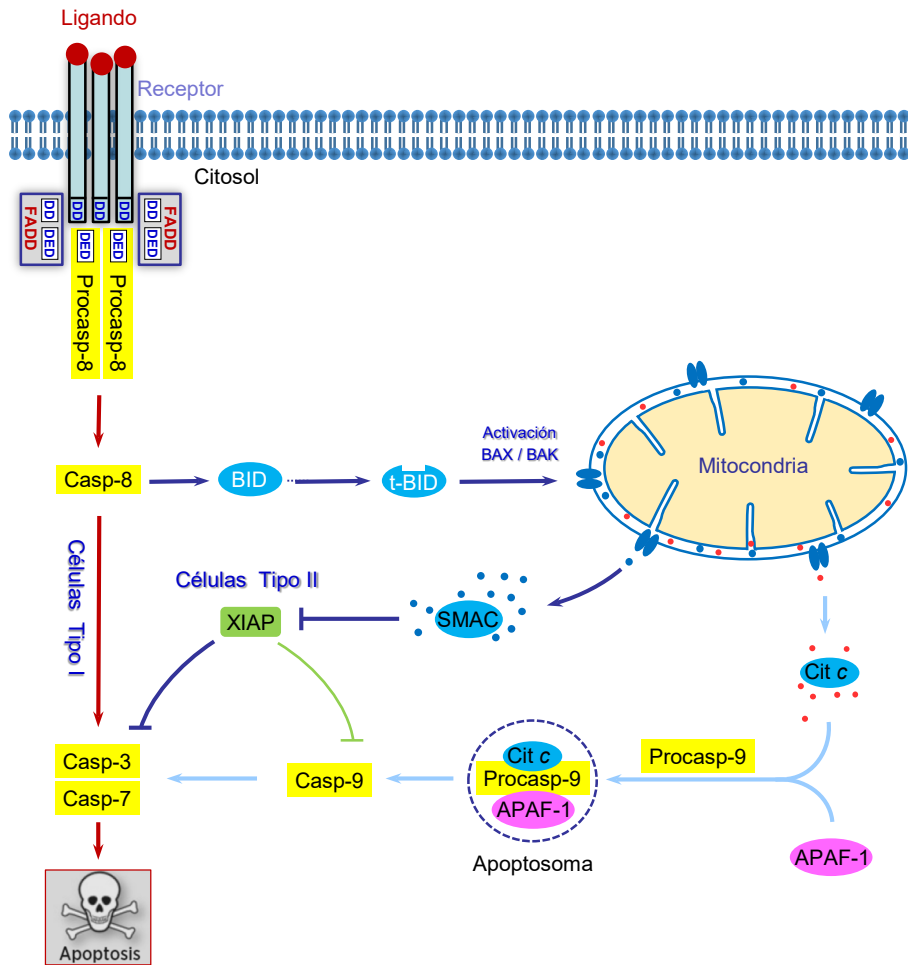


**Figura 6. Activación de la vía intrínseca de la apoptosis.** La vía intrínseca se activa en respuesta a diversos estímulos extracelulares o intracelulares como son el daño en el DNA causado por radiación o por agentes químicos, estrés oxidativo, falta de nutrientes o de factores de crecimiento. El aumento en la proporción de las proteínas proapoptóticas frente a las antiapoptóticas conlleva que se altere la red de interacciones entre los distintos miembros de la familia BCL-2. En estas condiciones las proteínas proapoptóticas activadoras interaccionan directamente con las proteínas efectoras formadoras de poro como BAX y/o BAK y promueven el aumento de la permeabilidad de la membrana mitocondrial externa (MOMP) y la liberación de factores apoptogénicos al citosol, principalmente citocromo c. En el citosol, el citocromo c facilita la formación del apoptosoma y la activación de la caspasa-9 que, a su vez, activa a las caspasas ejecutoras (principalmente caspasa-3) responsables del desmantelamiento de las estructuras y funciones esenciales de la célula. Aunque la participación de BAX y BAK en el aumento de la permeabilidad de la membrana mitocondrial externa está ampliamente documentada, no se conoce de qué forma estas proteínas permeabilizan la membrana mitocondrial y la naturaleza (proteica o lipídica) del poro. La información experimental sobre BOK es más limitada; se desconoce su contribución a la apoptosis en condiciones de ausencia de las otras dos proteínas efectoras y cómo promueve la permeabilidad mitocondrial.

Las caspasas ejecutoras aceleran el desmantelamiento de la estructura celular y son las responsables de los cambios morfológicos y bioquímicos asociados a la apoptosis como son la fragmentación del DNA, la externalización de la fosfatidilserina y la formación de cuerpos apoptóticos [77,78]. El aumento de la permeabilidad de la membrana mitocondrial externa conduce a la disipación del potencial mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ), consecuencia de una actividad respiratoria reducida por la pérdida de la proteína transportadora de electrones citocromo c. Las funciones que dependen del potencial mitocondrial, como la síntesis de ATP y el transporte de proteínas codificadas por genes nucleares al interior de la mitocondria, se ven también comprometidas.

### ***Activación de la apoptosis por la vía extrínseca***

La vía extrínseca (Figura 7) es iniciada por perturbaciones en el medio extracelular e implica la participación de receptores de membrana (i.e. receptores de muerte) activados por la unión a ligandos específicos [79]. Entre los receptores de muerte se incluyen a FAS (=CD95=APO1) y a los miembros de la superfamilia de TNF como TNFR1, TRAILR1 (=DR4) y TRAILR2 (=DR5) [80,81]. Generalmente la unión del ligando promueve la formación intracelular del complejo de señalización inductor de muerte (DISC), implicado en la activación de la procaspasa-8 (y también de la procaspasa-10). Tras la unión del ligando se estabiliza la estructura homotrimérica del receptor y este último sufre cambios conformacionales en el lado intracelular que tienen las siguientes consecuencias: i) se exponen los dominios de muerte (DD) del receptor que interactúan con los dominios de muerte presentes en el lado C-terminal de la proteína adaptadora FADD y ii) los dominios efectores de muerte (DED) presentes en el lado N-terminal de esta última interactúan a su vez con los dominios DED de la procaspasa-8. La interacción a través de los dominios DED favorece la homodimerización de la procaspasa-8 y, consecuentemente, su activación que va a estar regulada positivamente o negativamente por factores proteicos estructuralmente relacionados (c-FLIP) que se unen a DISC, y posiblemente también por fosforilación [82].



**Figura 7. Activación de la vía extrínseca de la apoptosis.** La vía extrínseca se inicia con la unión de los receptores de muerte presentes en la membrana celular a sus ligandos específicos. Existen muchas evidencias de que los receptores se encuentran en forma trimérica antes de que ocurra la interacción con el ligando. Tras la unión del ligando, el trímero sufre cambios conformacionales intracelulares complejos: expone una región denominada dominio de muerte (DD) que presenta afinidad por una proteína adaptadora (FADD) y cuya misión es actuar de puente entre el receptor y la procaspasa-8 (o procaspasa-10). Esta estructura macromolecular intracelular se conoce como complejo de señalización inductor de muerte (DISC) y en ella la procaspasa-8 adquiere actividad autocatalítica, liberándose caspasa-8 con mayor capacidad para acceder a los sustratos proteicos. En las células de tipo I, la actividad caspasa-8 es suficiente para activar a caspasa-3 y a caspasa-7 y, por lo

tanto, para la ejecución de la apoptosis. Sin embargo, en otro tipo de células (células de tipo II) los niveles endógenos de ciertos inhibidores de la caspasa-3 y de la caspasa-7 como XIAP son muy elevados y es necesario neutralizarlos. Esto se consigue a través del aumento de la permeabilidad de la membrana mitocondrial externa mediante la participación del activador proapoptótico t-BID y cuya formación es dependiente de la caspasa-8. La liberación al citosol de la proteína mitocondrial SMAC conlleva la neutralización de XIAP y que las caspasas ejecutoras aumenten su actividad enzimática, pudiendo llevar a cabo la rotura de múltiples proteínas. En estas condiciones, la activación de la caspasa-9 que precede a la liberación de citocromo c vía t-BID contribuye también a la amplificación de la señal apoptótica. Aunque XIAP puede también inhibir a la caspasa-9, la afinidad que presenta por esta caspasa ejecutora es sensiblemente inferior.

Una vez activada la vía extrínseca, la apoptosis puede ejecutarse siguiendo dos alternativas. En las células denominadas de tipo I, como timocitos o linfocitos maduros, la activación proteolítica de las caspasas ejecutoras se lleva a cabo solo por la caspasa-8 ya que es suficiente para producir apoptosis. En las células de tipo II, es el caso de los hepatocitos, células  $\beta$ -pancreáticas o la mayoría de células cancerígenas, la activación de las caspasas ejecutoras por la acción directa de la caspasa-8 es muy limitada debido a la presencia de inhibidores de las caspasas ejecutoras. Es el caso de XIAP, un miembro perteneciente a la familia de proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAP) que bloquea la actividad catalítica de la caspasa-3 y de la caspasa-7, y en menor medida de la caspasa-9 [83]. Para superar este bloqueo es necesario que la caspasa-8 active proteolíticamente al factor proapoptótico BID. La forma madura o truncada de BID (t-BID) se inserta en la membrana mitocondrial externa donde actúa como activador de BAX y BAK, favoreciendo el aumento de la permeabilidad de la membrana mitocondrial externa y promoviendo de esta forma la liberación de citocromo c (y por tanto la activación de la caspasa-9) y de SMAC, que neutraliza el efecto inhibitorio de XIAP sobre las caspasas ejecutoras.

Existen muchas evidencias científicas sobre las propiedades antitumorales de la melatonina y su reducida toxicidad *in vivo*, incluso cuando se utiliza a concentraciones que superan en varios órdenes de magnitud los niveles que se alcanzan en la circulación sanguínea durante la noche [84-87].

En un estudio reciente realizado en ratas se consiguió reducir el tamaño de los tumores inducidos con células de carcinosarcoma Walker 256, utilizando como estrategia terapéutica la combinación de hipertermia y melatonina; los mecanismos involucrados en la actividad antitumoral de ese tratamiento, sin embargo, no fueron investigados [88]. En base a lo anteriormente expuesto sobre la melatonina y teniendo en cuenta el uso cada vez más frecuente de la hipertermia como estrategia terapéutica frente al cáncer, estudiar y valorar el posible impacto del tratamiento con melatonina sobre la muerte celular inducida por hipertermia es relevante.

Específicamente, en el presente trabajo se investigó la capacidad de la melatonina para modular las propiedades antitumorales de la hipertermia. Para alcanzar los objetivos se seleccionó la línea de leucemia mieloide aguda humana U-937, ampliamente utilizada como modelo *in vitro* en el estudio de la muerte celular activada por calor [48]. Los resultados de este trabajo revelan que la eficacia de la hipertermia en la inducción de la muerte celular por apoptosis aumenta notablemente cuando el tratamiento se hace en combinación con la indolamida. Para su comparación se analizó también el efecto de la melatonina en otras líneas de células de leucemia humana como son HL-60, MOLT-3 y K-562.



### REACTIVOS

#### ***Reactivos y material para los cultivos celulares***

El medio de cultivo RPMI 1640 y el suero bovino fetal se obtuvieron de Gibco. La mezcla concentrada (100x) de los antibióticos estreptomicina y penicilina G fue de Biowest. El material plástico estéril como botellas de cultivo de 75 cm<sup>2</sup>, platos de 100 mm, placas de 12 y 96 pocillos, pipetas de 5 ml y de 10 ml, tubos tipo Falcon de 50 ml y tubos de poliestireno de 12 ml se adquirieron de Becton-Dickinson. El dimetilsulfóxido (DMSO) y el azul de tripán, ambos estériles, fueron de Sigma.

#### ***Reactivos para la determinación de la actividad caspasa***

Los inhibidores de caspasas benciloxi-carbonil-Val-Ala-Asp (OMe)-fluorometilcetona (z-VAD-fmk), benciloxi-carbonil-Val-Asp-Val-Ala-Asp-(OMe)-fluorometilcetona (z-VDVAD-fmk), benciloxi-carbonil-Asp-Glu-Val-Asp-(OMe)-fluorometilcetona (z-DEVD-fmk), benciloxi-carbonil-Val-Asp-Val-Ala-Asp-(OMe)-fluorometilcetona (z-IETD-fmk) y benciloxi-carbonil-Leu-Glu-His-Asp-(OMe)-fluorometilcetona (z-LEHD-fmk), y los sustratos colorimétricos *N*-acetil-Val-Asp-Ala-Asp-*p*-nitroanilina (Ac-VDVAD-*p*NA), *N*-acetil-Asp-Glu-Val-Asp-*p*-nitroanilina (Ac-DEVD-*p*NA), *N*-acetil-Ile-Glu-Thr-Asp-*p*-nitroanilina (Ac-IETD-*p*NA) y *N*-acetil-Leu-Glu-His-Asp-*p*-nitroanilina (Ac-LEHD-*p*NA) fueron obtenidos de Sigma.

#### ***Reactivos para el análisis por inmunoblot***

La mezcla de acrilamida-bisacrilamida (bis *N,N'*-metilen-bis-acrilamida) (40% p/v, proporción de monómeros totales respecto al agente entrecruzante 29:1), el persulfato amónico, el *N,N,N,N*-tetrametil-etilendiamina (TEMED), el dodecil sulfato sódico (SDS) y el marcador coloreado de pesos moleculares Precision Plus Protein Dual Color Standards (10 kDa-250 kDa) se obtuvieron de Bio-Rad. El azul de bromofenol, el β-mercaptoetanol, la glicina, así como trizma-base y trizma-HCl fueron de Sigma. El metanol se obtuvo de AppliChem.

Los anticuerpos primarios que reconocen a caspasa-2 (Cat# 551093, RRID:AB\_394042), caspasa-6 (Cat# 556581, RRID:AB\_396471), caspasa-7 (Cat# 556541, RRID:AB\_396460), caspasa-8 (Cat# 559932, RRID:AB\_397381), caspasa-9 (Cat# 551246, RRID:AB\_394118), citocromo *c* (Cat# 556433, RRID:AB\_396417), Bid (Cat# 550365, RRID:AB\_393636) y Bax (Cat# 554104, RRID:AB\_395241) se obtuvieron de BD Biosciences. El anticuerpo dirigido frente a caspasa-3 (Cat# ADI-AAP-113, RRID:AB\_10615972) se adquirió de Enzo Life Sciences mientras que el anticuerpo frente a HSP70 (Cat# sc-24, RRID:AB\_627760) se obtuvo de Santa Cruz Biotechnology y el de  $\beta$ -actina (Cat# A2228, RRID:AB\_476697) fue de Sigma.

Los anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa de rábano anti-IgG de ratón (Cat# NA9310, RRID:AB\_772193) y anti-IgG de conejo (Cat# NA9340, RRID:AB\_772191) fueron de GE Healthcare. Las membranas de PVDF (difluoruro de polivinilideno) y el sustrato de revelado por quimioluminiscencia se obtuvieron de Millipore.

### ***Reactivos para el análisis por citometría de flujo y microscopía de fluorescencia***

El yoduro de propidio, el yoduro de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetil-bencimidazol-carbocianina (JC-1), el cianuro *m*-clorofenil hidrazona (CCCP), la RNasa A, la proteinasa K, el paraformaldehído y la bisbencimida (Hoechst 33258) fueron suministrados por Sigma.

### **Otros reactivos**

El PBS estéril y concentrado (10x), la melatonina, la albúmina de suero bovino (BSA), el fosfato monosódico, el fosfato disódico, el ácido *N*-(2-hidroxietil) piperazino *N'*-(2-etanosulfónico) (HEPES), el ácido etilendiamino-tetraacético (EDTA), el ácido etilenglicol-bis-*N,N'*-tetraacético (EGTA), el cloruro de sodio (NaCl), el cloruro de potasio (KCl), el hidróxido de sodio (NaOH), el ácido clorhídrico (HCl), el glicerol, el bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio (MTT), la sacarosa, los inhibidores de proteasas (aprotinina,



leupeptina, pepstatina y PMSF), los inhibidores de fosfatasa (fluoruro sódico,  $\beta$ -glicerofosfato sódico, ortovanadato sódico y pirofosfato sódico), el agente reductor ditioneitol (DTT) y los detergentes no iónicos tritón X-100 y tween 20 provinieron de Sigma. El etanol de grado analítico para la disolución de la melatonina se adquirió de BDH mientras que el utilizado para la esterilización de superficies de trabajo relacionadas con los cultivos celulares se obtuvo de Artemi. El agua desionizada y bidestilada se generó con un equipo Mili-Q (Water Purification System) de Millipore. El reactivo de Bradford se adquirió a Bio-Rad.

### INFRAESTRUCTURA UTILIZADA

Para llevar a cabo los cultivos celulares y el mantenimiento de las células se utilizaron las campanas de flujo laminar Cultair y Faster BHA 48 (ambas de Cultek), el incubador de CO<sub>2</sub> Shel Lab (Sheldon Manufacturing), el microscopio de contraste de fases Axiovert 135 (Zeiss), la centrífuga de velocidad intermedia Universal 320R (Hettich) y el baño termostático digital WB01 (LBX Instruments).

El análisis del ciclo celular (apoptosis) y el potencial de la membrana mitocondrial interna se realizó con el citómetro de flujo BD FACSVerser (BD Biosciences).

Para el estudio de la morfología nuclear se empleó el microscopio invertido de fluorescencia Axiovert 200M (Zeiss). Para el análisis de la expresión de las proteínas se utilizó el equipo de electroforesis / transferencia Mini-Protean Tetra System, la fuente de alimentación PowerPac 300 y el equipo de detección por quimioluminiscencia ChemiDoc, todos de Bio-Rad.

El calentamiento en seco de las muestras de proteínas se realizó con un termobloque digital Dry Bath-Dual Block (Labnet). El baño de agua utilizado para el tratamiento con hipertermia estaba equipado con varios módulos independientes y fue de P-Selecta. La determinación

colorimétrica de la actividad caspasa y la concentración de proteínas se realizó con el lector de microplacas modelo 680 (Bio-Rad).

Para la obtención del número de células y la viabilidad celular en los experimentos indicados se utilizó el contador automático de células TC-10 (Bio-Rad), para la sonicación de las células se empleó el sonicador Labsonic 2000 (Braun-Biotech) y para la esterilización de material plástico y líquidos (agua bidestilada y tampones) se usó un autoclave Matachana.

La centrifugación de las microplacas en los ensayos de MTT se realizó con la centrífuga CS-15 R (Beckman), mientras que otras centrífugas utilizadas durante el estudio fueron el modelo Universal 32 R (Hettich) y las microcentrífugas refrigeradas de alta velocidad Allegra X-22R (Beckman Coulter) y Mikro 200R (Hettich).

## MÉTODOS

### **Cultivos celulares**

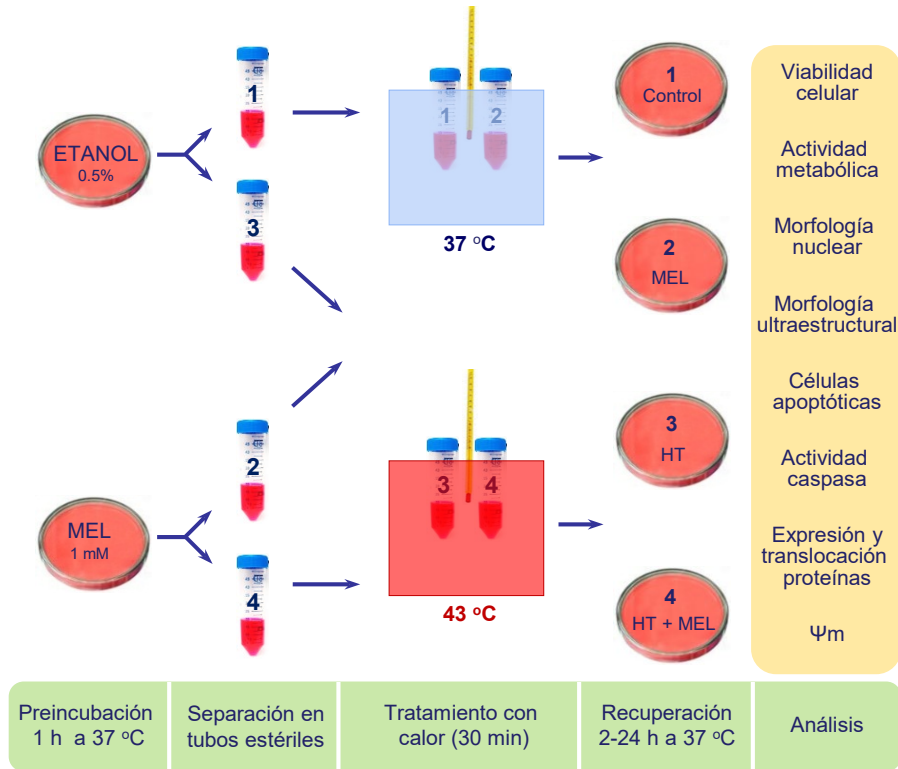
Las células U-937 (DSMZ Cat# ACC-5, RRID:CVCL\_0007), HL-60 (DSMZ Cat# ACC-3, RRID:CVCL\_0002), K-562 (DSMZ Cat# ACC-10, RRID:CVCL\_0004) y MOLT-3 (DSMZ Cat# ACC-84, RRID:CVCL\_0624) se obtuvieron de la colección alemana de cultivos celulares DSMZ, mientras que la línea U-937/BCL-2 fue donada por la Dra. Jacqueline Bréard (INSERM U749, Facultad de Farmacia Paris-Sud, Châtenay-Malabry, Francia).

Las células se cultivaron en medio de crecimiento RPMI 1640 suplementado con 10% (v/v) de suero bovino fetal (FBS) inactivado por calor y antibióticos (100 unidades/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina), en una atmósfera humidificada (37 °C y 5% CO<sub>2</sub>). Durante la propagación de las células, a estas se les cambió el medio de cultivo unas tres veces por semana (cada 48-72 horas) y se mantuvo en todo momento a una densidad inferior a 500.000 células/ml.

La determinación del número y la viabilidad celular se llevó a cabo con el método de exclusión del azul de tripán, utilizando para ello una cámara de Neubauer (hematocitómetro) y un microscopio invertido de contraste de fases Axiovert 135 (Zeiss). La tasa de duplicación celular fue aproximadamente de 24 horas. A las células se les cambió el medio de crecimiento el día anterior y también justo antes de comenzar el experimento; este se inició si la viabilidad celular era igual o superior al 95%.

### ***Tratamiento con hipertermia***

Las células se transfirieron a tubos de polipropileno estériles, se centrifugaron a 500 g durante 10 minutos a temperatura ambiente y se eliminó por decantación el medio de crecimiento. El precipitado de células se resuspendió con medio de crecimiento fresco, ajustado a 37 °C, hasta alcanzar una densidad aproximada de 500.000 células/ml. Las células (10-12 ml) se distribuyeron en platos de cultivo estériles de 100 mm, se les añadió melatonina recién preparada o vehículo (0.5% de etanol, concentración final), y se mantuvieron en el incubador durante 1 hora a 37 °C. Las células de cada plato se recogieron y rápidamente se distribuyeron en dos tubos de polipropileno estériles, con la misma cantidad de células en cada uno de ellos. A continuación, los tubos con células tratadas con melatonina y con células tratadas solamente con el vehículo se sumergieron en un baño de agua ajustado previamente a 37 °C (control) o bien a 43 °C (tratamiento con hipertermia), durante 30 minutos. Posteriormente las células se transfirieron a platos de 100 mm, placas de 12 pocillos o microplacas de 96 pocillos estériles (dependiendo del objetivo), y se incubaron a 37 °C durante los periodos de tiempo especificados en cada experimento (periodo de recuperación). Finalmente se recogieron las células para llevar a cabo el análisis biológico correspondiente (Figura 8).



**Figura 8. Esquema del proceso metodológico llevado a cabo para estudiar el efecto de la melatonina sobre la muerte celular inducida por hipertermia en células de leucemia humanas que crecen en suspensión.** Las células se preincubaron en ausencia (vehículo, 0.5% etanol) o presencia de melatonina (disuelta en etanol) a la concentración especificada en cada experimento, durante 1 hora a 37 °C. A continuación, las células de cada grupo experimental se recogieron y se separaron de manera equitativa en dos tubos. Los tubos se sumergieron seguidamente en un baño de agua ajustado a 37 °C o 43 °C durante 30 minutos tras lo cual las células se transfirieron a platos de 100 mm o bien a placas de 12 o 96 pocillos (dependiendo del objetivo del ensayo) y se incubaron a 37 °C durante un periodo de tiempo que osciló entre 2 y 24 horas. Finalmente, se recogieron las células y se llevó a cabo el análisis biológico especificado para cada experimento (viabilidad celular, actividad metabólica, apoptosis, actividad caspasa, inmunoblot o potencial de la membrana mitocondrial). Las muestras se analizaron por triplicado.

### ***Análisis de la morfología nuclear por microscopía de fluorescencia***

Una vez finalizado el periodo de recuperación, las células ( $0.5 \times 10^6$  células/pocillo) se transfirieron a tubos de 1.5 ml y se centrifugaron a 500 g durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se eliminó el medio de crecimiento por aspiración con vacío, se lavaron las células con 1 ml de PBS y se centrifugó nuevamente en las mismas condiciones anteriores. El precipitado celular se resuspendió con 50  $\mu$ l de paraformaldehído al 3% (p/v) en PBS y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente. Seguidamente se centrifugó a 12 000 g durante 1 minuto a temperatura ambiente y se eliminó por aspiración la disolución de paraformaldehído. Las células fijadas se lavaron con 1 ml de PBS y se tiñeron a continuación con 30  $\mu$ l de una disolución que contenía 20  $\mu$ g/ml de trihidrocloruro de bisbencimida (Hoechst 33258) en PBS, durante 15 minutos a temperatura ambiente y en la oscuridad. Una alícuota (10  $\mu$ l) se colocó sobre un portaobjetos de vidrio, se cubrió con un cubreobjetos y se analizó la morfología nuclear con un microscopio de fluorescencia. Las células cuyos núcleos presentaban condensación de la cromatina o estaban fragmentados en pequeños cuerpos densos fueron consideradas apoptóticas, mientras que las que exhibieron núcleos no condensados y con la cromatina dispersa se tomaron como no apoptóticas [89].

### ***Cuantificación de las células apoptóticas por citometría de flujo: fases del ciclo celular***

Una vez finalizado el experimento, las células ( $0.5 \times 10^6$  células/pocillo) se transfirieron a tubos de 1.5 ml y se centrifugaron a 500 g durante 10 minutos a 4 °C. Se eliminó el medio de crecimiento por aspiración con vacío, se resuspendió el precipitado celular con 1 ml de PBS frío y se centrifugó nuevamente en las mismas condiciones anteriores. Las células se resuspendieron con 50  $\mu$ l de PBS frío y se fijaron con 1 ml de etanol al 70%, a -20 °C. La mezcla se agitó con moderación y los tubos se guardaron a -20 °C hasta el siguiente día; seguidamente se centrifugaron a 500 g durante 10 minutos a 4 °C, se eliminó la fracción etanólica y el precipitado celular se lavó con 1 ml de PBS frío. El

sedimento de células se resuspendió a continuación con 200  $\mu$ l de PBS conteniendo ioduro de propidio (50  $\mu$ g/ml) y RNasa A (100  $\mu$ g/ml) y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente y en oscuridad. Finalmente, las muestras fueron analizadas en un citómetro de flujo BD FACSVerse (Becton-Dickinson) de la siguiente forma: las muestras se irradiaron a 488 nm con el láser de argón para promover la excitación del complejo ADN-propidio y la fluorescencia emitida por el propidio que forma parte del complejo ( $E_{max}$ = 617 nm) se capturó con el detector BlueD, equipado con el espejo 560LP y el filtro 586/42. Se analizaron 10.000 células de cada muestra y los restos celulares se excluyeron del análisis.

La fluorescencia emitida por los fluorocromos que pueden unirse al DNA, como el ioduro de propidio, permite determinar en una población celular el porcentaje de células existente en cada una de las fases del ciclo celular. Así, las células con capacidad de dividirse pueden estar en fase  $G_1$  (primer pico), fase S (o de síntesis de DNA) o en fase  $G_2/M$  (segundo pico). Las células en fase  $G_1$  contienen menor cantidad de DNA que las células en fase S y estas a su vez tendrán menor cantidad de DNA que las células en fase  $G_2/M$ , y las que están en  $G_2/M$  tendrán doble cantidad de DNA que las que se encuentran en la fase  $G_1$  del ciclo celular. Las células con reducida tinción del DNA por el ioduro de propidio, resultado de contener menor cantidad de cromatina o fragmentación de la misma, se localizan a la izquierda del pico  $G_1$  (fracción sub- $G_1$ ) y son consideradas apoptóticas.

### ***Evaluación de la morfología ultraestructural por microscopía electrónica de transmisión***

Una vez finalizado el experimento, las células ( $5 \times 10^6$  células/plato) se transfirieron a tubos de poliestireno y se centrifugaron a 500 g durante 10 minutos a 4 °C. Se eliminó el medio por aspiración con vacío y el precipitado celular se sometió a dos ciclos de lavado con PBS. Para ello se resuspendieron las células con 5 ml de PBS frío, se centrifugó a 500 g durante 10 minutos a 4 °C y al precipitado celular obtenido se le realizó la misma operación por segunda vez. Posteriormente, las

células fueron resuspendidas y fijadas con 1.4 ml de una disolución de glutaraldehído al 2.5% en tampón fosfato sódico (200 mM, pH 7.2) durante 24 horas a 4 °C. En este punto, las muestras se pasaron al Servicio de Microscopía Electrónica de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria donde se siguió con su procesamiento. Aquí las células fueron lavadas tres veces con PBS, post-fijadas con tetróxido de osmio (OsO<sub>4</sub>) al 1% en tampón fosfato sódico durante 4 horas a 4 °C y lavadas con agua destilada. Las células se deshidrataron con concentraciones crecientes de etanol y se embebieron en la resina Epon 812. Se hicieron cortes ultrafinos con un ultramicrotomo Reichert Ultracuts (Leica) y estos se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo. Las fotografías se obtuvieron en un microscopio electrónico de transmisión Zeiss EM 912 (Carl ZEISS) equipado con la cámara digital Proscan Slow-Scan CCD (Proscan Elektronische Systeme GmbH).

### ***Determinación de la actividad caspasa***

Una vez finalizado el experimento, las células (5x10<sup>6</sup> células/plato) se transfirieron a tubos de poliestireno y se centrifugaron a 500 g durante 10 minutos a 4 °C. Se eliminó el medio por aspiración y el precipitado celular se sometió a dos ciclos de lavado con PBS. Para ello se resuspendieron las células con 5 ml de PBS frío, se centrifugó a 500 g durante 10 minutos a 4 °C y al precipitado celular obtenido se le realizó la misma operación por segunda vez. Posteriormente, las células se solubilizaron con tampón de lisis [50 mM HEPES (pH 7.4), 1 mM DTT, 0.1 mM EDTA, 0.1% CHAPS) conteniendo inhibidores de proteasas (0.1 mM PMSF, 10 µg/ml de aprotinina y 10 µg/ml de pepstatina A) a razón de 30 µl de tampón por cada 10<sup>6</sup> células, se pasaron 10 veces través de una aguja de calibre 29G y se centrifugaron a 16000 g durante 10 minutos a 4 °C. Se recogieron los sobrenadantes y se determinó la concentración de proteínas siguiendo el método de Bradford [90]. Las muestras se ajustaron a la misma concentración de proteínas, utilizando para ello el tampón de lisis con inhibidores de proteasas anterior, y una fracción de las mismas (20 µg de proteínas) se utilizó para la determinación de la actividad caspasa. El ensayo de la actividad se realizó en microplacas de 96 pocillos y cada muestra se valoró por

triplicado en un volumen de reacción de 100  $\mu$ l, consistente en 10  $\mu$ l de muestra (20  $\mu$ g de proteínas), 10  $\mu$ l de sustrato específico de caspasa (200  $\mu$ M) y 80  $\mu$ l de tampón de ensayo [50 mM HEPES (pH 7.4), 10 mM DTT, 1 mM EDTA, 0.1% CHAPS, 100 mM NaCl, 10% glicerol]. La microplaca se incubó a 37 °C durante un mínimo de 1 hora y la absorbancia a 405 nm asociada a la liberación del cromóforo *para*-nitroanilina (*p*NA), que forma parte de los sustratos, se determinó en un lector de microplacas (Modelo 680, Bio-Rad). Los valores de absorbancia asociados al aumento de actividad caspasa se obtuvieron tras deducir los valores de absorbancia inespecíficos de los blancos, que contenían 10  $\mu$ l de tampón de lisis (en vez de muestra), 10  $\mu$ l del sustrato específico de caspasa (200  $\mu$ M) y 80  $\mu$ l de tampón de ensayo.

Este método evalúa la hidrólisis de los sustratos cromogénicos específicos de caspasas. Los sustratos utilizados fueron: i) *N*-acetil-Val-Asp-Val-Ala-Asp-*p*-nitroanilina (Ac-VDVAD-*p*NA), para determinar la actividad caspasa-2; ii) *N*-acetil-Asp-Glu-Val-Asp-*p*-nitroanilina (Ac-DEVD-*p*NA), para valorar la actividad caspasa-3/7; iii) *N*-acetil-Ile-Glu-Thr-Asp-*p*-nitroanilina (Ac-IETD-*p*NA), para evaluar la actividad caspasa-8; iv) *N*-acetil-Leu-Glu-His-Asp-*p*-nitroanilina (Ac-LEHD-*p*NA), para conocer la actividad caspasa-9. Los diferentes sustratos se disolvieron con tampón de ensayo a una concentración de 2 mM y se conservaron a -20 °C.

### ***Análisis de la expresión, procesamiento y translocación de las proteínas por inmunoblot***

Una vez finalizado el experimento las células (5-10  $\times 10^6$  células/plato) se transfirieron a tubos de poliestireno y se centrifugaron a 500 g durante 10 minutos a 4 °C. Se eliminó el medio por aspiración con vacío y el precipitado celular se sometió a dos ciclos de lavado con PBS. Para ello se resuspendió el precipitado de células con 5 ml de PBS frío, se centrifugó a 500 g durante 10 minutos a 4 °C y al precipitado celular obtenido se le realizó la misma operación por segunda vez. Una vez realizado los lavados con PBS, el precipitado celular finalmente



obtenido fue procesado de diferente forma, dependiendo de la localización de las proteínas de interés:

i) Obtención del lisado celular total: las células se solubilizaron con tampón de lisis A (20 mM Tris-HCl [pH 7.4], 2 mM EDTA, 137 mM NaCl, 10% glicerol, 1% Triton X-100) conteniendo inhibidores de proteasas (1 mM PMSF, 5 µg/ml de leupeptina, 5 µg/ml de aprotinina y 5 µg/ml de pepstatina A) y fosfatasas (2 mM pirofosfato sódico, 2 mM ortovanadato sódico, 10 mM fluoruro sódico, 20 mM β-glicerofosfato sódico) a razón de 30 µl de tampón por cada 10<sup>6</sup> células, y se mantuvieron durante 15 minutos en hielo; a continuación las muestras se sonicaron en frío (cuatro ciclos de 5 segundos), se centrifugaron a 16 000 g durante 10 minutos a 4 °C y la fracción soluble (sobrenadante) se transfirió a tubos de microcentrifuga limpios, que se conservaron a -20 °C hasta el momento del análisis. Este procedimiento se realizó para analizar los niveles de expresión y/o procesamiento proteolítico de caspasa-2, caspasa-3, caspasa-6, caspasa-7, caspasa-8, caspasa-9, HSP70 y β-actina.

ii) Fraccionamiento subcelular. Las células se resuspendieron con tampón isotónico B [20 mM HEPES-KOH (pH 7.5), 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 250 mM sacarosa] conteniendo inhibidores de proteasas (1 mM PMSF, 5 µg/ml de leupeptina, 5 µg/ml de aprotinina y 5 µg/ml de pepstatina A), a razón de 30 µl de tampón por cada 10<sup>6</sup> células, y se mantuvieron durante 15 minutos en hielo; a continuación, las células se lisaron haciéndolas pasar a través de una aguja de calibre 29G y se centrifugaron a 1000 g durante 5 minutos a 4 °C. El precipitado (fracción nuclear) se desechó y el sobrenadante resultante se transfirió a un tubo limpio que se centrifugó a 22000 g durante 15 minutos a 4 °C. El sobrenadante resultante (fracción citosólica soluble) se transfirió a un tubo de microcentrifuga limpio y el precipitado (fracción mitocondrial) se resuspendió con tapón A, a razón de 10 µl de tampón por cada por cada 10<sup>6</sup> células. Las muestras se conservaron a -20 °C hasta su análisis. Este procedimiento se realizó para analizar los niveles de expresión y/o

translocación de citocromo *c* y BAX entre las fracciones mitocondrial y citosólica.

La concentración de proteínas de las diferentes muestras se determinó siguiendo el método de Bradford. Para llevar a cabo los estudios comparativos, dentro de cada experimento las muestras se ajustaron a la misma concentración de proteínas, utilizando para ello el tampón específico empleado para su obtención. Se tomaron volúmenes idénticos de los lisados celulares (25  $\mu$ l, 80  $\mu$ g de proteínas) y se calentaron durante 10 minutos a 100 °C en tampón de carga [50 mM Tris-HCl (pH 6.8), 15% sacarosa, 2 mM EDTA, 3% SDS, 5 mM  $\beta$ -mercaptoetanol y 0.01% azul de bromofenol]. Seguidamente, las muestras se sometieron a electroforesis en un gel de poliacrilamida al 7.5% (si se van a analizar las caspasas,  $\beta$ -actina o HSP70) o al 15% (si se va a analizar BID, BAX o citocromo *c*) conteniendo 0.1% SDS. Como referencia se utilizó el marcador coloreado de pesos moleculares Precision Plus Protein Dual Color Standards (10 kDa-250 kDa) de Bio-Rad. Una vez las proteínas se separaron en función de sus pesos moleculares, estas se transfirieron a una membrana de PVDF (Bio-Rad) que se conservó a 4 °C hasta su análisis.

Para la determinación de la expresión y/o procesamiento de las proteínas, las membranas se incubaron con 5 ml de tampón TBST [20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 137 mM NaCl, 0.1 % Tween-20] conteniendo leche desnatada al 10% (p/v) durante 1 hora a temperatura ambiente (etapa de bloqueo), seguido de una incubación con 1-2 ml del anticuerpo primario específico (1:1000), diluido en TBST con un 3% de leche desnatada, durante 24 horas a 4 °C y con agitación suave. El anticuerpo primario específico para  $\beta$ -actina se utilizó para demostrar que las muestras analizadas contenían la misma cantidad de proteínas. Las membranas se sometieron a tres ciclos de lavados con 5 ml de TBST durante 15 minutos a temperatura ambiente cada uno, y se incubaron a continuación con un anticuerpo secundario apropiado (1:10000), diluido en TBST con un 3% de leche desnatada, durante 1 hora y con agitación suave. Finalmente, las membranas se lavaron con TBST a temperatura ambiente y las proteínas específicas se visualizaron por

la emisión de quimioluminiscencia, utilizando el kit comercial Immobilon Western (Millipore) y detección de la misma mediante un equipo ChemiDoc (Bio-Rad).

La intensidad de las bandas de proteínas se determinó con la versión v.1.52u del programa de procesamiento de imagen digital de dominio público ImageJ (National Institutes of Health, USA) y la expresión relativa se normalizó con el correspondiente control de carga, utilizando  $\beta$ -actina.

### ***Análisis del potencial de la membrana mitocondrial por citometría de flujo***

Las células ( $0.5 \times 10^6$  células/pocillo) se incubaron con  $10 \mu\text{M}$  de la sonda fluorescente JC-1 a  $37^\circ\text{C}$  durante los últimos 30 minutos del periodo de recuperación, y una vez finalizado el experimento se transfirieron a tubos de microcentrífuga de 1.5 ml de capacidad y se centrifugaron a  $500 \text{ g}$  durante 10 minutos a  $4^\circ\text{C}$ . Se eliminó el sobrenadante por aspiración con vacío y las células se lavaron con 1 ml de PBS a temperatura ambiente y se centrifugaron en las mismas condiciones anteriores. El precipitado celular resultante se resuspendió con  $200 \mu\text{l}$  de PBS a temperatura ambiente y las células se analizaron en un citómetro de flujo BD FACSVersé (Becton-Dickinson), utilizando una longitud de onda de excitación de 488 nm y los detectores BlueD (equipado con el espejo 560LP y el filtro 586/42) y BlueE (equipado con el espejo 507LP y el filtro 527/32) para capturar la fluorescencia emitida por los agregados y por los monómeros de JC-1, respectivamente. Se analizaron 10000 células de cada muestra y los restos celulares se excluyeron del análisis.

La sonda fluorescente JC-1 ha sido ampliamente utilizada para estimar el potencial mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) de las células. Debido a la carga positiva que presenta, JC-1 se acumula en las mitocondrias energizadas, principalmente en las células sanas, y las altas concentraciones que se alcanzan en el interior de estos orgánulos favorecen la formación de agregados (denominados agregados J) que

presentan un espectro de emisión distinguible respecto al exhibido por los monómeros de JC-1. Cuando es excitada a 488 nm, JC-1 emite fluorescencia con un pico máximo a 529 nm (verde), mientras que si se encuentra en forma de agregados, el pico máximo de emisión se desplaza a 590 nm (naranja-rojo). Consecuentemente, la despolarización mitocondrial está asociada con la reducción en la intensidad de fluorescencia del cociente verde/rojo. El uso más extendido de JC-1 está relacionado con la detección de la despolarización mitocondrial en el estudio de la apoptosis. La disipación del potencial mitocondrial puede ser un evento temprano en el mecanismo de inducción de apoptosis, como ha sido demostrado en numerosos estudios [91,92].

La representación gráfica bidimensional de la fluorescencia emitida por los monómeros (eje X) y la fluorescencia de los agregados (eje Y) permite visualizar a las células sanas con elevado potencial mitocondrial (máxima fluorescencia de los agregados, cuadrante superior) de las que no lo son (mínima fluorescencia de los agregados, cuadrante inferior), como es el caso de las células apoptóticas. Como control positivo se utilizaron células a las que se les añadió la sonda JC-1, tal y como se describió anteriormente, y a continuación 50  $\mu$ M de carbonil cianuro *m*-clorofenil hidrazona (CCCP), un ionóforo de protones que promueve rápidamente la disipación del potencial mitocondrial.

### ***Determinación del número de células y de la viabilidad celular***

Una vez finalizado el tiempo de tratamiento y el periodo de recuperación programado, las células ( $0.5 \times 10^6$  células/pocillo) se transfirieron a tubos de 1.5 ml y se centrifugaron a 500 g durante 10 minutos a 4 °C. El medio de crecimiento (sobrenadante) se eliminó por aspiración con vacío y las células se resuspendieron con 1 ml de PBS frío. Seguidamente se mezclaron a temperatura ambiente 20  $\mu$ l de la suspensión celular con 20  $\mu$ l de una disolución salina (0.85% de cloruro sódico) conteniendo 0.4% (p/v) del colorante azoico azul de tripán; alícuotas de 10  $\mu$ l de la mezcla anterior se analizaron en un contador

automático de células TC-10 (Bio-Rad). Para cada muestra original se obtuvo el número de células totales, el número de células viables y el porcentaje de viabilidad.

### ***Valoración de la actividad metabólica por reducción del MTT***

Una vez finalizados los 30 minutos del periodo de tratamiento con calor, las células se recogieron en tubos de polipropileno estériles y de cada grupo experimental se transfirió 6 muestras de 100  $\mu$ l (50 000 células) a una placa de 96 pocillos. Las células se mantuvieron en el incubador durante 24 horas. Finalizado el periodo de recuperación, la placa se centrifugó a 500 g durante 10 minutos a temperatura ambiente y se eliminó el sobrenadante mediante aspiración con vacío. Seguidamente a cada pocillo se le añadió 100  $\mu$ l de MTT (0.5 mg/ml en RPMI con antibióticos) y la placa se incubó durante 1-2 horas a 37 °C. La reacción se paró con 100  $\mu$ l de una disolución al 20% (p/v) de SDS en 0.02 M de ácido clorhídrico y se incubó la mezcla a 37 °C hasta el siguiente día.

La actividad metabólica de las células se determinó por su capacidad de transformar el MTT (color amarillo) en su forma reducida e insoluble (color púrpura), catalizado por el enzima succinato deshidrogenasa mitocondrial. La absorbancia de las muestras se obtuvo a 570 nm en un lector de microplacas (modelo 680 de Bio-Rad). La absorbancia específica de cada muestra se determinó deduciendo el valor de la absorbancia media obtenida de los pocillos utilizados como blancos, consistentes estos en tres pocillos sin células y a los que se les añadió 100  $\mu$ l de MTT (0.5 mg/ml en RPMI con antibióticos). Las absorbancias específicas de las muestras se transformaron en porcentajes, tomando como 100% la absorbancia específica media de los controles.

La disminución de la capacidad de las células para reducir el MTT en respuesta a un tratamiento determinado puede indicar bloqueo de la proliferación celular (agente citostático), aumento de la tasa de muerte celular (agente citotóxico) o ambos. Esta técnica, aunque es

muy útil para evaluar la actividad citotóxica de los agentes químicos/físicos, debe complementarse con otras (con el método de exclusión del azul-tripán, por ejemplo) para conocer con más precisión de qué forma afecta el compuesto de interés a las células.

### ***Análisis estadístico***

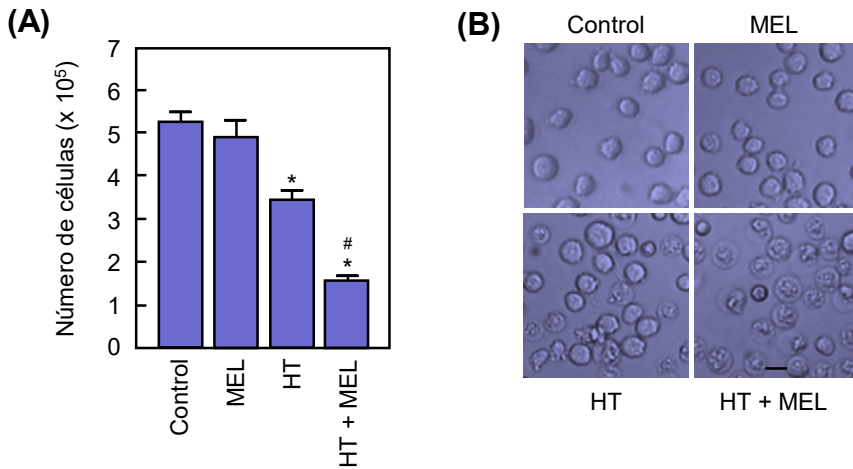
En todos los casos, las determinaciones para cada grupo experimental se realizaron por triplicado o cuadruplicado, y los valores representados se corresponden a datos de tres experimentos como mínimo (Media  $\pm$  E.S.M.). La comparación entre los distintos tratamientos se realizó por el método de la *t* de Student o análisis de la varianza, considerando significativos los valores de  $P < 0.05$ .

### ***La melatonina potencia el efecto citotóxico de la hipertermia en las células leucémicas U-937***

Para determinar el efecto que presenta la melatonina sobre la viabilidad de las células U-937 expuestas a hipertermia se empleó una concentración que ha demostrado reducir la proliferación celular e inducir la diferenciación, la apoptosis y la autofagia en una gran variedad de líneas de células tumorales humanas.

Para conseguir ese objetivo, las células se cultivaron en ausencia o presencia de 1 mM de melatonina durante 1 hora y posteriormente se sometieron a hipertermia (30 minutos a 43 °C). Tras un periodo de recuperación de 24 horas a 37 °C, las células se recogieron y analizaron. Como se observa en la Figura 9A, el número de células viables disminuyó significativamente en respuesta al tratamiento con hipertermia (~60% de células viables respecto al control), y el pretratamiento con melatonina incrementó notablemente la eficacia de la hipertermia (~25% de células viables en comparación con el control). Estos resultados también evidencian que la melatonina, por sí misma, no es tóxica para las células.

Consistente con los anteriores resultados, las células U-937 incubadas solo con melatonina durante 24 horas presentaron morfología redondeada y citosol difuso, características de las células sanas, cuando se visualizaron mediante microscopía de contraste de fases (Figura 9B). Al contrario, la combinación de melatonina e hipertermia incrementó notablemente el número de células que presentaron citosol granular y aspecto insano, en comparación con el grupo tratado únicamente con hipertermia. Globalmente, estos resultados sugieren que la melatonina potencia la citotoxicidad de la hipertermia en las células U-937.



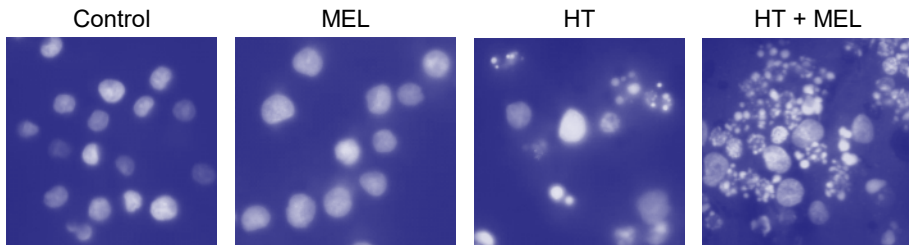
**Figura 9. Efecto de la melatonina sobre la viabilidad de las células U-937 expuestas a hipertermia.** Las células se preincubaron en ausencia (control) o presencia de melatonina (MEL, 1 mM) durante 1 hora a 37 °C, se expusieron a continuación a hipertermia (HT, 30 minutos a 43 °C) y posteriormente se analizaron tras un periodo de recuperación de 24 horas a 37 °C. (A) El número de células viables se determinó mediante el método de la exclusión del azul de tripán. (B) Visualización de las células mediante microscopía de contraste de fases; se muestra un campo representativo de cada grupo experimental. La barra en el cuadrante inferior derecho representa una longitud de 30  $\mu$ m. \* $P$ <0.05 vs. control; # $P$ <0.05 vs. tratamiento solo con hipertermia.

***La melatonina incrementa la apoptosis activada por la hipertermia en células U-937***

La apoptosis es una modalidad de muerte celular y es, además, un importante proceso fisiológico que ocurre en todos los tejidos y que es crítico para el correcto desarrollo del organismo y para la homeostasis. En una gran variedad de células tumorales, incluidas las células U-937, la activación de la apoptosis es desencadenada por hipertermia [93]. Para determinar si la melatonina es capaz de modular la respuesta apoptótica en condiciones de hipertermia, las células U-937 se preincubaron con la indolamida (1 mM) y posteriormente se trataron con calor durante 30 minutos a 43 °C.



Como se aprecia en la Figura 10, el tratamiento con hipertermia indujo importantes cambios morfológicos en el núcleo como son la fragmentación y la condensación de la cromatina, características de las células apoptóticas, y que pueden detectarse mediante microscopía de fluorescencia. Una inspección más detallada de las imágenes revela que el número de núcleos apoptóticos aumentó notablemente en las células tratadas conjuntamente con melatonina e hipertermia.

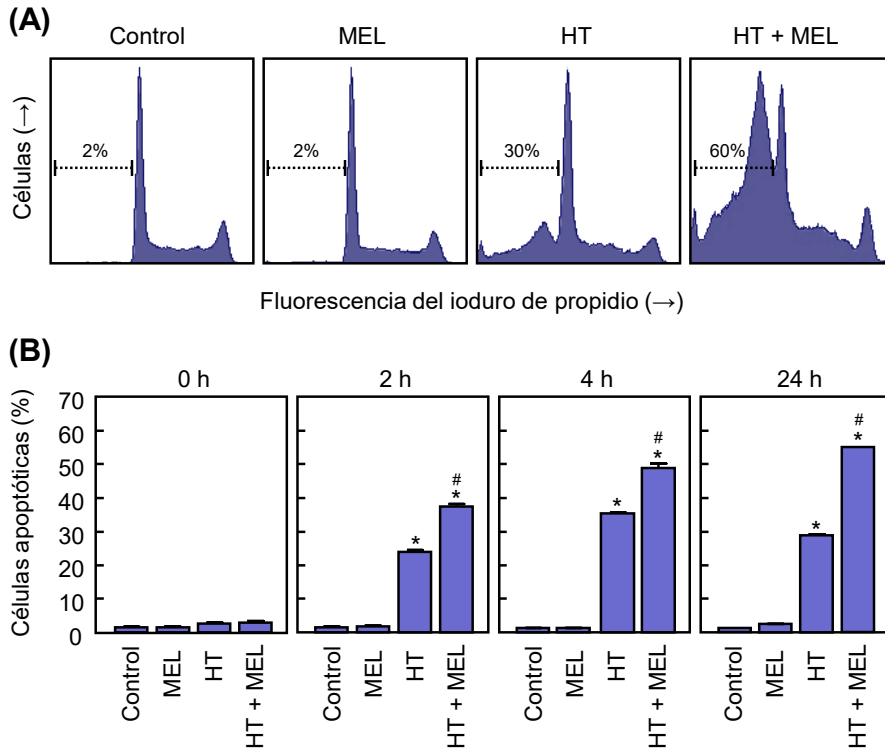


**Figura 10. Efecto de la melatonina sobre la muerte celular por apoptosis en células U-937 expuestas a hipertermia.** (A) Las células fueron preincubadas en ausencia (control) o presencia de 1 mM de melatonina (MEL) durante 1 hora, se expusieron a hipertermia (HT, 30 minutos a 43 °C) y se permitió un periodo de recuperación de 24 horas a 37 °C. Seguidamente las células se recogieron, se tiñeron con tri-hidrocloruro de bisbencimida y se analizaron mediante microscopía de fluorescencia. Se presentan campos representativos de células con el fin de evaluar la condensación y la fragmentación de la cromatina nuclear (i.e. apoptosis).

Resultados similares se observaron cuando las células se tiñeron con yoduro de propidio y se analizó el ciclo celular mediante citometría de flujo (Figura 11A). Los histogramas evidencian un aumento significativo en la proporción de células apoptóticas (fracción Sub-G<sub>1</sub>) en el grupo tratado con hipertermia más melatonina respecto al grupo que solo se trató con hipertermia (60% vs 30%) tras un periodo de recuperación de 24 horas a 37 °C.

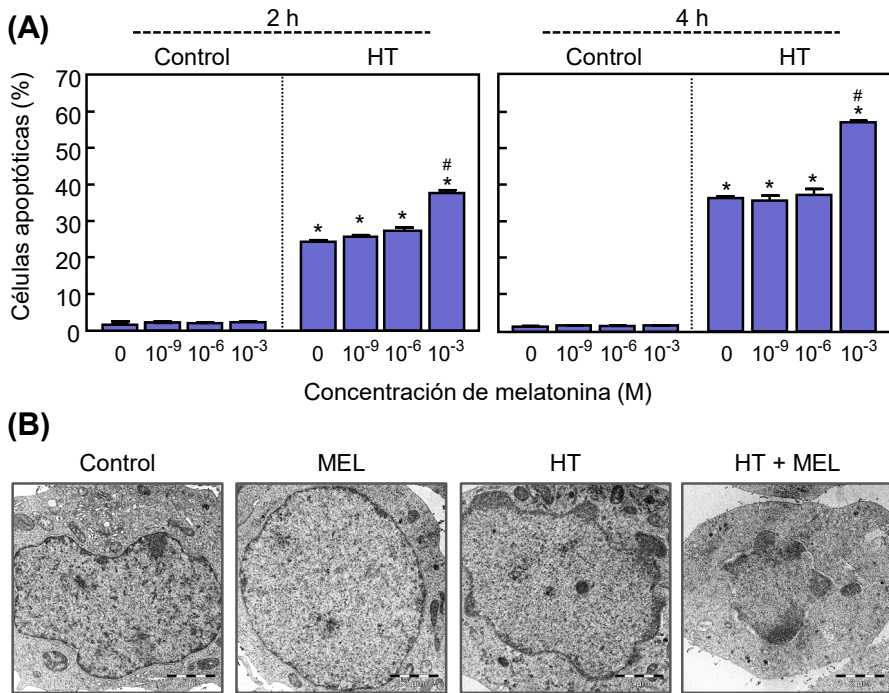
El efecto de la melatonina sobre la hipertermia se analizó siguiendo diferentes periodos de recuperación (Figura 11B). Un aumento importante en el porcentaje de células apoptóticas se observó desde las 2 horas en el grupo tratado conjuntamente con hipertermia y

melatonina comparado con el tratado exclusivamente con hipertermia (40% vs 25%). El nivel de potenciación fue similar cuando se analizaron periodos de recuperación más prolongados (4-24 horas).



**Figura 11. Efecto de la melatonina sobre la muerte celular por apoptosis en células U-937 expuestas a hipertermia.** (A) Las células se preincubaron en ausencia (control) o presencia de 1 mM de melatonina (MEL) durante 1 hora, se expusieron a hipertermia (HT, 30 minutos a 43 °C) y se permitió la recuperación durante 24 horas a 37 °C. A continuación, se recogieron las células y se determinó la distribución celular en función del contenido de DNA mediante citometría de flujo, utilizando el método de tinción con yoduro de propidio; las células incluidas en la región sub-G1 (i.e. células apoptóticas) están delimitadas por una línea de puntos. Se presentan histogramas representativos. (B) Las células se preincubaron en ausencia (control) o presencia de 1 mM de melatonina (MEL) durante 1 hora, se expusieron a hipertermia (HT, 30 minutos a 43 °C) y se permitió su recuperación a 37 °C durante los periodos indicados; las células se recolectaron y el porcentaje de las mismas con un contenido sub-G1 de DNA se determinó por citometría de flujo. \* $P < 0.05$  vs. células no tratadas (control); # $P < 0.05$  vs. tratamiento solo con hipertermia.

Puesto que existe cierta confusión sobre cuál es la concentración fisiológica de melatonina [94], se decidió evaluar el efecto de concentraciones crecientes de la misma sobre la apoptosis estimulada por hipertermia. Como se observa en la Figura 12A, el porcentaje de células apoptóticas fue significativamente mayor en las células tratadas simultáneamente con hipertermia y 1 mM de melatonina respecto a las tratadas solamente con hipertermia, tanto a las 2 horas de recuperación (22% vs 40%) como a las 4 horas (40% vs 60%); concentraciones inferiores de melatonina (1 nM ó 1 μM) carecieron de efectos.



**Figura 12. Efecto de la melatonina sobre la muerte celular por apoptosis en células U-937 expuestas a hipertermia.** (A) Las células fueron preincubadas en ausencia o presencia de las concentraciones indicadas de melatonina durante 1 hora, se expusieron a hipertermia (HT, 30 minutos a 43 °C) y se permitió su recuperación a 37 °C durante los periodos de tiempo especificados. Las células se recogieron y el porcentaje de células apoptóticas se determinó mediante citometría de flujo. \* $P < 0.05$  vs. células no tratadas (control); # $P < 0.05$  vs. tratamiento solo con hipertermia. (B) Las células se preincubaron en ausencia (control) o presencia de 1

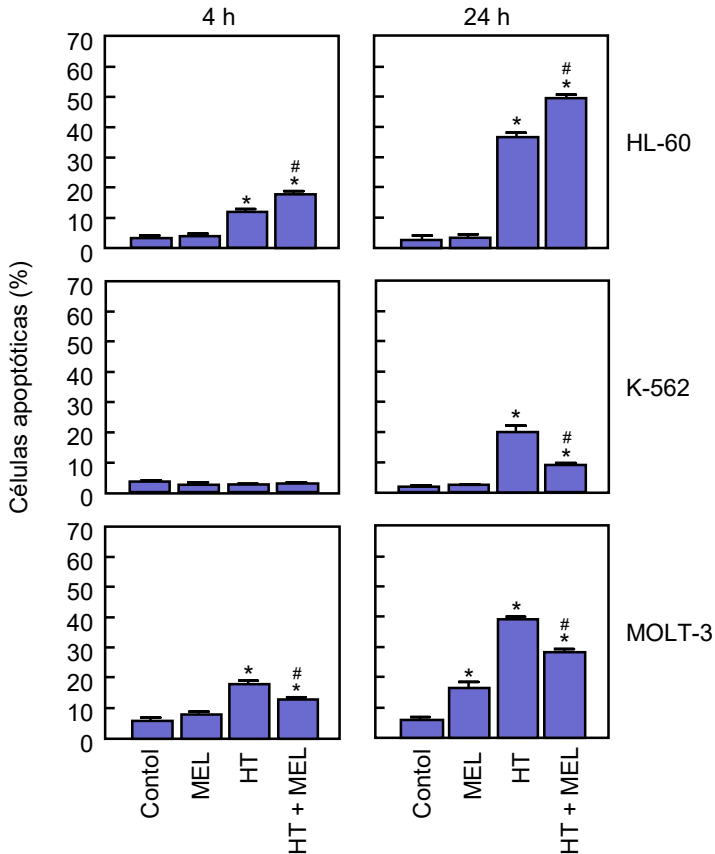
mM de melatonina (MEL) durante 1 hora, se expusieron a hipertermia (HT, 30 minutos a 43 °C) y se permitió la recuperación durante 4 horas a 37 °C. A continuación, las células se recolectaron y se analizaron mediante microscopía de transmisión electrónica. Todas las imágenes mostradas presentan el mismo aumento (9 000 x). Las barras insertadas en el lado inferior derecho de las imágenes presentan una longitud de 2  $\mu$ m.

La concentración de melatonina utilizada (1 mM) no tuvo influencia sobre el nivel de apoptosis basal, independientemente del periodo de recuperación utilizado. Las células se analizaron también mediante microscopía de transmisión electrónica y no se apreciaron diferencias entre las células tratadas únicamente con hipertermia respecto a las tratadas con hipertermia en combinación con melatonina; además, cambios estructurales característicos de las células apoptóticas fueron detectados en los dos grupos experimentales (Figura 12B).

### ***Efecto diferencial de la melatonina sobre la apoptosis activada por la hipertermia en células leucémicas humanas***

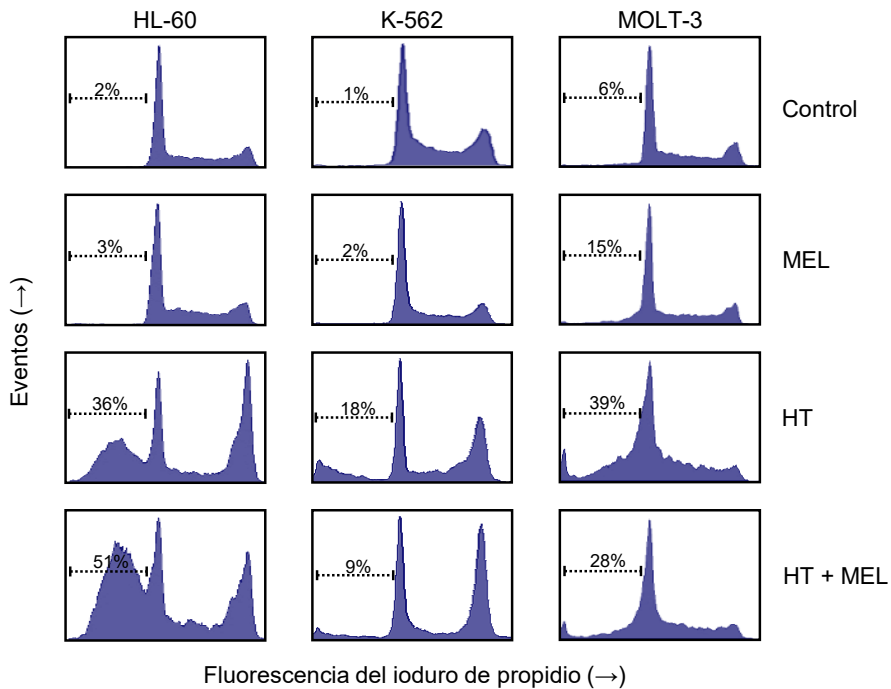
Para determinar si el efecto potenciador de la melatonina sobre la apoptosis detectado en las células U-937 expuestas a hipertermia es extensible a otras líneas de leucemia humanas, las líneas celulares HL-60 (células de leucemia mieloide aguda), K-562 (células de leucemia mieloide crónica) y MOLT-3 (células linfoides) fueron también incluidas en este estudio. Para ello, el efecto de la melatonina sobre las células tratadas con hipertermia se evaluó y cuantificó por citometría de flujo, utilizando la tinción con yoduro de propidio (Figura 13). En células HL-60, el porcentaje de células apoptóticas aumentó con la exposición a hipertermia y con periodos de recuperación más prolongados (36% a las 24 horas vs. 12% a las 4 horas; apoptosis basal ~4%). Un importante incremento en el porcentaje de células apoptóticas se observó ya desde las 4 horas en el grupo tratado conjuntamente con hipertermia y melatonina en comparación con el grupo tratado solamente con hipertermia (18% vs. 12%; apoptosis basal ~4%). La potenciación fue similar (51% vs. 36%; apoptosis basal ~4%) si el periodo de recuperación era considerablemente más largo (24 horas). Por el contrario, la inclusión de la melatonina atenuó la

respuesta apoptótica frente a la hipertermia tanto en las células K-562 (18% vs. 9%; apoptosis basal ~3%) como en las células MOLT-3 (39% vs. 28%; apoptosis basal ~7%), determinada tras un periodo de recuperación de 24 horas.



**Figura 13. Efecto de la melatonina sobre la muerte celular por apoptosis en líneas celulares de leucemia humanas expuestas a hipertermia.** Las células se preincubaron en ausencia (control) o presencia de 1 mM de melatonina (MEL) durante 1 hora, se expusieron a hipertermia (HT, 30 minutos a 43 °C) y se permitió a continuación su recuperación a 37 °C durante el periodo de tiempo especificado. (A) Las células se recogieron tras el periodo de recuperación y se determinó la distribución de las fases del ciclo en función del contenido de DNA mediante citometría de flujo, utilizando el método de la tinción con yoduro de propidio; se muestra el porcentaje de células en la región sub-G<sub>1</sub> (i.e. células apoptóticas). \**P*<0.05 vs. células no tratadas (control); #*P*<0.05 vs. tratamiento solo con hipertermia.

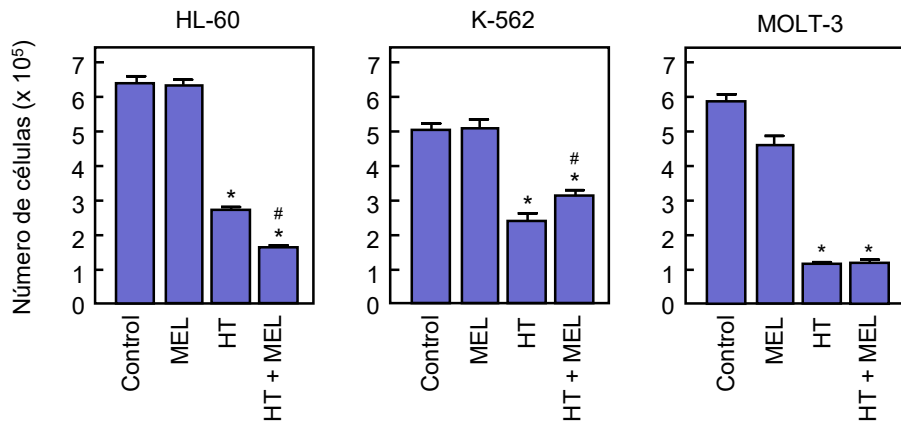
Entre las líneas celulares analizadas, las células K-562 fueron las más resistentes a la activación de la apoptosis por hipertermia y un aumento significativo en el porcentaje de células apoptóticas solo pudo apreciarse con periodos prolongados de recuperación (24 horas). Es importante destacar que la presencia de melatonina favoreció que las células K-562 expuestas a hipertermia se acumulen en la fase G<sub>2</sub>-M del ciclo celular (Figura 14).



**Figura 14. Efecto de la melatonina sobre la muerte celular por apoptosis en líneas celulares de leucemia humanas expuestas a hipertermia.** Las células se preincubaron en ausencia (control) o presencia de 1 mM de melatonina (MEL) durante 1 hora, se expusieron a hipertermia (HT, 30 minutos a 43 °C) y se permitió a continuación su recuperación a 37 °C durante 24 horas. Seguidamente las células se analizaron por citometría de flujo mediante el marcaje con ioduro de propidio; el porcentaje de células incluidas en la región sub-G<sub>1</sub> (i.e. células apoptóticas) aparece indicado.

En consonancia con los resultados anteriores, el número de células viables disminuyó en el grupo tratado simultáneamente con hipertermia y melatonina en comparación con el que fue expuesto exclusivamente a hipertermia en las células HL-60, pero no en las células K-562 y en las células MOLT-3 (Figura 15).

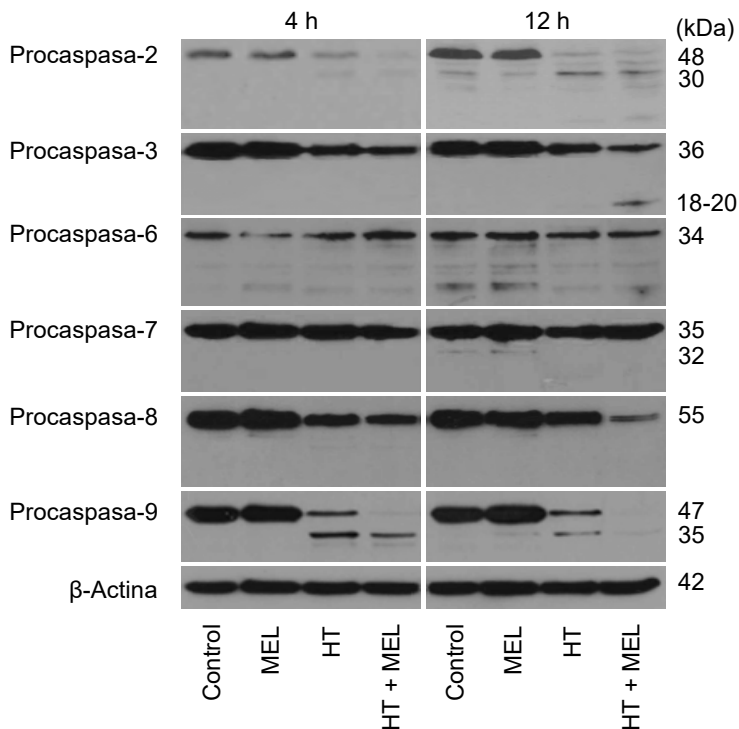
Estos resultados demuestran también que, en las condiciones y tiempos de tratamiento analizados, la melatonina por sí misma no presenta efectos apreciables sobre la apoptosis ni sobre la viabilidad celular, al menos en las células HL-60 y K-562; sin embargo, esta indolamida modula de forma diferencial la respuesta apoptótica frente a la hipertermia en las las líneas de leucemia humanas.



**Figura 15. Efecto de la melatonina sobre la viabilidad en líneas celulares de leucemia humanas expuestas a hipertermia.** Las células se preincubaron en ausencia (control) o presencia de 1 mM de melatonina (MEL) durante 1 hora, se expusieron a hipertermia (HT, 30 minutos a 43 °C) y se permitió a continuación su recuperación a 37 °C durante 24 horas. Se recogieron las células y se determinó el número de células viables siguiendo el método del azul de tripán. \* $P < 0.05$  vs. células no tratadas (control); # $P < 0.05$  vs. tratamiento solo con hipertermia.

***El procesamiento y la actividad catalítica de las caspasas promovidos por la hipertermia es favorecido por melatonina en células U-937***

Uno de los más importantes marcadores moleculares de la apoptosis es la activación de las caspasas, una clase de enzimas con actividad proteolítica que desempeña una función clave en este tipo de muerte celular, tanto en células normales como en células tumorales. Para determinar el papel que desempeñan las caspasas en el efecto de la melatonina sobre la apoptosis inducida por hipertermia se obtuvieron lisados de células U-937 y se analizaron posteriormente mediante inmunoblot (Figura 16).



**Figura 16. Efecto de la melatonina sobre la actividad del procesamiento de las caspasas en células U-937 tratadas con hipertermia.** Las células fueron expuestas a hipertermia (HT) en ausencia o presencia de 1 mM de melatonina (MEL) y la rotura de las procaspasas especificadas se analizó mediante inmunoblot a los tiempos de recuperación indicados; la  $\beta$ -actina se incluyó como control de carga homogénea de proteínas en los diferentes canales del gel.

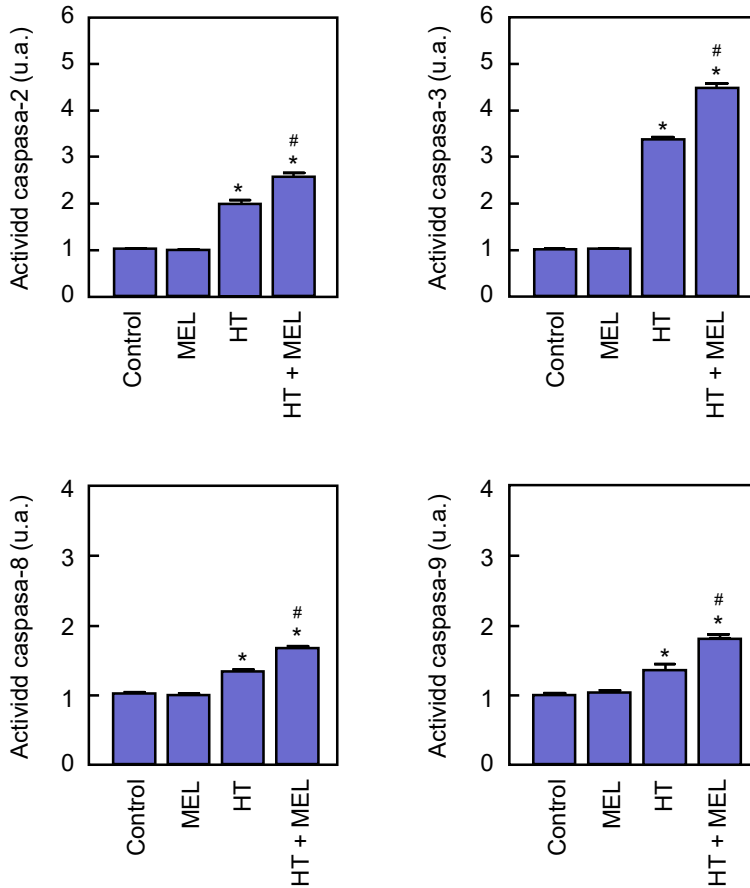


Como puede observarse, la combinación de hipertermia y melatonina fue más eficiente en promover el procesamiento (indicativo de activación) de la procaspasa-2, la procaspasa-3, la procaspasa-8 y la procaspasa-9 que el tratamiento únicamente con hipertermia. Los resultados fueron similares con periodos cortos (4 horas) o más prolongados (12 horas) de recuperación. Por el contrario, no se detectó procesamiento de procaspasa-6 ni de procaspasa-7 en respuesta al tratamiento con hipertermia, sola o combinada con melatonina. En consonancia con los resultados mostrados en las Figuras 10, 11 y 12, el tratamiento solo con melatonina careció de efecto sobre el procesamiento de las caspasas analizadas, en cualquiera de los periodos de recuperación evaluados.

Para confirmar que la hidrólisis de las procaspasas detectadas por inmunoblot estaba asociada con un aumento de la actividad enzimática, se obtuvieron lisados celulares y se analizó la hidrólisis de los sustratos tetrapeptídicos Ac-VDVAD-*p*NA (caspasa-2), Ac-DEVD-*p*NA (caspasa-3/7), Ac-IETD-*p*NA (caspasa-8) y Ac-LEHD-*p*NA (caspasa-9).

Los resultados (Figura 17) indican que la exposición a la hipertermia incrementa de forma apreciable las actividades enzimáticas de la caspasa-2, la caspasa-3, la caspasa-8 y la caspasa-9, y que la eficacia de la hipertermia en relación a la inducción de la actividad catalítica de estas proteasas fue notablemente mayor en combinación con melatonina. Como cabía esperar, en las células expuestas a hipertermia las actividades de las caspasas iniciadoras (caspasa-2, caspasa-8 y caspasa-9) fueron significativamente menores que la actividad de caspasa-3, la principal caspasa ejecutora. Además, consistente con los resultados de inmunoblot (ver Figura 16), el tratamiento únicamente con melatonina no tuvo influencia sobre la actividad basal de ninguna de las caspasas analizadas. Conjuntamente, estos resultados sugieren que las dos modalidades de la apoptosis, la vía extrínseca (caspasa-8 dependiente) y la vía intrínseca (caspasa-9 dependiente), son activadas en las células U-937 expuestas a hipertermia y que la melatonina desempeña un papel sensibilizador,

favoreciendo el aumento de la actividad caspasa-3/7, involucrada en el desmantelamiento celular.



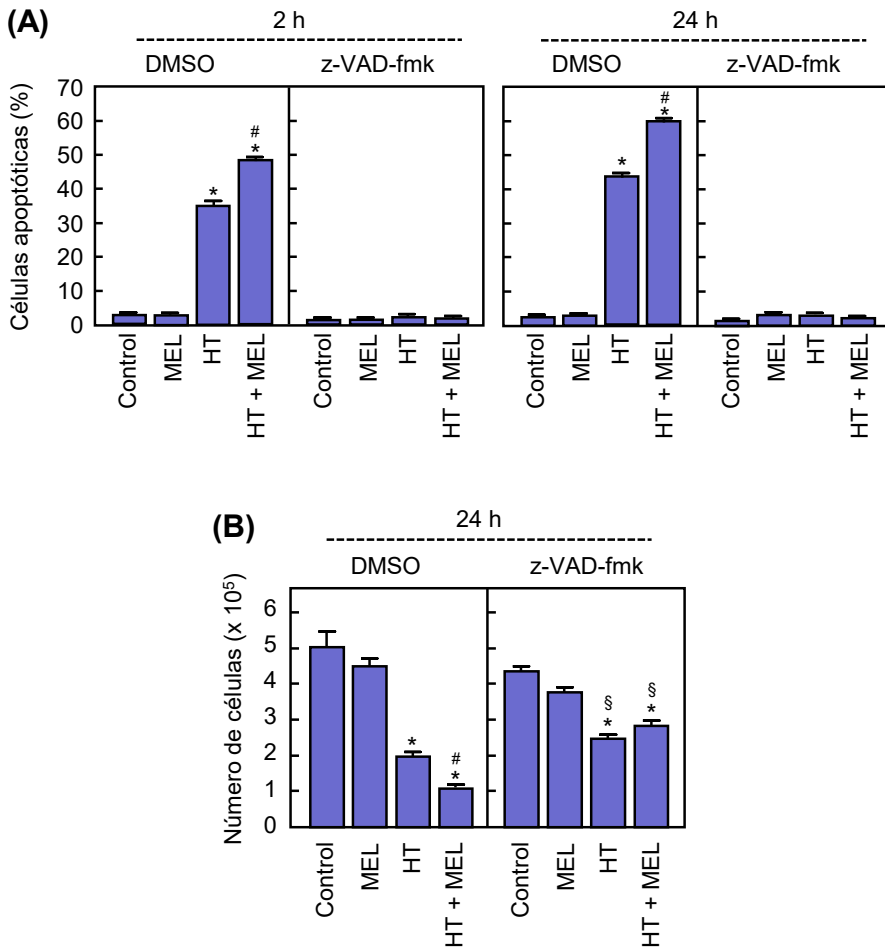
**Figura 17. Efecto de la melatonina sobre la actividad caspasa en células U-937 tratadas con hipertermia.** Las células fueron expuestas a hipertermia (HT) en ausencia o presencia de 1 mM de melatonina (MEL) y tras un periodo de recuperación de 4 horas se obtuvieron los lisados celulares y se determinó la actividad de las caspasas indicadas haciendo uso de sustratos colorimétricos específicos. \* $P < 0.05$  vs. células no tratadas (control); # $P < 0.05$  vs. tratamiento solo con hipertermia; u.a. (unidades arbitrarias).

### ***Las caspasas son esenciales en la inducción de la apoptosis por la hipertermia y en el aumento de la citotoxicidad por la melatonina***

La importancia de las caspasas en la inducción de la apoptosis por hipertermia y en la potenciación de este tipo de muerte celular por melatonina se evaluó en presencia de z-VAD-fmk, un inhibidor general de caspasas ampliamente utilizado en este tipo de estudios. Los resultados (Figura 18A) ponen de manifiesto que el pretratamiento con el inhibidor suprimió completamente la inducción de la muerte celular por hipertermia, sola o combinada con melatonina, en los diferentes tiempos de recuperación estudiados.

El efecto inhibitorio de z-VAD-fmk sobre la inducción de la apoptosis se correlacionó con el aumento del número de células viables en los grupos expuestos a hipertermia e hipertermia combinada con melatonina (Figura 18B). Además, la potenciación de la melatonina sobre la reducción del número de células fue suprimida por z-VAD-fmk y no se apreciaron diferencias en el número de células viables en los dos grupos experimentales anteriores.

Estos resultados sugieren que el efecto de la melatonina sobre la citotoxicidad inducida por hipertermia es atribuible al aumento de la actividad de las caspasas. Es interesante destacar que se observó una ligera reducción en el número de células por la presencia de z-VAD-fmk, en comparación con el vehículo, tanto en el grupo control como en el grupo tratado solo con melatonina (Figura 18B), a pesar de que el inhibidor careció de citotoxicidad ( $96 \pm 1\%$  y  $98 \pm 1\%$  de células viables en el control y en el grupo correspondiente a las células tratadas con melatonina, respectivamente). Además, aunque z-VAD-fmk suprimió completamente la apoptosis promovida por hipertermia, en ausencia o en presencia de melatonina, el tratamiento con este inhibidor no logró que se recuperasen todas las células; así, un menor número de células se detectó en los grupos tratados con hipertermia o con hipertermia combinada con melatonina, en comparación con los correspondientes grupos control, a pesar de que la viabilidad celular estuviera próxima a los niveles del control ( $\sim 90\%$  vs.  $\sim 97\%$ ).



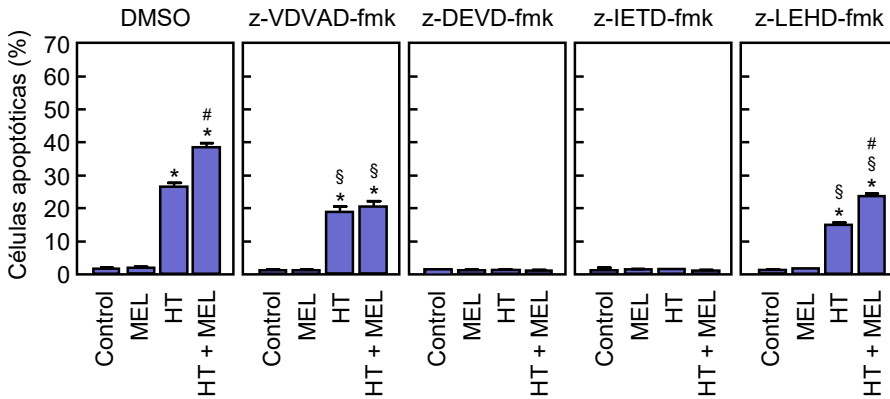
**Figura 18. Efecto del inhibidor general de las caspasas z-VAD-fmk sobre la modulación de la apoptosis por melatonina en células U-937 expuestas a hipertermia.** (A) Las células se preincubaron con z-VAD-fmk (100  $\mu$ M) o el vehículo correspondiente (0.1% DMSO) durante 1 hora, se expusieron a hipertermia (HT) sola o en combinación con 1 mM de melatonina (MEL), se recogieron en los periodos de recuperación señalados y se analizaron por citometría de flujo utilizando el método de tinción con ioduro de propidio. (B) Las células se preincubaron con z-VAD-fmk (100  $\mu$ M) o el vehículo correspondiente (0.1% DMSO) durante 1 hora, se expusieron a hipertermia (HT) sola o en combinación con 1 mM de melatonina (MEL) y tras un periodo de 24 horas de recuperación se determinó el número de células viables mediante el método de exclusión del azul de tripán. \* $P < 0.05$  vs. control (con vehículo); <sup>§</sup> $P < 0.05$  vs. hipertermia (con vehículo) o hipertermia más melatonina (con vehículo); # $P < 0.05$  vs. hipertermia.

Se sabe que ciertos inhibidores de las caspasas, como es el caso de z-VAD-fmk, pueden unirse a sitios no específicos e incluso facilitar otras modalidades de muerte celular [95,96]. Futuros estudios serán necesarios para valorar estos aspectos en las células U-937.

### ***La apoptosis inducida por la hipertermia y su potenciación por la melatonina es dependiente de la vía extrínseca***

Con el fin de identificar qué caspasas son importantes en la potenciación de la muerte celular por la melatonina, las células U-937 fueron expuestas a hipertermia en presencia de inhibidores permeables específicos de las caspasas y tras 2 horas de recuperación se cuantificaron las células apoptóticas mediante citometría de flujo. Los inhibidores analizados fueron z-VDVAD-fmk (inhibidor de caspasa-2), z-DEVD-fmk (inhibidor de caspasa-3/7), z-IETD-fmk (inhibidor de caspasa-8) y z-LEHD-fmk (inhibidor de caspasa-9).

Como puede observarse en la Figura 19, los inhibidores de caspasa-3/7 y de caspasa-8 suprimieron completamente la inducción de la apoptosis en las células expuestas a hipertermia y también en las células tratadas simultáneamente con hipertermia y melatonina. Por el contrario, cuando las células fueron tratadas con los inhibidores específicos de caspasa-2 o de caspasa-9 se obtuvieron diferentes resultados. Así, el inhibidor de caspasa-2 suprimió parcialmente la apoptosis estimulada por hipertermia (28% de células apoptóticas en ausencia de inhibidor vs. 18% en presencia de inhibidor) y neutralizó completamente el efecto de la melatonina sobre la hipertermia. El inhibidor de la caspasa-9 bloqueó parcialmente la apoptosis tanto en las células tratadas solo con hipertermia (29% en ausencia de inhibidor vs. 15% en presencia de inhibidor) como en las células sometidas al tratamiento combinado de hipertermia más melatonina (40% en ausencia de inhibidor vs. 25% en presencia de inhibidor); sin embargo, la presencia del inhibidor de la caspasa-9 no interfirió en el efecto potenciador de la melatonina sobre la hipertermia (15% en las células tratadas con hipertermia vs. 25% en las células expuestas al tratamiento combinado, hipertermia más melatonina).



**Figura 19. Efecto de los inhibidores específicos de las caspasas sobre la modulación de la apoptosis por melatonina en células U-937 expuestas a hipertermia.** Las células se preincubaron durante 1 hora en ausencia (DMSO, 0.1%) o presencia de 50  $\mu$ M de z-VDVAD-fmk (inhibidor de caspasa-2), z-DEVD-fmk (inhibidor de caspasa-3/7), z-IETD-fmk (inhibidor de caspasa-8) o z-LEHD-fmk (inhibidor de caspasa-9), se expusieron a hipertermia (HT) o a hipertermia combinada con 1 mM de melatonina (MEL), se recogieron tras un periodo de recuperación de 24 horas y se analizaron por citometría de flujo utilizando el método de tinción con yoduro de propidio. \* $P < 0.05$  vs. control (con vehículo); § $P < 0.05$  vs. hipertermia (con vehículo) o hipertermia más melatonina (con vehículo); # $P < 0.05$  vs. hipertermia.

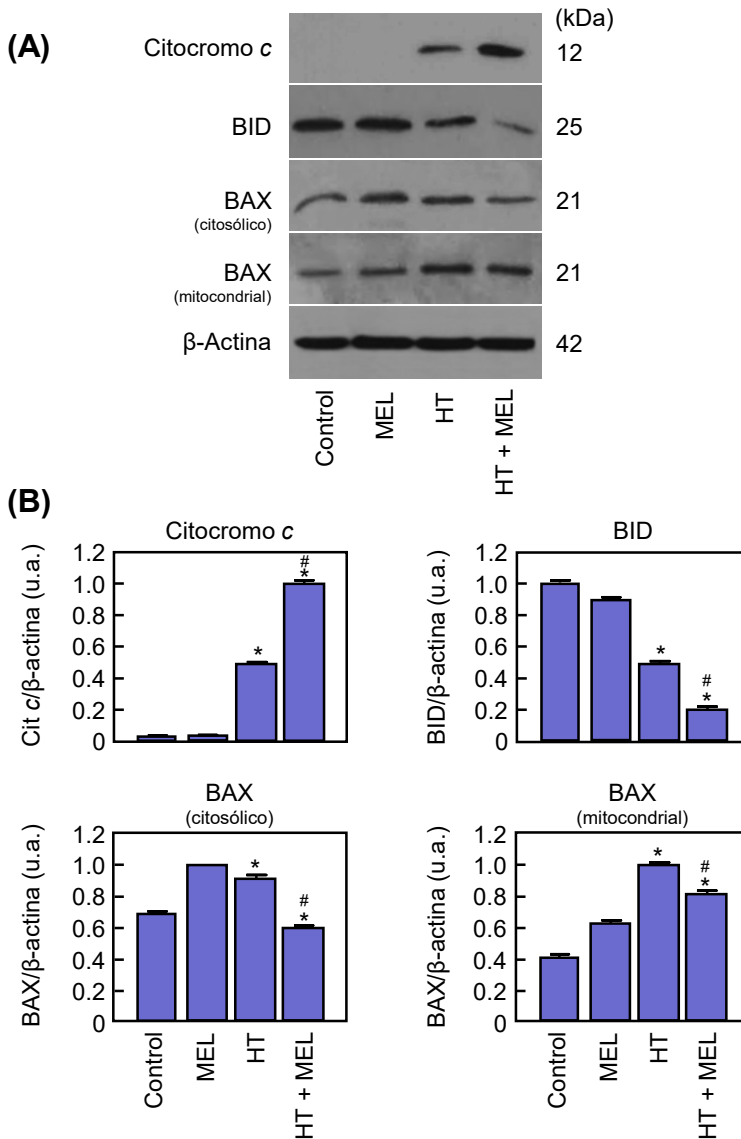
***La melatonina potencia la activación de la vía intrínseca de la apoptosis sin perturbar el potencial de la membrana mitocondrial***

La liberación de citocromo c desde la mitocondria al citosol constituye un evento fundamental en la iniciación de la apoptosis a través de la vía intrínseca e implica la activación de la caspasa-9. Como puede observarse (Figura 20), no se apreció citocromo c en las fracciones citosólicas de células control o de células tratadas solo con melatonina; por el contrario, sí se detectó esta importante proteína en las fracciones citosólicas obtenidas de células expuestas a hipertermia después de un corto periodo de recuperación (2 horas), y los niveles de este factor apoptogénico fueron mayores en las células tratadas conjuntamente con hipertermia y melatonina.

Puesto que la vía intrínseca de la apoptosis está controlada por la familia de proteínas BCL-2 [97], la expresión de BID y de BAX se evaluó también mediante inmunoblot. El factor proapoptótico BID es un sustrato de la caspasa-8 que está muy bien caracterizado. Es fragmentado en su forma activa, conocida también como forma troncada (tBID), y desempeña un papel central en la apoptosis ya que conecta las vías intrínseca y extrínseca.

La forma completa (no troncada) e inactiva de BID (25 kDa) disminuyó sensiblemente en las fracciones citosólicas de las células tratadas con hipertermia, lo que es indicativo de activación de este factor, y la reducción fue incluso mayor en las células expuestas simultáneamente con hipertermia y melatonina (Figura 20). Estos resultados están en concordancia con un mayor aumento de la actividad caspasa-8 en las células tratadas con hipertermia combinada con melatonina en comparación con las células expuestas solo a hipertermia (ver Figuras 16 y 17).

Se sabe que una vez BID es activado, rápidamente se asocia con la membrana mitocondrial externa y puede activar al factor citosólico y proapoptótico BAX que, a continuación, se inserta en esa misma membrana mitocondrial para promover el aumento de la permeabilidad de la mitocondria [98]. De acuerdo con este modelo, BAX (21 kDa) disminuyó en el citosol y paralelamente aumentó en la fracción mitocondrial de las células tratadas con hipertermia, sola o combinada con melatonina. Además, los niveles citosólicos de este factor fueron inferiores en las células expuestas al tratamiento combinado en comparación con las células tratadas solo con hipertermia, mientras que a nivel mitocondrial no se observaron diferencias (Figura 20). Este último resultado puede ser consecuencia de diferencias en la afinidad que exhibe tBID por BAX y por BAK, y por tanto de la extensión en la activación de de estos factores proapoptóticos formadores de poros.



**Figura 20. Efecto de la melatonina sobre la liberación de citocromo c al citosol y sobre las proteínas de la familia BCL-2 relacionadas con su movilización en células U-937 expuestas a hipertermia.** (A) Las células se expusieron a hipertermia (HT) en ausencia o presencia de 1 mM de melatonina (MEL) y tras un periodo de recuperación de 2.5 horas se obtuvieron las fracciones citosólicas y mitocondriales y se analizaron por inmunoblot; como control de carga de proteínas se incluyó a la  $\beta$ -actina. \* $P < 0.05$  vs. células no tratadas (control); # $P < 0.05$  vs. tratamiento solo con hipertermia.

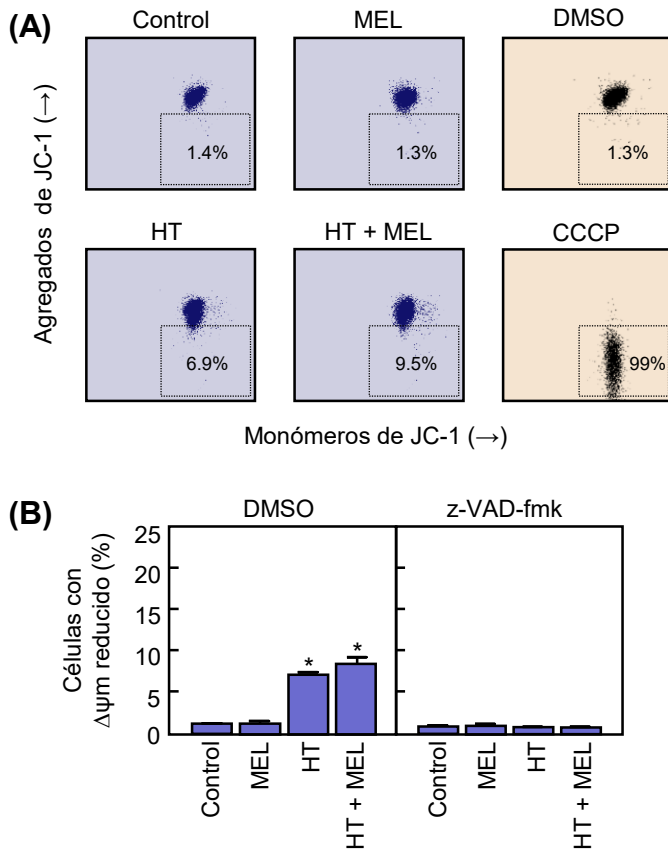


Las proteínas mitocondriales del espacio intermembrana como el citocromo *c* también pueden liberarse al citosol debido a la permeabilidad mitocondrial transitoria. Esto ocurre como consecuencia de un aumento brusco de la permeabilidad de la membrana mitocondrial interna a moléculas de bajo peso molecular, lo que promueve la disipación del potencial mitocondrial transmembrana ( $\Delta\psi_m$ ) y la inhibición de actividades mitocondriales muy importantes como es la síntesis de ATP.

Para conocer si la liberación de citocromo *c* está asociada con la reducción del potencial mitocondrial, células U-937 tratadas se tiñeron con la sonda fluorescente JC-1 y se analizaron por citometría de flujo. Como se muestra en la Figura 21A, un aumento en la fracción de células con  $\Delta\psi_m$  reducido se observó en el grupo tratado con hipertermia en comparación con el control (6.9% vs. 1.4%) tras 4 horas de recuperación. Por el contrario, el tratamiento con melatonina, sola o combinada con hipertermia, no tuvo influencia sobre el porcentaje de células con  $\Delta\psi_m$  reducido comparado con el control (1.3% vs. 1.4%) o con hipertermia sola (9.5% vs. 6.9%), respectivamente.

Aunque la exposición a hipertermia promueve elevadas proporciones de células apoptóticas tras 2-4 horas de recuperación (ver Figura 11), solamente una pequeña fracción de estas células presentó  $\Delta\psi_m$  reducido. Además, este efecto fue suprimido por z-VAD-fmk (Figura 21B), indicando que la disipación de  $\Delta\psi_m$  es probablemente consecuencia de la activación proteolítica de las caspasas.

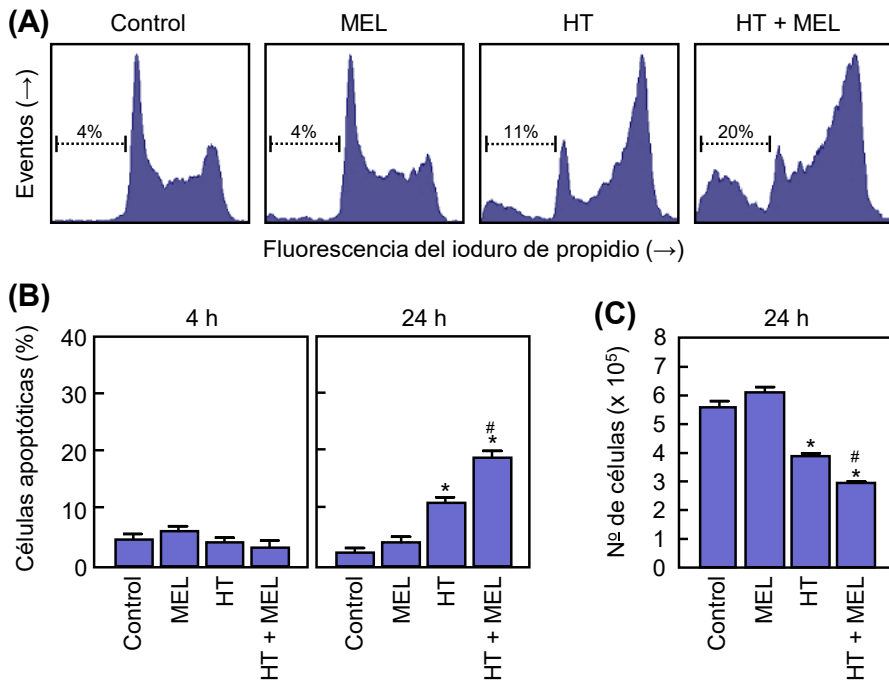
Globalmente, estos resultados sugieren que la potenciación de la liberación de citocromo *c* por melatonina en células expuestas a hipertermia parece ser independiente de la permeabilidad mitocondrial transitoria e implica la activación de los factores proapoptóticos BID y BAX.



**Figura 21. Efecto de la melatonina sobre el potencial mitocondrial transmembrana en células U-937 expuestas a hipertermia.** (A) Las células se sometieron a hipertermia (HT) en ausencia o presencia de 1 mM de melatonina (MEL) y después de un periodo de recuperación de 4 horas se tiñeron con la sonda fluorescente JC-1 y se analizaron mediante citometría de flujo. Los valores numéricos insertados en los diagramas de puntos representan el porcentaje de células con potencial mitocondrial transmembrana ( $\Delta\psi_m$ ) reducido. Como control positivo de disipación del potencial mitocondrial se utilizaron células U-937 incubadas con 50  $\mu\text{M}$  del ionóforo de protones carbonil cianuro *m*-clorofenil hidrazona (CCCP) durante 30 minutos. (B) Las células se preincubaron en presencia de 100  $\mu\text{M}$  de z-VAD-fmk o del correspondiente vehículo (0.1% DMSO) durante 1 hora, posteriormente se trataron con hipertermia (HT), en ausencia o presencia de 1 mM de melatonina (MEL), y transcurrido el periodo de recuperación (4 horas) se analizaron por citometría de flujo como se ha señalado en el apartado anterior; el inhibidor general de caspasas estuvo presente durante todo el tiempo, incluido el periodo de recuperación. \* $P < 0.05$  vs. células no tratadas (control).

**La melatonina incrementa las propiedades citotóxicas de la hipertermia en células que expresan niveles elevados del factor de supervivencia BCL-2**

Para profundizar en el papel que desempeña la vía mitocondrial de la apoptosis, el efecto de la melatonina sobre la muerte celular inducida por hipertermia se evaluó en la línea celular U-937/BCL-2 (Figura 22). Estas células expresan elevados niveles de la proteína BCL-2 humana, un factor antiapoptótico de la familia de proteínas BCL-2 que bloquea la permeabilización de la membrana mitocondrial externa [99].



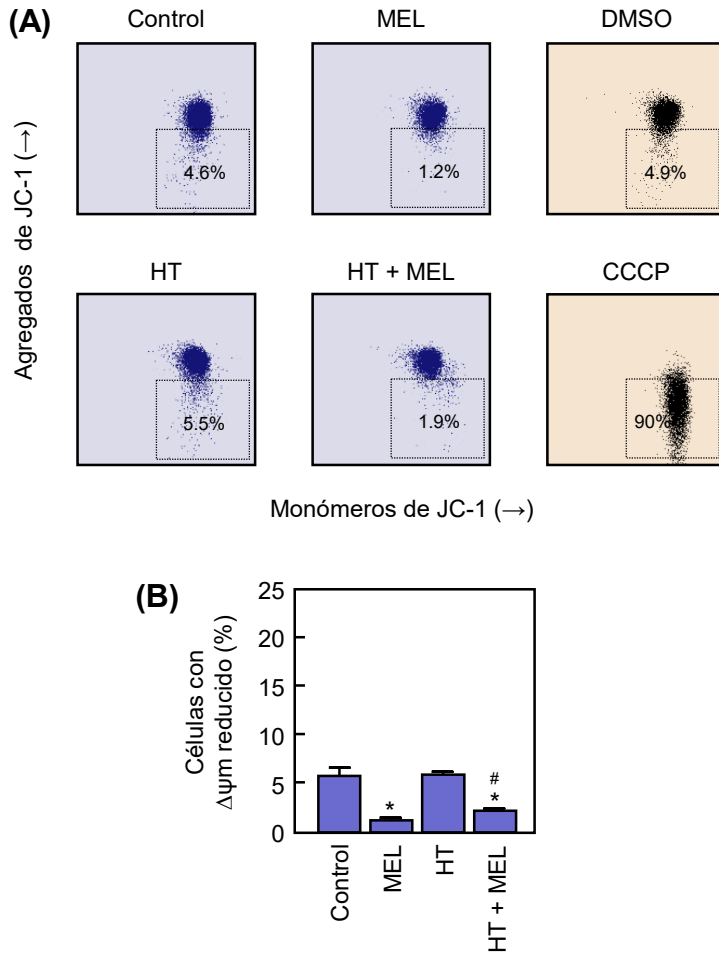
**Figura 22. Efecto de la melatonina sobre la apoptosis y sobre el potencial mitocondrial transmembrana en células U-937/BCL-2 expuestas a hipertermia.** (A) Las células se preincubaron en ausencia (control) o presencia de 1 mM de melatonina (MEL) durante 1 hora, se trataron con hipertermia (HT, 30 minutos a 43 °C) y se permitió su recuperación durante 24 horas a 37 °C. Seguidamente las células se recogieron y se determinó la distribución celular en función del contenido de DNA mediante citometría de flujo, utilizando el método de tinción con yoduro de propidio; las células incluidas en la región sub-G<sub>1</sub> (i.e. células apoptóticas) está indicada por una línea de puntos. Se presentan histogramas representativos. (B) Las células se

preincubaron en ausencia (control) o presencia de 1 mM de melatonina (MEL) durante 1 hora y se expusieron a hipertermia (HT) durante 30 minutos a 43 °C; una vez finalizados los periodos indicados de recuperación, el porcentaje de células apoptóticas se determinó por citometría de flujo como en el apartado anterior. (C) Las células se expusieron a hipertermia (HT) en ausencia o presencia de 1 mM de melatonina (MEL) y tras un periodo de 24 horas de recuperación se determinó el número de células viables mediante el método de exclusión del azul de tripán \* $P < 0.05$  vs. células no tratadas (control); # $P < 0.05$  vs. células tratadas solo con hipertermia.

Los resultados (Figura 22 A,B) muestran que la melatonina también potencia la muerte celular por apoptosis debida a la hipertermia en las células U-937/BCL-2 (~20% de células apoptóticas en el tratamiento combinado vs. ~11% en las células tratadas solo con hipertermia, después de 24 horas de recuperación). Este efecto se correlaciona también con un menor número de células viables en el tratamiento combinado en comparación con el grupo expuesto solo con hipertermia (Figura 22 C).

Globalmente, estos resultados son análogos a los obtenidos con la línea celular parental U-937 (ver Figura 12 B para su comparación). Sin embargo, las células U-937/BCL-2 demostraron ser más resistentes al tratamiento con hipertermia. Así, la activación de la apoptosis por estrés térmico no se detectó a tiempos cortos de recuperación (4 horas) o bien fue discreta (11% de células apoptóticas vs. 4% en el control, aumento de 3 veces) con tiempos de recuperación más largos (24 horas).

Como era de esperar, y al contrario que en las células U-937, no se detectó disipación del potencial mitocondrial transmembrana en las células U-937/BCL-2 expuestas a hipertermia; es más, el tratamiento con melatonina causó un ligero aumento en la fluorescencia de los agregados de JC-1 (Figura 23). Conjuntamente, estos resultados sugieren que la potenciación de la apoptosis por acción de la melatonina es independiente de la disipación del potencial de la membrana mitocondrial.



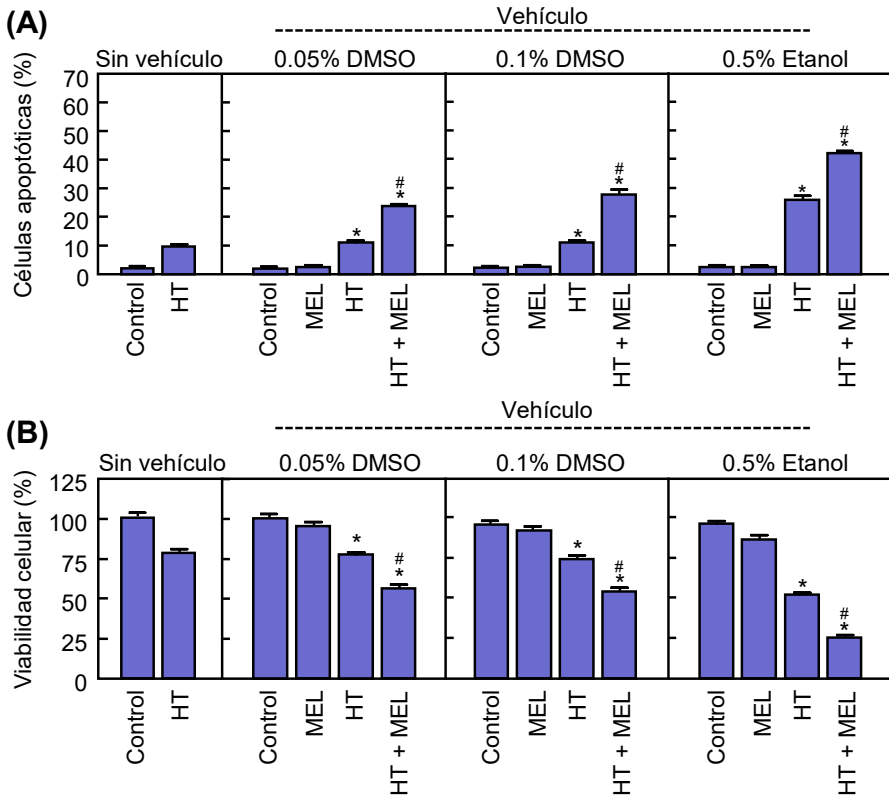
**Figura 23. Efecto de la melatonina sobre la apoptosis y sobre el potencial mitocondrial transmembrana en células U-937/BCL-2 expuestas a hipertermia.** (A) Las células se sometieron a hipertermia (HT) en ausencia o presencia de 1 mM de melatonina (MEL) y después de un periodo de recuperación de 24 horas se tiñeron con la sonda fluorescente JC-1 y se analizaron mediante citometría de flujo. Los valores numéricos insertados en los diagramas de puntos representan el porcentaje de células con potencial mitocondrial transmembrana reducido. Como control positivo de disipación del potencial mitocondrial se utilizaron células incubadas con 50  $\mu$ M del ionóforo de protones carbonil cianuro *m*-clorofenil hidrazona (CCCP) durante 30 minutos. (B) Las células se preincubaron en ausencia o presencia de 1 mM de melatonina (MEL) durante 1 hora, se sometieron a hipertermia (HT) y después de un periodo de recuperación de 24 horas se determinó el potencial mitocondrial transmembrana ( $\Delta\psi_m$ ), de la misma forma que en el apartado anterior. \* $P < 0.05$  vs. células no tratadas (control); # $P < 0.05$  vs. células tratadas solo con hipertermia.

### ***El efecto potenciador de la melatonina sobre las propiedades citotóxicas de la hipertermia es independiente del vehículo utilizado***

La melatonina es una biomolécula de naturaleza anfipática y para determinar sus propiedades biológicas habitualmente se disuelve en etanol o, con menor frecuencia, en dimetilsulfóxido, DMSO [100-103]. Para llevar a cabo el presente trabajo se eligió como vehículo el etanol y los resultados preliminares no evidenciaron efectos citotóxicos. El etanol estuvo presente en el medio de cultivo (0.5% v/v) durante todo el tiempo de duración del experimento.

En un trabajo reciente, realizado en condiciones experimentales similares a las empleadas en el presente estudio, se ha descrito que el etanol posee un importante impacto sobre la respuesta celular a la hipertermia [104]. Por tal motivo, se decidió investigar si el efecto potenciador de la melatonina observado utilizando etanol como vehículo era reproducible con DMSO. Los resultados (Figura 24 A) demuestran que la melatonina también potencia el efecto proapoptótico de la hipertermia utilizando DMSO (12% de células apoptóticas con hipertermia vs. 25% con hipertermia más melatonina), lo que sugiere que este efecto es debido a una propiedad específica de la indolamida.

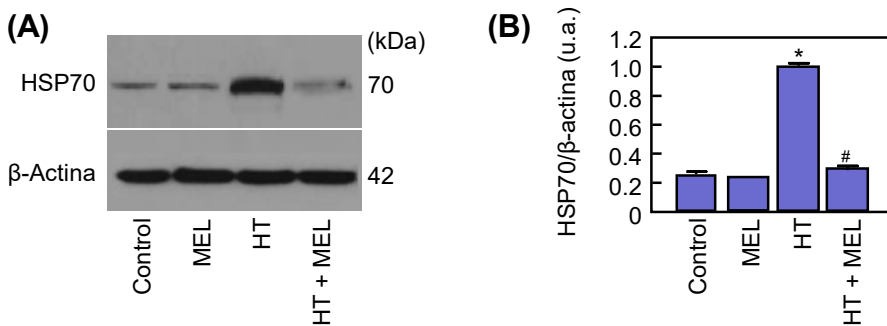
Además, la presencia de etanol en el medio de crecimiento potenció la respuesta proapoptótica de la hipertermia en comparación con las células sometidas a hipertermia en ausencia de cualquier vehículo (25% vs. 10%), lo que está en consonancia con los estudios publicados en células leucémicas humanas [104]. Es importante destacar que este efecto potenciador no se reprodujo con DMSO, independientemente de la proporción empleada (0.05% o 0.1%), lo que evidencia que se trata de un efecto específico del alcohol. Aunque el incremento del número de células apoptóticas por el tratamiento combinado fue mayor con etanol (43%) que con DMSO (25%), cabe destacar que el aumento relativo respecto a sus controles fue superior con DMSO (25% vs. 10%; 2.5 veces) que con etanol (43% vs. 25%; 1.7 veces).



**Figura 24. Efecto del vehículo sobre la acción potenciadora de la melatonina sobre la citotoxicidad inducida por hipertermia en células U-937.** (A) Las células se preincubaron durante 1 hora en ausencia o presencia de 1 mM de melatonina (MEL) disuelta en etanol (0.5%) o en DMSO (0.05% o 0.1%); las células no tratadas con melatonina se preincubaron a su vez en ausencia de etanol o DMSO (sin vehículo) o en presencia de las proporciones indicadas de esos dos vehículos. A continuación, se trataron con hipertermia (HT, 30 minutos a 43 °C), se permitió su recuperación durante 2.5 horas a 37 °C y seguidamente se recogieron y se determinó la distribución celular en función del contenido de DNA mediante citometría de flujo, utilizando el método de tinción con yoduro de propidio; se representa el porcentaje de células apoptóticas (i.e. células en la región sub-G<sub>1</sub> del ciclo celular). (B) Las células se preincubaron durante 1 hora en ausencia o presencia de 1 mM de melatonina (MEL) y los porcentajes indicados de etanol o DMSO; las células no tratadas con melatonina se preincubaron a su vez en ausencia de etanol o DMSO (sin vehículo) o en presencia de las proporciones indicadas de esos dos vehículos. Seguidamente las células se trataron con hipertermia (HT, 30 minutos a 43 °C), se incubaron a 37 °C durante 24 horas y finalmente se evaluó el efecto la viabilidad celular mediante el ensayo de la reducción de las sales de tetrazolio (MTT).

Consistente con los resultados anteriores, datos similares se obtuvieron cuando se analizó el efecto citotóxico de la hipertermia mediante el ensayo de la reducción mitocondrial de la sal de tetrazolio MTT, que valora la actividad metabólica celular (Figura 24 B) como una medida de la viabilidad celular; así, por ejemplo, la viabilidad celular en el tratamiento combinado de hipertermia y melatonina fue significativamente menor en presencia de etanol que con DMSO (25% vs. 52%).

Numerosos estudios indican que la hipertermia es un potente inductor de la respuesta al estrés, caracterizada por la estimulación de la expresión de las proteínas del choque térmico. Puesto que uno de los miembros de esta familia, la proteína HSP70, ha demostrado desempeñar un importante papel como modulador en la muerte celular mediante su interacción con varios componentes de las vías apoptóticas [105], el impacto de la melatonina sobre la expresión de HSP70 se determinó en células U-937 mediante inmunoblot. Los resultados (Figura 25) demuestran que la exposición de las células a hipertermia promueve el aumento de los niveles basales de la proteína HSP70 y que este efecto es completamente suprimido cuando las células son pretratadas con melatonina.



**Figura 25. Efecto de la melatonina sobre la expresión de HSP70 en células U-937 expuestas a hipertermia.** Las células se preincubaron en ausencia (control) o presencia de 1 mM de melatonina (MEL) durante 1 hora, se expusieron a hipertermia (HT, 30 minutos a 43 °C) y se permitió a continuación su recuperación a 37 °C durante 4 horas. Se obtuvieron los lisados celulares y se analizaron por inmunoblot; se incluyó a la  $\beta$ -actina como control de carga de proteínas. (B) Análisis densitométrico de la expresión de HSP70, expresado en unidades arbitrarias (u.a.). \* $P < 0.05$  vs. células no tratadas (control); # $P < 0.05$  vs. tratamiento solo con hipertermia.



La hipertermia es una opción terapéutica en la lucha contra el cáncer puesto que en el rango de temperaturas entre 40 °C y 44 °C ha demostrado reducir la proliferación e inducir muerte celular. Este procedimiento ha sido empleado con éxito en combinación con quimioterapia o con radioterapia [52-55,106]. Se conocen diversas modalidades para inducir hipertermia de forma controlada; el enfoque con ultrasonidos de alta intensidad y el uso de nanomateriales acoplados a una fuente de energía externa son utilizados en el tratamiento local [60,61]. Las propiedades antitumorales de la hipertermia han sido notablemente mejoradas mediante la utilización de compuestos que sensibilizan a las células [107-110].

En el presente trabajo se evaluó el efecto de la melatonina sobre la respuesta celular a la hipertermia, ya que es conocida la capacidad que presenta esta indolamida para potenciar la citotoxicidad de ciertos agentes quimioterapéuticos [37-42]. Los resultados del presente estudio indican que el co-tratamiento con melatonina incrementa notablemente la citotoxicidad de la hipertermia en las células leucémicas humanas U-937, y evidencian que esta indolamida actúa como un agente sensibilizador.

Existen dos subtipos de receptores de membrana para la melatonina, conocidos como MT1 y MT2, ambos acoplados a proteínas G. Estos regulan diversas vías de señalización que incluyen adenilato ciclasa, fosfolipasa C/proteína quinasa C y las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK). Los dos subtipos de receptores se expresan solos o conjuntamente en muchos tejidos u órganos, modulando de este modo la melatonina muchos aspectos de la fisiología humana [111,112]. También ha sido descrita la existencia y relevancia funcional de heterodímeros formados por la asociación de MT1 y MT2, lo que le añade aún más complejidad a la señalización mediada por estos receptores [113].

Normalmente los receptores MT1 y MT2 son activados completamente con concentraciones de melatonina en el rango inferior de nanomolar [9]. Sin embargo, a estas concentraciones la

melatonina fue incapaz de potenciar la muerte celular inducida por hipertermia en las células tumorales U-937. El efecto potenciador solo pudo observarse con elevadas concentraciones (1 mM), si se compara con las concentraciones plasmáticas encontradas durante el periodo nocturno (0.1-0.5 nM), lo que sugiere la existencia de un mecanismo independiente de los receptores de membrana de alta afinidad.

Se sabe que las membranas biológicas son permeables a la melatonina, sin embargo, las concentraciones de esta molécula en las distintas partes del cuerpo no están en equilibrio y los niveles intracelulares pueden ser varios órdenes de magnitud superior a los del torrente sanguíneo [87,94,114]. Se han propuesto mecanismos reguladores para intentar explicar por qué habitualmente son necesarias concentraciones elevadas de melatonina para ejercer efectos farmacológicos [94]. Se sabe, además, que esta biomolécula es producida también en las células del sistema inmune, aunque sus concentraciones intracelulares no se conocen. Algunos autores han sugerido que la inhibición de la enzima soluble *quinona reductasa 2* puede explicar algunos de los efectos protectores descritos con concentraciones altas de melatonina en enfermedades neurológicas degenerativas [29]. Estudios futuros podrán aclarar si la acción de melatonina sobre la hipertermia en células U-937 implica la participación de sitios de unión de baja afinidad como los descritos para *quinona reductasa 2* y también para la calmodulina.

Existen muchas evidencias que indican que la hipertermia reduce la viabilidad celular principalmente a través de un mecanismo que promueve la apoptosis [48,115,116]. Los resultados del presente trabajo demuestran que la melatonina potencia la respuesta apoptótica en células U-937 expuestas a hipertermia. Si bien en la mayoría de los experimentos la melatonina fue añadida a las células 1 hora antes de iniciarse el periodo de hipertermia, no se observaron diferencias si la preincubación era más larga (3 horas) o más corta, esto es, si se añadía justo en el momento de iniciarse el tratamiento con calor.

El efecto de la indolamida sobre la apoptosis inducida por hipertermia fue evidente desde las 2 horas de recuperación y se extendió durante tiempos de recuperación más prolongados (24 horas). Resultados similares se observaron en las células de leucemia humanas HL-60 (células de leucemia mieloide aguda) pero no en las células K-562 (leucemia mieloide crónica) o MOLT-3 (leucemia linfoblástica aguda). Por el contrario, la presencia de melatonina protegió a las células K-562 frente a la hipertermia ya que redujo notablemente el porcentaje de células apoptóticas e incrementó la supervivencia celular. Estudios futuros serán necesarios para identificar posibles mecanismos moleculares que puedan explicar la capacidad de la melatonina para atenuar la respuesta apoptótica frente a la hipertermia, tanto en las células K-562 como en las células MOLT-3. Es probable que pueda influir sobre diferentes vías de señalización ya que, por ejemplo, las células K-562, pero no las células MOLT-3, expresan la oncoproteína BCR/ABL con actividad tirosina quinasa constitutiva que a su vez actúa activando vías como PI3K/AKT, MAPK o STAT5, favoreciendo la supervivencia e inhibiendo la apoptosis.

Estudios previos sugieren que la melatonina por sí misma puede reducir la proliferación de las células cancerígenas a través de mecanismos que conducen a la activación de la apoptosis, y que para ello frecuentemente se requieren tiempos de incubación prolongados [33,34]. Los resultados del presente trabajo indican que la melatonina no afecta a los niveles basales de apoptosis en células U-937, incluso a tiempos largos de recuperación (24 horas).

La muerte celular por apoptosis puede ocurrir con o sin activación de las caspasas, una familia de enzimas proteolíticas involucradas en el control de la muerte celular y la inflamación [117]. Existen dos rutas que conducen a la activación de la apoptosis en las células de mamíferos, son las denominadas vía intrínseca (o vía mitocondrial) y vía extrínseca (o vía de los receptores de muerte). Estas dos vías son las responsables de la apoptosis dependiente de caspasas en la mayoría de los casos [118]. Los estudios de inmunoblot y de actividad enzimática con lisados celulares revelaron un incremento significativo

en el procesamiento y en la actividad de las caspasas-2, -3, -8 y -9 en células U-937 tratadas con la combinación hipertermia más melatonina comparado con la exposición solo a hipertermia, después de 4 horas de recuperación. Con el fin de delimitar el papel que desempeñan las caspasas en el efecto de la melatonina sobre la hipertermia, se utilizaron inhibidores específicos y de amplio espectro de estas proteasas. Los resultados indican que la potenciación de la muerte celular debido a la melatonina fue dependiente de la activación de las caspasas, ya que la apoptosis fue completamente suprimida por el inhibidor general de caspasas z-VAD-fmk. Los mismos resultados se obtuvieron haciendo uso de los inhibidores de caspasa-3 y caspasa-8. Respecto a los inhibidores específicos de caspasa-2 y caspasa-9, estos solo pudieron reducir parcialmente el porcentaje de células apoptóticas inducida por hipertermia y únicamente el inhibidor de caspasa-2 logró interferir con el efecto potenciador de melatonina. Estos resultados sugieren que, en las condiciones experimentales utilizadas, la muerte celular por apoptosis estimulada por el tratamiento con hipertermia implica la activación de la vía extrínseca a través de la caspasa-8 y la ejecución de la apoptosis mediante la caspasa-3.

La activación de la caspasa-8 es iniciada por la unión de los receptores de muerte (FAS, TNFR, DR4 [TRAIL-R1] o DR5 [TRAIL-R2]) a sus correspondientes ligandos (FasL, TNF o TRAIL) en la membrana celular. Estudios previos en células U-937 han demostrado que la externalización de FAS está asociada con el efecto potenciador de ciertos compuestos sintéticos sobre la apoptosis inducida por hipertermia [119,120]. La melatonina también incrementa la expresión de los receptores de muerte y sus ligandos en líneas celulares de cáncer hematológico y en los blastos de pacientes con leucemia mieloide aguda, y tanto FAS como FASL parecen desempeñar un papel central en la toxicidad de melatonina en células leucémicas [121]. Puesto que las células U-937 expresan la mayoría de receptores de muerte y sus ligandos [122], investigaciones futuras podrán aclarar el papel que desempeñan estas biomoléculas en la potenciación de la melatonina sobre muerte celular iniciada por hipertermia.

La caspasa-8 activa directamente a la caspasa-3 para iniciar la apoptosis y también activa a BID mediante la liberación de un fragmento de 15 kDa con capacidad para insertarse en la membrana mitocondrial externa (forma truncada, t-BID). Este último factor proapoptótico facilita la conexión con la vía mitocondrial (células del tipo II) y, por tanto, la amplificación de la respuesta apoptótica. La caspasa-2 también utiliza a BID como sustrato natural pero la eficiencia en la fragmentación de este factor proteico es mucho menor si se compara con la caspasa-8 [123]. La función fisiológica de caspasa-2 es enigmática ya que exhibe características de caspasa iniciadora y de caspasa ejecutora, y comparte la mayoría de los sustratos con otras caspasas, principalmente con caspasa-3/7 y con caspasa-8 [124]. Cabe destacar también que z-VDVAD-fmk es un potente inhibidor de caspasa-2 y de caspasas-3/7, y que caspasa-2 no parece jugar un papel relevante en la muerte inducida por hipertermia en la línea celular humana Jurkat (leucemia linfoide crónica) [125].

Muchos estudios sugieren que BID, una vez activado, se asocia rápidamente con la membrana mitocondrial externa donde se une transitoriamente con BAX (presente en el citosol) o con BAK (presente en la membrana mitocondrial) y promueve la activación de estos factores. El modelo más ampliamente aceptado asume que BAX y BAK oligomerizan en la membrana mitocondrial externa, facilitando de este modo el aumento de la permeabilidad a proteínas como citocromo *c* y otros factores mitocondriales [98]. Los resultados de inmunoblot demuestran que la hidrólisis de BID fue superior con el tratamiento combinado de hipertermia y melatonina, y es consistente también con una mayor actividad caspasa-8 observada en este grupo experimental. La liberación de citocromo *c* mitocondrial se detectó a tiempos tempranos en células tratadas con hipertermia y los niveles de este factor apoptogénico fueron también mayores cuando la exposición a hipertermia se hizo en presencia de melatonina. Los datos experimentales muestran también evidencias de que la liberación de citocromo *c* causada por el tratamiento con hipertermia no estaba asociada con la disipación del potencial mitocondrial transmembrana ( $\Delta\psi_m$ ). A los tiempos de tratamiento en los que máximos niveles de

células apoptóticas fueron detectados (2-4 horas), solo una pequeña fracción de células presentó disminución de  $\Delta\psi_m$  en respuesta a hipertermia sola o combinada con melatonina. Este efecto marginal, además, demostró ser un evento caspasa-dependiente puesto que fue neutralizado totalmente mediante el inhibidor general de caspasas z-VAD-fmk. En este contexto se sabe que, en condiciones apoptóticas, la subunidad p75 del complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial es fragmentada por acción de la caspasa-3, lo que desencadena el bloqueo del transporte de electrones, la disipación de  $\Delta\psi_m$  y la reducción de los niveles de ATP [126]. Estudios previos han demostrado, además, que cambios en  $\Delta\psi_m$  no son absolutamente necesarios para lograr la completa liberación de citocromo *c* a través del aumento de la permeabilidad de la membrana mitocondrial externa [127].

La relevancia de la vía mitocondrial de la apoptosis en la potenciación de la melatonina sobre la muerte celular inducida por hipertermia se evaluó mediante dos aproximaciones experimentales, la inhibición de la actividad caspasa-9 y la supresión del aumento de la permeabilidad de la membrana mitocondrial externa. En U-937, el uso de un inhibidor específico frente a la caspasa-9 (z-LEHD-fmk) redujo el número de células apoptóticas debido a hipertermia a tiempos cortos (2 horas), pero no consiguió bloquear el efecto de melatonina. En U-937/BCL-2, una línea celular que sobreexpresa el factor antiapoptótico BCL-2 que inhibe el aumento de la permeabilidad de la membrana mitocondrial externa y por lo tanto la vía mitocondrial, el efecto potenciador de la melatonina sobre la apoptosis inducida por hipertermia se conserva. La respuesta apoptótica en esta línea fue, sin embargo, más lenta y menos intensa en comparación con la línea celular parental. Aunque el porcentaje de células apoptóticas fue similar en las células U-937 cultivadas en presencia del inhibidor de caspasa-9 y en las células U-937/BCL-2, la respuesta más temprana (2-3 horas) observada en las células parentales respecto a las células que sobreexpresan BCL-2 (24 horas) sugiere que otros factores apoptogénicos, además de citocromo *c*, puedan liberarse de la mitocondria y modular la respuesta apoptótica. En este contexto, se sabe que SMAC neutraliza

la represión ejercida por los antagonistas XIAP sobre las caspasas efectoras y que ello es esencial para la muerte celular inducida por FAS en las células del tipo II [128]. En las células U-937/BCL-2 expuestas a hipertermia no se detectó disipación de  $\Delta\psi_m$ , como cabía esperar. Es destacable que el tratamiento con melatonina, sola o combinada con hipertermia, promovió el aumento de la fluorescencia debida a los agregados JC-1, lo que ha sido interpretado como un aumento de  $\Delta\psi_m$  o del volumen de las mitocondrias [129].

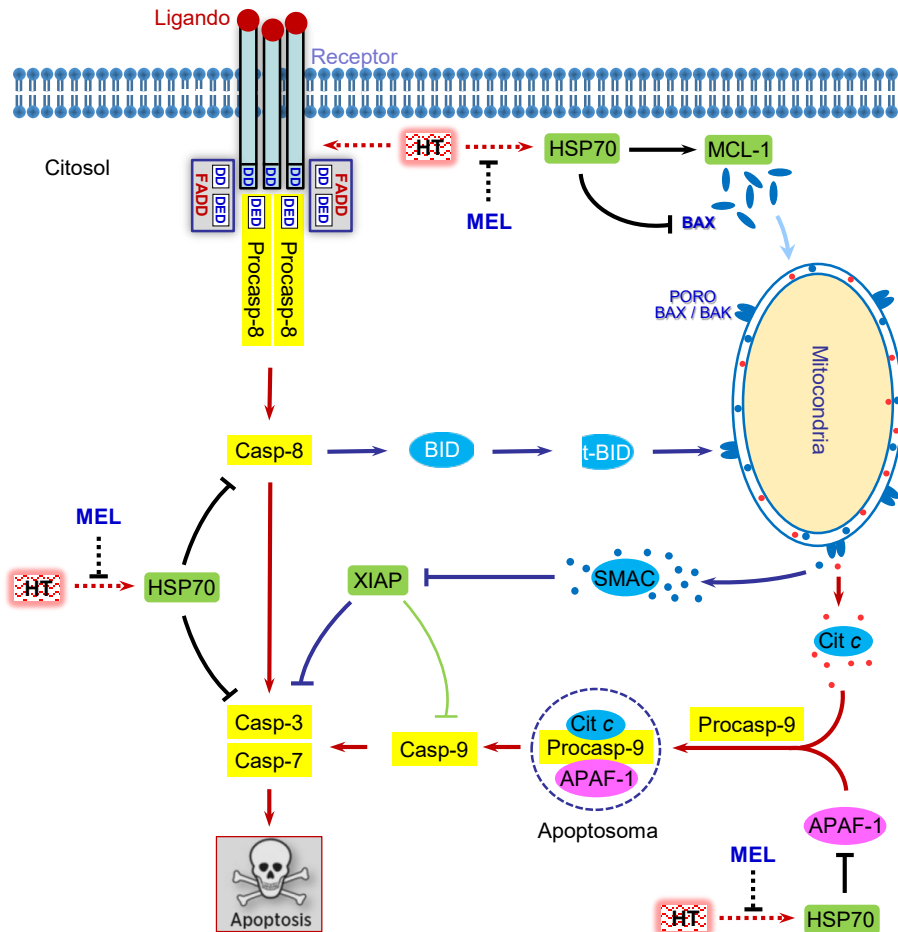
Colectivamente, estos datos indican que la apoptosis inducida por hipertermia en células U-937 implica la activación de la vía extrínseca y de BID; este factor favorece a su vez la entrada en escena de la vía mitocondrial y la amplificación de la respuesta apoptótica. La melatonina modula las dos vías de la apoptosis, aumenta la actividad caspasa-8 y la liberación de citocromo *c*. Este último se asocia en el citosol con el factor APAF-1 para formar un complejo con múltiples subunidades, el apoptosoma, y activar a la caspasa-9. La potenciación debida a melatonina de la apoptosis inducida por hipertermia en las células U-937/BCL-2 es relevante ya que se sabe que las células cancerígenas evaden la apoptosis de múltiples formas, siendo una de las más ampliamente descritas el aumento en la expresión de los miembros antiapoptóticos de la familia BCL-2, bloqueando de esta manera la permeabilidad de la membrana mitocondrial externa [99,130]. Consecuentemente, la melatonina puede incrementar la sensibilidad de las células tumorales sometidas a hipertermia al favorecer la utilización de la vía mitocondrial. En este contexto, es destacable que la melatonina redujo la expresión de la proteína HSP70, cuya síntesis es inducida por hipertermia. Esta proteína es un miembro de la familia de proteínas del choque térmico que se sobreexpresa frecuentemente en los tumores y desempeña un papel protector frente a la apoptosis. Se ha demostrado que HSP70 inhibe la formación del apoptosoma, interfiriendo de este modo con la activación de la caspasa-9 y de la caspasa-3, y que también puede bloquear otras etapas de la vía apoptótica como es la liberación de citocromo *c* mitocondrial [131].

La transcripción del gen de HSP70 está regulado por el factor de transcripción del choque térmico 1 (HSF1), que se activa en respuesta a hipertermia entre otros estímulos de estrés [132]. La activación transcripcional de HSF1 es un proceso complejo que, secuencialmente, implica: i) la translocación desde el citosol al núcleo, ii) la trimerización, iii) la unión al elemento de respuesta del choque térmico (HSE) en el DNA, y iv) la fosforilación [133]. Se sabe que durante el periodo de hipertermia ocurre la activación de HSF1 y su unión al DNA, mientras que la expresión de HSP70 tiene lugar durante el periodo de recuperación [134].

Se ha descrito que la *catalasa*, utilizada frecuentemente como antioxidante natural por su capacidad para descomponer al peróxido de hidrógeno, aumenta el porcentaje de células apoptóticas en células U-937 expuestas a hipertermia y disminuye la expresión de HSP70 a través de un mecanismo en el que parece estar involucrado el factor de transcripción HSF1 [134]. Puesto que la melatonina desempeña un importante papel como antioxidante natural, es sugerente pensar que esta indolamida pueda alterar la respuesta al estrés térmico de manera análoga a como lo hace la *catalasa*. Investigaciones futuras podrán aclarar si la melatonina modula la activación de HSF1 y el papel que desempeña HSP70 en la potenciación de la muerte celular.

En resumen, la hipertermia como opción terapéutica implica la elevación de la temperatura de un área específica del cuerpo o del organismo completo para conseguir los efectos deseados. La hipertermia de cuerpo entero está siendo usada en combinación con otros tratamientos antitumorales en aquellas situaciones con metástasis; habitualmente implica la elevación sistémica de la temperatura dentro del rango de la fiebre. En el presente trabajo se muestran evidencias de que la melatonina potencia la efectividad de la hipertermia en la destrucción de las células tumorales *in vitro* (Figura 26). Aunque está documentado que altas concentraciones de melatonina exhiben muy baja toxicidad, futuros estudios *in vivo* podrán elucidar los beneficios de esta indolamida como agente sensibilizador de la termoterapia frente al cáncer.





**Figura 26. La melatonina potencia la muerte celular por apoptosis inducida por hipertermia en células de leucemia humana.** El tratamiento solamente con hipertermia (HT) estimula la apoptosis a través de un mecanismo en el que están implicadas caspasa-8 y caspasa-3, y además promueve el aumento de los niveles del factor proteico de supervivencia HSP70. Un gran número de evidencias indican que esta proteína es capaz de: i) estabilizar el factor antiapoptótico MCL-1, ii) bloquear la translocación de BAX, iii) interferir en la formación del apoptosoma a través de su unión con APAF-1, y iv) inhibir directamente las actividades enzimáticas de caspasa-8 y caspasa-3. El pretratamiento con melatonina previene el aumento de HSP70 por hipertermia a través de un mecanismo desconocido, lo que se traduce en: i) aumento de la actividad caspasa-8, ii) estimulación de la proteólisis (activación) de BID, iii) incremento de la translocación de BAX, iv) mayor liberación de factores proapoptóticos mitocondriales (citocromo c, SMAC) y finalmente, v) aumento de las

actividades caspasa-9 y caspasa-3. Se sabe que la afinidad de XIAP por las caspasas 3 y 7 es muy elevada en comparación con la que presenta por la caspasa-9 (baja afinidad) o por la caspasa-8 (nula afinidad). HT, hipertermia; MEL, melatonina; Cit c, citocromo c.

La hipertermia es una modalidad terapéutica en la lucha contra el cáncer, particularmente en combinación con la quimioterapia y la radioterapia. En el presente trabajo se evaluó el efecto de la melatonina sobre las células de leucemia humanas expuestas a la hipertermia y se observó que esta indolamida exhibe propiedades sensibilizadoras, probablemente a través de un mecanismo independiente de los receptores de membrana.

Hay muchas evidencias que indican que la hipertermia reduce la viabilidad celular activando la apoptosis. Los resultados de este trabajo demuestran que la melatonina potencia la respuesta proapoptótica de la hipertermia en las células U-937 y HL-60, pero no en las líneas de leucemia humanas K-562 o MOLT-3; en estas últimas pareció ejercer más bien un papel citoprotector.

Se sabe que la melatonina, por sí misma, puede reducir la proliferación de las células cancerígenas a través de la activación de diversas vías de señalización que promueven la apoptosis. Sin embargo, en las células U-937 y HL-60 no se detectó aumento de los niveles basales de apoptosis.

La muerte celular por apoptosis puede ocurrir con o sin participación de las caspasas. Se observó un incremento en el procesamiento y en la actividad de las caspasas-2, -3, -8 y -9 en las células U-937 tratadas con la combinación de hipertermia y melatonina, comparado con las células expuestas solo a hipertermia. Además, la potenciación de la muerte celular por la melatonina es dependiente de la activación de las caspasas.

La exposición de las células U-937 a hipertermia estimula la activación de la vía extrínseca y la amplificación de la respuesta apoptótica mediante la hidrólisis de BID, la liberación de citocromo *c* y la posterior ejecución de la vía mitocondrial. Los resultados del estudio comparativo de U-937 y U-937/BCL-2 sugieren que otros factores apoptogénicos, además del citocromo *c*, pueden liberarse de las mitocondrias y promover la apoptosis.

La melatonina incrementó la sensibilidad de las células tumorales, activando la vía mitocondrial a través de la proteólisis de BID y de la represión de la expresión de la proteína del choque térmico HSP-70, proteína citoprotectora que se induce por la hipertermia y que interfiere en la formación del apoptosoma.

Aunque está ampliamente documentado que la melatonina exhibe muy baja toxicidad en humanos cuando es utilizada a altas concentraciones, futuros estudios *in vivo* podrán elucidar sus beneficios como molécula sensibilizadora en la termoterapia frente al cáncer.

1. Lerner AB, Case JD, Takahashi Y, Lee TH, Mori W. Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes. *J Am Chem Soc.* (1958) 80:2587.  
doi:10.1021/ja01543a060.
2. Arnao MB, Hernández-Ruiz J. Melatonin: plant growth regulator and/or biostimulator during stress?. *Trends Plant Sci.* 2014; 19(12):789-797.  
doi:10.1016/j.tplants.2014.07.006.
3. Zhao D, Yu Y, Shen Y, Liu Q, Zhao Z, Sharma R, Reiter RJ. Melatonin Synthesis and Function: Evolutionary history in animals and plants. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2019;10:249.  
doi: 10.3389/fendo.2019.00249.
4. Tan DX, Manchester LC, Esteban-Zubero E, Zhou Z, Reiter RJ. Melatonin as a potent and inducible endogenous antioxidant: synthesis and metabolism. *Molecules.* 2015;20(10):18886-18906.  
doi:10.3390/molecules201018886.
5. Mauriz JL, Collado PS, Veneroso C, Reiter RJ, González-Gallego J. A review of the molecular aspects of melatonin's anti-inflammatory actions: recent insights and new perspectives. *J Pineal Res.* 2013;54(1):1-14.  
doi:10.1111/j.1600-079X.2012.01014.x.
6. Liu K, Yu W, Wei W, et al. Melatonin reduces intramuscular fat deposition by promoting lipolysis and increasing mitochondrial function. *J Lipid Res.* 2019;60(4):767-782.  
doi:10.1194/jlr.M087619.
7. Xu P, Wang J, Hong F, et al. Melatonin prevents obesity through modulation of gut microbiota in mice. *J Pineal Res.* 2017;62(4):10.1111/jpi.12399.  
doi:10.1111/jpi.12399.
8. Peschke E, Bähr I, Mühlbauer E. Experimental and clinical aspects of melatonin and clock genes in diabetes. *J Pineal Res.* 2015;59(1):1-23.  
doi:10.1111/jpi.12240.
9. Tosini G, Owino S, Guillaume JL, Jockers R. Understanding melatonin receptor pharmacology: latest insights from mouse

- models, and their relevance to human disease. *Bioessays*. 2014;36(8):778-787.  
doi:10.1002/bies.201400017.
10. Reiter RJ. Melatonin: the chemical expression of darkness. *Mol Cell Endocrinol*. 1991;79(1-3):C153-C158.  
doi:10.1016/0303-7207(91)90087-9
  11. Reiter RJ, Tan DX, Kim SJ, Cruz MH. Delivery of pineal melatonin to the brain and SCN: role of canaliculi, cerebrospinal fluid, tanycytes and Virchow-Robin perivascular spaces. *Brain Struct Funct*. 2014;219(6):1873-1887.  
doi:10.1007/s00429-014-0719-7.
  12. Treberg JR, Braun K, Zacharias P, Kroeker K. Multidimensional mitochondrial energetics: application to the study of electron leak and hydrogen peroxide metabolism. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. 2018;224:121-128.  
doi:10.1016/j.cbpb.2017.12.013.
  13. Reiter RJ, Rosales-Corral S, Tan DX, Jou MJ, Galano A, Xu B. Melatonin as a mitochondria-targeted antioxidant: one of evolution's best ideas. *Cell Mol Life Sci*. 2017;74(21):3863-3881.  
doi:10.1007/s00018-017-2609-7.
  14. Tan DX, Hardeland R, Back K, Manchester LC, Alatorre-Jimenez MA, Reiter RJ. On the significance of an alternate pathway of melatonin synthesis via 5-methoxytryptamine: comparisons across species. *J Pineal Res*. 2016;61(1):27-40.  
doi:10.1111/jpi.12336.
  15. Klein DC. Arylalkylamine N-acetyltransferase: "the Timezyme". *J Biol Chem*. 2007;282(7):4233-4237.  
doi:10.1074/jbc.R600036200.
  16. Reiter RJ, Sharma R, Rosales-Corral S, de Campos Zuccari DAP, de Almeida Chuffa LG. Melatonin: a mitochondrial resident with a diverse skill set. *Life Sci*. 2022;301:120612.  
doi:10.1016/j.lfs.2022.120612.
  17. Venegas C, García JA, Escames G, et al. Extrapineal melatonin: analysis of its subcellular distribution and daily fluctuations. *J Pineal Res*. 2012;52(2):217-227.  
doi:10.1111/j.1600-079X.2011.00931.x.

18. Acuña Castroviejo D, López LC, Escames G, López A, García JA, Reiter RJ. Melatonin-mitochondria interplay in health and disease. *Curr Top Med Chem*. 2011;11(2):221-240.  
doi:10.2174/156802611794863517
19. Tan DX, Manchester LC, Qin L, Reiter RJ. Melatonin: a mitochondrial targeting molecule involving mitochondrial protection and dynamics. *Int J Mol Sci*. 2016;17(12):2124.  
doi:10.3390/ijms17122124
20. Hardeland R. Melatonin in plants - diversity of levels and multiplicity of functions. *Front Plant Sci*. 2016;7:198.  
doi:10.3389/fpls.2016.00198
21. Markus RP, Sousa KS, da Silveira Cruz-Machado S, Fernandes PA, Ferreira ZS. Possible role of pineal and extra-pineal melatonin in surveillance, immunity, and first-line defense. *Int J Mol Sci*. 2021 Nov 10;22(22):12143.  
doi: 10.3390/ijms222212143
22. Dubocovich ML, Delagrange P, Krause DN, Sugden D, Cardinali DP, Olcese J. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXV. Nomenclature, classification, and pharmacology of G protein-coupled melatonin receptors. *Pharmacol Rev*. 2010;62(3):343-380.  
doi:10.1124/pr.110.002832
23. Hermann R, Podhajsky S, Jungnickel S, Lerchl A. Potentiation of antiproliferative effects of tamoxifen and ethanol on mouse hepatoma cells by melatonin: possible involvement of mitogen-activated protein kinase and induction of apoptosis. *J Pineal Res*. 2002;33(1):8-13.  
doi:10.1034/j.1600-079x.2002.01846.x
24. Lacoste B, Angeloni D, Dominguez-Lopez S, et al. Anatomical and cellular localization of melatonin MT1 and MT2 receptors in the adult rat brain. *J Pineal Res*. 2015;58(4):397-417.  
doi:10.1111/jpi.12224
25. Jockers R, Maurice P, Boutin JA, Delagrange P. Melatonin receptors, heterodimerization, signal transduction and binding sites: what's new?. *Br J Pharmacol*. 2008;154(6):1182-1195.  
doi:10.1038/bjp.2008.184

26. Becker-André M, Wiesenberg I, Schaeren-Wiemers N, et al. Pineal gland hormone melatonin binds and activates an orphan of the nuclear receptor superfamily [published correction appears in *J Biol Chem* 1997 Jun 27;272(26):16707]. *J Biol Chem*. 1994;269(46):28531-28534.
27. He B, Zhao Y, Xu L, et al. The nuclear melatonin receptor ROR $\alpha$  is a novel endogenous defender against myocardial ischemia/reperfusion injury. *J Pineal Res*. 2016;60(3):313-326. doi:10.1111/jpi.12312
28. del Río B, García Pedrero JM, Martínez-Campa C, Zuazua P, Lazo PS, Ramos S. Melatonin, an endogenous-specific inhibitor of estrogen receptor alpha via calmodulin. *J Biol Chem*. 2004;279(37):38294-38302. doi:10.1074/jbc.M403140200
29. Boutin JA. Quinone reductase 2 as a promising target of melatonin therapeutic actions. *Expert Opin Ther Targets*. 2016;20(3):303-317. doi:10.1517/14728222.2016.1091882
30. Targhazeh N, Reiter RJ, Rahimi M, et al. Oncostatic activities of melatonin: roles in cell cycle, apoptosis, and autophagy. *Biochimie*. 2022;200:44-59. doi:10.1016/j.biochi.2022.05.008
31. Perdomo J, Quintana C, González I, et al. Melatonin induces melanogenesis in human SK-MEL-1 melanoma cells involving glycogen synthase kinase-3 and reactive oxygen species. *Int J Mol Sci*. 2020;21(14):4970. doi:10.3390/ijms21144970
32. Ordoñez R, Fernández A, Prieto-Domínguez N, et al. Ceramide metabolism regulates autophagy and apoptotic cell death induced by melatonin in liver cancer cells. *J Pineal Res*. 2015;59(2):178-189. doi:10.1111/jpi.12249
33. Perdomo J, Cabrera J, Estévez F, Loro J, Reiter RJ, Quintana J. Melatonin induces apoptosis through a caspase-dependent but reactive oxygen species-independent mechanism in human leukemia Molt-3 cells. *J Pineal Res*. 2013;55(2):195-206.



- doi:10.1111/jpi.12062
34. Rubio S, Estévez F, Cabrera J, Reiter RJ, Loro J, Quintana J. Inhibition of proliferation and induction of apoptosis by melatonin in human myeloid HL-60 cells. *J Pineal Res.* 2007;42(2):131-138.  
doi:10.1111/j.1600-079X.2006.00392.x
  35. García-Santos G, Martín V, Rodríguez-Blanco J, et al. Fas/Fas ligand regulation mediates cell death in human Ewing's sarcoma cells treated with melatonin. *Br J Cancer.* 2012;106(7):1288-1296.  
doi:10.1038/bjc.2012.66
  36. Bizzarri M, Proietti S, Cucina A, Reiter RJ. Molecular mechanisms of the pro-apoptotic actions of melatonin in cancer: a review. *Expert Opin Ther Targets.* 2013;17(12):1483-1496.  
doi:10.1517/14728222.2013.834890
  37. Uguz AC, Cig B, Espino J, et al. Melatonin potentiates chemotherapy-induced cytotoxicity and apoptosis in rat pancreatic tumor cells. *J Pineal Res.* 2012;53(1):91-98.  
doi:10.1111/j.1600-079X.2012.00974.x
  38. Casado-Zapico S, Rodríguez-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(1):72-80.  
doi:10.1111/j.1600-079X.2009.00727.x
  39. Plaimee P, Weerapreeyakul N, Barusrux S, Johns NP. Melatonin potentiates cisplatin-induced apoptosis and cell cycle arrest in human lung adenocarcinoma cells. *Cell Prolif.* 2015;48(1):67-77.  
doi:10.1111/cpr.12158
  40. Martín V, García-Santos G, Rodríguez-Blanco J, et al. Melatonin sensitizes human malignant glioma cells against TRAIL-induced cell death. *Cancer Lett.* 2010;287(2):216-223.  
doi:10.1016/j.canlet.2009.06.016
  41. Xiang S, Dauchy RT, Hauch A, et al. Doxorubicin resistance in breast cancer is driven by light at night-induced disruption of the

- circadian melatonin signal. *J Pineal Res.* 2015;59(1):60-69.  
doi:10.1111/jpi.12239
42. Alonso-González C, González A, Martínez-Campa C, et al. Melatonin enhancement of the radiosensitivity of human breast cancer cells is associated with the modulation of proteins involved in estrogen biosynthesis. *Cancer Lett.* 2016;370(1):145-152.  
doi:10.1016/j.canlet.2015.10.015
43. Tian T, Li J, Li Y, et al. Melatonin enhances sorafenib-induced cytotoxicity in FLT3-ITD acute myeloid leukemia cells by redox modification. *Theranostics.* 2019;9(13):3768-3779.  
doi:10.7150/thno.34327
44. Li T, Yang Z, Jiang S, et al. Melatonin: does it have utility in the treatment of haematological neoplasms?. *Br J Pharmacol.* 2018;175(16):3251-3262.  
doi:10.1111/bph.13966
45. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011;144(5):646-674.  
doi:10.1016/j.cell.2011.02.013
46. Senga SS, Grose RP. Hallmarks of cancer-the new testament. *Open Biol.* 2021;11(1):200358.  
doi:10.1098/rsob.200358.
47. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2021;71(3):209-249.  
doi:10.3322/caac.21660
48. Ahmed K, Tabuchi Y, Kondo T. Hyperthermia: an effective strategy to induce apoptosis in cancer cells. *Apoptosis.* 2015;20(11):1411-1419.  
doi:10.1007/s10495-015-1168-3
49. Lauber K, Brix N, Ernst A, et al. Targeting the heat shock response in combination with radiotherapy: Sensitizing cancer cells to irradiation-induced cell death and heating up their immunogenicity. *Cancer Lett.* 2015;368(2):209-229.  
doi:10.1016/j.canlet.2015.02.047

50. Kok HP, Cressman ENK, Ceelen W, Brace CL, Ivkov R, Grüll H, Ter Haar G, Wust P, Crezee J. Heating technology for malignant tumors: a review. *Int J Hyperthermia*. 2020;37(1):711-741. doi: 10.1080/02656736.2020.1779357
51. Bakker A, van der Zee J, van Tienhoven G, Kok HP, Rasch CRN, Crezee H. Temperature and thermal dose during radiotherapy and hyperthermia for recurrent breast cancer are related to clinical outcome and thermal toxicity: a systematic review. *Int J Hyperthermia*. 2019;36(1):1024-1039. doi:10.1080/02656736.2019.1665718
52. Overgaard J, Gonzalez Gonzalez D, Hulshof MC, et al. Randomised trial of hyperthermia as adjuvant to radiotherapy for recurrent or metastatic malignant melanoma. European Society for Hyperthermic *Oncology*. *Lancet*. 1995;345(8949): 540-543. doi:10.1016/s0140-6736(95)90463-8
53. Harima Y, Nagata K, Harima K, Ostapenko VV, Tanaka Y, Sawada S. A randomized clinical trial of radiation therapy versus thermoradiotherapy in stage IIIB cervical carcinoma. *Int J Hyperthermia*. 2009;25(5):338-343. doi:10.1080/02656730903092018
54. Toraya-Brown S, Fiering S. Local tumour hyperthermia as immunotherapy for metastatic cancer. *Int J Hyperthermia*. 2014;30(8):531-539. doi:10.3109/02656736.2014.968640
55. Datta NR, Grobholz R, Puric E, et al. Enhanced tumour regression in a patient of liposarcoma treated with radiotherapy and hyperthermia: Hint for dynamic immunomodulation by hyperthermia. *Int J Hyperthermia*. 2015;31(5):574-577. doi:10.3109/02656736.2015.1033482
56. Casazza A, Di Conza G, Wenes M, Finisguerra V, Deschoemaeker S, Mazzone M. Tumor stroma: a complexity dictated by the hypoxic tumor microenvironment. *Oncogene*. 2014;33(14): 1743-1754. doi:10.1038/onc.2013.121

57. Song CW. Effect of local hyperthermia on blood flow and microenvironment: a review. *Cancer Res.* 1984;44 (10 Suppl):4721s-4730s.
58. Song CW, Park HJ, Lee CK, Griffin R. Implications of increased tumor blood flow and oxygenation caused by mild temperature hyperthermia in tumor treatment. *Int J Hyperthermia.* 2005;21(8):761-767.  
doi:10.1080/02656730500204487
59. Kirui DK, Koay EJ, Guo X, Cristini V, Shen H, Ferrari M. Tumor vascular permeabilization using localized mild hyperthermia to improve macromolecule transport. *Nanomedicine.* 2014; 10(7):1487-1496.  
doi:10.1016/j.nano.2013.11. 001
60. Hervault A, Thanh NT. Magnetic nanoparticle-based therapeutic agents for thermo-chemotherapy treatment of cancer. *Nanoscale.* 2014;6(20):11553-11573.  
doi:10.1039/c4nr03482a
61. Kobayashi T, Kakimi K, Nakayama E, Jimbow K. Antitumor immunity by magnetic nanoparticle-mediated hyperthermia. *Nanomedicine (Lond).* 2014;9(11):1715-1726.  
doi:10.2217/nnm.14.106
62. Genet SC, Fujii Y, Maeda J, et al. Hyperthermia inhibits homologous recombination repair and sensitizes cells to ionizing radiation in a time- and temperature-dependent manner. *J Cell Physiol.* 2013;228(7):1473-1481.  
doi:10.1002/jcp.24302
63. Ahmed K, Zaidi SF, Mati-Ur-Rehman, Rehman R, Kondo T. Hyperthermia and protein homeostasis: Cytoprotection and cell death. *J Therm Biol.* 2020;91:102615.  
doi:10.1016/j.jtherbio.2020.102615
64. Galluzzi L, Vitale I, Aaronson SA, et al. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ.* 2018;25(3):486-541.  
doi:10.1038/s41418-017-0012-4
65. Czabotar PE, Lessene G, Strasser A, Adams JM. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for

- physiology and therapy. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014;15(1):49-63.  
doi:10.1038/nrm3722
66. Green DR, Oguin TH, Martinez J. The clearance of dying cells: table for two. *Cell Death Differ.* 2016;23(6):915-926.  
doi:10.1038/cdd.2015.172
67. Tait SW, Green DR. Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2010;11(9):621-632.  
doi:10.1038/nrm2952
68. Moldoveanu T, Follis AV, Kriwacki RW, Green DR. Many players in BCL-2 family affairs. *Trends Biochem Sci.* 2014;39(3):101-111.  
doi:10.1016/j.tibs.2013.12.006
69. Kale J, Osterlund EJ, Andrews DW. BCL-2 family proteins: changing partners in the dance towards death. *Cell Death Differ.* 2018;25(1):65-80.  
doi:10.1038/cdd.2017.186
70. Shamas-Din A, Kale J, Leber B, Andrews DW. Mechanisms of action of Bcl-2 family proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013;5(4):a008714.  
doi:10.1101/cshperspect.a008714
71. Kalkavan H, Green DR. MOMP, cell suicide as a BCL-2 family business. *Cell Death Differ.* 2018;25(1):46-55.  
doi:10.1038/cdd.2017.179
72. Kim H, Rafiuddin-Shah M, Tu HC, et al. Hierarchical regulation of mitochondrion-dependent apoptosis by BCL-2 subfamilies. *Nat Cell Biol.* 2006;8(12):1348-1358.  
doi:10.1038/ncb1499
73. Edlich F, Banerjee S, Suzuki M, et al. Bcl-x(L) retrotranslocates Bax from the mitochondria into the cytosol. *Cell.* 2011;145(1):104-116.  
doi:10.1016/j.cell.2011.02.034
74. Moldoveanu T, Czabotar PE. BAX, BAK, and BOK: a coming of age for the BCL-2 family effector proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2020;12(4):a036319.  
doi:10.1101/cshperspect.a036319

75. Todt F, Cakir Z, Reichenbach F, et al. Differential retrotranslocation of mitochondrial Bax and Bak. *EMBO J.* 2015;34(1):67-80.  
doi:10.15252/embj.201488806
76. Tait SW, Green DR. Mitochondrial regulation of cell death. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013;5(9):a008706.  
doi:10.1101/cshperspect.a008706
77. Coleman ML, Sahai EA, Yeo M, Bosch M, Dewar A, Olson MF. Membrane blebbing during apoptosis results from caspase-mediated activation of ROCK I. *Nat Cell Biol.* 2001;3(4):339-345.  
doi:10.1038/35070009
78. Green DR. Caspases and their substrates. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2022;14(3):a041012.  
doi:10.1101/cshperspect.a041012
79. Green DR. The death receptor pathway of apoptosis. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2022;14(2):a041053.  
doi:10.1101/cshperspect.a041053
80. Kaufmann T, Strasser A, Jost PJ. Fas death receptor signalling: roles of Bid and XIAP. *Cell Death Differ.* 2012;19(1):42-50.  
doi:10.1038/cdd.2011.121
81. Lemke J, von Karstedt S, Zinngrebe J, Walczak H. Getting TRAIL back on track for cancer therapy. *Cell Death Differ.* 2014;21(9):1350-1364.  
doi:10.1038/cdd.2014.81
82. Green DR. Caspase activation and inhibition. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2022;14(8):a041020.  
doi:10.1101/cshperspect.a041020
83. Silke J, Meier P. Inhibitor of apoptosis (IAP) proteins-modulators of cell death and inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013;5(2):a008730.  
doi:10.1101/cshperspect.a008730
84. Jahnke G, Marr M, Myers C, Wilson R, Travlos G, Price C. Maternal and developmental toxicity evaluation of melatonin administered orally to pregnant Sprague-Dawley rats. *Toxicol Sci.* 1999;50(2):271-279.  
doi:10.1093/toxsci/50.2.271

85. Bharti VK, Srivastava RS, Malik JK, Spence DW, Pandi-Perumal SR, Brown GM. Evaluation of blood antioxidant defense and apoptosis in peripheral lymphocytes on exogenous administration of pineal proteins and melatonin in rats. *J Physiol Biochem.* 2012;68(2):237-245.  
doi:10.1007/s13105-011-0136-9
86. Andersen LP, Gögenur I, Rosenberg J, Reiter RJ. The safety of melatonin in humans. *Clin Drug Investig.* 2016;36(3):169-175.  
doi:10.1007/s40261-015-0368-5
87. Reiter RJ, Tan DX. What constitutes a physiological concentration of melatonin?. *J Pineal Res.* 2003;34(1):79-80.  
doi:10.1034/j.1600-079x.2003.2e114.x
88. Lushnikova EL, Ovsyanko EV, Nepomnyashchikh LM, Efremov AV, Morozov DV. Proliferation of Walker 256 carcinosarcoma cells: effect of whole-body hyperthermia and antitumor agents. *Bull Exp Biol Med.* 2011;152(1):146-152.  
doi:10.1007/s10517-011-1475-9
89. Rivero A, Quintana J, Eiroa JL, López M, Triana J, Bermejo J, Estévez F. Potent induction of apoptosis by germacranolide sesquiterpene lactones on human myeloid leukemia cells. *Eur J Pharmacol.* 2003;482(1-3):77-84.  
doi: 10.1016/j.ejphar.2003.09.058
90. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248-254.  
doi:10.1006/abio.1976.9999
91. Cossarizza A, Franceschi C, Monti D, et al. Protective effect of N-acetylcysteine in tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis in U937 cells: the role of mitochondria [published correction appears in *Exp Cell Res* 1996;222(1):251-3]. *Exp Cell Res.* 1995;220(1):232-240.  
doi:10.1006/excr.1995.1311
92. Petit PX, Lecoeur H, Zorn E, Dauguet C, Mignotte B, Gougeon ML. Alterations in mitochondrial structure and function are early events of dexamethasone-induced thymocyte apoptosis. *J Cell Biol.* 1995;130(1):157-167.

- doi:10.1083/jcb.130.1.157.
93. Furusawa Y, Tabuchi Y, Takasaki I, Wada S, Ohtsuka K, Kondo T. Gene networks involved in apoptosis induced by hyperthermia in human lymphoma U937 cells. *Cell Biol Int*. 2009;33(12):1253-1262.  
doi:10.1016/j.cellbi.2009.08.009.
  94. Venegas C, García JA, Escames G, et al. Extrapineal melatonin: analysis of its subcellular distribution and daily fluctuations. *J Pineal Res*. 2012;52(2):217-227.  
doi:10.1111/j.1600-079X.2011.00931.x
  95. Misaghi S, Korbelt GA, Kessler B, Spooner E, Ploegh HL. z-VAD-fmk inhibits peptide:N-glycanase and may result in ER stress. *Cell Death Differ*. 2006;13(1):163-165.  
doi:10.1038/sj.cdd.4401716
  96. 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(9):1477-1485.  
doi:10.1084/jem.187.9.1477
  97. Llambi F, Green DR. Apoptosis and oncogenesis: give and take in the BCL-2 family. *Curr Opin Genet Dev*. 2011;21(1):12-20.  
doi:10.1016/j.gde.2010.12.001
  98. Westphal D, Kluck RM, Dewson G. Building blocks of the apoptotic pore: how Bax and Bak are activated and oligomerize during apoptosis. *Cell Death Differ*. 2014;21(2):196-205.  
doi:10.1038/cdd.2013.139
  99. Lopez J, Tait SW. Mitochondrial apoptosis: killing cancer using the enemy within. *Br J Cancer*. 2015;112(6):957-962.  
doi:10.1038/bjc.2015.85
  100. Janjetovic Z, Jarrett SG, Lee EF, Duprey C, Reiter RJ, Slominski AT. Melatonin and its metabolites protect human melanocytes against UVB-induced damage: Involvement of NRF2-mediated pathways. *Sci Rep*. 2017;7(1):1274.  
doi: 10.1038/s41598-017-01305-2
  101. Kim TK, Lin Z, Li W, Reiter RJ, Slominski AT. N1-Acetyl-5-Methoxykynuramine (AMK) is produced in the human epidermis



- and shows antiproliferative effects. *Endocrinology*. 2015; 156(5):1630-1636.  
doi:10.1210/en.2014-1980
102. Zou ZW, Liu T, Li Y, et al. Melatonin suppresses thyroid cancer growth and overcomes radioresistance via inhibition of p65 phosphorylation and induction of ROS. *Redox Biol*. 2018;16:226-236.  
doi:10.1016/j.redox.2018.02.025
103. Tian T, Li J, Li Y, et al. Melatonin enhances sorafenib-induced cytotoxicity in FLT3-ITD acute myeloid leukemia cells by redox modification. *Theranostics*. 2019;9(13):3768-3779.  
doi:10.7150/thno.34327
104. Quintana M, Saavedra E, Del Rosario H, et al. Ethanol enhances hyperthermia-induced cell death in human leukemia cells. *Int J Mol Sci*. 2021;22(9):4948.  
doi:10.3390/ijms22094948
105. Albakova Z, Armeev GA, Kanevskiy LM, Kovalenko EI, Sapozhnikov AM. HSP70 multi-functionality in cancer. *Cells*. 2020;9(3):587.  
doi:10.3390/cells9030587
106. Linthorst M, Baaijens M, Wiggenraad R et al. Local control rate after the combination of re-irradiation and hyperthermia for irresectable recurrent breast cancer: Results in 248 patients. *Radiother Oncol*. 2015;117:217-222.
107. To KK, Poon DC, Wei Y, Wang F, Lin G, Fu L. Pelitinib (EKB-569) targets the up-regulation of ABCB1 and ABCG2 induced by hyperthermia to eradicate lung cancer. *Br J Pharmacol*. 2015;172(16):4089-4106.  
doi:10.1111/bph.13189
108. Cui ZG, Piao JL, Kondo T, et al. Molecular mechanisms of hyperthermia-induced apoptosis enhanced by docosahexaenoic acid: implication for cancer therapy. *Chem Biol Interact*. 2014;215:46-53.  
doi:10.1016/j.cbi.2014.03.005

109. Cui ZG, Piao JL, Rehman MU, et al. Molecular mechanisms of hyperthermia-induced apoptosis enhanced by withaferin A. *Eur J Pharmacol.* 2014;723:99-107.  
doi:10.1016/j.ejphar.2013.11.031
110. Alcalá MA Jr, Park K, Yoo J, et al. Effect of hyperthermia in combination with TRAIL on the JNK-Bim signal transduction pathway and growth of xenograft tumors. *J Cell Biochem.* 2010;110(5):1073-1081.  
doi:10.1002/jcb.22619
111. Manchester LC, Coto-Montes A, Boga JA, et al. Melatonin: an ancient molecule that makes oxygen metabolically tolerable. *J Pineal Res.* 2015;59(4):403-419.  
doi:10.1111/jpi.12267
112. Reiter RJ, Tan DX, Galano A. Melatonin: exceeding expectations. *Physiology (Bethesda).* 2014;29(5):325-333.  
doi:10.1152/physiol.00011.2014
113. Baba K, Benleulmi-Chaachoua A, Journé AS, et al. Heteromeric MT1/MT2 melatonin receptors modulate photoreceptor function. *Sci Signal.* 2013;6(296):ra89.  
doi:10.1126/scisignal.2004302
114. Reiter RJ, Tan DX, Maldonado MD. Melatonin as an antioxidant: physiology versus pharmacology. *J Pineal Res.* 2005;39(2):215-216.  
doi:10.1111/j.1600-079X.2005.00261.x
115. Hou CH, Lin FL, Hou SM, Liu JF. Hyperthermia induces apoptosis through endoplasmic reticulum and reactive oxygen species in human osteosarcoma cells. *Int J Mol Sci.* 2014;15(10):17380-17395.  
doi:10.3390/ijms151017380
116. Katschinski DM, Boos K, Schindler SG, Fandrey J. Pivotal role of reactive oxygen species as intracellular mediators of hyperthermia-induced apoptosis. *J Biol Chem.* 2000;275(28):21094-21098.  
doi:10.1074/jbc.M001629200

117. Shalini S, Dorstyn L, Dawar S, Kumar S. Old, new and emerging functions of caspases. *Cell Death Differ.* 2015;22(4):526-539. doi:10.1038/cdd.2014.216
118. Galluzzi L, Vitale I, Abrams JM, et al. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ.* 2012;19(1):107-120. doi:10.1038/cdd.2011.96
119. Yu DY, Matsuya Y, Zhao QL, et al. Enhancement of hyperthermia-induced apoptosis by a new synthesized class of benzocycloalkene compounds. *Apoptosis.* 2008;13(3):448-461. doi:10.1007/s10495-008-0178-9
120. Cui ZG, Kondo T, Matsumoto H. Enhancement of apoptosis by nitric oxide released from alpha-phenyl-tert-butyl nitron under hyperthermic conditions. *J Cell Physiol.* 2006;206(2):468-476. doi:10.1002/jcp.20482
121. Casado-Zapico S, Martín V, García-Santos G, et al. Regulation of the expression of death receptors and their ligands by melatonin in haematological cancer cell lines and in leukaemia cells from patients. *J Pineal Res.* 2011;50(3):345-355. doi:10.1111/j.1600-079X.2010.00850.x
122. De Miguel D, Gallego-Lleyda A, Anel A, Martínez-Lostao L. Liposome-bound TRAIL induces superior DR5 clustering and enhanced DISC recruitment in histiocytic lymphoma U937 cells. *Leuk Res.* 2015;39(6):657-666. doi:10.1016/j.leukres.2015.03.019
123. Bouchier-Hayes L, Green DR. Caspase-2: the orphan caspase. *Cell Death Differ.* 2012;19(1):51-57. doi:10.1038/cdd.2011.157
124. Wejda M, Impens F, Takahashi N, Van Damme P, Gevaert K, Vandenabeele P. Degradomics reveals that cleavage specificity profiles of caspase-2 and effector caspases are alike. *J Biol Chem.* 2012;287(41):33983-33995. doi:10.1074/jbc.M112.384552
125. Milleron RS, Bratton SB. Heat shock induces apoptosis independently of any known initiator caspase-activating complex. *J Biol Chem.* 2006;281(25):16991-17000.

- doi:10.1074/jbc.M512754200
126. Ricci JE, Muñoz-Pinedo C, Fitzgerald P, et al. Disruption of mitochondrial function during apoptosis is mediated by caspase cleavage of the p75 subunit of complex I of the electron transport chain. *Cell*. 2004;117(6):773-786.  
doi:10.1016/j.cell.2004.05.008
  127. 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(1):37-49.  
doi:10.1093/emboj/17.1.37
  128. Jost PJ, Grabow S, Gray D, et al. XIAP discriminates between type I and type II FAS-induced apoptosis. *Nature*. 2009;460(7258):1035-1039.  
doi:10.1038/nature08229
  129. Kowaltowski AJ, Cosso RG, Campos CB, Fiskum G. Effect of Bcl-2 overexpression on mitochondrial structure and function. *J Biol Chem*. 2002;277(45):42802-42807.  
doi:10.1074/jbc.M207765200
  130. Murphy KM, Ranganathan V, Farnsworth ML, Kavallaris M, Lock RB. Bcl-2 inhibits Bax translocation from cytosol to mitochondria during drug-induced apoptosis of human tumor cells. *Cell Death Differ*. 2000;7(1):102-111.  
doi:10.1038/sj.cdd.4400597
  131. Beere HM, Wolf BB, Cain K, et al. Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. *Nat Cell Biol*. 2000;2(8):469-475.  
doi:10.1038/35019501
  132. Kumar S, Stokes J 3rd, Singh UP, Scissum Gunn K, Acharya A, Manne U, Mishra M. Targeting Hsp70: A possible therapy for cancer. *Cancer Lett*. 2016;374(1):156-166.  
doi: 10.1016/j.canlet.2016.01.056.
  133. Kmiecik SW, Le Breton L, Mayer MP. Feedback regulation of heat shock factor 1 (Hsf1) activity by Hsp70-mediated trimer unzipping and dissociation from DNA. *EMBO J*. 2020;39(14):e104096.

- doi:10.15252/emj.2019104096
134. Sancho P, Troyano A, Fernández C, De Blas E, Aller P. Differential effects of catalase on apoptosis induction in human promonocytic cells. Relationships with heat-shock protein expression. *Mol Pharmacol*. 2003;63(3):581-589.  
doi:10.1124/mol.63.3.581



## PUBLICACIÓN A LA QUE HA DADO ORIGEN ESTA TESIS

Quintana C, Cabrera J, Perdomo J, Estévez F, Loro JF, Reiter RJ, Quintana J. Melatonin enhances hyperthermia-induced apoptotic cell death in human leukemia cells. *J Pineal Res.* 2016;61(3):381-95. doi: 10.1111/jpi.12356

Received: 18 May 2016 | Accepted: 25 July 2016  
DOI: 10.1111/jpi.12356

ORIGINAL ARTICLE

WILEY

Journal of Pineal Research  
An Interdisciplinary Journal of the  
Pineal Society of the Americas

## Melatonin enhances hyperthermia-induced apoptotic cell death in human leukemia cells

Carlos Quintana<sup>1</sup> | Javier Cabrera<sup>2</sup> | Juan Perdomo<sup>1</sup> | Francisco Estévez<sup>1,3</sup> |  
Juan F. Loro<sup>2,3</sup> | Russel J. Reiter<sup>4</sup> | José Quintana<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Fisiología, Genética e Inmunología, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Las Palmas de Gran Canaria, Spain

<sup>2</sup>Departamento de Ciencias Clínicas, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Las Palmas de Gran Canaria, Spain

<sup>3</sup>Instituto Universitario de Investigaciones Biomédicas y Sanitarias, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Las Palmas de Gran Canaria, Spain

<sup>4</sup>Department of Cellular and Structural Biology, The University of Texas Health Science at San Antonio, San Antonio, TX, USA

## Correspondence

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, Las Palmas de Gran Canaria, Spain.  
Email: jose.quintana@ulpgc.es

## Abstract

Melatonin is an endogenous indoleamine with a wide range of biological functions. In addition to modulating circadian rhythms, it plays important roles in the health as an antioxidant. Melatonin has also the ability to induce apoptosis in cancer cells and to enhance the antitumoral activity of chemotherapeutic agents. In this study, the effect of melatonin on hyperthermia-induced apoptosis was explored using human leukemia cells. The results demonstrate that melatonin greatly improved the cytotoxicity of hyperthermia in U937 cells. The potentiation of cell death was achieved with 1 mmol/L concentrations of the indoleamine but not with concentrations close to physiological levels in blood (1 nmol/L). This effect was associated to an enhancement of the apoptotic response, revealed by an increase in cells with hypodiploid DNA content and activation of multiple caspases (caspase-2, caspase-3, caspase-8, and caspase-9). Melatonin also increased hyperthermia-induced Bid activation as well as translocation of Bax from the cytosol to mitochondria and cytochrome *c* release. Hyperthermia-provoked apoptosis and potentiation by melatonin were abrogated by a broad-spectrum caspase inhibitor (z-VAD-fmk) as well as by specific inhibitors against caspase-8 or caspase-3. In contrast, blocking of the mitochondrial pathway of apoptosis either with a caspase-9 inhibitor or overexpressing the anti-apoptotic protein Bcl-2 (U937/Bcl-2) reduced the number of apoptotic cells in response to hyperthermia but it was unable to suppress melatonin enhancement. Melatonin appears to modulate the apoptotic response triggered by hyperthermia in a cell type-specific manner as similar results were observed in HL-60 but not in K562 or MOLT-3 cells.

## KEYWORDS

apoptosis, caspases, hyperthermia, leukemia, melatonin

## 1 | INTRODUCTION

Melatonin (*N*-acetyl-5-methoxytryptamine) is an ancient molecule with a wide range of physiological functions.<sup>1</sup> It influences the biological clock, regulates the immune system and displays antioxidant actions.<sup>2</sup> For many years after its discovery, melatonin was thought to be exclusively produced

in the pineal gland and secreted into the blood where it exhibits a circadian day–night rhythm and regulates seasonal biorythms.<sup>3</sup> Currently, it is known that melatonin biosynthesis also occurs in extrapineal tissues through the same metabolic pathway as that described in the pineal gland, although it is not regulated by the photoperiod.<sup>4</sup>

Melatonin concentrations up to 0.5 nmol/L may be achieved in mammalian blood at night, while extrapineal

## INDICIOS DE CALIDAD DE LA PUBLICACIÓN

**Revista:** Journal of Pineal Research

**Base de datos de indexación:** Journal Citation Reports

**Año:** 2016

**Indice de impacto:** 10.391

**Categoría:** Physiology

**Posición que ocupa en la categoría:** Q1 (3 de 85)

**Categoría:** Endocrinology & Metabolism Endocrinology & Metabolism

**Posición que ocupa en la categoría:** Q1 (7 de 138)

**Categoría:** Neuroscience

**Posición que ocupa en la categoría:** Q1 (12 de 259)

