



FACULTAD DE MEDICINA  
UNIVERSIDAD DE CANTABRIA

## **GRADO EN MEDICINA**

### **TRABAJO FIN DE GRADO**

**Melatonina y Cáncer de mama**

Melatonin and Breast cancer

**Autora: Leyre Izaguirre Lasa**

**Director: Samuel Cos Corral**

**Santander, Junio 2017**

“A l’atzar agraeixo tres dons: haver nascut dona,  
de clase baixa i nació oprimida.

I el tèrbol atzur de ser tres voltes rebel.”

Maria-Mercè Marçal.

# ÍNDICE

RESUMEN.....	1
OBJETIVOS Y METODOLOGÍA .....	2
• Objetivos.....	2
• Metodología .....	2
INTRODUCCIÓN .....	3
• Síntesis de melatonina.....	3
• Regulación de la síntesis de melatonina .....	3
• Mecanismo de acción .....	4
• Acciones.....	6
• Cáncer de mama .....	6
MECANISMOS DE LOS EFECTOS ANTITUMORALES DE LA MELATONINA.....	9
1. Acciones antiestrogénicas de la melatonina .....	9
a. Regulación de las concentraciones plasmáticas de estrógenos .....	10
b. Regulación de la activación del receptor de estrógenos. ....	11
c. Modulación de los enzimas involucrados en la síntesis local de estrógenos. .	12
2. Modulación del ciclo celular: proliferación, diferenciación y apoptosis.....	13
a. Proliferación .....	14
b. Diferenciación.....	14
c. Apoptosis.....	15
3. Inhibición de la actividad de la telomerasa.....	16
4. Efectos antioxidantes. ....	17
5. Antiangiogénesis.....	18
6. Prevención de la disrupción de los ritmos circadianos. ....	19
7. Inhibición de las metástasis.....	20
8. Efectos inmunoestimulantes.....	21
9. Factores epigenéticos.....	21
10. Transporte y metabolismo de ácidos grasos. ....	22
MELATONINA Y CÁNCER DE MAMA .....	23
• Modulación de la expresión de diferentes genes en el cáncer de mama.....	23
• La melatonina como un modificador de la susceptibilidad de la glándula mamaria a las neoplasias.....	25
• Melatonina y estrógenos.....	27

- La melatonina como regulador de la resistencia a la terapia endocrina y a la quimioterapia. .... 34
- Ensayos clínicos en pacientes..... 35

CONCLUSIONES..... 40

AGRADECIMIENTOS..... 41

BIBLIOGRAFÍA ..... 42

## RESUMEN

La melatonina, principal hormona secretada por la glándula pineal, tiene como principal función la sincronización de los ritmos circadianos con los fenómenos ambientales, fundamentalmente con la luz. En las últimas décadas, numerosos equipos de investigación han demostrado las propiedades oncostáticas de la melatonina, especialmente sobre el cáncer de mama. En el presente trabajo analizaremos los diferentes mecanismos a través de los cuales la melatonina ejerce sus acciones antitumorales, entre los que destacan: (1) las acciones antiestrogénicas de la melatonina, tanto sobre los niveles circulantes de estrógenos como sobre las vías de señalización estrogénica, (2) la regulación del ciclo celular, a nivel de proliferación, diferenciación y apoptosis, (3) la regulación de la invasividad y metástasis tumoral, (4) sus acciones antioxidantes, (5) sus efectos inmunoestimulantes, (6) sus acciones antiangiogénicas, (7) los efectos moduladores de los ritmos circadianos, (8) la regulación epigenética y (9) su regulación de la actividad de la telomerasa. A continuación, nos centraremos en la influencia de la melatonina en el desarrollo del cáncer de mama para, finalmente, abordar el papel de la melatonina en distintos ensayos clínicos, valorando los efectos beneficiosos de su utilización junto con otros tratamientos antitumorales.

Melatonin, the main hormone released by the pineal gland, has as its main function the synchronization of circadian rhythms with the environmental phenomena, mainly with the light. In the last decades, several research groups have shown the oncostatic properties of melatonin, specifically those related to breast cancer. The aim of this work is to analyze the different mechanisms by which the melatonin exerts its antitumoral action, such as: (1) antiestrogenic actions, both on circulating levels of estrogens and on estrogenic signaling pathways, (2) cell cycle regulation, proliferation, differentiation and apoptosis, (3) the regulation of invasiveness and tumor metastasis, (4) its antioxidant actions, (5) its immunostimulatory effects, (6) its antiangiogenic actions, (7) the modulating effects of circadian rhythms, (8) epigenetic regulation and (9) its telomerase activity regulation. Finally, we will analyze the role of melatonin decreasing the treatment resistance currently employed in breast cancer. Even with all the research and results obtained that support the possible beneficial properties of melatonin, its clinical use is extremely limited and more trials should be carried out to better define its usefulness in clinical oncology. We will then focus on the influence of melatonin on the development of breast cancer in order to, eventually, address the role of melatonin in different clinical trials, valuing the beneficial effects of its use along with other antitumor treatments.

# OBJETIVOS Y METODOLOGÍA

## Objetivos

El objetivo principal de este trabajo es determinar las propiedades oncostáticas de la melatonina en relación al cáncer de mama. Para ello, en primer lugar, realizaremos una revisión de la fisiología de la glándula pineal y su principal producto la melatonina. Posteriormente, analizaremos los diferentes mecanismos de acción mediante los cuales la melatonina ejerce sus efectos antitumorales. En último lugar, nos centraremos en el papel de la melatonina en el desarrollo y tratamiento del cáncer de mama.

## Metodología

Para el desarrollo del trabajo hemos realizado una revisión bibliográfica del tema, utilizando diferentes bases de datos, como PubMed, artículos publicados en revistas científicas de alto impacto, como Annals of the New York Academy of Sciences, Journal of Neuroendocrinology, Pharmacological Reviews o Journal of Pineal Research, así como libros y fuentes de soporte digital.

En la búsqueda de bibliografía se han empleado las palabras clave: melatonina, cáncer de mama, estrógenos, aromatasa y vía de señalización.

# INTRODUCCIÓN

La melatonina es sintetizada principalmente en la glándula pineal. La primera descripción de esta glándula fue dada en el siglo III a. C por Herófilo de Calcedonia, siendo Galeno, en el siglo II a. C, el primero en proporcionar una descripción de su anatomía y en asignarle el nombre por la que hoy la conocemos. La glándula pineal fue considerada como un remanente anatómico, sin aparente función biológica, hasta que en 1958, el dermatólogo estadounidense Aaron Lerner aisló una sustancia, la N-acetil-5-metoxi-triptamina a partir de pineales bovinas, capaz de inhibir la MSH y aclarar la piel de los anfibios, a la que denominó melatonina (Lerner et al. 1960).

## Síntesis de melatonina

La epífisis o glándula pineal sintetiza y secreta la mayor parte de la melatonina de nuestro organismo, la cual, en pequeñas cantidades, se sintetiza también en otros órganos como la retina o el intestino delgado. La melatonina deriva del triptófano, que se hidroxila en la glándula pineal para después descarboxilarse a serotonina. A continuación, la serotonina es acetilada, gracias al enzima N-Acetil transferasa (AANAT), y, finalmente, se produce una reacción de metilación, mediada por el enzima hidroxil indol orto metil transferasa (HIOMT), que permite la obtención de la melatonina (Figura 1).

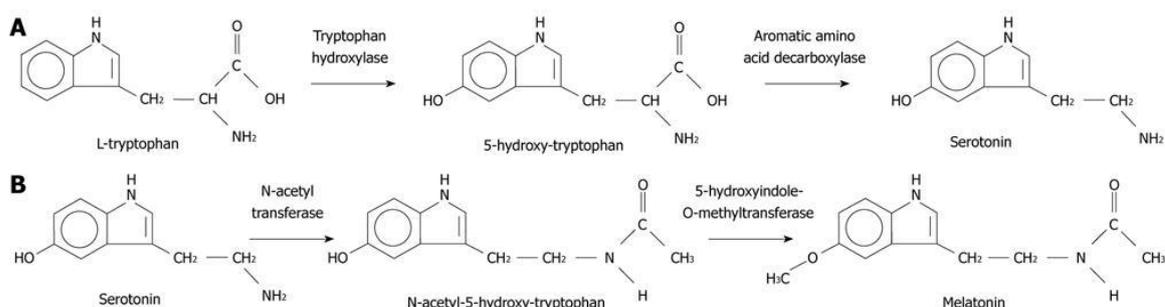


Figura 1. Síntesis de melatonina a partir de triptófano y serotonina (Dulce y De Souza, 2010)

## Regulación de la síntesis de melatonina

La secreción de melatonina está sometida a un ritmo circadiano, modulado principalmente por la información del fotoperíodo ambiental, que se transmite por las vías ópticas. Desde la retina parte un circuito multisináptico que alcanza el núcleo supraquiasmático del hipotálamo y, del cual, se transmite la información a la médula espinal, donde nacen las fibras eferentes en dirección al ganglio cervical superior. La

noradrenalina, liberada por los nervios simpáticos en la glándula pineal en presencia de oscuridad, eleva la concentración intracelular de cAMP por la vía de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos y activa la proteína kinasa dependiente de cAMP. Esta vía de señalización resulta crucial en la regulación de los dos últimos enzimas responsables de la biosíntesis de melatonina: la N-acetil transferasa (AANAT) y la hidroxindol orto metil transferasa (HIOMT). Por tanto, con la oscuridad se estimula la síntesis de melatonina y con la luz se inhibe, independientemente del ritmo sueño-vigilia (Farreras – Rozman, 2012; Schomerus y Korf, 2005).

Así mismo, la producción de melatonina también se ve influida por las estaciones del año (Wehr, 1997) y factores endógenos como la edad (Cos y Sánchez-Barceló, 2000).

### Mecanismo de acción

Muchas de las acciones antitumorales de la melatonina dependen de su unión a receptores específicos localizados en la membrana celular en los tejidos diana. Se han descrito dos tipos básicos de receptores de membrana celular acoplados a proteínas G: el MT<sub>1</sub> (o Mel<sub>1A</sub> o MTNR1A) y el MT<sub>2</sub> (o Mel<sub>1B</sub> o MTNR1B) (Figura 2). El subtipo MT<sub>1</sub> se encuentra en la *pars tuberalis* de la hipófisis y en el núcleo supraquiasmático del hipotálamo. El subtipo MT<sub>2</sub> se encuentra principalmente en la retina. También se ha descrito un tercer subtipo: Mel<sub>1C</sub> (o MTNR1C), pero éste sólo se ha identificado en anfibios, aves y peces.

## MELATONIN RECEPTOR SIGNALING

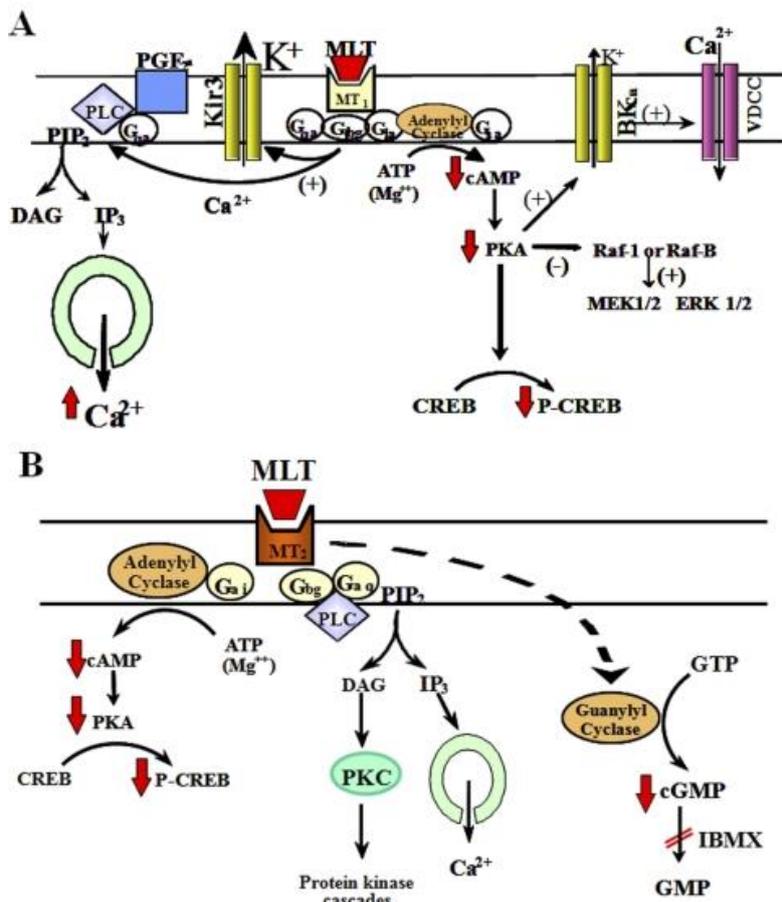


Figura 2. Vías de señalización de los receptores de melatonina  $MT_1$  y  $MT_2$ . En la figura A, la melatonina (MLT) activa el receptor  $MT_1$  que actúa mediante dos vías de señalización paralelas mediadas por la subunidad  $\alpha$  (inhibición de la formación de cAMP) y la subunidad  $\beta\gamma$  (potenciando el intercambio fosfoinositido estimulado por el receptor acoplado a proteínas G) de  $G_i$ . En la figura B, queda representado el hecho de que los cambios de fase de los ritmos circadianos mediados por la melatonina a través de las vías de señalización acopladas a receptores  $MT_2$  están mediadas por la activación de PKC (el mecanismo mediante el cual se activa PKC es aún desconocido) (Dubocovich et al. 2010).

La activación del receptor  $MT_1$  produce la inhibición de la formación de cAMP, modulada por la adenilato ciclasa, la supresión de la actividad de la proteína quinasa A (PKA), y la fosforilación de CREB. Así mismo, puede modular los canales iónicos de la célula. Los receptores  $MT_2$  también inhiben la producción de cAMP, modulan la formación de cGMP, a través de la guanilato ciclasa, e incrementan la actividad de la proteína quinasa C (PKC) (Hill et al. 2015).

Dado el carácter altamente lipofílico de la melatonina y su escasa dificultad para atravesar las membranas citoplasmática y nuclear, se ha descrito también la unión de la melatonina a receptores nucleares pertenecientes a la subfamilia de los receptores del retinoide Z (orphan receptors, receptores huérfanos nucleares). También se ha descrito la unión de la melatonina a la calmodulina (Cos y Sánchez-Barceló, 2000; Del Rio et al.

2004).

### Acciones

Las acciones de la melatonina pineal han sido descritas diferentes en diversos contextos biológicos. En general, las acciones de la melatonina se pueden dividir en cinco grandes grupos: por un lado, la glándula pineal a través de la melatonina es el nexo indispensable para la sincronización de diferentes ritmos circadianos y circanuales, con la luz ambiental, de esta forma la melatonina media el control fotoperiódico de los ritmos reproductores en los mamíferos con apareamiento estacional y los ritmos termorregulatorios y locomotrices en reptiles y aves. En humanos, la melatonina es capaz de sincronizar el ritmo vigilia-sueño en sujetos ciegos y de mejorar los trastornos derivados de los vuelos transmeridiano, jet-lag. La principal acción de la melatonina consiste en la regulación de los ritmos circadianos mediante su sincronización con fenómenos ambientales, fundamentalmente con la luz. El núcleo supraquiasmático del hipotálamo medial conforma el “reloj interno” de los mamíferos y es regulado por factores externos, principalmente por la luz. No obstante, aun siendo los ciclos luz-oscuridad la señal primaria que sincroniza el reloj circadiano con los ciclos ambientales, la melatonina se ha demostrado capaz de sincronizar los relojes en individuos que no perciben la luz o con ritmos circadianos de funcionamiento libre (Turek y Gillette, 2004). Esta asociación entre los ritmos de melatonina con el componente endógeno de los ritmos de sueño-vigilia ha llevado a la idea de que la melatonina constituye un “facilitador” del sueño y, en consecuencia, resulta útil en el tratamiento de ciertos tipos de insomnio y en el reajuste de los ritmos circadianos (por ejemplo, en el *jet-lag*) (Cajochen et al. 2003).

En segundo lugar, un gran bloque de trabajos, se encargan de describir la melatonina como neutralizador de radicales libres, demostrándose que es una hormona con capacidad de neutralizar radicales libres (13). En tercer lugar, otra acción de la melatonina es la estimulación de la función inmune, induciendo la producción de interleukinas y otras citocinas en linfocitos y monocitos. Un cuarto bloque incluye todas las acciones de la melatonina sobre el eje hipotálamo-hipófisis-gónadas y, por último, un quinto bloque que integra todas las acciones antitumorales (Cos y Sánchez-Barceló, 2000).

### Cáncer de mama

El cáncer es un problema mayor de salud en países desarrollados e industrializados, tanto por su incidencia creciente como por su mortalidad. La última actualización de los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC), apunta a que, en el caso de las mujeres, el de mama, es el cáncer más frecuente (123,7/100.000 mujeres) y, de hecho, es la segunda causa de muerte por cáncer, después del cáncer de pulmón. Según la WCRFI (World Cancer Research Fund International) el cáncer de mama es el tipo de tumor maligno más frecuente en la mujer en el mundo, con aproximadamente 1,7

millones de nuevos casos diagnosticados al año. Se estima que, aproximadamente, 1 de cada 8 mujeres desarrollara un cáncer de mama a lo largo de la vida. La ACS (American Cancer Society) describe una incidencia de cancer de mama en Estados Unidos, en 2015 de 231.840 nuevos casos de tumores invasivos, 60.290 casos de carcinomas *in situ* y aproximadamente 40.290 fallecimientos. La incidencia en España es menor que la de Estados Unidos y Canadá, Reino Unido, Países Bajos, Bélgica, Alemania, Francia y Suiza, siendo similar al resto de países de la Europa Mediterránea, Centroeuropeos, Portugal e Irlanda. En España se diagnostican unos 26.000 casos al año, lo que representa casi el 30% de todos los tumores del sexo femenino en nuestro país. La mayoría de los casos se diagnostican entre los 35 y los 80 años, con un máximo entre los 45 y los 65. Tanto el número de casos como las tasas de incidencia aumentan lentamente en España y en el mundo, probablemente debido a cambios en el estilo de vida y al aumento de factores de riesgo como obesidad, disminución en el número de hijos o maternidad tardía, terapia hormonal contraceptiva, etc.

La etiología del cáncer de mama es multifactorial, y en su aparición y desarrollo existen algunos parámetros que cabe destacar:

- 1) Edad: la incidencia del cáncer de mama aumenta a lo largo de toda la vida de la mujer, siendo este incremento mayor durante los años fértiles para después estabilizarse a partir de la menopausia, en torno a los 50 años. Cabe destacar que aproximadamente el 78% de las mujeres diagnosticadas con cáncer de mama invasivo están en un rango de edad comprendido entre 40 y 50 años (Ries et al. 2001).
- 2) Factores genéticos: un 5-10% de los casos tienen origen hereditario. El riesgo de padecer cáncer de mama alcanza un 80-90% en mujeres que presentan una mutación hereditaria en cualquiera de los genes BRCA1 o BRCA2 (Yoshida y Miki, 2004).
- 3) Raza: el riesgo de padecer cáncer de mama es mayor en mujeres de raza blanca en comparación con africanas o asiáticas (Bernstein, 2002). La prognosis de la enfermedad varía también en función de la raza. Así, las mujeres africanas suelen presentar tumores más agresivos y asociados a una mayor mortalidad (Morris y Mitchel, 2008).
- 4) Estilo de vida: dietas ricas en ácidos grasos están asociadas a un mayor riesgo de padecer cáncer mamario (Wu et al. 1999), como también lo están el consumo de alcohol (Longnecker et al. 1995) y el tabaquismo (IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, 2004).
- 5) Talla y peso: la talla de los individuos está directamente relacionada con el riesgo de padecer cáncer de mama, aumentando este riesgo en un 10% por cada 10 cm de altura (Hunter y Willett, 1993). La obesidad constituye igualmente un factor de riesgo, especialmente en mujeres postmenopáusicas (Brown y Simpson, 2012).
- 6) Estatus reproductor: la menarquia temprana se correlaciona con un mayor riesgo de padecer cáncer de mama, de manera que por cada año de retraso en la menarquia, el riesgo de cáncer disminuye un 5%. Del mismo modo, las mujeres que presentan una menopausia tardía ven incrementada la posibilidad de padecer tumores mamarios, aumentando ésta en un 3% por cada año de retraso

en la menopausia (Key et al. 2001). Ambos factores se relacionan con un mayor tiempo de exposición a los estrógenos a lo largo de la vida. El embarazo a edades avanzadas o el número de hijos también inciden en el riesgo de padecer la enfermedad (MacMahon et al. 1970).

- 7) Terapia hormonal sustitutiva: el uso de terapia hormonal sustitutiva durante la menopausia aumenta la probabilidad de desarrollar tumores mamarios, especialmente durante la administración combinada de estrógenos y progestágenos (Ross et al. 2000; Schairer et al. 2000).
- 8) Factores ambientales: recientemente está cobrando gran importancia la consideración de los factores medioambientales a la hora de explicar el gran incremento en la aparición de tumores mamarios en los últimos años. Dentro de los factores susceptibles de actuar como carcinógenos se incluyen agentes físicos (exposición a radiación ionizante o a campos electromagnéticos), químicos (disolventes orgánicos, metales) y otros relacionados con conductas laborales (alteración de los ritmos circadianos).

En muchos casos, el efecto de estos factores es demasiado bajo para que se puedan considerar carcinogénicos por sí mismos. Sin embargo, sus efectos son aditivos y a largo plazo, pueden causar alteraciones hormonales (Davis et al. 2001; Silva et al. 2002; Rajapakse et al. 2002; Tinwell y Ashby, 2004,).

Al analizar en profundidad los factores de riesgo, hay un dato común a prácticamente todos ellos: la mayor exposición a estrógenos naturales o sintéticos a lo largo de la vida conlleva un mayor riesgo de aparición de tumores mamarios. La correlación entre la función ovárica y el cáncer de mama fue descrita por primera vez en 1896 por Beatson, quien observó que la ovariectomía bilateral inhibía el crecimiento de los tumores de mama en mujeres. Desde entonces, han surgido un gran número de estudios clínicos y experimentales que relacionan la exposición sostenida y acumulativa de estrógenos a lo largo de la vida con un mayor riesgo de desarrollar cáncer de mama (Howell et al. 1997; Thomas et al. 1997; Russo y Russo, 1998). En este sentido, es importante considerar que dos tercios de los tumores de mama se detectan en mujeres postmenopáusicas, en las que los ovarios han dejado de ser funcionales y cuyos niveles de estrógenos circulantes son mínimos. En la menopausia, tras el cese de la función folicular, y excepto una pequeña contribución ovárica, la totalidad de los estrógenos se sintetizan, tras la menopausia, en los tejidos periféricos a partir de los andrógenos de origen fundamentalmente suprarrenal (Yue et al. 1998). Esto explica los elevados niveles de estrógenos presentes en la mama tumoral con respecto a la mama normal o a la concentración de estrógenos plasmática (Landeghem et al. 1985).

# MECANISMOS DE LOS EFECTOS ANTITUMORALES DE LA MELATONINA

Los efectos de la melatonina han sido estudiados en numerosos tipos de tumores, incluidos el de próstata, sarcomas, colorrectal, hepatocarcinoma, melanoma, tumores neurales, carcinomas laríngeos, cáncer de ovarios, de mama, de piel y cervical. La mayoría de los estudios fueron desarrollados *in vitro*, empleando líneas celulares derivadas de tumores humanos (por ejemplo, las MCF-7 del cáncer de mama), pero también se han realizado estudios *in vivo*, en modelos tumorales murinos. La conclusión general es que la melatonina inhibe la proliferación celular e induce apoptosis en la mayoría de líneas celulares tumorales y reduce el desarrollo tumoral en tumores químicamente inducidos en roedores. Dadas las múltiples y variadas acciones de la melatonina se han descrito diferentes mecanismos a través de los cuales la melatonina realiza sus acciones oncostáticas (Mediavilla et al. 2010) (Figura 3).

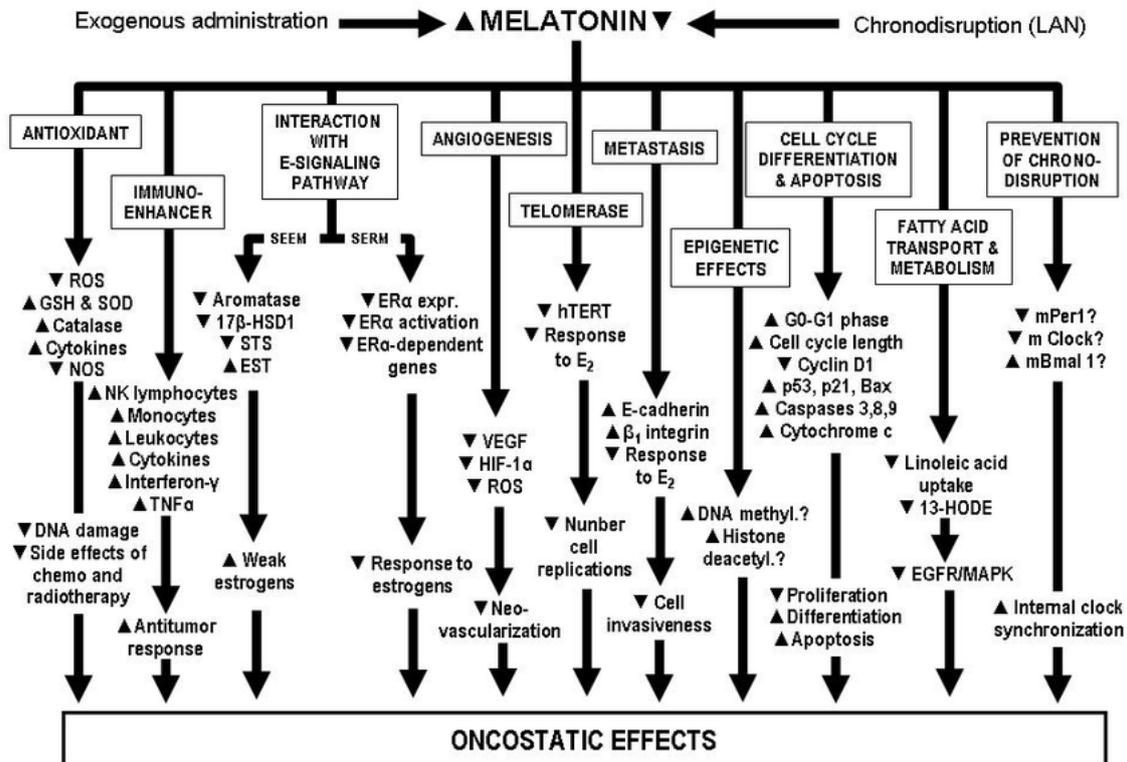


Figura 3. Mecanismos involucrados en las acciones oncostáticas de la melatonina (Mediavilla et al. 2010).

## 1. Acciones antiestrogénicas de la melatonina

Los efectos oncostáticos de la melatonina basados en su interacción con las vías de señalización de los estrógenos se llevan a cabo a través de tres mecanismos: (1) mediante la regulación negativa de la síntesis gonadal de esteroides, disminuyendo, en consecuencia, sus niveles circulantes, (2) interaccionando con el receptor de estrógenos (ER) y, por tanto, comportándose como un SERM (modulador selectivo de los receptores estrogénicos), y (3) regulando negativamente la actividad y la expresión de enzimas relacionados con la síntesis periférica de estrógenos, como la aromatasa, es decir, comportándose como un SEEM (modulador selectivo de los enzimas estrogénicos) (Figura 4).

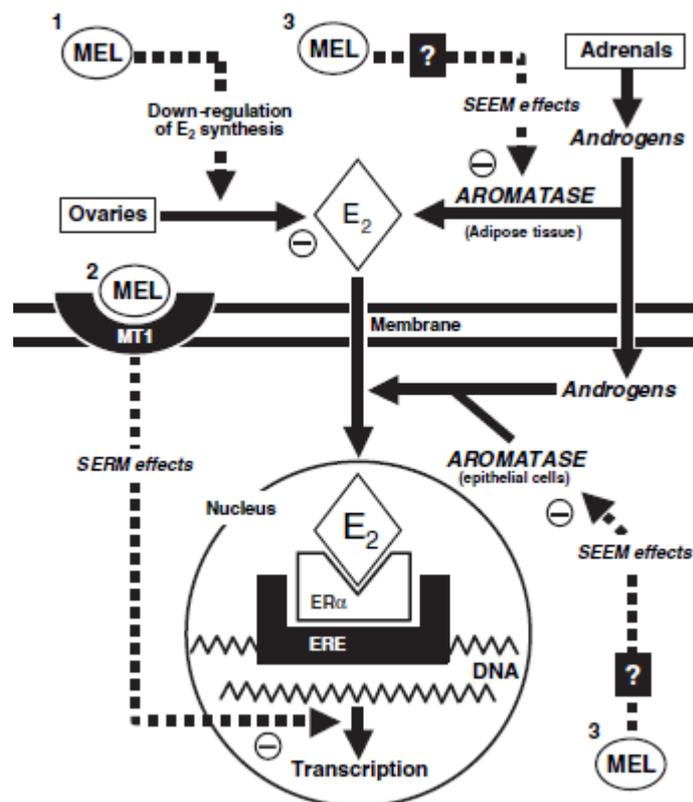


Figura 4. Representación de los tres mecanismos mediante los cuales la melatonina reduce el crecimiento tumoral mediado por estrógenos: (1) regulación negativa de la síntesis gonadal de esteroides (2) disminuyendo la expresión del receptor de estrógenos (ER $\alpha$ ) e inhibiendo la unión del complejo E<sub>2</sub>-ER al elemento de respuesta a estrógenos (ERE) en el DNA, comportándose, por tanto, como un SERM (este efecto depende de la unión de la melatonina a receptores específicos de membrana, MT1), y (3) actuando como un modulador selectivo de enzimas estrogénicos (SEEM) (Sánchez-Barceló et al. 2005).

#### a. Regulación de las concentraciones plasmáticas de estrógenos

Los efectos de la melatonina en el eje neuroendocrino-reproductor son bien conocidos aunque sus mecanismos aún no se han comprendido del todo. La melatonina modula las concentraciones de FSH y LH actuando sobre el hipotálamo mediobasal, mientras que el control de la secreción de PRL depende de su acción sobre la pars tuberalis. La distribución de los receptores de membrana de la melatonina ( $MT_1$  y  $MT_2$ ) en la pars tuberalis, en las diferentes áreas hipotalámicas (principalmente SCN pero también el área medial preóptico, el hipotálamo anterior y los núcleos hipotalámicos dorsomedial y ventromedial) y en la pituitaria anterior apoyan este control de la melatonina sobre las gonadotrofinas. Aunque todavía no hay evidencias directas de la presencia de receptores de melatonina en la pituitaria gonadotropa, se pueden encontrar pruebas indirectas, como la inhibición por parte de la melatonina de la liberación de LH y FSH inducida por GnRH en cultivos de células de la pituitaria, que la sugieren. La regulación negativa de estas hormonas produce una menor síntesis de esteroides gonadales (Cos y Sánchez-Barceló, 2000).

#### b. Regulación de la activación del receptor de estrógenos

Se ha demostrado que los tumores de mama ER-positivos inducidos químicamente en ratas ovariectomizadas tratadas con estradiol exógeno se reducían de manera significativa cuando estos animales eran expuestos a situaciones conocidas por sus efectos estimulantes de la glándula pineal (anosmia, inanición o exposición al frío, asociado a privación lumínica). Estos efectos antitumorales no podían ser explicados por una caída de los niveles de estrógenos circulantes debida a la regulación pineal, puesto que las concentraciones séricas de estrógenos se habían mantenido estables por su administración exógena y por la falta de cambios en el metabolismo esteroideo. Por tanto, los resultados de estos experimentos sugerían que la melatonina regula las acciones de los estrógenos directamente a nivel del tumor (Sánchez-Barceló et al. 2005).

Ciertamente, la melatonina interactúa con el receptor estrogénico (ER) comportándose como un Modulador Selectivo del Receptor Estrogénico (SERM). Sin embargo, a diferencia de otros SERM, como el tamoxifeno, la melatonina ni se une al ER ni interfiere con la unión de estrógenos ( $E_2$ ) a su receptor. Las propiedades antiestrogénicas de la melatonina se basan en la disminución de la expresión de  $ER\alpha$  y en la inhibición de la unión del complejo  $E_2$ -ER con el elemento de respuesta a estrógenos (ERE) en el DNA. Estos efectos son llevados a cabo a través de la unión de la melatonina a receptores específicos de membrana ( $MT_1$ ). Los receptores  $MT_1$  están acoplados a proteínas G e inhiben la actividad de la adenilato ciclasa reduciendo, en consecuencia, la actividad de la vía de señalización cAMP/PKA. Esta reducción en el cAMP inducida por la melatonina puede ser uno de los mecanismos que emplea la melatonina para disminuir la actividad transcripcional del  $ER\alpha$  inducida por los estrógenos. Está demostrado que  $ER\alpha$  es activado por la elevación intracelular de las concentraciones de cAMP de tal modo que, dicho aumento, permite la transcripción mediada por ER. Dado que la melatonina

reduce el cAMP intracelular, también estará disminuida la actividad transcripcional de ER $\alpha$  inducida por el estradiol. Por tanto, la melatonina desempeña una regulación negativa de la expresión de proteínas dependientes de la actividad transcripcional de ER $\alpha$ , incluyendo proteínas mitogénicas y el gen antiapoptótico bcl-2.

Por otra parte, la calmodulina (CaM) actúa como un modulador de la actividad transcripcional de ER $\alpha$ , aunque no de ER $\beta$ , de tal modo que la asociación de CaM con el complejo E<sub>2</sub>-ER facilita su unión a ERE. En consecuencia, otro mecanismo por el cual la melatonina desempeña una acción antiestrogénica se basa en su capacidad para unirse a CaM e inactivar el complejo Ca<sup>++</sup>/CaM (Del Rio et al. 2004; Mediavilla et al. 2010).

#### c. Modulación de los enzimas involucrados en la síntesis local de estrógenos

Además de los ovarios, tejidos periféricos que incluyen las células mesenquimales del tejido adiposo y piel, osteoblastos, condrocitos, endotelio vascular, músculo liso aórtico y diferentes áreas cerebrales, pueden sintetizar estrógenos. Aquellos fármacos capaces de interactuar con los enzimas responsables de la síntesis local o de la transformación de estrógenos son llamados Moduladores Selectivos de Enzimas Estrogénicas (SEEM).

El precursor más importante para la síntesis local de estrógenos es la dehidroepiandrosterona (DHEA) y su sulfato. Enzimas de la familia de la 17 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa (17 $\beta$ -HSD) catalizan la conversión de los estrógenos débiles estrona (E<sub>1</sub>), androstenediona y 5-androstenediona en estradiol (E<sub>2</sub>), testosterona y 5-dihidrotestosterona, más potentes, y viceversa (Figura 5). Ciertas isoformas de 17 $\beta$ -HSD (por ejemplo, la tipo 1) son esenciales para la biosíntesis gonadal y extragonadal de esteroides activos biológicamente potentes (E<sub>2</sub> y testosterona), mientras que las formas oxidativas (por ejemplo, tipo 2) catalizan la formación de esteroides de baja actividad. La aromatasas transforma andrógenos en estrógenos. La estrógeno sulfatasa (STS) convierte estrógenos sulfatados en E<sub>1</sub> y E<sub>2</sub>. La estrógenosulfotransferasa (EST) cataliza la transformación de estrógenos en sus sulfatos inactivos (Figura 5).

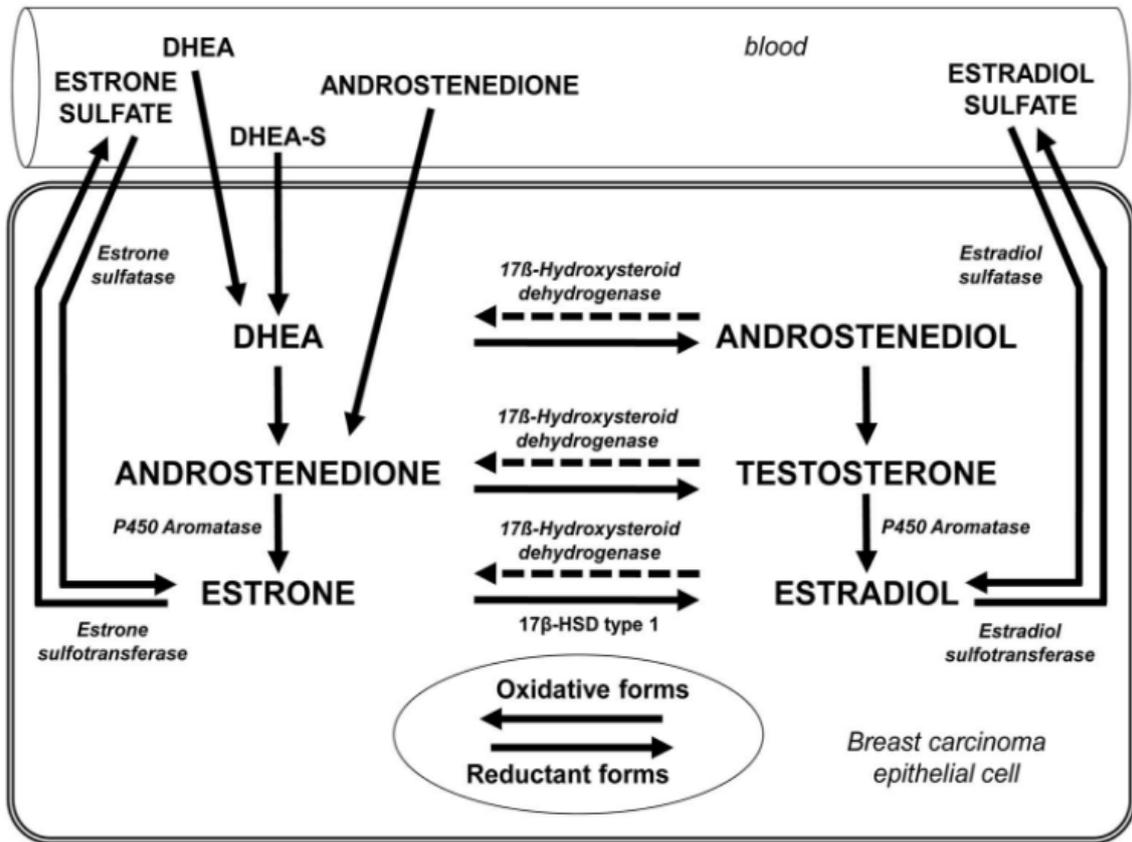


Figura 5. Mecanismos enzimáticos involucrados en la producción local de estrógenos en el tejido tumoral mamario (Cos et al. 2014).

La melatonina, a concentraciones fisiológicas, es capaz de inhibir la expresión y la actividad de la aromatasa P450, la estrógeno sulfatasa y la 17β-HSD tipo 1, tres enzimas involucrados en la síntesis y transformación de estrógenos biológicamente activos. Por el contrario, la melatonina estimula la expresión y actividad de la estrógeno sulfotransferasa, que sulfata estrógenos y los convierte en compuestos biológicamente inactivos (Figura 6). Estos estudios demuestran las propiedades de la melatonina como SEEM (Mediavilla et al. 2010).

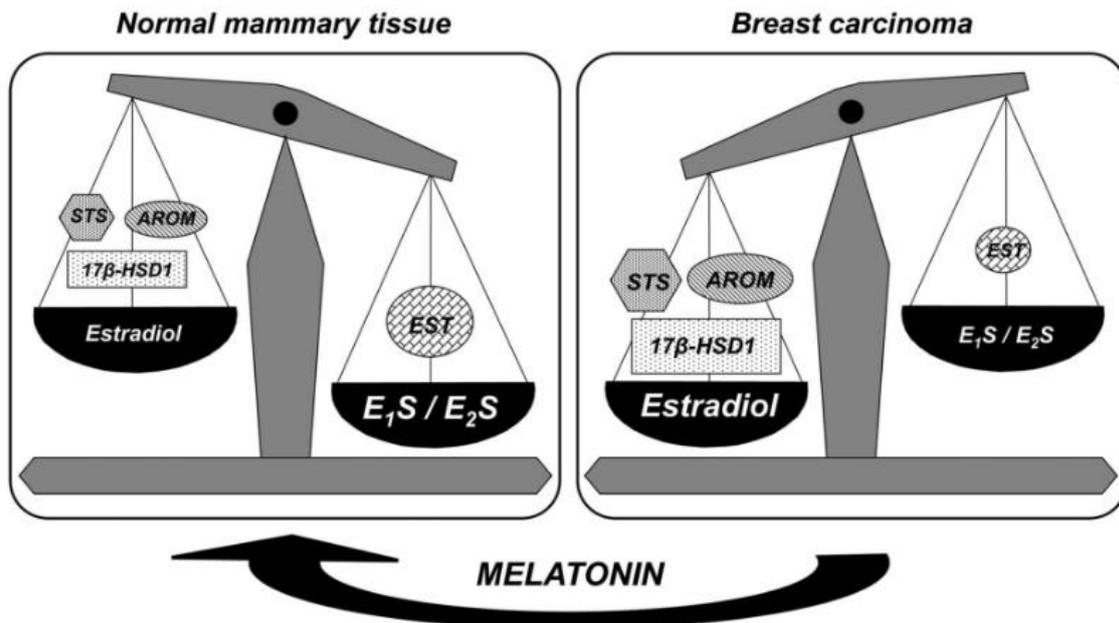


Figura 6. Expresión de los enzimas asociados a la producción local de estrógenos en tejido mamario sano y tejido tumoral maligno. En este último caso, los enzimas sulfatasa, aromatasas y 17β-HSD1 están sobreexpresados mientras que la estrógeno sulfotransferasa está disminuida, situación que la melatonina es capaz de revertir. Por lo tanto, la melatonina tiende a modificar la expresión de los enzimas involucrados en la síntesis local de estrógenos dando lugar a un patrón de expresión enzimática similar a la del tejido mamario sano (Cos et al. 2014).

## 2. Modulación del ciclo celular: proliferación, diferenciación y apoptosis

El crecimiento de un tumor se ve condicionado por el resultado del balance entre proliferación y muerte celular. Por tanto, la modulación del ciclo celular y de la apoptosis son dos aspectos fundamentales en el control del crecimiento tumoral.

### a. Proliferación

El efecto antiproliferativo de la melatonina se extiende al ciclo celular, provocando un retraso en la transición de las células tumorales de la fase G<sub>0</sub>-G<sub>1</sub> a la fase S del ciclo celular. La melatonina aumenta la proporción de células en fase G<sub>0</sub>-G<sub>1</sub> y disminuye la fracción de células en la fase S. Este efecto de la melatonina sobre el ciclo celular se ha explicado por efectos en la duración del ciclo celular. Se ha demostrado que la melatonina incrementa la duración del ciclo celular en células humanas de cáncer de mama MCF-7, células mieloides humanas HL-60 y células del hepatocarcinoma HepG2, al prolongar la fase G<sub>1</sub> y retrasar la entrada de las células tumorales en la fase S. La prolongación de la fase G<sub>1</sub> reduce la proliferación celular y permite el rescate celular en la fase G<sub>0</sub> al estimular su diferenciación. De hecho, la prolongación de la fase G<sub>1</sub> permite la reparación de DNA dañado.

El alargamiento de la fase  $G_1$  puede ser explicado, al menos en parte, por la regulación positiva que la melatonina ejerce sobre la expresión de p53 y p21, dos proteínas reguladoras del ciclo celular. Recientes estudios apuntan a que uno de los eventos moleculares clave es la regulación negativa de la transcripción de la ciclina D1, y proporcionan una evidencia indirecta de que el efecto de la melatonina en el promotor de la ciclina D1 es mediado por las proteínas c-jun y ATF-2. Siguiendo en esta línea, se ha descrito la capacidad de la melatonina para inhibir el crecimiento tumoral retrasando  $G_1/S$  a través de la regulación negativa de CDK2 y 4 en las líneas celulares OVCAR-429 y PA-1 del cáncer de ovario (Ching-Ju Shen et al. 2016). Estos descubrimientos establecen, por primera vez, un enlace molecular entre la melatonina y los efectos en el ciclo celular, al mismo tiempo que demuestran su utilidad como quimioterápico adyuvante.

### b. Diferenciación

Los tumores bien diferenciados son generalmente menos agresivos y tienen un mejor pronóstico, mientras que los poco diferenciados suelen ser más agresivos e implican un peor pronóstico.

La melatonina induce la diferenciación celular en diversos tipos de células tanto tumorales como normales. El incremento de la duración del ciclo celular, por el alargamiento de la fase  $G_0-G_1$  y el retraso en la entrada de las células en fase S, es una razón por la cual la melatonina permite a las células tumorales adquirir mayores grados de diferenciación (Mediavilla et al. 2010).

Por otra parte, el nivel de diferenciación celular depende, también, del establecimiento y mantenimiento de uniones intercelulares de tipo GAP, las cuales están involucradas en el control de la proliferación y diferenciación celular y juegan un papel crucial en la supresión del desarrollo tumoral. Se ha observado, en células cancerígenas, uniones GAP anormales, ya sea por motivos estructurales o funcionales. Así mismo, se han descrito factores de crecimiento promotores de tumores y oncogenes cuyas acciones malignas relacionadas con la diferenciación y proliferación celular son llevadas a cabo a través de la alteración de las uniones GAP. Es más, la mayoría de los carcinógenos químicos son capaces de regular negativamente la función de las uniones GAP, mientras que algunos agentes químicos antitumorales llevan a cabo una acción inversa; éste es el caso de la melatonina, capaz de modular positivamente los niveles de uniones GAP en las células malignas de los tumores mamarios, regulando, de este modo, su crecimiento y diferenciación (Cos et al. 2006).

### c. Apoptosis

El proceso de apoptosis depende de la activación de las caspasas (proteasas citosólicas), cuya adherencia a múltiples sustratos proteicos da lugar a la pérdida de la estructura y función celular y, finalmente, a la muerte celular. Hay dos vías apoptóticas: la extrínseca,

activada por la unión de un ligando de muerte extracelular, como FasL, al receptor de superficie celular, y la intrínseca, mediada por la liberación, desde el espacio intermembrana de la mitocondria al citoplasma, de varias proteínas entre las cuales se encuentra el citocromo C que media la activación de la caspasa-9, desencadenando la cascada de activación de las caspasas que promueve la apoptosis celular.

Los efectos de la melatonina en la apoptosis no parecen del todo consistentes. La melatonina, que se ha demostrado protectora de las células normales frente a la apoptosis, se ha descubierto que induce la apoptosis en varias líneas celulares tumorales. Sin embargo, el efecto anti-apoptótico de la melatonina en células cancerígenas o la carencia de sus efectos en la apoptosis también han sido descritos.

El mecanismo de los efectos pro-apoptóticos de la melatonina en células tumorales es parcialmente conocido. En algunos casos (células de cáncer de mama MCF-7, células del hepatoma de ratón H22 y del hepatocarcinoma humano HepG2), la melatonina se ha visto que incrementa la expresión de p53 y p21 mientras que, en otros casos (células del hepatocarcinoma humano), el mecanismo está relacionado con la liberación citosólica de citocromo C, la regulación positiva de Bax y la inducción de las caspasas 8 y 9. En estos casos, se ha descrito que JNK 1, - 2 and -3 y p38, miembros de la familia de las MAPK, son regulados positivamente mediante el tratamiento con melatonina. De hecho, un estudio reciente acerca de los efectos de la melatonina sobre el cáncer gástrico (Li W. et al. 2015) ha demostrado que la melatonina induce la apoptosis en líneas celulares de cáncer gástrico al activar las vías apoptóticas dependientes de las caspasas y al inhibir la translocación nuclear de NF- $\kappa$ B p65, dos procesos que son regulados por p38 y JNK.

Por otra parte, en aquellas células tumorales que se han hecho resistentes a la apoptosis mediada por el Ligando Inductor de Apoptosis relacionado con el Factor de Necrosis Tumoral (TRAIL) debido a las condiciones de hipoxia en que se encuentran, se ha demostrado que la melatonina, por una parte, disminuye este efecto anti-apoptótico de la hipoxia y, por otra, se ha sugerido su utilidad terapéutica en combinación con otros ligandos proapoptóticos como el propio TRAIL, en especial en tumores sólidos sometidos a hipoxia (Lee et al. 2014).

Finalmente, hay casos en los que la melatonina sinergiza con otros fármacos antitumorales para inducir la apoptosis (líneas celulares del Sarcoma de Ewing, células del glioma humano).

### 3. Inhibición de la actividad de la telomerasa

La telomerasa es un enzima que alarga el telómero y su activación desempeña un papel importante en la carcinogénesis al proporcionar una capacidad de división celular

ilimitada a las neoplasias. Es por ello que se observa una actividad de telomerasa en un 85-90% de los cánceres mientras que dicha actividad está ausente en la mayoría de los tejidos diferenciados. La expresión de la subunidad de la telomerasa hTERT se relaciona estrechamente con la actividad de telomerasa y sirve como indicador de la activación de la telomerasa.

En células normales, la melatonina incrementa la actividad de la telomerasa, probablemente como parte de un mecanismo para retrasar el envejecimiento al inhibir la senescencia celular por la replicación. Sin embargo, en las células tumorales MCF-7, la expresión del mRNA de hTERT es inhibida por la melatonina siguiendo un efecto dosis-dependiente. Así mismo, el tratamiento con CGP 52608, un agonista de los receptores nucleares de melatonina, disminuye los niveles de RNA de hTERT, mientras que el S20098, agonista del receptor de membrana de melatonina MT<sub>1</sub>, tiene el efecto opuesto. Todo ello sugiere una relación excluyente entre ambos tipos de receptores en la regulación hormonal de la actividad de la telomerasa.

La existencia de un ERE en el promotor de hTERT explica la capacidad de los estrógenos para activar la telomerasa y por qué el estradiol promueve la expresión de hTERT y la actividad de la telomerasa en células MCF-7 (ER $\alpha$  positivas) y no en células que carecen de ER $\alpha$ . Estudios *in vitro* demuestran que la melatonina inhibe la expresión de hTERT inducida tanto por E<sub>2</sub> como por xenoestrógenos como el cadmio, un metal pesado con propiedades estrogénicas y actividad carcinogénica. Por tanto, la melatonina, al inhibir la actividad de la telomerasa inducida por estradiol, puede resultar útil en el tratamiento de tumores dependientes de estrógenos o en la carcinogénesis debida a exposiciones ambientales u ocupacionales a xenoestrógenos (Mediavilla et al. 2010).

#### 4. Efectos antioxidantes

El daño oxidativo del DNA constituye la base de los efectos carcinogénicos de las especies reactivas de oxígeno (ROS). Dado que el estrés oxidativo participa en los tres estadios de la carcinogénesis (iniciación, progresión y metástasis), los antioxidantes pueden proteger frente al cáncer en todas las etapas de su desarrollo.

La melatonina y sus metabolitos tienen la capacidad tanto de neutralizar los radicales como de estimular la expresión de enzimas antioxidantes y de reducir la de los pro-oxidantes. Los efectos directos de la melatonina consisten en: detoxificar los radicales hidroxilo y superóxido, el peróxido de hidrógeno, el anión peroxinitrito y el óxido nítrico. Los efectos antioxidantes indirectos de la melatonina dependen de su capacidad para inducir la expresión de la glutatión peroxidasa y reductasa superóxido dismutasa y catalasa, cuatro importantes enzimas antioxidantes, así como de reducir la actividad de enzimas pro-oxidantes como la óxido nítrico sintasa (Cos y Sánchez-Barceló, 2000). En este sentido, un estudio reciente abordó el papel de la melatonina como antioxidante mediante la medición de una serie de parámetros (niveles de moléculas antioxidantes

de bajo peso molecular, sustancias reactivas ácido tiobarbitúricos, factor de necrosis tumoral  $\alpha$  y la actividad de la glutatión reductasa) en ratones a los que se les había administrado una sustancia inductora de estrés oxidativo. Los resultados del mismo orientan a una mayor importancia de la regulación del metabolismo (representado por la actividad de la glutatión reductasa) frente a las esperadas regulación inmunitaria y homeostasis oxidativa basal en lo que se refiere a los efectos antioxidantes de la melatonina (Pohanka et al. 2015).

En concreto, en la carcinogénesis hormonal, el E<sub>2</sub> desempeña sus efectos al estimular la proliferación celular en diferentes tejidos, incluidos el mamario y el endometrial, incrementando, por ello, la probabilidad de replicación de DNA mutado por diferentes causas. Además, muchos de los efectos carcinogénicos de los estrógenos están relacionados con el estrés oxidativo dependiente de algunos de sus metabolitos. Así, los estrógenos son metabolizados por los enzimas del citocromo p450 en productos hidroxilados, los cuales serán oxidados a semiquinonas y, éstas, en presencia de oxígeno molecular, son oxidadas a quinonas con la formación de radicales anión superóxido e hidroxilo, responsables de la carcinogenicidad esteroidea. Empleando modelos animales de carcinogénesis inducida por E<sub>2</sub>, se ha demostrado que la melatonina previene la oxidación de bases guanina causada por el E<sub>2</sub> y, en consecuencia, el daño del DNA, siendo un potencial supresor del cáncer mediado por estrógenos (Figura 7).

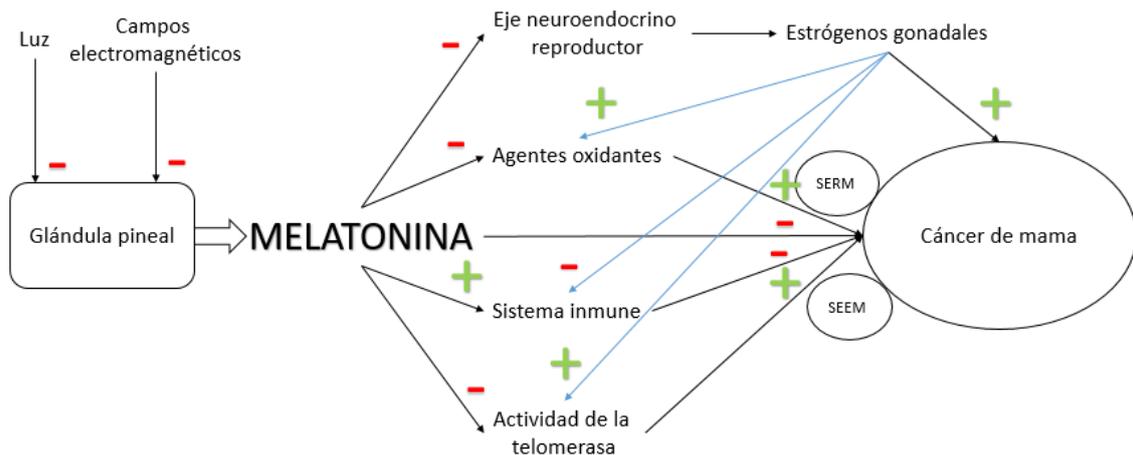


Figura 7. Mecanismos de modulación de la carcinogénesis mamaria desarrollados por la melatonina.

Por otra parte, cabe destacar la utilidad de la melatonina como adyuvante de la quimioterapia y de la radioterapia. Tanto la radioterapia como muchos quimioterápicos empleados en la destrucción de células cancerígenas inducen la formación de especies reactivas de oxígeno o radicales libres, los cuales, en la mayoría de los casos, son

responsables de los efectos secundarios de estas terapias. Por lo tanto, el uso de suplementos de antioxidantes puede reducir la toxicidad de la quimio y radioterapia. Un metanálisis reciente que incluyó 33 estudios desarrollados entre 1996 y 2007 recogiendo hasta 2446 casos, documentó que la melatonina disminuyó la neurotoxicidad, mielosupresión, astenia, caquexia y diarrea de los tratamientos quimioterápicos empleados en diferentes tipos de tumores (Mediavilla et al. 2010).

## 5. Antiangiogénesis

Los tumores necesitan un abastecimiento continuo de oxígeno y nutrientes para crecer y metastatizar, el cual depende del desarrollo de nuevos vasos. Por tanto, la inhibición de la angiogénesis constituye otra estrategia de tratamiento que, actualmente, está siendo ampliamente investigada. La angiogénesis inducida por un tumor consiste en un proceso complejo mediado y controlado por diferentes factores de crecimiento, receptores y moléculas de adhesión celular. La angiogénesis es desencadenada por la hipoxia, la cual induce la expresión del Factor Inducido por Hipoxia (HIF), capaz de unirse al elemento de respuesta a hipoxia que conduce a la expresión de genes inducibles por hipoxia, incluyendo el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), la anhidrasa carbónica IX (CAIX), el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), y el factor de crecimiento epidérmico (TGF $\alpha$ ). El VEGF es una importante molécula pro-angiogénica endógena que induce la angiogénesis actuando directamente sobre el endotelio *in vivo* y, de este modo, aumenta la permeabilidad microvascular. Los pacientes con tumores pueden tener niveles anormalmente altos de VEGF que se correlacionan con el crecimiento tumoral rápido, metástasis precoces y, con todo ello, un mal pronóstico.

La primera descripción de las propiedades angiogénicas de la melatonina proviene de un estudio clínico que mostró la caída en los niveles séricos de VEGF, diana del factor de transcripción HIF-1 $\alpha$ , en pacientes oncológicos tratados con esta indolamina. Un estudio más reciente desarrollado en diferentes líneas celulares del cáncer de próstata (DU145, PC-3 y LNCaP) confirma que las concentraciones farmacológicas de melatonina inhiben la expresión de la proteína HIF-1 $\alpha$  bajo condiciones tanto normóxicas como hipóxicas. De este modo, como consecuencia de la reducción de los niveles de proteína HIF-1 $\alpha$ , la melatonina inhibe la actividad transcripcional de HIF-1 $\alpha$  y la liberación de VEGF. Este mecanismo de acción ha sido apoyado por otro estudio realizado sobre un modelo de cáncer de mama, aunque en este caso no se observaron diferencias estadísticamente significativas en condiciones normóxicas (Jardim-Perassi et al. 2014).

La melatonina inhibe la proliferación así como la invasión y la migración de células endoteliales y la formación de estructuras vasculares a través de inhibir la síntesis y liberación de VEGF a nivel de las células tumorales (Álvarez- García et al. 2013). Además de este efecto antiangiogénico directo inhibiendo VEGF, la melatonina también ha demostrado un efecto indirecto, al inhibir otros factores de crecimiento tumoral (IGF, EGF y ET-1; importantes mitógenos y estimulantes de la angiogénesis tumoral) y

neutralizar especies reactivas de oxígeno que, durante la hipoxia, juegan un papel importante estabilizando el factor HIF-1 $\alpha$  inducido por hipoxia.

Todos estos datos dotan a la investigación de las propiedades angiogénicas de la melatonina de una especial importancia, dadas sus posibles aplicaciones futuras en las terapias oncológicas.

## 6. Prevención de la interrupción de los ritmos circadianos

La cronodisrupción se define como la pérdida crítica del orden temporal a diferentes niveles del organismo, incluyendo la expresión génica en células individuales. En consecuencia, se consideran cronodisruptores a aquellos agentes exógenos y endógenos causantes de una alteración en el ritmo y orden de las funciones y jerarquías fisiológicas. Como se ha descrito previamente, el sistema encargado de regular los ritmos circadianos está compuesto por el núcleo supraquiasmático (SCN) del hipotálamo, considerado el reloj endógeno supremo. El SCN recibe aferencias (tracto retinohipotalámico) que proporcionan a este núcleo señales para su sincronización con los fenómenos ambientales (principalmente el ciclo luz/oscuridad). Sus numerosas eferencias regulan los ritmos circadianos de la expresión génica en diversos tejidos, tanto en el sistema nervioso central como en los tejidos periféricos, a través de señales neuronales, pero también hormonales (principalmente la melatonina). El reloj circadiano controla la distribución de las fases del ciclo de división celular en tejidos sanos y en malignos así como regula la proliferación celular a través del control negativo de la actividad transcripcional de p53, c-Myc y Wee1.

Los componentes del sistema de regulación circadiano esenciales para el control del desarrollo y progresión tumoral son aún desconocidos. Hasta el momento se sabe que la expresión de los genes del ciclo celular como Wee1, ciclinas y c-myc controla, siguiendo el ritmo circadiano, un complejo de transcripción circadiano que regula la transcripción de genes reloj, entre los que se incluyen PER1, PER2, CRY1 y CRY2. PER1 y PER2 se han relacionado con las vías de respuesta a daño del DNA de tal modo que, la sobreexpresión de ambos en células cancerígenas inhibe su crecimiento neoplásico e incrementa el ratio apoptótico, mientras que la pérdida de expresión de estos genes se ha encontrado en muchos tipos de cáncer humano. La influencia directa de la melatonina en la expresión de genes reloj en el SCN está aún bajo consideración. En estudios recientes sobre diferentes líneas celulares de cáncer de próstata (LNCaP, 22R  $\alpha$  1, DU145 y PC3) se ha demostrado la capacidad de la melatonina para aumentar la expresión de proteínas Clock y Per2 y disminuir la de Bmal1; posible mecanismo mediante el cual la melatonina desempeña sus acciones oncostáticas al menos en este tipo de tumores. Alteraciones del patrón circadiano de secreción de la melatonina también han sido descritas en tumores pituitarios (Enfermedad de Cushing) (Mediavilla et al. 2010).

Con todos estos datos se puede alcanzar una mejor comprensión del modo en el que la cronodisrupción influye sobre el crecimiento tumoral. Dado que la luz es el principal sincronizador del ritmo circadiano de los mamíferos, una causa frecuente de cronodisrupción es la alteración de los patrones de exposición lumínica. Por tanto, se ha postulado que la exposición a la luz durante la noche constituye un factor de riesgo para el cáncer de mama en las sociedades industrializadas. De hecho, la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) ha declarado como probables carcinógenos los turnos laborales de noche y la exposición continuada a luz durante la noche (Blask et al. 2011). Varios experimentos han demostrado que la exposición a luz durante la noche (LAN) induce el crecimiento de tumores mamarios así como la relación entre los cambios en el patrón de secreción de melatonina inducidos por LAN y el crecimiento tumoral. Un interesante estudio a propósito de estos hechos demostró que al perfundir sangre nocturna de mujeres premenopáusicas (esto es, con concentraciones elevada de melatonina producida endógenamente) sobre ratones en los que crecían cánceres de mama inducidos mediante xenoinjerto, se inhibía el metabolismo celular normalmente asociado con el crecimiento tumoral. En cambio, la perfusión con sangre de las mismas mujeres tras someterlas a LAN (por tanto, con concentraciones reducidas de melatonina) carecía de estos efectos inhibitorios del crecimiento tumoral. Todos estos datos apoyan la hipótesis de que las concentraciones fisiológicas de melatonina en sangre pueden ser suficientes para establecer cierto grado de inhibición del crecimiento tumoral mientras que la cronodisrupción inducida por LAN, con su consecuente disminución o supresión de la producción de melatonina y sus efectos oncostáticos, puede permitir el crecimiento de células tumorales a un ritmo mayor. Por tanto, la melatonina puede ser considerada uno de los enlaces entre la disrupción circadiana y el desarrollo de cáncer.

## 7. Inhibición de las metástasis

Dosis fisiológicas de melatonina (1 nM), *in vitro*, han demostrado reducir la invasividad de las células del cáncer de mama MCF-7 al disminuir su capacidad de adhesión a la membrana basal y al reducir su respuesta quimiotáctica. Además, la melatonina atenúa la migración celular inducida por el estradiol. La movilidad e invasión de las células tumorales son fenómenos que dependen de la adhesión celular y están relacionados con la presencia de moléculas de adhesión celular de superficie tanto para las interacciones célula-célula como célula-matriz. Dosis fisiológicas de melatonina incrementan la expresión de b<sub>1</sub>-integrina y E-cadherina, dos importantes moléculas para dichas interacciones, respectivamente, en células de cáncer mamario humano (MCF-7). De este modo, la melatonina hace que las células tumorales sean menos invasivas y promueve su diferenciación (Cos et al. 2006). Estudios recientes han demostrado que estas acciones son llevadas a cabo mediante la unión de melatonina a su receptor específico de membrana MT<sub>1</sub> (Mediavilla et al. 2010).

La melatonina se ha demostrado eficaz controlando las metástasis del cáncer de mama tanto *in vitro* como *in vivo*, no sólo mediante la inhibición de la proliferación de células

tumorales, sino también a través del antagonismo directo de mecanismos celulares basados en la inhibición de ROCK-1 (Borin et al. 2016).

Por otra parte, también se ha descrito la capacidad de la melatonina para incrementar el desarrollo de fibras de estrés (microfilamentos) y placas de adhesión local en células MCF-7. Ambas modificaciones celulares fortalecen la unión de las células al substrato y las hacen menos propensas a la generación de metástasis. Este efecto de la melatonina también requiere la unión de la misma a su receptor de membrana MT<sub>1</sub>, así como la activación de la proteína kinasa C  $\alpha$ .

## 8. Efectos inmunoestimulantes

Una estrategia interesante en el abordaje de la terapia oncológica consiste en la activación del sistema inmune para inducir una potente respuesta anti-tumoral.

Un considerable número de estudios han descrito los efectos de la melatonina sobre el sistema inmune, lo cual sugiere una actividad inmunomoduladora por su parte de tal modo que el aumento de melatonina estimula el sistema inmune y su disminución lo suprime. La presencia de receptores de melatonina en varios órganos linfoides y en linfocitos plantea múltiples mecanismos de acción. Se ha propuesto un doble papel de la melatonina como inmunomodulador: por una parte al activar el sistema inmune tras un evento agudo (infección bacteriana o viral) al potenciar la actividad de las células Th1, macrófagos y la producción de citocinas; y por otra parte al regular a largo plazo la modulación circadiana de las funciones inmunes, afectando a la hematopoyesis y la mitosis timocítica (Cos et al. 2006).

La pinealectomía u otros procedimientos experimentales que inhiben la síntesis y secreción de melatonina deprimen la inmunidad celular y humoral. En cambio, la administración de melatonina estimula la producción de células NK, monocitos y leucocitos así como la producción de citocinas, incluyendo interleukinas (IL-2, IL-6, IL-12) e interferón- $\gamma$  y TNF  $\alpha$ , a través de su unión con receptores específicos de membrana y nucleares en estas células.

Aún no hay estudios experimentales centrados en el potencial oncostático de la melatonina basados específicamente en sus propiedades inmunoestimulantes. En cualquier caso, las evidencias descritas son suficientes para justificar futuros estudios que aborden la capacidad de la melatonina para favorecer la activación de Th1 y/o células NK, con el fin de apoyar la eficacia de las vacunas contra el cáncer.

## 9. Factores epigenéticos

La melatonina podría proporcionar el enlace aún desconocido entre las alteraciones ambientales de los ritmos biológicos y la maquinaria molecular epigenética que regula la hipometilación global del DNA en los oncogenes y la hipermetilación local del DNA en los genes supresores de tumores. En cualquier caso, la melatonina puede regular las modificaciones epigenéticas de las células cancerígenas metilando el DNA y remodelando las histonas. En el cáncer de mama, la melatonina está involucrada en la regulación negativa de los oncogenes relacionados con la metilación del gen de la aromatasas (CYP19) o la deacetilación de las histonas CYP19. En líneas celulares de cáncer de mama tratadas con melatonina, el incremento de la metilación del DNA se corresponde con la regulación negativa de los oncogenes EGR3 y POU4F2/Brn-3b así como con la regulación positiva del gen supresor de tumores GPC3. Además, el tratamiento con melatonina puede suprimir la proliferación celular del cáncer de mama mediante la deacetilación de oncogenes, dando lugar a un cierre de la cromatina y, por tanto, impidiendo la unión de factores de transcripción necesarios para desencadenar la expresión de oncogenes (Haim y Zubidat, 2015).

Así mismo, dentro de las interesantes posibilidades en estudio, se encuentra la inhibición, por parte de la melatonina, de la acetil transferasa de histona p300 en macrófagos, inhibiendo, en consecuencia, la acetilación de p52 y uniéndose al DNA, y silenciando los genes iNOS y COX-2. Así mismo, en el tratamiento de células madre neurales C17.2 con melatonina durante 24 horas produce un incremento significativo de la acetilación de la histona H3, la cual está asociada al remodelado de la cromatina y a la transcripción genética. El resultado de estos estudios sugiere posibles mecanismos de acción de la melatonina basado en la modulación epigenética de la transcripción genética, aunque es necesaria más información para obtener datos concluyentes (Mediavilla et al. 2010).

## 10. Transporte y metabolismo de ácidos grasos

Recientes estudios apuntan a que la supresión de la vía de señalización mitogénica EGFR/MAPK constituye un importante mecanismo mediador de la acción inhibitoria de la melatonina sobre el crecimiento tumoral dependiente del ritmo circadiano. La acción es llevada a cabo a través del bloqueo de la absorción del ácido linoleico por parte del tumor, mediada por el receptor de melatonina, con su posterior conversión en ácido 13-hidroxi-octadecadienoico (13-HODE), el cual, en condiciones normales, activa las señales mitogénicas mediadas por EGFR/MAPK. El hecho de que este efecto no sea continuo, sino que está sometido al ritmo circadiano, representa un modelo potencialmente unificador de la regulación por parte de la melatonina de la inhibición cronobiológica del crecimiento tumoral.

## MELATONINA Y CÁNCER DE MAMA

El papel de la melatonina en el desarrollo tumoral ha sido intensamente estudiado en las últimas décadas, como se ha detallado en el apartado anterior. Las acciones oncostáticas de la melatonina han sido estudiadas en diferentes tipos de tumores, especialmente, en los cánceres de mama hormono-dependientes. En ellos se ha descrito que la melatonina, *in vivo*, previene la génesis y el crecimiento de tumores mamarios en roedores, ya sean espontáneos o químicamente inducidos; mientras que la melatonina, *in vitro*, inhibe la proliferación celular y la invasividad de las células tumorales mamarias humanas. Las propiedades anti-estrogénicas de la melatonina son la base de sus acciones oncostáticas en los cánceres de mama hormono-dependientes, así que, la interacción de la melatonina con las vías de señalización estrogénicas han sido extensamente estudiadas. Así, una disminución de la función pineal, por cualquiera que sea la causa, con su consecuente reducción de la secreción de melatonina, puede inducir un estado de hiperestrogenismo, de modo que la precoz y prolongada exposición del tejido mamario a estrógenos puede contribuir a la etiología del cáncer de mama (Mediavilla et al. 2010).

### Modulación de la expresión de diferentes genes en el cáncer de mama

A través de la activación de sus receptores MT<sub>1</sub> en el cáncer de mama, la melatonina inhibe la expresión y/o fosfo-activación de numerosas kinasas (AKT, ERK1/2, PKA, PKC, c-SRC, GSK3b, etc.), factores de transcripción (ERα, RORα, RAR, RXR, VDR, PPARγ, Ap-1, Elk-1, CREB, NF-kB, y STAT3), y co-reguladores de ERα y de CaM, CBP/p300, y SRC-1, los cuales son responsables de la progresión de dicho tipo de cáncer.

Se han llevado a cabo estudios para identificar los perfiles de expresión génica regulados por la melatonina en células MCF-7. De este modo se pretenden conocer los mecanismos por los cuales la melatonina suprime el crecimiento tumoral en el cáncer de mama. El grupo de Lee et al. (2011) evaluó los micro RNA (miRNA) y la expresión génica de células MCF-7 que habían sido tratadas con concentraciones de 1 nM y 100 nM de melatonina durante 24 horas, encontrando diferencias significativas tanto en los miRNA como en la expresión génica en respuesta a las diferentes dosis suministradas. En las células a las que se administró 1 nM de melatonina, cinco miRNA fueron regulados positiva o negativamente mientras que en las células que recibieron 100 nM de melatonina se modificaron 18; tan sólo la regulación del miRNA-1207-3p se solapaba en ambos grupos. A nivel del mRNA, la melatonina regulaba la expresión del doble de genes en aquellas células a las que se había administrado 1 nM que a las que se administró más dosis (100 nM). La mayoría de estos genes estaban relacionados funcionalmente con la transducción de señales, la transcripción, la proliferación celular y el transporte celular.

Este mismo grupo, en 2013, evaluó los efectos de la melatonina sobre la metilación. A este respecto, encontraron que numerosos genes eran metilados de manera aberrante y su expresión descendía en respuesta a la melatonina. Tal fue el caso del gen de respuesta temprana al crecimiento (Egr3) y POU4F2/Brn3b, ambos asociados con el incremento de la invasividad y de la proliferación celular. Así mismo, la melatonina a dosis de 1 nM demetila e incrementa la expresión del gen supresor de tumores y metástasis glypican-3 (GPC-3).

Por su parte, el grupo de Liu et al. (2013), examinó el efecto del carcinógeno metilmetano sulfonato sobre células MCF-7 pretratadas con melatonina (1 nM), demostrando la alteración de la expresión de genes que regulan vías de respuesta al daño del DNA. Análisis bioinformáticos posteriores revelaron que estas vías son de regulación de la replicación del DNA, recombinación, reparación y el cáncer. Dentro de estos genes relacionados con la regulación de la actividad reparadora del DNA, se encontró el CEP152, un regulador de la integridad genómica y de la respuesta celular al DNA dañado que actúa a través de las vías de señalización del punto de control mediado por ATR (Kalay et al. 2011). El mRNA de N4BP2L2 también fue inducido tras la exposición al carcinógeno y se elevó aún más con el pretratamiento de melatonina. N4BP2L2 codifica una proteína asociada al sistema inmune que es fosforilada por ATM o ATR tras el daño del DNA.

Para identificar los genes candidatos que responden directa o indirectamente a la melatonina mediante la activación de sus receptores MT<sub>1</sub>, se examinaron los perfiles de expresión génica en células MCF-7 que fueron transitoriamente transfectadas con el receptor MT<sub>1</sub> y tratadas con 1 nM de melatonina, empleando un microarray de cDNA limitados (8000-9000 genes). Así, se determinó que alrededor de 300 genes tenían una alteración significativa de sus niveles de expresión. De entre todos ellos, se encontró que la melatonina suprimía la expresión de más de 210 genes e inducía la expresión de más de 80. Ejemplos clave de esta modulación serían moléculas de adhesión célula-célula y de comunicación, como la fibronectina (FN1) y la desmoplaquina, las cuales fueron reguladas negativamente; la proteína morfogénica de la citokina del hueso (BMP7) fue también regulada negativamente, así como el factor de crecimiento amfiregulínico (AREG) y el factor de crecimiento 1 insulin-like (IGF1R), mientras que la nucleobindina 2 (NUCB2) fue regulada positivamente en respuesta a la activación del receptor MT<sub>1</sub> por parte de la melatonina.

Genes relacionados con la remodelación de la cromatina y con la regulación de la transcripción, incluyendo SRC-1 y el transactivador que interactúa con CBP/p300 (CITED2), los cuales son correguladores bien establecidos de la familia de receptores nucleares y de otros factores de transcripción, fueron regulados negativamente, mientras la calreticulina (CALR), una proteína de interacción con los receptores nucleares, fue regulada positivamente. Los factores de transcripción endotelial PAS con dominio protéico 1 (EPAS1), el cual también se denomina factor inducible por hipoxia 2  $\alpha$  (HIF2  $\alpha$ ) y está asociado con un incremento de la angiogénesis, fue regulado negativamente.

La regulación de una gran variedad de proteínas asociadas con la proliferación celular fue negativa, incluyendo Ki-67. El inhibidor del ciclo celular p21 fue regulado positivamente.

Genes relacionados con la aparición de metástasis, incluyendo la proteína de unión-5 a IGF-1 (IGFBP-5), FN1, y EFNA1 fueron regulados negativamente. No obstante, el inhibidor tisular de metaloproteinasas 3 (TIMP3) fue inducido. De hecho, TIMP3 ha demostrado promover la sensibilización del cáncer de mama al tamoxifeno mientras que, como se ha descrito recientemente (Dauchy et al. 2014), la supresión *in vivo* de la señal circadiana de melatonina por dLEN conduce a cánceres de mama con resistencia intrínseca a tamoxifeno. La angiogénesis constituye un paso esencial en la formación tumoral y juega un papel crítico en las metástasis tumorales. Un gran número de genes relacionados con la angiogénesis fueron regulados negativamente por la melatonina, como EPAS1, el gen que regula la cascada de N-Myc (NDRG1), y EFNA1 (Hill et al. 2015).

#### La melatonina como un modificador de la susceptibilidad de la glándula mamaria a las neoplasias

El desarrollo del cáncer de mama en mujeres depende de una compleja combinación de factores genéticos y ambientales. La menarquia temprana y la menopausia tardía, la nuliparidad o el embarazo tardío, la exposición a radiaciones ionizantes en edades jóvenes, y una historia familiar de cáncer de mama u ovarios son factores que incrementan el riesgo a sufrir un cáncer de mama. El período de tiempo entre la menarquia y el primer embarazo a término parece crítico para el inicio de la carcinogénesis mamaria. La razón de esta mayor susceptibilidad de la mama a los agentes carcinógenos durante este período puede deberse a presencia, en la glándula mamaria en estos momentos, de un elevado número de estructuras conocidas como unidades lobulares ductales terminales (TDLU), o lóbulos de tipo 1. Estas TDLU, que representan las estructuras más indiferenciadas presentes en la mama de mujeres nulíparas, son los lugares donde se originan los tumores mamarios. Las TDLU son los equivalentes, en su potencial carcinógeno, a los extremos terminales (TEB) de las glándulas mamarias de los roedores. La incidencia de cáncer mamario en ratas se correlaciona directamente con la densidad de TEB relativamente indiferenciados en la glándula mamaria durante la administración del carcinógeno. El posible papel de la melatonina en la prevención de la carcinogénesis en la glándula mamaria puede residir en su capacidad para modular el desarrollo de la glándula mamaria y, concretamente, en disminuir el número de TEB. En ratones, los TEB de la glándula mamaria alcanzan su número máximo hacia la quinta semana de edad. Es interesante destacar que la melatonina, a dosis farmacológicas, suprime la morfogénesis mamaria en ratas y ratones. Los efectos de la melatonina consisten en reducir el número de TEB a la quinta semana de vida, cuando se alcanza su valor máximo y, por tanto, cuando la susceptibilidad a carcinógenos químicos es mayor. En este sentido, la melatonina puede desempeñar sus efectos protectores contra los carcinógenos químicos al reducir los tejidos diana de estos agentes. Estudios llevados a cabo en ratas también han

encontrado que, tanto los niveles de prolactina como el número de TEB en el día 55 de edad (cuando los efectos carcinógenos del DMBA son máximos) son significativamente mayores en animales en los que la melatonina ha sido suprimida mediante pinealectomía funcional (exposición a ciclos continuos de oscuridad) que en aquellos animales control (sometidos a ciclos de luz/oscuridad 10/14) (Cos y Sánchez-Barceló, 2000).

Otros argumentos que apoyan el papel de la melatonina en la prevención del desarrollo del cáncer de mama pueden encontrarse en la relación entre la exposición a campos electromagnéticos y la incidencia del cáncer de mama. Como se ha apuntado previamente, una forma de inhibir la secreción de melatonina consiste en someter a los sujetos a la luz cuando deberían estar en oscuridad y, en consecuencia, secretando la indolamina. Otra situación reconocida por su capacidad para disminuir la síntesis de melatonina en la glándula pineal se basa en la exposición de los animales a radiaciones electromagnéticas en el rango visible. Los posibles efectos de las radiaciones del espectro no visible en la glándula pineal han sido menos estudiados. Los primeros estudios apuntaban a que una exposición a campos electromagnéticos (EMF) de baja intensidad disminuye los niveles nocturnos de melatonina en plasma. Estudios más recientes han puesto de relieve, a través de observaciones epidemiológicas, que la exposición de humanos a EMF de baja intensidad, aquellos producidos por aparatos de uso común en las sociedades modernas, se relaciona con una mayor incidencia de cáncer de mama. Puesto que se ha demostrado que las radiaciones no ionizantes no tienen efectos mutagénicos, la reducción de la síntesis de melatonina inducida por EMF parece ser la causa del aumento de la incidencia de cáncer de mama entre la población expuesta a estas radiaciones. La información que disponemos actualmente de estudios animales muestra que EMF de 50760-Hz promueven el cáncer de mama. *In vitro*, EMF de baja intensidad pueden actuar a nivel celular reforzando la proliferación celular en líneas celulares (MCF-7) al bloquear la acción oncostática de la melatonina o del tamoxifeno. No obstante, los resultados son aún controvertidos, posiblemente por los problemas metodológicos que dificultan la estandarización de los experimentos. Así, los mismos autores que describieron disminuciones significativas de los niveles de melatonina en ratas sometidas a DMBA (intenso carcinógeno empleado en la inducción de cáncer de mama en laboratorios) y expuestas a EMF no lograron, en otros estudios, demostrar este efecto de las EMF en los niveles de melatonina (Cos y Sánchez-Barceló, 2000).

### Melatonina y estrógenos

El papel de los estrógenos ováricos en el cáncer de mama es conocido desde 1896 cuando Beatson demostró que la ovariectomía inhibía el crecimiento de los tumores mamarios. Desde estos estudios hasta los actuales, no cabe duda de que los estrógenos son moléculas clave en la carcinogénesis mamaria. Sin embargo, aún no se ha esclarecido por completo si sus efectos dependen de las acciones estimuladoras de los estrógenos sobre la proliferación celular epitelial (efectos carcinógenos indirectos) o si los estrógenos o sus metabolitos actúan como agentes mutagénicos (efectos directos)

de los carcinógenos). En el primer caso, los estrógenos, estimulando la proliferación celular principalmente a través de ER $\alpha$  pueden incrementar las probabilidades de propagación de mutaciones inducidas por diferentes agentes carcinogénicos. A propósito de los posibles efectos genotóxicos directos de los estrógenos, algunos metabolitos estrogénicos, especialmente los catecol-estrógenos, son considerados carcinógenos, puesto que su oxidación genera radicales libres que producen lesiones oxidativas en el DNA. En relación con el papel de los estrógenos en la génesis y evolución de los tumores mamarios, es importante considerar que dos tercios de los cánceres de mama tienen lugar en mujeres postmenopáusicas, donde los ovarios han cesado su función y los niveles circulantes de estrógenos son bajos. No obstante, en estos casos, la concentración de estradiol (E<sub>2</sub>) en el tejido tumoral mamario es mayor que en el plasma y en el tejido mamario sano. Este hecho, presuntamente, se debe a la biosíntesis *in situ* y a la acumulación de estrógenos en el tejido mamario. Los andrógenos adrenales serían el sustrato de esta biosíntesis extragonadal de estrógenos y la vía de señalización de la aromatasas es uno de los principales sistemas enzimáticos involucrados en este proceso (Sánchez-Barceló et al. 2005).

Por lo tanto, la interacción de la melatonina con los estrógenos parece ser clave para comprender sus propiedades oncostáticas. Los estrógenos son metabolizados por los enzimas del citocromo P450 a productos hidroxilados como 2-,4- y 16<sup>a</sup> hidroxiestradiol. Como se ha apuntado previamente, de la sucesiva oxidación de estos 2- y 4- catecol-estrógenos hidroxilados se obtienen radicales libres de oxígeno que pueden ser atenuados por las acciones neutralizantes de la melatonina, atenuando, así, el daño oxidativo inducido por E<sub>2</sub> en los tejidos como el riñón y el hígado. Por otra parte, las propiedades inmunoestimulantes de la melatonina han sido también consideradas para explicar sus acciones antitumorales. Es bien conocido el papel modulador de la función inmune que desempeñan los estrógenos de tal modo que elevadas concentraciones de estrógenos suprimen la respuesta inmune mediada por células; en consecuencia, las acciones antiestrogénicas de la melatonina pueden relacionarse con sus efectos inmunoestimulantes. Finalmente, los efectos inhibitorios de la melatonina sobre la actividad de la telomerasa en células humanas de cáncer de mama MCF-7 ha sido considerada la base de sus acciones antitumorales, pero también en este caso, los efectos antiestrogénicos de la melatonina podrían ser el enlace con sus efectos en la telomerasa. Teniendo en cuenta todo lo previamente expuesto, cabe destacar los efectos oncostáticos de la melatonina basados en su interacción tanto con la síntesis de estrógenos como con las vías des señalización estrogénicas (Sánchez-Barceló et al. 2005) (Figura 8).

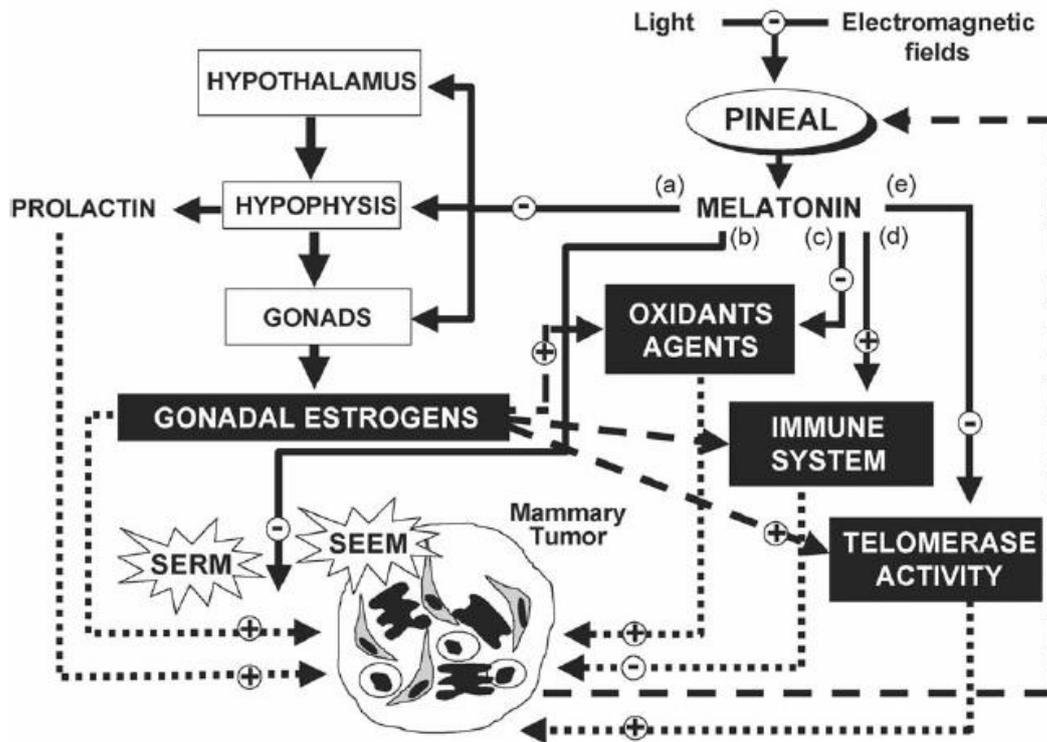


Figura 8. Mecanismos mediante los cuales la melatonina regula la carcinogénesis mamaria (Cos et al. 2006).

La mayoría de estudios *in vivo*, que han demostrado las acciones oncostáticas de la melatonina en los cánceres de mama hormono-dependientes a través de sus propiedades antiestrogénicas, han empleado, como modelo animal, cánceres de mama inducidos químicamente, utilizando 7,12-dimethylbenzantraceno (DMBA) o N-nitrosomethylurea (NMU) en ratas. A través de ellos, se comparaban los efectos del carcinógeno en animales con un incremento de la función de la glándula pineal frente a sujetos con una disminución o supresión de la función pineal. Así se observó que, los primeros, frente a los segundos, presentaban: (1) un incremento de la latencia tumoral o del tiempo entre la administración del carcinógeno y la aparición de tumores mamarios palpables, (2) una menor incidencia de tumores, (3) una reducción del número y tamaño de los tumores, (4) un menor crecimiento tumoral, (5) una mayor frecuencia en la incidencia de regresión tumoral, (6) una disminución del estradiol sérico y de las hormonas FSH y LH, y (7) una disminución en la concentración de receptor estrogénico a nivel tumoral. En un principio, estos efectos oncostáticos de la melatonina *in vivo* fueron explicados por su capacidad de regular negativamente el eje neuroendocrino reproductor, mediante el mecanismo detallado previamente. Sin embargo, la demostración de que el crecimiento de tumores mamarios químicamente inducidos, positivos para el receptor de estrógenos, en ratas ovariectomizadas tratadas diariamente con estradiol exógeno, se reducía significativamente cuando, dichos animales, eran sometidos a manipulaciones experimentales que potenciaban las acciones de la melatonina pineal (anosmia, privación lumínica...), sugirió que la melatonina podría actuar directamente a nivel de las células tumorales. Por lo tanto, los

efectos antitumorales de la melatonina no sólo se explican por su capacidad de disminuir los estrógenos circulantes, puesto que las concentraciones séricas de estradiol se mantenían estables por la administración exógena de esteroides, sino que la melatonina parece que, también, podría contrarrestar los efectos de los estrógenos a nivel tumoral. Por lo tanto, se comenzaron a desarrollar estudios *in vitro*, directamente sobre las células tumorales, para describir los efectos de la melatonina como SERM y como SEEM detallados en el apartado anterior.

Los estudios *in vitro* se llevaron a cabo fundamentalmente sobre la línea celular MCF-7 y se determinó que el efecto antiproliferativo de la melatonina tiene una serie de características: (1) es un efecto reversible, de tal modo que cuando desaparece la melatonina del cultivo, las células recuperan su ritmo normal de crecimiento, (2) es un efecto específico de la molécula de melatonina, sus metabolitos no comparten estas propiedades inhibitorias, (3) es dosis-dependiente y sólo concentraciones cercanas a 1 nM (similares a las nocturnas fisiológicas) son efectivas para disminuir la proliferación celular, (4) depende de la presencia de receptores para estrógenos en las células, de tal modo que la melatonina es capaz de inhibir la proliferación celular en otras líneas celulares malignas mamarias que responden a estrógenos pero no en aquellas líneas celulares del cáncer de mama que no responden a estrógenos, (5) depende de la tasa de proliferación, siendo mayor la acción antiproliferativa cuanto mayor sea dicha tasa, (6) depende de la presencia de suero completo en el medio de cultivo; en un medio libre de suero, la melatonina pierde su capacidad antimitogénica, a menos que las células tumorales mamarias MCF-7 sean expuestas simultáneamente a algún mitógeno, como estradiol, prolactina o factor de crecimiento epidérmico. Por lo tanto, el hecho de que sólo aquellas líneas celulares que expresen receptores de estrógenos respondan a los efectos antimitogénicos de la melatonina, refuerza la hipótesis de que las acciones oncostáticas de la melatonina son mediadas a través de sus efectos sobre la vía de señalización de respuesta a estrógenos de las células tumorales. Así mismo, esta teoría también es respaldada por: (1) la capacidad de la melatonina de bloquear, en diferentes medios de cultivo, el efecto mitogénico del estradiol, (2) por el bloqueo que realiza la melatonina sobre el rescate estrogénico de células inhibidas por tamoxifeno en agar clonogénico y cultivos monocapa, (3) por la capacidad del tamoxifeno de reducir las acciones antiproliferativas de la melatonina, lo que sugiere que ambos compuestos llevan a cabo sus efectos a través de los mismos mecanismos, (4) por la regulación negativa que lleva a cabo la melatonina de ER $\alpha$  y de la expresión del mRNA de ER $\alpha$  de manera tiempo y dosis dependiente en células MCF-7, (5) por la modulación de la melatonina sobre las proteínas reguladas por estrógenos, factores de crecimiento y protooncogenes (TGF $\alpha$ , c-myc, pS2, el receptor de progesterona, cfox, y TGF $\beta$ ) en células de cáncer de mama humano, (6) por el aumento de los efectos supresores del crecimiento de la melatonina en células que ER $\alpha$ -positivas y con receptores MT $_1$ -transfectados, mientras que aquellas que, aún sobreexpresando MT $_1$ , no mostraban respuesta a la melatonina por ser ER $\alpha$ -negativas, y (7) por el aumento de la expresión del mRNA de ER $\alpha$  inducido por melatonina en células MCF-7 con receptores MT $_1$ -transfectados.

Como se ha descrito previamente, la interacción de la melatonina con el estradiol también tiene lugar a nivel de la regulación de la cinética del ciclo celular. Mientras que el estradiol estimula la proliferación celular e induce la progresión celular de la fase G<sub>1</sub> a la S, la melatonina retrasa la transición G<sub>1</sub>-S incrementando la duración del ciclo celular. Este efecto modulador de la melatonina es explicado por su capacidad de regular la expresión de proteínas involucradas en el control de la transición G<sub>1</sub>-S. Así, se ha demostrado que la melatonina a concentraciones nanomolares incrementa la expresión de p53 y p21WAF1. La p53 es una proteína que activa la expresión del gen p21WAF1, que inhibe las quinasas dependientes de ciclinas, conduciendo a un fallo de la fosforilación de la proteína del retinoblastoma produciendo el consiguiente bloqueo de la progresión del ciclo celular de la fase G<sub>1</sub> a S. De este modo, la acumulación de células en la fase G<sub>1</sub> induce su entrada en fase G<sub>0</sub>, un estado de quiescencia que conduce a una mayor diferenciación. Por lo tanto, la melatonina, a través de sus efectos sobre el ciclo celular, es capaz de modificar el balance de la proliferación a la diferenciación (en contraposición a los efectos proliferativos de los estrógenos) (Figura 9). De hecho, estudios morfológicos y morfométricos han demostrado que concentraciones fisiológicas de melatonina permiten a las células del cáncer de mama humano alcanzar rasgos ultraestructurales típicos de células terminales diferenciadas, efecto contrarrestado por los estrógenos.

Este incremento de la diferenciación celular inducido por la melatonina también se extiende al comportamiento metastático de las células MCF-7. Como se ha explicado en el apartado anterior, la regulación de las uniones GAP por parte de la melatonina influye tanto en la diferenciación celular como en sus propiedades metastáticas. Así mismo, la melatonina a dosis fisiológicas reduce la invasividad de las células del cáncer de mama humanas (MCF-7) tanto reduciendo su unión a la membrana basal como a otras células, disminuyendo la respuesta quimiotáctica debido a un aumento de la expresión de E-cadherina y  $\beta$ 1-integrina, dos moléculas que favorecen la adhesión celular.

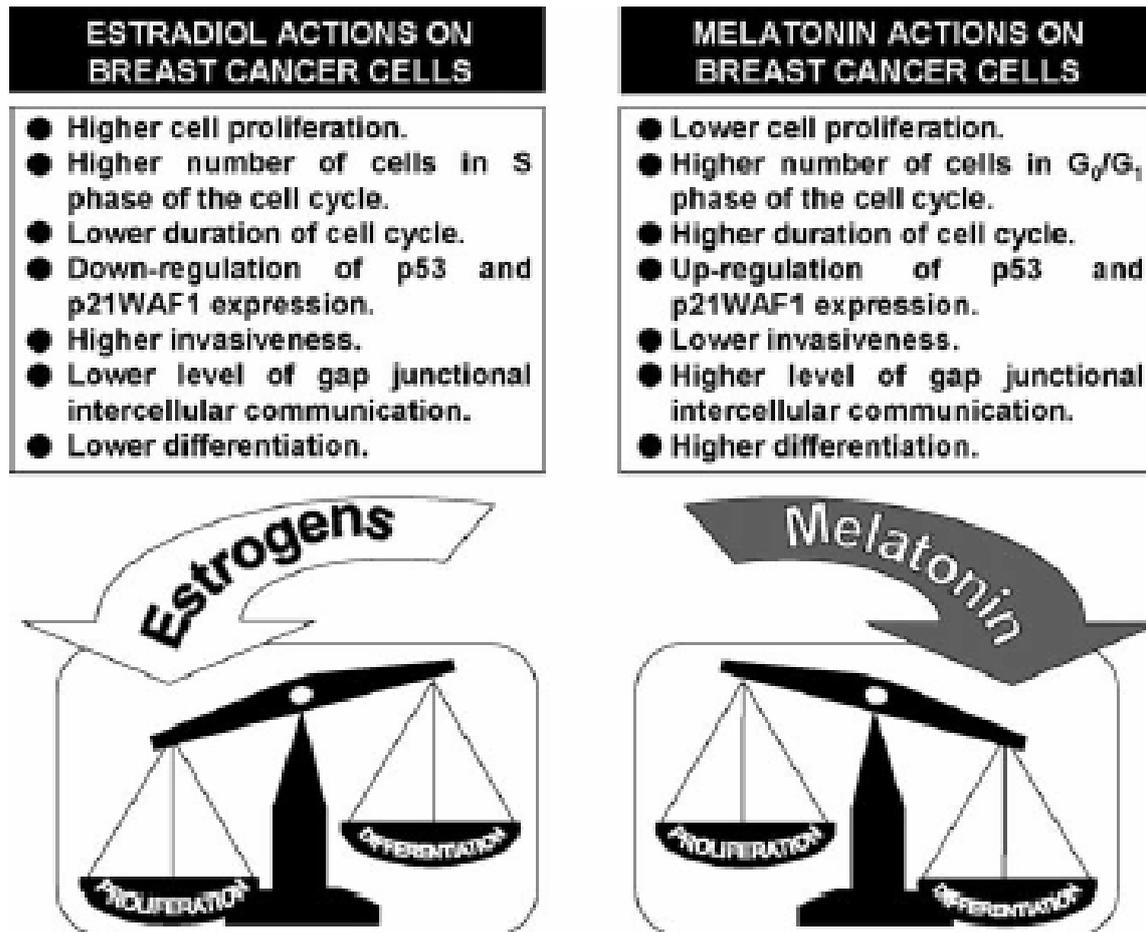


Figura 9. La interacción entre la melatonina y los estrógenos tiene lugar a través de la regulación del balance entre proliferación y diferenciación, de tal modo que el estradiol estimula los procesos proliferativos e inhibe los de diferenciación, mientras que la melatonina lleva a cabo las acciones inversas (Cos et al. 2006).

Las células MCF-7 expresan la aromatasa y, gracias a ella, pueden sintetizar estrógenos a partir de los andrógenos y estos estrógenos sintetizados *in situ* ejercen sus acciones autocrinas y paracrinias promotoras de la proliferación celular uniéndose al receptor de estrógenos de la propia célula o de células tumorales adyacentes. La melatonina es capaz de contrarrestar la proliferación celular inducida por testosterona, dependiente de la biosíntesis local de estrógeno a partir de la testosterona, producida por la aromatasa de las células. Concretamente, la melatonina reduce la actividad de la aromatasa en las células MCF-7 tanto en condiciones basales como cuando la actividad de la aromatasa es estimulada por cAMP o cortisol. La mayor inhibición de la actividad de la aromatasa tiene lugar cuando se obtienen concentraciones de 1 nM de melatonina, la misma que produce los efectos antiproliferativos y antiinvasivos máximos en las células MCF-7 (Cos et al. 2006).

Puesto que el gen de la aromatasa (CYP19) está, en las células del cáncer de mama, bajo el control de los promotores II y I.3, regulados por cAMP, se ha demostrado que la melatonina modula la aromatasa a través de la regulación del cAMP. En esta línea, se ha realizado un estudio (Martínez-Campa et al. 2009) con cultivos celulares de MCF-7 en el cual se ha demostrado que la regulación dependiente de melatonina de la expresión de los genes de la aromatasa se lleva a cabo básicamente mediante la regulación negativa de la expresión génica de las regiones promotoras específicas de la aromatasa pII y pI.3 en las células tumorales mamarias. De hecho, el promotor pII, que tiene una mayor expresión en comparación con pI.3 o pI.4, sufre una inhibición más potente que los otros. Como se ha mencionado previamente, se cree que las regiones promotoras del gen de la aromatasa están reguladas por el cAMP y los factores que regulan las vías del cAMP. Se ha descrito un modelo según el cual la expresión aumentada de los enzimas de la ciclooxigenasa (COX), responsables de la conversión del ácido araquidónico en PGE<sub>2</sub>, y una actividad incrementada de COX producen un aumento de los niveles de PGE<sub>2</sub>. Estos niveles elevados, incrementan, a su vez, el cAMP intracelular dando lugar a una elevada expresión de la aromatasa debido a la activación de los promotores I.3 y II. En el citado estudio se demostró que la melatonina disminuye la actividad enzimática de la COX y esta acción inhibitoria comienza a nivel transcripcional con la inhibición de la expresión de la COX-1 y, sobre todo, de la COX-2. Así mismo, se determinó que la melatonina, a dosis fisiológicas (1 nM), reduce los niveles de mRNA de la aromatasa. Tanto esta disminución de la aromatasa como la de los niveles de cAMP por parte de dicha indolamina se demostró que son coincidentes en el tiempo. Por lo tanto, todos estos resultados obtenidos demuestran que uno de los mecanismos mediante los cuales la melatonina puede modular la aromatasa en el cáncer de mama es a través de la regulación negativa de la expresión de los enzimas ciclooxigenasas, que permiten la disminución de los niveles de PGE<sub>2</sub>. En esta situación, se reducen también los niveles intracelulares de cAMP y, en consecuencia, hay una menor activación de los promotores I.3 y II, que supone una menor expresión y actividad de la aromatasa (Martínez-Campa et al. 2009).

La progresión del cáncer depende de la angiogénesis. Es por ello que las células endoteliales representan un elemento determinante en el microambiente tumoral, jugando un papel crucial en el crecimiento y progresión del cáncer mediante el control de la angiogénesis. La formación de nuevos vasos sanguíneos, que permiten suministrar los nutrientes que necesita el tumor para su crecimiento, es regulada por diferentes factores de crecimiento, siendo el Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular (VEGF) uno de los más importantes. Los cánceres de mama expresan muchos factores angiogénicos, incluyendo la familia VEGF. De hecho, se ha demostrado que el VEGF producido por las células tumorales es esencial en la progresión del cáncer de mama y puede actuar facilitando la expansión y el crecimiento tumoral tanto de un modo paracrino como de un modo autocrino. Las interacciones entre el epitelio y el estroma en el cáncer de mama inhiben la diferenciación de los adipocitos y estimulan la formación de estrógenos al aumentar la actividad de la aromatasa de los fibroblastos indiferenciados. Todas estas interacciones están mediadas por citocinas, como TNF- $\alpha$ , IL-11 e IL-6, producidas por las células epiteliales malignas. Se ha sugerido el papel de la melatonina reduciendo la formación de fibroblastos indiferenciados alrededor de las

células epiteliales malignas al estimular la diferenciación de los fibroblastos en adipocitos maduros así como la adipogénesis, y al disminuir la actividad de la aromatasa de los fibroblastos y adipocitos a través de la regulación negativa de la expresión de citocinas antiadipogénicas, disminuyendo, de este modo, los niveles de estas citocinas. Niveles bajos de TNF- $\alpha$ , IL-11 e IL-6 dan lugar a una mayor diferenciación de los fibroblastos y a una disminución en la actividad y expresión de la aromatasa. Como se ha mencionado previamente, la melatonina también reduce la producción de PGE<sub>2</sub> por parte de las células malignas, la cual, además de aumentar la expresión de la aromatasa tanto en el tumor como en el tejido adiposo circundante, estimula la producción de IL-11 por parte de las células tumorales. Habiendo explicado el papel de la melatonina como regulador de la actividad de la aromatasa, cabe destacar ahora su acción antiangiogénica. Un estudio reciente acerca de los efectos antiangiogénicos de la melatonina realizado en cultivos de células endoteliales humanas de la vena umbilical (Álvarez-García et al. 2013), ha demostrado que la melatonina inhibe la migración de dichas células así como reduce la distancia migrada por las mismas un 30% con dosis de 1 nM. Así mismo, el tratamiento con melatonina disminuye el número de células endoteliales con capacidad invasiva a través de la membrana basal en respuesta a factores angiogénicos como VEGF. Por otra parte, la melatonina interrumpe la formación de túbulos, la formación de redes tubulares estimuladas por VEGF en las células mencionadas y reduce la longitud de los túbulos en aproximadamente un 50% en comparación con aquellas células tratadas exclusivamente con VEGF. Por lo tanto, la melatonina parece disminuir la proliferación de las células endoteliales, la invasión, la migración y la formación de túbulos, mediante la regulación negativa del VEGF. La modulación que ejerce la melatonina sobre las interacciones del epitelio y el estroma favorece la disminución del número de fibroblastos indiferenciados, la angiogénesis y reduce las concentraciones locales de estrógenos en el cáncer de mama. En definitiva, la melatonina podría jugar un papel importante en las interacciones paracrinas que tienen lugar entre las células del epitelio maligno y las células adiposas y epiteliales próximas a este. Es decir, la melatonina tendría unos efectos antiproliferativos, antiaromatasa y antiangiogénicos que sugieren que esta indolamina podría ser beneficiosa como un agente anticancerígeno en la prevención y tratamiento del cáncer de mama dependiente de estrógenos (Cos et al. 2014).

Recientemente se ha descrito la capacidad de la melatonina de aumentar, *in vitro*, la radiosensibilidad de las células tumorales mamarias. El tratamiento con melatonina previo a la radiación sensibiliza las células cancerígenas mamarias a los efectos ionizantes de la radiación, mediante su capacidad para disminuir la proliferación celular, inducir la detención del ciclo celular, regular negativamente las proteínas involucradas en la reparación del daño del DNA y en la biosíntesis de estrógenos. Dado que el p53 induce la detención del ciclo celular, la reparación del DNA y la inhibición de la aromatasa, las acciones reguladoras de la melatonina sobre p53 podrían ser la explicación de dicho fenómeno. El aumento de la radiosensibilidad de las células tumorales mamarias mediado por la melatonina está asociado también con la modulación de las proteínas involucradas en la biosíntesis de estrógenos (Alonso-González et al. 2015).

## La melatonina como regulador de la resistencia a la terapia endocrina y a la quimioterapia.

La resistencia a la terapia endocrina y a la quimioterapia son el mayor impedimento para el éxito de los tratamientos del cáncer de mama. Evidencias preclínicas y clínicas han relacionado la resistencia a antiestrogénos y fármacos quimioterápicos en las células del cáncer de mama con la sobreexpresión y/o activación de una serie de tirosina kinasas prooncogénicas. Aproximadamente el 60 – 70% de los cánceres de mama expresan ER $\alpha$  y PR, que son marcadores y determinantes para el uso de terapias endocrinas, incluyendo los moduladores selectivos de los receptores de estrógenos como el tamoxifeno (TAM). Actualmente, entre el 30 y el 50% de los pacientes con cáncer de mama ER $\alpha$  positivo muestran una resistencia intrínseca al TAM, mientras que la mayoría de pacientes que inicialmente respondían a esta terapia acabarán desarrollando resistencia a la misma. Así mismo, la doxorrubicina (Dox) es uno de los agentes quimioterápicos más frecuentemente utilizados en pacientes cuyo cánceres de mama son resistentes a la terapia endocrina o metastásicos. Sin embargo, como con la terapia endocrina, muchos de estos cánceres son intrínsecamente resistentes a los agentes quimioterápicos convencionales y otros, que inicialmente respondían, adquieren resistencia durante el tratamiento.

La resistencia tanto a las terapias endocrinas como a los agentes quimioterápicos puede producirse por diversos mecanismos. Las células pueden volverse resistentes mediante la activación de varias vías de señalización claves incluyendo EGFR/HER2/MAPK/ERK y PI3K/AKT. Numerosos estudios han demostrado que la expresión y/o la fosfo-activación de una serie de kinasas y factores de transcripción están elevadas en líneas celulares del cáncer de mama de los humanos y en biopsias clínicas de cánceres de mama tanto con resistencia intrínseca como adquirida a los tratamientos endocrinos y a la quimioterapia. Además, ambos tipos de resistencia a estos tratamientos también se han relacionado con la regulación positiva de los transportadores de moléculas ABC, como ABCB1 (MDR-1/P-gp), ABCC1 (MRP1), y ABCG2 (BCRP) así como a enzimas metabolizadores de fármacos, conduciendo, todo ello, a una disminución de los niveles de fármaco activo en las células cancerígenas. Finalmente, cada vez más evidencias apoyan la hipótesis de que un metabolismo celular desregulado (glicolisis aerobia, efecto Warburg) está relacionada con la resistencia a terapias antitumorales a través de la regulación positiva de la glucosa y el lactato tumoral, e incrementando la señalización celular.

Estudios *in vitro* han demostrado que la melatonina puede potenciar la eficacia del TAM y de la Dox. En las células MCF-7 aisladas de tejido tumoral mamario de xenoinjertos desarrollados en ratas sometidas a ciclos de 12h luz: 12h luz tenue durante la noche (dLEN), kinasas (ERK1/2, AKT, SRC y FAK) y factores de transcripción (ER $\alpha$ , CREB y STAT3) claves en la producción tumoral estaban incrementadas su expresión y/o fosfo-activación. Así mismo, todas estas vías de señalización han sido encontradas de manera elevada, también, en cánceres de mama resistentes a TAM. Además, xenoinjertos tumorales de ratas sometidas a dLEN exhibían el efecto Warburg con incremento del

uso tumoral de glucosa y de la producción de ácido láctico. En estos casos se comprobaba una resistencia completa a TAM. En contraposición, xenoinjertos tumorales de ratas sometidas a ciclos de luz-oscuridad 12:12 con noche oscura o luz-dLEN 12:12 pero suministrando suplementos de melatonina durante dLEN, han demostrado una abolición o una gran disminución de la expresión y/o fosfo-activación de estas kinasas (ERK1/2, SRC, FAK) y factores de transcripción (CREB, ER $\alpha$ , STAT3) inductoras de tumores, una importante supresión del efecto Warburg, y un gran sinergismo con el TAM, hasta tal punto que los xenoinjertos tumorales regresaban rápida y significativamente.

La disrupción de los ritmos circadianos de melatonina mediante dLEN en xenoinjertos tumorales de cáncer de mama muestra que dLEN promueve, mientras que la melatonina inhibe, la fosforilación de sitios clave del ER $\alpha$ , incluyendo S118 y S167. Estos sitios de ER $\alpha$  son fosforilados en los tumores resistentes a TAM, haciendo que pase de ser un antagonista a ser un agonista. La melatonina puede reprimir la transactivación inducida por estrógenos de ER $\alpha$  *in vitro* y puede reprimir de forma significativa la fosforilación de ER $\alpha$  en los sitios S118 y S167. Estos efectos han sido confirmados *in vivo* y se ha demostrado que la melatonina, reprimiendo vías de señalización claves de las kinasas, altera la fosfo-activación de ER $\alpha$  y, con ello, se asegura la actuación de TAM como un antagonista de ER $\alpha$ .

Las células MCF-7 aisladas de tejido tumoral mamario de xenoinjertos desarrollados en ratas sometidas a dLEN han mostrado una resistencia intrínseca completa a Dox. Esta resistencia, como la vista con TAM, fue asociada con el efecto Warburg y el aumento de la expresión y/o fosfo-activación de vías de señalización claves en la proliferación tumoral, su supervivencia y progresión. En cambio, los xenoinjertos tumorales en individuos expuestos a dLEN pero con suplementos nocturnos de melatonina, muestran una inhibición del efecto Warburg y una abolición/disminución de la expresión y/o fosfo-activación de kinasas y factores de transcripción claves en la resistencia a Dox y la progresión tumoral. Estos xenoinjertos tumorales eran altamente sensibles a la acción sinérgica de la melatonina y la Dox, como evidencia su rápida regresión. Estos estudios demuestran que la disrupción del ritmo circadiano de la melatonina debido a dLEN es suficiente para regular el metabolismo tumoral y la señalización que conduce a los tumores a la resistencia intrínseca completa a terapias endocrinas específicas y quimioterápicas (Hill et al. 2015).

### Ensayos clínicos en pacientes

Los primeros datos obtenidos tras la administración clínica de melatonina en pacientes con cáncer de mama fueron proporcionados por Burns y Dibella et al., los cuales no obtuvieron conclusiones claras de sus estudios. La mayoría de los ensayos clínicos llevados a cabo en pacientes oncológicos han sido desarrollados por el grupo de Lissoni en Italia durante las últimas dos décadas. En estos estudios, se administraba melatonina (habitualmente en combinación con otros fármacos) a pacientes en estadios avanzados

de diferentes tipos de cáncer (incluyendo unos pocos casos de cáncer de mama). Por estas razones, se dispone de muy poca información sobre la potencial eficacia de los tratamientos con melatonina en el cáncer de mama. Un estudio preliminar en fase II realizado por el mismo grupo sugiere que la melatonina, administrada a razón de 20 mg/día, puede aumentar la eficacia terapéutica del tamoxifeno en mujeres con cáncer de mama metastático e inducir regresiones tumorales objetivas en cánceres de mama metastáticos de mujeres que no habían respondido previamente a la terapia exclusiva con tamoxifeno, independientemente de los receptores de estrógenos.

Los ensayos empleando la melatonina como agente quimioterápico en el cáncer, especialmente los realizados por Lissoni, han sido ampliamente revisados. Por una parte, Panzer y Viljoen recogieron 49 estudios en relación a los usos clínicos de la melatonina en oncología publicados entre 1987 y 1995. En estos estudios se incluían un total de 634 pacientes con diferentes tipos de tumores avanzados metastáticos que fueron tratados con melatonina exclusivamente o en asociación con otras terapias estándar. En 15 de los 634 casos se encontró una desaparición completa de todas las lesiones durante, por lo menos, cuatro semanas. En 101 casos (16%) se encontró una respuesta parcial, es decir, una reducción de, al menos, el 50% del volumen tumoral; finalmente, en 267 pacientes (42%), la enfermedad continuó su progresión. Otro dato alentador fue el hecho de que en 248 casos (49%), la enfermedad permaneció estable durante al menos ocho semanas. Así mismo, de este metanálisis se extrajeron más conclusiones: (1) la melatonina mejora la calidad de vida de estos pacientes, (2) disminuye la incidencia y severidad de los episodios de hipotensión que acontecen como efecto adverso de la terapia con interleukina-2, (3) contrarresta la trombocitopenia desarrollada como complicación de la quimioterapia, (4) disminuye la severidad de los síndromes mielodisplásicos inducidos por la quimioterapia, (5) disminuye la linfocitopenia inducida por la cirugía, (6) mejora el rendimiento de los pacientes, (7) mejora los efectos inmunosupresores de otros fármacos citotóxicos y (8) reduce la ansiedad (Cos y Sánchez-Barceló et al. 2000; Mediavilla et al. 2010; Romero et al. 2002).

Por otra parte, Mills et al. han llevado a cabo más recientemente otro metanálisis en el que incluyeron 10 ensayos clínicos, todos del grupo de Lissoni, desarrollados entre 1992 y 2003 y que, de nuevo, analizaban el papel de la melatonina sola o en combinación con terapias estándar. Todos los ensayos fueron llevados a cabo en pacientes con cáncer en estadio avanzado, no hubo ciegos y no se incluyó placebo. Estos ensayos incluían: tres estudios sobre cáncer de pulmón, uno en cáncer de mama, uno renal, un glioblastoma y un melanoma maligno; dos sobre poblaciones mixtas de pacientes con tumores sólidos avanzados o metastáticos; y un estudio específico de metástasis cerebrales de tumores sólidos variados. El número total de sujetos incluidos en estos estudios fue de 75. El metanálisis concluyó que la melatonina reducía de manera significativa el riesgo de muerte de estos pacientes en un año. Además del hecho de que la metodología empleada en estos estudios dificulta su evaluación, el aumento de supervivencia de un año es un período muy corto de tiempo dentro del contexto de muchos cánceres, como el cáncer de mama (con un tiempo medio de recurrencia de siete años), y, por lo tanto, es necesario desarrollar ensayos clínicos más largos. El resultado más importante

obtenido es que no se han descrito efectos adversos por el uso de melatonina. Parece que la toxicidad de esta indolamina es muy limitada en el contexto de lo que supondrían exposiciones muy tóxicas debido a la quimioterapia. Esta característica puede ser crucial de cara a la realización de más y mayores ensayos clínicos con melatonina (Grant et al. 2009).

Los resultados más recientes han sido revisado y recogidos en un estudio realizado por Sánchez-Barceló et al. (2014) y sus conclusiones están en la línea de los trabajos previos.

Así mismo, el tratamiento de algunos de los síntomas asociados con las enfermedades oncológicas, como la anorexia, la caquexia, los problemas de sueño, etc. y la disminución de los efectos secundarios de la quimioterapia o de la radiación, que producen estrés oxidativo, son dos aspectos interesantes de la melatonina en relación al manejo de los pacientes oncológicos (Figura 10). Dado que la melatonina reduce los efectos secundarios de ciertos quimioterápicos, es posible incrementar la dosis de quimioterápico si es dado en combinación con esta indolamina (Mediavilla et al. 2010).

En definitiva, es necesaria una mayor investigación en el campo de la melatonina. Aún se requiere determinar la dosis fisiológica de melatonina, como apuntan Reiter et al. (2003). Del mismo modo, son necesarias investigaciones en profundidad para determinar con exactitud los mecanismos de señalización modulados por la melatonina en los tumores, teniendo en cuenta que la eficacia de la melatonina en el retardo o prevención del cáncer de mama es variable y puede depender de su tipo. Además, otros modelos, tanto celulares como *in vivo*, deberían emplearse para confirmar los mecanismos que subyacen a la acción de la melatonina en relación a su capacidad para estimular la diferenciación celular.

Finalmente, son necesarios más estudios que permitan conocer el papel que juega la exposición a luz durante la noche en el riesgo de desarrollar cáncer de mama y si los suplementos de melatonina durante la noche demuestran alguna eficacia en la prevención y/o en el tratamiento del cáncer de mama, máxime cuando el hecho de realizar un turno de trabajo de noche ha sido clasificado como un potencial carcinógeno tanto por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como por la Agencia Internacional de la Investigación en Cáncer (IARC). Así mismo, estos ensayos clínicos deben expandirse con el fin de incluir una población más heterogénea de individuos. Tienen que determinarse factores como la dosis y la posología, al igual que los criterios genómicos en relación al uso de la melatonina en el tratamiento del cáncer de mama.

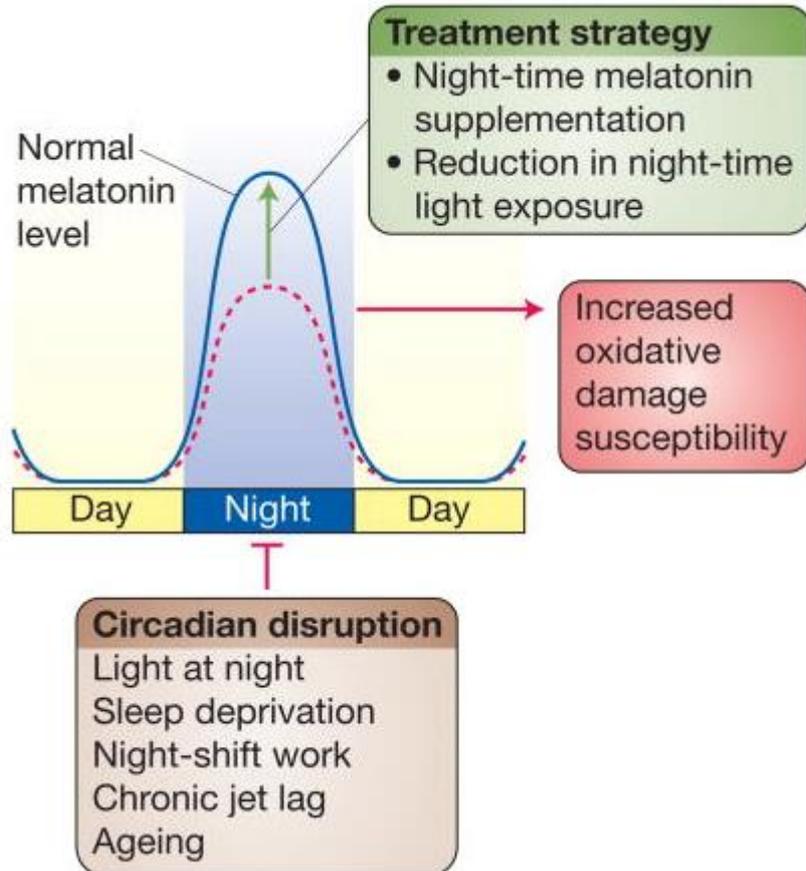


Figura 10. Consideraciones clínicas para el uso de melatonina. Los factores de disrupción del ritmo circadiano pueden incrementar la susceptibilidad al daño oxidativo a través de la supresión del pico nocturno de melatonina. El objetivo de la terapia, por tanto, debe ser el de restaurar los niveles nocturnos previos de melatonina mediante la administración nocturna de suplementos de melatonina y mediante la reducción del tiempo de exposición a luz durante la noche (Grant et al. 2009).

Los descubrimientos acerca de la melatonina como inhibidor de las cascadas de señalización dependientes de estrógenos deben constituir la base de más estudios con el fin de conocer si la melatonina muestra interacciones sinérgicas con las terapias fundamentales ya establecidas como el tamoxifeno, el raloxifeno o el fulvestrant. Los resultados de estos trabajos podrían conducir al uso pionero en la clínica de la melatonina para prevenir y/o tratar el cáncer de mama. Por lo tanto, estos estudios podrían reportar importantes beneficios (Grant et al. 2009).

## CONCLUSIONES

La melatonina, principal hormona secretada por la glándula pineal, tiene como función básica la sincronización de los ritmos circadianos con los fenómenos ambientales, fundamentalmente con la luz. El estudio de esta indolamina ha despertado gran interés en las últimas décadas debido a los sucesivos descubrimientos de sus propiedades oncostáticas.

Concretamente, el cáncer en el cual se han estudiado más ampliamente los efectos de la melatonina sobre su prevención y/o tratamiento ha sido el de mama. Las acciones antiestrogénicas de la melatonina constituyen el sustrato fundamental de sus efectos oncostáticos sobre los tumores malignos mamarios estrógeno-dependientes. De este modo, la melatonina, actuando a tres niveles: (1) regulando la síntesis de esteroides gonadales a través de una modulación del eje neuroendocrino reproductor, (2) actuando como un modulador selectivo de los receptores de estrógenos (SERM), (3) actuando como un modulador selectivo de los enzimas estrogénicos, es capaz de reducir el crecimiento de los tumores mamarios estrógeno-dependientes. Otros mecanismos a través de los cuales la melatonina puede disminuir el crecimiento tumoral es inhibiendo la progresión de las células en el ciclo celular, con un aumento del número de células en fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, aumentando la duración del ciclo celular, induciendo la expresión de p53 y de p21WAF1, disminuyendo la invasividad, incrementando el número de uniones GAP de comunicación intercelular entre las células, disminuyendo la angiogénesis tumoral, modulando la actividad del sistema inmune e inhibiendo la actividad de la telomerasa. En definitiva, la melatonina modifica el balance entre proliferación y diferenciación celular en favor de esta última. Por lo tanto, todo estímulo que inhiba la secreción de melatonina, como puede ser la exposición a luz durante la noche o a campos electromagnéticos de baja intensidad, inducirá un estado de hiperestrogenismo que puede contribuir a la etiología del cáncer de mama.

Así mismo, la melatonina es un potente neutralizador de radicales libres de oxígeno. Este efecto antioxidante puede desempeñar un papel importante en la prevención del cáncer, en tanto que impide el daño oxidativo del DNA, y en la prevención de los efectos secundarios de la quimioterapia y de la radiación.

La melatonina es capaz de aumentar la radiosensibilidad de las células tumorales mamarias y puede potenciar los efectos de otros tratamientos en el cáncer de mama como son el tamoxifeno o la doxorubicina.

Aún con todo lo expuesto, los ensayos clínicos oncológicos valorando los posibles efectos beneficiosos de la melatonina sobre el cáncer de mama son escasos y difíciles de valorar, dada su metodología. En cualquier caso, las observaciones realizadas hasta el momento apuntan a que la melatonina es capaz de mejorar la calidad de vida de los pacientes oncológicos, alargar la supervivencia en ciertos pacientes con cáncer metastático y disminuir o neutralizar los efectos adversos de las quimio y radioterapias empleadas. Por todo ello, así como por el importante hecho de que la melatonina carece de toxicidad, son necesarios más ensayos y de mayor rigurosidad con el fin de definir con exactitud las posibles indicaciones y beneficios de esta molécula en el tratamiento del cáncer de mama.

## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quería agradecer a mi tutor, Samuel Cos, toda su ayuda, sus consejos y su atención. De sus clases de fisiología, le recordaba como un gran docente, pero ahora sé que es aún mejor persona.

Gracias a mis padres y a mis hermanos por su cariño, por todas las oportunidades que me han dado y por ser mi mejor ejemplo a seguir. Allá donde llegue, será sólo gracias a ellos.

Gracias a la Orquesta Juvenil Ataulfo Argenta, y en especial al maestro Hugo Carrio, porque quien sólo sabe de Medicina, ni de Medicina sabe.

Por último, pero no menos importante, por todos los buenos momentos y por los aprendizajes en común, gracias a todos los amigos que he tenido el placer de conocer en estos 6 años, desde mis compañeros de clase en Santander hasta los entrañables habitantes de la Comuna di Pavia, sin olvidar a Alba, Mariona, Neus y todos los amigos que hice durante mi año en Barcelona, i que portaré sempre dins del cor.

## BIBLIOGRAFÍA

**Alonso-González C., González A., Martínez-Campa C., Menéndez – Menéndez J., Gómez- Arozamena J., García Vidal A., Cos S.** (2015). Melatonin enhancement of the radiosensibility of human breast cancer cells is associated with the modulation of protein involved in estrogen biosynthesis. *Cancer Lett.* **370**: 145-152.

**Álvarez-García V., González A., Alonso-González C., Martínez-Campa C., Cos S.** (2013). Antiangiogenic effects of melatonin in endothelial cell cultures. *Microvascular - Research.* **87**: 25–33.

**Blask D.E., Hill S.M., Dauchy R.T., Xiang S., Yuan L., Duplessis T., Mao L., Dauchy E., Sauer L.A.** (2011). Circadian regulation of molecular, dietary, and metabolic signaling mechanisms of human breast cancer growth by the nocturnal melatonin signal and the consequences of its disruption by light at night. *J. Pineal Res.* **51**(3):259-69.

**Borin T. F., Arbab A. S., Gelaleti G. B., Ferreira L. C., Moschetta M. G., Jardim-Perassi B. V., Iskander A., Varma N. R. S., Shankar A., Coimbra V. B., Fabri V. A., de Oliveira J. G. and Zuccari D. A. P. d. C.** (2016). Melatonin decreases breast cancer metastasis by modulating Rho-associated kinase protein-1 expression. *Journal of Pineal Research.* **60**: 3–15.

**Brown K.A., Simpson E.R.** (2012) Obesity and breast cancer: mechanisms and therapeutic implications. *Front. Biosci.* **4**: 2515-2524.

**Cajochen C., Kräuchi K., Wirz-Justice A.** (2003). Role of melatonin in the regulation of human circadian rhythms and sleep. *J. Neuroendocrinol.* **15**(4):432-7.

**Cos S. and Sánchez-Barceló E.J.** (2000). Melatonin, experimental basis for a possible application in breast cancer prevention and treatment. *Histology and Histopathology.* **15**: 637-647.

**Cos S., Álvarez-García V., González A., Alonso-González C. and Martínez-Campa C.** (2014). Melatonin modulation of crosstalk among malignant epithelial, endothelial and adipose cells in breast cancer (Review). *Oncology Letters.* **8**: 487-492.

**Cos S., and Sánchez-Barcelo E.J.** (2000). Melatonin and Mammary Pathological Growth. *Frontiers in Neuroendocrinology*. **21**: 133–170

**Cos S., González A., Martínez-Campa C., Mediavilla D., Alonso-González C., Sánchez-Barceló E.J.** (2006). Estrogen-signaling pathway: A link between breast cancer and melatonin oncostatic actions. *Cancer Detection and Prevention*. **30**: 118–128.

**Davis S., Mirick D.K., Stevens R.G.** (2001). Night-shift-work, light-at-night, and the risk of breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **93**: 1557-1562.

**Del Rio B., García-Pedrero J.M., Martínez-Campa C., Zuazua P., Lazo P.S., Ramos S.** (2004). Melatonin: an endogenous specific inhibitor of estrogen receptor  $\alpha$  via calmodulin. *J Biol Chem*. **279**: 38294-38302.

**Dubocovich M.L, Delagrange P., Krause D.N, Sugden D., Cardinali D.P and Olcese J.** (2010). Nomenclature, Classification, and Pharmacology of G Protein-Coupled Melatonin Receptors. *Pharmacol. Rev.* **62**: 343–380.

**Dulce Favacho de Oliveira Torres J., De Souza Pereira R.** (2010). Which is the best choice for gastroesophageal disorders: Melatonin or proton pump inhibitors? *World J. Gastrointest. Pharmacol. Ther.* **1**: 102-106

**Farreras – Rozman.** (2012). Medicina Interna. 12ª Edición. España. Elsevier.

**Grant S.G, Melan M.A., Latimer J.J., and Witt-Enderby P.A.** (2009). Melatonin and breast cancer: cellular mechanisms, clinical studies and future perspectives. *Expert. Rev. Mol. Med.* **11**: e5.

**Haim A. and Zubidat A.E.** (2015). Artificial light at night: melatonin as a mediator between the environment and epigenome. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **370**: 1667.

**Hill S.H., Belancio V.P., Dauchy R.T., Xiang S., Brimer S., Mao L., Hauch A., Lundberg P.W., Summers W., Yuan L., Frasch T. and Blask D.E.** (2015). Melatonin: an inhibitor of breast Cancer. *Endocr. Relat. Cancer*. **22**(3): R183–R204.

**Howell A., Clarke R.B., Anderson E.** (1997). Oestrogens, Beatson and endocrine therapy. *Endocr. Relat. Cancer*. **4**: 371-380.

**Hunter D.J., Willett W.C.** (1993). Diet, body size and breast cancer. *Epidemiol. Rev.* **15**: 110-132.

**IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans.** (2004). Tobacco smoke and involuntary smoking. *IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks Hum.* **83**: 1-1438.

**Jardim-Perassi B.V., Arbab A.S., Ferreira L.C., Borin T.F., Varma N.R., Iskander A.S., Shankar A., Ali M.M., de Campos Zuccari D.A.** (2014). Effect of melatonin on tumor growth and angiogenesis in xenograft model of breast cancer. *PLoS One*. **9**(1):85311.

**Kalay E, Yigit G, Aslan Y, Brown KE, Pohl E, Bicknell LS, Kayserili H, Li Y, Tüysüz B, Nürnberg G.** (2011). CEP152 is a genomic maintenance protein disrupted in Seckel syndrome. *Nature Genetics*. **43**: 23–26.

**Key TJ, Verkasalo PK, Banks E.** (2001). Epidemiology of breast cancer. *Lancet Oncol.* **2**: 133-40.

**Landeghem A.A., Poortman J., Nabuurs M., Thijssen J.H.** (1985). Endogenous concentration and subcellular distribution of estrogens in normal and malignant human breast tissue. *Cancer Res.* **45**: 2900-2906.

**Lee SE, Kim SJ, Yoon JP, Hwang SY, Park CS, Park YS.** (2011). MicroRNA and gene expression analysis of melatonin-exposed human breast cancer cell lines indicating involvement of the anticancer effect. *Journal of Pineal Research.* **51**: 345–352.

**Lerner A.B, Case J.D., Takahashi Y.** (1960). Isolation of melatonin and 5-methoxyindole-3-acetic acid from bovine pineal glands. *J. Biol. Chem.* **235**: 1992-1997

**Li W., Fan M., Chen Y., Zhao Q., Song C., Yan Y., Jin Y., Huang Z., Lin C., Wu J.** (2015). Melatonin Induces Cell Apoptosis in AGS Cells Through the Activation of JNK and P38 MAPK and the Suppression of Nuclear Factor-Kappa B: a Novel Therapeutic Implication for Gastric Cancer. *Cell. Physiol. Biochem.* **37**(6):2323-38.

**Liu R, Fu A, Hoffman AE, Zhu Y.** (2013). Melatonin enhances DNA repair capacity possibly by affecting genes involved in DNA damage responsive pathways. *BMC Cell Biology.* **14**: 1–6.

**Longnecker M.P., Newcomb P.A., Mittendorf R., Greenberg E.R., Clapp R.W., Bodgan G.F., Baron J., MacMahon B., Willet W.C.** (1995). Risk of breast cancer in relation to lifetime alcohol consumption. *J. Natl. Cancer Inst.* **87**: 923-929.

**MacMahon B., Cole P., Lin M.T., Lowe C.R., Mirra A. P., Ravnihar B., Salber E.J., Valaoras V.G., Yuasa S.** (1970). Age at first birth and cancer of the breast. A summary of an international study. *Bull. World Health Organ.* **43**: 209-211.

**Martínez-Campa C., González A., Mediavilla D., Alonso-González C., Álvarez-García A., Sánchez-Barceló E.J., and Cos S.** (2009). Melatonin inhibits aromatase promoter expression by regulating cyclooxygenases expression and activity in breast cancer cells. *British Journal of Cancer.* **101**: 1613 – 1619.

**Mediavilla D., Sánchez Barceló E.J., Tan D.X., Manchester L., Reiter R.J.** (2010). Basic mechanism involved in the anti-cancer effects of Melatonin. *Curr. Med. Chem.* **17**: 4462-4481.

**Mills E1, Wu P, Seely D, Guyatt G.** (2005). Melatonin in the treatment of cancer: a systematic review of randomized controlled trials and meta-analysis. *J Pineal Res.* **39**(4): 360-6.

**Morris G.J., Mitchell E.P.** (2008). Higher incidence of aggressive breast cancers in African-American women: a review. *J. Natl. Med. Assoc.* **100**: 698–702.

**Pohanka M., Ruttkay-Nedecký B., Fusek J., Adam V., Kizek R.** (2015). Melatonin Regulates Oxidative Stress Initiated by Freund's Complete Adjuvant. *Acta Medica (Hradec Kralove)*. **58**(1):21-4.

**Rajapakse N., Silva E., Kortenkamp A.** (2002). Combining xenoestrogens at levels below individual no-observed-effect-concentrations dramatically enhances steroid hormone action. *Environ. Health Perspect.* **110**: 917-921.

**Reiter R.J., Tan D.X.** (2003). What constitutes a physiological concentration of melatonin? *Journal of Pineal Research*. **34**: 79–80

**Ries L. A.G., Eisner M.P., Kosary C.L., Hankey B.F., Miller B.A., Clegg L., Edwards B.K.** (2001). SEER Cancer Statistics Review, 1973-1998. *National Cancer Institute*, Bethesda, MD.

**Romero T., Molina R., Key M.** (2002). Melatonina y cáncer de mama. *Gac. Méd. Caracas*. v.110 n.3.

**Ross R.K., Paganini-Hill A., Wan P.C., Pike M.C.** (2000). Effect of hormone replacement therapy on breast cancer risk: estrogen versus estrogen plus progestin. *J. Natl. Cancer Inst.* **92**: 328-332.

**Russo I.H., Russo J.** (1998). Role of hormones in mammary cancer initiation and progression. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia*. **3**: 49-61.

**Sánchez-Barceló E.J., Cos S., Mediavilla D., Martínez-Campa C., González A. and Alonso- González C.** (2005). Melatonin–estrogen interactions in breast cancer. *J. Pineal Res.* **38**:217–222.

**Schairer C., Lubin J., Troisi R., Sturgeon S., Brinton L., Hoover R.** (2000) Estrogen/progestin replacement and risk of breast cancer. *J. A. M. A.* **284**: 691-694.

**Schomerus C., Korf H.W.** (2005) Mechanisms regulating melatonin synthesis in the mammalian pineal organ. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1057**: 372-83.

**Shen C-J., Chang C-C., Chen Y-T., Lai C-S. and Hsu Y-C.** (2016). Melatonin Suppresses the Growth of Ovarian Cancer Cell Lines (OVCAR-429 and PA-1) and Potentiates the Effect of G1 Arrest by Targeting CDKs. *Int. J. Mol. Sci.* **17**(2), 176.

**Silva E., Rajapakse N., Kortenkamp A.** (2002) Something from “nothing”– eight weak estrogenic chemicals combined at concentrations below NOECs produce significant mixture effects. *Environ. Sci. Technol.* **36**: 1751– 1756.

**Thomas H.V., Reeves G.K., Key T.J.** (1997). Endogenous estrogen and postmenopausal breast cancer: A quantitative review. *Cancer Causes Control.* **8**: 922-928.

**Tinwell H., Ashby J.** (2004) Sensitivity of the immature rat uterotrophic assay to mixtures of estrogens. *Environ. Health Perspect.* **112**: 575– 582.

**Turek F.W., Gillette M.U.** (2004). Melatonin, sleep, and circadian rhythms: rationale for development of specific melatonin agonists. *Sleep Med.* **5**(6):523-32.

**Wehr TA.** (1997). Melatonin and seasonal rhythms. *J. Biol. Rhythms.* **12**: 518-27.

**Wu A. H., Pike M. C., y Stram D. O.** (1999). Meta-analysis: dietary fat intake, serum estrogen levels, and the risk of breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **91**: 529-534.

**Yoshida K., Miki Y.** (2004). Role of BRCA1 and BRCA2 as regulators of DNA repair, transcription, and cell cycle in response to DNA damage. *Cancer Science.* **95**: 866- 871.

**Yue W., Wang J. P., Hamilton C. J., Demers L. M., Santen R. J. (1998). *In situ* aromatization enhances breast tumour estradiol levels and cellular proliferation. *Cancer Res.* **58**: 927-932.**