FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD DE
CANTABRIA

GRADO EN MEDICINA

TRABAJO FIN DE GRADO

Influencia de la melatonina en el desarrollo de la mama, tanto normal como tumoral

Influence of melatonin on both normal and tumoral breast growth

Autora: Ángela Gutiérrez González

Director: D. Samuel Cos Corral

Santander, Junio 2018

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradecer a mi tutor, Samuel Cos, por su tiempo, su ayuda, sus consejos, y sobre todo por la dedicación que regala a los alumnos de medicina. Fuiste uno de los primeros profesores con los que tuvimos el placer de aprender fisiología, y espero que muchas más promociones tengan la suerte de disfrutar de tus clases y de tu entusiasmo por esta profesión.

Gracias a mis padres, por apoyarme y respetar siempre las decisiones que tomo. Gracias mamá por estar ahí incondicionalmente, por creer en mí más que nadie, por no dejar que me caiga nunca. Gracias papá por ser un ejemplo de constancia, si he llegado hasta aquí es gracias al sentido de la responsabilidad que tú me has enseñado. Gracias por dar todo y más para que consiga lo que quiero ser. Y a Edu, porque el disfrutar de la vida lo he tenido que heredar de ti.

Gracias a mis abuelas, Lili y Pilar, por ser un ejemplo de lucha y superación. Porque lo orgullosas que os sentís de mí es el reflejo de lo que lo estoy yo de vosotras.

Gracias a mi chico, Enrique, por la paciencia, por lo compartido, en Cartagena o en Santander, pero contigo. Compañero, gracias por ser la ilusión de todo lo que viene.

Y a estos 6 años, les tengo que dar las gracias por darme experiencias y amigos increíbles. A vosotros, gracias por hacer el camino más llevadero, porque en un tiempo no recordaremos lo duro que fue, sino lo bonito que lo hicimos.

ÍNDICE

RESUMEN / ABSTRACT……1

OBJETIVOS Y METODOLOGÍA……2

- Objetivos
- Metodología

CÁNCER DE MAMA……3

1. Epidemiología y etiología……..3
2. Clasificación inmunohistoquímica…….....4
3. Abordaje clínico y terapéutico……...4
   a. Quimioterapia.
   b. Radioterapia.
   c. Hormonoterapia.

MELATONINA……8

1. Síntesis, secreción, transporte y metabolismo de la melatonina……...8
2. Regulación de la síntesis de melatonina……9
3. Mecanismo de acción……..10
4. Acciones……....12

ACCIONES DE LA MELATONINA EN EL DESARROLLO MAMARIO……13

MELATONINA Y CÁNCER DE MAMA……14

1. Melatonina y estrógenos……14
2. La melatonina como un modificador de la susceptibilidad de la glándula mamaria a las neoplasias……17
3. Modulación de la expresión de diferentes genes en el cáncer de mama……19

MECANISMOS DE LOS EFECTOS ANTITUMORALES DE LA MELATONINA EN EL CÁNCER DE MAMA……...21

1. Acciones antiestrogénicas de la melatonina……21
   a. Regulación de las concentraciones plasmáticas de estrógenos……...21
   b. Regulación de la activación del receptor de estrógenos……..22
   c. Modulación de los enzimas involucrados en la síntesis local de estrógenos……...23

2. Modulación del ciclo celular: proliferación, diferenciación y apoptosis……..24
   a. Proliferación……...24
   b. Diferenciación……25
   c. Apoptosis……25

3. Inhibición de la actividad de la telomerasa…… 26

4. Efectos antioxidantes……27

5. Antiangiogénesis……28

6. Prevención de la disrupción de los ritmos circadianos……29

7. Inhibición de las metástasis……..30

8. Efectos inmunoestimulantes……31

9. Factores epigenéticos……32

10. Transporte y metabolismo de ácidos grasos……..32

LA MELATONINA COMO REGULADOR DE LA RESISTENCIA A LA TERAPIA ENDOCRINA Y A LA QUIMIOTERAPIA……..34

ENSAYOS CLÍNICOS EN PACIENTES……..35

CONCLUSIONES……...38

REFERENCIAS……...41

RESUMEN

La melatonina es la principal hormona secretada por la glándula pineal. La función clásica de esta indolamina es la sincronización de los diferentes ritmos circadianos y circanuales con la luz ambiental. En las últimas décadas, un gran número de equipos de investigación se han encargado de describir el importante papel de la melatonina en la prevención y el desarrollo del cáncer. El objetivo del presente trabajo es describir los diferentes mecanismos a través de los cuales la melatonina ejerce acciones sobre el desarrollo de la mama tanto normal como tumoral. Entre las acciones antitumorales de la melatonina cabe destacar: (1) las acciones antiestrogénicas, tanto sobre los niveles circulantes de estrógenos como sobre las vías de señalización estrogénica; (2) la modulación del ciclo celular, a nivel de proliferación, diferenciación y apoptosis; (3) la regulación de la actividad de la telomerasa; (4) la regulación de la invasividad y la metástasis tumoral; (5) sus acciones antioxidantes; (6) sus acciones antiangiogénicas; (7) los efectos moduladores sobre los ritmos circadianos; (8) los efectos inmunoestimulantes; (9) la regulación epigenética y (10) el transporte y metabolismo de ácidos grasos. A continuación, abordaremos el papel de la melatonina en distintos ensayos clínicos, valorando los efectos beneficiosos de su utilización junto con otros tratamientos antitumorales. A pesar de todas las propiedades mencionadas, el uso de la melatonina en la práctica clínica diaria es muy limitado, se necesitan estudios adicionales para definir con mayor precisión el papel de esta hormona en la aplicación clínica oncológica.

ABSTRACT

Melatonin is the main hormone secreted by the pineal gland. The classical function of this indolamine is the synchronization of the different circadian and circanual rhythms with ambient light. In recent decades, a large number of research teams have described the main role of melatonin in the prevention and development of cancer. The objective of the present work is to describe the different mechanisms through which melatonin exerts its actions on both normal and tumoral mammary growth. Among melatonin tumoral actions are: (1) the antiestrogenic actions of melatonin, both on the circulating levels of estrogens and on the pathways of estrogenic signaling; (2) modulation of the cell cycle, at the level of proliferation, differentiation and apoptosis; (3) its regulation of telomerase activity; (4) the regulation of invasiveness and tumor metastasis; (5) its antioxidant actions; (6) its anti-angiogenic actions; (7) modulating effects on circadian rhythms; (8) the immunostimulatory effects; (9) epigenetic regulation and (10) transport and metabolism of fatty acids. Next, we will approach the role of melatonin in different clinical trials, assessing the beneficial effects of its use along with other antitumor treatments. Despite all the mentioned properties, the use of melatonin in daily clinical practice is very limited, additional studies are needed to define with more precision the role of this hormone in clinical oncological application.

OBJETIVOS

El objetivo fundamental de este trabajo es describir los diferentes mecanismos a través de los cuales la melatonina ejerce acciones sobre el desarrollo de la mama, tanto normal como tumoral. Para ello, en primer lugar, realizaremos una breve introducción de la fisiología de la glándula pineal y de su principal producto de secreción, la melatonina.

A continuación, realizaremos una revisión de la literatura publicada hasta hoy día, con el objetivo de describir los principales mecanismos de acción de la melatonina a través de los cuales ejerce sus efectos oncostáticos.

Finalmente, revisaremos las posibles aplicaciones futuras de la melatonina en la práctica clínica.

METODOLOGÍA

Con la finalidad de realizar una búsqueda de información para la realización de este trabajo se han utilizado diferentes bases de datos científicas como: Pubmed, Medline, Uptodate, Google Académico. Además se han consultado artículos de revistas de alto factor de impacto como *Journal of Pineal Research, Cancer Research, International Journal of Molecular Sciences*, *British Journal of Cancer* o *Biomed Research International*. También se han empleado otro tipo de fuentes de información como libros y páginas *webs.*

Para realizar la búsqueda bibliográfica se han empleado las palabras clave: melatonina, glándula pineal, cáncer de mama, estrógenos, vías de señalización.

CÁNCER DE MAMA

1. Epidemiología y etiología

El cáncer de mama se define como una proliferación maligna y descontrolada de células epiteliales mamarias que han adquirido propiedades que les permiten evadir la muerte celular, invadir tejidos circundantes y, en algunos casos, metastatizar a otros lugares a través del sistema linfático o del torrente sanguíneo. El crecimiento celular y la integridad genómica están estrechamente regulados en las células normales por distintos genes. Sin embargo, en las células tumorales a menudo se pierde esta regulación debido a las anomalías (hereditarias o adquiridas) en dichos genes, como por ejemplo los genes supresores de tumores y oncogenes.

El cáncer de mama es el segundo cáncer más frecuente en el mundo y, con mucho, el cáncer más frecuente en mujeres con 1,67 millones de nuevos casos de cáncer diagnosticados en 2012 (25% de todos los cánceres). La mayoría de los casos ocurren en mujeres en regiones menos desarrolladas. Las tasas de incidencia varían casi cuatro veces en las regiones del mundo, con tasas que oscilan entre 27 por 100.000 en África Media y Asia Oriental hasta 96 en Europa Occidental. El cáncer de mama se clasifica como la quinta causa de muerte por cáncer (522.000 muertes) y mientras sigue siendo la causa más frecuente de muerte por cáncer en las mujeres en las regiones menos desarrolladas (324.000 muertes, 14.3% del total), ahora es la segunda causa de muerte por cáncer en las regiones más desarrolladas (198.000 muertes, 15,4%) después del cáncer de pulmón. El rango en las tasas de mortalidad entre las regiones del mundo es menor que el de la incidencia debido a la supervivencia más favorable del cáncer de mama en las regiones desarrolladas (de alta incidencia). Esto podría explicarse principalmente por la falta de programas de detección precoz en las zonas menos desarrolladas, que hace que un alto porcentaje de las mujeres acudan al médico cuando la enfermedad se encuentra avanzada, pero también por la falta de servicios adecuados de diagnóstico y tratamiento. [1]

En relación con su etiología, aunque las causas precisas del cáncer de mama no están claras, conocemos los principales factores de riesgo. A pesar de esto, la mayoría de las mujeres consideradas de alto riesgo de cáncer de mama pueden no desarrollarlo, y viceversa. Entre los factores más importantes están la **edad avanzada y los antecedentes familiares de cáncer de mama**. El riesgo aumenta para una mujer que tiene ciertos tipos de bultos mamarios benignos y aumenta significativamente para una mujer que ha tenido cáncer de mama o de los ovarios anteriormente.

Una mujer cuya madre, hermana o hija ha tenido cáncer de mama tiene entre dos y tres veces más probabilidades de desarrollar la enfermedad, especialmente si se ha visto afectado a más de un familiar de primer grado. Los investigadores han identificado dos genes responsables de algunos casos de cáncer de mama familiar. Estos genes se conocen como **BRCA1 y BRCA2.** Alrededor de una mujer de cada 200 porta estos genes. Tener uno de ellos predispone a una mujer a desarrollar cáncer de mama y también de ovario.

Generalmente, las mujeres **mayores de 50 años** tienen más probabilidades de contraer cáncer de mama que las mujeres más jóvenes, y las mujeres afroamericanas tienen más probabilidades que las caucásicas de contraer cáncer de mama antes de la menopausia.

El vínculo entre el cáncer de mama y las hormonas es claro. Los investigadores piensan que cuanto mayor es la exposición de una mujer a los estrógenos, más susceptible es para el desarrollo de cáncer de mama. El estrógeno estimula a las células a su división; cuanto más se dividen las células, es más probable que surja alguna mutación y más posible que se vuelvan cancerosas.

La exposición de una mujer al estrógeno y la progesterona aumenta y disminuye durante su vida, influenciada por la edad en que comienza y deja de menstruar, la duración promedio de su ciclo menstrual y su edad en el primer parto. El riesgo de una mujer de contraer cáncer de mama aumenta si comienza a menstruar antes de los 12 años, tiene su primer hijo después de los 30, deja de menstruar después de los 55 años o tiene un ciclo menstrual más corto o más largo que el promedio de 26 a 29 días. Las mujeres que tomaron píldoras anticonceptivas en el pasado pueden tener un riesgo levemente mayor de desarrollar cáncer de mama. Este riesgo desaparece si no ha tomado píldoras anticonceptivas durante al menos 10 años. Algunos estudios sugieren que tomar terapia de reemplazo hormonal para la menopausia con estrógeno y progesterona combinados puede aumentar el riesgo, especialmente cuando se toma por más de cinco años. Las dosis altas de radioterapia también pueden ser un factor, pero las mamografías de baja dosis casi no representan un riesgo.

El vínculo entre la dieta y el cáncer de mama es debatido. La obesidad es un factor de riesgo notable, y beber alcohol con regularidad, en particular más de una bebida al día, puede promover la enfermedad. Muchos estudios han demostrado que las mujeres cuyas dietas son ricas en grasas tienen más probabilidades de contraer la enfermedad. Los investigadores sospechan que, si una mujer reduce sus calorías diarias de grasa, a menos del 20% -30%, su dieta puede ayudar a protegerla de desarrollar cáncer de mama.

2. Clasificación inmunohistoquímica. [2]

En función de las características inmunohistoquímicas se diferencian varios subtipos de tumores mamarios y su clasificación es clave a la hora de determinar el abordaje terapéutico. Durante el análisis del tumor biopsiado se utilizan 4 marcadores principalmente: receptores de estrógenos (ER) y receptores de progesterona (PgR), cuyo grado de expresión conferirá una mejor respuesta al tratamiento hormonal; el receptor del factor de crecimiento epidérmico (HER2) cuya presencia confiere al tumor una mayor agresividad; y un marcador de proliferación (Ki67). En función de estas características se distinguen los siguientes subtipos *(fig. 1):*

a) Luminal: expresa receptores hormonales (ER+) y a su vez se subdivide en función de la expresión de HER2 y del índice de proliferación celular (Ki67).

b) HER2 +.

c) Triple negativo, que no expresa ni receptores hormonales ni HER2.

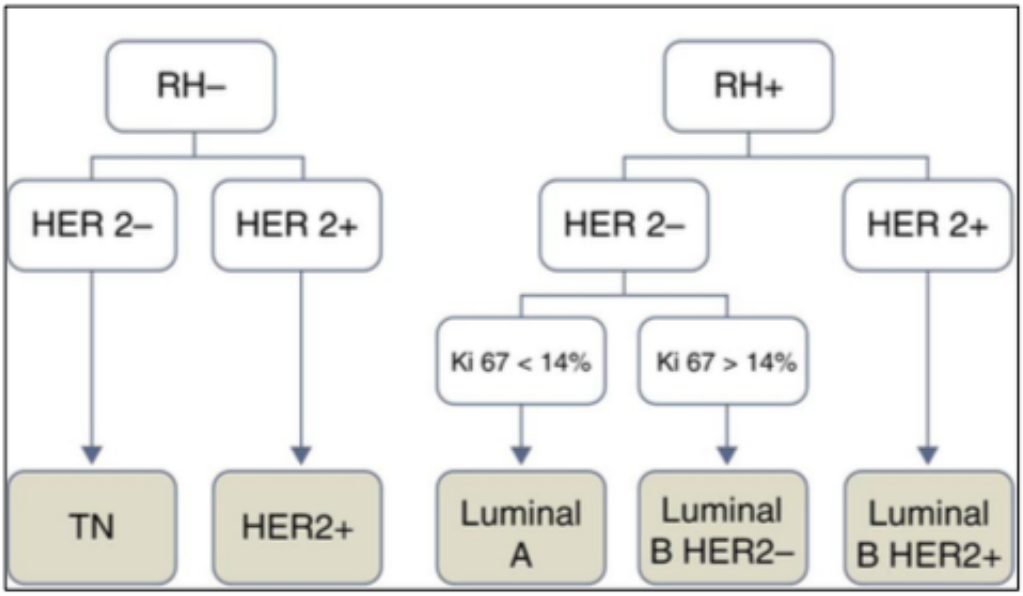

Figura 1. Clasificación inmunohistoquímica del cáncer de mama.

3. Abordaje clínico y terapéutico [2]

En el cáncer de mama, al igual que en muchos otros tumores sólidos, existen tres herramientas terapéuticas principales: cirugía, radioterapia y quimioterapia, siendo la cirugía la primera modalidad utilizada en la gran mayoría de los casos. Habitualmente tras la resección quirúrgica se instauran terapias adyuvantes como la quimioterapia y/o la radioterapia. En ocasiones estas técnicas se utilizan de forma neoadyuvante, antes de la cirugía, para facilitar la realización de la misma, consiguiendo una regresión parcial o total del tumor.

a) Quimioterapia.

En la mayoría de los casos, especialmente como tratamiento adyuvante o neoadyuvante, la quimioterapia es más eficaz cuando se usan combinaciones de medicamentos. Actualmente, los médicos emplean muchas combinaciones diferentes, y no queda claro que una sola combinación sea evidentemente mejor que otra. Entre los fármacos más empleados se encuentran: antraciclinas, como la doxorrubicina (Adriamycin) y la epirrubicina (Ellence), son terapias que actúan inhibiendo las topoisomerasas; taxanos, como el paclitaxel (Taxol) y el docetaxel (Taxotere), que interfieren con los microtúbulos; 5-fluorouracilo (5-FU); ciclofosfamida (Cytoxan) y carboplatino (Paraplatin). Con más frecuencia, se usan combinaciones de dos o tres de estos medicamentos.

b) Radioterapia.

La radioterapia, al igual que muchos agentes quimioterapéuticos, daña directamente el ADN de las células tumorales. Este daño es realizado por una radiación ionizante. Se puede aplicar externamente (radioterapia), internamente a través de cápsulas (braquiterapia) o por vía oral/intravenosa (sistémica). En el cáncer de mama es utilizada tanto para el control local de la enfermedad como para reducir la carga tumoral antes de la cirugía (neoadyuvante).

c) Hormonoterapia.

Aproximadamente el 70% de los tumores mamarios son hormono-dependientes (al menos en su etapa inicial), en los que el receptor de estrógenos está sobreexpresado en mayor o menor grado. La hormonoterapia por tanto se basa en fármacos con acción antiestrogénica:

1. **Drogas capaces de modular la actividad del receptor de estrógenos (Selective Estrogen Receptor Modulators, SERM).** En este grupo se incluye el Tamoxifeno y sus derivados, que se comportan como agonistas parciales o antagonistas de estrógenos. Otro SERM es el Fulvestrant conocido también como SERD (Selective Estrogen Receptor Destroyer), que bloquea totalmente la transactivación del receptor de estrógenos, altera su dimerización e induce la degradación del mismo.

2. **Drogas capaces de inhibir los enzimas implicados en la conversión de andrógenos a estrógenos (Selective Estrogen Enzime Modulators, SEEM).** En este grupo se incluyen los compuestos de origen esteroideo (formestrano o exemestrano) como no esteroideo (letrozol).

Los SERM, al bloquear la respuesta a los estrógenos a nivel del ER, previenen los efectos carcinogénicos de estos esteroides, derivados de su capacidad para aumentar la proliferación celular a través de la activación del ERalfa. Los SEEM, al disminuir la propia síntesis de estrógenos, no solo previenen los efectos derivados de su unión a los ER, sino también las posibles acciones mutagénicas directas de los esteroides o de sus metabolitos.

Si bien este tipo de tratamiento combinado con quimioterapia mejora notablemente el pronóstico de las pacientes, no es útil en los casos en los que las células tumorales carecen de receptores hormonales (ER-, PgR-). En estos casos el abordaje terapéutico dependerá de si la proteína HER2 está sobreexpresada. Las células que presentan altos niveles de esta proteína en su membrana plasmática responden de manera muy intensa a niveles normales de factores de crecimiento, por lo que se multiplican velozmente llegando a originar tumores. Para tratar a los pacientes con este tipo de cáncer de mama se utilizan compuestos de quimioterapia dirigidos contra la proteína HER2, como el anticuerpo monoclonal Trastuzumab. En los casos triples negativos, sin receptores para estrógenos y progesterona y sin sobreexpresión HER2, son los que tienen peor pronóstico y su tratamiento se basa mayoritariamente en fármacos de quimioterapia que sean capaces de detener

la división celular interfiriendo con la dinámica de los microtúbulos.

MELATONINA

1. Síntesis, secreción, transporte y metabolismo de la melatonina [3]

Se han descrito numerosas sustancias de naturaleza peptídica sintetizadas por la glándula pineal, tales como vasopresina, oxitocina, somatostatina o neurofisinas, entre otras. Pero lo cierto es que actualmente la síntesis de melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) es considerada la función primaria de la glándula.

La síntesis de melatonina comienza con la captación, por parte de los pinealocitos de un aminoácido esencial, el triptófano, precursor de la hormona. Esta captación se realiza probablemente a través de transporte activo; parte del triptófano se utiliza para la producción de proteínas y, en su mayor proporción, es convertido en indolaminas. El triptófano a través de la acción de las enzimas triptófano hidroxilasa y descarboxilasa, es convertido en 5-hidroxitriptófano y serotonina. Este paso ocurre en la mitocondria en presencia de una pteridina usada como cofactor, posiblemente la tetrahidrobiopterina [4].

La serotonina es la precursora del compuesto biológicamente activo (melatonina), siendo sus concentraciones pineales las más elevadas de todo el organismo. La vía metabólica principal de la serotonina intrapineal es su conversión a melatonina, para la cual se llevan a cabo dos reacciones enzimáticas (*fig. 2*):

- Acetilación de la serotonina por acción de la enzima serotonina-N-acetil-transferasa (SNAT); esta enzima es el factor limitante de la biosíntesis de melatonina.

- A continuación, la hidroxindol-O-metiltransferasa (HIOMT) transfiere el grupo metilo donado por la S-adenosilmetionina a la posición 5-hidroxi de la N-acetilserotonina, dando como resultado la formación de melatonina.

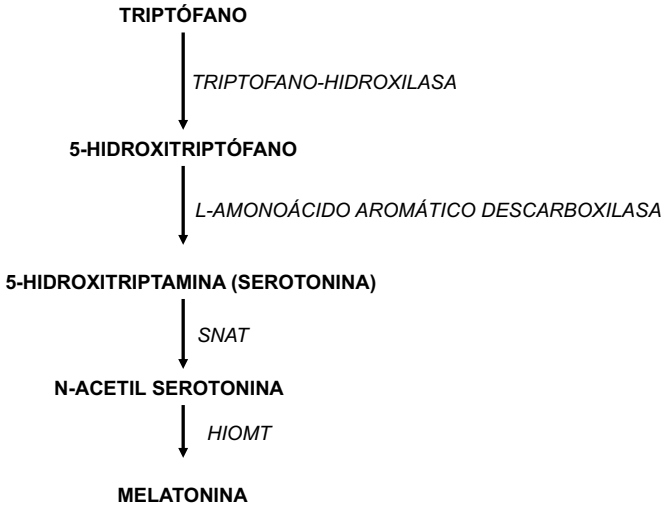

Figura 2. Síntesis de melatonina a partir de triptófano en la glándula pineal.

La glándula pineal no es el único órgano productor de melatonina, la síntesis también está presente por ejemplo en la retina, las glándulas lacrimales o el intestino. Sin embargo, se ha demostrado que la síntesis extrapineal de melatonina solo tiene acción a nivel local, aunque los niveles de producción de melatonina extrapineal son mucho mayores que en la pineal.

El mecanismo de secreción de la melatonina a la sangre es por difusión simple, penetrando en compartimentos corporales como el líquido cefalorraquídeo o el líquido amniótico. Circula en el plasma unida en un 80% a la albúmina y el resto de forma libre. Debido a que la melatonina no se acumula en la glándula pineal, los niveles de la hormona en sangre son considerados el principal índice de su síntesis pineal [4]

La mayor parte de la melatonina circulante es metabolizada en el hígado. Se produce la formación de un compuesto inactivo mediante la hidroxilación en posición 6 de la melatonina, 6-hidroximelatonina. Esta a su vez se conjuga con ácido sulfúrico (70-80%) o glucurónico (5-30%), formas de excreción fundamentales en orina y heces. El sistema nervioso central también metaboliza melatonina, produciendo dos metabolitos activos, la N-acetil-N-formil-5metoxi-quinureamina (AFMK) y N-actil-5-metoxiquinurenamina (AMK). Una pequeña proporción (0,5-1%) de la melatonina circulante es eliminada en la orina de forma libre. Además, existen otros metabolitos que son excretados por la orina, como la 3-OH melatonina cíclica.

2. Regulación de la síntesis de melatonina [3]

La secreción de la melatonina presenta un patrón circadiano, repetido cada 24 horas, con aumento de la misma durante las horas de oscuridad y niveles bajos durante las horas de luz. Por esta razón ha sido llamada la “hormona de la oscuridad”. Los niveles diurnos oscilan entre 10-20 pg/ml, mientras que los nocturnos aumentan unas diez veces. Alcanza su pico máximo entre las 2 am y las 6 am.

Al determinar a lo largo de un ciclo diario, durante un periodo de tiempo, los niveles de melatonina y sus precursores, e incluso la actividad de las enzimas SNAT y HIOMT, se observa, en todos ellos, un ritmo dependiente de la alternancia luz/oscuridad. Las propias enzimas son capaces de responder a cambios en la luz ambiental, con actividades altas durante la oscuridad y bajas durante el día, en todas las especies estudiadas y también en el hombre.

La actividad biosintética y secretora de la glándula pineal responde primariamente a estímulos neurales (lumínicos) y secundariamente a estímulos hormonales de tejidos periféricos.

La información fotosensorial es captada por los fotorreceptores retinianos, y a través del tracto retinohipotalámico, hace escala en el núcleo supraquiasmatico. Desde estos sale por la médula espinal (columna intermedio lateral) para llegar al ganglio cervical superior (GCS). Finalmente, la información llega a la pineal por las fibras postganglionares de los GCS *(fig.3).*

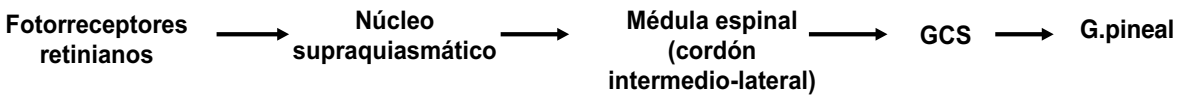

Figura 3. Vía a través de la cual la información luminosa llega a la glándula pineal.

El esquema clásico de la regulación pineal defiende que la luz mantiene inhibida la actividad eléctrica de las neuronas ganglionares. Cuando el estímulo lumínico se interrumpe se produce una activación inmediata neuronal, con liberación de noradrenalina en las fibras simpáticas postganglionares. Esta noradrenalina interactúa con los receptores beta-1 adrenérgicos de la membrana del pinealocito desencadenando un incremento de la actividad de la adenilato ciclasa y de los niveles de AMPc, un aumento de la síntesis de ARN y proteínas y activación de enzimas involucradas en la síntesis de melatonina tales como SNAT y HIOMT.

Además de este esquema se ha incluido un modelo que implica un control multifactorial de la secreción de melatonina. En este se ha descrito la presencia de receptores alfa-1 postsinápticos que potencian el efecto beta. Además se han encontrado datos que avalan la existencia de una inervación pineal central que contribuye al control secretorio de la glándula. Por último, existen evidencias claras de un control paracrino de la actividad pineal.

La glándula pineal presenta también retroalimentación hormonal por los órganos efectores a cuyas funciones afecta. Entre las hormonas capaces de actuar sobre la pineal, tanto de forma directa como indirecta, se incluyen estrógenos, andrógenos, progestágenos, corticoides, prolactina, gonadotrofinas, somatostatina… Esto puede explicar los cambios que se producen en el ritmo diario de la melatonina durante el ciclo menstrual de la mujer, que no serían más que respuestas a cambios en las concentraciones de gonadotrofinas y esteroides ováricos. Esta modulación hormonal es complementaria a la neural.

3. Mecanismos de acción

La melatonina ejerce sus efectos a través de receptores específicos. Se une y activa a dos tipos de receptores MT1 y MT2, que se expresan principalmente en el SNC aunque también en órganos periféricos.

Ambos pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteínas G (G protein-coupled receptors) los cuales se encuentran en la superficie celular y contienen 7 dominios transmembrana. [5]

El receptor MT1 está formado por 350 aminoácidos y se encuentra unido a Gi. Su expresión se ha encontrado en el cerebro, el sistema cardiovascular (incluidos vasos sanguíneos periféricos, aorta y corazón), sistema inmunitario, testículos, ovario, piel, hígado, riñón, placenta, retina, páncreas, mama y bazo. En el SNC, el receptor se encuentra predominantemente en el hipotálamo, el cerebelo, hipocampo, sustancia negra y área ventral tegmental. Por su parte, el

receptor MT2, también unido a proteínas G ha sido encontrado en el sistema inmunitario, el cerebro (hipotálamo y núcleo supraquiasmático), retina, vasos sanguíneos, testículos, riñón, tracto gastrointestinal, mamas, tejido adiposo y piel. [6]

Existe un tercer receptor de melatonina, MT3, que no ha sido encontrado en humanos, pero sin en hámsteres. Los niveles más altos del mismo se encuentran en el hígado y los riñones, con concentraciones moderadas en el corazón, el tejido adiposo y el cerebro. Entre sus propiedades se encuentra su baja afinidad por la 2- [I125]-yodo-melatonina, al contrario que en los receptores MT1 y MT2 cuya afinidad es elevada. No se encuentra unido a proteínas G. En el año 2000 Nosjean y sus colaboradores concluyeron que MT3 es equivalente a la quinona reductasa II [4]. (*Fig*.4)

La melatonina no solo ejerce sus efectos a través de receptores específicos, también se ha demostrado su acción a través de receptores nucleares, interaccionando con proteínas citosólicas, interacción mitocondrial e incluso acción directa.

Los receptores nucleares sobre los que media su acción son los ROR/RZR (retinoid orphan receptors/retinoid Z receptors). En 1994 Becker-Andre y su equipo demostraron una acción genómica de la melatonina a través de los receptores nucleares RORα. Existe cierta controversia actual sobre si los factores de transcripción ROR son verdaderos receptores nucleares de melatonina, aunque hay numerosas publicaciones avalando este punto de vista.

La melatonina puede interactuar con proteínas citosólicas como la calmodulina [7], calreticulina [8], tubulina [9] y proteína quinasa C (PKC) [12]. Todas estas proteínas participan en el metabolismo del calcio y participan en la modulación de la estructura del citoesqueleto.

A nivel mitocondrial se han encontrado dos lugares de unión específicos de la melatonina, uno de alta y otro de baja afinidad relacionados con el cluster sulfoferroso del complejo I y con el poro de transición mitocondrial respectivamente. En primer lugar, la melatonina puede actuar sobre el cluster sulfoferroso N2, modificando el transporte de protones y electrones. Como consecuencia de esta interacción, la melatonina puede reducir el flujo de electrones, la disipación de protones y la consecuente formación de especies reactivas a este nivel [11,12,13]. El segundo lugar de unión de la melatonina a la mitocondria estaría a nivel del poro de transición mitocondrial y su efecto sería una inhibición de su apertura, previniendo la liberación mitocondrial de citocromo C y, consecuentemente, la apoptosis [14].

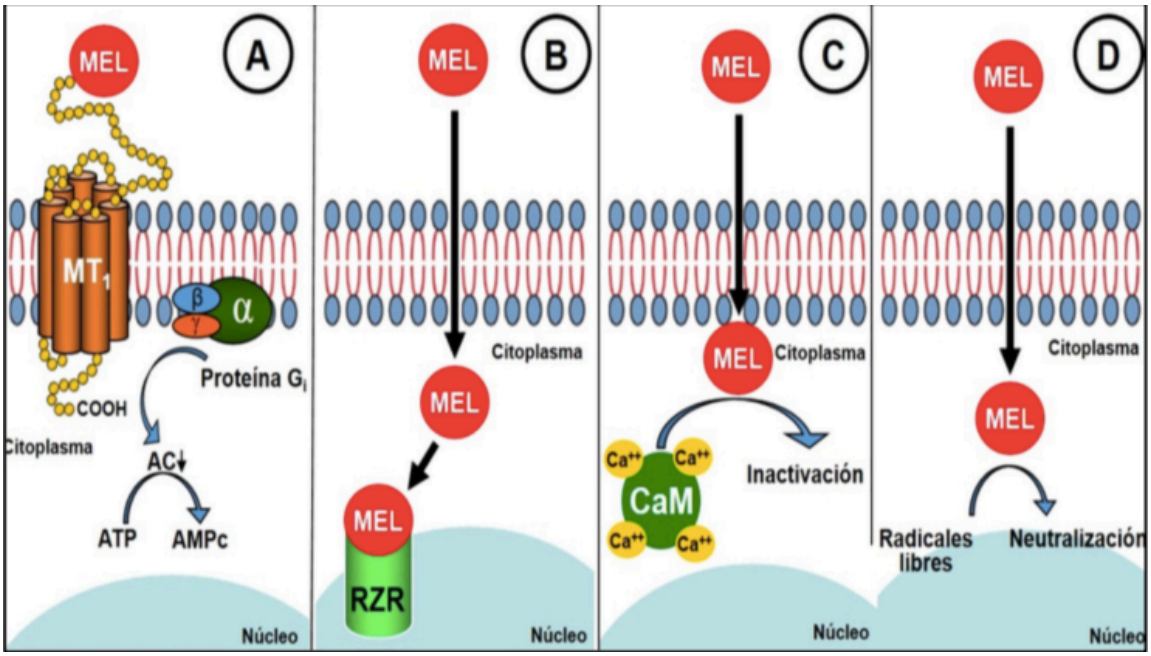

Figura 4. Mecanismos generales de acción de la melatonina. ***A)*** *Unión a receptores de membrana MT1/MT2****;*** ***B)*** *Unión a receptores nucleares RZR/ROR;* ***C)*** *Unión a proteínas citoplasmáticas, como la calmodulina (CaM);* ***D)*** *Neutralizador de radicales libres.*

4. Acciones

En cuanto a las acciones de la melatonina pineal, se trata de una hormona de la cual han sido descritas diferentes acciones en diversos contextos biológicos. En general, podemos dividir las acciones de la melatonina 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. 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. En tercer lugar, otra acción de la melatonina es la estimulación de la función inmune, induciendo la producción de interleukinas y otras citokinas 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 son las acciones antitumorales.

ACCIONES DE LA MELATONINA EN EL DESARROLLO MAMARIO

La melatonina regula los niveles circulantes de algunas hormonas gonadales y pituitarias que intervienen en el control del desarrollo mamario. Como consecuencia de esto, es lógico pensar en el posible papel de la melatonina en el crecimiento la mama. Aunque en numerosas ocasiones se han estudiado la influencia de la glándula pineal y sus hormonas en el crecimiento de tumores mamarios, el posible papel de la melatonina en el desarrollo normal de la mama, por el contrario, ha sido menos estudiado.

En los estudios realizados sobre la acción de la melatonina en el crecimiento de la mama, se ha descrito que ejerce su acción de manera directa e indirecta. Su acción indirecta la ejerce, como ya hemos dicho, modificando los niveles de hormonas gonadales y pituitarias que son importantes en la mamogénesis. Su acción directa fue estudiada en ratones a los que se administraba melatonina de forma exógena. En este estudió se concluyó que el tratamiento con melatonina después de la pubertad no cambiaba el crecimiento mamario, por el contrario, durante la pubertad, los ratones que recibieron melatonina exógena mostraron un menor crecimiento mamario. Además, se describió que los tratados con melatonina, presentaban el crecimiento alométrico positivo mamario dos semanas más tarde que los no tratados, siendo la finalización de este crecimiento a la vez [15].

Por último, se demostró que la melatonina disminuye el desarrollo de estructuras ligadas a lugares de crecimiento, y aumenta el número de estructuras epiteliales que representan el estadio final de crecimiento ductal. Es importante destacar que la aparición de adenocarcinomas está relacionada con la densidad de estructuras indiferenciadas presentes en la glándula mamaria. Esto puede explicar el efecto protector que tiene la melatonina en la carcinogénesis mamaria [15].

Por otro lado, el crecimiento mamario está asociado a incremento del cAMP y disminución del cGMP. Se estudiaron los efectos de la melatonina y otras indolaminas pineales en la síntesis de nucleótidos cíclicos en las mamas de ratones. La melatonina, así como la 5-metoxitriptamina aumentan la acumulación del cGMP y disminuyen la del cAMP, siendo este efecto dosis-dependiente. En ambos casos el efecto de la 5-metoxitriptamina era mayor que el de la melatonina. Por lo tanto de esto podemos concluir que la melatonina a este nivel también disminuye el crecimiento mamario [16].

MELATONINA Y CÁNCER DE MAMA

Los efectos de la melatonina han sido estudiados en diferentes tipos de tumores, incluidos el de próstata, sarcomas, colorrectal, hepatocarcinoma, melanoma, tumores neurales, carcinomas laríngeos, cáncer de ovarios, de piel, cervical y, en particular, de mama. La mayor parte de los estudios han sido 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 las líneas celulares tumorales y reduce el desarrollo tumoral en tumores químicamente inducidos en roedores.

1. Melatonina y estrógenos [17, 20]

El cáncer de mama además de ser el más frecuente, también es actualmente la segunda causa de muerte por cáncer en mujeres detrás del cáncer de pulmón. Se conoce que gran parte de los tumores mamarios son hormono-dependientes. Los estrógenos intervienen en el crecimiento y la diferenciación de la glándula mamaria normal y en el desarrollo de las ramificaciones ductales. Además, es conocida la implicación de los estrógenos en la carcinogénesis. Desde 1896 se conoce el papel que desarrollan los estrógenos en el desarrollo del cáncer de mama, observándose respuestas beneficiosas tras ovariectomía bilateral en pacientes con este tipo de cáncer. Se ha seguido estudiando el papel de los estrógenos en el cáncer de mama. Su deprivación, reduce los tumores mamarios y su administración estimula el crecimiento del cáncer de mama.

Existen factores de riesgo para el desarrollo de cáncer de mama relacionados con los estrógenos, como son una menarquía precoz, una menopausia tardía, la nuliparidad, la obesidad, etc. Lo que tienen en común todos estos factores es la exposición acumulativa y excesiva a estrógenos a lo largo de la vida. Esta exposición tiene un papel importante en el cáncer de mama.

Se conoce la acción del estradiol en la carcinogénesis de los tumores mamarios, lo que no se sabe es si esos efectos los realiza de forma indirecta, a través de la estimulación de la proliferación de células epiteliales o de forma directa, actuando el estradiol y sus metabolitos como agentes mutagénicos.

Por todo lo mencionado anteriormente, uno de los principales objetivos del tratamiento del cáncer de mama es neutralizar los efectos de los estrógenos en ella. Como ya hemos dicho la ovariectomía fue el primer tratamiento “anti-estrogénico”. Actualmente la cirugía, la radioterapia, la quimioterapia y la hormonoterapia son los pilares principales del tratamiento del cáncer de mama.

Existen dos terapias farmacológicas para neutralizar los efectos estrogénicos:

a) Fármacos que actúan sobre el receptor estrogénico interfiriendo sobre la acción de los estrógenos endógenos en el mismo. A estos se les denomina moduladores selectivos de los receptores de estrógenos (SERMs).
b) Fármacos que interfieren con la síntesis de hormonas esteroideas inhibiendo las enzimas que controlan la conversión de andrógenos en estrógenos. A estos se les denomina moduladores selectivos de enzimas estrogénicas.

Dentro de las acciones de la melatonina, nos interesa su comportamiento como agente oncostático, en particular en tumores estrógeno-dependientes como el cáncer de mama. La melatonina comparte propiedades con los fármacos mencionados. Se ha demostrado también que los estrógenos modulan la respuesta inmune, y que altas concentraciones de estrógenos suprimen la respuesta inmunitaria celular. Por esta razón la acción antiestrogénica de la melatonina puede estar ligada a un aumento de la respuesta inmunitaria. Otra acción antitumoral de la melatonina es la que ejerce al inhibir la actividad de la telomerasa en las células mamarias cancerígenas MCF-7. En este caso también su acción antiestrogénica puede estar ligada, ya que recientemente se ha demostrado que los estrógenos tienen efecto potenciador de la acción de la telomerasa. Sin obviar las acciones mencionadas anteriormente, vamos a centrarnos en los efectos de la melatonina en la interacción con la síntesis estrogénica y sus vías de señalización.

La melatonina puede influir en las acciones de los estrógenos de tres maneras diferentes: 1. Mediante la regulación negativa de la síntesis gonadal de esteroides; 2. Interaccionando con los receptores de estrógenos (actuando como un SERM); 3. Mediante la regulación negativa de la actividad de enzimas, como la aromatasa, involucrada en la síntesis tanto de estrógenos como de andrógenos *(Fig.5).*

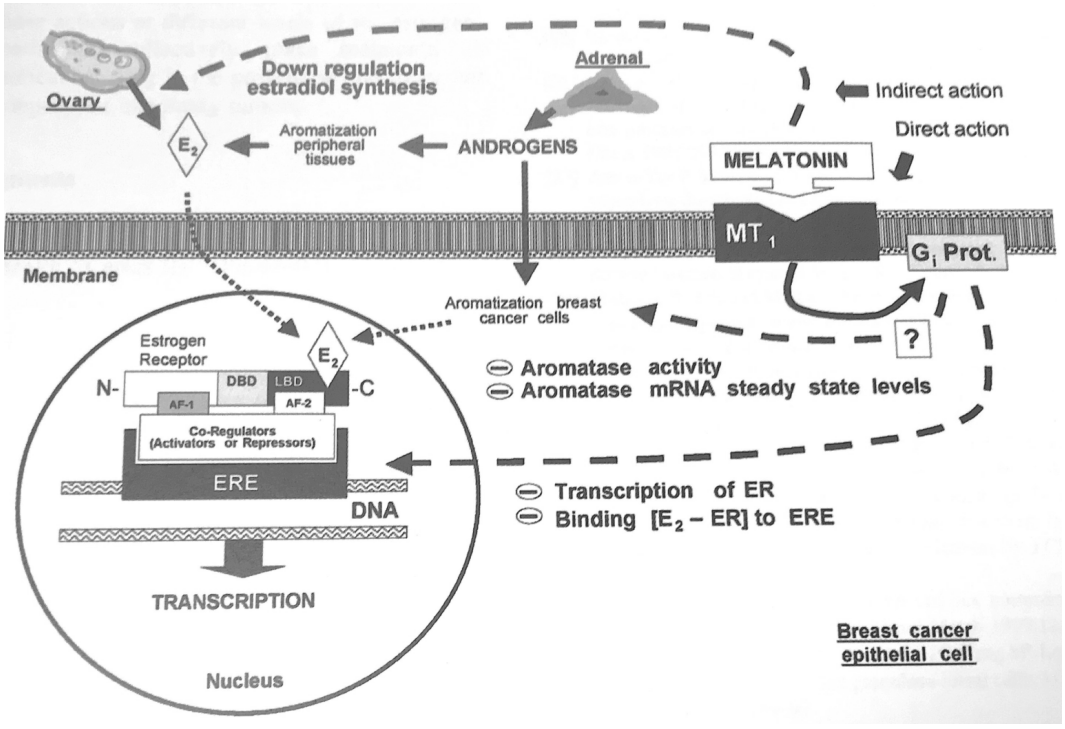

Figura 5. Esquema de los mecanismos a través de los que la melatonina reduce el cáncer de mama mediado por estrógenos. [17]

Esta indolamina, como hemos comentado, es capaz de regular las concentraciones plasmáticas de estrógenos. La regulación negativa ovárica de estrógenos ha sido observada en múltiples mamíferos, incluso en el humano, siendo esta demostrada en las células granulosas luteínicas [17]. También se han encontrado receptores melanocíticos en el cuerpo lúteo y los folículos antrales de ovarios de ratones [18].

La melatonina a concentraciones similares a las encontradas en suero de animales mamíferos durante la noche (1 nM) contrarresta los efectos inducidos por los estrógenos, tanto sobre la diferenciación celular como sobre la invasividad de las células tumorales mamarias, aumentando la sensibilidad de las células a los antiestrogenos como el tamoxifeno. De esta forma, inhibe la expresión de proteínas, factores de crecimiento y proto-oncogenes regulados por estrógenos. A diferencia del tamoxifeno, la melatonina no se une al receptor de estrógenos para realizar su acción, ni tampoco interfiere en la unión del estrógeno al mismo. Lo que hace es disminuir la expresión de receptores estrogénicos alfa (ER alfa) e inhibe la unión del complejo estrógeno-receptor al elemento de respuesta estrogénica (ERE) en el DNA. Estos efectos son dependientes de la unión de la melatonina a su receptor MT1, y la sobreexpresión de estos receptores potencia la respuesta de las células tumorales a la acción antiestrogénica de la melatonina. Los receptores MT1 se han encontrado en el tejido mamario tanto normal como tumoral. En resumen, la melatonina se comporta como un antiestrógeno que se une a sus propios receptores de membrana (MT1), y es capaz de interaccionar con la vía de señalización de los receptores de estrógenos.

Lo que parece enlazar la vía de señalización de los estrógenos y la melatonina son las concentraciones de cAMP. En las células tumorales mamarias los estrógenos activan la adenilato ciclasa y aumentan los niveles de cAMP. Este, hace sinergia con las acciones de los esteroides potenciando la transcripción mediada por receptores de estrógenos. Por el contrario, la melatonina inhibe la actividad de la adenilato ciclasa y disminuye el cAMP.

Así, un descenso en el cAMP parecer ser el mecanismo a través del que actúa la melatonina para reducir la actividad transcripcional inducida por estrógenos.

La melatonina, como los SERM es capaz de bloquear de forma específica los receptores alfa y no los beta estrogénicos. Esto es importante, ya que la sensibilidad de las células cancerosas mamarias humanas a la melatonina depende del cociente receptores alfa/beta y está abolida por la sobreexpresión de receptores beta.

Por último, la acción anti-aromatasa de la melatonina en las células del cáncer de mama se explica porque cualquier agente que es capaz de modular los niveles de cAMP también puede influir en la expresión de aromatasa. Es el caso de la prostaglandina E_2, que incrementa los niveles intracelulares de cAMP y estimula la aromatasa y la síntesis de estrógenos. Recientemente se ha demostrado utilizando células tumorales mamarias, que expresan tanto receptores MT1 como aromatasa, que la melatonina a concentraciones fisiológicas reduce la actividad de la aromatasa tanto en condiciones basales como cuando la aromatasa está estimulada por cAMP o cortisol. Además, se ha demostrado a través de la reacción en cadena de la polimerasa-trasncriptasa, que la melatonina en las células tumorales mamarias regula negativamente la expresión de aromatasa a nivel transcripcional. [21].

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

Existen numerosos factores, tanto ambientales como géneticos, que modifican la susceptibilidad de la glándula mamaria a las neoplasias. Entre ellos, los más conocidos y estudiados son: la nuliparidad o el embarazo tardío, la menarquía temprana, la menopausia tardía, historia familiar de cáncer de mama u ovarios, etc. Todos ellos considerados factores de riesgo para desarrollar cáncer de mama.

Existe un periodo en el cual la glándula mamaria es más susceptible a padecer neoplasias, este periodo se establece entre la menarquía y el primer embarazo a término. Esto se debe a que en esos momentos en la glándula mamaria existen un elevado número de estructuras llamadas unidades lobulares ductales terminales (TDLU). Son las estructuras más indiferenciadas presentes en la glándula mamaria de las mujeres nulíparas, lugar donde se originan los tumores mamarios. El papel de la melatonina en este caso reside en su capacidad para modular el desarrollo de la glándula mamaria, concretamente disminuyendo el número de estas estructuras indiferenciadas y aumentando otras más diferenciadas.

Se ha estudiado en ratas y ratones que la melatonina a dosis farmacológicas suprime la morfogénesis mamaria. Las estructuras de las que hablábamos antes (TDLU) parecen ser equivalentes a los extremos terminales (TEB) en ratas. Los efectos de la melatonina consisten en reducir estos TEB a la quinta semana de vida, cuando se alcanza su valor máximo, y, por tanto, cuando la susceptibilidad a carcinógenos químicos es mayor. Parece que la melatonina puede desempeñar efectos protectores contra carcinógenos químicos al reducir los tejidos diana de estos agentes. [22]

Existen otros argumentos que apoyan el papel de la melatonina como preventivo en el desarrollo del cáncer de mama, como la relación entre la exposición a campos electromagnéticos y la incidencia de cáncer de mama. Hay estudios que han demostrado que la exposición a radiaciones electromagnéticas provoca una disminución de los niveles nocturnos de melatonina en plasma. A su vez, otros estudios han demostrado que la exposición en humanos a campos electromagnéticos de baja intensidad se relaciona con una mayor incidencia de cáncer de mama. Puesto que las radiaciones electromagnéticas no tienen efectos mutagenicos, la reducción de la síntesis de melatonina inducida por los campos electromagnéticos puede ser la causa del aumento del cáncer de mama en las poblaciones expuestas a estas radiaciones. [23] *(Fig. 6)*

Por otro lado, estudios realizados en tumores de animales sugieren que la administración de melatonina realizada por la tarde es más efectiva suprimiendo la génesis tumoral que la administrada por la mañana, de forma que los tumores tiene su propio ritmo circadiano de sensibilidad a la melatonina. Por lo tanto, parece que la administración de la melatonina durante la noche parece ser más beneficiosa que la administrada a lo largo del día. [25]

Además, cabe destacar que las mujeres que trabajan exclusivamente durante turnos largos de noche tienen incrementado significativamente el riesgo de cáncer de mama. [25]

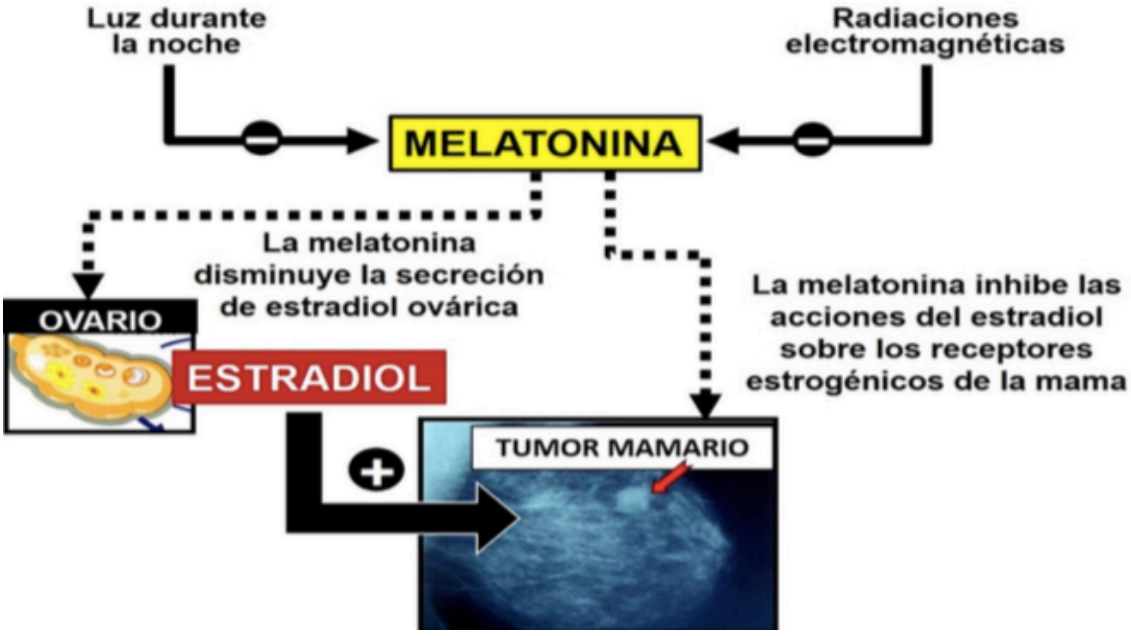

Figura 6. Influencia de la melatonina sobre la carcinogénesis mamaria.

3. Modulación de la expresión de diferentes genes en el cáncer de mama

A través de la activación de sus receptores MT1 en el cáncer de mama, la melatonina inhibe la expresión y/o fosfo-activación de numerosas kinasas, factores de transcripción y co-reguladores, 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* [25] evaluó los micro RNA (miRNA) y la expresión génica de las 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 en 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 de 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. Encontraron que numerosos genes eran metilados de manera aberrante y su expresión descendía en respuesta a la melatonina. La melatonina a dosis de 1 nM desmetila e incrementa la expresión el gen supresor de tumores y metástasis glypican-3 (GPC-3).

Para identificar genes candidatos que responden directa o indirectamente a la melatonina mediante la activación de sus receptores MT1, se examinaron los perfiles de expresión génica de células MCF-7 que fueron transitoriamente transfectadas con el receptor MT1 y tratadas con 1 nM de melatonina, empleando un microarray de cDNA limitado (8000-9000 genes). Cerca de 300 genes encontraron alterados sus niveles de expresión. De entre 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 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 1 insulin-like (IGF1R) y amfiregulínico (AREG), mientras que la nucleobindina 2 (NUCB2) fue regulada positivamente en respuesta a la activación del receptor MT1 por parte de la melatonina. [26]

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 que la calreticulina (CALR), una proteína de interacción con los receptores nucleares, fue regulada

positivamente. Los factores de transcripción endotelial PAS con dominio proteico 1 (EPAS1), el cual también se denomina factor inducible de hipoxia, 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. 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 [27], la supresión *in vivo* de la señal circadiana de la melatonina 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 y EFNA1 [26].

MECANISMOS DE LOS EFECTOS ANTITUMORALES DE LA MELATONINA EN EL CÁNCER DE MAMA

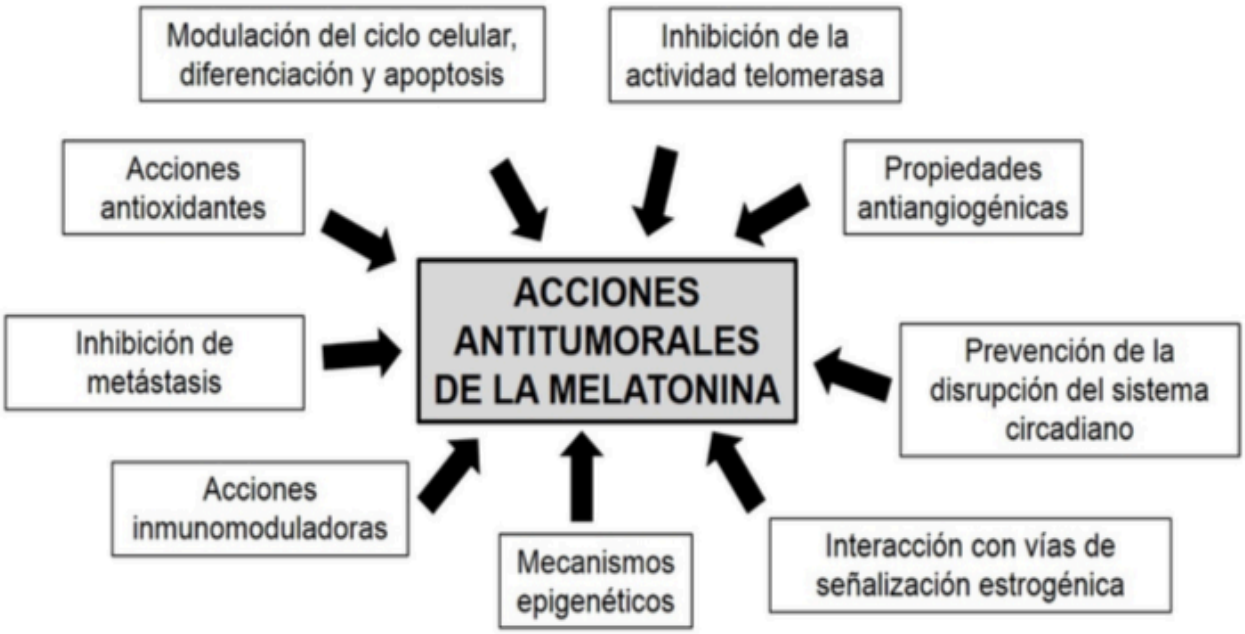

Figura 7. Principales mecanismos implicados en las propiedades antitumorales de la melatonina.

1. ACCIONES ANTIESTROGÉNICAS DE LA MELATONINA

a) Regulación de las concentraciones plasmáticas de estrógenos

La melatonina media el control fotoperiódico de los ritmos reproductores en los mamíferos con reproducción estacional. En estos animales, la melatonina controla la función reproductiva a través de la activación de sitios receptores dentro del eje hipotalámico-hipófisis-gónadas, lo que regula los niveles de actividad gonadal [29,30].

Basándose en estas acciones descritas de la melatonina sobre el eje hipotálamo-hipófisis-ovarios, en 1978, un grupo de investigadores del National Cancer Institute de Bethesda plantearon la hipótesis de que la disminución de la función pineal podía formar parte de los factores etiológicos del cáncer mamario. Basaban su hipótesis en numerosos datos indirectos, como la baja incidencia de cáncer mamario entre las pacientes psiquiátricas tratadas con fenotiazinas, que incrementan los niveles séricos de melatonina o la correlación positiva entre calcificaciones pineales (interpretadas como déficit funcional pineal) y cáncer mamario. Estos autores sugerían que un descenso en la función pineal, cualquiera que sea la causa, y la consiguiente reducción en la secreción de melatonina, podría inducir un estado de relativo hiperestrogenismo y la prolongada exposición de la mama a los estrógenos podría influir en el desarrollo

del tumor mamario [30].

Aunque en humanos el papel de la melatonina en el sistema reproductor no está completamente claro, se ha propuesto una relación inversa entre la melatonina y la actividad ovárica y un cierto papel de la melatonina en la modulación del eje reproductor neuroendocrino. Además, se han demostrado efectos moduladores directos de la melatonina sobre las células granulosas luteales humanas, así como la presencia de receptores melatoninérgicos funcionales en células de folículos antrales y cuerpos lúteos de ovarios de rata. Todos los datos mencionados sugieren que la melatonina regula la función ovárica regulando negativamente la producción de estrógenos [17,18].

La melatonina modula las concentraciones de FSH y LH actuando sobre el hipotálamo mediobasal, mientras que el control de la PRL depende de su acción sobre la *pars tuberalis*. La distribución de los receptores de melatonina en la *pars tuberalis*, en las diferentes áreas hipotalámicas 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 pituitaria. La regulación negativa de estas hormonas produce una menor síntesis de esteroides gonadales [31].

b) Regulación de la activación del receptor de estrógenos [32]

Los efectos oncostáticos de la melatonina son especialmente relevantes en los tumores hormono-dependientes, particularmente en aquellos que afectan a la glándula mamaria, los ovarios o la próstata. De todas estas neoplasias, la más estudiada ha sido el adenocarcinoma de mama**.** Las propiedades anti-estrogénicas de la melatonina son la base de sus acciones sobre el cáncer de mama hormono-dependiente, y las interacciones de esta indolamina en la vía de señalización estrogénica han sido extensamente estudiadas. Las primeras descripciones hablaban del posible papel de la glándula pineal en la etiología del cáncer de mama [30].

En la actualidad se conoce que la melatonina interacciona con el receptor de estrógenos (ER), comportándose como un modulador selectivo del receptor de estrógenos (SERM). Sin embargo, a diferencia de otros SERMs, como el tamoxifeno, la melatonina no se une a los receptores estrogénicos (ER) ni interfiere en la unión de los estrógenos (E_2) a sus receptores. Las propiedades anti-estrogénicas de la melatonina dependen de su capacidad para disminuir los niveles de expresión del ER_α e inhibir la unión del complejo E_2-ER al elemento de respuesta a estrógenos del DNA. Estos efectos son ejercidos a través de la unión de la melatonina a sus receptores de membrana específicos (MT1). En las células MCF-7 de cáncer de mama humano, la activación de los receptores MT1 mejora la respuesta de estas células a los efectos antiestrogénicos de la melatonina. Estos receptores de membranas están unidos a proteínas G e inhiben la actividad de la adenilato-ciclasa, disminuyendo así la actividad de la vía de señalización AMPc/PKA. Se sabe que los ER_α se activan a

concentraciones elevadas de AMPc. En las células MCF-7, los estrógenos inducen un aumento del AMPc a través de un mecanismo no transcripcional. Este aumento de AMPc mejora la transcripción mediada por receptores de estrógenos. La melatonina regula negativamente la expresión de proteínas dependientes de la actividad transcripcional del receptor de estrógenos alfa, incluyendo proteínas mitogénicas y antiapoptóticas Bcl-2. La melatonina a través de las vías asociadas a proteínas G, también modula la activación transnuclear de miembros de la familia retinoide/esteroide incluyendo los receptores de glucocorticoides o los repectores ácidos alfa retinoicos (RARalfa).

Existe otro posible mecanismo involucrado en las acciones antiestrogénicas de la melatonina. La asociación de la calmodulina con el complejo estrógeno-receptor facilita su unión al elemento de respuesta estrogénica, y, en consecuencia, la calmodulina actúa como un modulador de la actividad transcripcional del ER_{α}, aunque no del ER_{β}. La melatonina se une a la calmodulina y la inactiva, siendo esta otra vía a través de la cual la indolamina interactúa con las vías de señalización estrogénica. Es importante destacar que la calmodulina actúa sobre los ER_{α}, por lo tanto, al ser la melatonina un inhibidor de la calmodulina, solo tendrá la capacidad de inhibir la activación transcripcional de los receptores de estrógenos alfa, y no sobre los beta; de hecho, la sensibilidad de las células de cáncer de mama humanas MCF-7 a la melatonina depende de la proporción de receptores alfa y beta, siendo abolida cuando hay una sobreexpresión beta [33]

c) Modulación de los enzimas involucrados en la síntesis local de estrógenos [32]

No solo los ovarios tienen la capacidad de sintetizar estrógenos, también otros tejidos periféricos pueden hacerlo, como las células adiposas del tejido mesenquimal o de la piel, los osteoblastos, los condrocitos, el endotelio vascular, el músculo liso de la aorta y algunas áreas del cerebro entre otros. Esto es importante a la hora de diseñar fármacos anticancerígenos cuya diana son los estrógenos, especialmente en los cánceres de mama hormono-dependientes. Los fármacos que interaccionan con las enzimas encargadas de la síntesis y transformación de los estrógenos se denominan moduladores selectivos de enzimas estrogénicos (SEEMs), que junto con los SERM son las principales dianas terapéuticas en el tratamiento del cáncer de mama.

Los precursores más importantes en la síntesis local de estrógenos son la dehidroepiandrosterona (DHEA) y su sulfato. Las enzimas de la familia de las 17-beta-hidroxiesteroides deshidrogenasas (17β-HSD) catalizan la conversión de la estrona (E_1), relativamente débil, androstenediona y 5-androstenediona en estradiol (E_2), testosterona y dihidrotestosterona que son más potentes. A partir de las diferentes isoformas de 17β-HSD, algunas, como la 17β-HSD tipo 1 son esenciales para la biosíntesis gonadal y extragonadal de potentes estereoides biológicamente activos (E_2 y testosterona), mientras que las isoformas oxidativas (17β-HSD tipo 2) catalizan la formación de esteroides de baja actividad. La aromatasa, que transforma los andrógenos en estrógenos, la sulfatasa de estrógenos (STS), que convierte los sulfatos de estrógenos en E_1 y E_2, y las

sulfotransferasas (EST) de estrógenos que catalizan la conversión de estrógenos en sus sulfatos inactivos, completan la máquina enzimática básica para la biosíntesis local de estrógenos. En los adenocarcinomas de mama, la producción local de estrógenos está sesgada hacia la formación del E_2 activo porque la actividad de 17β-HSD tipo 1, STS y aromatasa es mayor que la de 17β-HSD tipo 2 y EST.

Estudios recientes llevados a cabo por el grupo de Sanchez-Barceló, demostraron que la melatonina, a concentraciones fisiológicas, inhibe la expresión y la actividad de la aromatasa P450, la estrógeno sulfatasa y la 17β-HSD tipo 1, tres de las enzimas involucradas en la síntesis y transformación biológica de estrógenos biológicamente activos. Por el contrario, la indolamina estimula la expresión y la actividad de la estrógeno sulfotransferasa, enzima responsable de la transformación del estradiol en sulfatos de estrógenos biológicamente inactivos [17,21]. Estos estudios demuestran las propiedades de la melatonina como SEEM.

Los efectos antiaromatasa de la melatonina en las células MCF-7 requieren la presencia de los receptores MT1. La melatonina potencia la acción de otros compuestos antiaromatasa como la aminoglutetimida. *In vivo*, en un modelo de animales ovariectomizados que portan tumores mamarios inducidos por DMBA dependientes de estrógenos y tratados con testosterona, la melatonina inhibe el crecimiento tumoral dependiente de la transformación local de testosterona en estrógenos por la acción de la aromatasa [34]. Este hecho demuestra la actividad anti-aromatasa de la melatonina *in vivo*.

En conclusión, hasta donde sabemos, la melatonina es la única molécula que comparte propiedades de SERM y SEEM. Este doble mecanismo de acción, y la inhibición preferencial de ERα, explica las propiedades oncostáticas de la melatonina en los tumores dependientes de estrógenos y confiere a la melatonina ventajas potenciales para el tratamiento de estas neoplasias.

2. MODULACIÓN DEL CICLO CELULAR: PROLIFERACIÓN, DIFERENCIACIÓN Y APOPTOSIS [32]

El crecimiento tumoral es el resultado del balance entre la proliferación y la muerte celular. En consecuencia, la modulación del ciclo celular y la inducción de la apoptosis son dos objetos en el control del desarrollo tumoral.

a) Proliferación

La melatonina incrementa la duración del ciclo celular en diferentes células tumorales humanas como las células MCF-7 del cáncer de mama, células mieloides HL-60, y células del hepatocarcinoma HepG2. En todas ellas su mecanismo de acción consiste en aumentar la duración de la fase G_1 y retrasar la entrada de las células en fase S. También actúa deteniendo a las células en fase G_2/M. La melatonina aumenta la proporción de células en fase G_0-G_1 y disminuye la fracción de células en fase S. La prolongación de la fase G_1 reduce la proliferación celular y permite que el rescate de células en la fase G_0 conduzca a la diferenciación; además una fase G_1 alargada permite la reparación del daño

producido en el DNA. Esta fase G_1 extendida podría explicarse, al menos en parte, por la regulación positiva de melatonina sobre la expresión de p53 y p21 descrita en múltiples líneas celulares.

El retraso de la entrada de la célula en la fase S puede explicar la disminución en la síntesis de ADN descrita en las células MCF-7 tratadas con melatonina. Estos hallazgos establecen, por primera vez, un vínculo molecular entre la melatonina y sus efectos sobre el ciclo celular, proporcionando al mismo tiempo un fundamento para su uso en la quimioterapia adyuvante.

b) Diferenciación

Se conocen bien las relaciones entre la progresión tumoral y la diferenciación celular. Los tumores bien diferenciados son generalmente menos agresivos y suelen tener mejor pronóstico que los poco diferenciados, siendo estos más agresivos y con un pronóstico peor. Los numerosos mecanismos que regulan la diferenciación celular durante el desarrollo normal también están involucrados en la carcinogénesis.

La melatonina induce la diferenciación celular en diferentes tipos de células, tanto normales como tumorales, incluyendo células de neuroblastoma, células MCF-7, células de cáncer de próstata, células madre mesenquimales humanas y células madre neurales. El aumento de la duración del ciclo celular, por expansión de la fase G_0-G_1, y el retraso en la entrada en fase S, es una de las maneras a través de la que la melatonina permite adquirir una diferenciación mayor a la célula tumoral. Estos efectos citodiferenciadores de la melatonina han sido considerados como la posible explicación a la mayor supervivencia y la calidad de vida de pacientes afectados por glioblastomas y tratados con radioterapia.

c) Apoptosis

Existen numerosas condiciones que provocan la entrada de las células en fase G_0 y por tanto su diferenciación, mientras que otras favorecen la apoptosis, como la existencia de gran cantidad de DNA dañado. El proceso de apoptosis depende de la activación de las caspasas (proteasas citosólicas), que escinden múltiples sustratos de proteínas, dando como resultado la pérdida tanto funcional como estructural de la célula y por lo tanto su muerte. Existen dos vías apoptóticas; la vía extrínseca, que se activa por la unión de un ligando de muerte extracelular, como el FasL y la vía intrínseca, mediada por la liberación desde el espacio intermembrana de las mitocondrias al citoplasma de varias proteínas incluyendo el citocromo C que media la activación de caspasa-9, desencadenando una cascada de activaciones de caspasa que promueven la apoptosis celular.

La melatonina, que ha demostrado proteger a las células normales de la apoptosis, induce la apoptosis en varios tipos celulares de cáncer incluyendo células mieloides humanas HL-60, células de linfoma B, células MCF-7 del cáncer mama, entre otras. El mecanismo pro-apoptótico de la melatonina en las

células tumorales es conocido parcialmente. El gen de supresión tumoral, p53, es conocido por ser responsable del crecimiento celular y/o la apoptosis. La melatonina aumenta cuando se expresa el p53 y el p21 en células MCF-7, células del hepatocarcinoma H22 en ratones y hepG2 en humanos.

Estudios recientes sugieren que la melatonina desencadena dos procesos apoptóticos distintos en células MCF-7: uno es una apoptosis independiente de caspasas temprano, asociado con un aumento en la relación p53 / MDM2, un aumento en la liberación de factor inducido por apoptosis y ninguna modificación en la actividad de caspasa; el segundo es un proceso apoptótico tardío, dependiente de TGFβ1, en el que participan las caspasas 7 y 9 activadas y PARP.

En ocasiones la melatonina interacciona haciendo sinergia con otros fármacos antitumorales para inducir la apoptosis. Esto sucede en las células SK-N-MC, un tipo celular del sarcoma de Ewing. Cuando la melatonina se combina con vincristina o ifosfamida existe un aumento significativo de la activación de las caspasas 3, 8, 9 y Bid, en comparación con los tratamientos individuales. Por lo tanto, existe en este caso una potenciación de la apoptosis, principalmente a través de la vía extrínseca.

3. INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA TELOMERASA

La telomerasa es la enzima principal que actúa sobre la elongación telomérica y su actividad está aumentada en la gran mayoría de los cánceres. Desde que se conoce esto, es considerada una diana terapéutica potencial en el tratamiento del cáncer. La telomerasa en la carcinogénesis ofrece a las células la capacidad de dividirse de forma ilimitada. Su actividad está aumentada en el 85-90% de los cánceres mientras que se encuentra prácticamente abolida en los tejidos diferenciados. La expresión de hTERT, subunidad de la telomerasa y su mayor determinante de actividad, se correlaciona íntimamente con la actividad de la misma y nos indica su activación. [35]

Los estrógenos son uno de los principales activadores de la telomerasa en el cáncer de mama. El complejo E-ER mejora la expresión de hTERT, lo que explica la capacidad de los estrógenos para activar la telomerasa y por qué el estradiol regula positivamente la expresión de hTERT y la actividad de la telomerasa en las células MCF-7 con receptores de estrógenos positivos (ERα) y no en las células que carecen de estos receptores. Debido a las acciones antiestrogénicas de la melatonina existe la hipótesis de que esta pueda actuar también como agente anti-telomerasa. Un estudio *in vivo* realizado por Leon-Blanco et al. ha revelado que la melatonina tiene la capacidad de reducir tanto la actividad de la telomerasa como la expresión de mRNA hTERT. En células cancerígenas MCF-7 la expresión del mRA hTERT es inhibida por la melatonina de manera dosis dependiente [35].

La conclusión de estos hallazgos es que la capacidad anti-telomerasa de la melatonina viene determinada en su gran mayoría por su acción antiestrogénica.

4. EFECTOS ANTIOXIDANTES

El estrés oxidativo, definido como la perturbación del equilibrio entre la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y su inactivación por los sistemas antioxidantes, es la causa etiológica de muchas enfermedades, entre las que se encuentran las neoplasias. El daño oxidativo del DNA constituye la base fundamental del efecto carcinogénico de las ROS. El estrés oxidativo participa en los 3 pasos de la carcinogénesis (iniciación, progresión y metástasis), y los antioxidantes protegen frente al cáncer en los tres estadios del desarrollo.

La melatonina y sus metabolitos tienen la capacidad tanto de barrer los radicales como de estimular la expresión de enzimas antioxidantes y reducir la expresión de las pro-oxidantes. La melatonina ejerce efectos directos antioxidantes directos, entre los que se encuentran desintoxicar el radical hidroxilo, el radical anión superóxido, el peróxido de hidrógeno, el anión peroxinitrito y el óxido nítrico. Sus efectos indirectos dependen de su capacidad para inducir la expresión de las glutatión peroxidasa y reductasa, la superóxido dismutasa y catalasa, cuatro enzimas antioxidantes importantes, además de reducir la actividad de enzimas oxidativas como la óxido nítrico sintetasa.

En los cánceres hormono-dependientes la melatonina también ejerce un papel importante por sus acciones antioxidantes. El 17β-estradiol (E_2) es una hormona natural considerada carcinógena por la asociación internacional de investigación de cáncer. Los efectos carcinógenos del E_2 dependen en parte de su efecto estimulador de la replicación celular en los diferentes tejidos, entre los que se incluyen la mama y el endometrio. El aumento en la replicación del DNA provoca que haya mayor riesgo de mutaciones. Otros efectos carcinógenos de los esteroides están relacionados con el estrés oxidativo dependiente de algunos de sus metabolitos. Los estrógenos son metabolizados en el citocromo P450 por enzimas que tras hidrolizarlos los convierten en productos como 2 y 4-hidroxiestradiol. Estos son a su vez oxidados a semiquinonas que, en presencia de moléculas de oxígeno, se oxidan a quinonas formando radicales de anión superóxido y radical hidroxilo (OH), que son los responsables del poder carcinogénico de los esteroides [36].

Se ha demostrado en hígados de hámster a los que se les ha inducido carcinogénesis por E_2 que la melatonina previene el aumento de la oxidación de bases de guanina producido por los E_2 y previniendo en consecuencia el daño en el DNA y la supresión potencial del cáncer estrógeno-mediado [37,38].

Otro aspecto importante sobre los efectos antioxidantes de la melatonina está relacionado con la esfera de la terapia contra el cáncer, en concreto el uso de esta indolamina como adyuvante en la quimioterapia y la radioterapia. Muchos fármacos utilizados en la quimioterapia son capaces de matar las células tumorales, y esto induce la formación de ROS y radicales libres, que en muchos casos, son los responsables de los efectos secundarios de estas terapias. Esto justifica la utilización de antioxidantes (como puede ser la melatonina), como suplementación a la quimioterapia y la radioterapia, para así reducir su toxicidad [39].

5. ANTIANGIOGÉNESIS

La angiogénesis, que se define como el proceso de formación de nuevos vasos, juega un papel fundamental en gran variedad de procesos tanto fisiológicos como patológicos, siendo algunos ejemplos el desarrollo embrionario, la cicatrización de heridas o el crecimiento tumoral. Para crecer y metastatizar, los tumores necesitan aporte constante de nutrientes y oxígeno, lo que depende a su vez del desarrollo de nuevos vasos. Por consiguiente, la inhibición de la angiogénesis es otra estrategia a tener en cuenta en el tratamiento del cáncer y actualmente se está estudiando ampliamente.

La angiogénesis inducida por tumores es un proceso complejo mediado y controlado por factores de crecimiento, receptores celulares y moléculas de adhesión. El desencadenante de la misma es la hipoxia, que induce la expresión del factor inducible por hipoxia (HIF), que se une al elemento de respuesta hipóxica y conduce la expresión de genes inducibles por hipoxia, entre los que se incluyen el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), la anhidrasa carbónica IX (CAIX), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y el factor de crecimiento transformante alfa (TGFα). El VEGF es una molécula endógena pro-angiogénica importante, que induce la angiogénesis actuando directamente sobre el endotelio *in vivo*, aumentando la permeablidad microvascular. Los pacientes con tumores suelen tener niveles anormalmente elevados de VEGF que se correlacionan con la tasa de crecimiento tumoral, las metástasis tempranas y en consecuencia con peores pronósticos.

La primera descripción de las propiedades antiangiogénicas de la melatonina viene de un estudio clínico, en el que se demostró un descenso en los niveles séricos de VEGF en pacientes con cáncer tratados con esta indolamina [38] Más tarde fue demostrado que la melatonina ejerce efectos antiangiogénicos directos inhibiendo la VEGF. La melatonina también ejerce acciones indirectas antiangiogénicas a través de dos mecanismos diferentes:

a. inhibiendo otros factores de crecimiento tumoral, como IGF, EGF y ET-1, que son potentes mitógenos y estimulan la angiogénesis tumoral.

b. neutralizando ROS que, durante la hipoxia, juegan un papel importante estabilizando al factor inducible de hipoxia HIF-1alfa.

La influencia de la melatonina en la angiogénesis también ha sido estudiada sobre el endotelio de venas umbilicales humanas. La melatonina a altas concentraciones (>10nmol/L) reduce marcadamente la proliferación del endotelio venoso umbilical, induce la apoptosis celular y modula la duración del ciclo celular a través de la expresión de p53 y Bax/Bcl-2. En 3 líneas celulares cancerígenas diferentes (PANC-1, HeLa y A549), concentraciones farmacológicas de melatonina suprimen el mRNA VEGF y los niveles de proteínas inducidas por hipoxia; también disminuye la proteína HIF-1alfa, lo que sugiere un papel para el factor de transcripción HIF-1 alfa en la supresión de la expresión de VEGF.

Un estudio más reciente llevado a cabo en diferentes líneas celulares de cáncer de próstata confirma que dosis farmacológicas de melatonina inhiben la expresión de la proteína HIF-1alfa tanto en condiciones de hipoxia como de normoxia [41].

Todos estos datos encontrados tras investigar exhaustivamente las propiedades antiangiogénicas de la melatonina son de especial interés para la futura aplicación en terapias oncológicas.

6. PREVENCIÓN DE LA DISRUPCIÓN DE LOS RITMOS CIRCADIANOS

La asociación internacional de investigación del cáncer reconoce que los cambios laborales que provocan disrupción circadiana son probable causa de cáncer en humanos. Concretamente se considera como potencial carcinogénico los trabajos que tienen turnos de noche.

La cronodisrupción se define como una pérdida crítica del orden del tiempo en los diferentes niveles del organismo, incluyendo la expresión de genes en cada una de las células del cuerpo. Por lo tanto, los cronodisruptores son aquellos agentes causales, tanto exógenos como endógenos, que alteran la organización temporal de las funciones fisiológicas. El sistema de ritmos circadianos está compuesto por el núcleo supraquiasmático del hipotálamo que es considerado el reloj interno. Este recibe las vías aferentes que traen señales que provienen del entorno y permiten la sincronización (fundamentalmente señales de luz-oscuridad). Las vías eferentes, que son numerosas, se encargan de conducir y controlar los ritmos circadianos de múltiples tejidos a través de señales neurales y hormonales. El reloj circadiano controla el ciclo de división celular en los tejidos mamarios sanos y enfermos y regula la proliferación celular a través del control negativo de la actividad transcripcional del p53, c-myc y Weel.

Es desconocido qué componentes del sistema circadiano son esenciales en el control del desarrollo y del crecimiento tumoral. La expresión de genes como las ciclinas, c-myc y weel están bajo control circadiano de un complejo transcripcional que regula la transcripción de genes reloj como son PER1, PER2 CRY1 y CRY2. Dos de estos reguladores del ritmo circadiano, PER1 y PER2, han sido relacionados con vías de reparación de daño en el DNA. La sobreexpresión tanto de PER1 como de PER2 en células cancerígenas inhibe su crecimiento neoplásico y aumenta su tasa de apoptosis; la pérdida de expresión de estos genes ha sido encontrada en múltiples tipos de cánceres humanos [42].

La acción directa de la melatonina sobre la expresión de genes reloj en el núcleo supraquiasmático está todavía bajo consideración. En la *pars tuberalis* de las ovejas, el tratamiento con melatonina aumenta la expresión de algunos de estos genes reloj y en las neuronas primarias del estriado de ratones aumenta la expresión de Mper1, Mclock y mBmall [43]. Recientemente, Jung-Hynes *et al*. han demostrado en diferentes líneas celulares del cáncer de próstata que la melatonina regula positivamente la expresión de PER2 y clock, mientras que regula negativamente la proteína Bmall. En pacientes con tumores pituitarios

también se han descrito alteraciones en el patrón circadiano de la secreción de melatonina.

Todos estos datos contribuyen a comprender mejor como la cronodisrupción influye en el crecimiento tumoral. Como la luz es el principal sincronizador, cambios en la exposición a la luz son las causas más frecuentes de esta cronodisrupción. Multitud de estudios han demostrado que la exposición a la luz durante la noche intensifica el crecimiento de tumores mamarios, así como la relación entre la secreción de melatonina inducida por la exposición a la luz durante la noche y el crecimiento tumoral. En consecuencia, cuando las ratas con células de hepatoma de Morris se expusieron a ciclos de luz-oscuridad 12:12, pero el periodo de oscuridad fue contaminado con luz para reducir los niveles de melatonina nocturna, el crecimiento tumoral se aceleró y se relacionó positivamente con la intensidad de la luz nocturna [44].

En experimentos similares, la exposición de ratas hembra, con adenocarcinomas de mama DMBA inducidos químicamente, a la luz aumentó significativamente las tasas de crecimiento tumoral y disminuyó la supervivencia en comparación con los animales control en condiciones normales de iluminación [43]. Las ratas expuestas a luz nocturna no mostraron diferencias en los niveles de 6-sulfatoximelatonina, el principal producto metabólico de la melatonina, lo que indica una supresión nocturna de los niveles de melatonina.

Un estudio interesante realizado por el grupo de Blask demostró que la perfusión de xenoinjertos de cáncer de mama humano que crecen en ratas con sangre nocturna (que contiene niveles elevados de melatonina producidos endógenamente) de mujeres pre-menopáusicas inhibió el metabolismo celular normalmente asociado con el crecimiento tumoral. Sin embargo, la perfusión de los xenoinjertos con sangre de las mismas mujeres después de la exposición a luz durante la noche (que contiene niveles reducidos de melatonina) carecía de los efectos inhibitorios en el crecimiento tumoral. Estos datos apoyan la hipótesis de que las concentraciones fisiológicas de melatonina durante la noche pueden ser suficientes para ejercer cierto nivel de inhibición del crecimiento tumoral y que la exposición a luz durante la noche induce la cronodisrupción, con el consiguiente descenso o supresión de la producción de melatonina y sus acciones oncostáticas, lo que podría ayudar a las células tumorales a tener una tasa de crecimiento mayor. Por lo tanto, la melatonina puede ser un nexo de unión entre la disrupción circadiana y el desarrollo de cáncer.

7. INHIBICIÓN DE LAS METÁSTASIS

La melatonina (1 nM), *in vitro*, reduce la invasividad de las células MCF-7 del cáncer de mama y bloquea los efectos estimuladores del 17β-estradiol sobre las células invasivas. Este efecto coincide con un aumento de la expresión de moléculas de adhesión de la superficie celular como la E-cadherina y la β1-integrina, lo que podría explicar los efectos antimetastásicos de la melatonina [46].

Recientemente, el grupo de Hill, usando el mismo método, reevaluó los efectos anti-metastásicos de la melatonina usando 3 clones de células MCF-7 con un potencial de metástasis significativamente mayor. El tratamiento de estas células invasoras con melatonina (1-10 nM) dio como resultado una marcada supresión de su invasividad. Esta respuesta antiinvasora a la melatonina se ve aumentada por la sobreexpresión del receptor MT1, e inhibida por la administración de luzindol (un antagonista de los receptores MT1 y MT2), demostrando en consecuencia que los efectos antimetastásicos de la melatonina dependen de la unión de la indolamina a sus receptores de membrana específicos [47].

Estos hallazgos son similares a los que demostraron el grupo de Benitez-King, que describieron que la melatonina incrementa el desarrollo de fibras de estrés (microfilamentos) y de las placas de adhesión local de las células MCF-7. Ambas modificaciones favorecen la adhesión celular al substrato y hace que las células estén más latentes (hace que sea menos probable su metástasis). La acción de la melatonina en el desarrollo de las fibras de estrés y placas de adhesión ricas en vinculina requiere una interacción de la indolamina con el receptor de membrana MT1 y la activación de la proteína quinasa C alfa.

8. EFECTOS INMUNOESTIMULANTES [32]

Una estrategia alternativa atractiva en la terapia del cáncer es activar el sistema inmunitario para así inducir una potente respuesta antitumoral. El sistema inmunitario está compuesto por células innatas que se encargan de mediar una respuesta rápida (monocitos, macrófagos, células killer…) y las células de respuesta del sistema inmune adaptativo, que se encargan de las respuestas de memoria y duraderas (células T y B). La melatonina no se sintetiza exclusivamente en la glándula pineal, también lo hace en otros órganos y tejidos, concretamente en órganos linfoides como la médula ósea, el timo y los linfocitos, todos ellos involucrados en la respuesta inmunitaria tanto humoral como celular. Es por esto que la pinealectomía o cualquier otro proceso que inhiba la síntesis y secreción de melatonina, va a deprimir tanto la inmunidad celular como la humoral. Por el contrario, la administración de melatonina estimula la producción de células natural killer, monocitos y leucocitos, así como citoquinas incluyendo interleucinas (IL-2, IL-6, IL-12) e interferón gamma y TNF-alfa, a través de su unión a los receptores específicos de membrana y a los receptores nucleares presentes en estas células. Como consecuencia de todo lo explicado anteriormente, la melatonina es considerada un agente inmunoestimulante, aunque es cierto que, en algunos modelos experimentales, como en ratones trasgénicos que sobreexpresan el protooncogén N-ras, la melatonina induce atrofia severa del tejido linfoide mamario [48].

No existen estudios experimentales centrados específicamente en el potencial oncostático de la melatonina basándose en sus propiedades inmunoestimulantes. Sin embargo, las evidencias descritas anteriormente son suficientes para justificar la capacidad de la melatonina para activar las células Th1 y/o las células natural killers. Estas cualidades son interesantes a la hora de estudiar la posible eficacia de la melatonina en las vacunas frente al cáncer.

9. FACTORES EPIGENÉTICOS [32]

La regulación epigenética de la expresión génica implica básicamente dos clases de mecanismos moleculares: modificaciones de histonas y metilación del DNA. Aunque existen datos indirectos que sugieren la participación de mecanismos epigenéticos en las propiedades oncostáticas de la melatonina, todavía no se dispone de pruebas concretas de las acciones directas de la melatonina sobre la metilación del DNA o la desacetilación de histonas.

Entre las posibilidades interesantes se encuentra la descripción de la inhibición de la histona p300 acetiltransferasa en macrófagos por la melatonina, que inhibe la acetilación de p52 y la unión al DNA, silenciando los genes Inos y COX-2. La evidencia adicional en línea con las acciones epigenéticas potenciales de la melatonina es que el tratamiento de las células madre neurales C17.2 con la indolamina durante 24 h causó un aumento significativo en la acetilación de la histona H3, que se asocia con la remodelación de la cromatina y la transcripción génica. Los resultados de estos dos estudios sugieren papeles nuevos para la melatonina en la modulación epigenética de la transcripción de genes, aunque es necesaria más información para que esta hipótesis sea sólida.

10. TRANSPORTE Y METABOLISMO DE ÁCIDOS GRASOS [49]

Diferentes tipos de líneas celulares tumorales han sido sometidos a experimentos *in vitro*, los cuales tenían en común un crecimiento dependiente del ácido linoleico, que además de actuar como fuente común de energía para el crecimiento tumoral, actúa como una molécula de señalización. Este ácido graso poliinsaturado es un ácido esencial en la dieta y el más consumido por la población. Se ha visto que, un incremento del ácido linoleico en sangre produce un aumento de la tasa de crecimiento celular. El ácido linoleico es oxidado a 13-hidroxioctadecanoico (13-HODE) por la enzima 15-lipooxigenasa que está regulada por los receptores tirosin quinasa EGFR (epidermal growth factor receptor). El 13-HODE activa la señalización mitogénica vía EGFR/MAPK, al incrementar la fosforilación del EGFR inducida por el EGF (*epidermal growth factor*) y aumentar la actividad de las proteínas quinasas (vía MAPK).

Varios estudios han demostrado la asociación entre la administración exógena de melatonina y la pérdida de peso, sobre todo en mujeres obesas y también sobre la influencia de la melatonina en el apetito. Por otro lado, también se ha demostrado la asociación entre padecer síndrome metabólico y el trabajar en horario nocturno. Todos estos datos, indirectamente, indican la existencia de una relación entre la melatonina y el metabolismo de los ácidos grasos.

El efecto directo de la melatonina sobre el metabolismo de los ácidos grasos se basa en la disminución de la producción de AMPc, y la inhibición de la captación de ácidos grasos por los transportadores de las células. Se produce una disminución de la fuente de energía para el crecimiento de la célula, lo que podría considerarse como un mecanismo antiproliferativo de la melatonina.

Sin embargo, parece ser que este mecanismo de inhibición del crecimiento tumoral no es continuo, sino que sigue un ritmo circadiano. Numerosos estudios muestran que la melatonina administrada durante la tarde en animales con cáncer resulta más eficaz en suprimir el crecimiento tumoral, en comparación con la melatonina administrada por la mañana. Por esta razón, se ha sugerido que los tumores que muestran una sensibilidad diferente a lo largo del día a la melatonina exógena, pueden estar regulados por la propia melatonina endógena. Por la mañana, el número de receptores de melatonina es menor que los receptores que se expresan por la noche. Esta es una de las razones que podría explicar la mayor eficacia de la melatonina sobre el crecimiento tumoral y sobre la inhibición del metabolismo tumoral de ácidos grasos por la noche, ya que la densidad de receptores es mayor durante ese periodo. Sin embargo, ante la exposición continua de luz, no se produce el pico de melatonina endógena, no se sigue un patrón circadiano de la secreción y los receptores se encuentran en cantidades altas, por lo que la melatonina administrada de manera exógena debería ser eficaz independientemente del momento del día.

Los estudios realizados por Blask y su grupo, llegaron a la conclusión de que el mecanismo principal por el cual se inhibía el crecimiento tumoral dependiendo del patrón circadiano de la melatonina, era la supresión del EGFR y la actividad MAPK, y por lo tanto la inhibición de los efectos mitogénicos que afectan a la proliferación y a la diferenciación celular. La melatonina, a través de su receptor de membrana, bloquea la captación de ácido linoleico por las células tumorales y su conversión a 13-HODE impidiendo la activación de EGFR/MAPK.

LA MELATONINA COMO REGULADOR DE LA RESISTENCIA A LA TERAPIA ENDOCRINA Y A LA QUIMIOTERAPIA

Aunque la terapia endocrina y la radiación son la piedra angular en el tratamiento del cáncer de mama, todavía algunos pacientes no responden al tratamiento debido a la falta de expresión de ERα y la activación de señalización del receptor tirosina quinasa. Además, los efectos citotóxicos de la quimioterapia convencional, como la trombocitopenia inducida por quimioterápicos o la cardiotoxicidad dependiente de la adriamicina son considerados como impedimentos principales para el tratamiento exitoso y restringen la aplicación de estos fármacos para los pacientes. [50]

Varios estudios han sugerido que las terapias combinadas, como la melatonina y los agentes quimioterapéuticos, pueden aumentar el éxito del tratamiento, aumentando la eficacia y disminuyendo los efectos secundarios. Los agentes quimioterapéuticos inducen daño en el ADN, mientras que la melatonina bloquea vías específicas, tales como la ruta de la proteína quinasa activada por mitógenos, aumentando la letalidad de los tratamientos de quimioterapia. Por lo tanto, una combinación podría reducir efectivamente el umbral para los agentes quimioterapéuticos, proteger a los tejidos normales de la sensibilidad a la citotoxicidad de estas terapias, y reducir los efectos secundarios a través de sus propiedades antioxidantes y de eliminación de radicales libres.

En la mayoría de los ensayos combinados en los que se usó melatonina junto con fármacos terapéuticos, se descubrió que la presencia de melatonina prolonga el tiempo libre de progresión de la enfermedad y la supervivencia general, así como también mejora el sufrimiento del paciente. Por ejemplo, en un estudio el grupo de *Lissoni et al.* evaluó los efectos de la administración concomitante de melatonina sobre la toxicidad y la eficacia de varias combinaciones de quimioterapia en pacientes con cáncer avanzado con un estado clínico deficiente. El estudio incluyó 250 pacientes con tumores sólidos metastásicos que fueron aleatorizados para recibir melatonina más un amplio régimen de quimioterapia o quimioterapia sola. En este estudio, la tasa de supervivencia a un año y la tasa de regresión objetiva del tumor fueron significativamente más altas en los pacientes tratados concomitantemente con melatonina que en aquellos que recibieron solo quimioterapia. Además, se descubrió que la administración concomitante de melatonina reduce significativamente la frecuencia de trombocitopenia, neurotoxicidad, cardiotoxicidad, estomatitis y astenia. Este estudio sugirió que la melatonina puede mejorar la eficacia de la quimioterapia y reducir su toxicidad, al menos en pacientes con cáncer avanzado y con un estado clínico deficiente. Como se mencionó anteriormente, las capacidades positivas de prevenir el cáncer de la melatonina son las más fuertes cuando se toman de noche. Por lo tanto, puede ser beneficioso que los fármacos quimioterapéuticos se administren por la noche junto con la melatonina, lo que maximiza el efecto de ambos tipos de fármacos. [25]

ENSAYOS CLÍNICOS EN PACIENTES [25]

Se han realizado varios estudios clínicos para investigar los efectos de la melatonina contra ciertos tipos de cáncer, incluidos cánceres de mama, tumores no microcíticos de pulmón, cutáneos, renales y sólidos con metástasis cerebrales.

Muchos estudios sobre los efectos antiproliferativos de la melatonina se han centrado en el cáncer de mama, posiblemente porque se ha demostrado que la melatonina modula la actividad de varios aspectos de la fisiología endocrina [51]. Los estudios han demostrado que las pacientes con cáncer de mama tienen una disminución en el nivel sanguíneo de melatonina circulante. A partir de esto, se derivó la "hipótesis de la melatonina" que plantea que la disminución de la melatonina conduce a un aumento en los niveles de estrógenos y un aumento en el recambio de las células madre epiteliales de la mama, lo que aumenta el riesgo de transformación maligna. Se ha realizado un trabajo extenso en modelos de melatonina y cáncer de mama y se han sugerido varios mecanismos potenciales. Estos incluyen, pero no se limitan a lo siguiente:

a. La melatonina puede regular negativamente las hormonas del eje reproductivo neuroendocrino, lo que lleva a una disminución de los esteroides gonadales circulantes.
b. Puede actuar como un antiestrógeno al contrarrestar los efectos de los estrógenos en sus objetivos.
c. La melatonina puede regular negativamente la expresión del receptor de estrógeno alfa, inhibiendo así la unión del compendio de estradiol-ER al elemento de respuesta de estrógeno. [52]

Estas acciones pueden ser la causa de la respuesta proliferativa negativa de la melatonina hacia las células de cáncer de mama. Varios ensayos clínicos han sugerido el potencial de la melatonina en el tratamiento del cáncer de mama. En un estudio, 14 pacientes con cáncer de mama metastásico que no respondían al tamoxifeno recibieron 20 mg de melatonina diariamente por la noche junto con tamoxifeno. Se logró una respuesta en el 28% de los pacientes [53]. También se ha demostrado que la melatonina aumenta la sensibilidad citostática del tamoxifeno a través de un mecanismo desconocido. Los estudios también han encontrado una correlación entre una disminución en la melatonina nocturna y un aumento en el tamaño del tumor en individuos con cáncer de mama primario.

Algunos estudios investigaron el efecto de la melatonina en el cáncer de pulmón no microcítico (CPNM), que a menudo no responde bien a la terapia convencional. En un ensayo clínico, 63 pacientes con CPNM con enfermedad metastásica que no respondieron al tratamiento inicial con cisplatino se les administro aleatoriamente 10 mg de melatonina al día a las 7 p.m. o solo cuidados de apoyo. Los datos de este estudio mostraron que el tiempo medio de supervivencia fue significativamente mayor para los pacientes tratados con melatonina que para los que recibieron solo cuidados de apoyo. Un segundo ensayo con 60 pacientes se llevó a cabo para evaluar la eficacia de la inmunoterapia con dosis bajas de interleucina 2 (IL-2) más melatonina versus quimioterapia en CPNM avanzado. Este estudio incluyó a 60 pacientes con

CPNM localmente avanzado o metastásico que fueron aleatorizados para recibir inmunoterapia (IL-2 + melatonina) o quimioterapia (cisplatino y etopósido). Los datos de este estudio mostraron que la inmunoterapia con dosis bajas de IL-2 más melatonina fue mejor tolerada y más efectiva en términos de supervivencia que la quimioterapia que contiene cisplatino en pacientes con CPNM. [54]

Se ha demostrado que la melatonina desempeña un papel crítico en una variedad de funciones normales de la piel, como el ciclo de crecimiento del cabello, la pigmentación de los pelajes y el control del melanoma. Los receptores de melatonina se expresan en varias células de la piel, incluidos los queratinocitos normales y malignos, los melanocitos y los fibroblastos. Se ha demostrado que la melatonina protege las células de la piel del daño mediado por la radiación UV a través de su propiedad antioxidante. Se ha propuesto que la melatonina (sintetizada localmente o administrada tópicamente) podría contrarrestar o amortiguar tensiones externas (ambientales) o internas para preservar la integridad biológica de la piel y mantener su homeostasis. En un estudio realizado, se aplicaron tópicamente diferentes dosis de melatonina como monoterapia en 40 pacientes con melanoma maligno metastásico durante 5 semanas. Se logró una respuesta parcial en seis pacientes; la enfermedad se estabilizó en seis pacientes más y se logró una tasa de respuesta global del 30%. Con base en los datos, los autores sugirieron que se necesitan más estudios de melatonina para el melanoma. [55,56]

Bangha et al realizaron un estudio aleatorizado doble ciego con 20 voluntarios para evaluar la eficacia de la melatonina aplicada tópicamente en la supresión del eritema inducido por UV. No se encontraron dosis de melatonina (0,05%, 0,1% y 0,5%) que tuvieran efectos adversos sobre la piel sana y se produjo una disminución dependiente de la dosis en el enrojecimiento de la piel y el eritema inducido por UV observado. [57]

Neri et al llevaron a cabo un ensayo documentado en 22 pacientes con carcinoma progresivo de células renales. En este estudio, los autores evaluaron el efecto de un régimen a largo plazo (12 meses) con IFN linfoblastoideo humano y melatonina en el carcinoma de células renales. Hubo un total de siete (33%) remisiones; cuatro completas (que involucran pulmones y tejidos blandos) y cuatro parciales, con una media de duración de 16 meses. Nueve pacientes lograron una enfermedad estable y 5 progresaron. La tasa de respuesta observada en este estudio definitivamente garantiza estudios adicionales para determinar la utilidad de la administración concomitante de melatonina en la respuesta clínica a INF en el carcinoma de células renales metastásico [58].

Otro tipo de cáncer para el que se ha investigado el efecto de la melatonina son los tumores sólidos avanzados con metástasis cerebrales. En un ensayo, 50 pacientes con metástasis cerebrales cuyas enfermedades habían progresado con un tratamiento inicial más amplio fueron aleatorizados para recibir atención de apoyo o atención de apoyo y melatonina. 9 de los 24 pacientes que recibieron melatonina sobrevivieron 1 año en comparación con 3 de 26 que no recibieron melatonina [59].

En otro ensayo, 30 pacientes con tumores sólidos metastásicos intratables fueron tratados diariamente con 20 mg de melatonina oral junto con dosis bajas de las citocinas antitumorales, IL-2 e IL-12. Se encontró que la proliferación de linfocitos y la inmunidad contra el cáncer de las citocinas aumentaban significativamente con el tratamiento con melatonina. Ambos estudios muestran el potencial de la melatonina en la administración de tumores sólidos avanzados con metástasis cerebrales. [60]

CONCLUSIONES

La melatonina, hormona secretada por la glándula pineal, es una hormona de la que se han descrito diferentes acciones en diversos contextos biológicos. Aunque su función principal, en el hombre, es la sincronización de los ritmos circadianos con los fenómenos ambientales, fundamentalmente con la luz, existen también numerosos estudios en los que se han descrito acciones de la melatonina en el desarrollo y la prevención del cáncer, poniendo de manifiesto sus propiedades oncostáticas.

La melatonina ejerce efectos sobre el crecimiento mamario. Por un lado, de forma indirecta, modificando los niveles de hormonas gonadales y pituitarias que son importantes en la mamogénesis y, por otro lado, de forma directa reduciendo el crecimiento mamario.

El cáncer de mama ha sido sobre el que más se han estudiado los efectos de esta indolamina, tanto en su desarrollo como en su prevención. Esto es debido fundamentalmente a las acciones antiestrogénicas de la melatonina, que son el sustrato fundamental de los efectos oncostáticos de esta indolamina sobre los tumores malignos de mama estrógeno-dependientes. La melatonina ejerce estas acciones a 3 niveles:

1. Regulando la síntesis de esteroides gonadales a través de la regulación del eje neuroendocrino reproductor.
2. Actuando como un modulador selectivo de los receptores de estrógenos (SERM).
3. Actuando como un modulador selectivo de enzimas estrogénicas (SEEM).

A través de estas acciones la melatonina es capaz de reducir el crecimiento de los tumores mamarios estrógenos-dependientes.

Además, se han descrito otras acciones antitumorales de la melatonina, como la modificación del balance entre proliferación y diferenciación celular a favor de esta última. Esto lo realiza inhibiendo la progresión de las células en el ciclo celular, con un aumento de las células en fase G_0/G_1 y aumentando la duración del ciclo celular. También disminuye la angiogénesis tumoral, incrementa el número de uniones GAP de comunicación intercelular y de esta forma disminuye la invasividad celular. Otra de sus acciones consiste en inhibir la actividad de la telomerasa, disminuyendo la replicación celular. Así mismo es capaz de inducir la apoptosis a través de la inhibición de las caspasas.

La melatonina tiene la capacidad de disminuir el ADN aberrante producido por la exposición a carcinógenos, neutralizando directamente el número de radicales libres y de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, e incrementando la expresión de varias enzimas antioxidantes. Este efecto antioxidante puede desempeñar un papel importante en la prevención del cáncer, impidiendo el daño oxidativo del DNA, y en la prevención de los efectos secundarios de la quimioterapia y de la radiación.

Esta indolamina también 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 el del tamoxifeno. Por último, la melatonina tiene también la capacidad de regular el sistema inmune con el incremento de interleucinas y de otras citocinas.

Existen otras funciones menos estudiadas de la melatonina, como sus efectos sobre la disrupción del ritmo circadiano y su posible asociación con el aumento del riesgo de cáncer, así como la regulación de los factores epigenéticos o el transporte y metabolismo de los ácidos grasos.

En el siguiente cuadro se muestra un resumen de las propiedades de la melatonina sobre las células tumorales, y los mecanismos por los cuales esta hormona ejerce su acción antitumoral. *(Fig.8)*

Propiedades	Mecanismos de acción		Acciones
ANTIOXIDANTE	↓ROS ↑Catalasa ↓NOS	↑GSH, SOD ↑Citokinas	↓Daño ADN ↓Efectos secundarios de la quimio y radioterapia.
INMUNOMODULADOR	↑linfocitos NK ↑Leucocitos ↑INF γ	↑Monocitos ↑Citokinas ↑TNFα	↑ Respuesta antitumoral
INTERACCIÓN CON VÍA ESTROGÉNICA:	↓Aromatasa ↓17β-HSD1 ↓STS		↑Estrógenos débiles
SEEM	↑EST		
SERM	↓ Expresión REα ↓ Activación Reα ↓ Genes dependientes REα		↓Respuesta a estrógenos
ANTIANGIOGÉNESIS	↓VEGF ↓HIF-1α ↓ROS		
TELOMERASA	↓hTERT ↓Respuesta a E2		↓Nº replicación celular
METÁSTASIS	↑E- cadherina ↑β1 integrina ↓Respuesta a E2		↓Invasividad celular
FACTORES EPIGENÉTICOS	↑Metilación ADN ↑Acetilación de histonas		
CICLO CELULAR, DIFERENCIACIÓN Y APOPTOSIS	↑Fases G0-G1 ↓ Ciclina D1 ↑Caspasas 3,8,9	↑ Alarga el ciclo celular ↑p53,p21,Bax ↑Citocromo c	↓Proliferación ↑Diferenciación ↑Apoptosis
TRASPORTE Y METABOLISMO DE ÁCIDOS GRASOS	↓Captación de ácido linleico ↓13-HODE		↓EGFR/MAPK
PREVENCIÓN DE LA CRONODISRUPCIÓN	↓mPer1 ↓mClock		↑Sincronización del reloj interno

Figura 8. Resumen de los mecanismos involucrados en las propiedades oncostáticas de la melatonina.

A pesar de todo lo expuesto anteriormente, el uso de la melatonina en la práctica clínica está muy limitado actualmente. Los ensayos clínicos realizados hasta la fecha sugieren que la melatonina es capaz de mejorar la calidad de vida de los pacientes oncológicos, alargar la supervivencia en ciertos pacientes con cáncer metastásico y disminuir o neutralizar los efectos adversos de las quimio y radioterapias empleadas. También se han realizado estudios que demuestran que el tratamiento con melatonina incrementa la sensibilidad a la radiación ionizante de las células cancerígenas. Dada la baja o inexistente toxicidad de la melatonina, y teniendo en cuenta los resultados encontrados en los estudios realizados tanto *in vivo* como *in vitro,* son necesarios más ensayos clínicos para definir con mayor precisión las posibles indicaciones y beneficios de esta hormona en la aplicación clínica oncológica.

REFERENCIAS

[1] Jacques Ferlay, Isabelle Soerjomataram, Rajesh Dikshit, Sultan Eser, Colin Mathers, Marise Rebelo, Donald Maxwell Parkin, David Forman and Freddie Bray. Cancer incidence and mortality wordlwide: sources, methods and mayor patterns in GLOBOCAN 2012 Int. J. Cancer: 136, E359-E386.2015

[2] Andrea Valdor Cerro, Carolina Alonso González. Perspectivas terapéuticas de la melatonina en el tratamiento del cáncer de mama. Junio 2017.

[3] Cardinali, D., Jordá Catalá, J. and Sánchez Barceló, E. (1994). *Introducción a la cronobiología*. [Cantabria]: Universidad de Cantabria.

[4] Carmen Jesica Venegas (2012) *Estudio de los mecanismos de regulación de la síntesis, distribución y efectos de la melatonina extrapineal Carmen Jesica Venegas Maldonado*.

[5] Romera, J. A., Cortés-cabrera, Á., Sánchez-murcia, P. A., Álvarez-builla, J., & Gago, F. (2013). *Bases moleculares de la selectividad de ligandos por receptores de melatonina.*

[6] Slominski, R. M., Reiter, R. J., Schlabritz-Loutsevitch, N., Ostrom, R. S., & Slominski, A. T. (2012, April 4). Melatonin membrane receptors in peripheral tissues: Distribution and functions. *Molecular and Cellular Endocrinology*.

[7] Benitez-King G, Anton-Tay F. Calmodulin mediates melatonin cytoskeletal effects. Experientia 1993; 49(8): 635-641.

[8] Macias M, Escames G, Leon J, Coto A, Sbihi Y, Osuna A, Acuna-Castroviejo D. Calreticulin-melatonin. An unexpected relationship. Eur J Biochem 2003; 270(5): 832-840.

[9] Cardinali D P, Freire F. Melatonin effects on brain. Interaction with microtubule protein, inhibition of fast axoplasmic flow and induction of crystaloid and tubular formations in the hypothalamus. Mol Cell Endocrinol 1975; 2(5): 317-330.

[10] Benitez-King G, Rios A, Martinez A, Anton- Tay F. In vitro inhibition of Ca2+/calmodulin-dependent kinase II activity by melatonin. Biochim Biophys Acta 1996; 1290(2): 191-196.

[11] Hardeland R, Coto-Montes A, Poeggeler B. Circadian rhythms, oxidative stress, and antioxidative defense mechanisms. Chronobiol Int 2003; 20(6): 921-962.

[12]Hardeland R, Pandi-Perumal S R. Melatonin, a potent agent in antioxidative defense: actions as a natural food constituent, gastrointestinal factor, drug and prodrug. Nutr Metab (Lond) 2005; 2: 22.

[13] Hardeland R, Poeggeler B. Non-vertebrate melatonin. J Pineal Res 2003; 34(4): 233- 241.

[14] Andrabi S A, Sayeed I, Siemen D, Wolf G, Horn T F. Direct inhibition of the mitochondrial permeability transition pore: a possible mechanism responsible for anti- apoptotic effects of melatonin. FASEB J 2004; 18(7): 869-871.

[15] Mediavilla MD, San Martín M, Sánchez-Barceló EJ. Melatonin inhibits mammary gland develpment in female mice. J. Pineal Res. 1992:13:13-19.

[16] Mediavilla MD, San Martín M, Bonanni Rey R.A, Cardinali D.P, Sánchez-Barceló E.J. Melatonin actions in mouse mammary gland. Melatonin and pineal gland, from basic science to clinical application. 1992.

[17] Samuel Cos MD, Alicia González, Carlos Martínez-Campa, Maria Dolores Mediavilla, Carolina Alonso-González, Emilio J. Sanchez-Barceló. Estrogen-signaling pathway: a link between breast cancer and melatonin oncostatic actions. 2006

[18] Woo MM, Tai CJ, Kang SK et al. Direct action of melatonin in human granulosa-luteal cells. J Clin Endocrinol Metab 2001; 86:4789-4797.

[19] Soares JM, Masana MI, Ersahin C et al. Functional melatonin receptors in rat ovaries at varios stages of the estrous cycle. J Pharmacol Exp Ther 2003; 306: 604-702.

[20] Emilio J. Sanchez-Barceló, Samuel Cos, Dolores Mediavilla, Carlos Martínez-Campa, Alicia González, Carolina Alonso-González. Melatonin-estrogen interactions in breast cancer. J pineal Res. 2005; 38:217-222.

[21] Cos S, Martinez-Campa C, Mediavilla-MD et al. Metatonin modulates aromatase activity in MCF-7 human breast cancer cells. J Pineal Res.

[22] Cos S. y Sánchez Barceló E.J. (2000). Melatonin and mammary pathological growth. *Frontiers and neuroendocrinology,* 21, 133-170.

[23] 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.

[24] Blask DE, Saner LA, Dauchy RT. Melatonin as a chronobiotic/anticancer agent: celular, biochemical and molecular mechanisms of action and their implications for circadian-based cancer theraphy. *Curr Top Med Chem* 2002; 2:113-32.

[25] Brittney Jung, Nihal Ahmad. Melatonin in cancer managment: progress and promise. *Cancer Res 2006,* 66:20.

[26] Steven M Hill, Victoria P Benlacio, Robert T Dauchy, Shulin Xiang, Samatha Brimer, Lulu Mao, Adam Hauch, Peter W Lundberg, Whitney Summers, Lin Yuan,

Tripp Frasch, David E Blasck. Melatonin: an inhibitor of breast cancer (2015). *Endocr. Relat, Cancer.* 22(3): R183-R204.

[27] Dauchy RT, Xiang S, Mao L, Brimer S, Wern MA, Yuan L, Anbalagan M, Hauch A, Frasch T, Rowan BG et al. 2014. Circadian and melatonin disruption by exposure to light at night drives intrinsic resistance to tamoxifen therapy in breast cancer. *Cancer Reseach* 74 4099-4110.

[28] Vanecek J. Melatonin inhibits increase of intracelular calcium and cyclic AMP in neonatal rat pituitary via independent pathways. Mol Cell Endocrinol 1995; 107:149-153.

[29] Dubocovich ML, Rivera-Bermudez MA, Gerdin MJ et al. Molecular pharmacology, regulation and function of mamalian melatonin receptors. Front Biosci 2003, 8:1093-1108.

[30] Cohen M, Lippan M, Chabner B. Role of pineal gland in etiology and treatment of breast cancer. Lancet 1978; 2:814-816.

[31] Sánchez Barceló, E.J; Cos, S; Martínez-Campa, C; González, A; Alonso-González, C. Melatonin-estrogen interactions in breast cáncer. *J. Pineal Res.* 2005; 38:217-222.

[32] M.D. Mediavilla, E.J. Sánchez-Barceló, D.X. Tan, L. Manchester and R.J. Rieter. Basic mechanisms involved in the anti-cancer effects of melatonin. *Current Medicinal Chemistry,* 2010, 17, 4462-4481.

[33] 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 α via calmodulin. J Biol Chem. 279: 38294-38302.

[34] Cos, S; González, A; Güezmes, A; Mediavilla, MD; Martínez-Campa, C; Alonso González. C; Sánchez Barceló, E.J. Melatonin inhibits the growth of DMBA-induced mammary tumors by decreasing the local biosynthesis of estrogens through the modulation of aromatase activivy. *Int. J. Cancer, 2006,* 118, 274-278.

[35] Kirkpatrick, K.L; Clark, G.; Ghilchick, M.; Newbold, R.F.; Mokbel, K. hTERT mRNA expression correlates with telomerase activity in human breast cáncer. *Eur.J.Surg. Oncol.,* 2003, 29, 321-326.

[36] Cavalieri, E; Frenkel, K; Liehr, J.G.; Rogan, E.; Roy, D. Estrogens as endogenous genotoxic agents. DNA adducts and mutations. *J. Natl. Cancer Inst. Monogr.* 2000, 27, 75-93.

[37] Karbownik, M; Lewinski, A; Reiter, RJ. Anticarcinogenic actions of melatonin which involve antioxidative processes: comparison with other antioxidants. *Int.J. Biochem. Cell. Biol.* 2001, 33, 735-753.

[38] Karbownik, M; Reiter, RJ; Burkhardt, S; Gitto, E; Tan, D.X; Lewinski, A. Melatonin attenuates estradiol-induced oxidative damage to DNA; relevance for cancer prevention. *Exp. Biol. Med,* 2001, 226, 707-712.

[39] Block, K.I; Koch, A.C.; Mead, M.N.; Tothy, P.K.; Newman, R.A; Gyllenhaal, C. Impact of antioxidant supplementation on chemotherapeutic toxicity: a systematic review of evidence from randomized controlled trials*. Int. J. Cancer,* 2008, 123, 1227-1239.

[40] Lissoni, P; Rovelli, F.; Malugani, F.; Bucovec, R.; Conti, A.; Maestroni, G.J: Anti-angiogenic activity of melatonin in advanced cancer patients. *Neuro. Endocrinol. Lett.* 2001, 22, 45-47.

[41] Park, J.W.; Hwang, M.S.; Suh, S.I.; BaekPark, W.K. Melatonin down-regulates HIF-1a expression through inhibition of protein translation in prostate cancer cells. *J. Pineal Res.,* 2009, 46, 415-421.

[42] Chen-Goodspeed, M.; Lee, C.C. Tumor supression and circadian function. *J. Biol. Rhythms,* 2007, 22, 292-298.

[43] Imbesi, M.; Arslan, A.D.; Yildiz, S.; Sharma, R.; Gavin, D.; Tun, N.; Manev, H.; Uz, T. The melatonin receptor MT1 is required for the differential regulatory actions of melatonin on neuronal “clock” gene expression in striatal neurons in vitro. *J. Pineal Res.*, 2009, 46, 87.94.

[44] Dauchy, R.T.; Sauer, L.A.; Blask, D.E.; Vaughan, G.M. Light contamination during the dark phase in “photoperiodically controlled” animal rooms: effect on tumor growth and metabolism in rats. *Lab. Anim. Sci,* 1997, 47, 511-518.

[45] Cos, S.; Mediavilla, M.D.; Martinez-Campa, C.; González, A.; Alonso-González, C.; Sánchez-Barceló, E.J. Exposure to light-at-night increases the growth of DMBA-induced mammary adenocarcinoma in rats. *Cancer Lett.,* 2006, 235, 266-271.

[46] Cos, S.; Fernández, R.; Güezmes, A.; Sánchez-Barceló, E.J. Influence of melatonin on invasive and metastatic properties of MCF-7 human breast cancer cells. *Cancer Res.,* 1998, 58, 4383-4390.

[47] Hill, S.M.; Frasch, T.; Xiang, S.; Yuan, L.; Duplessis, T.; Mao, L. Molecular mechanisms of melatonin anticancer effects. *Integr. Cancer Ther.,* 2009, 8, 337-346.

[48] Mediavilla, M.D.; Güezmez, A.; Ramos, S.; Kothari, L.; Garijo, F.; Sánchez-Barceló E.J. Effects of melatonin on mammary gland lesions in transgenic mice overexpressing N-ras proto-oncogene. *J. Pineal Res.,* 1997 22, 86-94.

[49] Nuria Puente Ruiz; Samuel Cos Corral. Acciones antitumorales de la melatonina. Trabajo de fin de grado 2016. Universidad de Cantabria.

[50] Elaheh Nooshinfar; Ava Safaroghili-Azar; Davood Bashash; Mohammad Esmaeli Akbari. Melatonin, an inhibitory agent in breast cancer. *Breast Cancer (2017)* 24:42-51

[51] Vijayalaxmi, Thomas CR, Jr., Reiter RJ, Herman TS. Melatonin: from basic research to cancer treatment clinics. *J Clin Oncol 2002*; 20:2575-601.

[52] Sánchez-Barceló EJ, Cos S, Fernández R, Mediavilla MD. Melatonin and mammary cancer: a short review. *Endocr Relat Cancer 2003*; 10:153-9.

[53] Lissoni P, Barni S, Meregalli S, et al. Modulation of cancer endocrine therapy by melatonin: a phase II study of tamoxifen plus melatonin in metastatic breast cancer patients progressing under tamoxifen alone. *Br J Cancer 1995*; 71: 854-6.

[54] Lissoni P, Barni S, Ardizzoia A, et al. Randomized study with the pineal hormone melatonin versus supportive care alone in advanced nonsmall cell lung resistant to a first-line chemotherapy containing cisplatin. *Oncology 1992*; 49:336-9.

[55] Slominski A, Fischer TW, Zmijewski MA, et al. On the role of melatonin in skin physiology and pathology. *Endocrine 2005;* 27:137-48.

[56] González R, Sánchez A, Ferguson JA, et al. Melatonin therapy of advanced human malignant melanoma. *Melanoma Res* 1991; 1:237-43.

[57] Bengha E, Elsner P, Kistler GS. Suppression of UV-induced erythema by topical treatment with melatonin. A dose response study. *Arch Dermatol Res* 1996; 288:522-6.

[58] Neri B, Firorelli C, Moroni F, et al. Modulation of human lymphoblastoid interferon activity by melatonin in metastatic renal cell carcinma. A phase II study. *Cancer 1994; 73:305-9*.

[59] Lissoni P, Barni S, Ardizzoia A, Tancini G, Conti A, Maestroni g. A randomized study with the pineal hormone melatonin versus supportive care alone in patients with brain metastases due to solid neoplasms. *Cancer* 1994; 73:699-701.

[60] Lissoni P. Modulation of anticancer cytokines IL-2 and IL-12 by melatonin and the other pineal índoles 5-methoxytryptamine and 5-methoxytryptophol in the treatment of human neoplasms. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 917:560-7.