

UNIVERSIDAD DE CANTABRIA

PROGRAMA DE DOCTORADO DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y BIOMEDICINA



TESIS DOCTORAL

**La melatonina como modulador de los cambios
moleculares inducidos por la radioterapia y la
quimioterapia en el cáncer de mama**

PHD THESIS

**Melatonin as modulator of the molecular changes
induced by radiotherapy and chemotherapy on
breast cancer**

Realizada por: Javier Menéndez Menéndez

Dirigida por: Carlos Manuel Martínez Campa y Carolina Alonso González

Escuela de Doctorado de la Universidad de Cantabria

Santander 2020



Departamento de Fisiología y Farmacología
Facultad de Medicina
Universidad de Cantabria
39011 Santander

D. **Carlos Manuel Martínez Campa**, Profesor Titular del Departamento de Fisiología y Farmacología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Cantabria y Dña. **Carolina Alonso González**, Profesora Contratada Doctora del Departamento de Fisiología y Farmacología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Cantabria

CERTIFICAN:

Que D. **Javier Menéndez Menéndez** ha realizado el trabajo de investigación correspondiente a esta tesis doctoral titulada “La melatonina como modulador de los cambios moleculares inducidos por la radioterapia y la quimioterapia en el cáncer de mama” bajo nuestra dirección, en el Departamento de Fisiología y Farmacología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Cantabria. Consideramos que el trabajo reviste las características de originalidad y calidad científica requeridas para ser defendido como Tesis Doctoral y optar al Grado de Doctor.

Santander, 19 de Noviembre de 2020.

Director y Tutor de la tesis:

A blue ink signature of Carlos Martínez Campa, written in a cursive style.

Fdo. Carlos Martínez Campa

Directora de la tesis:

A blue ink signature of Carolina Alonso González, written in a cursive style.

Fdo. Carolina Alonso González

“La ciencia siempre vale la pena, porque sus descubrimientos, tarde o temprano, siempre se aplican.”

Severo Ochoa

Cualquier avance científico bien entendido tiene una aplicación práctica que mejora la vida de las personas.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar agradezco a mis directores de tesis su apoyo y tiempo dedicado a este trabajo. A Carlos Martínez Campa, por confiar en mis capacidades desde el principio, hacerme un hueco en su laboratorio para realizar esta tesis y permitirme participar en la docencia de la asignatura “Fisiología General e Inmunología”. Y a Carolina Alonso González, por ayudarme a progresar en mi formación académica, guiando mis primeros pasos en la investigación científica.

Asimismo, gracias a mis evaluadoras Alicia González y Noemí Rueda por sus constructivos consejos, tanto en las evaluaciones anuales como en todas las ocasiones que fueron necesarios.

Gracias a Gema y a José Antonio, por sus valiosas enseñanzas en cuanto a la planificación y el desarrollo de los experimentos, la preparación de reactivos, el manejo de los cultivos celulares y el funcionamiento de las máquinas del laboratorio.

No me olvido del resto de miembros del área de Fisiología, que me han rodeado durante estos años. Samuel, Mar, M^a José, Alicia, Iñaki, Emilio y Lola han contribuido a que pudiera disfrutar de un ambiente de trabajo ameno y agradable.

Agradezco también la colaboración de nuestros compañeros del área de Farmacología, en especial Raquel, así como la de los miembros del Departamento de Anatomía y Biología Celular, particularmente Nacho y Cris. Del mismo modo, gracias a Pepe, del área de Radiología y Física Médica, y a Fidel, del servicio de microscopía del IDIVAL. La ayuda de todos ellos fue fundamental en determinados momentos.

Por supuesto, gracias a Juani, por su siempre buena disposición a acogerme en la FINBA, y a su grupo de la unidad de Oncología de Cabeza y Cuello del IUOPA, especialmente a Fran, Rocío y Nagore por enseñarme técnicas experimentales que sin duda enriquecen notablemente este trabajo.

Gracias a Pedro Casado y a Pedro Cutillas por invitarme a realizar la estancia internacional con ellos en el Barts Cancer Institute, de la Universidad Queen Mary de Londres.

Y finalmente, gracias también a mi familia por su apoyo y aprobación, especialmente a mis padres, Alfonso y Flor, sin los cuales no habría tenido ni el tiempo, ni el dinero, ni los ánimos para llevar a cabo este trabajo, y a mi tía Luisa y a mi tío Carlos, por su paciencia y generosidad.

ÍNDICE

ÍNDICE

ABREVIATURAS	3
RESUMEN	9
SUMMARY	11
<u>1. INTRODUCCIÓN</u>	
1.1 CÁNCER DE MAMA.....	15
1.1.1 Clasificaciones y estadificación	16
1.1.2 Epidemiología	18
1.1.3 Etiología	18
1.1.4 Papel de los estrógenos en el cáncer de mama	22
1.1.5 Tratamiento del cáncer de mama.....	25
1.1.6 Inconvenientes de las terapias convencionales y moléculas adyuvantes	33
1.1.7 La expresión génica en el cáncer de mama.....	34
1.1.8 Los microARNs y el cáncer de mama	35
1.1.9 Los genes reloj en el cáncer de mama	38
1.1.10 Twist1 como factor clave en la transición epitelio-mesénquima	40
1.2 LA MELATONINA	44
1.2.1 Síntesis, secreción, circulación y metabolismo	44
1.2.2 Regulación de la síntesis	47
1.2.3 Mecanismos de acción	48
1.2.4 Acciones fisiológicas de la melatonina.....	50
1.2.5 Acciones antitumorales de la melatonina.....	51
1.2.6 La melatonina y el cáncer de mama.....	53
1.2.7 Acciones antiestrogénicas de la melatonina en el cáncer de mama	55
1.2.8 La melatonina como sensibilizador a los efectos de la quimioterapia.....	58
1.2.9 La melatonina como sensibilizador a los efectos de la radioterapia.....	60
<u>2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS</u>	
2.1 JUSTIFICACIÓN.....	65
2.2 OBJETIVOS.....	66
<u>3. MATERIALES Y MÉTODOS</u>	
3.1 CULTIVOS CELULARES.....	69
3.1.1 Líneas celulares utilizadas.....	69
3.1.2 Condiciones de cultivo comunes a todas las líneas celulares	70

3.1.3 Condiciones de subcultivo	70
3.1.4 Recuentos celulares para siembras y viabilidad celular	70
3.1.5 Cocultivos de células BRF y MCF-7	71
3.1.6 Tratamientos con melatonina.....	71
3.1.7 Tratamiento con radiación ionizante	72
3.1.8 Tratamientos con quimioterápicos.....	72
3.2 MEDIDA DE PROLIFERACIÓN Y VIABILIDAD CELULAR.....	73
3.2.1 Medida de la actividad metabólica (método del MTT).....	73
3.2.2 Ensayo de clonogenicidad.....	74
3.3 ANÁLISIS DEL CICLO CELULAR	76
3.4 DETERMINACIÓN DE LA MUERTE CELULAR.....	77
3.5 ESTUDIOS DE EXPRESIÓN GÉNICA	78
3.5.1 Extracción de ARN total de las células en cultivo.....	78
3.5.2 Determinación de la cantidad y pureza del ARN	79
3.5.3 Síntesis de ADN complementario (ADNc)	80
3.5.4 Determinación de los perfiles de expresión génica mediante RT-PCR	80
3.5.5 Detección y cuantificación de la expresión génica	82
3.5.6 Diseño de los oligonucleótidos cebadores para RT-PCR	84
3.5.7 Diseño de los estudios de expresión génica en líneas celulares <i>in vitro</i>	86
3.5.8 Detección y cuantificación de la expresión de microARNs (miARNs)	86
3.6 CAMBIOS EN EL ESTADO DEL FOSFOPROTEOMA.....	88
3.7 INMUNODETECCIÓN PROTEICA	89
3.7.1 Anticuerpos.....	89
3.7.2 Cuantificación de la concentración de proteína.....	90
3.7.3 Inmunodetección mediante <i>western blot</i>	90
3.7.4 Inmunofluorescencia	93
3.8 ENSAYOS DE MIGRACIÓN CELULAR.....	94
3.9 ENSAYOS DE INVASIÓN CON ESFEROIDES	95
3.10 SILENCIAMIENTO DE LA EXPRESIÓN DE <i>TWIST1</i>	95
3.10.1. Lipofección.....	96
3.10.2. Silenciamiento	96
3.11 MODELO DE ANGIOGÉNESIS <i>IN VIVO</i> : CAM ASSAY.....	97
3.12 MODELO DE XENÓGRAFOS EN RATONES ATÍMICOS	98
3.12.1 Cepas de ratón y técnica de implantación de células MCF-7	98

3.12.2 Tratamientos experimentales <i>in vivo</i>	99
3.12.3 Extracción de ARN total procedente de los xenógrafos de ratón.....	99
3.13. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS	100
4. RESULTADOS	
4.1 EFECTOS DE LA MELATONINA SOBRE LOS CAMBIOS INDUCIDOS POR LA RADIACIÓN EN CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA (MCF-7).....	103
4.1.1 La melatonina potencia los efectos antiproliferativos y citotóxicos de la radiación en la línea celular MCF-7	103
4.1.2 Efectos de la melatonina sobre los cambios inducidos por la radiación en la expresión génica en células MCF-7.....	105
4.1.3 Efectos de la radiación y la melatonina en la expresión de microARNs ..	114
4.1.4 Efectos de la radiación y la melatonina en el estado de activación de quinasas y otros factores implicados en vías de señalización	115
4.1.5 Influencia de la melatonina sobre los efectos de la radiación en la formación de nuevos vasos sanguíneos en un modelo <i>in vivo</i> : <i>CAM assay</i>	117
4.2 EFECTOS DE LA MELATONINA SOBRE LOS CAMBIOS INDUCIDOS POR DOCETAXEL EN CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA (MCF-7)	129
4.2.1 La melatonina potencia el efecto antiproliferativo del docetaxel en la línea celular MCF-7.....	129
4.2.2 La melatonina contribuye a la parada del ciclo celular inducida por el docetaxel en la línea celular MCF-7.....	131
4.2.3 Efecto del docetaxel y la melatonina sobre la expresión de genes implicados en apoptosis.....	133
4.2.4 La melatonina aumenta los efectos proapoptóticos del docetaxel en la línea celular MCF-7.....	134
4.2.5 Efectos de la melatonina sobre los cambios inducidos por el docetaxel en la expresión génica en células MCF-7.....	136
4.2.6 Efectos de la melatonina y el docetaxel sobre el desarrollo de tumores mamarios en un modelo animal de xenógrafos con células MCF-7.....	140
4.3 EFECTOS DE LA MELATONINA SOBRE LOS CAMBIOS INDUCIDOS POR DOXORRUBICINA EN CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA.....	155
4.3.1 La melatonina potencia el efecto antiproliferativo de la doxorubicina en la línea celular MCF-7.....	156
4.3.2 Efectos de la melatonina y la doxorubicina en la migración e invasión de las células MCF-7	158
4.3.3 Efectos de la melatonina y la doxorubicina en la migración e invasión de las células MDA-MB-231.....	159
4.3.4 Efectos de la melatonina sobre los cambios inducidos por la doxorubicina en la expresión de genes relacionados con el cáncer de mama.....	160

4.3.5 Efectos de la melatonina y la doxorrubicina sobre los niveles de la proteína Twist1 en células MCF-7	166
4.3.6 Efectos sobre la expresión de los genes <i>TWIST1</i> y <i>CDKN1A</i> en células MCF-7 cocultivadas con adipocitos	168
4.3.7 Efectos de la melatonina y la doxorrubicina en la expresión de genes relacionados con la angiogénesis	169
4.3.8 Efectos de la melatonina y doxorrubicina en la expresión de genes reloj	172
4.3.9 Efectos de la melatonina y la doxorrubicina en el estado de activación de quinasas y otros factores implicados en vías de señalización	174
4.3.10 Efectos de melatonina y doxorrubicina en la expresión de microARNs	176
4.3.11 Efecto del bloqueo de <i>TWIST1</i> sobre la expresión de miR-10b	178
4.3.12 Efecto de la melatonina y la doxorrubicina sobre el desarrollo de tumores mamarios en un modelo de xenógrafos de células MCF-7	180
5. <u>DISCUSIÓN GENERAL</u>	199
6. <u>CONCLUSIONES</u>	227
7. <u>BIBLIOGRAFÍA</u>	231

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

- AA-NAT:** Arilalquilamina-N-acetiltransferasa
- Ac:** Anticuerpo
- ADN:** Ácido desoxirribonucleico
- ADNc:** Ácido desoxirribonucleico complementario
- AECC:** Asociación Española Contra el Cáncer
- AF-1:** Activation Function 1
- AF-2:** Activation Function 2
- AMPc:** Adenosín monofosfato cíclico
- ARN:** Ácido ribonucleico
- ARNm:** Ácido ribonucleico mensajero
- ARNr:** Ácido ribonucleico ribosomal
- ATCC:** American Type Culture Collection
- ATP:** Adenosín trifosfato
- AP1:** Proteína Activadora 1
- APS:** Persulfato amónico
- BRCA:** Proteína de susceptibilidad al cáncer de mama
- BRF:** Fibroblastos mamarios
- BSA:** Albúmina sérica bovina
- CaM:** Calmodulina
- CAM:** Membrana corioalantoidea
- CREB:** cAMP response element-binding
- C_T:** Ciclo umbral
- CTCs:** Células tumorales circulantes
- DAPI:** 4',6-diamidino-2-fenilindol
- D.O:** Densidad óptica
- DCC:** Dextran-coated charcoal
- DEPC:** Diethylpyrocarbonate
- DMBA:** 7,12-dimetil-1,2-benzantraceno

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DMSO: Dimetil sulfóxido

dNTPs: Desoxirribonucleótidos trifosfato

DSB: Rotura de doble cadena del ADN

E₂: Estradiol

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

EGF: Factor de crecimiento epidérmico

EMT: Transición epitelio-mesénquima

EREs: Elementos de respuesta a estrógenos

FS: Fracción de supervivencia

FSH: Hormona folículo estimulante

G₁: Fase de crecimiento celular GAP1

G₂: Fase de crecimiento celular GAP2

GCS: Ganglio cervical superior

GTP: Guanosín trifosfato

Gys: Grays

HDAC: Histona de acetilasa

HIOMT: Hidroxiindol-O-metiltransferasa

HRP: Horseradish peroxidase

hTERT: Telomerasa transcriptasa inversa humana

HTP: Hidroxitriptófano

IAs: Inhibidores de la aromatasa

IGF-1: Factor de crecimiento insulínico tipo 1

i.p: Intraperitoneal

IP: Ioduro de propidio

ipRGCs: Células ganglionares intrínsecamente fotosensibles de la retina

kDa: Kilodalton

LAN: Light at night

LBD: Ligand binding domain

LH: Hormona luteinizante

MAPK: Mitogen activated protein kinase

MCF-7: Michigan Cancer Foundation 7

MDA-MB-231: M.D. Anderson Metastasis Breast Cancer

MET: Transición mesénquima-epitelio

miARN: micro ARN

MIAs: Microtubule interfering agents

MT1: Receptor de melatonina 1

MT2: Receptor de melatonina 2

MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 bromuro difeniltetrazolio

MMP: Metaloproteínasa

NAT: N-acetil transferasa

NE: Norepinefrina

NMU: Nitrosometilurea

NSQ: Núcleo supraquiasmático

OMS: Organización Mundial de la Salud

PBS: Phosphate buffered saline

PI3K: Fosfoinositol-2-quinasa

PK: Proteínquinasa

PPAR γ : Receptor gamma activado por el proliferador de peroxisoma

PR: Receptor de progesterona

PVDF: Polifluoruro de vinilideno

r.p.m: Revoluciones por minuto

RA: Receptor de andrógenos

RE: Receptor de estrógenos

RIPA: Radioimmunoprecipitation assay

ROS: Especies reactivas de oxígeno

RS: Recurrence score

RT: Transcripción reversa

RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

SDS: Dodecilsulfato sódico

SDS-PAGE: Sodium dodecil sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

SEEM: Modulador selectivo de las enzimas estrogénicas

SEM: Error estándar de la media

SERM: Modulador selectivo de los receptores de estrógenos

SFB: Suero fetal bovino

SNC: Sistema nervioso central

SPF: Specific pathogen free

siARN: ARN de silenciamiento

TBST: Tris-base salino y polisorbato 20

TNF α : Factor de necrosis tumoral α

Tm: Temperatura de fusión

RESUMEN

RESUMEN

El cáncer de mama es una de las neoplasias más comunes en mujeres a nivel mundial. Tras una proliferación inicial normalmente dependiente de estrógenos, las células desarrollan fenotipos muy agresivos. Las terapias convencionales como la radioterapia y la quimioterapia han probado ser efectivas contra el cáncer. Sin embargo, estos tratamientos tienen algunos inconvenientes como graves efectos secundarios en aquellos tejidos que están en división activa. Otro problema derivado de su uso reiterado es el desarrollo de resistencia, la cual permite a las células sobrevivir y recuperar su actividad proliferativa. El tercer problema, menos caracterizado, es que estas terapias también alteran el transcriptoma y el proteoma de las células tumorales, contribuyendo a su malignidad. Por estas razones, es esencial la búsqueda de compuestos adyuvantes capaces de contribuir a los efectos antiproliferativos y proapoptóticos de la radioterapia y la quimioterapia, mitigando sus efectos adversos y/o revirtiendo la resistencia.

Uno de esos compuestos es la melatonina, una hormona producida en la glándula pineal que presenta un pico de secreción nocturno, la cual actúa como un agente oncostático reduciendo el crecimiento y el desarrollo de tumores mamarios estrógenodependientes, principalmente gracias a sus propiedades antiestrogénicas (*SERM* y *SEEM*), por las cuales es considerada un excelente adyuvante para las terapias convencionales. Adicionalmente, la melatonina sensibiliza a las células tumorales a la quimioterapia y a la radioterapia mediante mecanismos como la inducción de la apoptosis, el aumento de la citotoxicidad o la inhibición de la angiogénesis. Sin embargo, los cambios moleculares que subyacen a estas acciones aún no están completamente caracterizados.

En este trabajo, estudiamos las modificaciones provocadas por la radiación ionizante y por dos fármacos de quimioterapia comúnmente utilizados en la práctica clínica en pacientes de cáncer de mama: docetaxel y doxorubicina, en una línea celular derivada de adenocarcinoma mamario humano (MCF-7).

Así, los resultados de este trabajo se han dividido en tres apartados: en el primero comprobamos si la melatonina podría aumentar la sensibilidad de las células MCF-7 a la radioterapia. Encontramos que la melatonina potenció los efectos antiproliferativos y proapoptóticos ejercidos por la radiación ionizante. La hormona pineal también moduló las modificaciones en la actividad transcripcional, aumentando algunos efectos de la radiación (*TP53*, *RASSF1*, *CDKN1A*, *BAD*, *BAX2*, *BIRC5*) y contrarrestando otros (*PTEN*, *ATM*, *N3RC1*, *ERBB2*, *SERPINE*, *PLAU*). La melatonina también reguló el estado de fosforilación de algunas quinasas y de p53, y potenció los efectos antiangiogénicos de la radiación.

En el segundo bloque de resultados, la melatonina aumentó las respuestas antiproliferativas y proapoptóticas de dosis bajas de docetaxel. De manera importante,

estos efectos fueron más potentes cuando la melatonina se añadió previamente al docetaxel. El tratamiento con docetaxel 1 μ M (equivalente a la dosis terapéutica) inhibió la expresión de los genes *TP53*, *CKDN1A* y *CDH13*, y del microARN miR-10b, y estimuló *MUC1*, *GATA3* y *c-MYC*, mientras que la melatonina contrarrestó estos efectos. La hormona pineal aumentó aún más la expresión de los genes proapoptóticos *BAD* y *BAX2* y potenció la inhibición del gen antiapoptótico *BCL-2*. *In vivo*, la melatonina también tuvo algunas acciones positivas como la abolición de la inducción del gen *TWIST1*.

En el tercer capítulo de resultados, estudiamos la combinación de melatonina con doxorrubicina. Ha sido descrito que la melatonina potencia los efectos antiproliferativos de la doxorrubicina; sin embargo, los cambios moleculares involucrados en la expresión génica y la activación o inhibición de vías de señalización intracelular permanecen en gran parte desconocidas. Aquí, encontramos que la melatonina aumentó los efectos antiproliferativos de la doxorrubicina en las células MCF-7 pero no en las células MDA-MB-231. Sorprendentemente, el tratamiento con doxorrubicina indujo la invasión celular, y la melatonina contrarrestó estos efectos en MCF-7 pero no en las células independientes de estrógenos MDA-MB-231. La doxorrubicina modificó la expresión de varios genes y la melatonina fue capaz de modular muchos de esos cambios. De manera importante, describimos por primera vez la capacidad de la melatonina de inhibir a *TWIST1*, fuertemente inducido en respuesta a la antraciclina, en las células MCF-7, pero no en las MDA-MB-231. En combinación con la doxorrubicina, la melatonina inhibió la activación de p70S6K y moduló la expresión de genes de cáncer de mama, angiogénesis y genes reloj. Además, la melatonina reguló los niveles de microARNs relacionados con Twist1, como miR-10a, miR-10b y miR-34a. Como Twist1 juega un rol esencial en la transición epitelio-mesénquima, la adquisición de fenotipo metastásico y la angiogénesis, nuestros resultados sugieren que la inhibición de Twist1 por la melatonina puede ser un mecanismo crucial para revertir la resistencia y mejorar el potencial oncostático de la doxorrubicina en células tumorales mamarias dependientes de estrógeno.

Todos estos resultados nos permiten profundizar en nuestro conocimiento de los cambios moleculares que tienen lugar en las células tumorales en respuesta a la radioterapia y a la quimioterapia. Hemos identificado que algunos de estos cambios son potencialmente peligrosos y pueden conducir a la supervivencia y resistencia, y encontramos que la melatonina puede ejercer efectos protectores previniendo al menos algunos de esos cambios, aumentando por tanto las acciones antitumorales de los tratamientos convencionales.

SUMMARY

SUMMARY

Breast cancer is one of the most common malignancies in women around the world. After an initial proliferation normally dependent on estrogens, the cells evolve into more aggressive phenotypes, which includes changes in gene, miRNAs and other molecules expression, deregulation of cell signalling pathways, accompanied by mutations, deletions, translocations and/or epigenetic alterations, causing uncontrolled cell proliferation, epithelial-to-mesenchymal transition and invasion leading to metastasis. Conventional therapies such as radiotherapy or chemotherapy have proven to be effective against cancer. However, these treatments have some drawbacks such as serious side effects in tissues whose cells are in active division. Another problem derived from their repeated use is the development of resistance, allowing the cells to survive and resume their proliferative activity. The third problem, less characterized, is that these therapies also alter the transcriptome and proteome of the tumor cells, contributing to their malignancy. For all these reasons, it is essential the search of adjuvant compounds capable of contributing to the anti-proliferative and pro-apoptotic effects of radiotherapy and chemotherapy, by mitigating their adverse effects and reversing resistance.

One of these compounds is melatonin, a hormone produced in the pineal gland that presents a nocturnal peak of secretion, which acts as an oncostatic agent reducing the growth and development of estrogen-dependent breast tumors, mainly thanks to its anti-estrogenic properties (*SERM* and *SEEM*), for which it is considered an excellent adjuvant for conventional therapies. Additionally, melatonin sensitizes tumor cells to both chemotherapy and radiotherapy by mechanisms such as induction of apoptosis, enhancement of cytotoxicity or inhibition of angiogenesis. However, the molecular changes underlying these actions are not well characterized.

In this work we study the modifications caused by ionizing radiation and by two chemotherapy drugs commonly used in clinical practice in breast cancer patients: docetaxel and doxorubicin, in the MCF-7 cell line, derived from human breast adenocarcinoma, and which overexpresses the estrogen receptor alpha (MCF-7).

Therefore, the work has been structured in three sections: in the first objective, we studied whether melatonin could enhance the sensitivity of MCF-7 cells to radiotherapy. We found that melatonin potentiated the anti-proliferative and the pro-apoptotic effects exerted by ionizing radiation. The pineal hormone also modulated the modifications in the transcriptional activity, either enhancing some radiation effects (*TP53*, *RASSF1*, *CDKN1A*, *BAD*, *BAX2*, *BIRC5*) or counteracting others (*PTEN*, *ATM*, *N3RC1*, *ERBB2*, *SERPINE*, *PLAU*). Melatonin regulated the phosphorylation state of some kinases and p53, and potentiated the anti-angiogenic effect of radiation.

In the second block of results, we demonstrated that melatonin enhanced the anti-proliferative and pro-apoptotic responses to low doses of docetaxel in breast cancer cells. Importantly, these effects were more potent when melatonin was added prior to docetaxel. Treatment with 1 μ M docetaxel (equivalent to the therapeutic dosage) induced changes in gene expression profiles and melatonin modulated these changes. Specifically, docetaxel downregulated *TP53*, *CDKN1A* and *CDH13*; and upregulated *MUC1*, *GATA3* and *c-MYC*, whereas melatonin counteracted these effects. The expression of the miRNA miR-10b was also stimulated by docetaxel and melatonin counteracted this effect. The pineal hormone further increased the expression of the pro-apoptotic *BAD* and *BAX2* genes, and enhanced the inhibition of the anti-apoptotic gene *BCL-2*. *In vivo*, melatonin also had some positive actions such as abolishing the induction of the epithelial-to-mesenchymal *TWIST1* gene.

In the third objective, we studied the combination of melatonin with doxorubicin. It has been described that melatonin potentiates the anti-proliferative effects of doxorubicin; however, the molecular changes involving gene expression and the activation/inhibition of intracellular signalling pathways remain largely unknown. Here we found that melatonin enhanced the anti-proliferative effect of doxorubicin in MCF-7 but not in MDA-MB-231 cells. Strikingly, doxorubicin treatment induced cell invasion, and melatonin effectively counteracted these effects in MCF-7 but not in estrogen-independent MDA-MB-231 cells. Doxorubicin changed the expression of many genes and melatonin modulated many of those changes. Importantly, we describe for the first time the ability of melatonin to downregulate *TWIST1*, strongly induced in response to the anthracycline, in estrogen-dependent but not in estrogen-independent breast cancer cells. Combined with doxorubicin, melatonin inhibited the activation of p70S6K and modulated the expression of breast cancer, angiogenesis and clock genes. Moreover, melatonin regulates the levels of Twist1-related microRNAs, such as miR-10a, miR-10b and miR-34a. Since Twist1 plays a pivotal role in the epithelial-to-mesenchymal transition, acquisition of metastatic phenotype and angiogenesis, our results suggest that inhibition of Twist1 by melatonin might be a crucial mechanism of overcoming resistance and improving the oncostatic potential of doxorubicin in estrogen-dependent breast cancer cells.

All the results obtained in this work have allowed us to deepen our understanding of the molecular changes that take place in tumor cells in response to radiation and chemotherapy. We have identified that some of these changes are potentially dangerous and can lead to survival and resistance, and we found that melatonin can exert protective effects preventing at least some of these changes from occurring in treated cells, enhancing the antitumor actions of conventional treatments.

INTRODUCCIÓN

En esta Tesis Doctoral nos hemos planteado profundizar en el conocimiento del papel de la melatonina como agente sensibilizador a la radioterapia y a dos quimioterápicos antineoplásicos: el docetaxel y la doxorubicina, todos ellos parte de los protocolos comúnmente utilizados en el tratamiento del cáncer de mama. En esta introducción, comenzaremos por describir las principales características de los tumores mamarios, en particular de aquellos que son hormonodependientes. En segundo lugar, nos centraremos en la hormonoterapia, fundamentada en interferir con la síntesis o las acciones de los estrógenos, así como en la eficacia, las bases moleculares y los problemas de la radioterapia y la quimioterapia. Por último, hablaremos de la melatonina, la hormona pineal de la que se conoce que ejerce un papel oncostático en el cáncer de mama basado al menos en parte en sus acciones antiestrogénicas. Más concretamente, describiremos las acciones ya conocidas de la melatonina como adyuvante a la radioterapia y la quimioterapia y que son el punto de partido de este trabajo.

1.1 CÁNCER DE MAMA

Bajo el término cáncer de mama se agrupan una serie de enfermedades que como hecho común presentan una multiplicación descontrolada y autónoma de las células mamarias. En la mayor parte de los casos se trata de células epiteliales (carcinomas), aunque en algunos otros se pueden originar a partir de células musculares (sarcomas) y en casos extremadamente raros, a partir de células mioepiteliales (carcinoma mioepitelial). Generalmente, la proliferación descontrolada tiene su origen en el acúmulo temporal de una serie de alteraciones (como mutaciones, duplicaciones, translocaciones o deleciones) en el ADN de dichas células que no son correctamente reparadas e inducen procesos de malignización. Estas alteraciones en el ADN pueden ser somáticas o germinales, y se pueden producir tanto en células de los conductos ductales (carcinoma ductal) como en las células de los lobulillos (carcinoma lobulillar).

Al proliferar, las células forman un tumor *in situ* que a lo largo del tiempo va evolucionando hacia un crecimiento que finalmente puede derivar en la invasión de tejidos adyacentes y otras partes del cuerpo mediante la diseminación de las células tumorales a través de los vasos sanguíneos y/o linfáticos, generando de esta manera metástasis en tejidos alejados del foco primario (American Cancer Society, 2019).

1.1.1 Clasificaciones y estadificación

Los tumores mamarios se pueden clasificar de formas diferentes atendiendo a una serie de propiedades y características que se describen a continuación:

1.1.1.1 En función del origen histológico de las células tumorales

- Sarcomas, son poco frecuentes, estimándose que representan en torno al 1% del total. En este caso el origen del tumor está en las células del músculo, del tejido adiposo o del tejido conectivo.
- Carcinomas, si el origen del tumor tiene lugar a partir de las células epiteliales que revisten los órganos.
- Adenocarcinomas, un caso particular producido muy frecuentemente, que se corresponden con los tumores originados en el tejido glandular.
- Carcinoma mioepitelial, un caso de carcinoma extremadamente raro y que tiene su origen en las células del mismo nombre, con características duales entre células epiteliales y de músculo liso, y que forman una capa intermedia entre la membrana basal y el epitelio ductal o lobulillar.

1.1.1.2 Clasificación inmunohistoquímica

Esta clasificación está basada en la expresión de una serie de proteínas receptoras para hormonas y factores de crecimiento. Hay diversos métodos de valoración, que van desde el simple término “positivo” o “negativo”, el porcentaje de células que presentan receptores hormonales (entre 0% y 100%), o puntuaciones como la escala *Allred*, que varía entre 0 (ausencia de receptor) y 8 (máxima intensidad tras la tinción). De esta forma, los tumores se pueden incluir en las siguientes categorías:

- Receptores hormonales positivos, con dos proteínas a considerar: receptor de estrógeno positivo (ER+) y/o receptor de progesterona positivo (PR+). En este caso, los estrógenos estimulan el crecimiento tumoral, y las pacientes con este tipo de tumores tienden a tener niveles de estrógenos más altos de lo normal (Harfouche y cols., 2011). Es por ello que en estos casos la hormonoterapia es el tratamiento más comúnmente utilizado.
- Receptores del factor de crecimiento epidérmico humano 2 positivos (HER2+). En este segundo caso se incluirían tumores que presentan altos niveles de HER2/neu, un receptor de membrana con actividad tirosina quinasa considerado

como un protooncogén y para el que existen tratamientos consistentes en anticuerpos monoclonales como el Trastuzumab.

- Tumores triple negativos, si el tumor no expresa el receptor de estrógenos (ER-), el de progesterona (PR-), ni HER2/neu, (HER2-). En estos casos suele administrarse quimioterapia neoadyuvante como paso previo a la cirugía.

1.1.1.3 Clasificación anatomopatológica

Otra de las formas utilizadas para clasificar los tumores mamarios se basa en la parte de la mama donde se originan, encontrándonos así con:

- Lobulillares: si el tumor se origina en las glándulas que producen la leche.
- Ductales: constituyen la mayor parte de los tumores mamarios. Tienen su origen en los conductos ductales, que llevan la leche hacia el pezón.
- Otros tipos: en este último grupo podemos englobar el resto de las posibilidades, mucho menos comunes, como son la enfermedad de Paget del pezón, el tumor filoides o los angiosarcomas (American Cancer Society, 2019).

1.1.1.4 En función de su origen genético

Los tumores mamarios pueden tener un origen genético cuando existen mutaciones en la proteína de susceptibilidad al cáncer de mama tipo 1 (BRCA1) y/o a la proteína de susceptibilidad al cáncer de mama tipo 2 (BRCA2). BRCA1 se une al receptor de andrógenos (AR) potenciando los efectos mediados por estas hormonas, lo cual puede indicar que mutaciones en este oncogén podrían interferir o anular los efectos de los andrógenos y por lo tanto aumentar el riesgo de padecer cáncer de mama (Park y cols., 2000). Cabe destacar que sólo entre un 5-10% de los tumores mamarios están asociados con mutaciones en BRCA1 y BRCA2.

1.1.1.5 En función del estadio

El estadio del cáncer de mama establece si el tumor está circunscrito a una zona de la mama, si se ha propagado hacia otros tejidos mamarios o si se ha extendido hacia otras partes del cuerpo. El estadio considera cuatro factores: el tamaño del tumor, si el cáncer es invasivo, la presencia de células tumorales en los ganglios linfáticos axilares y la propagación fuera de la mama. Dicho estadio suele expresarse como un número entre 0 y IV, con algunas subdivisiones dentro de cada una de estas categorías, donde 0 se

corresponde con un tumor no invasivo *in situ* y IV indica el estadio más avanzado, con diseminación metastásica hacia otras partes del cuerpo.

1.1.2 Epidemiología

El cáncer de mama es el tumor más frecuente en la población femenina y representa una de las causas de muerte más importantes entre las mujeres de los países más desarrollados (IARC World Cancer Report, 2020). En el año 2018 se diagnosticaron cerca de tres millones de nuevos casos en el mundo (Bray y cols., 2018). El observatorio de la Asociación Española Contra el Cáncer (AECC) registró 33.307 nuevos casos en España en el año 2019, con un mayor número total de diagnósticos en mujeres entre 45 y 65 años. La tasa de incidencia nacional se sitúa en torno a 138 casos por cada 100.000 habitantes y probablemente debido al envejecimiento de la población, al diagnóstico precoz, y al aumento cuantitativo y cualitativo de los factores de riesgo, está aumentando lentamente en España y en todo el mundo. De esta manera, se estima que en la actualidad el riesgo de padecer cáncer de mama a lo largo de la vida es de aproximadamente 1 de cada 8 mujeres.

La incidencia del cáncer de mama tiende a ser mayor en países desarrollados, registrándose las tasas más elevadas entre la población caucásica de Estados Unidos y los países del norte y el oeste de Europa, mientras que las más bajas corresponden con países subdesarrollados de Asia y África (Botha y cols., 2003). Sin embargo, las tasas de mortalidad están descendiendo debido en gran parte a diagnósticos precoces y mejoras en los tratamientos.

1.1.3 Etiología

Hay multitud de parámetros que pueden ser considerados factores de riesgo, aumentando la probabilidad de que se produzca la aparición y el desarrollo del cáncer de mama. Entre ellos, podemos destacar los siguientes:

- Sexo: el cáncer de mama es mucho más frecuente en mujeres, ya que tienen una glándula mamaria más desarrollada cuyas células están expuestas además al constante estímulo de diversos factores de crecimiento y hormonas como el estradiol y la progesterona. Los hombres también pueden desarrollar este tipo de cáncer, pero la incidencia es muy baja, unas 100 veces menor que en la mujer (Sharon y Giordano, 2018).

- Edad: la probabilidad de padecer cáncer de mama aumenta a lo largo de toda la vida de la mujer, lo que probablemente está asociado a una exposición acumulativa a los factores de riesgo y a que los mecanismos de reparación van perdiendo eficacia con el envejecimiento. Este incremento es más acusado durante los años fértiles y se estabiliza a partir de la menopausia. Como dato, casi el 80% de las mujeres diagnosticadas con cáncer de mama invasivo superan los 40 años (Yancik y cols., 2001).
- Raza: está bien establecido que la incidencia de este tipo de tumores es mayor en mujeres caucásicas que en las mujeres africanas o asiáticas (Bernstein, 2002; Leong y cols., 2010). Sin embargo, también se ha comprobado que son las mujeres africanas las que desarrollan tumores mamarios más agresivos lo que por ende lleva parejo una mayor mortalidad (Morris y Mitchel, 2008).
- Estatus reproductor: el número de años de vida fértil está en relación directa con el riesgo de desarrollar un cáncer de mama; de esta manera, por cada año de adelanto de la menarquía el riesgo aumenta un 5%, y por cada año de retraso de la menopausia aumenta un 3% (Key y cols., 2001). Asimismo, los periodos de embarazo y lactancia reducen el riesgo de padecer este tipo de cáncer (MacMahon y cols., 1970), ya que reducen el número de ciclos menstruales en la vida de la mujer. Esto está en relación directa con la exposición a estrógenos, hormonas que tienen un papel fundamental en el desarrollo normal de la mama pero que a su vez pueden considerarse agentes carcinógenos.
- Terapia hormonal sustitutiva: las mujeres que reciben una terapia de reemplazamiento hormonal para paliar síntomas asociados a la menopausia también tienen un mayor riesgo de desarrollar este tipo de tumores, ya que la administración combinada de estrógenos y progestágenos promueve la proliferación de las células tumorales mamarias (Ross y cols., 2000; Schairer y cols., 2000).
- Anticonceptivos orales: algunos estudios epidemiológicos asocian el consumo de anticonceptivos orales basados en estrógenos y progestágenos sintéticos con un aumento del riesgo de cáncer de mama, probablemente debido a que las hormonas esteroides exógenas actuarían como un factor mitogénico tanto acelerando la proliferación de las células tumorales ya existentes como participando en la iniciación, esto es, la transformación de las células normales en atípicas (López-Otín y Diamandis, 1998; Davison y Davis, 2003).

- Medidas corporales: la altura de las personas está directamente relacionada con el riesgo de padecer cáncer de mama, de tal manera que la probabilidad aumenta un 10% por cada 10 cm de incremento en la altura (Hunter y Willett, 1993). La obesidad también está relacionada con un mayor riesgo, especialmente en mujeres postmenopáusicas (Brown y Simpson, 2012). La explicación a este hecho es que antes de la menopausia, los estrógenos son producidos mayoritariamente en los ovarios. Sin embargo, tras la menopausia es el tejido adiposo mamario el que se encarga de la producción mayoritaria de estrógenos. Un exceso de tejido adiposo en mujeres postmenopáusicas puede elevar los niveles de estrógenos aumentando así la probabilidad de padecer cáncer de mama.
- Antecedentes personales: una mujer que en el pasado haya desarrollado un tumor mamario tiene una probabilidad dos veces mayor de padecer un cáncer de mama contralateral (Horn y Thompson, 1988). Además, si una mujer desarrolla tumores benignos en la mama, el riesgo de presentar en el futuro un tumor maligno también se ve incrementado.
- Antecedentes familiares: aproximadamente el 25% de los tumores mamarios están relacionados con antecedentes familiares. Las mujeres con un familiar de primer grado con cáncer de mama tienen un riesgo 1,75 veces mayor, y las que tienen dos o más familiares de primer grado con esta patología ven su riesgo multiplicado por 2,5 (Brewer y cols., 2017).
- Factores genéticos: aproximadamente entre un 5% y un 10% de los casos tienen un origen hereditario. La causa más común en los casos hereditarios son mutaciones en los genes *BRCA1* y *BRCA2*, que presentan un tipo de transmisión autosómica dominante. El riesgo de padecer cáncer de mama en algún momento de la vida en las mujeres que presentan una mutación en alguno de estos genes es de hasta un 80-90% (Yoshida y Miki, 2004). Además, otros genes no específicos del cáncer de mama, que por tanto se encuentran mutados en multitud de tumores y que pueden incrementar el riesgo en la mama son: *TP53*, cuyo producto es el supresor de tumores p53; su principal diana transcripcional, *CDKN1A*, cuyo producto es p21; otro conocido supresor de tumores, *PTEN* (PI3K/AKT/fosfatasa y homólogo de tensina) y *HGNC* (serina/treonina proteína quinasa CHK2), que regula los puntos de control del ciclo celular.

- Factores ambientales: El incremento constante en la tasa de incidencia a lo largo de las últimas décadas puede ser explicado por la mayor exposición a factores medioambientales. Aunque por sí mismos no sean considerados carcinógenos, sus efectos son acumulativos y a largo plazo pueden provocar alteraciones hormonales que deriven en esta patología (Silva y cols., 2002; Rajapakse y cols., 2002; Tinwell y Ashby, 2004). Dentro de estos factores podemos considerar tres grandes grupos: físicos, como la radiación ionizante o la exposición a campos electromagnéticos, los cuales van a depender de la dosis y la edad a la que se produzca la exposición, afectando más durante la pubertad; factores químicos; como metales, disolventes orgánicos, asbestos, arsénico, aflatoxinas o algunos componentes del tabaco; o por último, los factores biológicos, como pueden ser algunas infecciones causadas por virus, bacterias o parásitos (OMS, 2019).
- Estilo de vida: los alimentos ricos en ácidos grasos de origen animal (Wu y cols., 1999; Wu, 2000), el alcohol (Longnecker y cols., 1995) o el tabaco (*IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks To Humans*, 2004) también son factores de riesgo.
- Tejido mamario denso: las mamas que presentan una mayor proporción de tejido fibroso y glandular respecto al adiposo tienen mayor riesgo de malignizarse.
- Alteración de los ritmos circadianos: la exposición a la luz artificial durante la noche (LAN, *Light at night*) puede provocar desajustes en los patrones de síntesis y secreción de algunas hormonas (fundamentalmente de la melatonina) favoreciendo así la aparición de tumores. En este sentido, se ha descrito en un estudio realizado con más de 100.000 mujeres, que aquellas que trabajaron durante más de 20 años en turnos nocturnos presentan un riesgo mucho mayor de desarrollar la enfermedad (Schernhammer y cols., 2006). La supresión de melatonina debido a la exposición a la luz durante la fase de oscuridad se ha identificado como un biomarcador de detección temprana de desórdenes metabólicos y desarrollo de cáncer de mama (Davis y cols., 2001; Zubidat y Haim, 2017). Ambos síndromes están asociados a la disrupción circadiana y al aumento del apetito por un déficit de melatonina (Chojnacki y cols., 2016). Cabe destacar que la actividad física reduce el riesgo de padecer cáncer de mama, especialmente en mujeres postmenopáusicas, debido a sus efectos sobre el peso corporal, la inflamación, el balance energético y el sistema hormonal. Es posible que el ejercicio aumente la síntesis de melatonina, reduciendo así el riesgo de desarrollar tumores mamarios (OMS, 2019).

- Al analizar estos factores puede observarse que la presencia de estrógenos es bastante recurrente en muchos de ellos. La correlación entre la función ovárica y el cáncer de mama fue descrita por primera vez por Beatson hace más de 120 años, quien postuló y comprobó que la ovariectomía bilateral inhibía el crecimiento de los tumores de mama en mujeres (Beatson, 1896). Desde entonces, numerosos estudios relacionaron la exposición a estrógenos sostenida y acumulativa a lo largo de la vida con un mayor riesgo de desarrollar cáncer de mama (Thomas y cols., 1997; Russo y Russo, 1998; Yager, 2000; González y cols., 2019). En la menopausia, con excepción de una pequeña contribución ovárica, aún se sintetizan estrógenos (fundamentalmente en el tejido adiposo) a partir de los andrógenos suprarrenales. De esta manera, la mama tumoral presenta concentraciones de estrógenos muy elevadas con respecto a la mama normal o al plasma (van Landeghem y cols., 1985).

1.1.4 Papel de los estrógenos en el cáncer de mama

El desarrollo de la mama durante la pubertad y la madurez sexual es estimulado por la hormona 17β -estradiol, que es la molécula más activa desde el punto de vista fisiológico en los tejidos mamarios. Sin embargo, existen multitud de evidencias que relacionan el tiempo de exposición a los estrógenos con el riesgo de padecer cáncer de mama, de tal manera que, como hemos mencionado anteriormente al hablar de la etiología de este tipo de cáncer, el número de años de vida fértil se puede considerar un factor de riesgo y de esta manera, las hormonas sexuales femeninas, especialmente el 17β -estradiol, se pueden considerar como agentes carcinógenos (Germain, 2011). Tanto la génesis como la progresión de la enfermedad están relacionadas con la capacidad de los estrógenos para estimular la proliferación de las células epiteliales del sistema reproductor femenino y de las glándulas mamarias (Dickson y Stancel, 2000). En el cáncer de mama, más del 95% de los casos diagnosticados son inicialmente hormonodependientes y en todos los casos el 17β -estradiol es fundamental tanto en la génesis como en la progresión tumoral. *In vitro*, en células epiteliales mamarias humanas, se ha descrito que el 17β -estradiol es capaz de inducir niveles de transformación neoplásica similares a los alcanzados con otros reconocidos carcinógenos (Russo y Russo, 1998; Russo y cols., 2006). Los estrógenos son capaces de estimular la proliferación de las células tumorales mamarias a través de una serie de efectos genómicos y no genómicos. Los efectos genómicos implican la unión de la hormona con el receptor, lo que provoca la dimerización del mismo y la unión directa al ADN, comportándose como un factor de transcripción, en promotores que

contienen elementos de respuesta a estrógenos (ERE), pero también de una manera indirecta, interaccionando con los complejos proteicos AP-1, NF-kB o SP1. Los efectos no genómicos tienen lugar a través de la activación de adenilato ciclasa y la producción del AMPc (Aronica y cols, 1994) y mediante la activación de las MAP quinasas (Migliaccio y cols, 1996).

Los receptores de estrógenos (RE) funcionan como factores de transcripción que se encargan de llevar a cabo los efectos de dichas hormonas regulando la expresión génica de las células (Katzenellenbogen y Katzenellenbogen, 2000). Desde hace ya un par de décadas se ha demostrado la existencia de dos receptores de estrógenos, el RE α (primero en identificarse) y el RE β . En el epitelio mamario el más abundante es el RE α , que se encarga de regular el desarrollo de las glándulas mamarias en la pubertad, pero también la progresión tumoral en los casos de cáncer de mama (Mueller y cols., 2002). Ambos receptores presentan una característica común a los miembros de la superfamilia de los receptores nucleares que es poseer una cadena polipeptídica sencilla con estructuras modulares, en la que se distinguen tres regiones: un dominio amino terminal variable, un dominio de unión al ADN altamente conservado y un dominio carboxilo terminal al que se une el ligando (Heldring y cols., 2007). Además, existen dos dominios de transactivación, denominados AF-1 y AF-2 (*Activation Function 1 y 2*), que facilitan la activación transcripcional por reclutamiento de varios complejos de proteínas correguladoras. Más concretamente, AF-1 es un dominio constitutivamente activo y situado en la parte amino-terminal del receptor; y AF-2 es dependiente de ligando y localizado en el dominio LBD carboxilo-terminal (Nilsson y cols., 2001). Las diferentes actividades de AF-1 y la AF-2 podrían estar mediadas por adaptadores o coactivadores específicos (Parker, 1998).

En lo referente al cáncer de mama, aproximadamente dos de cada tres tumores mamarios presentan niveles elevados del receptor de estrógenos alfa y del receptor de progesterona. En las últimas décadas se han descubierto formas o variantes alternativas del RE α , tales como el RE γ el GPER1, que tienen la peculiaridad de ser activados no sólo por estrógenos, sino también por alguno de los agentes terapéuticos utilizados en hormonoterapia, como el tamoxifeno; esto hace que se activen vías como la de las MAP quinasas, lo que lleva a una mayor proliferación celular, ocasionando que la terapia con los antiestrógenos acabe por ser inefectiva (Ranganathan y cols., 2019).

Por otro lado, a pesar de que los ovarios son los órganos encargados de la producción principal de estrógenos, éstos también pueden ser sintetizados en los tejidos periféricos a partir de andrógenos (mediante la acción del complejo enzimático de la aromatasa) como ocurre en la menopausia tras el cese de la función folicular (Yue y cols., 1998). En esta situación tiene especial importancia la producción de estradiol por parte del tejido adiposo, el cual llega a la mama de manera endocrina. También es relevante el hecho de que el propio tejido mamario puede aumentar la concentración local de estrógenos mediante la alteración de la expresión de diversos genes, fundamentalmente mediante la sobreexpresión de la aromatasa.

En cuanto a las hipótesis propuestas para tratar de explicar los mecanismos implicados en los efectos carcinogénicos de los estrógenos están las siguientes:

- La unión de los mismos a su receptor provoca la activación de éste, convirtiéndolo en un factor de transcripción que promueve la expresión de genes implicados en supervivencia, proliferación celular, invasividad y metástasis. El incremento en la tasa de proliferación favorece además la aparición de errores en la replicación y alteraciones puntuales en el ADN (Preston-Martin y cols., 1990).
- Efectos genotóxicos: los estrógenos pueden metabolizarse dentro de las células transformándose en derivados de quinonas, compuestos capaces de reconocer y unirse con gran afinidad a las purinas (adenina y guanina) haciendo que sean eliminadas por la maquinaria de corrección de errores del ADN, lo que potencialmente puede generar mutaciones. Esta hipótesis se apoya en la evidencia experimental, ya que se ha descrito que ratones *knockout* para el receptor de estrógenos desarrollan tumores cuando son tratados con 17 β -estradiol (Bocchinfuso y Korach, 1997).
- Inducción de aneuploidía: el 17 β -estradiol parece estar implicado en la segregación anormal de cromosomas (Quick y cols., 2007) que sucede en las primeras fases de las lesiones tumorales mamarias (Arnerlöv y cols., 2001).
- Por último, los estrógenos regulan la angiogénesis, resultando en un peor pronóstico (Van't Veer y cols., 2002). La activación de la señalización mediada a través del RE en las células tumorales puede desencadenar la expresión de factores proangiogénicos, modificando así el microambiente tumoral y estimulando la formación de nuevos vasos (Buteau-Lozano y cols., 2002).

1.1.5 Tratamiento del cáncer de mama

El tratamiento del cáncer de mama depende en gran medida del tipo de tumor, de la expresión o no de los receptores de estrógenos, de progesterona y de HER2/neu, y del estadio en el que se encuentre la enfermedad, ya que tan efectivo como los tratamientos a pautar es la detección precoz. Una vez establecido el diagnóstico, los procedimientos a seguir pueden ser locales, entre los que podrían incluirse la cirugía y la radioterapia; o sistémicos, basados en la administración de fármacos que contrarresten el efecto perjudicial de los estrógenos sobre la glándula mamaria (en cuyo caso hablamos de hormonoterapia); o compuestos que dificulten la división celular como los agentes antineoplásicos (quimioterapia). Los tratamientos sistémicos pueden administrarse vía oral o directamente al torrente sanguíneo.

1.1.5.1 Terapia antiestrogénica (hormonoterapia)

Basándose en el hecho de que los estrógenos juegan un papel crucial en la génesis y la progresión tumoral mamaria, y debido también al gran porcentaje de pacientes con tumores positivos para el receptor de estrógenos, una de las estrategias fundamentales de la terapia antineoplásica está enfocada a contrarrestar los efectos perjudiciales de los estrógenos sobre la glándula mamaria.

La ovariectomía fue el primer “tratamiento” antiestrogénico aplicado (aún sin el conocimiento de los estrógenos y sus acciones), y desde entonces el abordaje de la enfermedad ha ido evolucionando con el desarrollo de numerosos fármacos antiestrogénicos cuyos objetivos son, bien disminuir los niveles de estas hormonas, bien interferir con la respuesta mediada por el receptor de estrógenos. De ahí que se puedan establecer dos grandes grupos: los moduladores selectivos del receptor de estrógenos (*Selective Estrogen Receptor Modulators*, *SERM*); y los inhibidores selectivos de las enzimas implicadas en la síntesis de estrógenos (*Selective Estrogen Enzyme Modulator*, *SEEM*) (**figura 1.1**).

Los moduladores *SERM* se comportan como agonistas parciales o antagonistas de los estrógenos, es decir, se unen al receptor de estrógenos, bloqueándolo y por tanto impiden a los estrógenos unirse a él. Quizás el más utilizado en clínica, sobre todo en mujeres premenopáusicas, es el tamoxifeno, cuya transformación intracelular en su forma activa 4-hidroxitamoxifeno, funciona como un antagonista en la célula tumoral mamaria, debido a que el complejo 4-hidroxitamoxifeno-RE α sufre un cambio conformacional particular,

de tal forma que la hélice 12 ocluye el surco de reconocimiento del coactivador, lo que por tanto impide la transcripción génica mediada por el estradiol (Shiau y cols., 1998). Sin embargo, el tamoxifeno presenta algunos efectos adversos y un problema importante, que es el actuar como agonista y no como antagonista en el endometrio. Además, el tamoxifeno tiene tendencia a unirse al ADN formando aductos. Por esta razón, se han ido desarrollando otros antiestrógenos con modificaciones en su estructura y con menor riesgo de desarrollar cáncer de útero si bien presentan algunos otros problemas como el mayor riesgo de eventos trombovasculares (Mustonen y cols., 2014). Entre estos compuestos podrían incluirse fármacos como el toremifeno, raloxifeno, bazedoxifeno y lasofoxifeno. Por último, el fulvestrant es un antagonista puro del receptor de estrógenos que se administra a mujeres postmenopáusicas con cáncer de mama avanzado (metastásico) positivo para el receptor.

Los inhibidores *SEEM* buscan interferir con la síntesis de las hormonas esteroideas a través de la inhibición de las enzimas implicadas en la transformación de andrógenos en estrógenos biológicamente activos. Antes de la menopausia, la mayor fuente de estrógenos son los ovarios, pero cuando éstos dejan de funcionar, se siguen produciendo estrógenos gracias a la actividad de la enzima aromatasa, una monooxigenasa que cataliza la síntesis de estrona y estradiol utilizando como sustrato los precursores androgénicos suprarrenales. Es importante resaltar que, en los tumores mamarios, una fuente importante de estrógenos procede del tejido graso peritumoral, donde la aromatasa se expresa abundantemente. Dentro de los *SEEM* se encuentran compuestos esteroideos (aminoglutetimida y exemestano) que se unen a la enzima de manera irreversible; y compuestos no esteroideos (anastrozol y letrozol) cuya unión es reversible.

Por último, existen algunos fármacos que interfieren con el eje hipotálamo-hipófisis-gónadas, entre los que se puede citar la triptorelina, más frecuentemente utilizada en el tratamiento del cáncer de próstata, pero que en la mama permite reducir temporalmente la función del ovario mientras la paciente recibe quimioterapia.

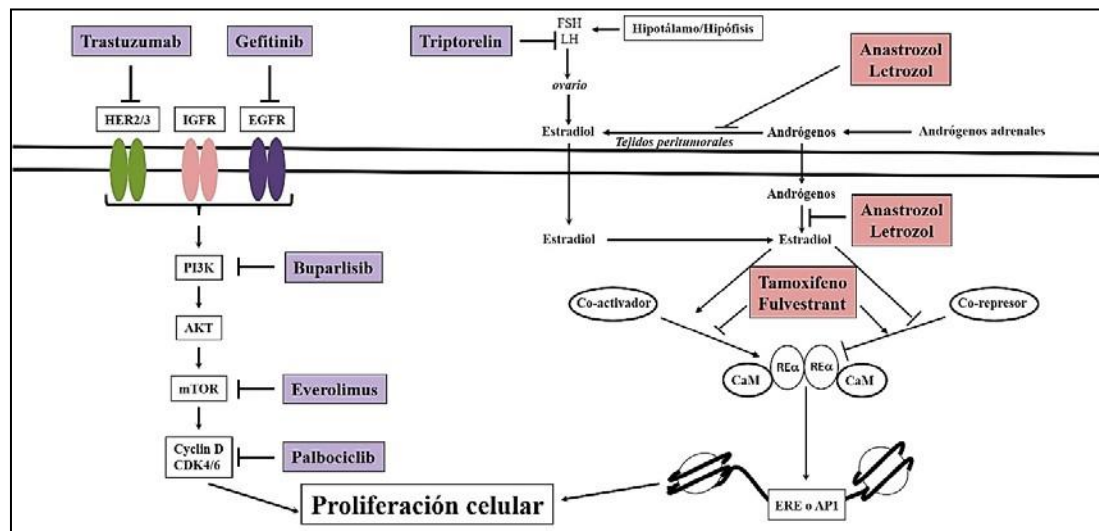


Figura 1.1: Mecanismos de acción de la hormonoterapia y de las terapias dirigidas diseñadas para mejorar la eficacia de los tratamientos endocrinos en el cáncer de mama. El Tamoxifeno o el Fulvestrant son fármacos considerados como *SERM*, que impiden la actividad del receptor de estrógenos. El Anastrozol o el Letrozol son fármacos considerados como *SEEM*, que inhiben la actividad aromatasa, impidiendo la síntesis de estrógenos tanto en tejido tumoral como peritumoral. Asimismo, existen otras terapias dirigidas (cuadros morados) para inhibir de manera específica la vía de PI3K/Akt/mTor, implicada en proliferación y resistencia; o inhibidores de receptores de factores de crecimiento. REα: Receptor de estrógenos alfa. CaM: Calmodulina. ERE: Elemento de respuesta a estrógenos. AP-1: Elemento de respuesta a AP-1. IGFR: Receptor para el factor de crecimiento insulínico; EGFR: Receptor para el factor de crecimiento epidérmico. FSH: Hormona folículo-estimulante. LH: Hormona luteinizante.

1.1.5.2 Terapia dirigida frente al cáncer de mama dependiente de hormonas

La terapia dirigida consiste en el diseño de fármacos contra determinadas proteínas, generalmente de superficie, que se expresan en las células tumorales, de manera que éstas se convierten en dianas específicas de los mismos. En el caso de las pacientes que presentan tumores mamarios positivos para el receptor de estrógenos, el tratamiento hormonal resulta útil, pero puede ser menos efectivo de lo esperado o ir desarrollando resistencia al mismo. Por ello, se han ido ensayando combinaciones con inhibidores selectivos de la vía PI3K/Akt/mTOR/CDK4/6 (Nunnery y Mayer, 2020), debido fundamentalmente a que la activación de esta vía está implicada en el desarrollo de resistencia a la terapia endocrina (**figura 1.1**). Entre los inhibidores más prometedores de esta vía están: el buparlisib, que interfiere con la actividad de la PI3K impidiendo la producción del segundo mensajero fosfatidil inositol trifosfato (PI3); en monoterapia ha mostrado una eficacia modesta pero coopera efectivamente con la hormonoterapia (Criscitiello y cols., 2018); el everolimus, un inhibidor selectivo de mTOR, que se suele administrar en combinación con exemestano y que reduce el riesgo de progresión en los tumores mamarios metastásicos positivos para el receptor de estrógenos (Raphael y cols., 2020); y el palbociclib, que es un inhibidor reversible y selectivo de CDK4 y CDK6,

uniéndose al bolsillo de unión al ATP y actuando con la misma potencia contra las dos quinasas (Roncato y cols., 2020).

1.1.5.3 Terapia dirigida al cáncer en general

Muchos otros fármacos se han diseñado no sólo para el tratamiento del cáncer de mama dependiente de hormonas, sino para el cáncer de mama en general y para otros muchos tipos de tumores, aunque al igual que los descritos en el caso anterior, están diseñados para bloquear proteínas diana clave para la progresión tumoral de manera específica. Entre ellas, quizás la más estudiada ha sido el producto del gen *HER2/neu* o *ErbB2*, que es el receptor del factor de crecimiento epidérmico humano, con actividad tirosina quinasa y que se encuentra sobreexpresado en aproximadamente un 30% de los tumores mamarios. Las células que presentan altos niveles de esta proteína en su membrana plasmática responden de manera exacerbada a concentraciones fisiológicas de factores de crecimiento, por lo que se multiplican velozmente llegando a originar tumores. Para tratar a estos pacientes se utilizan anticuerpos monoclonales como el trastuzumab o pequeñas moléculas que actúan como inhibidores como el lapatinib (Tesch y Gelmon, 2020). Otra posibilidad es utilizar un inhibidor de la actividad tirosina quinasa del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) como el gefitinib (Milik y cols, 2017). Por último, en las pacientes con mutaciones en los genes *BRCA1* y *BRCA2* se utiliza el olaparib, un inhibidor de la poli-ADP-ribosa polimerasa 1 (PARP1), que se une impidiendo la reparación de las roturas monocatenarias del ADN, lo que provoca la muerte de las células tumorales.

1.1.5.4 Quimioterapia

En general, los tratamientos con quimioterapia buscan interferir con el crecimiento y la proliferación de las células en división, actuando en diferentes fases del ciclo celular. Originalmente se administraban las dosis máximas tolerables dejando periodos de descanso entre cada toma para que el organismo se recuperase de su toxicidad. Actualmente se están estudiando otras maneras de administración posiblemente más efectivas, como la quimioterapia metronómica, la cual consiste en la administración de dosis más bajas (subtóxicas) pero sin los periodos de descanso, tratando así de evitar posibles resistencias al tratamiento (Biziota y cols., 2016). Según el momento en el que se utilice, la quimioterapia puede ser adyuvante, posterior a la cirugía para tratar de

eliminar células tumorales que se hayan propagado; o neoadyuvante, previa a la cirugía para reducir el tamaño del tumor y facilitar la intervención quirúrgica.

Una clasificación de los fármacos antineoplásicos se recoge en la **tabla 1.1**. Hay agentes alquilantes que ejercen su acción citotóxica mediante la formación de enlaces covalentes entre sus grupos alquilo y las bases nitrogenadas del ADN, bloqueando la replicación del mismo y la transcripción; antibióticos que ejercen diversas acciones como intercalarse en el ADN o dañarlo mediante oxidaciones que llevan a roturas de hebra simples y dobles. Dentro de este grupo están las antraciclinas como la doxorubicina (uno de los antineoplásicos que se han utilizado en el presente trabajo), que se intercala entre las hebras del ADN interfiriendo con la replicación y la transcripción e inhibiendo a la topoisomerasa II que mantiene la estructura terciaria del mismo; antimetabolitos, como los análogos de purinas y pirimidinas, que interfieren con la replicación e inhiben a las ADN polimerasas, la ADN primasa y la ADN ligasa I; modificadores de diversas vías biológicas, como el interferón gamma, con efectos pleiotrópicos; inhibidores de deacetilasas, cuyo efecto probablemente es permitir la expresión de genes que actúan como supresores de tumores; agentes utilizados en la hormonoterapia, para el tratamiento del cáncer de mama, ovario y próstata; anticuerpos monoclonales como el trastuzumab al que ya hemos mencionado en la terapia dirigida; inhibidores de multitud de proteínas quinasas participantes en vías de señalización intracelular; los taxanos, que se unen a la β -tubulina localizada en la cara interior de los microtúbulos impidiendo la despolimerización de los mismos e inhibiendo así la división celular. En este grupo está incluido el segundo antineoplásico utilizado en este trabajo: el docetaxel; los alcaloides de la vinca, que ejecutan justo la acción contraria, impidiendo la polimerización de los microtúbulos; inhibidores de la topoisomerasa y otros fármacos que al no encajar en ningún grupo de los anteriormente descritos y al presentar características distintas entre ellos, se pueden encajar en un grupo denominado “misceláneo”.

Agentes alquilantes:

Altretamine, Bendamustine, Busulfan, Carmustine, Chlorambucil, Cyclophosphamide, Dacarbazine, Ifosfamide, Lomustine, Mechlorethamine, Melphalan, Procarbazine, Streptozocin, Temozolomide, Thiotepa, Trabectedin, Carboplatin, Cisplatin, Oxaliplatin.

Antibióticos:

Bleomycin, Dactinomycin, Daunorubicin, Doxorubicin, Epirubicin, Idarubicin, Mitomycin, Mitoxantrone, Plicamycin, Valrubicin

Antimetabolitos (Antifolatos):

Methotrexate, Pemetrexed, Pralatrexate, Trimetrexate

Antimetabolitos (Análogos de purinas):

Azathioprine, Cladribine, Fludarabine, Mercaptopurine, Thioguanine

Antimetabolitos (Análogos de pirimidinas):

Azacitidine, Capecitabine, Cytarabine, Decitabine, Floxuridine, Fluorouracil, Gemcitabine, Tipracil

Modificadores de respuestas biológicas:

Aldesleukin (IL-2), Denileukin Diftitox, Interferon Gamma

Inhibidores de histona deacetilasas:

Belinostat, Panobinostat, Romidepsin, Vorinostat

Agentes hormonales:

Abiraterone, Apalutamide, Bicalutamide, Cyproterone, Enzalutamide, Flutamide, Nilutamide, Anastrozole, Exemestane, Fulvestrant, Letrozole, Raloxifene, Tamoxifen, Toremifene, Degarelix, Goserelin, Histrelin, Leuprolide, Triptorelin

Anticuerpos monoclonales:

Alemtuzumab, Atezolizumab, Avelumab, Bevacizumab, Blinatumomab, Brentuximab, Cemiplimab, Cetuximab, Daratumumab, Dinutuximab, Durvalumab, Elotuzumab, Gemtuzumab, Inotuzumab, Ozogamicin, Ipilimumab, Mogamulizumab, Moxetumomab, Pasudotox, Necitumumab, Nivolumab, Ofatumumab, Olaratumab, Panitumumab, Pembrolizumab, Pertuzumab, Ramucirumab, Rituximab, Tositumomab, Trastuzumab

Inhibidores de proteína quinasas:

Abemaciclib, Acalabrutinib, Afatinib, Alectinib, Axitinib, Binimetinib, Bortezomib, Bosutinib, Brigatinib, Cabozantinib, Carfilzomib, Ceritinib, Cobimetinib, Copanlisib, Crizotinib, Dabrafenib, Dacomitinib, Dasatinib, Duvelisib, Enasidenib, Encorafenib, Erlotinib, Gefitinib, Gilteritinib, Glasdegib, Ibrutinib, Idelalisib, Imatinib, Ivosidenib, Ixazomib, Lapatinib, Larotrectinib, Lenvatinib, Lorlatinib, Midostaurin, Neratinib, Nilotinib, Niraparib, Olaparib, Osimertinib, Palbociclib, Pazopanib, Ponatinib, Regorafenib, Ribociclib, Rucaparib, Ruxolitinib, Sonidegib, Sorafenib, Sunitinib, Talazoparib, Trametinib, Vandetanib, Vemurafenib, Vismodegib

Taxanos:

Cabazitaxel, Docetaxel, Paclitaxel

Inhibidores de topoisomerasa:

Etoposide, Irinotecan, Teniposide, Topotecan

Alcaloides de la vinca:

Vinblastine, Vincristine, Vinorelbine

Misceláneo:

Asparaginase, Eribulin, Everolimus, Hydroxyurea, Ixabepilone, Lenalidomide, Mitotane, Omacetaxine, Pomalidomide, Tagraxofusp, Telotristat, Temsirolimus, Thalidomide, Venetoclax

Tabla 1.1: Clasificación de los fármacos comúnmente utilizados en quimioterapia.

La dinámica de los microtúbulos es crucial para la correcta mitosis de las células. Por esta razón, los compuestos capaces de interferir con los microtúbulos durante la división celular resultan eficaces sobre las células que presentan altas tasas de proliferación. Estos compuestos se conocen como MIAs (*Microtubule Interfering Agents*) y están considerados como uno de los grupos de fármacos más efectivos en el tratamiento del cáncer. Dentro de los MIAs se encuentran los taxanos y los alcaloides de la vinca que como acabamos de describir, interfieren con la despolimerización y la polimerización de los microtúbulos respectivamente. El docetaxel (Taxotere) estimula el ensamblaje de la tubulina en los microtúbulos y estabiliza su formación, inhibiendo su despolimerización (Xiao y cols., 2006). En su utilización clínica en pacientes con cáncer de mama metastásico, el docetaxel ha demostrado ser, en monoterapia, más eficaz que la doxorubicina o la combinación de fluorouracilo más vinblastina, con unos efectos adversos como la neutropenia aceptables en comparación con los otros antineoplásicos citados (Lyseng-Williamson y Fenton, 2005); además de administrarse en monoterapia suele utilizarse como terapia neoadyuvante o adyuvante tras la cirugía, normalmente en combinación con ciclofosfamida (**figura 1.2**).

Otra de las alternativas consideradas entre los agentes antineoplásicos es la doxorubicina. Este antimitótico perteneciente al grupo de las antraciclinas puede utilizarse en monoterapia o en combinación con otros antineoplásicos, como la ciclofosfamida. También es frecuente administrar ciclos de doxorubicina/ciclofosfamida seguidos de paclitaxel y trastuzumab, y está indicada tanto en enfermedad inicial como en el cáncer metastásico (**figura 1.2**). El principal obstáculo a la utilización de la doxorubicina es su cardiotoxicidad, que puede ser explicada por diferentes mecanismos, uno de los cuales podría ser la pérdida de expresión de *PTEN* (Li y cols., 2020c). Otro de los problemas inherentes a la utilización de doxorubicina es la frecuente adquisición de quimiorresistencia. Recientemente, se ha descrito que un alto nivel de expresión del gen *TWIST1* es un biomarcador que permite predecir el desarrollo de resistencia a la antraciclina (Demir y cols., 2019).

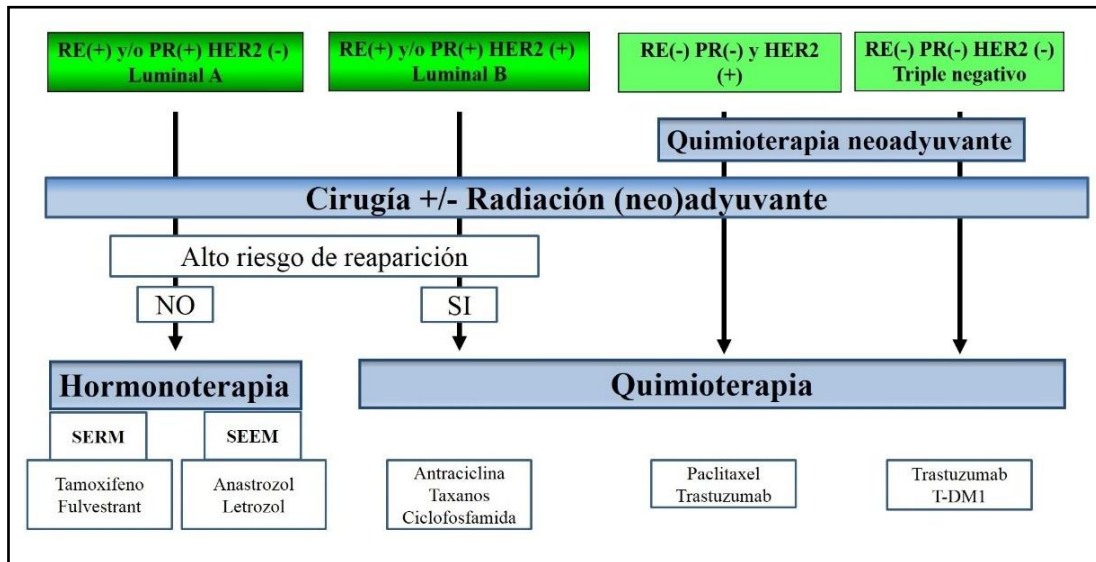


Figura 1.2: Esquema representativo de los tratamientos más comúnmente utilizados en la terapia del cáncer de mama. Todos los tumores se pueden tratar con radiación ionizante (tratamiento localizado) para reducir el tamaño del tumor antes de la cirugía de manera neoadyuvante o para eliminar restos tumorales después de la cirugía de manera adyuvante y/o quimioterapia (tratamiento sistémico) para inhibir la división celular. En el caso de los tumores hormonodependientes también se usa la hormonoterapia, que consiste en el uso de moléculas capaces de bloquear el receptor de estrógenos (SERM) y/o inhibir la síntesis de estrógenos (SEEM).

1.1.5.5 Radioterapia

La radioterapia es un tratamiento local que puede utilizarse tanto de manera adyuvante como neoadyuvante (**figura 1.2**). La radioterapia consiste en el uso de radiación ionizante de alta energía, cuya diana principal a nivel celular es el ADN (Zhang y cols., 2015). A medida que la radiación interacciona directamente con el ADN o bien a través de la ionización de moléculas de agua, produce radicales altamente reactivos, normalmente especies reactivas de oxígeno o de nitrógeno; de esta manera, los nucleósidos van siendo dañados lo que resulta en la rotura de las hebras de ADN o bien el establecimiento de enlaces covalentes entre las mismas (Hall y Giaccia, 2012). El empleo de la radioterapia también tiene una serie de efectos adversos, variables según las personas, pero que pueden llegar a ser severos, como quemaduras en la piel, náuseas, vómitos, pérdida de pelo, inflamación en la boca o diarreas.

1.1.6 Inconvenientes de las terapias convencionales y búsqueda de moléculas adyuvantes

A pesar de su gran utilidad en el tratamiento del cáncer de mama, los fármacos de quimioterapia y el uso de la radioterapia presentan algunos inconvenientes. En primer lugar, están los efectos secundarios debidos a su inespecificidad, ya que éstos compuestos afectan de manera indiscriminada tanto a células tumorales como a células sanas. Esto afecta especialmente a las células del organismo que se encuentran en división activa, como por ejemplo las células sanguíneas, gastrointestinales, de la mucosa bucal y los folículos pilosos, provocando respectivamente bajos recuentos sanguíneos, náuseas y diarreas, afectaciones bucales y pérdida de cabello. Estos efectos suelen revertir cuando cesa el tratamiento.

Otro de los problemas de la radioterapia y la quimioterapia es el desarrollo de resistencia, lo que implica que el uso reiterado de la radiación o de un mismo compuesto sobre un paciente puede terminar siendo ineficaz. Aunque el tumor llegue a reducirse considerablemente, existe la posibilidad de que algunas células tumorales desarrollen una resistencia a ese compuesto, sobrevivan y vuelvan a proliferar. Para evitar estas recidivas conviene utilizar más de un fármaco de manera alterna o cambiarlo si el tumor reaparece.

Por último, la radioterapia y quimioterapia plantean un tercer problema que no debe pasar desapercibido. Los tratamientos inducen alteraciones en la expresión génica de las células, de tal manera que pueden estar aumentando la expresión de oncogenes (genes que transforman una célula normal en maligna) y reduciendo la expresión de genes supresores tumorales (genes que reducen la probabilidad de que una célula se transforme en cancerígena, por ejemplo, inhibiendo una excesiva proliferación). La descripción de los cambios que la radioterapia y la quimioterapia produce en la expresión génica, y la búsqueda de compuestos que puedan contrarrestar dichas alteraciones indeseadas, constituye un campo de investigación actualmente en desarrollo. Esto sugiere la necesidad de encontrar moléculas que actúen como radiosensibilizadores y quimiosensibilizadores, potenciando el efecto de los tratamientos sobre las células tumorales, y si es posible, que actúen como radioprotectores y quimioprotectores, paliando algunos de los efectos adversos de la quimioterapia y la radioterapia.

1.1.7 La expresión génica en el cáncer de mama

En el cáncer de mama, al igual que en otros muchos tipos de cánceres, se producen cambios a nivel del material genético como amplificaciones, deleciones, mutaciones, o metilaciones de promotores, que conducen a la ganancia y/o pérdida de funciones no existentes en el tejido normal. Muchos de los genes alterados son comunes a diferentes tipos de tumores, mientras que otros, sin ser exclusivos, se asocian más específicamente con el cáncer mamario.

En el caso concreto del cáncer de mama, los más característicos son los genes *BRCA1* y *BRCA2*, ya mencionados anteriormente, cuya mutación eleva enormemente el riesgo de desarrollar este tipo de tumores. No obstante, también es frecuente encontrar alteraciones en otros genes como el *ESR1* (receptor de estrógenos alfa), muy frecuentemente sobreexpresado al menos en las etapas iniciales de los tumores mamarios; el gen que codifica para el receptor de progesterona; o la presencia o no del gen *HER2/neu*. Asimismo, se han descrito alteraciones en el estado de activación de multitud de vías de señalización, siendo la más característica la vía de PI3K/AKT/mTOR, ya reseñada anteriormente y cuya activación conduce a proliferación y resistencia.

En definitiva, existen una gran cantidad de genes y vías para los que se ha ido demostrando su implicación en el cáncer, de tal modo que cientos de proteínas han sido identificadas y asociadas con el cáncer de mama. Los genes se pueden clasificar en grupos según sus funciones (implicados en proliferación, control de la progresión a través del ciclo celular, apoptosis, angiogénesis, factores de transcripción, transducción de señales, invasión o apoptosis); y también pueden ser relacionados con determinadas consecuencias funcionales, con el estadio y con los subtipos del cáncer: relacionados con el estatus del receptor de estrógenos, genes relacionados con la adquisición de resistencia, con el daño celular, o con la transición epitelio-mesénquima.

Todo esto ha llevado a la aparición de *tests* diseñados para caracterizar los cambios producidos a nivel molecular en cada muestra, con el objetivo de elegir el tratamiento que más se ajuste al perfil génico del tumor ante el que nos encontramos, y de esta manera evitar efectos secundarios asociados a tratamientos innecesarios; algunas de estas herramientas genéticas son: *Oncotype DX*, *MammaPrint*, *PAM50/Prosigna*, *EndoPredict* o el *Theros-Breast Cancer Gene Expression Ratio Assay* (Caputo y cols., 2020). Dos de los más utilizados en España son el *Oncotype Dx* y el *MammaPrint*. El primero de ellos

valora 19 genes relacionados con el cáncer obteniendo una RS (*Recurrence Score*) que permite establecer tres categorías: bajo riesgo ($RS < 18$), riesgo intermedio ($RS 18-30$) y riesgo alto ($RS > 31$). El RS por tanto permite predecir la sensibilidad a la quimioterapia en pacientes con tumores RE (+) que no han diseminado a tejidos adyacentes. El *MammaPrint*, por su parte, consta de un panel de expresión génica en el que se valoran 70 genes relacionados con diferentes aspectos relacionados con el riesgo de metástasis; suele utilizarse para la valoración en pacientes con tumores invasivos, en estadio I o II y con menos de tres ganglios linfáticos afectados (Xin y cols., 2017).

Parece claro que ésta es una de las estrategias que se utilizarán en los próximos años, no sólo en el diagnóstico personalizado sino también para establecer un pronóstico, con el objetivo de seleccionar en base a estas herramientas moleculares los tratamientos más convenientes a utilizar. Es importante reseñar que el conocimiento de las alteraciones moleculares que se producen en las células tumorales en respuesta a los diferentes tratamientos antineoplásicos se está desarrollando con posterioridad a la caracterización de los cambios que se producen en el inicio y desarrollo tumorales (antes del tratamiento) y que por ello, las alteraciones potencialmente negativas que los distintos agentes quimioterápicos ocasionan sobre las células que sobrevivan al tratamiento, y que pueden llevar, por ejemplo, al desarrollo de resistencia, están aún lejos de conocerse en detalle.

1.1.8 Los microARNs y el cáncer de mama

Los microARNs o miARNs son una familia de ARNs monocatenarios endógenos, de pequeño tamaño (con una longitud que oscila entre 19 y 25 nucleótidos), que no codifican proteínas pero que pueden unirse a los diferentes ARNs mensajeros (ARNm) en base a la complementariedad de secuencia entre el miARN y el ARNm diana, induciendo tanto su degradación como bloqueando la síntesis de proteínas (Ying y cols, 2008).

Se ha demostrado que los microARNs forman parte integral de la red reguladora de la expresión génica, de tal manera que un solo miARN puede controlar la expresión de cientos de genes, y de esta manera, estas moléculas son capaces de desempeñar un papel crucial en un amplio espectro de procesos biológicos normales como la diferenciación, la proliferación, las respuestas al estrés, la reparación del ADN, la apoptosis, la inflamación, la motilidad o la supervivencia celular, todos ellos procesos que, en último término, también pueden relacionarse con la tumorigénesis. Se ha establecido que la sobreexpresión, la amplificación o mutaciones que conducen a ganancia de función,

pueden estimular el desarrollo tumoral, comportándose los miARNs englobados en este grupo como *oncomiRs*, pero también se han identificado numerosos miARNs cuya pérdida de función o delección también lleva a la carcinogénesis, y que cuando se expresan de manera conveniente inhiben procesos como la proliferación, la migración, la transición epitelio-mesénquima o la metástasis, por lo que en este caso estaremos ante miRs con una función de supresores de tumores (Hata y Kashima, 2016) (**figura 1.3**).

Con respecto al cáncer de mama, se han identificado multitud de miARNs con participación reguladora sobre el inicio, la progresión y la metástasis del mismo. En la **figura 1.3**, se recogen algunos de miARNs mejor caracterizados clasificados según el proceso tumoral sobre el que influyen (Kaboli y cols, 2015). Entre los cientos de miARNs que se han ido relacionando en los últimos años con el cáncer de mama (Abdalla y cols, 2020) los más importantes que podemos destacar son:

- **miR-10b:** actúa como un *oncomiR*. Fue uno de los primeros miARN en ser relacionado con el cáncer de mama metastásico. Es una diana directa de Twist1, un factor de transcripción implicado en la angiogénesis y la transición epitelio-mesénquima y que actúa sobre miR-10b induciendo su expresión. Esto lleva a la expresión del protooncogén (RhoC) perteneciente a la familia de Ras, que es otro conocido regulador de la transición epitelio-mesénquima (Ma y cols., 2007). Se ha sugerido que uno de los mecanismos desencadenados en respuesta a miR-10b es la represión de la expresión del gen supresor de tumores *PTEN* (Kim y cols., 2016). Además, en células MCF-7R (resistentes al tamoxifeno) se ha encontrado que los niveles de miR-10b son más altos que en la correspondiente línea parental MCF-7, lo que sugiere que este miR participa en el desarrollo de resistencia al antiestrógeno (Ahmad y cols., 2015).
- **miR-29a:** es otro *oncomiR* cuya pérdida suprime la proliferación y la migración, mientras que su sobreexpresión induce ambos procesos. También se ha demostrado su papel en la transición epitelio-mesénquima, y que sus niveles son notablemente más altos en las células MCF-7/ADR (resistentes a doxorubicina), lo que parece a su vez correlacionarse con una expresión disminuida de *PTEN* (Shen y cols., 2016).
- **miR-31:** se encuentra entre los miRs para los que su papel en el cáncer de mama aún no está bien establecido. Mientras que algunos autores han descrito que miR-31 inhibe la invasión y la metástasis en modelos de líneas celulares de cáncer de mama (Soheilyfar y cols., 2018) y que los niveles de expresión de miR-31 están disminuidos

en pacientes con tumores mamarios (Kundaktepe y cols., 2020), otros autores afirman que promueve la proliferación celular y la metástasis (Lv y cols., 2017).

- **miR-34a:** actúa como un miR supresor de tumores del que se ha descrito una baja expresión en el tejido tumoral mamario en comparación con los niveles de los tejidos normales. Entre sus funciones destaca la supresión de la vía de señalización Wnt/ β -Catenina lo que inhibe la proliferación, invasión y migración *in vitro* e *in vivo* (Si y cols., 2016). También se ha descrito que la supresión de los procesos de proliferación, invasión y metástasis en el cáncer de mama por parte de miR-34a están directamente relacionados con la supresión de Twist1 (Rokavec y cols., 2014; Imani y cols., 2017; Rui y cols., 2018).
- **miR-145:** otro supresor de tumores del que se ha descrito un efecto directo sobre la inhibición de Twist1 en el cáncer colorrectal (Shen y cols., 2019). En el cáncer de mama, se ha visto que su sobreexpresión inhibe la transición epitelio-mesénquima a través de la inhibición de la expresión de los genes de las metaloproteasas *MMP-2/9* (Zhao y cols., 2016). Por último, se ha descrito que a reactivación de miR145 suprimió la migración y la invasión de las células de cáncer de mama (Liu y cols., 2017a).
- **miR-10a:** aunque está considerado como un inhibidor de la progresión del cáncer de mama, también existe cierta controversia con respecto a este microARN, ya que se ha descrito que sus niveles son más altos de lo normal en células tumorales resistentes a doxorrubicina (Rong y cols., 2016). Los estudios que defienden su papel como supresor de tumores indican que promueve la apoptosis, e inhibe la proliferación y la migración de las células MCF-7 a través de la inhibición directa de PI3/Akt/mTOR (Zhang y cols., 2019) y de la quinasa p70S6. Por último, se ha descrito que este microARN está suprimido en tumores mamarios altamente agresivos (Ke y Lou, 2017).

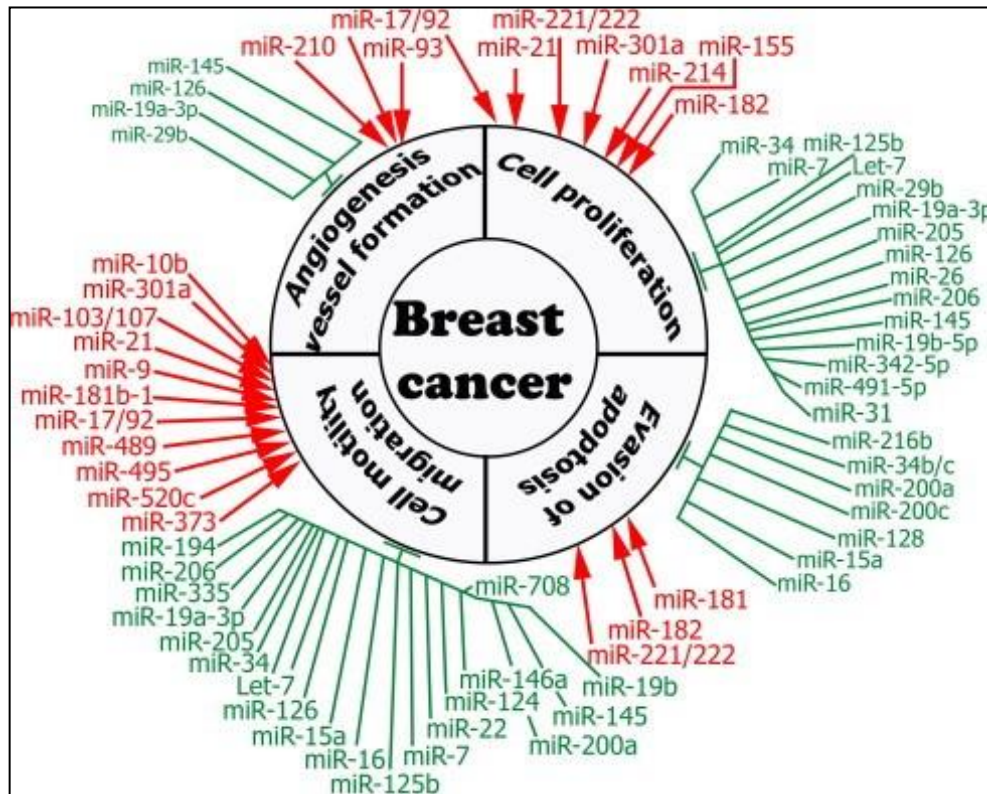


Figura 1.3: Algunos de los microARNs implicados en diferentes procesos del desarrollo tumoral mamario: Los miARNs oncogénicos se resaltan en rojo y los supresores de tumores en verde. (Imagen modificada de Kaboli y cols., 2015).

1.1.9 Los genes reloj en el cáncer de mama

Los núcleos supraquiasmáticos (NSQ), estructuras hipotalámicas bilaterales, se consideran el oscilador endógeno o “reloj interno” siendo los reguladores principales de los ritmos circadianos ya que la ablación quirúrgica de los mismos elimina la actividad rítmica en ratones (Turek, 1985). A través de diversas prolongaciones sobre otras estructuras del sistema nervioso central y también sobre la glándula pineal productora de melatonina, son capaces de sincronizar los ritmos de multitud de procesos fisiológicos con el ciclo luz/oscuridad, ya que prácticamente todas las células del organismo expresan genes “reloj”, un pequeño grupo de genes que están involucrados en generar y mantener los ritmos circadianos en todos los seres vivos. Son los responsables de que estos ritmos sean autosostenibles y persistan incluso en ausencia de estímulos ambientales. Hasta el momento, se han identificado doce genes pertenecientes a este grupo: *PER-1* (*Period-1*), *PER-2* (*Period-2*), *PER-3* (*Period-3*), *CLOCK* (*circadian locomotor output cycles kaput*), *CRY1* (*cryptochrome 1*), *CRY2* (*cryptochrome 2*), *BMAL1* o *ARNTL* (*aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like*) *TIMELESS* (*Timeless*), *ROR* (*retinoic acid-related orphan nuclear receptor*), *NPAS2* (*neuronal PAS domain protein 2*), *NR1D1* and *NR1D2*

(*nuclear receptor subfamily 1 group D member 1 and 2*, también conocido como *REV-ERB*) y *CSNK1E* (*casein kinase I epsilon*) (Angelousi y cols., 2019). De manera muy simple, las proteínas Bmal1 y Clock forman un complejo que se une a la E-box presente en el promotor de los genes *PER1* y *PER2*; Las proteínas Per translocan al núcleo de la célula, heterodimerizan con las proteínas Cry e inhiben la transcripción mediada por Bmal1 y Clock, es decir, reprimen su propia transcripción. Al cabo de un cierto tiempo, el complejo represor Per-Cry es degradado y Bmal1-Clock puede comenzar un nuevo ciclo transcripcional. Otros de los miembros de este grupo de proteínas, como Rev/Erb, ROR, regulan la amplitud y la fase de los genes así regulados (Angelousi y cols., 2019).

En ratones, se ha visto que la pérdida de regulación de algunos de estos genes conduce a un desarrollo acelerado de tumores (Fu y cols., 2002). A partir de esta observación, se ha ido determinando que estos genes han perdido su correcta regulación en muchos tipos de cáncer. En el caso concreto del cáncer de mama (**figura 1.4**), se ha demostrado que *PER1* y *PER2* actúan como supresores de tumores, observándose una pérdida de su expresión en muchos tumores primarios (Kuo y cols., 2009).

Curiosamente, la activación del RE α por parte del 17 β -estradiol regula la transcripción de *PER2* y recíprocamente, la pérdida de la expresión de *PER2* estabiliza al RE α que incrementa así su capacidad de activar la transcripción (Lin y Farkas, 2018). *BMAL1* también actúa como un supresor tumoral y su expresión a menudo está inhibida en células de cáncer de mama (Cadenas y cols., 2014). La inactivación de *CRY1*, *BMAL1* y *PER1* se ha propuesto como un mecanismo que aumenta el riesgo de cáncer de mama en trabajadores a turnos (Samulin y cols., 2017). Por el contrario, REV-ERB β , es un represor de *BMAL1*, y su sobreexpresión en el cáncer de mama conduce al desarrollo de quimiorresistencia (De Mei y cols., 2014). La proteína Timeless es un coactivador del RE α , al que se une para incrementar su actividad transcripcional, habiéndose demostrado un reclutamiento del complejo Timeless-RE α en el promotor de *c-MYC*, lo que resultó ser la primera evidencia que permitió relacionar a Timeless con la adquisición de resistencia a tamoxifeno (Magne Nde y cols., 2018).

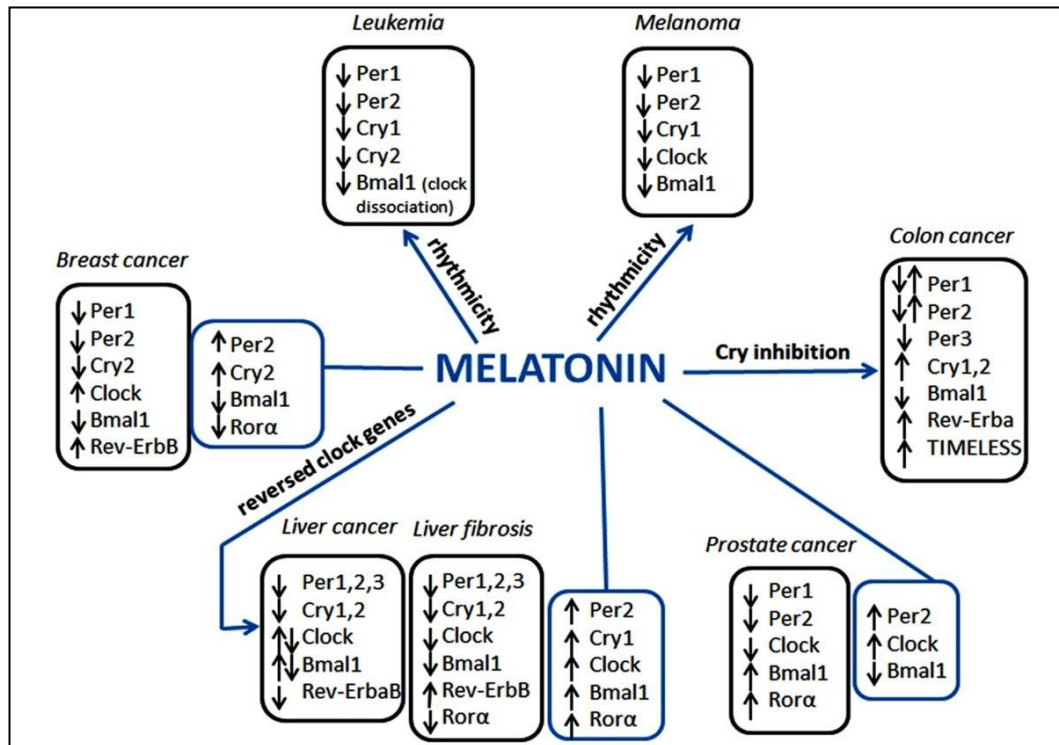


Figura 1.4: Efectos de la melatonina sobre los niveles de los genes reloj en diferentes tipos de cáncer. La alteración en los niveles de expresión y un patrón anormal de oscilación es un hecho común en muchos tipos de cáncer; algunos de los cambios más conocidos en leucemia, melanoma, cáncer de hígado, de próstata, colon y mama están representados en los recuadros de línea negra. Los cambios o resincronización de algunos de estos genes de vuelta a la normalidad, que se producen en algunos de estos tipos de tumores en respuesta a la melatonina, están representados en los recuadros de línea azul. (Tomado de Chuffa y cols., 2019).

1.1.10 Twist1 como factor clave en la transición epitelio-mesénquima

La transición epitelio-mesénquima (EMT) es un proceso morfogénico mediante el cual las células de características epiteliales se transforman en células mesenquimales, lo que implica que deben perder algunas de sus propiedades como son la polaridad y la adherencia con otras células (la pérdida de E-Cadherina es uno de los hechos más característicos de la EMT) y adquirir otras propiedades distintas como las capacidades migratorias e invasivas. Es de destacar que la EMT es un proceso fisiológico que ocurre fundamentalmente durante la embriogénesis y que es fundamental en la diferenciación celular final que lleva a la formación de los distintos órganos (Thiery y cols., 2009). Ya en el adulto, el papel más característico de la EMT es contribuir a los procesos de fibrosis y cicatrización. Durante la misma, los queratinocitos del borde de la lesión llevan a cabo la EMT y cuando la herida se cierra son capaces de revertir el proceso a través de la transición mesénquima-epitelio (MET). La expresión de *SNAIL2* acelera la cicatrización;

por ejemplo, en el ciclo menstrual, este proceso participa en la cicatrización posterior a la ovulación (Ahmed y cols., 2006).

El proceso de transición epitelio-mesénquima también desempeña un papel fundamental en el cáncer, facilitando la invasión, clave en el inicio de la metástasis. Como habíamos apuntado anteriormente, las células tumorales inducen la ruptura de la membrana basal lo que permite su salida al flujo sanguíneo. Con posterioridad, estas células tumorales circulantes (CTCs) se salen de los vasos y forman micro-metástasis, sufren la transición mesénquima-epitelio y comienzan el crecimiento clonal en las zonas metastatizadas (Chaffer y Weinberg, 2011). En definitiva, los programas oncogénicos que tienen lugar en las células que experimentan la EMT llevan a una transdiferenciación organizada donde las células epiteliales polarizadas pierden la inmovilidad y adquieren fenotipos fibroblastoides caracterizados por una adquisición de la capacidad de invadir y migrar, lo que lleva a que las lesiones de tipo carcinoma *in situ* iniciales se conviertan en tumores invasivos altamente agresivos (**figura 1.5**).

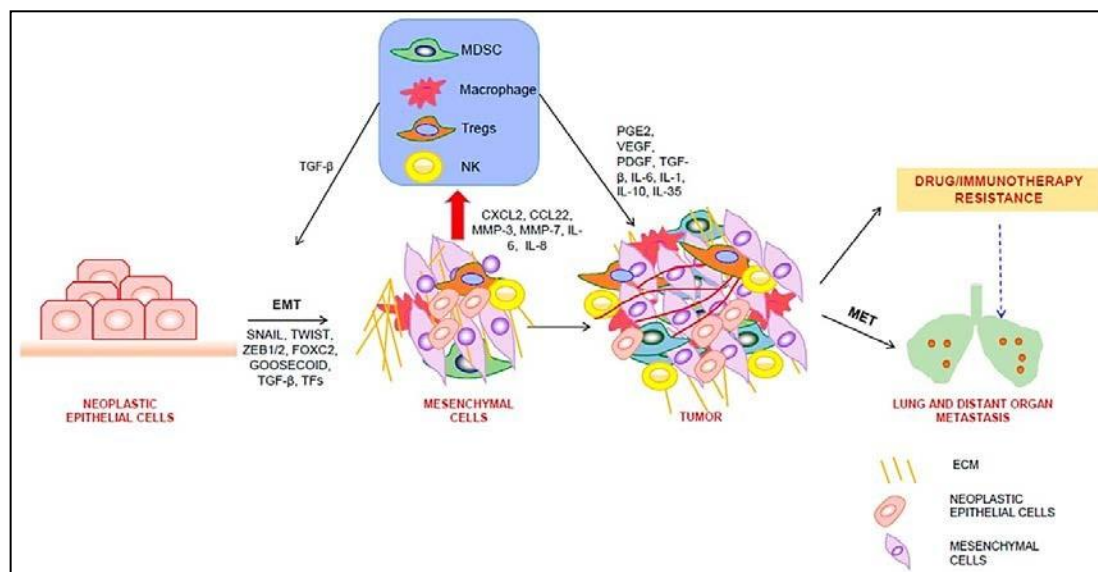


Figura 1.5: La transición epitelio-mesénquima. Las células epiteliales que experimentan cambios transcripcionales en genes clave implicados en la EMT se transforman en células mesenquimales. El reclutamiento de células del sistema inmune induce un estado proinflamatorio que estimula a las células tumorales a secretar citoquinas implicadas en el crecimiento y la invasión. Asociado a este proceso está la adquisición de resistencia (tomado de Singh y Chakrabarti, 2019). EMT: Transición epitelio-mesénquima. MET: Transición mesénquima-epitelio.

La inducción de la EMT depende de un gran número de factores secretados y atrapados en el estroma, como el TGF β , (*Transforming Growth Factor beta*), el PDGF (*Platelet-Derived Growth Factor*) y el EGF (*Epithelial Growth Factor*) (Dongre y Weinberg, 2019). Estas moléculas actúan de manera paracrina induciendo la activación de una serie de factores de transcripción (Twist1, Slug y Zeb1), que llevan a cabo una acción coordinada que conduce a la adquisición del fenotipo mesenquimal, comenzando por la supresión de la expresión de moléculas características de la adhesión entre células epiteliales (E-Cadherina, y Zona Occludens 1), e induciendo la expresión de otras tales como N-Cadherina, Fibronectina y Vimentina (Jechlinger y cols., 2003). Estos factores de transcripción tienen una gran relevancia clínica y así por ejemplo se ha establecido una correlación entre Slug y la progresión metastásica o la frecuencia de recidivas. La expresión de proteínas como Slug y Twist1 está asociada a un mal pronóstico y además, las células que sobreexpresan estas proteínas van a estar dotadas de otras propiedades adicionales como una mayor capacidad de supervivencia, mayor escape del sistema inmune y adquisición de resistencia a la quimioterapia (Martín y cols., 2005).

Twist1 se identificó hace ya décadas en *Drosophila*. En principio la mayor parte de estudios acerca de esta proteína estuvieron encaminados a esclarecer su papel en el desarrollo embrionario, pero posteriormente se estableció su papel transcendental en el desarrollo de metástasis. Esta proteína es un factor de transcripción con el típico dominio de unión al ADN hélice-giro-hélice que forma dímeros y reconoce secuencias E-box (CANNTG) (Zhu y cols., 2016).

En relación al cáncer de mama, se ha demostrado que la expresión de este factor de transcripción es notablemente mayor en las células tumorales circulantes de pacientes con cáncer de mama metastásico que en pacientes con carcinomas *in situ*. Por otra parte, la delección de *TWIST1* bloquea por completo la EMT, revierte parcialmente la resistencia múltiple a la quimioterapia y mejora notablemente la respuesta a la doxorrubicina (Li y cols., 2009). Es importante resaltar que, en el cáncer de mama metastásico, la fosforilación de la proteína en su residuo serina 42 por varias quinasas como Akt es esencial para el inicio de la metástasis (Ertosun y cols., 2020). También resulta interesante que ARTEMIN (ARTN), un factor neurotrófico que es inducido en respuesta a estrógenos y cuya expresión se correlaciona positivamente con el nivel de receptor de estrógenos en los carcinomas mamarios tratados con tamoxifeno, es capaz de activar Twist1

1.2 LA MELATONINA

La melatonina, identificada como N-acetil-5-metoxitriptamina, se aisló por primera vez a mediados del siglo XX a partir de glándulas pineales bovinas (Lerner y cols., 1958). Fue denominada comúnmente como “melatonina”, debido a que derivaba de la serotonina y tenía la capacidad para blanquear la piel de los renacuajos de rana a través de los melanóforos. Se trata de una hormona indólica, derivada del aminoácido triptófano, que se encuentra presente en multitud de organismos, desde bacterias hasta vertebrados (Tan y cols., 2003).

Esta molécula se considera como una hormona ya que se sintetiza en un órgano endocrino, la glándula pineal, y se libera a la sangre pudiendo actuar en lugares distantes y su actividad, mediada por vía específica de receptores, regula funciones fisiológicas. A diferencia de otras hormonas, existen fuentes exógenas alternativas de melatonina (está presente en algunos alimentos) por lo que podría considerarse también como un tipo de vitamina (Tan y cols., 2003).

1.2.1 Síntesis, secreción, circulación y metabolismo

En mamíferos, la síntesis de melatonina se lleva a cabo fundamentalmente en los pinealocitos de la glándula pineal. Dicha glándula es un transductor fotoneuroendocrino que convierte la información lumínica en señales humorales (Cos y Sánchez-Barceló, 2000). Se ha descrito una síntesis minoritaria de melatonina en otras partes del cuerpo como la retina, el fondo de ojo, el cuerpo estriado, el tracto gastrointestinal, la glándula tiroidea, la piel, los testículos, la médula espinal, los núcleos de rafe, y la médula ósea. En estos lugares la melatonina puede actuar como autacoide o mediador intracelular, pero también lo hace como paracoide o señal paracrina cuando se libera en el tercer ventrículo y alcanza el fluido cerebroespinal (Stefulj y cols., 2001).

El patrón de secreción de la melatonina en los mamíferos sigue un ritmo circadiano, es decir, tiene lugar en ciclos de 24 horas y requiere cambios en la iluminación ambiental (Buscemi y cols., 2004) captados a través de la retina, que (además de conos y bastones implicados en la visión) tiene un tipo de fotorreceptores recientemente caracterizados; las células ganglionares intrínsecamente fotosensibles de la retina (iPRGCs). Estos fotorreceptores especializados en percibir los cambios en los niveles de luz (sincronizador ambiental), proyectan axones hacia el núcleo supraquiasmático del hipotálamo que funciona como un marcapasos endógeno en los mamíferos ya que está sincronizado con

los ciclos luz-oscuridad a través del tracto retinohipotalámico. Las neuronas del núcleo supraquiasmático envían señales neurales a través de la vía multisináptica simpática llamada vía retino-hipotalámico-pineal (**figura 1.7**) Esta vía consta de los núcleos paraventriculares hipotalámicos, las células intermediolaterales y el ganglio cervical superior, el cual en ausencia de luz libera norepinefrina sobre la glándula pineal. La unión de esa norepinefrina con los receptores β -adrenérgicos específicos de los pinealocitos activa en éstos la vía del AMPc como segundo mensajero intracelular, lo cual finalmente desencadena la síntesis de melatonina (Reiter, 1991). Adicionalmente, esta unión de la norepinefrina a sus receptores, provoca la activación de la adenilato ciclasa a través de una proteína G reguladora, lo cual aumenta los niveles de AMPc intracelulares.

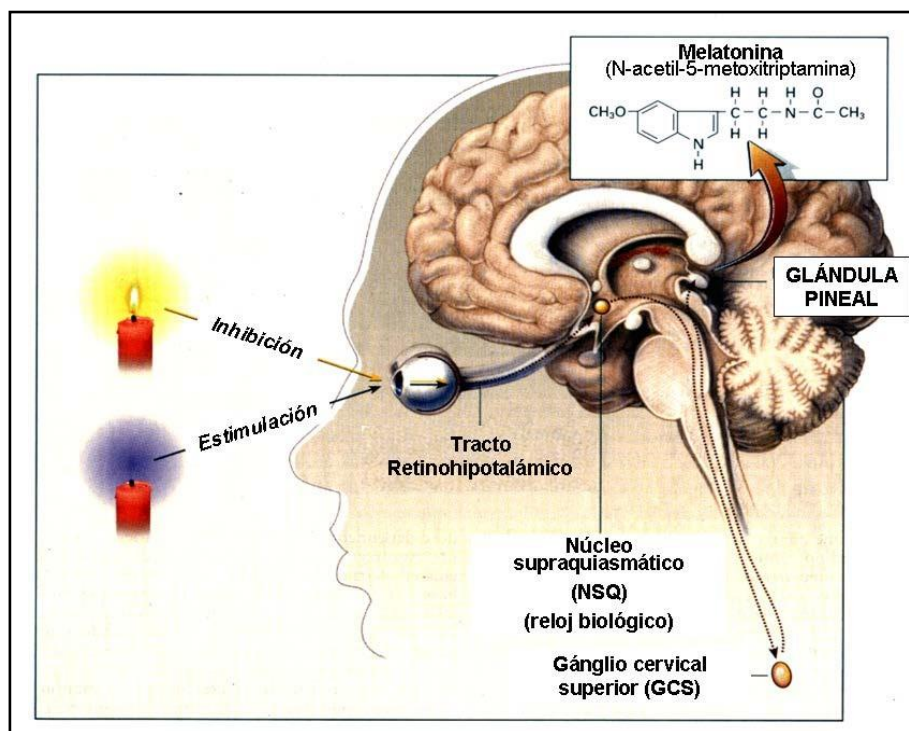


Figura 1.7: Vías de señalización en la síntesis de melatonina. Los fotorreceptores especializados en percibir los cambios en los niveles de luz (sincronizador ambiental), proyectan axones a través del tracto retinohipotalámico hacia el núcleo supraquiasmático (NSQ). De allí parten los axones preganglionares que conectan con las neuronas del ganglio cervical superior (GCS) y finalmente las neuronas postganglionares, en ausencia de luz, liberan NA en la proximidad de los pinealocitos.

La formación de la melatonina comienza con la captación del aminoácido triptófano (Trp), proveniente del torrente circulatorio. El Trp es hidroxilado en las mitocondrias por acción de la Trp-hidroxilasa. La mayor parte del 5-hidroxitriptófano (5-HTP) resultante se convierte en serotonina en el citosol, por la intervención de una enzima descarboxilasa. A continuación, la serotonina es acetilada por la arilalquilamina-N-acetiltransferasa (AA-NAT), la cual es el factor limitante en la biosíntesis de melatonina. Esta enzima,

controlada por el ciclo luz-oscuridad, es activada por la proteína quinasa A (PKA), la cual a su vez es activada por el aumento de la concentración de AMPc en el citosol. Además, esta PKA fosforila al factor de transcripción de la proteína de unión al elemento de respuesta a AMPc (CREB), que actúa modulando la síntesis *de novo* de NAT. De esta manera, por la acción de la AA-NAT se produce N-acetilserotonina, metabolito que es O-metilado por la enzima hidroxiindol-O-metiltransferasa (HIOMT), dando lugar a N-acetil-5-metoxitriptamina, más conocida como melatonina (Cos y Sánchez-Barceló, 2000).

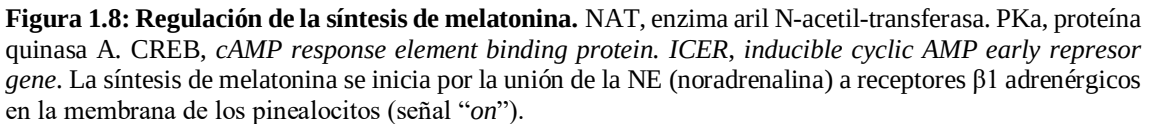
Una vez sintetizada, la melatonina puede difundir a la sangre, donde circula mayoritariamente unida a albúmina o bien liberarse hacia el líquido cefalorraquídeo, donde se encuentran niveles de melatonina muy superiores a los circulantes (Tan y cols., 2003). Su liberación al sistema vascular le permite acceder a fluidos como la saliva, la orina, el semen o la leche materna (Stefulj y cols., 2001). Esta hormona también se encuentra en los folículos preovulatorios y hay receptores para ella en las células granulosas y tecaes de los ovarios (Soares y cols., 2003).

La síntesis de melatonina se inicia durante el desarrollo embrionario en la semana 26 de gestación, aunque el patrón rítmico no se adquiere hasta al menos dos meses después del nacimiento. Las concentraciones plasmáticas varían con la edad, los niveles máximos se alcanzan durante el segundo y tercer año de vida (de uno a tres años). Estos niveles caen bruscamente en la pubertad y continúan descendiendo paulatinamente durante el resto de la vida (Waldhauser y cols., 1988). Este descenso ha hecho pensar en una posible relación de esta hormona con el proceso de envejecimiento, debido probablemente a sus propiedades antioxidantes.

Dado que no se acumula y se libera rápidamente a la sangre, el índice más comúnmente utilizado para medir los niveles de melatonina es su concentración en el plasma sanguíneo. La mayor parte de la melatonina circulante se metaboliza en el hígado mediante la conversión a 6-hidroxi-melatonina, y se elimina por la orina como metabolito sulfatado 6-sulfatoximelatonina (Tan y cols., 2003). Otra parte de la melatonina circulante se oxida en el cerebro formando kynurenamina, y únicamente una pequeña porción (0,5%) se elimina en forma libre por la orina.

1.2.2 Regulación de la síntesis

Tal y como ya se ha mencionado, la síntesis de melatonina se inicia por la unión de la noradrenalina a los receptores β -adrenérgicos en la membrana del pinealocito, causando la activación de la adenilato ciclasa a través de una proteína G reguladora, con lo que aumentan los niveles intracelulares de AMPc. Adicionalmente, la noradrenalina se une también a receptores α_1 , estimulando la entrada de calcio al pinealocito y la producción de diacilglicerol a partir de la hidrólisis del fosfatidil inositol, lo que lleva a la translocación y activación de una proteína quinasa dependiente de calcio (PKC). Se cree que esta última estimula la fosforilación de algún componente del sistema potenciando la acumulación intracelular de AMPc. El aumento de la concentración de AMPc en el citosol del pinealocito da lugar a la activación de la proteína quinasa A (PKA), que induce la activación del enzima aril N-acetil-transferasa (NAT). Este enzima, presente en todas las especies en forma inactiva, es limitante en la síntesis de melatonina. Además, esta misma PKA fosforila al factor de transcripción CREB (*cAMP response element binding protein*) que actúa modulando la síntesis *de novo* de NAT. De esta forma, tanto la NAT activada como la sintetizada *de novo* catalizan la transformación de serotonina en N-acetilserotonina, que a continuación será metilada por el enzima hidroxiindol-O-metiltransferasa (HIOMT) para generar melatonina. Existe además un mecanismo de inhibición de la transcripción del gen NAT que depende de la expresión del gen receptor *ICER* (*inducible cyclic AMP early repressor gene*). Por lo tanto, la proteína CREB es la encargada tanto de iniciar la transcripción de NAT como de finalizarla mediante la transcripción del gen represor *ICER*. Es importante destacar que la administración exógena de melatonina no induce una retroalimentación en su formación endógena, es decir, no aumenta ni disminuye su síntesis natural (**figura 1.8**).



La melatonina presenta un gran número de efectos fisiológicos para los cuales se han descrito una diversidad de mecanismos de acción. Algunas células tienen receptores para la melatonina en la membrana plasmática (Molinari y cols., 1996), pero debido a su naturaleza lipofílica la melatonina también es capaz de atravesar con facilidad esa membrana y llegar al citosol donde se une a proteínas citosólicas como la calmodulina (Sainz y cols., 2003; del Río y cols., 2004). También se sospecha que algunos receptores huérfanos nucleares pueden unir melatonina, aunque esto aún resulta controvertido (Reiter, 1991; Becker-Andre y cols., 1994; Reiter y cols., 1998). Además de todo esto, la melatonina estimula la expresión de enzimas antioxidantes (Bonnetfont-Rousselot y Collin, 2010) y por sí misma es un potente neutralizador de radicales libres (Allegra y cols., 2003).

1.2.3.1 Unión a receptores de membrana

Hasta el momento se han caracterizado dos tipos de receptores de melatonina de alta afinidad en mamíferos: MT1 y MT2, que pertenecen a la familia de receptores con siete dominios transmembrana acoplados a proteínas G inhibitorias. Además, se ha identificado una tercera proteína capaz de unir melatonina, denominada MT3, que se trata del enzima citosólico quinona reductasa 2 que participa en la protección frente al estrés oxidativo (Sainz y cols., 2003), a la cual la melatonina se une con baja afinidad, por lo que no puede considerarse como un receptor en sentido estricto (Reppert y cols., 1994).

Los receptores MT1 y MT2 están acoplados a proteínas de unión a guanósín trifosfato (GTP) y actúan suprimiendo la actividad de la adenilato ciclasa por la vía de la proteína G inhibitoria lo cual conduce a una reducción en los niveles intracelulares de AMPc, dando lugar a un cambio en el estado de fosforilación de las proteínas diana (Sainz y cols., 2003). MT1 y MT2 están expresados en multitud de tejidos, tanto del SNC (NSQ, hipotálamo mediobasal, cerebelo, hipocampo, córtex, tálamo y retina), como extra-neurales (adenohipófisis, linfocitos, arterias cerebrales, células epiteliales prostáticas, espermatozoides, colon, plaquetas, células granulosas de folículos preovulatorios y células epiteliales mamarias) (Reiter y cols., 2017).

MT1 está codificado por el gen del receptor de la melatonina 1A (*MTNR1A*) y está relacionado con las funciones circadianas y reproductivas de la melatonina. MT2, en cambio, está codificado por el gen del receptor de la melatonina 1B (*MTNR1B*) y está implicado en la respuesta del cambio de fase de la melatonina. Los receptores MT1 poseen una afinidad ($K_d = 30$ pM) superior a los MT₂ ($K_d = 160$ pM) y controlan la movilización de Ca^{++} a través de proteínas Gq11, mientras que los MT2 inhiben la guanilato ciclasa. La implicación del MT1 en el cáncer de mama está siendo objeto de estudio (Hill y cols., 2015).

1.2.3.2 Unión a receptores nucleares

En la última década del siglo XX, para explicar algunos efectos de la melatonina que no podían deberse a su unión a receptores de membrana, se consideró la posibilidad de que algunos receptores nucleares huérfanos RZR/ROR (RZR/ROR_a y RZR_b), para los que se desconocen ligandos específicos, pudiesen ser el sitio de unión de la hormona pineal. Esos receptores huérfanos son factores de transcripción que pertenecen a la superfamilia

de receptores del ácido retinoico, pero su naturaleza como receptores nucleares de melatonina aún no ha sido esclarecida (Reiter, 1991).

1.2.3.3 Interacción con Calmodulina (CaM)

La melatonina, debido a su liposolubilidad, es capaz de atravesar la membrana celular e interactuar directamente con la calmodulina citosólica. Esta unión es específica, saturable, reversible, dependiente de calcio, selectiva de ligando y de alta afinidad lo que sugiere que la melatonina es capaz de modular funciones intracelulares, por lo que la actividad celular será dependiente de los niveles circulantes de melatonina (Benítez-King y cols., 1993; Cos y Sánchez-Barceló, 2000). La melatonina induce cambios conformacionales en el complejo RE α -CaM desestabilizando la unión del complejo E₂-RE α -CaM al ADN y por lo tanto impidiendo la transcripción de RE α . Además, también se ha descrito que disminuye la afinidad del RE por el estradiol (del Río y cols., 2004). Por último, también impide la unión de la calmodulina al calcio, inhibiendo así la actividad de enzimas dependientes de calmodulina como por ejemplo quinasas, AMPc fosfodiesterasa u óxido nítrico sintasa.

1.2.3.4 Neutralización de radicales libres

La melatonina es capaz de transferir electrones a radicales hidroxilo, aniones superóxido, peróxido de hidrógeno, ácido hipocloroso, óxido nítrico y aniones peróxidonítricos (Allegra y cols., 2003), lo cual la convierte en un potente agente protector frente a daños oxidativos en las células, procesos neurodegenerativos y otros aspectos del envejecimiento (Cos y Sánchez-Barceló, 2000; Sainz y cols., 2003; Rodríguez y cols., 2004).

1.2.4 Acciones fisiológicas de la melatonina

El hecho de que esta hormona se sintetice únicamente durante la oscuridad y presente bajas concentraciones plasmáticas durante el día, sugiere que podría actuar como una señal química que mide la duración de las noches y por lo tanto de las estaciones del año. De hecho, se sabe que la glándula pineal, a través de la melatonina, tiene un rol indispensable en la sincronización de los ritmos biológicos circadianos y circanuales (Arend, 1986) especialmente en los mamíferos de reproducción estacional, y en los ritmos termorregulatorios y locomotrices de aves y reptiles. En humanos, la melatonina es capaz de paliar los trastornos derivados de viajes transmeridianos (*jet lag*) y sincronizar el ritmo sueño-vigilia en individuos ciegos. Adicionalmente, la melatonina ejerce otras funciones

sobre procesos fisiológicos no relacionadas aparentemente con el sistema circadiano. Algunas de estas funciones son antioxidantes (Mayo y cols., 2002), estimulación del sistema inmune mediante la inducción de la producción de citoquinas como las interleuquinas en linfocitos y monocitos (Trubiani y cols., 2005), la regulación del eje hipotálamo-hipófisis-gónadas (Reiter, 1991), el control de la termorregulación (Atkinson y cols., 2005), y la inhibición de la telomerasa (Martínez-Campa y cols., 2008).

1.2.5 Acciones antitumorales de la melatonina

Dado que la melatonina presenta propiedades antioxidantes a través de la neutralización de radicales libres, y en base a la implicación de éstos en las modificaciones del ADN mediadas por carcinógenos, se ha sugerido que la melatonina podría proteger a las células del inicio del proceso tumoral. Así, la melatonina previene el daño del ADN nuclear al contrarrestar a las especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno. El ADN dañado sufre mutaciones y acaba derivando en la transformación maligna. Si esos daños en el ADN persisten y no son reparados, se irán acumulando a lo largo de la vida y terminarán desencadenando un tumor (Reiter y cols., 2017).

Debido a sus residuos O-metil y N-acetil, la melatonina es un compuesto anfifílico. Está descrito que transfiere electrones entre especies antioxidantes y prooxidantes y tiene propiedades *redox* debido a la presencia de un sistema de anillo aromático rico en electrones que le permite funcionar como donador de electrones (Allegra y cols., 2003).

La melatonina tiene efectos antiproliferativos en las células tumorales (**figura 1.9**) asociados con la parada del ciclo celular, con un aumento de la duración de la fase de crecimiento celular GAP1 (G_1) que retrasa la entrada a la fase de síntesis de ADN (S) y mitosis (Cos y cols., 1996). Además, tiene efectos proapoptóticos en estas células ya que aumenta p53 lo que a su vez disminuye la expresión del gen de linfoma de células B2 (*BCL-2*) y aumenta los niveles de la proteína X asociada a Bcl2 (*Bax2*) y de la ciclina dependiente del inhibidor de quinasas 1 (p21WAF1) (Mediavilla y cols., 1999; Cui y cols., 2006). Así, la melatonina promueve la apoptosis en células tumorales, pero además se sabe que en casos de inmunodeficiencia o neurodegeneración disminuye también la apoptosis en células del sistema inmune y neuronas lo cual pone de manifiesto su papel protector ante estos procesos (Sainz y cols., 2003).

La melatonina inhibe la actividad de la telomerasa y reduce el crecimiento de las células tumorales mamarias humanas (Martínez-Campa y cols., 2008). La enzima telomerasa es

esencial para la síntesis de proteínas ribonucleares especializadas (los telómeros) que extienden el final de los cromosomas lineares eucariotas. Son indispensables para estabilizar la estructura cromosómica ya que en cada división celular se acortan, debilitando la estructura del cromosoma y dando lugar a envejecimiento celular por inestabilidades genéticas. Por otro lado, en las células tumorales la telomerasa está sobreexpresada, lo cual mantiene la estabilidad del ADN y contribuye a su inmortalidad proporcionando la capacidad ilimitada de divisiones celulares neoplásicas (Reiter y cols., 2017). La telomerasa transcriptasa inversa en humanos (hTERT), es la subunidad de la telomerasa que determina la principal actividad de este enzima y por lo tanto sirve como indicador de su actividad. La melatonina inhibe la transcripción de hTERT inducida por estradiol o por cadmio en la línea celular MCF-7, y además reduce la transactivación de hTERT iniciada por RE α y mediada por estradiol o cadmio (Martínez-Campa y cols., 2008).

Además de esto, la melatonina presenta acciones sobre el metabolismo de las grasas. Limita la absorción del ácido linoleico, el cual es promotor del crecimiento tumoral. Este ácido graso, tras su entrada en la célula, causa una serie de eventos que culminan con la proliferación celular, algunos de los cuales implican al factor de crecimiento epidérmico (EGF), la fosforilación y estimulación de cascadas de moléculas de señalización y las quinasas activadas por mitógenos, quinasa de la MAPK (MEK o MAPKK) y ERK1/2. Como la melatonina reduce la adsorción del ácido linoleico, es capaz de reducir a su vez el crecimiento tumoral (Reiter y cols., 2017).

Entre otras acciones antineoplásicas de la melatonina se incluyen sus efectos epigenéticos, la prevención de la disrupción circadiana y la estimulación de la diferenciación celular.

En lo que concierne al cáncer de mama, las acciones oncostáticas y antineoplásicas más importantes de la melatonina se deben a sus propiedades antiestrogénicas y antiangiogénicas (**figura 1.9**).

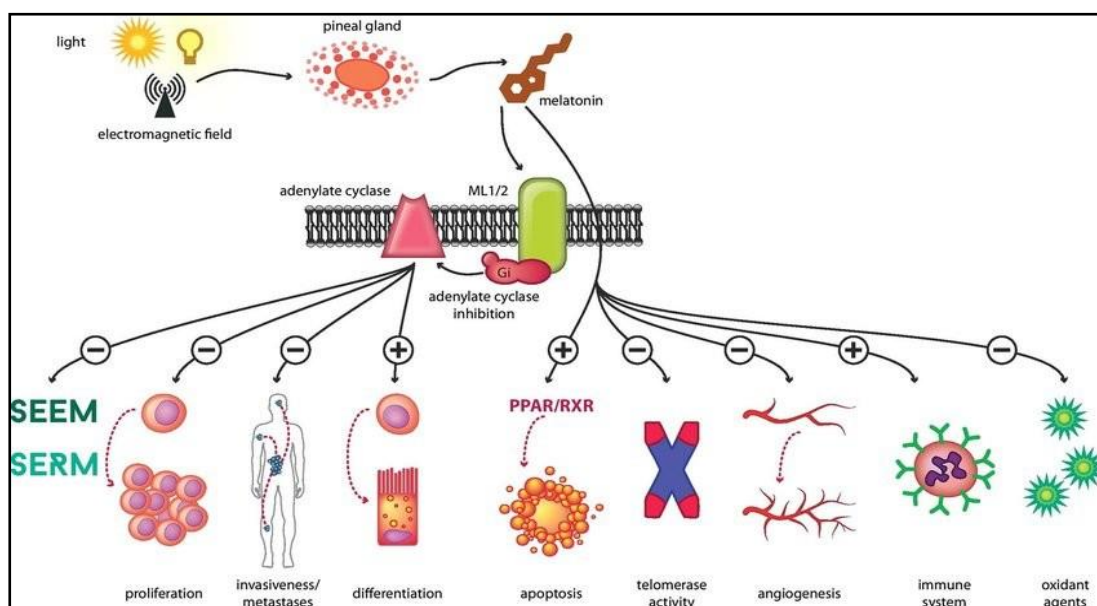


Figura 1.9: Posibles mecanismos implicados en las acciones antitumorales de la melatonina en el cáncer de mama. ML1/2, receptores de melatonina; Gi, proteínas G inhibidoras; SEEM, inhibidor de las enzimas estrogénicas; SERM, modulador selectivo del receptor de estrógenos; PPAR, receptores activados por proliferadores peroxisomales; RXR, receptor X retinoide. (Tomado de Kubatka y cols., 2018).

1.2.6 La melatonina y el cáncer de mama

Como ya se ha mencionado anteriormente en esta introducción, los estrógenos estimulan el crecimiento mamario en etapas cruciales del desarrollo como la pubertad o la gestación. Sin embargo, se ha demostrado que también pueden contribuir al inicio y progresión del cáncer mamario, y, de hecho, una gran proporción de estos tumores, al menos en sus estadios iniciales, presentan sobreexpresión del receptor de estrógenos alfa y consecuentemente, un crecimiento dependiente de estrógenos, evidencia que apunta a que los estrógenos deben ser considerados como carcinógenos mamarios.

Beatson fue el primero en observar que la ovariectomía bilateral en mujeres premenopáusicas con cáncer de mama avanzado inducía en muchos casos la regresión tumoral (Beatson, 1896). En 1978, Cohen y colaboradores propusieron que una función insuficiente de la glándula pineal se correlacionaba con un aumento del riesgo de desarrollar cáncer de mama, probablemente debido al subsiguiente hiperestrogenismo que podría favorecer la aparición de tumores mamarios, dada la elevada exposición del tejido mamario a los estrógenos circulantes. Esta hipótesis se basó en varias observaciones: (i) la incidencia de cáncer de mama era más baja en los países en los que la calcificación pineal mostraba una menor incidencia. (ii) Aquellos pacientes que tomaban

clorpromazina, un fármaco que aumenta los niveles de melatonina, presentaban tasas más bajas de cáncer de mama. (iii) Los datos conocidos en aquel momento y generados en experimentos *in vitro* sugerían que la melatonina podía tener efectos directos sobre las células del cáncer de mama. (iv) Los receptores de membrana específicos para la melatonina están presentes en las células de ovario humano, lo que sugiere que la melatonina puede tener una influencia directa en la producción ovárica de estrógenos (Cohen y cols., 1978).

Cuatro años más tarde, Tamarkin y colaboradores publicaron que el pico de melatonina nocturna de las mujeres con cáncer de mama RE (+) estaba notablemente reducido en comparación con pacientes con tumores RE (-) o con las mujeres sanas, lo que sugirió que concentraciones bajas de melatonina durante la noche pueden aumentar el riesgo de neoplasia mamaria con crecimiento dependiente de hormonas (Tamarkin y cols., 1982). En 1987, basándose en el estudio de Cohen, Richard Stevens planteó la hipótesis de que las mujeres expuestas a la luz durante la noche presentan tasas de incidencia de cáncer de mama elevadas (Stevens y cols., 1987).

En 2001, Schernhammer y colaboradores establecieron una relación entre el trabajo nocturno y el riesgo de cáncer de mama en una cohorte de enfermeras premenopáusicas, siendo el riesgo mayor entre mujeres que desarrollaron este tipo de trabajo durante más de 20 años (Schernhammer y cols., 2001).

Algunos otros estudios han establecido una correlación entre la alta exposición a la luz exterior residencial durante el tiempo de dormir con el incremento en la incidencia de cáncer de mama y próstata entre sujetos que nunca trabajaron por la noche (James y cols., 2017; García-Sáenz y cols., 2018). En definitiva, todos estos resultados apoyan la hipótesis de que, en mujeres premenopáusicas sanas, la exposición a LAN puede ser un factor inductor de la oncogénesis mamaria a través de la interrupción de las acciones oncostáticas circadianas de la melatonina.

La mayoría de los estudios *in vivo* realizados con el propósito de elucidar el papel de la melatonina en el cáncer de mama con crecimiento dependiente de estrógenos se han llevado a cabo utilizando como modelo la inducción química de carcinomas mamarios en ratas jóvenes, bien con 7,12-dimetil-1,2-benzantraceno (DMBA) o N-metil-N-nitrosourea (NMU). Los animales que fueron pinealectomizados, tratados con DMBA y mantenidos en fotoperiodos cortos (10 horas día / 14 horas noche) mostraron una mayor

incidencia de tumores y un menor período de latencia hasta la aparición de los mismos (Kothari y cols., 1984).

Por el contrario, los animales con una función pineal estimulada o tratados con melatonina, presentaron una disminución significativa en el número de tumores desarrollados, un aumento de la latencia tumoral y una menor incidencia, generalmente acompañado además de un tamaño más pequeño y de una mayor frecuencia de regresión tumoral (Blask y cols., 1991). Adicionalmente, los animales con tumores inducidos por DMBA y que recibieron melatonina mostraron una expresión reducida del receptor de estrógeno alfa a nivel tumoral. Por lo tanto, los resultados de estos experimentos llevados a cabo en modelos animales permitieron plantear la hipótesis de que la melatonina podría ejercer su efecto contrarrestando la acción de los estrógenos en las células tumorales *in vivo*.

1.2.7 Acciones antiestrogénicas de la melatonina en el cáncer de mama

Muchos de los trabajos llevados a cabo con el objetivo de caracterizar las acciones oncóstáticas de la melatonina en el cáncer de mama se han llevado a cabo durante más de tres décadas utilizando como modelo *in vitro* la línea celular MCF-7 (con crecimiento dependiente de estrógenos y altos niveles de expresión del RE α).

Se comenzó por demostrar que una concentración de melatonina fisiológica (1 nM) ejercía un claro efecto antiproliferativo, y a lo largo de este tiempo, se ha acumulado abundante evidencia de que este efecto depende de la capacidad de la hormona pineal para inhibir la síntesis de estrógenos y las vías de señalización intracelular desencadenadas por los mismos en la célula tumoral mamaria, es decir, la melatonina es una molécula con propiedades *SEEM* y *SERM* (**figura 1.10**).

En cuanto a las acciones antiestrogénicas actuando como un *SERM*, la melatonina presenta algunas características propias. Algunas moléculas antiestrogénicas (algunas de ellas utilizadas en clínica, como el tamoxifeno), llevan a cabo su función de antagonistas selectivos del receptor de estrógenos alfa, compitiendo con el 17 β -estradiol por su sitio de unión en el mismo, de tal manera que el complejo 4-OH-tamoxifeno-RE α experimenta un cambio conformacional que hace que la hélice 12 del receptor ocluya la ranura de reconocimiento de los coactivadores (Shiau y cols., 1998). Sin embargo, la melatonina no se une directamente al receptor, sino que lo que hace es interferir con la activación transcripcional desencadenada en respuesta al estrógeno a través de la desestabilización

del complejo 17β -estradiol-RE α , evitando su unión al ADN en aquellos promotores de genes que contengan elementos de respuesta a estrógenos (ERs) y elementos de respuesta a la proteína activadora 1 (AP1) (Rato y cols., 1999). Estas acciones probablemente están mediadas por la calmodulina, ya que ésta se une al RE α , y la melatonina es un conocido antagonista de calmodulina. La presencia de la hormona pineal provoca cambios estructurales en el complejo proteico calmodulina-RE α , lo que altera su unión a los promotores de respuesta a los estrógenos que acabamos de enumerar (Bouhoute y Leclercq, 1996). Este hecho puede tener su relevancia clínica, ya que al ser diferentes los mecanismos desencadenados por la melatonina y el tamoxifeno, ambas moléculas podrían cooperar, circunstancia que ya se ha comprobado *in vitro* en las células MCF-7, donde la presencia de la melatonina mejora la sensibilidad al tamoxifeno (Wilson y cols., 1992).

Las acciones antiestrogénicas de la melatonina también se pueden explicar en base a la expresión del receptor de melatonina de membrana de tipo 1 (MT1), localizado en la membrana plasmática (**figura 1.10**). Más concretamente, la unión de la melatonina a este receptor provoca la inhibición de adenilato ciclasa, lo que disminuye los niveles de AMPc (Godson y Reppert, 1997), contrarrestando el efecto opuesto llevado a cabo por el estradiol, que ejerce efectos no genómicos mediados por activación del mismo enzima elevando los niveles citoplasmáticos del segundo mensajero (Aronica y cols., 1994).

La melatonina también presenta propiedades similares a los *SEEM*, y parte de los mecanismos oncostáticos que ejerce en las células tumorales mamarias se basan en su capacidad para limitar la producción de estrógenos. Se demostró que la hormona pineal regula tanto la transcripción como la actividad de muchas de las enzimas involucradas en la síntesis de estrógenos, comportándose por tanto como un modulador selectivo de las enzimas estrogénicas. Entre las enzimas reguladas negativamente por la hormona están las necesarias para sintetizar estrógenos activos, mientras que son reguladas positivamente las que inactivan a los estrógenos a través de su conversión a formas sulfatadas. La regulación de la melatonina se produce tanto a nivel de la propia célula tumoral como a nivel del tejido peritumoral (**figura 1.10**), fundamentalmente en las células del tejido adiposo y en las células endoteliales (Cos y cols., 2005; Cos y cols., 2008; Purohit y cols., 2011; Álvarez-García y cols., 2013c; Chottanapund y cols., 2014; González y cols., 2015). La melatonina es capaz de regular la producción de moléculas que participan en la comunicación paracrina entre las células mamarias tumorales y los

fibroblastos y células endoteliales circundantes, tales como la interleucina 6 (IL-6) y el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) lo que entre otras acciones inhibe la producción de la enzima aromatasa en esas células (Álvarez-García y cols., 2013a; Álvarez-García y cols., 2013b).

Otro hecho que contribuye a explicar los efectos antiestrogénicos de la melatonina es la capacidad de la hormona para interferir con el eje neuroendocrino-reproductor (**figura 1.10**), de manera que la actuación de la indolamina sobre el hipotálamo, la hipófisis y las gónadas inhibe la síntesis de las hormonas folículo estimulante (FSH) y luteinizante (LH) lo que resulta en una menor síntesis de estrógenos ováricos (Russo y Russo, 1998).

Finalmente, Proietti y cols., han descrito que la melatonina contribuye a reducir la proliferación y el desarrollo de resistencia a través de la inhibición de PI3K/Akt (**figura 1.10**).

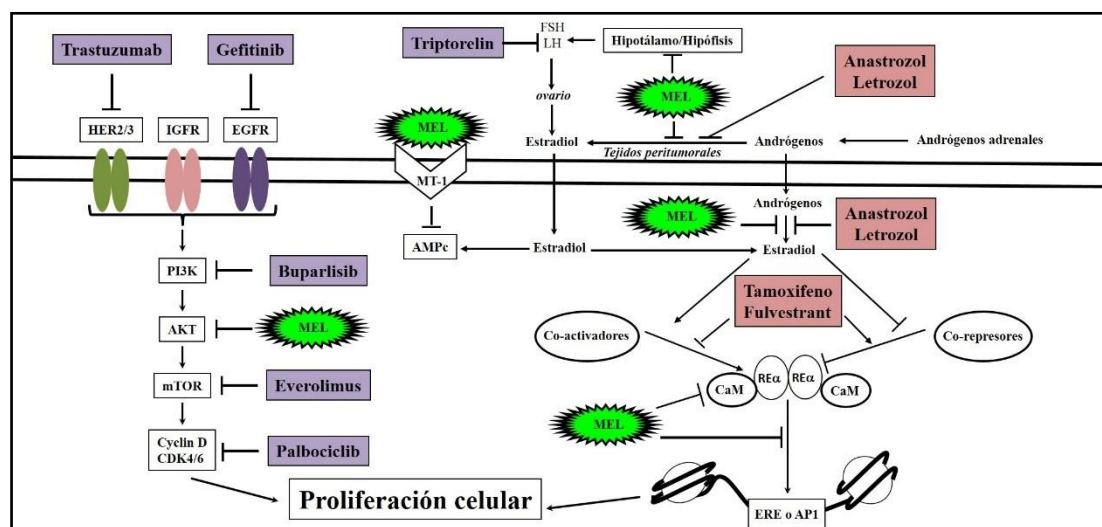


Figura 1.10: Acciones antiestrogénicas de la melatonina en la célula tumoral mamaria con crecimiento dependiente de estrógenos. Inhibición del eje hipotálamo-hipófisis-gónadas; Inhibición de los enzimas necesarios para la síntesis de estrógenos en la célula tumoral y en el tejido peritumoral; Inhibición de Adenilato Ciclasa, disminuyendo los niveles de AMPc; unión al complejo Calmodulina-REα, provocando la desestabilización del mismo y previniendo su unión a los elementos de respuesta a estrógenos (EREs) y elementos de respuesta a la proteína activadora 1 (AP1). REα: Receptor de estrógenos alfa. CaM: Calmodulina. IGFR: Receptor para el factor de crecimiento insulínico; EGFR: Receptor para el factor de crecimiento epidérmico. FSH: Hormona folículo-estimulante. LH: Hormona luteinizante.

1.2.8 La melatonina como sensibilizador a los efectos de la quimioterapia

La melatonina es un agente prometedor con potencial para ser considerado como un tratamiento adyuvante a la quimioterapia o a otras moléculas con actividad antineoplásica. Los quimioterápicos consiguen detener el crecimiento tumoral e inducir la muerte de las células malignizadas con mayor o menor eficacia, pero también producen efectos secundarios adversos como cardiotoxicidad, neuropatía, destrucción de las células hematopoyéticas, etc. Lissoni y colaboradores en 1987 fueron los primeros en describir los potenciales efectos beneficiosos de la hormona pineal en pacientes con tumores sólidos avanzados en los que las terapias convencionales habían fracasado, encontrando una mejora en la calidad de vida y una estabilización de la enfermedad en un cierto número de casos (Lissoni y cols., 1987).

Desde entonces, varios estudios han encontrado que si la hormona pineal se incluye en los protocolos de quimioterapia establecidos, ésta mejora las expectativas de los enfermos, reduciendo la trombocitopenia, la astenia y la neuropatía en pacientes con tumores mamarios, de pulmón o gastrointestinales (Lissoni y cols., 1997; Lissoni y cols., 2002); también se ha concluido que la melatonina fue capaz de mejorar la supervivencia a un año y la regresión tumoral en pacientes con metástasis y un mal estado clínico (Lissoni y cols., 1999). Otro estudio, realizado sobre pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas metastásico, concluyó que la supervivencia a cinco años y la regresión tumoral se veía aumentada cuando se incluía melatonina en el tratamiento, con el efecto adicional de que la tolerancia a la quimioterapia también se veía mejorada (Lissoni y cols., 2003).

Algunos trabajos han establecido una relación entre la interrupción de la producción de melatonina nocturna por exposición a la luz artificial y el desarrollo de resistencias, por ejemplo, al tamoxifeno (Dauchy y cols., 2014) o a la doxorrubicina (Xiang y cols., 2015) en el cáncer de mama. La resistencia a los agentes antineoplásicos en muchos casos está relacionada con su eflujo fuera de la célula tumoral por acción de la glicoproteína P (gen *ABCB1*); el tratamiento con melatonina incrementó las concentraciones intracelulares de doxorrubicina a través de la inhibición de esta glicoproteína (Granzotto y cols., 2001).

Los mecanismos moleculares por los cuales la melatonina ejerce su efecto potenciador sobre los agentes antineoplásicos están comenzando a ser caracterizados en modelos de diferentes tipos de tumores en estos últimos años. Algunos de los descritos son los

siguientes: En células no pequeñas de cáncer de pulmón, la melatonina potenció el efecto del gefitinib, inhibidor específico del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) (Yun y cols., 2014); También en células de cáncer de pulmón la melatonina incrementó el porcentaje de células que entraron en apoptosis en respuesta al cisplatino (Plaimee y cols., 2015); En células derivadas de tumores pancreáticos de ratas, la melatonina incrementó los efectos citotóxicos y apoptóticos del cisplatino, el fluorouracilo y la doxorrubicina (Uguz y cols., 2012); La combinación de melatonina y gemcitabina resultó en una reducción de la proliferación y el potencial invasivo en células de adenocarcinoma ductal pancreático, efecto explicado al menos parcialmente a través de la inhibición de NF- κ B (Kerr, 2004).

Ya en células de cáncer de mama, la hormona pineal indujo un incremento en la expresión de *BIM* (*Bcl2-like protein*) en paralelo con una disminución de la ciclooxygenasa 2 (COX-2) en células tratadas con tunicamicina (Woo y cols., 2015). En las células MCF-7, la combinación de melatonina y doxorrubicina mostró un efecto sinérgico sobre la apoptosis y el estrés oxidativo mitocondrial; los niveles de PARP (*Peroxisome Proliferator-Activated Receptor*), caspasa-3 y caspasa-9 se vieron significativamente incrementados en respuesta al tratamiento conjunto (Koşar y cols., 2016). La combinación con ácido valproico estimuló la producción del receptor MT-1 de melatonina y el efecto antiproliferativo del mismo (Jawed y cols., 2007). La hormona pineal también demostró ser efectiva en combinación con docetaxel, potenciando los efectos antiangiogénicos del mismo en un modelo de tejido peritumoral mamario (González-González y cols., 2020).

In vivo, en combinación con doxorrubicina, el cotratamiento con melatonina disminuyó el tamaño de los tumores, estimuló la entrada de las células tumorales en apoptosis y también aumentó la supervivencia (Ma y cols., 2015). También *in vivo*, se ha descrito que la combinación de melatonina con estatinas incrementó los efectos antineoplásicos de las mismas (Orendás y cols., 2014). El efecto antiapoptótico de esta combinación tuvo lugar por activación de las caspasas 3 y 7, en paralelo con una inhibición del marcador de proliferación ki67 (Kubatka y cols., 2014). En animales con tumores mamarios inducidos con DMBA, la combinación de melatonina y resveratrol resultó muy efectiva reduciendo la incidencia tumoral y disminuyendo la cantidad de tumores invasivos (Kisková y cols., 2012).

Con respecto a la combinación de melatonina y docetaxel, hasta la fecha, sólo hay un trabajo publicado donde se haya estudiado el efecto de ambos compuestos en un modelo de tumores mamarios, en este caso en ratones transgénicos Her2/neu con adenocarcinomas mamarios, en los que la administración de melatonina potenció los efectos antitumorales de la doxorubicina y el docetaxel (Panchenko y cols., 2020).

1.2.9 La melatonina como sensibilizador a los efectos de la radioterapia

La radioterapia es un tratamiento local comúnmente utilizado que se aplica tanto de forma adyuvante como neoadyuvante, de tal manera que cerca de un 80% de los pacientes con diagnóstico de cáncer reciben radiación ionizante, bien sola o en combinación con hormonoterapia o quimioterapia. Como todos los tratamientos agresivos, la radioterapia presenta una serie de efectos adversos. Por lo tanto, los tratamientos adyuvantes a la radiación ionizante persiguen dos objetivos fundamentales: potenciar la respuesta de las células tumorales a la radiación y proteger a los tejidos normales circundantes. Así, las dos estrategias terapéuticas empleadas son: el uso de radiosensibilizadores que fundamentalmente ejercen su acción sobre las células tumorales, optimizando el efecto de la radioterapia; y de radioprotectores, que buscan reducir los efectos deletéreos sobre las células normales (Alonso-González y cols., 2020).

La melatonina es una molécula para la cual se han descrito acciones radioprotectoras y radiosensibilizadoras. La hormona pineal lleva a cabo acciones radioprotectoras a través de mecanismos como la neutralización de radicales libres, el incremento de la respuesta ante el daño en el ADN y la reducción de la respuesta inflamatoria (Farhood y cols., 2019). La lesión citotóxica principal inducida por la radiación ionizante es la rotura de la doble cadena de ADN que, si no es reparada, provoca la parada del ciclo celular y/o la muerte celular. En células tumorales humanas de cabeza y cuello se ha demostrado que el aumento de la capacidad reparadora del ADN está relacionado con la resistencia a la radioterapia (Weichselbaum y cols., 1986).

Hasta la fecha, se han llevado a cabo muy pocos ensayos clínicos en los que se haya valorado el efecto de la melatonina en combinación con la radiación ionizante. Uno de los primeros fue el diseñado por Lissoni y colaboradores en pacientes con glioblastoma. Su estudio preliminar indicó que los pacientes que recibieron melatonina además de radioterapia se beneficiaron de una mejora en la calidad de vida, además de un incremento en la esperanza de supervivencia a un año (Lissoni y cols., 1996). Sin embargo, otros

estudios no encontraron efectos beneficiosos en respuesta a la administración de la indolamina; así, por ejemplo, en pacientes con metástasis cerebrales, no se vio ninguna mejora en el deterioro neurológico en respuesta a la hormona pineal (Berk y cols., 2007).

En cuanto a los estudios *in vivo*, en los últimos años se ha caracterizado el papel radioprotector de la melatonina. Cuando se administra una dosis normalmente letal de radiación ionizante a ratones, éstos consiguen sobrevivir si han sido tratados previamente con melatonina (Blickenstaff y cols., 1994). También se ha demostrado que administrar melatonina a los ratones como paso previo a la exposición a la radiación, reduce el daño genómico en las células de la sangre y la médula ósea (Vijayalaxmi y cols., 1999; Shirazi y cols., 2007).

La administración de melatonina antes de someter a las ratas a la radiación de alta energía demostró que esta indolamina es capaz de proteger frente al daño molecular estimulando la producción de enzimas antioxidantes endógenas, lo que conlleva la eliminación de los radicales libres generados en respuesta a la radiación, en estos animales, además, se pudo observar un aumento en el número de linfocitos (Shirazi y cols., 2013). Esta observación tiene especial relevancia ya que sugiere que la administración de melatonina podría contribuir a impedir el inicio de cáncer en otros tejidos sanos de los pacientes (Reiter y cols., 2017).

En algunos tipos de tumores agresivos que han desarrollado resistencia a la radioterapia, se produce una sobreexpresión de *HIF-1 α* y *VEGF*, lo cual estimula la angiogénesis tumoral. Estudios realizados en ratones *in vivo* han demostrado la capacidad de la melatonina para reducir la expresión de estos genes, inhibiendo por lo tanto la angiogénesis y la progresión tumoral (Kim y cols., 2013).

Numerosos experimentos realizados *in vitro* han encontrado evidencias moleculares que explican el papel potenciador de la melatonina sobre la radiación ionizante. A concentraciones fisiológicas, la hormona pineal es capaz de interferir con la capacidad de las células tumorales mamarias con crecimiento dependiente de estrógenos para reparar alteraciones en el ADN inducidas por la radiación, principalmente roturas de doble hebra, lo que dirige a las células hacia la apoptosis. En concreto, cuando las células radiadas se pretrataron con melatonina, la expresión de *RAD51* y de la *ADN-PKcs*, dos proteínas implicadas en mecanismos de reparación de roturas de doble hebra, se vieron inhibidas, lo que hace a las células tumorales más sensibles a la radiación (Alonso-González y cols.,

2015). En este mismo estudio, los niveles de p53 y p21 aumentaron notablemente en las células pretratadas, en paralelo con una disminución de la capacidad de sintetizar estrógenos. La radiación disminuyó la expresión y la actividad de la aromatasa, la sulfatasa y la 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa 1, todas ellas enzimas participantes en la producción de estrógenos, y el pretratamiento con melatonina agudizó aún más este efecto inhibitor (Alonso-González y cols., 2016).

Otros resultados de nuestro laboratorio nos han permitido observar que la melatonina no solamente sensibiliza a las células tumorales, sino que también tiene un efecto sobre las células peritumorales (células endoteliales y adipocitos mamarios). A una concentración farmacológica de 1 mM, la hormona pineal potenció el efecto inhibitor de la radiación sobre la angiogénesis a diferentes niveles (proliferación, migración o formación de estructuras tubulares), y también contribuyó al efecto represor de la radiación ionizante sobre los enzimas implicados en la biosíntesis de estrógenos; en cocultivos de células endoteliales y células de cáncer de mama, la radiación disminuyó la actividad y expresión de la aromatasa, la sulfatasa y la 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa 1 y la melatonina potenció este efecto (González-González y cols., 2019a). El mismo resultado se obtuvo en un modelo de fibroblastos mamarios: la radiación disminuyó la actividad y expresión del enzima aromatasa y este efecto se vio incrementado cuando la melatonina se administró en pretratamiento previo a la radiación (González-González y cols., 2019b).

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

2.1 JUSTIFICACIÓN

El cáncer de mama es una de las neoplasias más frecuentes en mujeres a nivel mundial. Si bien la tasa de mortalidad ha descendido a lo largo de los años, debido en gran parte a los programas de detección precoz y a las mejoras introducidas en las estrategias terapéuticas, que incluyen a la quimioterapia y radioterapia como dos de las terapias más efectivas, los principales problemas derivados de estos tratamientos son sus numerosos y severos efectos secundarios, así como la generación a largo plazo de resistencias que disminuyen su efectividad. En los últimos años, una de las estrategias de tratamiento ha sido la búsqueda de nuevas moléculas adyuvantes, que aumenten la eficacia de la quimioterapia y/o la radioterapia, al mismo tiempo que reduzcan sus efectos negativos. Por lo tanto, el punto de partida de esta tesis doctoral se basa en las siguientes premisas:

- La melatonina ejerce múltiples acciones oncostáticas en el cáncer de mama hormonodependiente, muchas de ellas asociadas a su capacidad de actuar como un antiestrógeno, bien regulando la actividad de las enzimas implicadas en la síntesis de 17β -estradiol (*SEEM*) tanto en el tejido tumoral como en el peritumoral mamario, bien inhibiendo la transcripción mediada por el receptor de estrógenos (*SERM*), comportándose como un modulador selectivo del mismo.
- Recientemente han comenzado a demostrarse los efectos tanto protectores (en los tejidos sanos) como sensibilizadores (en el tejido tumoral) de esta indolamina a la quimioterapia y radioterapia sobre distintos tipos de cáncer, incluido el de mama.
- Dentro de las acciones sensibilizadoras se encuentra su capacidad para potenciar los efectos antiproliferativos, citotóxicos y proapoptóticos de la quimioterapia y radioterapia en las células tumorales. Adicionalmente, la melatonina también ejerce acciones antiangiogénicas.
- Los cambios que se producen a nivel molecular en respuesta al tratamiento con fármacos antineoplásicos o la radioterapia, como las acciones de la melatonina modificando dichos cambios, son aún desconocidos en gran medida.
- En ensayos clínicos, la melatonina mejora la calidad de vida de los pacientes (menos efectos adversos), incrementa el número de casos que experimentan remisión parcial o total y aumenta la tasa de supervivencia a un año.

2.2 OBJETIVOS

Por todo lo anteriormente expuesto, el objetivo general de esta tesis doctoral ha sido estudiar las modificaciones moleculares inducidas por la radioterapia y la quimioterapia en las células tumorales mamarias, así como los cambios diferenciales que ocurren en estas células cuando estos tratamientos se combinan con melatonina. Para ello, nos hemos planteado tres grandes objetivos:

1. Estudiar la capacidad de la melatonina para modular los cambios inducidos por la radiación ionizante en células tumorales mamarias (MCF-7) analizando:
 - la capacidad para potenciar los efectos antiproliferativos y proapoptóticos.
 - las modificaciones en el patrón de expresión génica.
 - los efectos a nivel del fosfoproteoma.
 - las acciones antiangiogénicas en un modelo *in vivo* de formación de nuevos vasos sanguíneos.
2. Estudiar los efectos de la melatonina sobre los cambios inducidos por el docetaxel en células tumorales mamarias (MCF-7) comprobando:
 - la capacidad para potenciar los efectos antiproliferativos de concentraciones subfarmacológicas de docetaxel.
 - las modificaciones producidas sobre las fases del ciclo celular y sobre la apoptosis en respuesta a concentraciones subfarmacológicas de docetaxel.
 - las alteraciones en el patrón de expresión génica en respuesta a concentraciones farmacológicas de docetaxel.
 - las acciones antitumorales en un modelo *in vivo* de tumores mamarios.
3. Estudiar los efectos protectores de la melatonina sobre los cambios inducidos por la doxorrubicina en células tumorales mamarias (MCF-7 y MDA-MB-231) caracterizando:
 - los efectos sobre proliferación, invasión y migración.
 - las modificaciones en el patrón de expresión génica y de microARNs.
 - la capacidad para inhibir a Twist1, un factor implicado en la transición epitelio-mesénquima.
 - las modificaciones a nivel del fosfoproteoma.
 - las acciones antitumorales en un modelo *in vivo* de tumores mamarios.

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 CULTIVOS CELULARES

3.1.1 Líneas celulares utilizadas

Para la realización de los experimentos descritos en esta tesis se han utilizado tres líneas celulares (MCF-7, MDA-MB-231 y BRF) (**tabla 3.1**) que fueron adquiridas en la ATCC (American Type Culture Collection).

La línea celular denominada MCF-7 (*Michigan Cancer Foundation*) fue inicialmente establecida desde una efusión pleural de una paciente y se trata de células epiteliales inmortalizadas procedentes de adenocarcinoma mamario humano (RE+). Las células presentan por tanto algunas propiedades de epitelio mamario diferenciado incluyendo la síntesis de estradiol.

La segunda línea celular utilizada ha sido la línea MDA-MB-231 (*M.D. Anderson Metastasis Breast Cancer*). Se diferencia de la anterior en que el adenocarcinoma del que se obtuvieron inicialmente no expresaba el receptor de estrógenos (RE-).

En ambas líneas, el medio de cultivo utilizado ha sido el DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) (Cambrex, BioWhittaker) suplementado con 10% (v/v) de Suero Fetal Bobino (SFB).

La tercera línea celular utilizada fue la línea BRF (*Breast Fibroblasts*), que procede de fibroblastos mamaros humanos (preadipocitos). En este caso el medio de cultivo empleado ha sido medio de preadipocitos (Cell Application, INC). Para su diferenciación en adipocitos maduros se cultivaron en medio de diferenciación (Cell Application, INC) durante una semana.

Línea celular	Origen	Medio de cultivo
MCF-7	Epitelio de adenocarcinoma mamario humano (RE+)	DMEM + 10% SFB
MDA-MB-231	Epitelio de adenocarcinoma mamario humano (RE-)	DMEM + 10% SFB
BRF	Tejido adiposo mamario humano (preadipocito)	Medio de desarrollo de preadipocitos

Tabla 3.1: Líneas celulares. **MCF-7:** *Michigan Cancer Foundation*; **MDA-MB-231:** *M.D. Anderson Metastasis Breast Cancer*; **BRF:** *Breast Fibroblasts*; DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*; SFB: Suero Fetal Bovino.

3.1.2 Condiciones de cultivo comunes a todas las líneas celulares

Todas las líneas celulares utilizadas en este trabajo se mantuvieron rutinariamente en placas de plástico de 10 cm de diámetro (Falcon) y en una atmósfera a 37°C saturada de agua y con 5% de CO₂. Las células proliferan formando una monocapa adherida a la base de las placas. Los medios de cultivo fueron suplementados con una protección antibiótica de 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina (Sigma-Aldrich). Se mantuvieron varios stocks de cada una de las líneas celulares a -150°C en una solución crioprotectora compuesta de un 90% (v/v) de SFB (PAA Laboratories, Pasching) y un 10% de dimetil-sulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich).

3.1.3 Condiciones de subcultivo

Cuando las células alcanzaron aproximadamente el 80% de confluencia se procedió a su subcultivo para asegurar el crecimiento exponencial de las mismas. Para ello, se retiró el medio de la placa y se lavó con PBS (*Phosphate Buffered Saline*: NaCl 8 g/L, KCl 0,2 g/L, Na₂HPO₄ 1,4 g/L, KH₂PO₄ 0,24 g/L, pH 7,4). A continuación, se añadió una solución de 0,25% de tripsina-EDTA (0,25% de tripsina (p/v), 0,2 g/L EDTA) (Sigma-Aldrich) y se incubó durante cuatro minutos a 37°C para despegar las células de la superficie de la placa. En el paso siguiente, las células se recogieron en el medio de cultivo correspondiente, actuando el suero como inactivador de la tripsina, y se centrifugaron a 100 x g durante cinco minutos. Por último, el sedimento se resuspendió en medio de cultivo fresco, repartiendo la suspensión celular en distintas placas.

3.1.4 Recuentos celulares para siembras y viabilidad celular

De la suspensión celular obtenida en cada subcultivo se tomaron 100 µl para llevar a cabo el recuento celular en una cámara de Neubauer (Marienfeld, GmbH) mediante un microscopio óptico de fluorescencia invertido (Nikon TMS) utilizando un aumento de 10X. En todos los casos se realizó la tinción de la muestra con el colorante *trypan blue* 0,4% v/v (Sigma-Aldrich), que permitió valorar la proporción de células viables (las que excluyen el colorante), frente a las no viables.

3.1.5 Cocultivos de células BRF y MCF-7

Para los experimentos de cocultivos celulares se usaron placas de cultivo de seis pocillos (Falcon) en los que se sembraron 13.000 células MCF-7. Al cabo de dos días, se colocó un soporte o *insert* (Falcon) provisto de una membrana permeable con poros de 0,45 μm de diámetro, sobre la que se habían sembrado 24.000 adipocitos maduros también dos días antes. Estos cocultivos se mantuvieron durante cinco días en una atmósfera a 37°C y 5% de CO₂. El uso de este dispositivo permitió valorar la influencia de los adipocitos maduros diferenciados a partir de las células BRF sobre la expresión génica de *CDKN1A* y *TWIST1* en las células MCF-7. En la siguiente figura (**figura 3.1**) se representa el dispositivo utilizado en estos experimentos, el cual consiste en un pocillo de las placas de seis pocillos y un soporte permeable (*insert*) colocado en la parte superior.

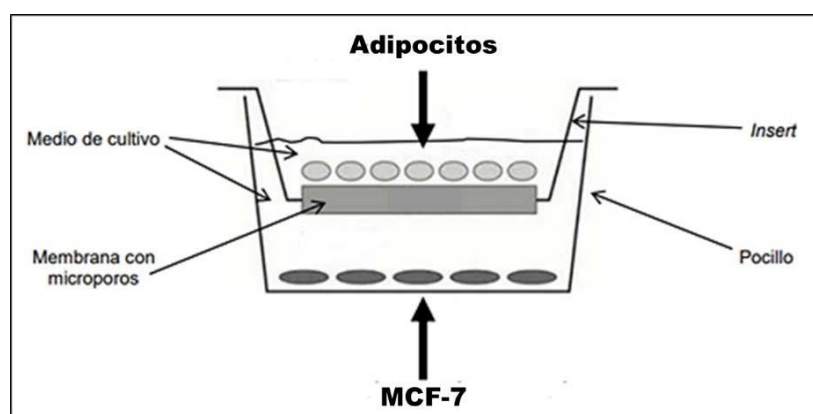


Figura 3.1: Pocillo e insert utilizados en los experimentos de cocultivos celulares. (Imagen modificada de <https://www.membrane-solutions.com/Co-Culture-Plate.htm>).

3.1.6 Tratamientos con melatonina

La melatonina (Sigma-Aldrich) se disolvió en etanol 100% a una concentración de 100 mM y se almacenó en alícuotas a -20°C. En el momento de proceder al tratamiento de las células se realizó una dilución de 1000 veces en el medio de cultivo, de manera que la concentración final de etanol en el medio fue de 0,1% (v/v). Para descartar cualquier influencia del alcohol, una cantidad equivalente de etanol fue añadida a las células que constituyeron el grupo control.

Para valorar los posibles efectos de la melatonina sobre los cambios inducidos por la radiación en las células MCF-7 se estableció un grupo experimental donde se administró la melatonina a las células en cultivo una semana antes de someterlas a la radiación (pretratamiento). En este grupo experimental, las células se sembraron a una densidad de

4×10^6 células/placa, en medio DMEM suplementado con 10% de SFB. Tras 24 horas de incubación para permitir la correcta adherencia de las células a la placa de cultivo, se realizaron dos lavados con PBS y se añadió medio DMEM sin rojo fenol suplementado con 0,5% suero desprovisto de estrógenos y factores de crecimiento (DCC-SFB), para sincronizar las células del cultivo. A las 24 horas, se realizaron de nuevo dos lavados con PBS y se añadió medio DMEM sin rojo fenol suplementado con 10% SFB junto con el tratamiento de melatonina correspondiente (a una concentración final de 1 nM) que se mantuvo durante una semana antes de someter a las células a la radiación.

En el caso de los estudios llevados a cabo con el agente antineoplásico docetaxel, el pretratamiento con melatonina se realizó únicamente durante 24 horas.

3.1.7 Tratamiento con radiación ionizante

Las células MCF-7 se expusieron a radiación X usando un tubo modelo YXLON SMART 200 (Yxlon International, Hamburgo, Alemania) a temperatura ambiente. Basándonos en un estudio anterior (Alonso-González y cols., 2015), utilizamos radiación de 8 Gy como dosis de radiación óptima. La radiación se administró como una dosis única en un campo de $11,5 \text{ cm} \times 8,5 \text{ cm}$. La distancia entre la fuente y la profundidad media se calculó inicialmente para obtener una tasa de dosis constante de $0,92 \text{ Gy} / \text{min}$. Las células de los grupos control se retiraron de la incubadora y se colocaron durante el mismo período de tiempo en el irradiador, pero sin radiación.

3.1.8 Tratamientos con quimioterápicos

En el desarrollo experimental de esta tesis se han utilizado dos fármacos antineoplásicos de uso clínico habitual en pacientes de cáncer de mama: docetaxel y doxorrubicina.

El docetaxel es un antimitótico que inhibe la división celular. Perteneciente al grupo de los taxanos y actúa interfiriendo en la dinámica de los microtúbulos de las células. Concretamente, inhibe la despolimerización de la tubulina, estabilizando el ensamblaje de la misma (**figura 3.2 A**).

La doxorrubicina es un fármaco perteneciente a la familia de las antraciclinas. Este compuesto se intercala en el ADN, uniéndose a bases de guanina, dificultando el avance de la topoisomerasa II. De esta manera la topoisomerasa II no puede desenrollar el ADN y el proceso de replicación se detiene (**figura 3.2 B**).

Ambos quimioterápicos se disolvieron en etanol 100% a una concentración de 0,1 M. A partir de esa concentración se llevaron a cabo diluciones hasta una concentración final de 0,001 M en agua destilada y se almacenaron a -4°C como stock. Ambos agentes se adquirieron en Sigma-Aldrich.

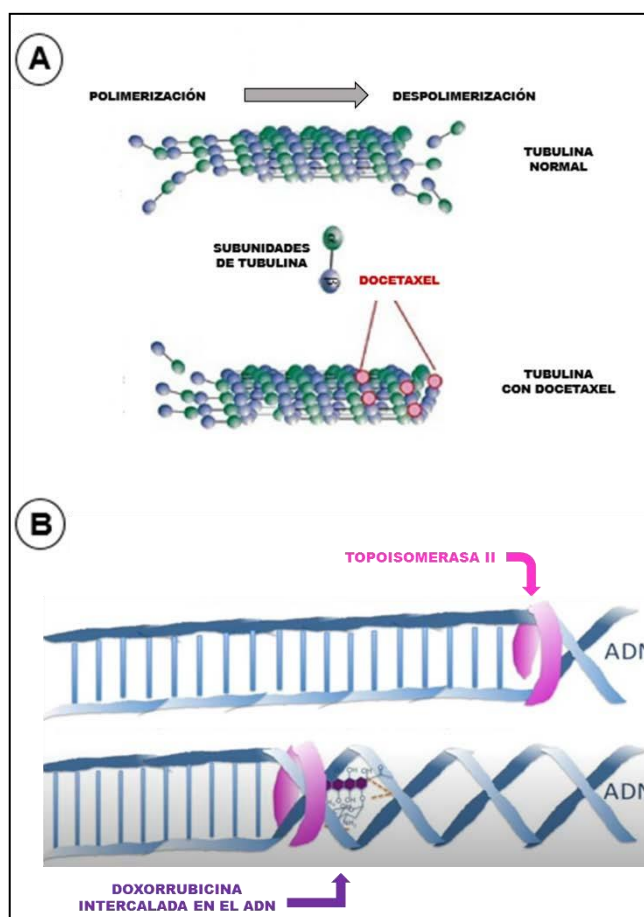


Figura 3.2: Mecanismo de acción de los fármacos de quimioterapia. (A) El docetaxel inhibe la despolimerización de los microtúbulos mediante su anclaje a las subunidades de tubulina (Imagen modificada de Sohail y cols., 2018). **(B)** La doxorubicina se une al ADN anclándose a las bases de guanina y bloquea el avance de la topoisomerasa II, inhibiendo así el desenrollamiento de la doble hélice de ADN, necesario para llevar a cabo la replicación (Imagen modificada de Mobaraki y cols., 2017).

3.2 MEDIDA DE LA PROLIFERACIÓN Y LA VIABILIDAD CELULAR

3.2.1 Medida de la actividad metabólica (método del MTT)

Los ensayos de proliferación celular se llevaron a cabo en las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231. En ambos casos las células se sembraron en placas de 96 pocillos (Falcon), a una densidad de 8×10^3 células/pocillo, en medio DMEM suplementado con 10% de SFB. Tras 24 horas para permitir la correcta adherencia de las células a la placa de cultivo, se realizaron dos lavados con PBS y se añadió medio DMEM sin rojo fenol

junto con los tratamientos correspondientes. La proliferación celular se evaluó mediante el método del MTT (reducción de sales de tetrazolio), según el protocolo descrito por Mosmann en 1983.

El ensayo del MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 bromuro difeniltetrazolio] (Molecular Probes Inc, Eugene, OR, EE.UU.) es un ensayo colorimétrico que mide la actividad metabólica de las células en fase de proliferación activa. Está basado en la rotura del anillo de tetrazolio del MTT (color amarillo) por las deshidrogenasas mitocondriales, formándose cristales de formazán (color violeta), que son insolubles en agua, pero pueden solubilizarse con disolventes orgánicos. Su concentración se determina midiendo la densidad óptica a una longitud de onda de 570 nm, siendo la cantidad de formazán producida directamente proporcional al número de células metabólicamente activas (proliferantes) hasta aproximadamente 10^6 células por pocillo (Mosmann, 1983; Denizot y Lang, 1986).

La medida de la proliferación celular se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante, con las siguientes modificaciones: se mezcló 1 ml de una solución madre de MTT (12 nM) disuelta en PBS, con 10 ml de medio DMEM sin rojo fenol. Tras retirar el medio de cultivo de la placa, se añadieron 110 μ l a cada pocillo. A las cuatro horas de incubación de las placas a 37°C, se solubilizaron los cristales de formazán añadiendo 100 μ l por pocillo de una solución de SDS-HCl (0,01 N) (conteniendo 1 gramo de SDS). A las 24 horas se midió la absorbancia a 570 nm empleando un lector de microplacas (*Labsystems MultiSkan RC 351*, Vienna, VA, EE. UU.). En todos los casos se restó la absorbancia de los blancos, que contenían todos los reactivos, pero no las células. Dado que la relación entre la densidad óptica y el número de células es lineal en un rango de hasta 10^6 células, la proliferación celular se representó como medida de la absorbancia. Cada experimento se realizó al menos tres veces y los resultados se indicaron como la media $\pm$ el error estándar de la media (SEM).

3.2.2 Ensayo de clonogenicidad

Un ensayo de clonogenicidad es una técnica que permite valorar la capacidad de las células tumorales para proliferar y formar colonias tras haber sido expuestas a un determinado fármaco o a radiación. En nuestro caso, este ensayo se realizó para valorar el efecto del pretratamiento con melatonina y/o la radiación sobre la supervivencia celular.

Las células MCF-7, tanto del grupo control como las pretratadas con melatonina (1 mM, 10 μ M o 1 nM) durante una semana, se cultivaron en un sistema de agar blando bicapa modificado del previamente descrito en la literatura (Hamburger y Salmon, 1977). Más concretamente, la capa inferior consistió en DMEM enriquecido con SFB, penicilina (20 unidades / ml) y estreptomycin (20 μ g/ml). A esta capa se le añadió una suspensión al 3% de agar caliente (70–75°C) para obtener una concentración final de agar al 0,5%. A continuación, se dispensó 1 ml de la suspensión resultante (40–42°C) en una placa de Petri de 35 mm² y se dejó enfriar a temperatura ambiente. La capa superior constaba del mismo medio que la capa inferior.

La siembra de las células MCF-7 (pretratadas con melatonina y control) se realizó sobre la capa inferior, añadiendo 0,5 ml de una suspensión celular ($1,75 \times 10^5$ células viables) junto con 0,5 ml de la suspensión de DMEM + agar al 0,5% (40–42°C) por cada pocillo. A continuación, las células se incubaron a 37°C con 5% de CO₂ y 100% de humedad durante 24 horas y posteriormente fueron expuestas a una radiación de 8 Gy. Las placas se incubaron durante varios días, asumiendo que las células sin tratar se dividen con normalidad cada 24 horas, y se observaron periódicamente en un microscopio invertido. Se realizaron los cambios de medio de cultivo de manera rutinaria durante todo el tiempo que duró el experimento (diez días). Al finalizar, se aspiró el medio, se realizaron dos lavados con PBS y se añadieron 500 μ l por placa de una solución del colorante cristal violeta (Sigma-Aldrich) que permite valorar las células viables. Tras 45 minutos de incubación con el colorante, se lavó la placa con agua y se dejó secar a temperatura ambiente antes de realizar el conteo de las colonias en un microscopio óptico de fluorescencia invertido (Nikon TMS) utilizando un aumento de 10X. Para el estudio fueron seleccionadas aquellas colonias mayores de 150 μ m (constituidas por al menos 50 células).

La **fracción de supervivencia (FS)** se calculó mediante la siguiente fórmula:

- **FS** = (n° colonias observadas x eficiencia de clonaje) / n° de células sembradas
- **Eficiencia de Clonaje:** Capacidad de formación de colonias del grupo control

Los experimentos se realizaron al menos tres veces, y los resultados se expresaron en función de la fracción de supervivencia del grupo control.

3.3 ANÁLISIS DEL CICLO CELULAR

Las distintas fases del ciclo celular pueden estudiarse en base al contenido de ADN de las células en cultivo mediante técnicas de citometría de flujo. Es sabido que las células que están en la fase G_0 - G_1 no se están dividiendo y por tanto presentan una carga cromosómica normal ($2n$). En cambio, las células en fase S o G_2 -M están duplicando su material genético antes de la mitosis ($4n$). Para medir el contenido de ADN se emplean fluorocromos como el ioduro de propidio (IP), que se une estequiométricamente al material genético de las células, siendo proporcional la fluorescencia que emite al contenido cromosómico total. De esta manera se produce un patrón característico que refleja el número de células en cada fase del ciclo celular (**figura 3.3**).

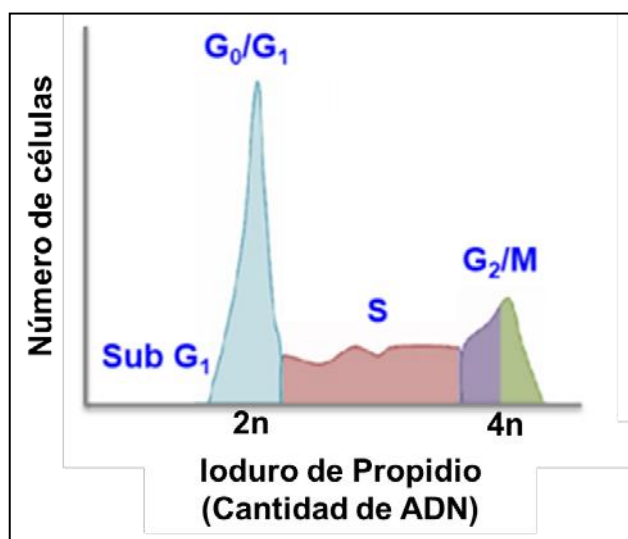


Figura 3.3: Histograma de las fases del ciclo celular. El ioduro de propidio se une estequiométricamente al ADN, por lo que la fluorescencia emitida es proporcional al contenido cromosómico total ($2n$ en fase G_1 y $4n$ en fase G_2 /M, cuando la célula duplica su material genético antes de la mitosis). (Imagen modificada de 100cias@uned, 2018).

En estos experimentos, las células MCF-7 se sembraron en placas de 6 pocillos a una densidad de 5×10^5 células por pocillo en medio DMEM suplementado con 10% SFB y se incubaron a 37°C durante 24 horas. Al día siguiente se cambió el medio por otro que contenía 0,5% de suero DCC-SFB para permitir la sincronización del cultivo y de nuevo un día después el medio se reemplazó por otro nuevo suplementado con 10% SFB y que contenía docetaxel (1 nM) solo o en combinación con melatonina (1 nM) y/o el vehículo (etanol a una concentración final $<0,01\%$). Después de 24 horas de tratamientos, las células se despegaron con tripsina, se lavaron dos veces con PBS y se fijaron añadiendo gota a gota etanol frío al 70% e incubando durante 30 minutos.

Tras la eliminación del etanol por centrifugación durante 5 minutos a $300 \times g$, las células se tiñeron con 500 μl de una solución que contenía 50 $\mu\text{g/ml}$ de ioduro de propidio (Sigma-Aldrich) y 100 $\mu\text{g/ml}$ de ARN-asa (para eliminar el ARN presente en las muestras) y se incubaron en oscuridad durante 30 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se contaron 10.000 células de cada muestra en un analizador BD FACS Canto II (BD Biosciences, San José, CA, EE. UU.) y la distribución de células en cada fase del ciclo se determinó utilizando el *software* de análisis FACSDivaTM (BD Biosciences).

3.4 DETERMINACIÓN DE LA MUERTE CELULAR

Durante las fases iniciales de la apoptosis se producen cambios en la superficie de las células que pueden ser valorados mediante la tinción con ioduro de propidio/Anexina-V y posterior análisis mediante citometría de flujo. Más concretamente, al inicio del proceso apoptótico se produce en la membrana plasmática la translocación de la fosfatidilserina de la cara interna a la cara externa de la membrana, pudiendo entonces unirse a ésta la Anexina-V. La fosfatidilserina también se encuentra en la cara externa de la membrana de las células necróticas, mientras que en las viables la encontramos en la cara interna de la membrana y por tanto no puede ser marcada con la Anexina-V. Por otro lado, en las células necróticas también se ve comprometida la integridad de la membrana, de manera que al teñirlas con ioduro de propidio, éste puede acceder al núcleo celular y unirse al ADN. La tinción simultánea con ioduro de propidio y Anexina-V permite discriminar las células apoptóticas (positivas únicamente para Anexina) de las necróticas (doble positivas), y de las células viables (doble negativas).

La inducción de la apoptosis en células MCF-7 fue determinada usando el kit de detección de apoptosis *Annexin V-FITC* (Miltenyi Biotec GmbH, Germany). Las células fueron inicialmente cultivadas en placas de seis pocillos durante 24 horas en medio DMEM suplementado con 10% de SFB. Pasado este tiempo, se retiró el medio y se añadió medio fresco con los tratamientos correspondientes (docetaxel y/o melatonina a las concentraciones especificadas en la descripción de los resultados). Tras 24 horas de incubación las células fueron recogidas y centrifugadas a $300 \times g$ durante 10 minutos. A continuación, se descartó el sobrenadante y el pellet de células se resuspendió en 100 μl de un buffer que contenía 5 μl de Anexina V-FITC. Las células fueron incubadas durante 15 minutos a temperatura ambiente, tras los cuales se lavaron dos veces con PBS, y se resuspendieron en 500 μl de un buffer que contenía 5 μl de ioduro de propidio. Inmediatamente después las células fueron analizadas con las sondas correspondientes

por citometría de flujo (Becton Dickinson FACS CANTO II *analyzer*). Al menos 10.000 eventos fueron analizados usando los detectores FL-1 de 515 nm (verde) para la detección de la fluoresceína (Anexina V-FITC) y un filtro FL-3 de 600 nm (rojo) para la detección del yoduro de propidio. Los resultados se analizaron comparando el porcentaje de células en cada cuadrante, tal y como se muestra en la **figura 3.4**.

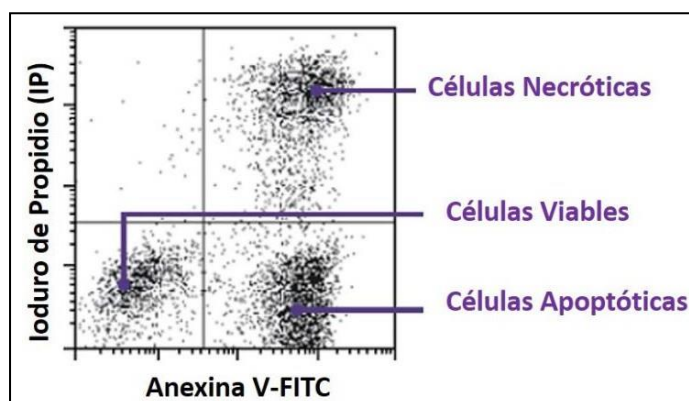


Figura 3.4: Representación gráfica del análisis por citometría de flujo de las células viables (Anexina⁻/IP⁻), apoptóticas (Anexina⁺/IP⁻) y necróticas (Anexina⁺/IP⁺). (Imagen modificada del manual AnnexinV-FITC Miltenyi Biotec).

3.5 ESTUDIOS DE EXPRESIÓN GÉNICA

En este apartado se incluye la metodología empleada para valorar los cambios en la expresión de diferentes genes y microARNs (miARNs) a partir de cultivos *in vitro* de células tumorales mamarias o bien de xenógrafos obtenidos en ratones atímicos. Los tratamientos empleados en los estudios de expresión génica *in vitro* han sido melatonina (1 nM) y/o radiación (8 Gy), docetaxel (1 μ M, 1 nM) y doxorubicina (1 μ M).

3.5.1 Extracción de ARN total de las células en cultivo

Para la extracción de ARN total de las células se utilizó el kit comercial NucleoSpin II (Macherey-Nagel), cuyo protocolo se resume en lisis celular, homogenización por filtración, unión, lavado, incubación con ADNasa, lavado y elución (**figura 3.5**).

Las células se lavaron con PBS y se homogeneizaron sobre la placa de cultivo, utilizando un tampón de lisis con un alto contenido en tiocinato de guanidina, que inactiva las ARNasas. El lisado se dispuso en una columna de filtración (*Nucleospin Filter Units*) para reducir la viscosidad de la muestra y aumentar su pureza.

Una vez centrifugada a 11.000 x g, se le añadió etanol al 70% (v/v) para ajustar las condiciones óptimas de unión, y se unió a la membrana de silica gel de la misma. El ADN contaminante, que también se une a la membrana, se eliminó mediante incubación con ADNasa reconstituida. Después de tres lavados sucesivos para eliminar los restos de sales y componentes celulares no deseados, se eluyó el ARN en 40 µl de agua libre de ARNasas.



Figura 3.5: Esquema del método de extracción de ARN. (Imagen modificada del manual *NucleoSpin RNA II*, Macherey-Nagel).

3.5.2 Determinación de la cantidad y pureza del ARN

Para descartar muestras con un cierto grado de degradación se evaluó el estado del ARN mediante un gel de agarosa-Tris-Borato EDTA al 1% (p/v). La cuantificación de las muestras se realizó mediante la lectura de su absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro (Nanodrop 1000 V 3.6). La pureza se midió mediante el cociente entre absorbancia a 260 nm y a 280 nm, el cual hace referencia a la cantidad de proteínas presentes en la muestra. Un resultado de 2,0 indica un ARN puro, sin contaminantes. En todos los casos este cociente fue siempre superior a 1,8.

3.5.3 Síntesis de ADN complementario (ADNc)

La síntesis de ADNc de cada muestra se realizó a partir de 1000 ng de ARN total, en un volumen de reacción final de 20 μ l, con un kit de síntesis de ADNc (Nzytech). El volumen de los componentes para una reacción se muestra en la **tabla 3.2**:

Componente	Cantidad
ARN	1 μ g (<i>n</i> μ l)
2X Master Mix	10 μ l
Enzyme Mix	2 μ l
DEPC-H ₂ O	Hasta 20 μ l (<i>12-n</i>)
ARN-asa (<i>E. Coli</i>)	1 μ l

Tabla 3.2: Componentes empleados en la reacción de retrotranscripción. La ARNasa (*E. Coli*) se añade posteriormente, tras una primera incubación del resto de componentes mezclados.

La reacción se llevó a cabo incubando la mezcla de componentes en un termociclador (BioRad) en dos tiempos. En primer lugar, se incubó el ARN junto con el 2X *Master Mix*, el *Enzyme Mix* y el agua, durante 10 minutos a 25°C, seguidos de 30 minutos a 50°C y finalmente 5 minutos a 85°C. En segundo lugar, se añadió la ARNasa (*E. Coli*) y se incubó durante 20 minutos a 37°C. Una vez finalizada la síntesis de ADNc, las muestras se guardaron congeladas a -20°C hasta su uso.

3.5.4 Determinación de los perfiles de expresión génica mediante PCR a tiempo real (RT-PCR)

Para valorar los cambios en los perfiles de expresión génica inducidos por los diferentes tratamientos (melatonina y/o radiación, docetaxel y doxorubicina) en las células tumorales MCF-7, se utilizaron las placas *RT² ProfilerTM PCR Array* (PAHS131Z, Qiagen) que permiten determinar en un solo ensayo los cambios en el patrón de expresión de genes que participan en las diferentes vías de señalización modificadas en el cáncer de mama humano. Estas placas de 96 pocillos incluyen 84 pares de oligonucleótidos específicos para la amplificación de genes implicados en diferentes rutas como angiogénesis, adhesión, proteólisis, ciclo celular y apoptosis (posiciones de A1 a G12). Son genes, además, cuya pérdida de regulación en el cáncer ha sido ampliamente descrita en la literatura. Los doce pocillos restantes de la placa contienen los oligonucleótidos que permiten amplificar cinco genes de referencia (*housekeeping*) para normalizar los datos

(posiciones de H1 a H5), un control de contaminación de ADN genómico (H6), y seis controles adicionales para monitorizar la eficiencia de la reacción de la polimerasa (posiciones de H7 a H12) (**figura 3.6**).

Asimismo, se utilizó otro *array* que permite valorar los diferentes genes implicados en procesos de angiogénesis (PAHS024Z, Qiagen), que de nuevo incluía 84 pares de oligonucleótidos específicos para la amplificación de genes humanos implicados en procesos angiogénicos agrupados según su posible función en factores de crecimiento y receptores, moléculas de adhesión, proteasas, factores de transcripción, citoquinas y quimioquinas.

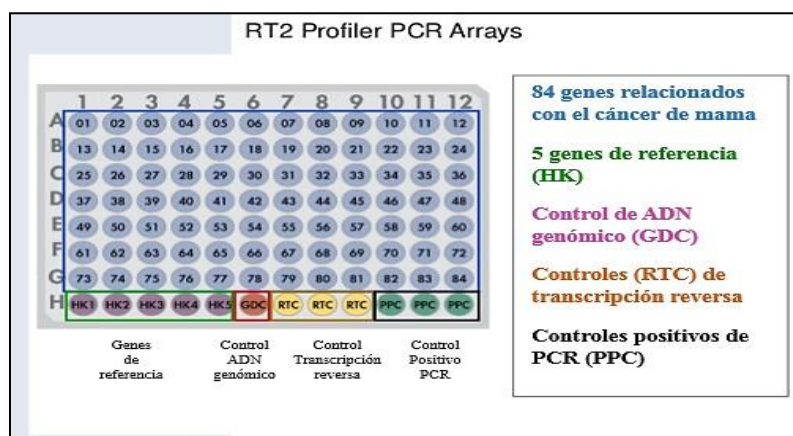


Figura 3.6: Esquema representativo de la distribución de genes y controles en una placa *RT² Profiler™ PCR Array* (Qiagen) de cáncer de mama. (Imagen modificada del manual de instrucciones).

En este caso, la expresión génica se analizó a partir del ADN complementario mediante la reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real descrita más en detalle en el **apartado 3.5.5**. El ADNc se mezcló con la *RT² Syber Green Mastermix* siguiendo el protocolo establecido por Qiagen, y posteriormente se alicuotó en las placas *RT² Profiler™ PCR Array*. Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador de tiempo real MX3005P Real-Time PCR (Stratagene), siendo las condiciones de amplificación las siguientes: 10 minutos a 95°C para la desnaturalización inicial del ADN, seguidos de 45 ciclos de 30 segundos a 95°C y un minuto a 60°C para la extensión (**figura 3.7**).

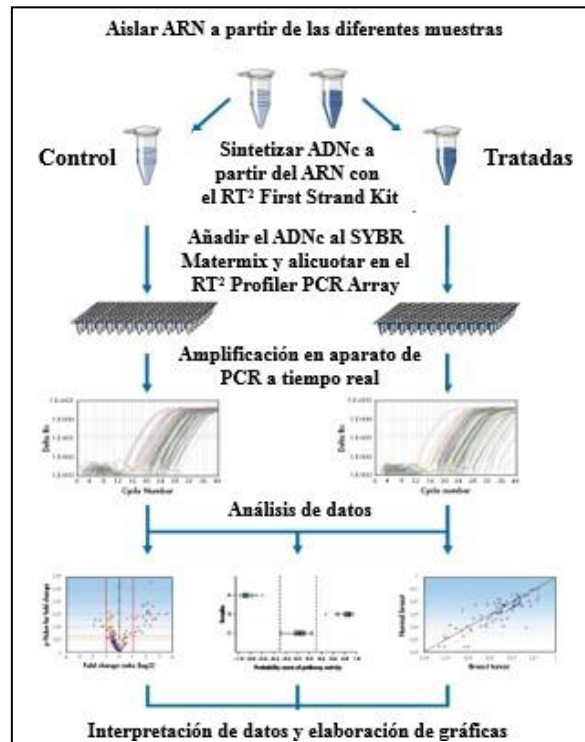


Figura 3.7: Esquema de las etapas del experimento de detección de la expresión génica global de los 84 genes relacionados con el cáncer de mama utilizando las placas *RT² Profiler™ PCR*. (Imagen modificada de <http://www.bumc.bu.edu/analytical-core/array-services/>).

3.5.5 Detección y cuantificación de la expresión génica mediante RT-PCR

Una vez sintetizado el ADN complementario al ARN inicial se puede proceder a preparar las muestras para la RT-PCR. Esta técnica consiste en monitorizar el progreso de la reacción de PCR a medida que va ocurriendo, desde el comienzo hasta el final. La detección se realiza al mismo tiempo que la amplificación, por lo que esta tecnología sustituye a la amplificación tradicional y la electroforesis. Se empleó como marcador el compuesto *Syber Green*, que se une al ADN bicatenario formado durante la reacción de amplificación y nos permite por tanto detectar la formación de los productos de la PCR conforme avanza la reacción ya que la intensidad de la fluorescencia aumenta de manera proporcional a la cantidad de los mismos. En esta técnica se marca un umbral de fluorescencia (*threshold*), en el punto en que la reacción de amplificación se encuentra en fase exponencial. El ciclo en el cual la reacción de amplificación atraviesa este umbral de fluorescencia se denomina C_T (*threshold cycle*) y depende de la cantidad de ADNc presente en cada muestra.

Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador de tiempo real MX3005P *Real-Time PCR* (Stratagene) usando tubos de 0,2 ml (Cmb Bioline, Cultek). En cada reacción se añadieron 6,25 μ l de mezcla de *Brilliant® Green PCR Master Mix* (Stratagene), 2,5 μ l (200 nM) de cada oligonucleótido, 0,5 μ l de ADNc, y agua libre de ARNasas hasta completar un volumen final de reacción de 12,5 μ l. Cada muestra se analizó por triplicado (a no ser que se especifique lo contrario), y cada experimento se repitió un mínimo de tres veces en idénticas condiciones.

Las condiciones de amplificación fueron las establecidas por el programa con algunas modificaciones: desnaturalización inicial de 10 minutos a 95°C, seguida de 45 ciclos de 95°C durante 20 segundos y anillamiento a 60°C durante 60 segundos. Para verificar la especificidad de la reacción se añadió un ciclo adicional, la curva de disociación, donde las muestras se calentaron lentamente desde 60°C hasta 95°C, monitorizándose continuamente la fluorescencia emitida. Cuando se representa la derivada de la fluorescencia frente a la temperatura, aparece un pico correspondiente a la temperatura de fusión del producto (T_m). El área del pico es directamente proporcional a la cantidad de producto de amplificación obtenido. En las condiciones en las que se amplifica más de un producto, se detectan varios picos, cada uno con su T_m específica.

Los resultados fueron analizados con el programa de análisis *Stratagene MXPro software* versión 3.0 (*Stratagene*), donde se normalizó el resultado obtenido en las muestras de los genes de interés con respecto al gen de referencia (14S ARNr o Actina), utilizando un método de comparación de los valores de C_T (ΔC_T) (Livak y Schmittgen, 2001), que se resume en el siguiente esquema:

$$\Delta C_T = C_T \text{ gen interés} - C_T \text{ gen de referencia}$$

$$\Delta \Delta C_T = \Delta C_T \text{ condición problema} - \Delta C_T \text{ condición control}$$

$$\text{Cambio relativo de la expresión} = 2^{-\Delta \Delta C_T}$$

3.5.6 Diseño de los oligonucleótidos cebadores para RT-PCR

En el diseño de los oligonucleótidos cebadores para la RT-PCR se utilizaron los programas informáticos *Sequence Analysis 1.6* y *DNAMAN (Lynnon Corporation)* así como la página web *The Sequence Manipulation Suite*. Se consideraron adecuadas las parejas de oligonucleótidos cuya longitud estuviese en torno a 20-25 bases, su porcentaje de G+C fuera de aproximadamente el 50%, su T_m estuviera en torno a 60°C y su composición no favoreciese la aparición de estructuras secundarias.

Al inicio de todos los experimentos se optimizó el ensayo con una matriz de diferentes concentraciones de los distintos oligonucleótidos cebadores (Sigma-Genosys), para identificar la concentración que obtuviera un menor valor de C_T y una mayor fluorescencia. La ausencia de dímeros y productos de amplificación indeseados se analizó sometiendo los productos de amplificación a un ciclo de disociación. A modo de control interno de cada reacción, se diseñaron parejas de oligonucleótidos específicos del gen codificante de la subunidad 14S del ARN ribosomal humano (ARNr) o bien del gen codificante de la actina, cuyas expresiones no varían con las condiciones y tratamientos empleados en este trabajo.

Todos los oligonucleótidos empleados en los estudios de expresión génica se detallan en la **tabla 3.3**.

GEN	SECUENCIA FORWARD	SECUENCIA REVERSE
14S	5'-TCACCGCCCTACACATCAAAC-3'	5'-TCCTGCGAGTGCTGTCAGAG-3'
ABCB1	5'-GTACATTAACATGATCTGGTC-3'	5'-CGTTCATCAGCTTGATCCGAT-3'
ABCG2	5'-AAAGCCACAGAGATCATAGAG-3'	5'-GATCTTCTTCTTCTTCTCACC-3'
ACTINA	5'-TAGCACAGCCTGGATAGCAA-3'	5'-AAATCTGGCACCACACCTTC-3'
AKT1	5'-AAGTACTCTTTCCAGACCC-3'	5'-TTCTCCAGCTTGAGGTC-3'
ANGPT2	5'-AAGAGAAAGATCAGCTACAGG-3'	5'-CCTTAGAGTTTGATGTGGAC-3'
APC	5'-AGAGGTCATCTCAGAACAAG-3'	5'-CATGTTGATTTCTCCCACTC-3'
ATM	5'-GAGAAAAGAAGCCGTGG-3'	5'-CATCACTGTCACTGCAC-3'
BAD	5'-ATCATGGAGGCGCTG-3'	5'-CTTAAAGGAGTCCACAAACTC-3'
BAX2	5'-AACTGGACAGTAACATGGAG-3'	5'-TTGCTGGCAAAGTAGAAAAG
BCL2	5'-CCTTTGGAATGGAAGCTTAG-3'	5'-GAGGGAATGTTTTCTCCTTG-3'
BIRC5	5'-TCTCCGCAGTTTCTCAAAT-3'	5'-GGACCACCGCATCTCTACAT-3'
BMAL1	5'-GACGAGGCAGCTGAGGTTAC-3'	5'-CCACAGCACAGGCTATTTGA-3'
BMAL2	5'-AATCCAAGTGTGCACCATCA-3'	5'-GCTACCAGGCAAAACCAGAG-3'
CDKN1A	5'-CAGCATGACAGATTCTACC-3'	5'-CAGGGTATGTACATGAGGAG-3'

GEN	SECUENCIA FORWARD	SECUENCIA REVERSE
CLOCK	5'-TATCATGCGTGTCGTTGTT-3'	5'-ACAAGGCATGTCCCAGTTTC-3'
c-MYC	5'-TGAGGAGGAACAAGAAGATG-3'	5'-ATCCAGACTCTGACCTTTTG-3'
COP1	5'-CTGGAAGCAGAATCACATGC-3'	5'-TGTGCTATCCTCACTGACAGG-3'
CRY1	5'-TTTTGCAGGGAAGCCTCTTA-3'	5'-CTGCTATTGCCCTGTTGGTT-3'
CRY2	5'-GCGAAAGCTGCTGGTAAATC-3'	5'-TACCTGCCCAAATTGAAAGC-3'
CST6	5'-CTCCTCTCAGCTCCTAAAG-3'	5'-TTTATTGTGACAGATACGGC
ERBB2	5'-CCAGCCTGAATATGTGAAC-3'	5'-CCCCAAAGGCAAAAACG-3'
GATA3	5'-CGGTCCAGCACAGGCAGGGAGT-3'	5'-GAGCCACAGGCATTGCAGACA-3'
GLI1	5'-CTCGTAGCTTTTCATCAACT-3'	5'-TTTTTGGTGATTCATCTGGG-3'
IGF1	5'-ATAGAGCCTGCGCAATGGAA-3'	5'-GAGATGGGAGATGTTGAGAGCA-3'
MUC1	5'-GCAAGAGCACTCCATTCTCAATT-3'	5'-TGGCATCAGTCTTGGTGCTATG-3'
NME1	5'-CAGAAGTCTCCACGGATGGT-3'	5'-AGAAAGGATTCCGCCTTGTT-3'
NPAS2	5'-AAGGCTTCCAGTCTTGCTGA-3'	5'-CGGGACCAGTTCAATGTTCT-3'
NR3C1	5'-ACTGCTTCTCTCTCTTCAGTTC-3'	5'-GATTTTCAACCACTTCATGC-3'
PER2	5'-AGTGGGACTGGAAAATGCTG-3'	5'-CACACACAGAAGGAGGAGCA-3'
PER3	5'-TCTTTGGGTCCAGTTGTTCC-3'	5'-TCCTGGCGTCTTCTCACTTT-3'
PGR	5'-GAGAGCTCATCAAGGCAATTGG-3'	5'-CACCATCCCTGCCAATATCTTG-3'
PLAU	5'-GCTTTAAGATTATTGGGGGAG-3'	5'-ATGTAGTCCTCTTCTTTGG-3'
PLG	5'-TAGATTCTCACCTGCTACAC-3'	5'-CGCAGTAGTCATATCTCTTTTC-3'
PTEN	5'-AGGTTTCCTCTGGTCCTGGT-3'	5'-CGACGGGAAGACAAGTTCAT-3'
RASFF1	5'-ATGAAGTGCCTGAATGTATG-3'	5'-TTGAGGATCTTGAAATCTTTATT-3'
RB1	5'-ACCAGATCATGTCAGAGAG-3'	5'-TAACCTCCCAATACTCCATC-3'
SERPINE1	5'-ATCCACAGCTGTCATAGTC-3'	5'-CACTTGGCCCATGAAAAG-3'
SFN	5'-TCTGATCGTAGGAATTGAGG-3'	5'-CACAGGGGAACTTTATTGAG-3'
SNAI2	5'-CAGTGATTATTTCCCGTATC-3'	5'-CCCCAAAGATGAGGAGTATC-3'
TIMELESS	5'-CACTGGCGTCATCATCAATC-3'	5'-GCAGGAGGAAGACAACCTTGC-3'
TIMP2	5'-GGCCTGAGAAGGATATAGAG-3'	5'-CTTTCCTGCAATGAGATATTCC-3'
TP53	5'-CCTATGCTTGTATGGCTAAC-3'	5'-TAGATCCATGCCTTCTTCTTC-3'
TWIST1	5'-CTAGATGTCATTGTTTCCAGAG-3'	5'-CCCTGTTTCTTTCAATTITGG-3'
VEGFA	5'-TGGTGATGTTGGACTCCTCA-3'	5'-GGGCAGAATCATCACGAAGT-3'
WEE1	5'-AGTGCCATTGCTGAAGGTCT-3'	5'-ACCTCGGATACCACAAGTGC-3'
XBP1	5'-ACTGGGTCCAAGTTGTCCAG-3'	5'-TCACCCCTCCAGAACATCTC-3'

Tabla 3.3: Oligonucleótidos empleados como cebadores específicos en los estudios de expresión génica mediante PCR a tiempo real. Todos los oligonucleótidos se utilizaron a una concentración de 200nM.

3.5.7 Diseño de los estudios de expresión génica en líneas celulares *in vitro*

Los diferentes análisis de expresión génica se realizaron en las dos líneas celulares tumorales de cáncer de mama utilizadas en este trabajo (MCF-7 y MDA-MB-231). En líneas generales, las células fueron sembradas a una densidad de 8×10^5 células en placas de poliestireno de 60 x 15 mm (Falcon) en medio DMEM sin rojo fenol suplementado con 10% de SFB. Tras 24 horas de incubación, se lavaron las células con PBS y se añadió medio fresco DMEM junto con los tratamientos correspondientes, detallados a lo largo de la descripción de los resultados. En todos los casos, la extracción del ARN total se realizó tras seis horas de incubación con los tratamientos correspondientes (melatonina y/o radiación, docetaxel, o doxorubicina) y una vez sintetizado el ADNc como se describió anteriormente, se llevó a cabo la amplificación génica usando los cebadores enumerados en la **tabla 3.3**. Como cuantificación de control para normalizar los resultados de expresión génica se utilizaron los genes codificantes para 14S o Actina.

3.5.8 Detección y cuantificación de la expresión de microARNs (miARNs)

Las células MCF-7 fueron cultivadas en medio DMEM suplementado con 10% SFB tal y como se describe en el **apartado 3.5.7**. En este caso, el ARN total, incluida la fracción de microARNs (miARNs), se extrajo de las células mediante el método de extracción fenólica con TRI-REAGENTTM (Sigma-Aldrich) que consiste en el uso de una solución monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina para separar la muestra en dos fases (acuosa y orgánica). Posteriormente, el ARN se aísla a partir de la fase acuosa empleando cloroformo e isopropanol. La suspensión celular se mezcló con 1 ml del reactivo TRI-REAGENTTM para facilitar la lisis y posteriormente se centrifugó a 12,000 x g durante diez minutos a 4°C, eliminándose los restos celulares en este paso. A continuación, se transfirió la fase acuosa a otro tubo y se mezcló con 0,2 ml de cloroformo, agitando vigorosamente y centrifugando de nuevo durante 10 minutos para separar la muestra en tres fases, siendo la fase acuosa la que contiene el ARN total. Esta fase se transfirió de nuevo a otro tubo y se mezcló con 0,5 ml de isopropanol para precipitar el ARN. Tras una centrifugación de 10 minutos se obtuvo el pellet, que fue lavado con etanol al 75% dos veces. Por último, se eliminó el etanol, se dejó secar el pellet y se disolvió el ARN en un total de 45 µl de agua DEPC estéril.

El kit *TaqMan® Micro RNA RT* (Life Technologies, Carlsbad, CA, EE.UU.) se utilizó para realizar la síntesis de ADNc específico para cada microARN de interés. Para determinar la expresión de los microARNs miR-10a, miR-10b, miR-29a, miR-31, miR-34a, miR-133a y miR-145 se utilizaron las sondas de *TaqMan® Human MicroRNA Assays* (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) correspondientes a cada uno de ellos. En cada muestra se utilizaron 100 ng de microARN a los que se añadieron 3 µl del cebador específico correspondiente al microARN a estudiar en cada caso, 2,84 µl de una mezcla de 1,5 µl de tampón de reacción, 1 µl de enzima transcriptasa inversa, 0,19 µl de inhibidores de ARNasas y 0,15 µl de dNTPs y H₂O hasta 9,16 µl. La muestra total (15 µl) se llevó al termociclador donde se incubó 30 minutos a 16°C, seguidos de 30 minutos a 42°C y finalmente 5 minutos a 85°C. Una vez finalizada la transcripción inversa, se almacenaron las muestras a -20°C.

Los niveles de expresión de los microARNs se determinaron mediante RT-PCR y se normalizaron a los niveles de expresión de RNU6B, que se midieron en paralelo para cada determinación específica de microARN que se utiliza como control interno. Se utilizaron sondas comerciales *TaqMan®* (Applied Biosystems, Life Technologies) y un reactivo que contiene Mg²⁺ y nucleótidos (*Premix Ex Taq™ Perfect Real Time*, Takara Bio Inc). Las amplificaciones se realizaron en el termociclador MX3005P (Agilent, Santa Clara, CA, EE. UU.). La reacción se llevó a cabo por triplicado, en un volumen final de 10 µl que contiene 0,5 µl del ADNc, 5 µl de *SYBR green Mix* (Takara), 0,4 µl 10 µM del cebador correspondiente al gen de interés, y 3,75 µl de H₂O DEPC. Las condiciones de amplificación fueron un ciclo inicial de dos minutos a 50°C y de diez minutos a 95°C, seguido de 50 ciclos de 95°C durante 15 segundos y 60°C durante 60 segundos.

En la **figura 3.8** se muestra de manera esquemática como se llevan a cabo la transcripción inversa y la RT-PCR de los microARNs.

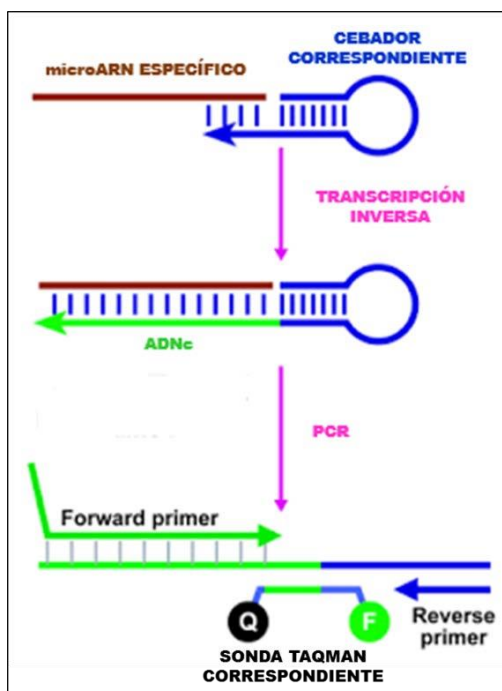


Figura 3.8: Esquema de la detección y cuantificación de la expresión de microARNs. (Imagen modificada de Varkonyi-Gasic y Hellen, 2011).

3.6 ANÁLISIS DE LOS CAMBIOS EN EL ESTADO DEL FOSFOPROTEOMA

Muchas de las proteínas identificadas en un análisis de fosfoproteoma son quinasas, enzimas que regulan el estado de fosforilación de las proteínas intracelulares y están implicadas en el desarrollo tumoral, por lo que recientemente han emergido como dianas moleculares en el tratamiento del cáncer.

Para valorar los cambios en los niveles de fosforilación de células MCF-7 se utilizó el *Human Phospho-Kinase Array Proteome ProfilerTM* (R&D Systems). Este array permite la valoración simultánea de los niveles relativos de fosforilación de 43 proteínas (la mayor parte quinasas) diferentes. Estos estudios se realizaron en células MCF-7 cultivadas en medio DMEM y tratadas con radiación (8 Gy) o doxorubicina (1 μ M) en presencia y ausencia de melatonina (1 nM) durante cuatro y seis horas respectivamente. Más concretamente, se llevó a cabo la incubación durante una noche de extractos proteicos con unas membranas de nitrocelulosa en las que previamente se habían fijado, por duplicado, anticuerpos específicos contra las diferentes proteínas. Posteriormente, las membranas se lavaron con las soluciones tamponadas correspondientes para eliminar las proteínas que no se hubieran unido, y se incubaron con los anticuerpos secundarios

conjugados con estreptavidina-HRP para la detección quimioluminiscente. La señal producida para cada punto es directamente proporcional a la cantidad de proteína unida.

3.7 INMUNODETECCIÓN DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN PROTEICA

3.7.1 Anticuerpos

El anticuerpo contra β -actina (A5441) fue comprado a Sigma Aldrich. Los anticuerpos contra Twist1 (2c1a, Cc-81417) y ER α (F-10, Sc-8002) fueron comprados a Santa Cruz Biotechnology. Los anticuerpos contra la forma fosforilada de la proteína S6 ribosomal (Ser240/244) (D68F8), contra la forma fosforilada de Akt (Ser473) (92712), contra la proteína total Akt (4691L) y contra la forma fosforilada de mTOR (Ser2448) (D9C2) fueron comprados a Cell Signaling. Y el anticuerpo contra la forma fosforilada de p53 (Ser15) (AF1043) fue comprado a R&D Systems. En la **tabla 3.4** se muestra la fuente, el peso molecular y la concentración utilizada de cada uno de ellos.

Anticuerpo primario	Casa comercial	Fuente	Peso molecular	Dilución
AntiActina	Sigma-Aldrich	Ac monoclonal de ratón	42 kDa	1:1000
AntiAkt	Cell Signalling Technology	Ac monoclonal de conejo	65 kDa	1:1000
Antip-Akt	Santa Cruz Biotechnology	Ac policlonal de conejo	75 kDa	1:500
Antip-mTOR	Cell Signalling Technology	Ac monoclonal de conejo	289 kDa	1:500
AntiRE α	Santa Cruz Biotechnology	Ac monoclonal de ratón	36-48-54-66 kDa	1:1000
Antip-S6	Cell Signalling Technology	Ac monoclonal de conejo	32 kDa	1:500
AntiTwist1	Santa Cruz Biotechnology	Ac policlonal de conejo	26 kDa	1:500
Antip-p53	R&D Systems	Ac monoclonal de ratón	53 kDa	1:1000

Tabla 3.4: Anticuerpos primarios y diluciones utilizados en los ensayos de Western Blot.

Por otra parte, los anticuerpos secundarios utilizados se compraron en la casa comercial LI-COR Biotechnology (tabla 3.5).

Anticuerpo secundario	Casa comercial	Filtro	Dilución
Antiratón IRDye-680RD	LI-COR Biotechnology, Lincoln, Nebraska, USA	700 nm (rojo)	1:10.000
Anticonejo IRDye-800CW	LI-COR Biotechnology, Lincoln, Nebraska, USA	800 nm (verde)	1:10.000

Tabla 3.5: Anticuerpos secundarios y diluciones utilizados en los ensayos de Western Blot.

3.7.2 Cuantificación de la concentración de proteína

La cuantificación de la concentración proteica de cada muestra se realizó siguiendo el método de Bradford (Bradford, 1976), utilizando un espectrofotómetro (Multiskan, Thermo Scientific) a una longitud de onda de 570 nm, para realizar una recta patrón de albúmina con concentraciones conocidas de proteína. Para elaborar dicha recta estándar se representaron las medias de los valores obtenidos en la lectura de la densidad óptica frente a la concentración de proteína y se elaboró una recta de regresión lineal cuyo coeficiente de regresión R^2 siempre fue superior a 0,99. La determinación de la concentración proteica en cada muestra problema se realizó por interpolación en la recta de calibrado de la medida de la densidad óptica obtenida en cada caso, con ayuda de la ecuación obtenida para la recta estándar.

3.7.3 Inmunodetección mediante *western blot*

Para comprobar el efecto de los diferentes tratamientos y la influencia de la melatonina sobre los niveles de las proteínas totales y de sus respectivas versiones activas en cultivos de células MCF-7 utilizamos la técnica de inmunodetección mediante *western blot*.

Las células fueron inicialmente sembradas en placas de seis pocillos a una densidad de 5×10^6 células por pocillo en medio DMEM suplementado con 10% de SFB e incubadas durante 24 horas a 37°C. Posteriormente, el medio fue reemplazado por uno nuevo que contenía los tratamientos correspondientes.

Para la extracción de proteínas de las células se añadió a cada pocillo 0,5 ml de tampón RIPA (NaCl 150 mM, Tris 50 mM, desoxicolato de sodio 0,5%, Igepal 1%, duocedil sulfato sódico (SDS) 1% con una mezcla de inhibidores de proteasas (4-(2-aminoacetyl)-benzeconsulfonil fluoruro 1,3 mM), e inhibidores de fosfatasas (cantaridita 1 mM, ortovanadato de sodio 1 mM). Las muestras se recogieron con rascadores y se centrifugaron durante 15 minutos a 14.000 rpm a 4°C para precipitar los restos celulares. A continuación, se recogió el sobrenadante (que contiene las proteínas) y se midió la cantidad total de proteínas tal y como se especifica en el **apartado 3.7.2**.

Posteriormente, las muestras se mezclaron en el vórtex con una disolución de Laemmli y β -mercaptoetanol 5% y se calentaron a 95°C durante 10 minutos. Tras esto, se centrifugaron durante 5 minutos a 3000 rpm a 4°C, se recogió el sobrenadante y se mantuvo en frío.

Para realizar la electroforesis se cargaron 40 μ l de cada muestra y se utilizaron geles verticales de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE) cuya composición se muestra en la **tabla 3.6**. La concentración de acrilamida en los geles de separación se modificó en aquellos casos en los que el peso molecular de la proteína que se quería estudiar tenía un peso molecular muy alto o muy bajo. Concretamente, para estudiar p-mTor, cuyo peso molecular es 289 kDa, se redujo la concentración de acrilamida, utilizando únicamente 1 ml de acrilamida (y 6,5 ml de H₂O), y para estudiar Twist1, cuyo peso molecular es 26 kDa, se aumentó la concentración de acrilamida, utilizando 3 ml de acrilamida (y 4,5 ml de H₂O).

Componentes	Gel de separación	Gel de empaquetamiento
H ₂ O destilada	5 ml	1,562 ml
Acrilamida-bisacrilamida 30%	2,5 ml	0,313 ml
Tampón de separación 4X	2,5 ml	-
Persulfato amónico (APS) 10%	0,15 ml	0,042 ml
Temed	0,008 ml	0,008 ml
Tampón de concentración 4X	-	0,625 ml

Tabla 3.6: Composición de los geles de separación y empaquetamiento.

Como referencia para los pesos moleculares se cargaron en una de las calles 3 μ l de un marcador proteico estándar (Bio-Rad). Las electroforesis se realizaron inicialmente con una corriente continua de 100 V durante 20 minutos a temperatura ambiente, para que las proteínas migrasen por el gel de empaquetamiento, y una vez alcanzado el gel de separación, se aumentó la corriente hasta 140 V durante 60 minutos. Este proceso se realizó en tampón de migración 1X (Tris base 25 mM, pH 8,5, glicina 0,2 M, SDS 0,1%).

Una vez realizada la electroforesis, las proteínas fueron transferidas a una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF) (Bio-Rad) directamente desde el gel de poliacrilamida. Para ello se pusieron en contacto el gel y la membrana empareados entre hojas de papel de filtro (Bio-Rad) y esponjas dentro de un armazón de plástico. Este bloque o sándwich se sumergió en tampón de transferencia (Tris base 25 mM, pH 8,3, glicina 192 mM, metanol 20%) y se sometió a un campo eléctrico de 100 V durante 120 minutos a 4°C. Tanto para la electroforesis como para la electro-transferencia se utilizó el kit de electroforesis vertical *Mini-PROTEAN* (Bio-Rad).

Una vez finalizada la transferencia, se comprobó la eficacia de la misma tiñendo las membranas con el colorante rojo Ponceau. Tras esto, se incubaron las membranas durante una hora a temperatura ambiente en tampón TBS-t (TRIS-HCl 10 mM, pH 7,6, NaCl 150 mM, Tween-20 0,1%) con albúmina sérica bovina (BSA) al 3% para bloquear los sitios de unión inespecíficos del anticuerpo. Pasada esa hora, las membranas fueron incubadas con los anticuerpos primarios (**tabla 3.4**) en TBS-t con BSA al 3% inicialmente durante una hora a temperatura ambiente y después durante toda la noche a 4°C y en agitación. Tras eso, se realizaron tres lavados de diez minutos cada uno en tampón TBS-t y se incubaron las membranas con el correspondiente anticuerpo secundario fluorescente (**tabla 3.5**) diluido en TBS-t con BSA al 3% durante 30 minutos en agitación a temperatura ambiente. Finalmente, tras esta incubación se lavaron tres veces durante diez minutos con TBS-t y se procedió a revelar las membranas.

La fluorescencia se detectó utilizando el sistema LI-COR Odyssey IR Imaging System V3.0 (LI-COR Odyssey Biosciences). La densidad óptica de las bandas fue determinada con el programa *ImageJ*. Para corregir posibles errores de carga en el gel, las membranas se reincubaron con un anticuerpo contra actina (42 KDa) de manera que los valores de los distintos marcadores analizados se normalizaron con las estimaciones de esta proteína constitutiva. Se realizaron al menos tres cultivos celulares, y al menos tres experimentos independientes de cada uno para los diferentes anticuerpos.

3.7.4 Inmunofluorescencia

La técnica de inmunofluorescencia se empleó en los experimentos de detección de la proteína Twist1 en las células MCF-7. Más concretamente, las células fueron cultivadas en medio DMEM suplementado con un 10% de SFB durante 24 horas en cubreobjetos de vidrio dentro de placas de seis pocillos, aproximadamente 25.000 células en cada cubreobjetos, y posteriormente el medio fue reemplazado por uno fresco conteniendo los tratamientos correspondientes (doxorrubicina y/o melatonina). Tras doce horas, las células se fijaron incubándolas con una solución de formaldehído 4% durante media hora. Luego, los cristales se reubicaron en una placa de Petri de 10 cm de diámetro y, creando una cámara húmeda, se permeabilizaron las células incubándolas durante una hora con 0,2% Tritón X-100/PBS. Pasado este tiempo y una vez lavados los cristales con PBS, las células se incubaron con 6 μ L del anticuerpo primario antiTwist1 durante 16 horas a 4°C. Tras esto, se lavaron nuevamente los cristales y se incubaron las células con el anticuerpo secundario conjugado con un fluorocromo, FITC (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, Pennsylvania, EEUU) durante una hora a temperatura ambiente. La molécula FITC (fluoresceína-5'-isotiocianato) es un colorante del grupo de los xantenos, derivado de la fluoresceína. En la **figura 3.9** se muestra de manera esquemática este proceso. Una vez terminada esa incubación, los cristales se lavaron con PBS 1X, se secaron y se les añadió 0,1 ml de medio de montaje *Vectashield* (Vector Laboratories, Peterborough). Este medio de montaje incluye DAPI, un marcador fluorescente que se une al ADN en regiones ricas en adeninas y timinas, sirviendo por lo tanto para identificar los núcleos celulares. Finalmente, con un microscopio de fluorescencia de escáner láser (Carl Zeiss Inc., Germany) se observaron las células y se capturaron imágenes con un aumento de 40X.

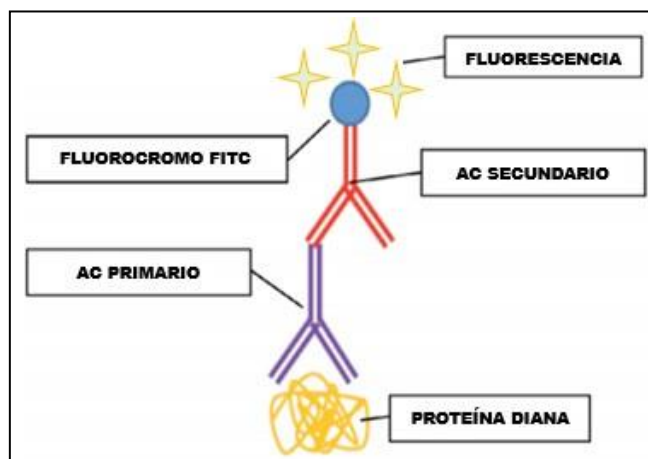


Figura 3.9: Esquema de la inmunofluorescencia para la detección de Twist1. En primer lugar, la muestra se incuba con el anticuerpo antiTwist1 el cual se une su proteína diana Twist1. A continuación las muestras se incuban con el anticuerpo secundario que está conjugado con el fluorocromo FITC, el cual emite fluorescencia que puede ser detectada. (Imagen modificada de Román y cols., 2016).

3.8 ENSAYOS DE MIGRACIÓN CELULAR: WOUND-HEALING ASSAY

Los ensayos para evaluar la capacidad de migración se realizaron según el protocolo descrito por Sato y Rifkin (1988) con algunas modificaciones. Se sembraron las células MCF-7 y MDA-MB-231 en placas de cultivo de 60 x 15 mm (Falcon) en medio DMEM suplementado con 10% de SFB. Cuando las células se encontraron adheridas formando una monocapa confluyente, se realizó una incisión longitudinal de aproximadamente 300 μm de ancho sobre la monocapa, con una punta de pipeta. Las células se lavaron dos veces con PBS para eliminar restos celulares y a continuación se añadió el medio de cultivo junto con los tratamientos correspondientes.

La migración celular se monitorizó en cuatro campos seleccionados al azar a lo largo de la línea de incisión en cada placa, con una cámara ORCA R2 (Hamamatsu Photonics) conectada a un microscopio Nikon Eclipse-Ti (Werfen Group), que tomó fotografías cada diez minutos durante el transcurso del experimento a un aumento de 10X. El ensayo se consideró finalizado en el momento en que las células del grupo control completaron el proceso de migración, aproximadamente 24 horas después del inicio del experimento. La migración celular se cuantificó midiendo el tamaño inicial y final de la incisión con el software Nis-Elements c.3.8 y para determinar la distancia recorrida por las células se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Distancia migrada} = (\text{Tamaño inicial de la incisión} - \text{Tamaño final de la incisión}) / 2$$

3.9 ENSAYOS DE INVASIÓN CON ESFEROIDES TRIDIMENSIONALES

Las células MCF-7 y MDA-MB-231 fueron resuspendidas en medio DMEM con un 5% de metil-celulosa (Sigma-Aldrich) a una concentración de 800.000 células por ml. Los esferoides fueron formados por pipeteo serial de 25 µl en la tapa de una placa Petri (2000 células por esferoide) e incubados en posición invertida durante 18 horas. Después, cada esferoide fue transferido a pocillos individuales de placas de 96 pocillos y fueron embebidos en un volumen de 110 µl de 2,3 mg/ml de matriz de colágeno bovino tipo I (PureCol) y rellenados con 100 µl de medio DMEM + 10% SFB.

La invasión celular fue monitorizada usando un microscopio *Zeiss Cell Observer Live Imaging* acoplado con un sistema de mantenimiento de CO₂ y temperatura. Se tomaron imágenes cada 15 minutos durante 24 horas usando una cámara *Zeiss AxioCam MRC*. El área de cada esferoide individual fue medida usando el programa de análisis *Image J*. El área invadida fue determinada calculando la diferencia entre el área final y el área inicial. Los resultados fueron normalizados respecto a las células control (no tratadas). Cada ensayo se realizó en experimentos independientes al menos en tres ocasiones.

3.10 SILENCIAMIENTO DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE *TWIST1*

La tecnología del ARN de silenciamiento o pequeño ARN de interferencia (*Small Interfering RNA*, siARNs) fue usada para inhibir la expresión del gen *TWIST1*. Una mezcla de cuatro siARNs (*ON-TARGETplus SMARTpool TWIST1 siARN*) fue adquirida en Thermo Fisher Dharmacon (Lafayette, CO).

Inicialmente, se sembraron 120.000 células MCF-7 en placas de 10 cm de diámetro y pasadas 24 horas, se lipofectaron con los siARNs correspondientes y se mantuvieron en incubación durante 72 horas. Transcurrido ese tiempo, las células de los grupos experimentales fueron tratadas con melatonina y/o doxorrubicina, y el ARN se extrajo tras seis horas de tratamiento.

Posteriormente, se procedió a sintetizar el ADNc de cada muestra y se realizaron estudios de expresión génica de *PLG*, *BIRC5*, *VEGFA*, miR10a y miR10b mediante RT-PCR.

3.10.1. Lipofección

La lipofección es una técnica que permite introducir material genético externo en el interior celular, mediante el uso de liposomas catiónicos que actúan como sistemas de transporte y entran en las células por endocitosis. Frente a otros tipos de transfecciones, este mecanismo presenta una menor toxicidad y una mayor versatilidad química. Además, el reactivo comercial utilizado, *Lipofectamina 2000 Transfection Reagent* (Invitrogen Life Technologies), permite obtener una alta eficiencia. La lipofectamina es un reactivo que contiene subunidades lipídicas que, en entornos acuosos, forman liposomas que pueden atrapar en su interior el material genético para posteriormente transfectarlo.

3.10.2. Silenciamiento

Las secuencias diana utilizadas se muestran en la **tabla 3.7**. Los siARN de no silenciamiento (Qiagen) fueron usados como control negativo. Las células fueron lipofectadas con siARNs agrupados usando la lipofectamina. El grupo designado como MOCK corresponde con células lipofectadas pero sin la adición de siARNs. Después de 72 horas, las células fueron tratadas durante seis horas con los tratamientos correspondientes (melatonina y/o doxorubicina), y el ARN total se extrajo de las células mediante el método de extracción fenólica con TRI-REAGENTTM (Sigma-Aldrich) descrito en el **apartado 3.5.8**.

Secuencias diana de los siARNs
5'-UGAGCAACAGCGAGGAAGA -3'
5'-GGAGUCCGCAGUCUUACGA-3',
5'-GCAAAUAGAUCGGUGUCU-3'
5'-AAUCAGAGGAACUAUAAGA-3'.

Tabla 3.7: Secuencias diana de los siARNs utilizados en los estudios de silenciamiento de la expresión génica de *TWIST1*.

3.11 MODELO DE ANGIOGÉNESIS *IN VIVO*: MEMBRANA CORIOALANTOIDEA DE EMBRIÓN DE POLLO (CAM ASSAY)

La evaluación de la actividad angiogénica *in vivo*, se realizó en la membrana corioalantoidea (CAM) de embriones de pollo (Grillo y cols., 2016). Los huevos de gallina fertilizados se incubaron a 37°C durante tres días en una incubadora humidificada (Hamburger y Hamilton, 1951). Se utilizaron agujas hipodérmicas para eliminar 4 ml de albúmina y permitir así el desprendimiento de la cáscara del huevo para exponer la CAM y luego se cubrió la abertura para continuar con la incubación.

En paralelo, se pretrataron células MCF-7 en medio DMEM suplementado con 10% SFB sin rojo fenol y melatonina a una dosis 1 nM, durante una semana. Posteriormente, tanto las células MCF-7 que habían recibido el pretratamiento con melatonina como las del grupo control fueron radiadas a una dosis de 8 Gy, tal y como se describió previamente en el **apartado 3.1.8**. Las células de los grupos control y melatonina sin radiación se retiraron de la incubadora y se colocaron durante el mismo período de tiempo en el irradiador, pero sin radiación.

En el undécimo día de incubación de los huevos, se colocaron bolas de alginato con 4 µl de PBS (control negativo), o bien con una solución que contenía las células MCF-7 sometidas a los diferentes tratamientos objeto del estudio (MCF-7 control sin radiar, células control + radiación, células pretratadas con melatonina sin radiar y células pretratadas con melatonina + radiación) a una concentración de 1×10^4 células por huevo disueltas en PBS hasta un volumen final de 4 µl. Después de 72 horas, los nuevos vasos sanguíneos que convergen hacia la bola de alginato se contaron a cinco aumentos con un estereo-microscopio *STEMI SR* equipado con un objetivo de 100 mm y un anillo adaptador 47070 (Zeiss). Finalmente, las membranas se fijaron con formalina tamponada al 7% y se fotografiaron (Gnutti y cols., 2015).

3.12 MODELO DE XENÓGRAFOS DE CÉLULAS MCF-7 EN RATONES ATÍMICOS

3.12.1 Cepas de ratón y técnica de implantación de células MCF-7

Se emplearon hembras de ratón atímico de la cepa *NMRI-Foxn1 nu⁻/nu⁻* de cuatro semanas de edad (Janvier Labs, France). Los animales fueron estabulados en el animalario de la Universidad, con un foto-período 12/12 (doce horas de luz, doce horas de oscuridad) en habitaciones con ventilación controlada, localizadas en una zona SPF (*Specific Pathogen Free*), y alimentados con agua y comida estériles *ad libitum*. Todos los experimentos se llevaron a cabo bajo la supervisión del comité de ética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Cantabria, de acuerdo con la normativa de la Unión Europea.

Una semana después de su llegada, y con el objetivo de que los niveles de estrógenos al inicio del experimento fueran lo suficientemente elevados para facilitar el crecimiento tumoral, a todos los ratones se les implantó un pellet subcutáneo de 17 β -estradiol, que liberaba siempre la misma cantidad (0,008 mg/día) durante 90 días (Innovative Research of America).

Una semana después de la implantación del pellet hormonal, se realizó la inyección ortotópica de las células tumorales. Concretamente, los ratones fueron anestesiados con una mezcla que contenía 100 mg/Kg de ketamina y 10 mg/kg de xilacina, y posteriormente, tras comprobar el reflejo de la pata, se les inyectó en las dos glándulas mamarias inguinales una suspensión celular que contenía 10x10⁶ células MCF7 disueltas en Matrigel (Corning 356234) en proporción 1:1, con un volumen final de 100 μ l por flanco.

A partir de la inyección de las células tumorales, tanto el peso corporal como el crecimiento tumoral fueron monitorizados cada tres días. Para valorar este último, se empleó un lipocalibre que mide el diámetro grande del tumor (D) y el diámetro pequeño (d) y calculando el volumen tumoral según la siguiente fórmula: $(D \times d^2) / 2$. Cuando el volumen tumoral alcanzó los 100 mm³, los animales fueron asignados aleatoriamente a alguno de los grupos experimentales objeto del estudio (**figura 3.6**).

3.12.2 Tratamientos experimentales *in vivo*

La melatonina fue administrada en agua de bebida, a una concentración estándar de 25 mg/L de agua, disuelta en etanol (concentración final 0,001% v/v). El stock original (1 mg/ml), disuelto en etanol absoluto, se almacenó a una temperatura de -20°C. Los animales del resto de los grupos recibieron en el agua de bebida el diluyente de la hormona (etanol 0,001% v/v). Todas las botellas, conteniendo el agua de bebida (con y sin melatonina), se cubrieron con papel de aluminio para proteger de la exposición a la luz. La presencia de melatonina en el agua no modifica ni la cantidad ni el ritmo de bebida, principalmente nocturno, de los animales (Wolden-Hanson y cols., 2000).

Los agentes de quimioterapia (docetaxel y doxorubicina) se administraron mediante inyección intraperitoneal (i.p.) una vez a la semana. La dosis empleada para el docetaxel fue de 15 mg/kg de peso corporal y la doxorubicina se administró a una dosis de 2 mg/kg. Todos los compuestos usados en los estudios *in vivo* fueron obtenidos en Sigma-Aldrich.

Tras un máximo de seis semanas de tratamiento, los ratones fueron sacrificados siguiendo el protocolo establecido por el comité de ética de la Universidad. Los tumores fueron inmediatamente congelados en nitrógeno líquido para su posterior análisis.

3.12.3 Extracción de ARN total procedente de los xenógrafos de ratón

El ARN total procedente de las muestras tumorales fue aislado mediante el método de extracción fenólica con TRI REAGENT™ (Sigma-Aldrich) descrito en el **apartado**

3.5.8. De cada tumor, se pesaron de 50 a 100 mg de tejido congelado y se homogenizaron con 1 ml del reactivo empleando un *Polytron* (Heidolph). Una alícuota de dicho ARN se empleó para la síntesis del ADNc anteriormente descrita (**apartado 3.5.3**) y se llevó a cabo la amplificación génica mediante RT-PCR de *AKT*, *TP53*, *CDKN1A*, *TWIST1*, *BAX2*, *BAD*, *ERK1*, *ERK2* y *VEGFA*, usando los cebadores correspondientes recogidos en la **tabla 3.3**. En todos los casos, se empleó como control el ARNm del gen 14S para normalizar los resultados de expresión génica. Las RT-PCR se realizaron por duplicado y se seleccionaron al menos 3 tumores distintos de cada grupo experimental.

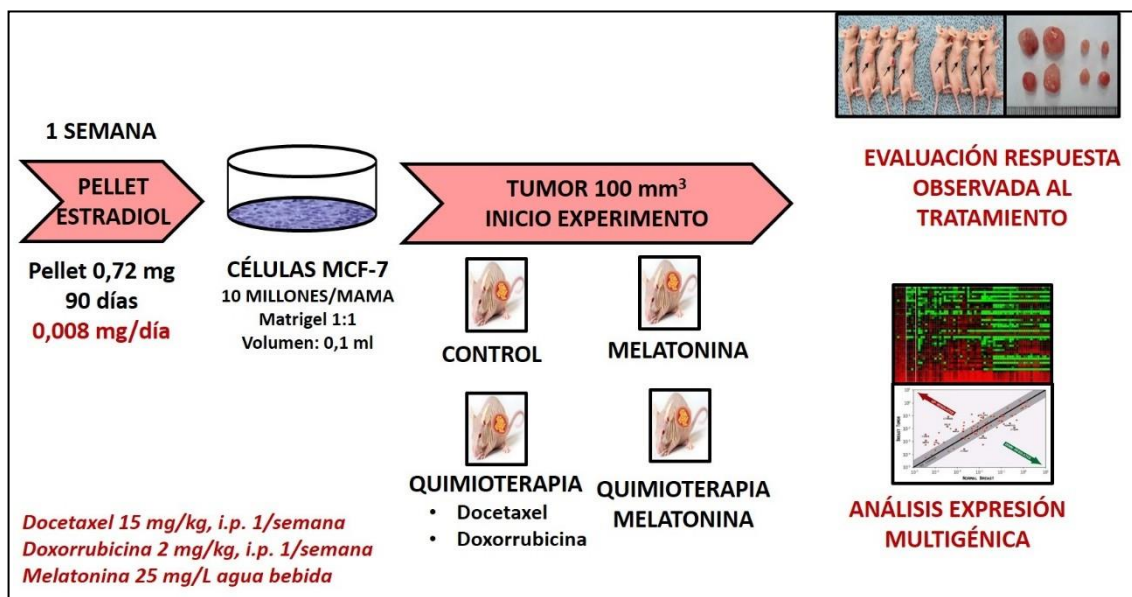


Figura 3.10: Esquema del desarrollo experimental de la generación de xenógrafos de MCF-7 en ratones atímicos NMRI-Foxn1 nu/nu. Las células MCF-7 se inocularon de manera ortotópica en cada flanco una semana después de haberse implantado el pellet de liberación lenta de 17 β -estradiol. Cuando el tumor alcanzó un tamaño de 100 mm³, los animales se distribuyeron en los distintos grupos experimentales indicados. Se realizaron medidas periódicas del volumen tumoral y del peso corporal y tras seis semanas de tratamiento, los animales fueron sacrificados y los tumores se congelaron para el posterior análisis de expresión génica.

3.13 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

Todos los estudios estadísticos fueron realizados utilizando el programa *Graph-Pad Prisma 5.0* (*Graph-Pad Software*). Los análisis estadísticos realizados fueron en todos los casos estudios paramétricos, aplicados a variables ajustadas a una distribución normal. En estos casos se realizaron análisis paramétricos de la varianza (ANOVA) seguidos del test de Student-Newman-Keuls en caso de valores significativos, para calcular las diferencias estadísticamente significativas existentes entre los distintos grupos experimentales, o bien test t de Student no paramétricos para analizar diferencias entre dos únicas variables experimentales. Los resultados se consideraron estadísticamente significativos para valores de $p < 0,05$. A no ser que se especifique lo contrario, todos los experimentos se repitieron al menos tres veces en idénticas condiciones y los resultados se indicaron como la media $\pm$ el error estándar de la media (SEM).

RESULTADOS

4.1 EFECTOS DE LA MELATONINA SOBRE LOS CAMBIOS INDUCIDOS POR LA RADIACIÓN EN CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA (MCF-7)

La radioterapia es uno de los tratamientos más comúnmente elegidos en muchos tipos de cáncer. Debido a los efectos adversos que se producen como consecuencia de la radiación, en la actualidad se están buscando moléculas adyuvantes que actúen como radiosensibilizadores, es decir, que optimicen la respuesta de las células tumorales a la radiación, y si es posible, que actúen además como radio-protectores de los tejidos normales no cancerosos, principalmente mitigando los efectos tóxicos de la radiación ionizante. La melatonina, además de ejercer una serie de acciones oncostáticas en tumores mamarios cuyo crecimiento es dependiente de estrógenos, parece llevar a cabo ambos tipos de funciones: no solo es capaz de aumentar la eficacia de la radioterapia, sino que también ejerce un efecto protector sobre el tejido circundante, atenuando los efectos secundarios de dicha terapia. Por esta razón, en el primer objetivo de esta tesis, nos hemos propuesto comenzar por determinar si la melatonina es capaz de potenciar los efectos antiproliferativos y proapoptóticos de la radiación. Por otro lado, y dado que los mecanismos moleculares que se alteran en las células tumorales en respuesta a la radioterapia son aún en gran medida desconocidos, nos pareció interesante estudiar el papel de la melatonina como modulador de los cambios moleculares que se producen en las células tumorales en respuesta a la radiación, tanto a nivel de expresión génica como de activación/inactivación de las diferentes vías de señalización intracelular. Para ello, hemos utilizado como modelo *in vitro* para nuestro estudio la línea celular MCF-7, derivada de adenocarcinoma mamario y cuyo crecimiento es dependiente de estrógenos.

RESULTADOS

4.1.1 La melatonina potencia los efectos antiproliferativos y citotóxicos de la radiación en la línea celular MCF-7

En primer lugar, procedimos a determinar el efecto de diferentes dosis de radiación sobre la proliferación de la línea celular MCF-7. Para ello, las células fueron expuestas a radiación ionizante de 0, 4, 8 y 12 Gy. Como se puede observar en la **figura 4.1.1**, la radiación inhibió la proliferación de las células MCF-7 de una manera dependiente de la dosis, de tal manera que la exposición a 4 Gy inhibió la proliferación de las células MCF-7 en un 25% al tercer día y en un 50% al sexto día. Por su parte, la dosis de 8 Gy

inhibió la proliferación de esta línea celular en un 35% tras los primeros tres días y en un 75% al finalizar el día sexto. Por último, la dosis de 12 Gy inhibió la proliferación celular en un 40% tras los primeros tres días, alcanzando un 80% de inhibición al sexto día.

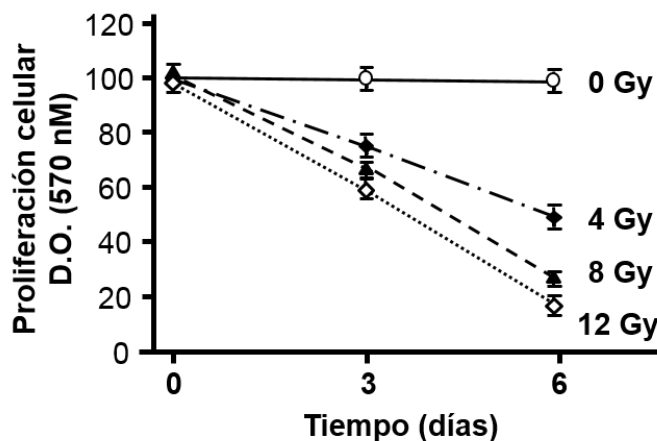


Figura 4.1.1: Efectos de la radiación ionizante sobre la proliferación de las células MCF-7. Las células se cultivaron en placas de 96 pocillos en medio DMEM durante 24 horas y posteriormente se radiaron a diferentes dosis (0, 4, 8 y 12 Gy). La proliferación celular se midió mediante el método del MTT tres y seis días después de la radiación. Los datos están expresados como porcentaje del grupo control no radiado (media ± SEM).

Basándonos en estos resultados, decidimos utilizar la dosis de 8 Gy como la más conveniente para llevar a cabo todos los demás experimentos que se irán describiendo en este capítulo.

Como se muestra en la **figura 4.1.2 A**, cuando las células MCF-7 se trataron únicamente con radiación (8 Gy), su proliferación disminuyó hasta el 60% en comparación con las células del grupo control tras seis días de tratamiento. Para comprobar si la melatonina es capaz de modificar el número de células que sobreviven a la radiación ionizante, procedimos a pretratar las células con diferentes dosis de melatonina durante siete días antes de ser expuestas a la radiación. El pretratamiento con melatonina, a cualquiera de las concentraciones utilizadas, potenció el efecto antiproliferativo de la radiación ionizante. La hormona pineal alcanzó su mayor eficacia a la concentración fisiológica (1 nM) lo que condujo a una inhibición significativamente mayor de la proliferación celular en comparación con aquellas células que únicamente recibieron radiación. Los pretratamientos con concentraciones farmacológicas de melatonina (1 mM y 10 μ M) también provocaron una disminución en la proliferación celular, pero fueron efectos menores al observado para la concentración de melatonina de 1 nM.

Además, también analizamos el efecto de la radiación ionizante y el pretratamiento con melatonina sobre la citotoxicidad celular, valorando la capacidad de las células tumorales para proliferar y formar colonias tras haber sido expuestas a la radiación. La fracción de supervivencia, entendida como la capacidad de formación de colonias, se redujo un 85% tras exponer las células a una dosis de radiación de 8 Gy con respecto a las células no radiadas. Cuando además de ser expuestas a la radiación, las células se sometieron a los pretratamientos con melatonina a las concentraciones indicadas (1 mM, 10 μ M y 1 nM), pudimos comprobar que la hormona pineal contribuyó a disminuir aún más el porcentaje de colonias en todas las concentraciones analizadas (**figura 4.1.2 B**).

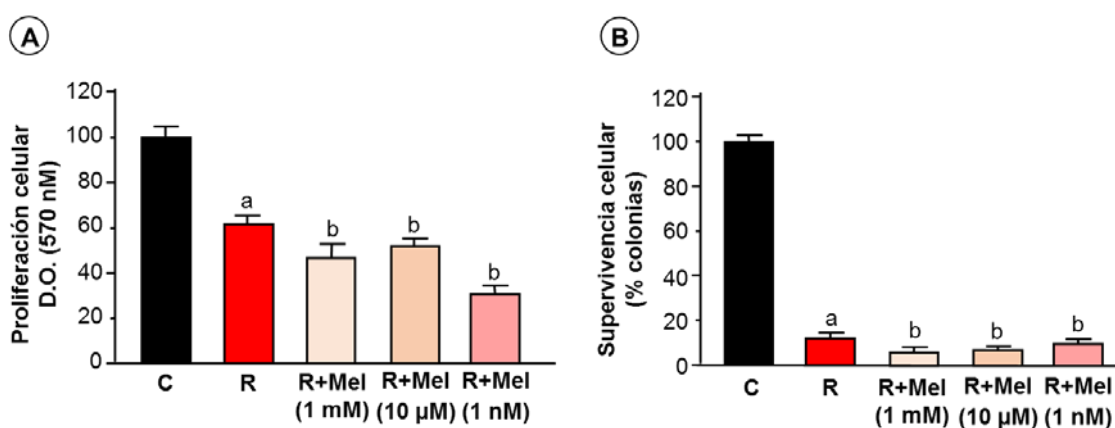


Figura 4.1.2: Efectos del pretratamiento de melatonina (1 mM, 10 μ M o 1 nM) y la radiación sobre la proliferación celular y la fracción de supervivencia en la línea celular MCF-7. (A) Las células control y pretratadas con melatonina durante una semana se radiaron a una dosis de 8 Gy y tras seis días se midió la proliferación celular mediante el método del MTT. (B) Las células se radiaron y tras diez días se realizó el conteo de las colonias con un tamaño mayor de 150 μ m. En ambos casos, los datos se expresan como el porcentaje del grupo de control (media $\pm$ SEM). a, $p < 0,001$ vs control; b, $p < 0,001$ vs radiadas. C: control. R: radiadas. R+Mel: pretratadas con melatonina y radiadas.

4.1.2 Efectos de la melatonina sobre los cambios inducidos por la radiación en la expresión génica en células MCF-7

Las modificaciones que se producen en la expresión génica en respuesta a la radiación en líneas celulares tumorales, y más en concreto en las células MCF-7 como modelo de adenocarcinoma mamario, están empezando a ser investigadas en la actualidad, y distan mucho de estar plenamente caracterizadas. Por lo tanto, el siguiente grupo de experimentos que decidimos llevar a cabo consistió en determinar los cambios en la expresión génica global inducidos por una dosis de radiación (8 Gy), equivalente a la que se aplica normalmente en los protocolos para pacientes con cáncer de mama, y comprobar si la adición de melatonina, administrada a dosis fisiológicas (1 nM) puede modificar

dichos cambios. Para ello, utilizamos el *RT² Profiler PCR Array* que permite el análisis simultáneo de 84 genes cuya regulación se ve alterada durante el desarrollo de los tumores mamarios, según se ha demostrado en multitud de estudios previos. Estos genes pueden clasificarse en distintos grupos: genes relacionados con angiogénesis, adhesión celular, proteólisis, progresión del ciclo celular o apoptosis. Esta clasificación se establece atendiendo a la función que desempeñan las proteínas codificadas, a las vías de señalización implicadas o al estadio de la enfermedad. Como es de suponer, debido a la dinámica interrelación de los diferentes procesos moleculares y celulares, algunos genes pueden encajar en varios grupos diferentes debido a la multitud de interdependencias existentes entre los diferentes procesos moleculares que tienen lugar en una célula tumoral mamaria y a que, evidentemente, muchas proteínas llevan a cabo diversas funciones lo que permite clasificarlas de maneras distintas atendiendo a los procesos en los que participan. La utilización de estos *arrays* permite la obtención de una gran cantidad de datos simultáneamente, que deben ser validados posteriormente con RT-PCR específicas para cada uno de los genes cuya expresión se haya visto modificada y por lo tanto sean de interés.

En el presente estudio, hemos incluido los genes analizados en cinco categorías diferentes: 1) aquellos que codifican para factores de transcripción; 2) los que intervienen en reparación de daño en el ADN; 3) los que actúan como reguladores del ciclo celular y la apoptosis; 4) los que participan en transducción de señales; 5) aquellos que regulan los procesos de adhesión celular, remodelado de la matriz extracelular y angiogénesis. En la **figura 4.1.3** se ha representado el número de genes pertenecientes a cada categoría cuya expresión se vio alterada al menos 1,5 veces al comparar los valores entre al menos dos de los grupos experimentales: radiación sola en comparación con el grupo control, o radiación sola comparada con el grupo de células pretratadas con melatonina y radiadas. De esta manera, se obtuvo que la radiación estimuló la expresión de 22 genes en comparación con el grupo de células control no tratadas, mientras que inhibió la expresión de 47 genes. Al comparar el grupo de células pretratadas con melatonina y radiadas con el grupo de células que solamente fueron radiadas, se obtuvo que la presencia de la hormona pineal estimuló la expresión de 23 genes, mientras que por el contrario desencadenó la inhibición de los niveles de expresión de otros 63.

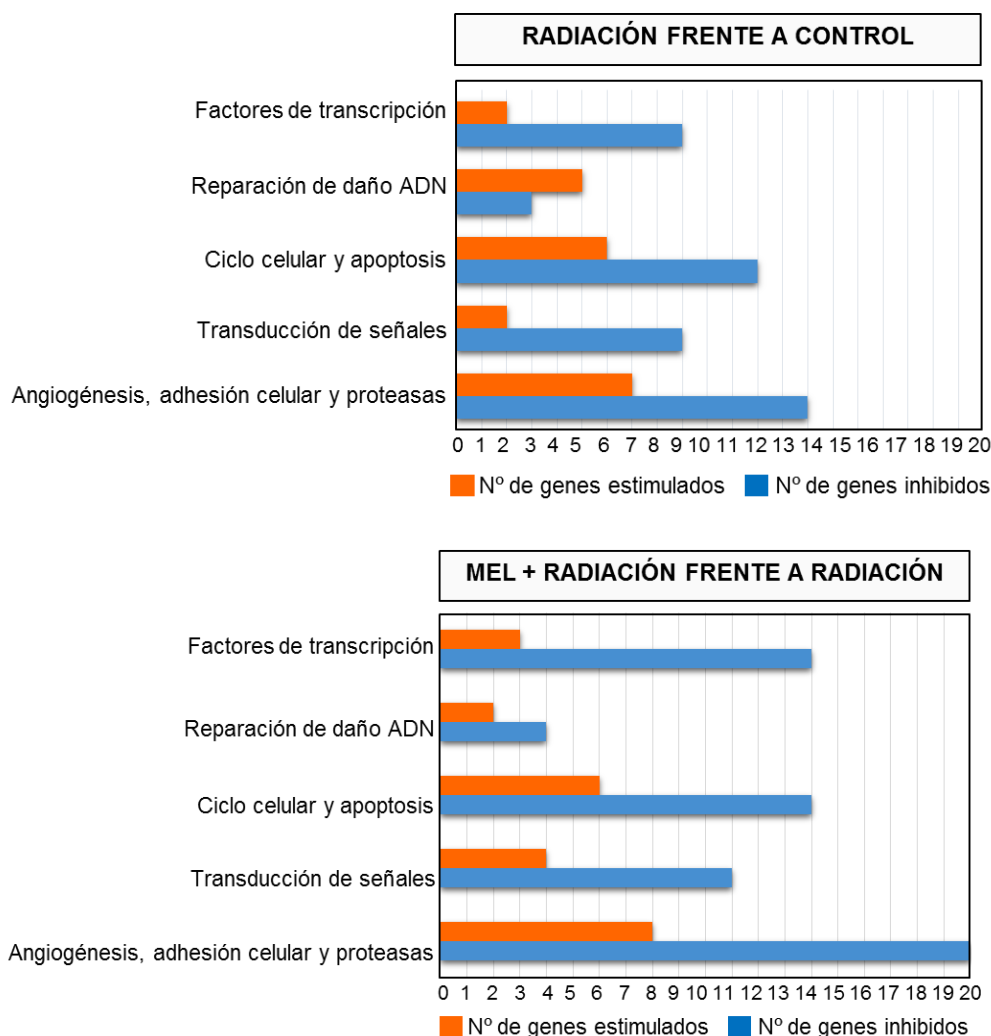


Figura 4.1.3: Genes estimulados o inhibidos en las células MCF-7 tratadas con radiación y/o melatonina. Las gráficas resumen la distribución de las categorías de genes del *array* de cáncer de mama inducidos o inhibidos en las células MCF-7. El panel superior compara el número de genes estimulados o inhibidos (al menos 1,5 veces) de cada categoría en células MCF-7 radiadas (8 Gy) frente a células control no radiadas. El panel inferior representa la comparación de células MCF-7 pretratadas con melatonina (1 nM) durante una semana y radiadas (8 Gy) frente a las MCF-7 únicamente radiadas. En ambos casos el perfil de expresión génica se realizó utilizando el ensayo de *RT² Profiler PCR* de cáncer de mama humano.

El siguiente paso consistió en validar o descartar los datos obtenidos en el *array* mediante el análisis específico de la expresión de algunos de los genes de cada uno de los grupos, hasta sumar un total de 25 de ellos: aquellos cuya expresión se vio alterada en mayor medida y/o cuyo papel en el cáncer de mama es más relevante. Dentro de un primer bloque de experimentos, estudiamos los cambios en la expresión de seis genes que pueden ser incluidos en el grupo de genes relacionados con el control del ciclo celular y reparación de daño en el ADN.

Los resultados obtenidos se recogen en la **figura 4.1.4**. Se puede observar como la radiación aumentó significativamente la expresión de los genes *TP53* (p53, el guardián del genoma), *RASSF1* (Proteína 1, isoforma A, perteneciente a la familia de proteínas con dominio de asociación a Ras) y *CDKN1A* (inhibidor de la quinasa dependiente de ciclina 1A, cuyo producto es conocido como p21). Los tres genes pueden ser considerados como supresores de tumores, y en los tres casos, la presencia de la melatonina potenció el efecto estimulador de la radiación sobre la expresión de los mismos.

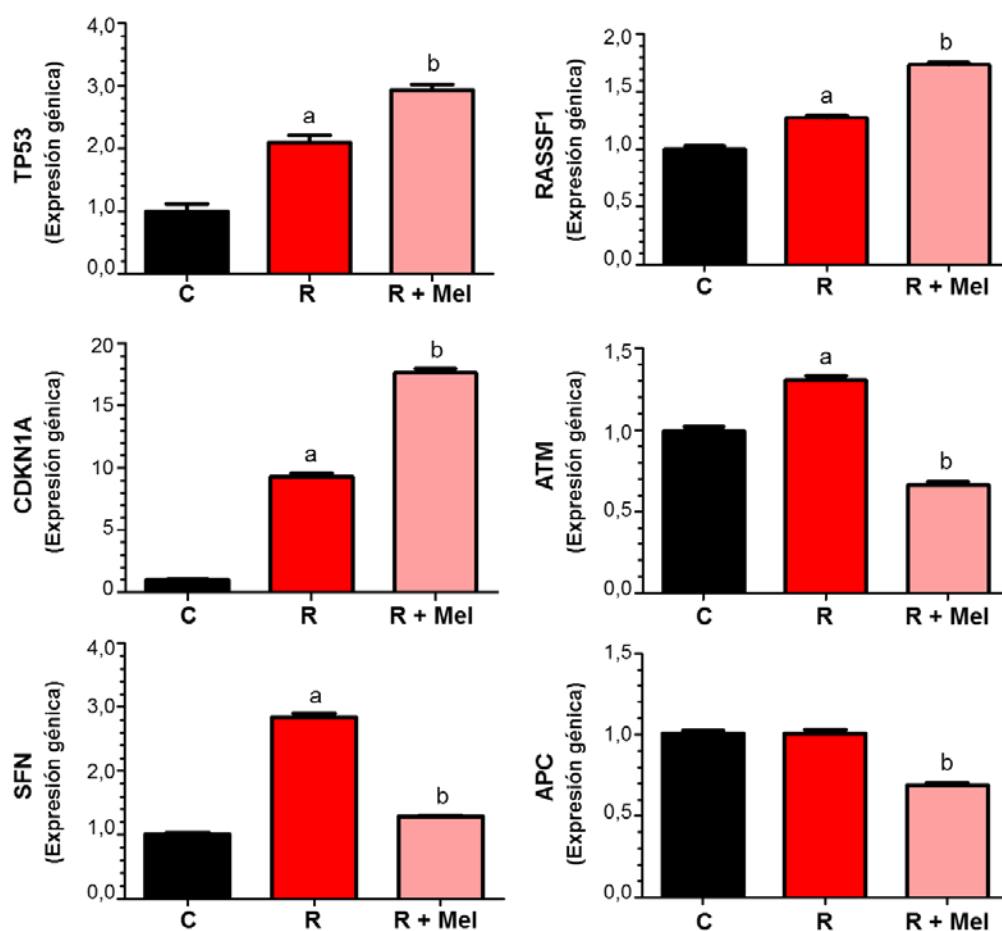


Figura 4.1.4: Efecto de los tratamientos con radiación y melatonina sobre la transcripción de genes relacionados con el control del ciclo celular y la reparación de daño en el ADN. Las células MCF-7 control y pretratadas con melatonina (1 nM) durante una semana se radiaron a una dosis de 8 Gy y tras seis horas se realizó el análisis por RT-PCR de los genes *TP53*, *RASSF1*, *CDKN1A*, *ATM*, *SFN* y *APC*. Todos los datos están expresados como el cambio relativo a las células control (media $\pm$ SEM), a partir de al menos tres experimentos independientes. a, $p < 0,001$ vs C; b, $p < 0,001$ vs R. C: control. R: radiadas. R+Mel: pretratadas con melatonina y radiadas.

La radiación también aumentó los niveles de los ARNm correspondientes a los genes *ATM* (ataxia-telagectasia mutado, activado en resistencia a quimioterapia) y *SFN* (estratifina 14-3-3 σ). En estos dos casos la melatonina contrarrestó de manera significativa

este efecto estimulador. Por último, la radiación no ejerció ningún efecto sobre los niveles de expresión de *APC* (poliposis adenomatosa coli), ejerciendo la melatonina una modesta pero significativa inhibición del mismo.

De entre los genes que pueden ser incluidos en el grupo de factores de transcripción cuya expresión se vio modificada (según los valores obtenidos en el *array*), seleccionamos seis para la validación de los datos obtenidos mediante RT-PCR específicas; *MUC1*, *c-MYC*, *GATA3*, *TWIST1*, *RB1* y *PGR*. Los resultados obtenidos se muestran en la **figura 4.1.5**.

Como se puede observar en las gráficas correspondientes, la radiación redujo de manera significativa la expresión de cuatro de los genes estudiados: *MUC1* (Mucina epitelial polimórfica, supresor de p53), *GATA3* (proteína de unión a GATA, sobreexpresado en tumores mamarios dependientes de estrógenos), *c-MYC* (myelocytomatosis, protooncogén de la familia de los genes *MYC*) y *TWIST1* (proteína 1 relacionada con la torsión). En los dos primeros casos (*MUC1* y *c-MYC*), el pretratamiento con la melatonina potenció el efecto inhibitor de la radiación de manera significativa, mientras que no influyó sobre el efecto de la radiación ionizante en la expresión de *GATA3* y *TWIST1*.

Con respecto a la expresión de *RB1* (que codifica para la proteína del retinoblastoma, supresor de tumores) y *PGR* (receptor de progesterona, que habitualmente se encuentra sobreexpresado en carcinomas mamarios hormonodependientes), en ambos casos se vio estimulada por la radiación, siendo este efecto incrementado de manera significativa cuando las células fueron adicionalmente pretratadas con melatonina a dosis fisiológicas.

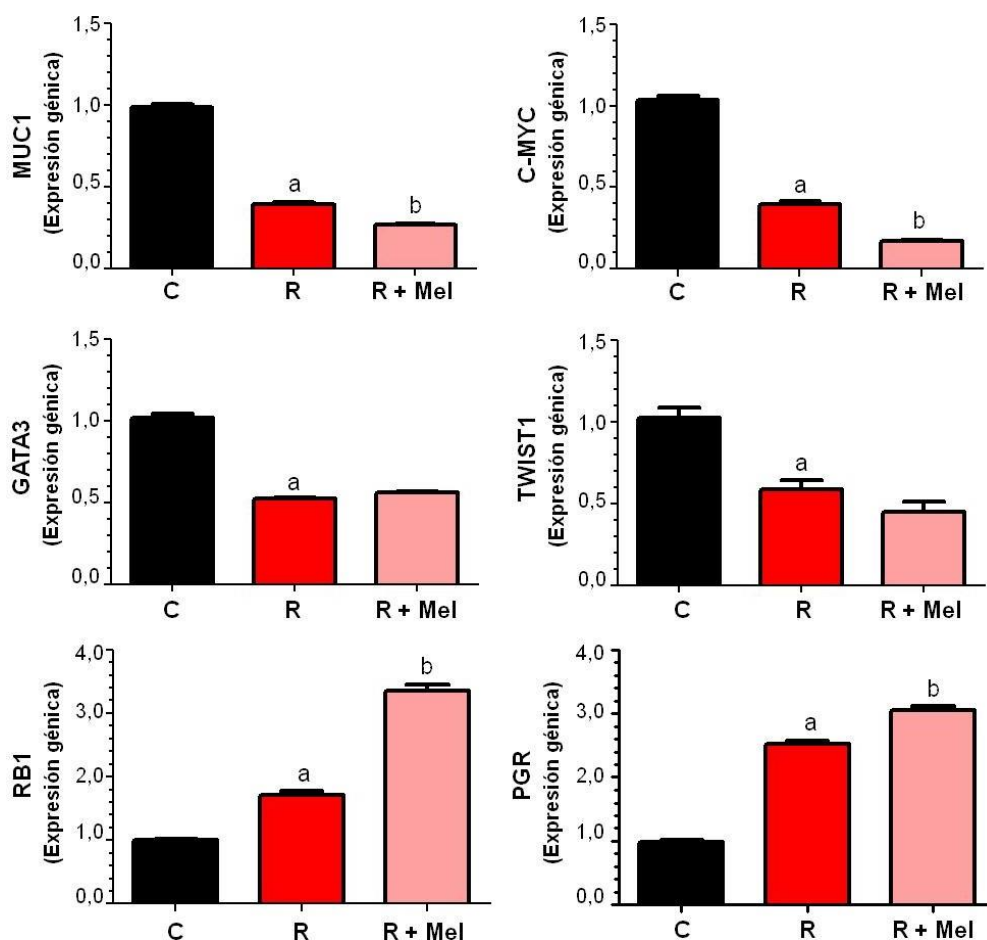


Figura 4.1.5: Efecto de los tratamientos con radiación y melatonina sobre la transcripción de genes que codifican para factores de transcripción. Las células MCF-7 control y pretratadas con melatonina (1 nM) durante una semana se radiaron a una dosis de 8 Gy y tras seis horas se realizó el análisis por RT-PCR de los factores de transcripción *MUC1*, *c-MYC*, *GATA3*, *TWIST1*, *RB1* y *PGR*. Todos los datos están expresados como cambios relativos a las células control (media $\pm$ SEM), a partir de al menos tres experimentos independientes. a, $p < 0,001$ vs C; b, $p < 0,001$ vs R. C: control. R: radiadas. R+Mel: pretratadas con melatonina y radiadas.

En el siguiente bloque de experimentos analizamos el efecto de la radiación y de la melatonina sobre cinco genes que encajan en el grupo de factores que actúan como transductores de señales, y que son: *AKT1* (serina/treonina proteína quinasa que forma parte de la vía de señalización PI3K/AKT/mTOR, participando en la regulación del ciclo celular y cuya activación está directamente relacionada con el cáncer); *N3RC1* (receptor de glucocorticoides); *ERBB2* (HER2/neu, protooncogén con actividad tirosina quinasa,); *BIRC5* (inhibidor baculoviral de la apoptosis o survivina, implicada entre otros muchos procesos en la respuesta adaptativa a la radiación) y *PTEN* (fosfatasa y homólogo de tensina, supresor de tumores). Los resultados obtenidos se muestran en la **figura 4.1.6**.

La radiación ionizante estimuló de manera significativa la expresión de *AKT1*, *N3RC1* y *ERBB2*, mientras que la inclusión de la melatonina en el tratamiento revirtió este efecto.

BIRC5 y *PTEN* vieron inhibida su expresión tras radiar las células, pero mientras que en el caso de *BIRC5* la melatonina potenció el efecto de la radiación, en lo que se refiere a *PTEN* la hormona pineal revirtió la inhibición observada en las células radiadas.

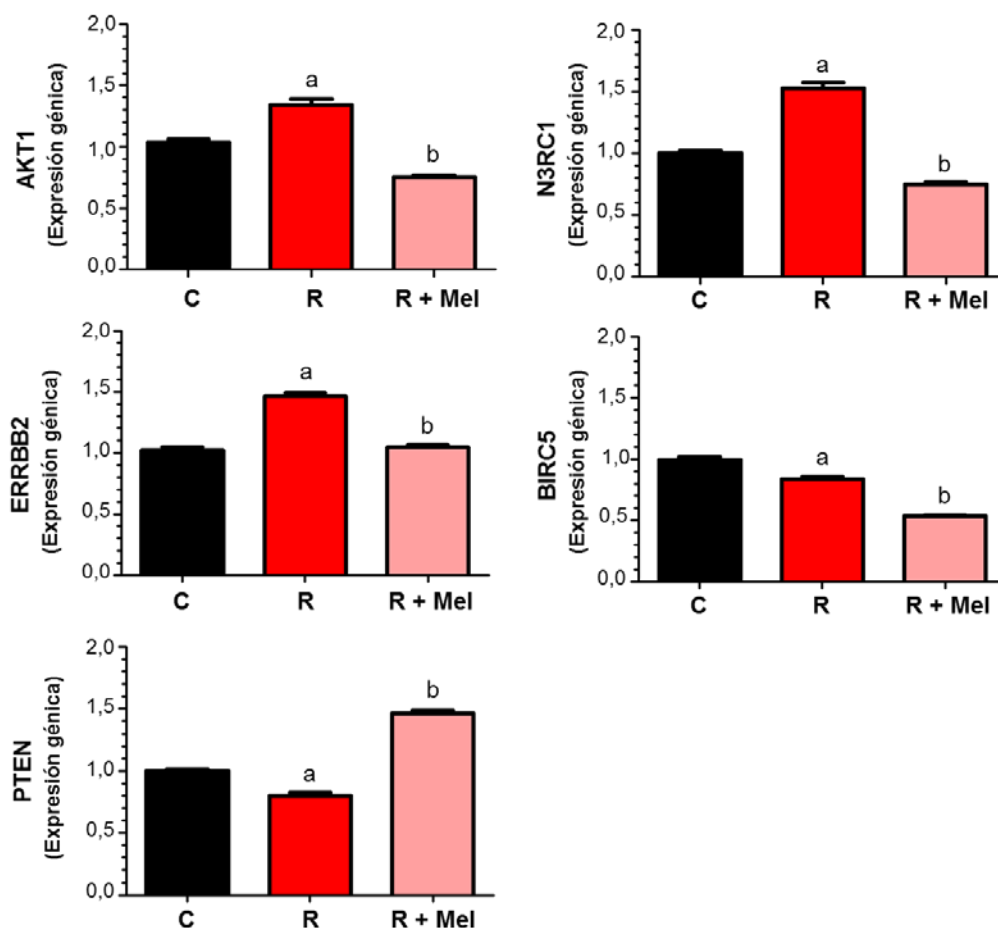


Figura 4.1.6: Efecto de los tratamientos con radiación y melatonina sobre la transcripción de genes relacionados con la transducción de señales. Las células MCF-7 control y pretratadas con melatonina (1 nM) durante una semana se radiaron a una dosis de 8 Gy y tras seis horas se realizó el análisis por RT-PCR de los genes *AKT1*, *N3RC1*, *ERBB2*, *BIRC5* y *PTEN*. Todos los datos están expresados como el cambio relativo a las células control (media $\pm$ SEM), a partir de al menos tres experimentos independientes. a, $p < 0,001$ vs C; b, $p < 0,001$ vs R. C: control. R: radiadas. R+Mel: pretratadas con melatonina y radiadas.

A continuación, decidimos estudiar la expresión de cuatro genes relacionados con la apoptosis: *BAD* (promotor de muerte asociado a *BCL-2*, proapoptótico), *BAX2* (proteína 4 similar a *Bcl-2*, proapoptótico), *BCL-2* (célula B de linfoma 2, antiapoptótico) y *NME1* (que codifica para la nucleósido-difosfato quinasa 1, supresor de metástasis, promotor de apoptosis).

Los resultados, representados en la **figura 4.1.7** mostraron como la radiación ionizante aumentó de manera significativa la expresión de los genes proapoptóticos *BAD* y *BAX2*, y redujo la expresión del gen antiapoptótico *BCL-2*.

En los tres casos, el pretratamiento con melatonina potenció significativamente los efectos de la radiación; los genes proapoptóticos aumentaron aún más su expresión, y el gen antiapoptótico redujo la suya.

Con respecto a la expresión de *NME1*, ésta permaneció inalterable en las células radiadas, pero se vio significativamente incrementada en aquellas células que fueron pretratadas además con melatonina.

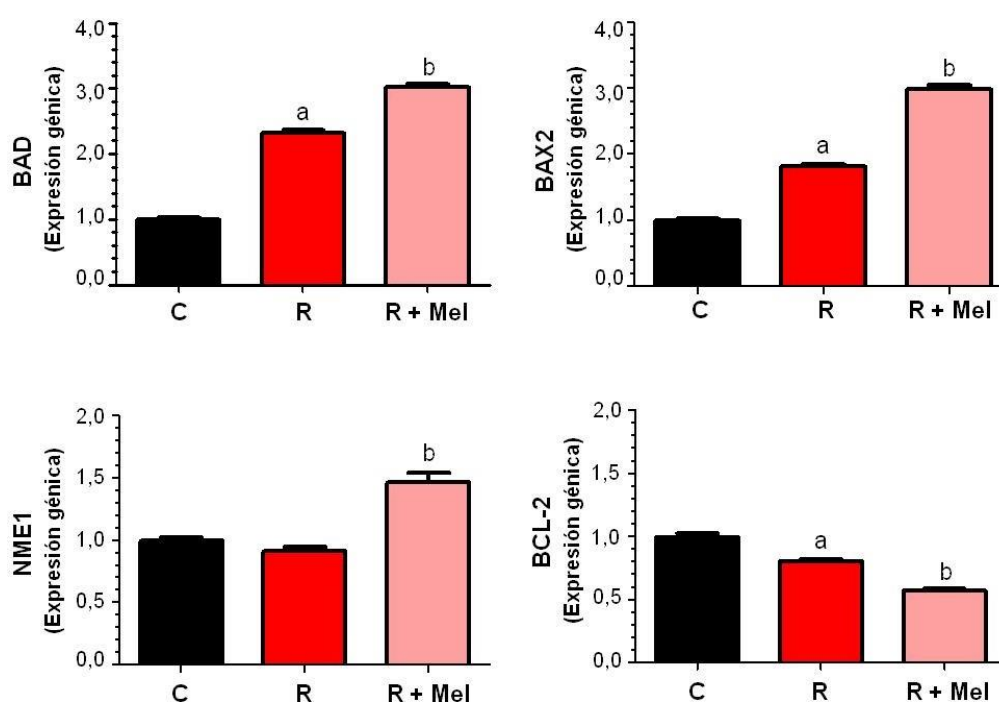


Figura 4.1.7: Efecto de los tratamientos con radiación y melatonina sobre la transcripción de genes relacionados con la apoptosis. Las células MCF-7 control y pretratadas con melatonina (1 nM) durante una semana se radiaron a una dosis de 8 Gy y tras seis horas se realizó el análisis por RT-PCR de los genes *BAD*, *BAX2*, *NME1* y *BCL-2*. Todos los datos están expresados como el cambio relativo a las células control (media $\pm$ SEM), a partir de al menos tres experimentos independientes. a, $p < 0,001$ vs C; b, $p < 0,001$ vs R. C: control. R: radiadas. R+Mel: pretratadas con melatonina y radiadas.

Los genes estudiados a continuación y que hemos incluido en el grupo de genes relacionados con adhesión celular, remodelado de la matriz extracelular y angiogénesis fueron *SERPINE* (promotor de metástasis en cáncer de mama), *PLAU* (uroquinasa, activador del plasminógeno, promotor de metástasis) y *CST6* (Cistatina E/M, supresor de metástasis en cáncer de mama).

Como se puede apreciar en la **figura 4.1.8**, en los tres casos se obtuvo una fuerte activación de la expresión en aquellas células sometidas a radiación. Sin embargo, mientras que en los dos primeros casos (*SERPINE* y *PLAU*) la melatonina contrarrestó en gran medida el efecto obtenido en respuesta a la radiación, en el último (*CST6*) la administración de la hormona pineal potenció de manera significativa el efecto de la radioterapia.

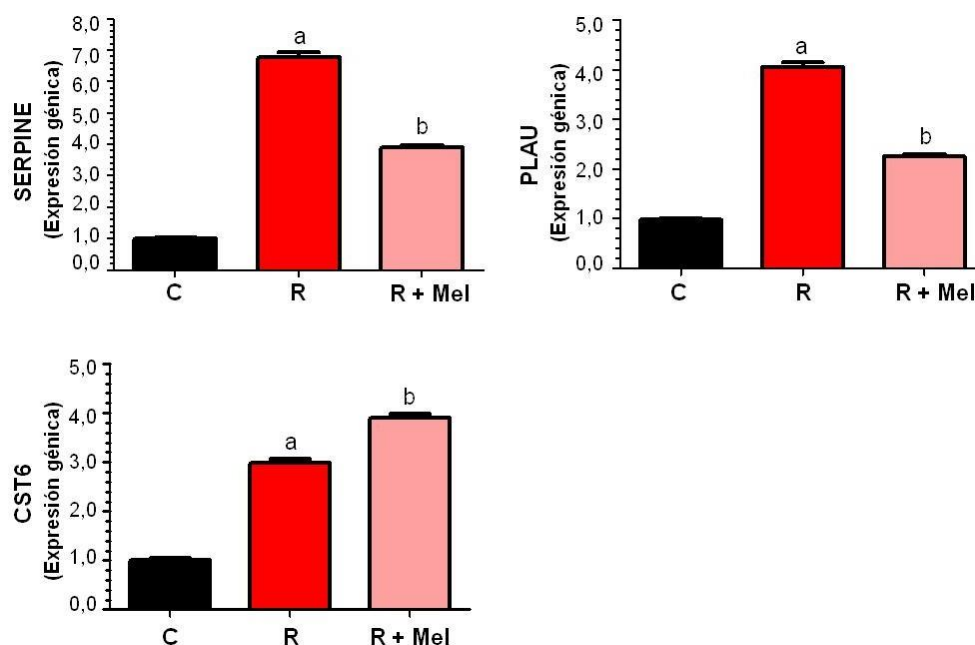


Figura 4.1.8: Efecto de los tratamientos con radiación y melatonina sobre la transcripción de genes relacionados con la adhesión celular, el remodelado de la matriz extracelular y la angiogénesis. Las células MCF-7 control y pretratadas con melatonina (1 nM) durante una semana se radiaron a una dosis de 8 Gy y tras seis horas se realizó el análisis por RT-PCR de los genes *SERPINE*, *PLAU* y *CST6*. Todos los datos están expresados como el cambio relativo a las células control (media $\pm$ SEM), a partir de al menos tres experimentos independientes. a, $p < 0,01$ vs C; b, $p < 0,01$ vs R. C: control. R: radiadas. R+Mel: pretratadas con melatonina (1 nM) y radiadas.

Por último, decidimos llevar a cabo el estudio de la expresión del gen *ABCB1*, el cual está implicado en el transporte xenobiótico (**figura 4.1.9**). Los resultados obtenidos indicaron que la radiación redujo la expresión del gen *ABCB1* mientras que la inclusión de la melatonina en el tratamiento intensificó de manera significativa el efecto represor de la radiación sobre la expresión de este gen.

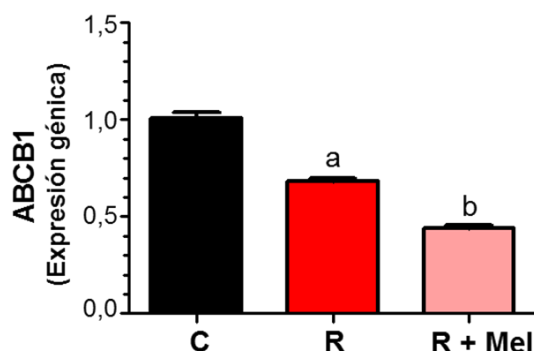


Figura 4.1.9: Efecto de los tratamientos con radiación y melatonina sobre la transcripción del gen de transporte xenobiótico *ABCB1*. Las células MCF-7 control y pretratadas con melatonina (1 nM) durante una semana se radiaron a una dosis de 8 Gy y tras seis horas se realizó el análisis por RT-PCR de la expresión del gen *ABCB1*. Todos los datos están expresados como el cambio relativo a las células control (media $\pm$ SEM), a partir de al menos tres experimentos independientes. a, $p<0,001$ vs C; b, $p<0,001$ vs R. C: control. R: radiadas. R+Mel: pretratadas con melatonina y radiadas.

4.1.3 Efectos de la radiación y la melatonina en la expresión de microARNs

En el cáncer de mama hormonodependiente, al igual que en un gran número de otros tipos de cáncer, se ha empezado a comprender en los últimos años que numerosos microARNs (miARNs) son capaces de llevar a cabo papeles cruciales en los diversos aspectos del desarrollo tumoral, bien ejerciendo un papel como oncogenes o como genes supresores de tumores, regulando multitud de vías de señalización intracelular.

Por ello, decidimos analizar los efectos de la radiación y la melatonina en la expresión de algunos microARNs con una participación demostrada en diversos procesos que acontecen en el crecimiento, expansión y diseminación de los tumores, como son la transición epitelio-mesénquima, el crecimiento celular, la migración, la invasión, la expansión de células madre o la progresión del cáncer de mama, centrando nuestro especial interés en algunos de ellos conocidos por su interrelación con Twist1, un factor clave en la transición epitelio-mesénquima.

Los resultados más relevantes que hemos obtenido en esta serie de experimentos se pueden observar en la **figura 4.1.10**. Con respecto al miR-10a, su expresión disminuyó de manera muy modesta pero significativa con la radiación, y la adición de melatonina no logró revertir significativamente ese efecto, a pesar de que la hormona pineal, por sí misma, sí aumenta la expresión de miR-10a.

Los niveles de miR-10b se vieron reducidos en respuesta tanto a la melatonina como a la radiación como a la combinación de ambas, aunque es cierto que el cotratamiento con melatonina y radiación mantuvo la expresión de este miR-10b en niveles similares a los de cada uno de los tratamientos individuales.

Por último, la expresión de miR-34a fue estimulada tanto por la melatonina como por la radiación. Cabe resaltar que en las células radiadas y tratadas con melatonina se alcanzaron unos niveles de expresión de miR-34a muy superiores a los alcanzados en respuesta a cada uno de los tratamientos individuales.

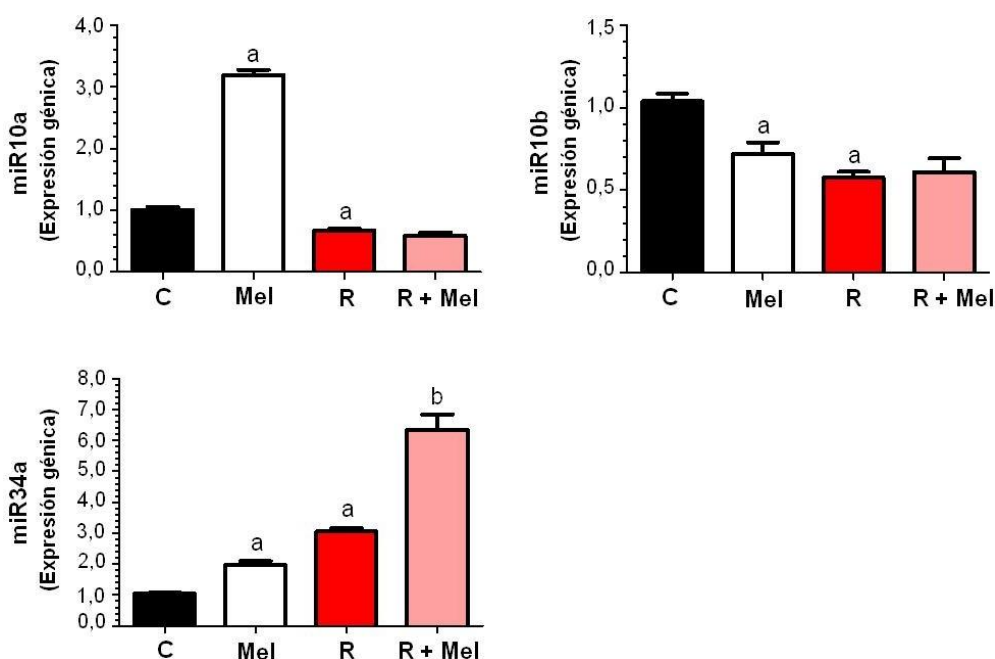


Figura 4.1.10: Efecto del tratamiento con melatonina y/o radiación sobre la expresión de microARNs. El análisis de la expresión de miR-10a, miR-10b, miR-34a se realizó mediante RT-PCR en células MCF-7 tratadas con melatonina (1 nM) y/o radiación (8 Gy). Todos los datos se expresan como cambio de veces en relación con las células control (media $\pm$ SEM) de tres experimentos independientes. a, $p < 0,001$ vs C; b, $p < 0,001$ vs R. C: control. Mel: melatonina. R: radiadas. R+Mel: radiadas con melatonina.

4.1.4 Efectos de la radiación y la melatonina en el estado de activación de quinasas y otros factores implicados en vías de señalización

En el siguiente bloque de experimentos perteneciente a este primer capítulo decidimos investigar el efecto del tratamiento con radiación y melatonina sobre el estado de activación (valorado en función del nivel de fosforilación) de diversos factores y proteínas quinasas en las células MCF-7. Para ello, utilizamos el ensayo *Proteome Profiler*TM (R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA) que permite evaluar el estado de fosforilación de múltiples proteínas quinasas involucradas en diferentes vías de señalización

intracelular. En la **figura 4.1.11 A** se muestra una membrana representativa de los resultados obtenidos. Como se puede observar en la misma, el efecto más evidente de la radiación se produjo sobre los niveles de fosforilación de la p70S6 quinasa, disminuyéndolos, efecto que fue fuertemente potenciado por el pretratamiento con la melatonina. La radiación también disminuyó los niveles de fosfoAkt (p-Akt) e incrementó los niveles de fosfo53 (p-p53), resultado que en ambos casos se vio potenciado por la presencia de la hormona pineal.

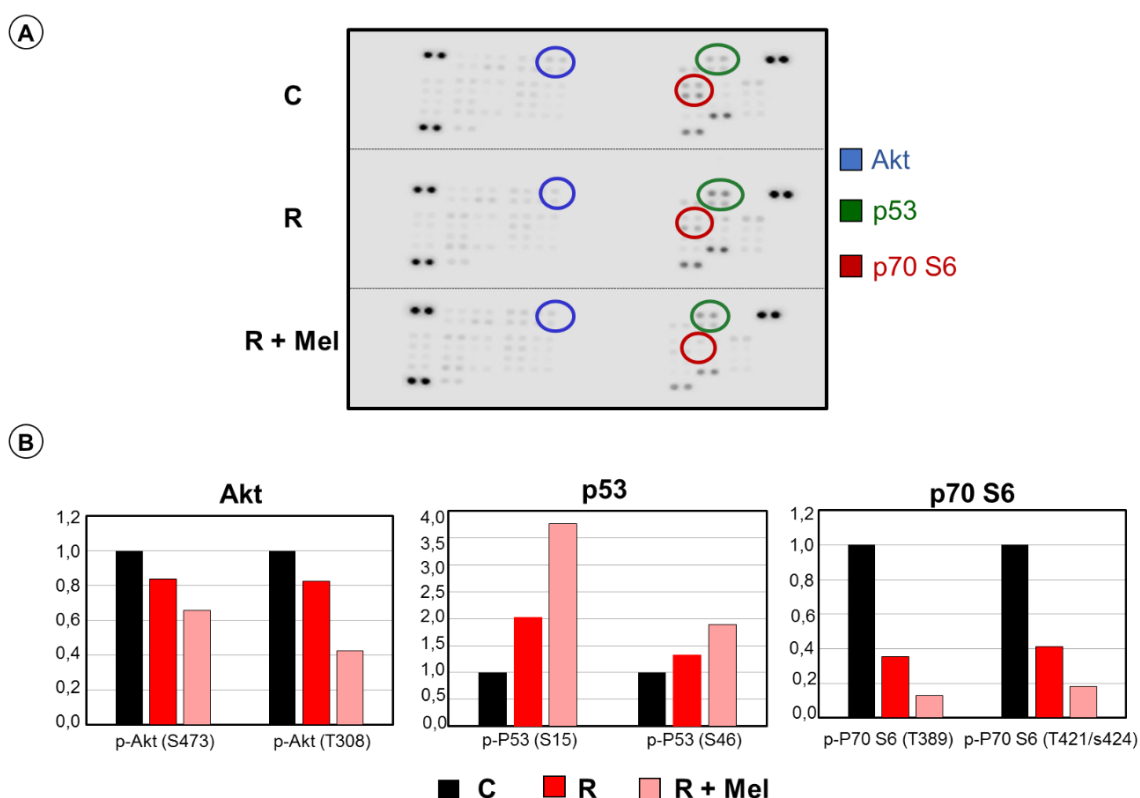


Figura 4.1.11: Efecto de los tratamientos con radiación y melatonina sobre el estado de fosforilación de las proteínas quinasas intracelulares. **(A)** Imágenes de las transferencias de la matriz de fosfoquinasas *Proteome Profiler™* Array ensayada en células MCF-7. Los extractos proteicos se obtuvieron cuatro horas después de radiar las células. Los óvalos azules, verdes y rojos señalan los puntos correspondientes a los niveles de las proteínas Akt, p53 y p70S6. **(B)** La intensidad de la señal de los puntos correspondientes a cada proteína se cuantificó por densitometría y se expresó en relación con el grupo control. C: control. R: radiadas (8 Gy). R+Mel: pretratadas con melatonina (1 nM) durante una semana y radiadas (8 Gy).

4.1.5 Influencia de la melatonina sobre los efectos de la radiación en la formación de nuevos vasos sanguíneos en un modelo *in vivo*: CAM assay

En el último apartado de este primer capítulo decidimos utilizar el modelo *in vivo* de la membrana corioalantoidea del embrión de pollo (CAM assay) para determinar los efectos de la radiación y la melatonina sobre la angiogénesis en la línea celular MCF-7. El procedimiento que seguimos fue el siguiente: las células MCF-7, pretratadas o no con melatonina a dosis 1 nM durante una semana, fueron radiadas a 8 Gy. Posteriormente se implantaron embebidas en bolas de alginato en los huevos de gallina fertilizados y, tres días más tarde, se contaron los vasos sanguíneos que convergen hacia dicha bola.

Tal y como se puede apreciar en la **figura 4.1.12**, tanto en aquellos huevos donde se habían implantado células pretratadas con melatonina como en los que contenían sólo las células radiadas, disminuyó significativamente el número de vasos sanguíneos formados alrededor del alginato. Además, el uso combinado de ambos tratamientos sobre las células MCF-7 hizo que la formación de vasos fuese aún menor.

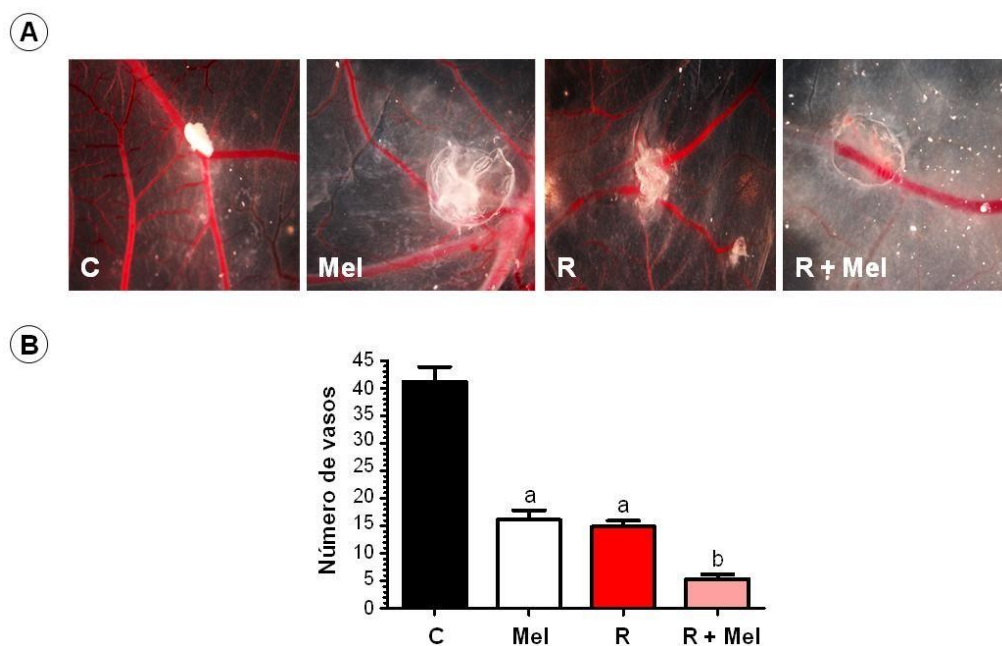


Figura 4.1.12: Efecto *in vivo* de los cambios inducidos por la radiación y/o la melatonina en la angiogénesis de células MCF-7 en el ensayo de la membrana corioalantoidea. (A) Imágenes representativas de la CAM. (B) Contaje del número de vasos de cada grupo experimental. Los datos se expresan como la media $\pm$ SEM; a, $p < 0,001$ vs C; b, $p < 0,001$ vs R. C: control. Mel: melatonina (1 nM). R: radiadas (8 Gy). R+Mel: radiadas con melatonina (1 nM).

DISCUSIÓN

La radioterapia es uno de los tratamientos elegidos, tanto con objetivos curativos como paliativos, a la hora de tratar muchos tipos de cáncer, incluyendo el cáncer de mama. Se estima que en la actualidad aproximadamente el 80% de los pacientes de cáncer reciben radioterapia, sola, o bien en combinación con quimioterapia u hormonoterapia (Nair y cols., 2001). El problema estriba en que la radiación ionizante tiene muchos efectos secundarios no deseados, consecuencia de una serie de mecanismos directos o indirectos; así, por ejemplo, multitud de vías de señalización intracelular son afectadas por la producción de especies de oxígeno altamente reactivas implicadas en daño oxidativo, que pueden a su vez desencadenar apoptosis e inhibición del crecimiento celular pero también eventos peligrosos como la transformación epitelio-mesénquima (Shinomiya, 2001). A pesar de los avances tecnológicos, la administración de altas dosis de radiación ionizante sobre un área específica bien definida del paciente implica que el tejido sano circundante sea también irradiado en mayor o menor medida. De ahí que los tratamientos adyuvantes persigan dos objetivos fundamentales: actuar como radio-protectores, sobre el tejido normal, y como radio-sensibilizadores, incrementando el efecto de la radioterapia sobre las células tumorales, y contribuyendo además a impedir el desarrollo de resistencia a la radiación, un problema que a menudo se presenta en los pacientes que reciben radioterapia (Alonso-González y cols., 2020).

Recientemente, se han publicado varios estudios, tanto *in vitro* como *in vivo*, cuyos resultados permiten proponer a la melatonina como una molécula con potencial para actuar como radio-sensibilizador, especialmente en las pacientes con tumores mamarios, y se han comenzado a describir algunos de los mecanismos que podrían explicar el hecho de que la hormona pineal potencie el efecto de la radiación. También hay estudios en los que se pone de manifiesto el papel de la hormona pineal como agente radio-protector, salvaguardando a la médula ósea y a las células sanguíneas de los efectos nocivos de la radiación (Alonso-González y cols., 2020).

En cuanto a los estudios *in vivo*, se ha descrito que la melatonina consigue reducir la mortalidad aproximadamente a la mitad en ratones expuestos a dosis letales de radiación ionizante (Blickenstaff y cols., 1994). El efecto positivo de la melatonina parece estar asociado a la protección de la médula ósea (altamente sensible a la radiación) frente al daño genómico causado (Vijayalaxmi y cols., 1999). La hormona pineal también ejerce como agente cito-protector de los linfocitos en humanos, en experimentos llevados a cabo

en un estudio *in vivo* / *ex vivo*, donde a una serie de voluntarios se les administró melatonina, para a continuación extraerles muestras de sangre de donde se aislaron linfocitos que fueron sometidos a altas dosis de radiación. Los linfocitos aislados dos horas tras la administración de melatonina presentaron un menor número de aberraciones cromosómicas (Vijayalaxmi y cols., 1996).

Centrándonos en los resultados obtenidos en diferentes modelos *in vitro* de cáncer de mama, en los últimos años se han comenzado a describir algunos de los mecanismos que podrían explicar la forma en la que la hormona pineal potencia el efecto de la radiación. Se ha propuesto que la melatonina podría llevar a cabo sus efectos radio-sensibilizadores modulando la síntesis de estrógenos a través de la regulación de los enzimas que participan en su producción e inactivación (Alonso-González y cols., 2015). Un efecto similar se ha descrito, no sólo en las células tumorales, sino en los fibroblastos que forman parte del tejido peritumoral (González-González y cols., 2019a). La melatonina también potencia el efecto antiangiogénico de la radiación, principalmente a través de la disminución de los niveles de VEGF (González-González y cols., 2019b). Otros efectos que pueden explicar el efecto radio-sensibilizador de la melatonina son su capacidad para incrementar los niveles de p53, p21 y Bax2 (Kastan y cols., 1991; Nooshinfar y cols., 2016) y el efecto cooperativo con la radiación actuando sobre los niveles de las dos principales proteínas implicadas en la reparación de las roturas en la doble hebra del ADN: Rad51 y DNA-PKcs (Alonso-González y cols., 2015).

Parece pues claro que la melatonina protege, sobre todo a las células de los tejidos normales circundantes y a las células de la médula ósea frente a los efectos nocivos de la radiación, a la vez que potencia el efecto de la misma sobre las células cancerosas. Sin embargo, aún no se conoce mucho acerca de los mecanismos moleculares alterados por la radiación ionizante (expresión génica, vías de señalización, etc), y de la manera en que la melatonina puede regular dichas alteraciones. Por lo tanto, en este primer capítulo de la tesis nos propusimos abordar el estudio de los eventos moleculares que se ven modificados por la radiación ionizante en las células MCF-7, asumiendo que algunos de esos cambios serán positivos, en el sentido de que conducen a la muerte celular, pero otros pueden ser potencialmente negativos, conduciendo a resistencia y supervivencia.

La hipótesis de partida que nos planteamos fue que la melatonina podría modular parte de esos cambios, probablemente estimulando algunos de los efectos positivos de la radioterapia y contrarrestando algunos de los efectos negativos de la misma.

Comenzamos el desarrollo experimental de este primer capítulo estudiando el efecto de la radiación ionizante sobre la proliferación de las células MCF-7. Como era de esperar, las células radiadas vieron claramente disminuida su capacidad proliferativa y su nivel de supervivencia. También podemos concluir de esta serie de resultados que el pretratamiento con melatonina durante una semana, como paso previo a la radiación ionizante, potencia el efecto inhibidor de ésta y lo hace de una manera óptima a la concentración fisiológica de 1 nM, por lo que ésta fue la dosis elegida y utilizada para llevar a cabo los experimentos subsiguientes planteados.

Una vez comprobado que la melatonina potencia el efecto antiproliferativo de la radiación ionizante sobre las células MCF-7, en el siguiente paso decidimos abordar la identificación de los cambios de expresión génica que se producen en estas células en respuesta a la radiación, para determinar a continuación si la melatonina ejerce algún papel modulador de dichos cambios. Para ello utilizamos el *array* de PCR de genes relacionados con el cáncer de mama (*RT² Breast Cancer Profiler Array*, Qiagen). Esta herramienta permite el estudio de manera simultánea y en un solo experimento de 84 genes. Cabe destacar que algunos de estos genes pueden ser clasificados en diversos grupos según su función, y que muchos de ellos pueden encajar, por la variedad de funciones que llevan a cabo, en varios de estos grupos. Por ejemplo, *CDKN1A*, que codifica para p21, puede ser incluido, por su participación en los diferentes procesos que es capaz de modular, en los siguientes grupos: “apoptosis”, “ciclo celular” y “daño en el ADN y reparación”.

Con la utilización de esta herramienta, pudimos determinar que la radiación reguló al alza la expresión de 22 de esos genes e inhibió la de otros 47 con respecto a las células que no han recibido tratamiento. Cuando el *array* procedente de células radiadas se comparó con el de células radiadas que además habían sido pretratadas con melatonina, comprobamos que la presencia de la hormona pineal reguló al alza la expresión de 23 genes y desencadenó la inhibición de otros 63.

Los estudios de expresión génica mediante la utilización de estos *arrays* presentan la desventaja de que no son conclusivos, ya que solamente se obtiene un único valor de expresión para cada gen en cada una de las membranas procesadas (correspondiente a un determinado tratamiento experimental). Por ello, fue necesario elegir una serie de genes para estudiar específicamente por RT-PCR, priorizando fundamentalmente aquellos para los que se obtuvieron en el *array* valores muy diferentes entre al menos dos de los grupos

experimentales. En concreto, procedimos a analizar de manera específica la expresión de 25 genes con el objetivo de validar o descartar los resultados obtenidos en el análisis de los arrays. Es importante recordar una vez más que algunos de los genes pueden ser incluidos en varios grupos diferentes debido a la complejidad de sus funciones. Nosotros hemos clasificado los genes validados por RT-PCR eligiendo uno de los posibles grupos de encaje para cada gen.

Dentro del grupo de genes relacionados con el control del ciclo celular y la reparación de daño en el ADN, hemos encontrado que la radiación aumentó los niveles de expresión de *TP53*, *RASSF1* y *CDKN1A* y que este efecto se vio incrementado de manera significativa por el pretratamiento con melatonina. El gen *TP53* codifica para p53, un supresor de tumores conocido como “el guardián del genoma” ya que una de sus funciones primordiales es mantener la estabilidad genómica (Berger y cols., 2013). El producto de *CDKN1A*, p21 es regulado directamente por p53 y es un inhibidor de los complejos ciclina-CDK2 y ciclina-CDK4, ralentizando el avance desde la fase S del ciclo celular (Gartel y Radhakrishnan, 2005). El incremento de los niveles de ambas proteínas ha sido propuesto como parte del mecanismo a través del cual la melatonina inhibe la proliferación de las células tumorales mamarias cuyo crecimiento es dependiente de estrógenos (Mediavilla y cols., 1999). Niveles adecuados de p53 permiten predecir una buena respuesta a la terapia del cáncer de mama y en paralelo, altos niveles de p21 permiten pronosticar un tipo de cáncer de mama más benigno (Elledge y Allred, 1998). Con respecto a *RASSF1*, codifica para la Proteína 1, isoforma A, perteneciente a la familia de proteínas con dominio de asociación a Ras. Rassf1 actúa como un supresor de tumores cuya inactivación está implicada en el desarrollo de muchos tipos de cáncer incluido el de mama. Esta proteína actúa disminuyendo los niveles de Bcl-2 y c-Myc en las células tumorales mamarias, lo que lleva a una inhibición de su crecimiento y supervivencia.

Dentro de este mismo grupo de genes, la radiación también estimuló la expresión de *ATM* (ataxia-telagectasia mutado) y de *SFN* (estratifina). La hiperactivación de *ATM* en células de cáncer de mama conduce a la regulación positiva de *ZEB1* (*zinc finger E-box binding homeobox 1*), lo que finalmente desencadena resistencia a la radiación y la transición epitelio-mesénquima (Zhang y cols., 2014b). La estratifina 14-3-3 σ , producto del gen *SFN*, es conocida como un supresor de tumores silenciado en aproximadamente un 80% de los tumores de la mama. Sin embargo, recientemente se ha descrito que desempeña un papel estabilizando el complejo formado entre actina solubilizada y los filamentos

intermedios del citoesqueleto, lo que origina una forma de carcinoma de mama agresiva con un mal pronóstico (Boudreau y cols., 2013). Nuestros resultados indican que, en ambos casos, *ATM* y *SFN*, el pretratamiento con melatonina contrarresta el efecto estimulador de la radiación. Por último, las células radiadas no vieron alterados los niveles de *APC* (poliposis adenomatosa coli), pero la melatonina si desencadenó una inhibición de su expresión. Este resultado en principio no es muy positivo, ya que la pérdida de *APC* está relacionada con la génesis tumoral y la resistencia a agentes quimioterapéuticos como la doxorubicina (Stefanski y cols., 2019).

Seis genes cuyas funciones les permiten ser considerados como factores de transcripción fueron estudiados a continuación mediante PCR específicas; *MUC1*, *c-MYC*, *GATA3*, *TWIST1*, *RB1* y *PGR*. La radiación inhibió de manera significativa la expresión de los cuatro primeros: *MUC1*, un inhibidor de p53 que se encuentra comúnmente sobreexpresado en el cáncer (Wei y cols., 2007) y para el cual recientemente se ha desarrollado una vacuna que ha mostrado una alta eficacia antitumoral contra el cáncer de mama en un modelo de ratones (Liu y cols., 2020); *c-MYC*, implicado en resistencia a doxorubicina (Cheng y cols., 2018) y que se encuentra sobreexpresado en células de cáncer de mama resistentes a la radiación (Zhang y cols., 2016); *GATA3*, habitualmente sobreexpresado en tumores mamarios hormonodependientes (Guo y cols., 2017b), con un papel prominente en la homeostasis de la glándula mamaria aunque existe cierta controversia, ya que también parece inhibir la transición epitelio-mesénquima, la invasión y la metástasis de los tumores mamarios (Yu y cols., 2019); y *TWIST1*, un factor de transcripción involucrado en el desarrollo del mesodermo en la etapa embrionaria (Thisse y cols., 1987; Wang y cols., 1997), que con frecuencia se reexpresa en el cáncer, apareciendo elevado en el cáncer de mama invasivo (Cheng y cols., 2007). Se ha descrito que Twist1 evita la detención del crecimiento desencadenada en respuesta a p53 (Maestro y cols., 1999). Más recientemente, se ha encontrado que Twist1 participa en la transición epitelio-mesénquima (Zhu y cols., 2016; Tang y cols., 2016) y que niveles altos de este factor de transcripción se correlacionan con una baja supervivencia (Wushou y cols., 2014), invasión y metástasis (Mao y cols., 2020). El pretratamiento con melatonina potenció de manera significativa el efecto inhibidor de la radiación en los dos primeros casos (*MUC1* y *c-MYC*) y no produjo ningún efecto significativo sobre la expresión de *GATA3* y *TWIST1*.

Dentro de esta misma categoría de factores de transcripción, la radiación potenció la expresión de *RB1* y *PGR*, y el pretratamiento con melatonina aumentó aún más los niveles de ARN mensajero de ambos genes. Rb1, la proteína del retinoblastoma, es una proteína supresora de tumores que se encuentra mutada/silenciada en muchos tipos de cáncer, incluido el de mama (Murphree y Benedict, 1984). En las células MCF-7, Rb1 es inhibida por la ciclina D1 lo que promueve la progresión a través del ciclo celular (Tomblin y Salisbury, 2014). Dentro de los tumores mamarios, los basales son los que con mayor probabilidad presentan mutaciones y pérdida de número de copias de este gen (Zhao y cols., 2019). En cuanto a *PGR* (receptor de progesterona), se ha descrito recientemente que la adquisición de radioresistencia trae como consecuencia una pérdida de su expresión (Gray y cols., 2019).

De los genes incluidos en el grupo de transducción de señales, la melatonina fue capaz de contrarrestar la inducción de la expresión observada en las células radiadas de *AKT1*, *N3RC1* y *ERBB2*. *AKT1* es uno de los genes sobreexpresados habitualmente en muchos tipos de cáncer, entre ellos el de mama (López-Cortés, 2020), y la reducción de sus niveles en respuesta a la melatonina que hemos observado está en concordancia con resultados previamente descritos (Proietti y cols., 2011; Xue y cols., 2012; Wang y cols., 2012). Con respecto al receptor de glucocorticoides (*N3RC1*), se ha descrito que estimula la proliferación y la supervivencia de numerosas líneas celulares tumorales (Gündisch y cols., 2012) y que su sobreexpresión parece estar asociada a una mala respuesta a la terapia basada en taxanos, pero una buena respuesta a la terapia basada en antraciclinas (Elkashif y cols., 2020). *ERBB2* (HER2/neu) es un protooncogén cuyo bloqueo con un antagonista específico (lapatinib) incrementa la sensibilidad de las células tumorales mamarias a la radiación (Yu y cols., 2016; Candas-Green y cols., 2020).

La melatonina potenció la inhibición ejercida por la radiación sobre la expresión de *BIRC5* (survivina) un factor antiapoptótico que se encuentra sobreexpresado en células resistentes a la quimioterapia (Hu y cols., 2015). En el cáncer de mama, se ha descrito que niveles altos de expresión de *BIRC5* están correlacionados con tiempos de supervivencia más cortos, y mayor probabilidad de eventos metastásicos (Dai, 2020).

Por último, la radiación ionizante redujo de manera modesta pero significativa la expresión de *PTEN* mientras que la melatonina consiguió revertir este efecto. *PTEN* es un supresor de tumores cuya pérdida se produce con mucha frecuencia en el carcinoma mamario lobular infiltrante (Lehrer y cols., 2019), cuya supresión activa la señalización

de la vía Akt/mTOR/p70S6K y disminuye la sensibilidad de las células MCF-7 a la doxorrubicina (Steelman y cols., 2008). Es importante destacar que aquellas pacientes con niveles bajos de la proteína PTEN en el estroma mamario y que reciben radioterapia presentan una predisposición mayor a desarrollar un cáncer de mama secundario (Sizemore y cols., 2018).

La melatonina y la radiación cooperaron en la inducción de la expresión de los genes proapoptóticos *BAD* y *BAX2*, y en la inhibición del gen antiapoptótico *BCL-2* (considerado como un oncogén) (Tudor y cols., 2000). Bad (promotor de muerte asociado a Bcl-2) es un miembro proapoptótico de la familia de genes de *BCL-2*, involucrado en el inicio de la apoptosis. Bad forma heterodímeros con proteínas antiapoptóticas (como Bcl-2) inactivándolas, permitiendo la apoptosis mediada por Bax2 (Tudor y cols., 2000). Bad contrarresta los efectos antiapoptóticos de Bcl-2, el cual, a su vez, modula la vía apoptótica intrínseca mediante la unión y la neutralización de otras proteínas que actúan como permeabilizadores mitocondriales, como la proteína proapoptótica Bax2 (Correia y cols., 2015). Se ha descrito asimismo que la expresión de *BAX2* se ve estimulada en respuesta a p53 y que Bax2 está involucrado en la apoptosis mediada por el guardián del genoma. Por último, la expresión de *NME1* no se vio afectada por la radiación, pero si resultó estimulada por la melatonina. *NME1* es un gen supresor de tumores y supresor de metástasis en el cáncer mamario (McCorkle y cols., 2014), y cuya rápida degradación a nivel transcripcional está asociada a la transición epitelio-mesénquima (Guo y cols., 2020).

Del grupo de adhesión, remodelado de la matriz y angiogénesis, la radiación estimuló la transcripción de los tres genes que hemos analizado: *SERPINE*, *PLAU* y *CST6*. La melatonina inhibió fuertemente este resultado en los dos primeros casos. La serpina y el inhibidor del activador del plasminógeno 1 (uroquinasa) son capaces de actuar sobre las células estromales circundantes, tales como los fibroblastos asociados al cáncer, estimulándolos para que produzcan proteasas de remodelado de la matriz extracelular, lo que conduce a la metástasis en cáncer de mama (Wei y cols., 2019; Yadav y cols., 2020). La expresión de *PLAU* en el estroma está relacionada con menor tiempo de supervivencia libre de metástasis y de supervivencia total en mujeres con tumores mamarios con crecimiento dependiente de estrógenos (Singer y cols., 2019). Por último, la melatonina coopera con la radiación para incrementar la expresión de la cistatina E/M (codificada por *CST6*), que suprime la proliferación, migración e invasión de las células tumorales

mamarias, actuando en definitiva como un supresor de metástasis en cáncer de mama, sobre todo de las óseas (Jin y cols., 2012). El último gen cuya expresión se vio reprimida en respuesta a la radiación y la melatonina fue *ABCB1*, también conocido como *MDR1*, que codifica para una glicoproteína que actúa como una bomba de eflujo, extrayendo fármacos (como los empleados en quimioterapia) del interior de la célula. Esta proteína se encuentra en niveles altos en numerosos tipos de cáncer incluyendo cáncer de colon, carcinoma renal, linfomas, leucemias, mieloma múltiple, y cáncer de mama (Silva y cols., 2015; Liu y cols., 2017c). Las células asesinas inducidas por citoquinas sensibilizan a las células tumorales mamarias resistentes a la radiación a través de un descenso de expresión de *MDR1* (Guo y cols., 2017a).

Los microARNs están implicados en una amplia gama de vías de señalización intracelular (Ambros, 2001). Con respecto a la carcinogénesis, pueden actuar como oncogenes o genes supresores de tumores (Zhang y cols., 2007). Por lo tanto, en uno de los últimos bloques experimentales llevados a cabo en este primer objetivo, estudiamos la expresión de algunos miARNs que se sabe que juegan papeles importantes en el cáncer.

El miR-10a es un inhibidor de la progresión del cáncer de mama, que promueve la apoptosis de las células MCF-7 a través de PI3/Akt/mTOR. La sobreexpresión de miR-10a promueve la apoptosis e inhibe la proliferación y la migración, a la par que suprime la activación de p70S6 quinasa. Este microARN está suprimido en tumores mamarios altamente agresivos (Ke y Lou, 2017). Nuestros resultados mostraron que, aunque la melatonina por sí sola tiene un efecto estimulante en su expresión, ésta se ve disminuida en las células radiadas, donde la melatonina no consigue revertir este efecto inhibitorio. El miR-10b está implicado en la invasión tumoral, la angiogénesis, la motilidad celular y la metástasis (Liu y cols., 2017b). Este microARN presenta niveles inferiores a lo normal en tumores mamarios implantados en ratones, tras ser sometidos a radiación (Farsinejad y cols., 2016). Nuestros experimentos indican que la melatonina y la radiación inhiben la expresión de este microARN, pero la hormona pineal no potencia el resultado de la radiación. El miR-34a protege contra la proliferación, la invasión y la metástasis del cáncer de mama al inhibir directamente Twist1 (Rokavec y cols., 2014; Imani y cols., 2017; Rui y cols., 2018). Se ha descrito que la radiación estimula su expresión en células MCF-7 (Stankevics y cols., 2013). Nuestros resultados indican que en las células MCF-7, la radiación estimula la expresión de miR-34a, y que la melatonina potencia este efecto de una manera notable.

En el siguiente grupo de experimentos decidimos estudiar las vías de señalización intracelular, tratando de caracterizar el estado de fosforilación de una serie de factores y proteínas quinasas, con la idea de identificar las modificaciones que se producen en respuesta a la radiación y ver si dichas modificaciones pueden ser potenciadas o revertidas por la melatonina. En el ensayo de perfil de proteoma llevado a cabo, encontramos que la radiación y la melatonina disminuyeron la fosforilación de Akt en la serina 473 y la treonina 308. La fosforilación de ambos residuos, dependiente de mTORC2 y su cofactor Rictor promueve la progresión tumoral en tumores mamarios (Morrison Joly y cols., 2016). La fosforilación de Akt se correlaciona con un mal pronóstico y se ha descrito en células MCF-7 pero no se ha observado en MDA-MB-231 (Cicenas y cols., 2005; Yndestad y cols., 2017). Mutaciones en estos dos residuos llevadas a cabo con el objeto de impedir la fosforilación de los mismos incrementan la sensibilidad a la radiación (Scymonowicz y cols., 2018). En paralelo al resultado de Akt, también observamos que radiación y melatonina parecen cooperar disminuyendo la fosforilación de p70S6 quinasa. La activación de la vía S6 parece implicada en la inducción de la transición epitelio-mesénquima y la metástasis en el carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (Wu y cols., 2016). En el cáncer de mama también se ha correlacionado con mal pronóstico y la resistencia al tamoxifeno (Bostner y cols., 2015).

La fosforilación de p53 en los residuos serina 15 y serina 46 se ve incrementada por la radiación, y la melatonina parece intensificar este efecto. Este resultado es potencialmente positivo, ya que se ha descrito que la fosforilación de p53 en ambos residuos es uno de los mecanismos desencadenantes de la apoptosis (Puca y cols., 2010).

En el último apartado de este objetivo decidimos abordar el estudio de las acciones antiangiogénicas de la melatonina en un ensayo de la membrana corioalantoidea como modelo *in vivo* de formación de nuevos vasos. Previamente, en nuestro laboratorio habíamos descrito que en este modelo la radiación, la melatonina y la combinación de ambas reducían el número de vasos sanguíneos formados en ausencia de células tumorales (González-González y cols., 2019b). Nuestros resultados indican que el número de vasos sanguíneos formados en este modelo varía sustancialmente en respuesta al tratamiento al que hayan sido sometidas las células MCF-7 implantadas en el embrión, de tal manera que el tratamiento conjunto con radiación y melatonina redujo de manera significativa el número de vasos sanguíneos.

Como conclusiones finales de esta primera parte del trabajo, podemos afirmar que los resultados obtenidos sugieren que la melatonina lleva a cabo una serie de efectos potenciadores sobre algunas de las acciones ejercidas por la radiación, a la vez que contrarresta alguno de los efectos no deseados de la misma. La hormona pineal parece potenciar los efectos apoptóticos de la radiación, regula las modificaciones en la actividad transcripcional que se producen en las células MCF-7 en respuesta a la radiación ionizante, modifica el estado de fosforilación de algunas quinasas y de p53 y parece potenciar el efecto antiangiogénico de la radiación lo que sugiere que la melatonina podría ser un agente a considerar como adyuvante a la radioterapia.

4.2 EFECTOS DE LA MELATONINA SOBRE LOS CAMBIOS INDUCIDOS POR DOCETAXEL EN CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA (MCF-7)

Como hemos dicho anteriormente en esta memoria, las acciones oncostáticas de la melatonina, especialmente en lo que hace referencia a tumores mamarios cuyo crecimiento es dependiente de estrógenos, han sido ampliamente descritas en la literatura científica. A lo largo de los últimos años, además, muchos artículos han puesto de manifiesto el efecto dual de esta molécula, ya que es capaz de intensificar la eficacia de los agentes comúnmente utilizados en quimioterapia a la par que ejerce un efecto protector sobre otros tejidos y órganos, atenuando los efectos secundarios de los agentes antineoplásicos. En esta parte del trabajo, nos hemos propuesto como primer objetivo estudiar si la melatonina es capaz de potenciar los efectos antiproliferativos y apoptóticos del docetaxel, un taxano comúnmente utilizado en el tratamiento del cáncer de mama. En segundo lugar, y ya que los mecanismos moleculares que se alteran en las células tumorales en respuesta al tratamiento con quimioterápicos son aún en gran medida desconocidos, nos pareció interesante estudiar el papel de la melatonina como regulador de los cambios en expresión génica inducidos por el docetaxel, tomando como modelo *in vitro* la línea celular MCF-7.

RESULTADOS

4.2.1 La melatonina potencia el efecto antiproliferativo del docetaxel en la línea celular MCF-7

El primero de los objetivos de esta parte del trabajo fue determinar si la melatonina, utilizada a concentraciones fisiológicas (1 nM), es capaz de potenciar el efecto antiproliferativo del docetaxel sobre las células MCF-7.

Como paso previo, se procedió a determinar el efecto de diferentes concentraciones de docetaxel sobre estas células. Como se puede observar en la **figura 4.2.1 A**, este taxano inhibió la proliferación de las células MCF-7 de una manera dependiente de la dosis. Para poder llevar a cabo nuestro estudio de combinación con melatonina *in vitro*, la concentración de docetaxel 1 μ M era demasiado alta, ya que el número de células metabólicamente activas tras tres días de incubación con el taxano fue tan sólo de un 23% con respecto al grupo control (sin tratar), indicando que la mayor parte de las células (casi

un 80%), estaban muertas tras ese tiempo. Estos resultados mostraron que las células MCF-7 son muy sensibles a concentraciones del quimioterápico equivalentes a las utilizadas en clínica. Por el contrario, el tratamiento con una dosis de 0,01 nM del taxano prácticamente no modificó el número de células viables con respecto al grupo control, indicando que a concentraciones tan pequeñas el docetaxel no tiene un efecto antiproliferativo importante sobre esta línea celular.

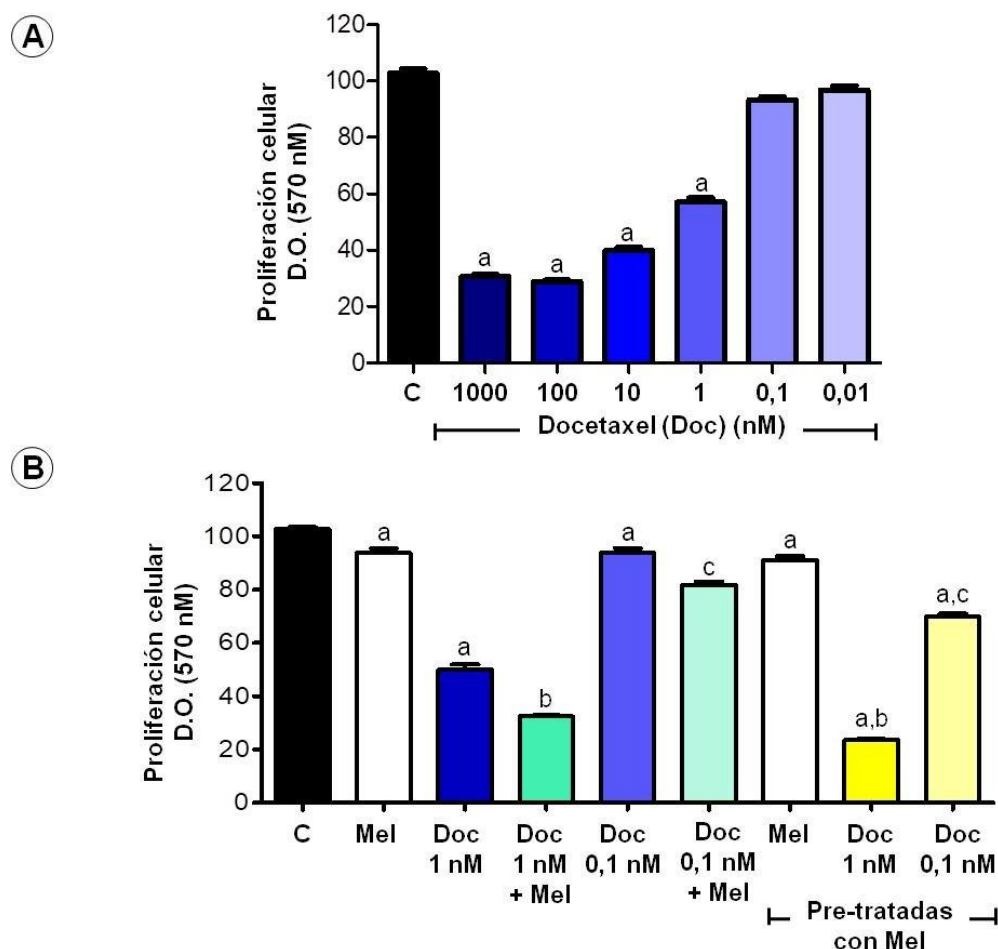


Figura 4.2.1: Efectos del docetaxel y la melatonina sobre la proliferación de células MCF-7. (A) Las células se cultivaron en medio DMEM con las concentraciones de docetaxel indicadas (desde 1 μ M hasta 1 pM) y la proliferación celular se midió a los tres días. (B) Las células se trataron con docetaxel (1 nM y 0,1 nM) y/o melatonina (1 nM) o fueron pretratadas durante 24 horas con melatonina (1 nM) previamente al docetaxel, y los tratamientos se mantuvieron durante seis días. En ambos casos la proliferación celular se evaluó mediante el método del MTT y los resultados se expresaron como el porcentaje de proliferación con respecto al grupo control (media $\pm$ SEM). a, $p < 0,001$ vs C; b, $p < 0,05$ vs Doc (1 nM); c, $p < 0,05$ vs Doc (0,1 nM). C: control. Mel: melatonina. Doc: docetaxel.

Por lo tanto, decidimos probar el efecto de concentraciones fisiológicas de melatonina combinadas con dos concentraciones intermedias -más bajas que las utilizadas en clínica- de docetaxel (1 nM y 0,1 nM). Los resultados obtenidos tras seis días de incubación con los diferentes tratamientos, se pueden observar en la **figura 4.2.1 B**.

Como ya se había descrito en trabajos previos de nuestro grupo, la melatonina por sí misma inhibió de manera significativa la proliferación de las células MCF-7. El docetaxel (0,1 nM) también presentó un leve pero significativo efecto inhibitor (8%), mientras que con la concentración de 1 nM el descenso en el número de células viables alcanzó un 44%. Cabe resaltar que el cotratamiento con docetaxel (a ambas concentraciones) y melatonina mostró una inhibición significativamente mayor que la desencadenada por el taxano por sí solo, lo que indica que la melatonina fue capaz de potenciar el efecto antiproliferativo de este agente.

Cuando las células MCF-7 se pretrataron con melatonina durante 24 horas como paso previo a la adición del docetaxel, se observó un descenso aún mayor en la viabilidad celular. Para el caso del docetaxel 1 nM, se pasó de un 44% a un 23% en el número de células viables, mientras que para la concentración de 0,1 nM se pasó de un 92% a un 73% cuando se pretrató con la hormona pineal.

4.2.2 La melatonina contribuye a la parada del ciclo celular inducida por el docetaxel en la línea celular MCF-7

Los efectos de la melatonina y el docetaxel por separado, así como los obtenidos al tratar las células con ambas moléculas simultáneamente, sobre la distribución de las células MCF-7 en las diferentes fases del ciclo celular se recogen en la **figura 4.2.2 A**, mientras que el porcentaje de células en cada una de las distintas fases subG₀-G₁, G₁, S y G₂-M se representan en la **figura 4.2.2 B**.

Como cabía esperar, el tratamiento de las células con concentraciones fisiológicas de melatonina (1 nM) durante 24 horas indujo un incremento en la proporción de células en fase G₁ (del 33% del control hasta un 49%), lo que refleja un retraso en la transición a la fase S. En consonancia con lo esperado, el tratamiento con docetaxel (1 nM) durante 24 horas resultó en un incremento en el porcentaje de células en la fase subG₀-G₁ (27%). Cuando las células se trataron con una combinación de ambos compuestos, el número de células en subG₀-G₁ alcanzó un 38%.

Es de reseñar que el hecho de pretratar las células con melatonina durante 24 horas antes de añadir el taxano incrementó aún más el porcentaje de células en esta fase, hasta un 42%. Este incremento de células en la fase subG₀-G₁ sugiere que la fragmentación del ADN podría ser una de las consecuencias de la muerte celular.

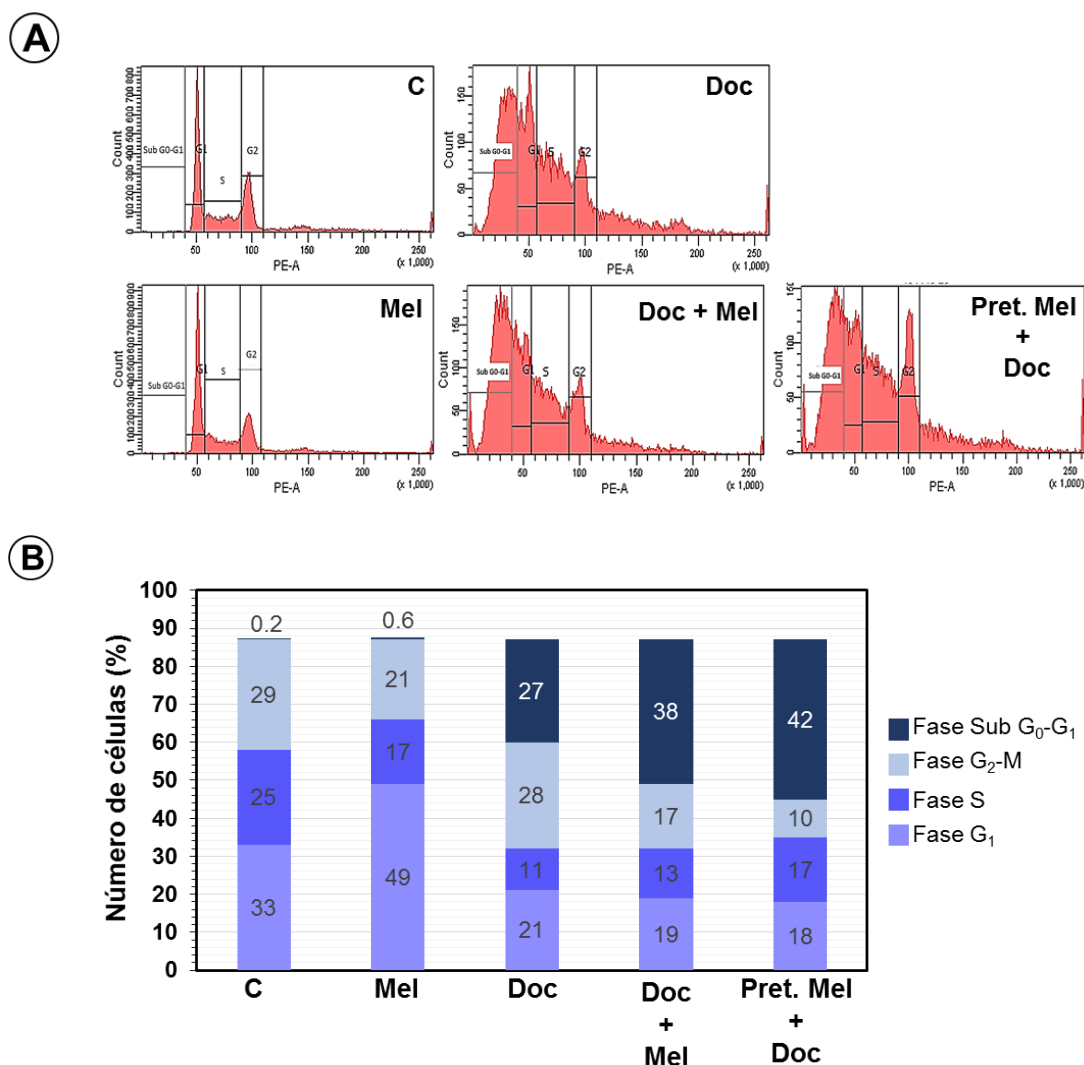


Figura 4.2.2: Efectos del tratamiento con docetaxel y/o melatonina sobre el ciclo celular de MCF-7. Las células MCF-7 fueron incubadas en medio DMEM con melatonina (1 nM) y/o docetaxel (1 nM), o bien pretratadas con la indolamina durante 24 horas antes del docetaxel. Se realizó tinción con ioduro de propidio y se analizó el ciclo celular por citometría de flujo. **(A)** Los histogramas muestran la distribución de células en cada fase. **(B)** Cuantificación del número de células presentes en cada fase del ciclo. C: control. Mel: melatonina. Doc: docetaxel. Pret. Mel: pretratadas con melatonina.

4.2.3 Efecto del docetaxel y la melatonina sobre la expresión de genes implicados en apoptosis

El siguiente paso consistió en determinar si los resultados obtenidos en el análisis por citometría de flujo se veían de alguna manera reflejados en la expresión de diversos genes implicados en vías de apoptosis. Por lo tanto, se procedió a determinar los niveles de expresión de los genes proapoptóticos *BAD* y *BAX2*, y del gen antiapoptótico *BCL-2*.

En la **figura 4.2.3** se puede observar como el tratamiento con docetaxel administrado a una concentración baja (1 nM) indujo un aumento en la expresión de *BAD* y *BAX2*, así como una disminución de los niveles de *BCL-2*. En aquellas células tratadas simultáneamente con docetaxel y melatonina, se pudo observar que la hormona pineal intensificó el efecto estimulador del docetaxel en la expresión de *BAD* y el efecto inhibidor del taxano sobre la expresión de *BCL-2*, en ambos casos de manera significativa; sin embargo, no pudo demostrarse un efecto estimulador sobre la expresión de *BAX2*. La melatonina administrada a dosis fisiológicas y en ausencia de docetaxel, indujo una disminución modesta pero significativa en los niveles de *BCL-2*.

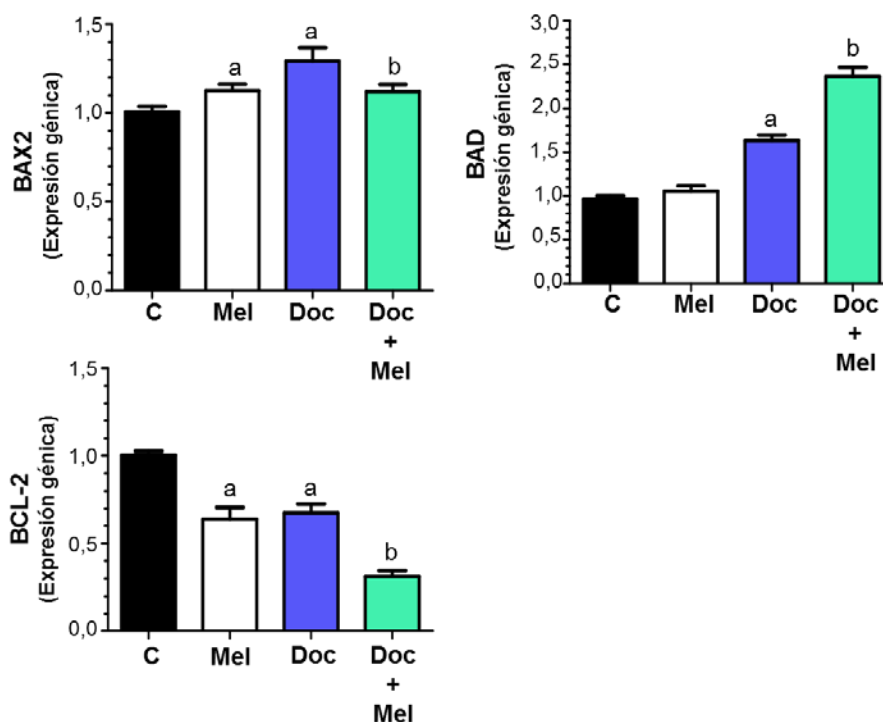


Figura 4.2.3: Efectos del docetaxel y la melatonina sobre la transcripción de genes relacionados con apoptosis (*BAX2*, *BAD* y *BCL-2*). Las células MCF-7 fueron incubadas con docetaxel (1 nM) y/o melatonina (1 nM) durante seis horas y la expresión génica se analizó por RT-PCR. Los resultados se expresaron como el cambio relativo de la expresión con respecto al grupo control (media $\pm$ SEM). a, $p < 0,001$ vs C; b, $p < 0,001$ vs Doc. C: control. Mel: melatonina. Doc: docetaxel.

4.2.4 La melatonina aumenta los efectos proapoptóticos del docetaxel en la línea celular MCF-7

Para comprobar si los efectos antiproliferativos y los cambios en la distribución de las células en las diversas fases del ciclo celular descritas en los apartados anteriores estaban relacionadas con la inducción de apoptosis, se procedió a tratar las células MCF-7 con una concentración baja de docetaxel (1 nM), solo o en combinación con melatonina durante 24 horas, y a continuación se usó el kit de detección de apoptosis *Annexin V-FITC* que permite discriminar entre células viables y aquellas células que se encuentren en procesos de apoptosis o de necrosis. Los resultados del ensayo de Anexina V se muestran en la **figura 4.2.4 A** y la cuantificación de los resultados obtenidos se ha representado en la **figura 4.2.4 B**. En la representación gráfica se puede observar que el tratamiento con melatonina indujo un pequeño descenso en el número de células viables en comparación con el grupo control. Del mismo modo, el tratamiento con el agente quimioterápico (docetaxel 1 nM) se tradujo en un descenso en el número de células viables paralelo a un incremento significativo en el número de células que se encontraban en apoptosis temprana. Cabe resaltar que el tratamiento simultáneo con ambos compuestos provocó una mayor disminución en el porcentaje de células viables, acompañada de un aumento en el número de células en proceso de apoptosis temprana, lo que sugiere que la melatonina potencia el efecto inductor del docetaxel sobre la apoptosis. También se ha podido observar como el pretratamiento con melatonina durante 24 horas, como paso previo a los tratamientos con docetaxel, resultó en un incremento aún mayor del porcentaje de células en apoptosis temprana.

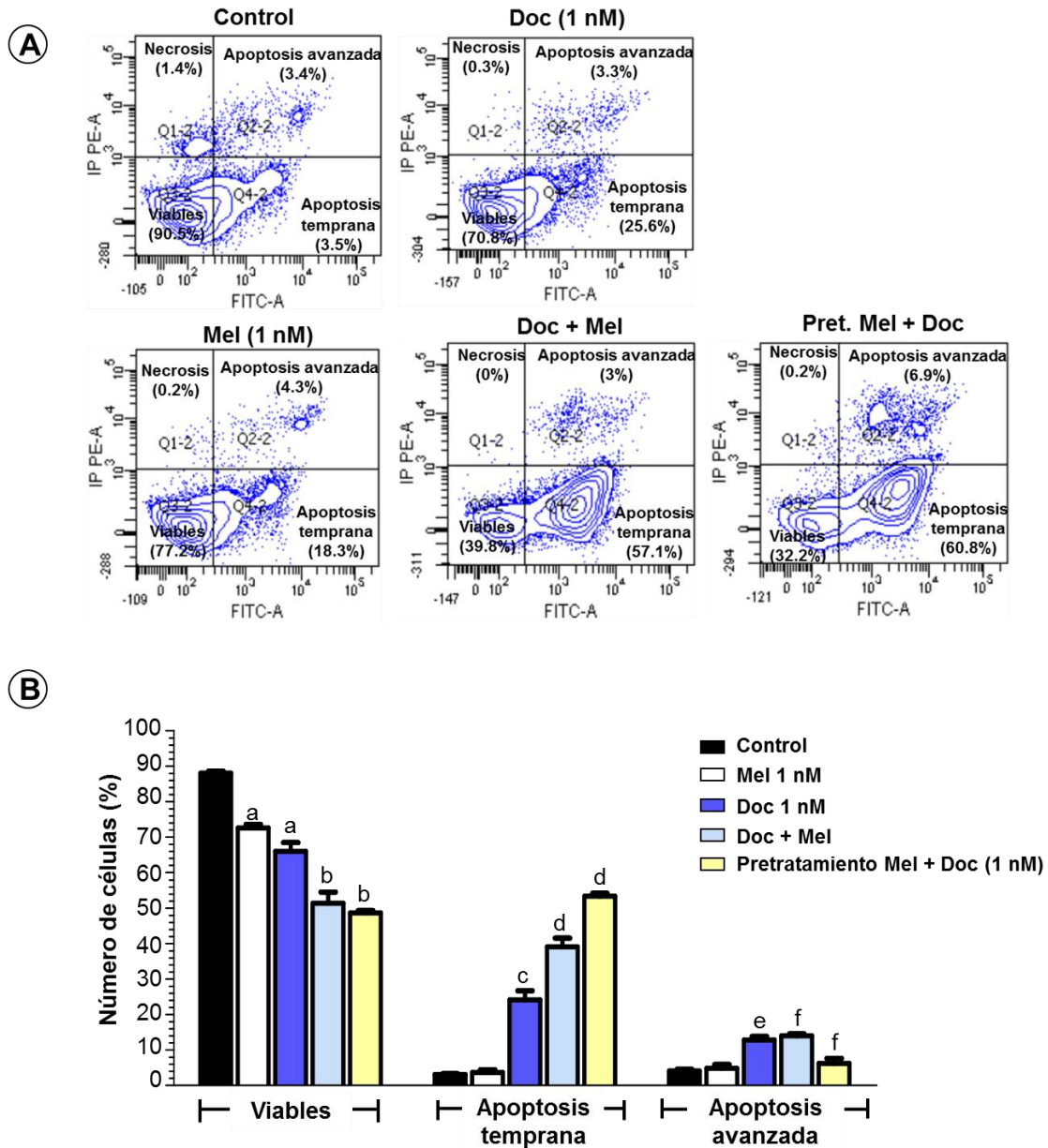


Figura 4.2.4: Efecto del tratamiento con melatonina y/o docetaxel sobre la apoptosis en células MCF-7. Las células MCF-7 fueron tratadas con docetaxel (1 nM) y/o melatonina (1 nM) o pretratadas con la indolamina. Tras 24 horas de tratamientos, la apoptosis fue evaluada por citometría de flujo usando como marcadores AnexinaV-FITC e Ioduro de Propidio (IP). **(A)** Las nubes de punto muestran el porcentaje de células viables, células en apoptosis temprana, células en apoptosis avanzada y células en necrosis. **(B)** Cuantificación del número de células de cada población. Los datos son representativos de tres experimentos independientes y están expresados en porcentaje de células en cada fase. a, $p < 0,001$ vs C (células viables); b, $p < 0,001$ vs Doc (células viables); c, $p < 0,001$ vs C (células en apoptosis temprana); d, $p < 0,001$ vs Doc (células en apoptosis temprana); e, $p < 0,05$ vs C (células en apoptosis avanzada); f, $p < 0,05$ vs Doc (células en apoptosis avanzada). Mel: melatonina; Doc: docetaxel. Pret. Mel: pretratadas con melatonina.

4.2.5 Efectos de la melatonina sobre los cambios inducidos por el docetaxel en la expresión génica en células MCF-7

Las modificaciones que se producen en la expresión génica en respuesta a agentes quimioterapéuticos utilizados a dosis clínicas están empezando a caracterizarse, pero aún distan mucho de ser totalmente conocidas. Por esta razón, el siguiente paso que se abordó en este estudio fue la utilización del *RT² Profiler PCR Array* para determinar los cambios inducidos por una concentración de docetaxel (1 μ M) comparable a las administradas normalmente en los protocolos diseñados para pacientes con cáncer de mama y comprobar si la adición de melatonina 1 nM podía modificar los cambios inducidos por el taxano de manera potencialmente beneficiosa.

Como ya hemos mencionado en el apartado de resultados dedicado a la radiación, el *array* empleado permite el análisis simultáneo de 84 genes para los cuales se ha demostrado, en múltiples estudios previos, que su regulación se ve alterada durante el desarrollo de los tumores mamarios. Estos genes incluidos en el *array* pueden clasificarse en diferentes grupos como son: genes implicados en la angiogénesis, la adhesión celular, capacidad proteolítica, progresión del ciclo celular o apoptosis. Esta clasificación se establece por tanto atendiendo a la función que desempeñan las proteínas codificadas, a la vía (o vías) de señalización implicada(s) o al estadio de la enfermedad. Evidentemente, debido a la dinámica interrelación de los diferentes procesos moleculares y celulares, algunos genes pueden encajar en uno o varios grupos diferentes.

Como se muestra en la **figura 4.2.5**, estableciendo como criterio un cambio de al menos 1,5 veces, encontramos que el tratamiento con docetaxel reguló al alza la expresión de 8 genes e inhibió la expresión de 36. Cuando el docetaxel fue usado en combinación con la melatonina, observamos que 15 genes aumentaron su expresión y 29 la redujeron.

Cabe destacar que en las células MCF-7 tratadas solamente con melatonina (1 nM), la expresión de varios de estos genes se ve modificada. Así, por ejemplo, el gen *TP53* (que codifica para p53), el inhibidor de la quinasa dependiente de ciclina *CDKN1A* (que codifica para p21), el gen *CDH13* (cadherina 13), o el receptor de progesterona (*PGR*) vieron su actividad transcripcional aumentada en respuesta a la hormona pineal, mientras que otros genes como *c-MYC*, el gen *IL-6* (interleucina 6) o el gen *BCL-2* vieron su expresión disminuida.

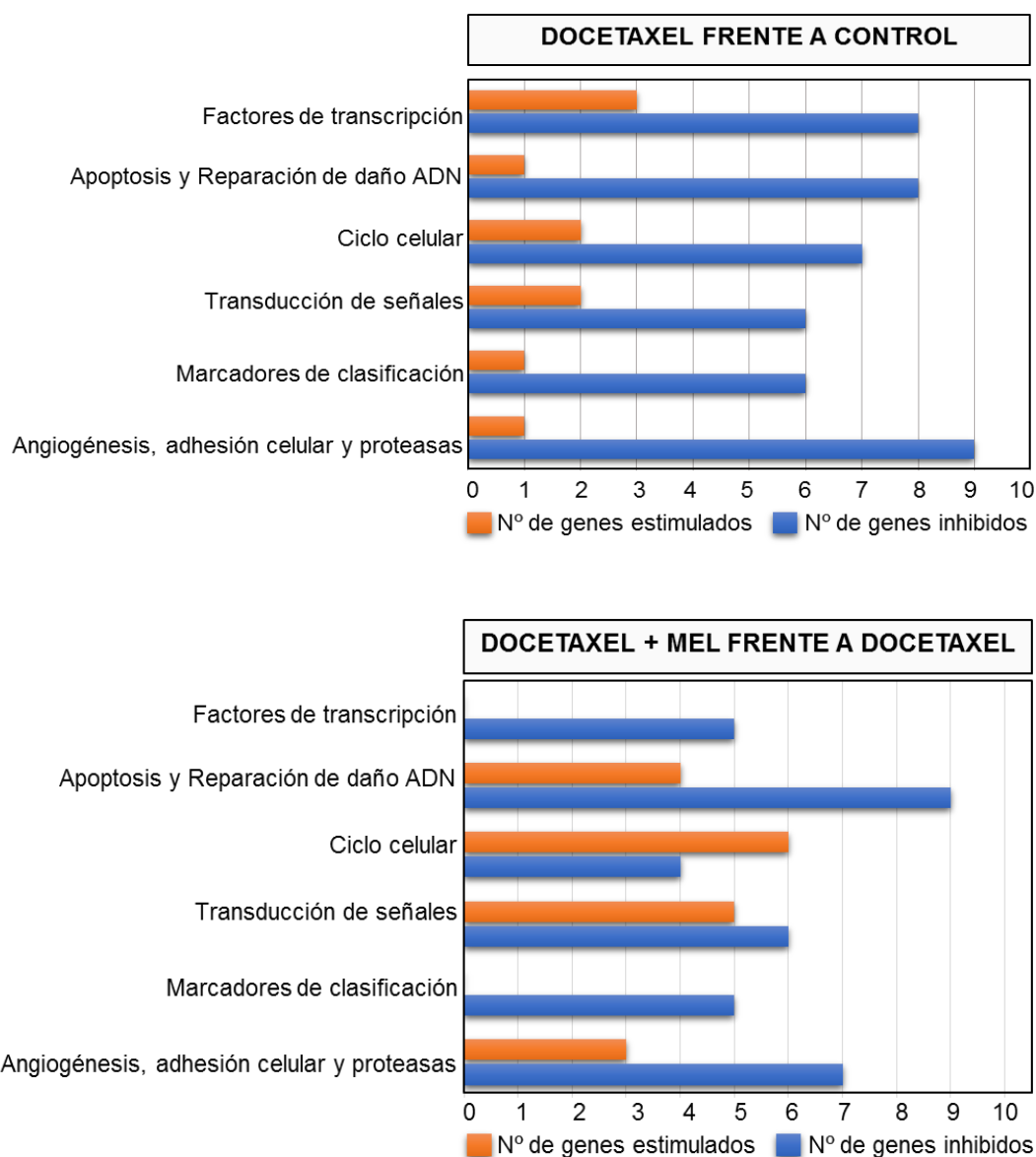


Figura 4.2.5: Genes estimulados o inhibidos en las células MCF-7 tratadas con docetaxel y melatonina. El panel de arriba compara el número de genes estimulados o inhibidos (al menos 1,5 veces) de cada categoría en células MCF-7 tratadas con docetaxel (1 μ M) durante seis horas frente a células control. El panel de abajo representa los cambios (al menos 1,5 veces) en células tratadas con melatonina (1 nM) y docetaxel frente a las incubadas solo con el taxano. En ambos casos el perfil de expresión génica se analizó utilizando el ensayo de *RT²-PCR Profiler* de cáncer de mama humano.

A continuación, procedimos a analizar de manera específica la expresión de algunos de los genes más representativos de cada uno de los grupos cuya expresión se vio modificada por alguno de los tratamientos. Con respecto a los cambios en la expresión de los genes implicados en apoptosis o que participan en el control del ciclo celular, los resultados se recogen en la **figura 4.2.6**. Los datos del *array* habían indicado que *TP53*, *BAD* y *CDKN1A* aumentaron al menos tres veces su expresión mientras que *BCL-2* la vio reducida también tres veces. Por lo tanto, estos genes fueron seleccionados para su estudio mediante RT-PCR específicas: *TP53* y *CDKN1A* como reguladores del ciclo celular, y

BAD y *BCL-2* como genes involucrados en apoptosis. Para completar el estudio, decidimos incluir además la expresión de *BAX2*, (al igual que habíamos hecho previamente a bajas concentraciones del taxano). Curiosamente, el docetaxel 1 μ M inhibe de manera significativa la expresión de *TP53* y *CDKN1A*, y el cotratamiento con melatonina 1 nM contrarrestó ese efecto. La expresión de los dos genes proapoptóticos *BAD* y *BAX2* fue estimulada por el docetaxel y en ambos casos, la presencia de la melatonina aumentó aún más sus niveles. En cuanto a la expresión del gen antiapoptótico *BCL-2* fue significativamente reducida con docetaxel y aún más con el cotratamiento con melatonina y docetaxel.

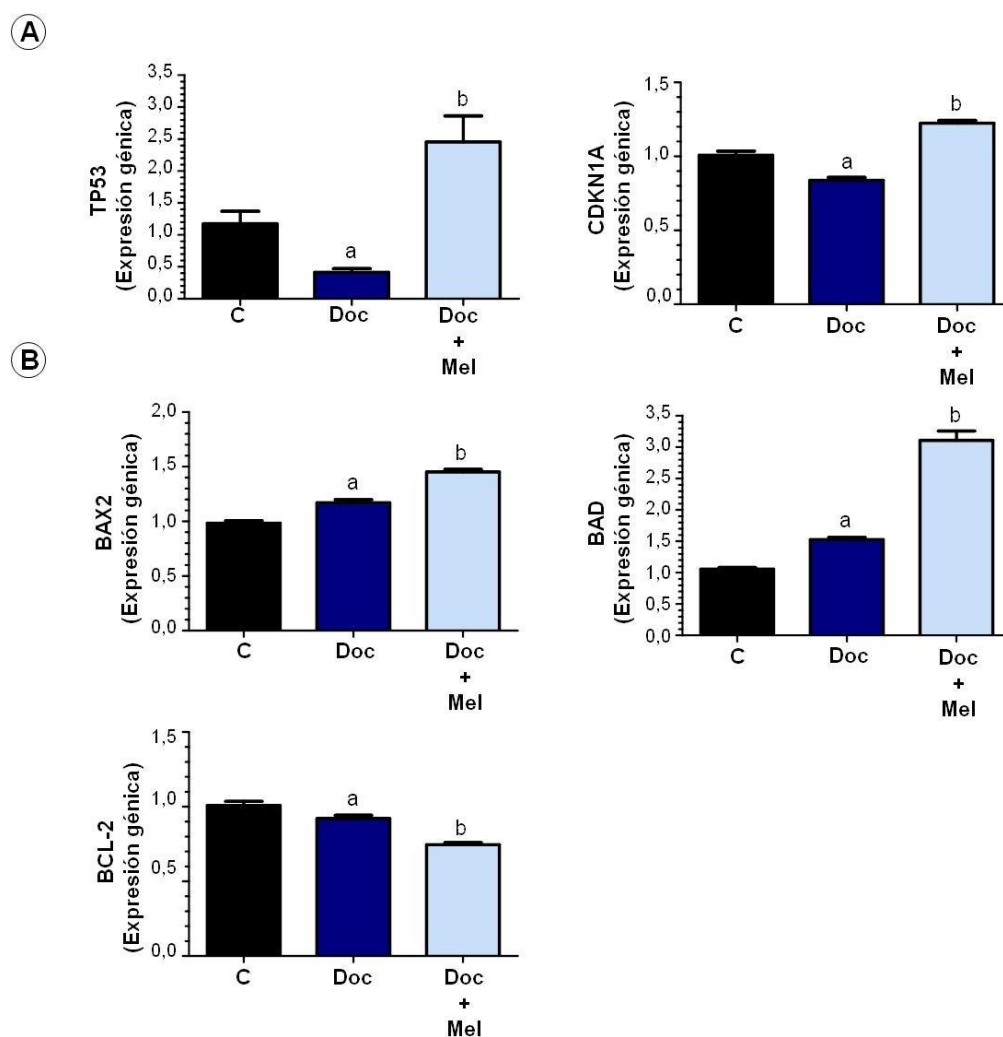


Figura 4.2.6: Cambios en la regulación de genes involucrados en la apoptosis y el ciclo celular en células MCF-7 tratadas con melatonina y docetaxel. (A) Análisis por RT-PCR de la expresión génica de *TP53* y *CDKN1A* en células MCF-7 tratadas durante seis horas con docetaxel (1 μ M) y/o melatonina (1 nM). (B) Análisis por RT-PCR de los genes relacionados con la apoptosis *BAX2*, *BAD* y *BCL-2*. Todos los datos están expresados como el cambio relativo a las células control, a partir de al menos tres experimentos independientes (media $\pm$ SEM). a, $p < 0,01$ vs C; b, $p < 0,01$ vs Doc. C: control. Doc: docetaxel. Mel: melatonina.

Entre los genes clasificados como factores de transcripción o involucrados en angiogénesis y/o adhesión celular, los datos del *array* indicaron que *MUC1*, *GATA3* y *c-MYC* fueron inhibidos (más de tres veces) mientras que *CDH13* fue estimulado (más de cuatro veces) cuando las células fueron tratadas simultáneamente con melatonina y docetaxel en comparación con las células tratadas únicamente con el taxano. En la **figura 4.2.7** se muestran los resultados obtenidos de las RT-PCR específicas llevadas a cabo. Los datos confirmaron que el docetaxel estimuló la expresión de los factores de transcripción *MUC1*, *GATA3* y *c-MYC*, mientras que la melatonina 1 nM contrarrestó ese efecto, hasta alcanzar valores prácticamente similares a los del grupo control. Con respecto a la expresión de *CDH13*, ésta fue inhibida por docetaxel mientras que la adición de melatonina revirtió ese efecto por completo.

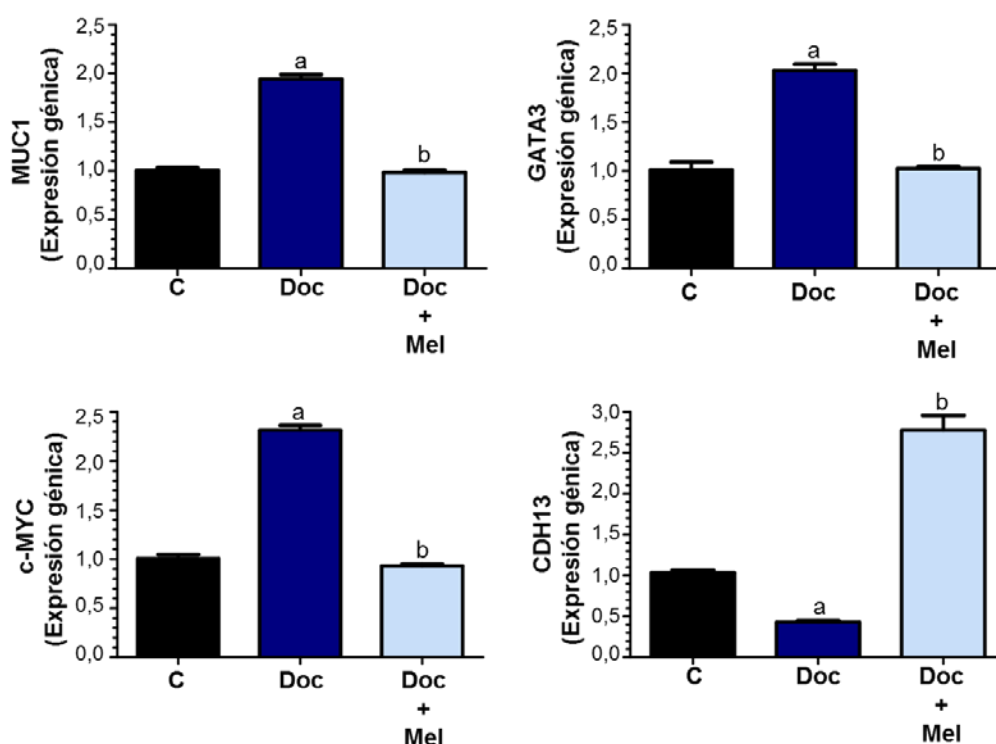


Figura 4.2.7: Comparación de los cambios en la regulación de los genes que codifican para factores de transcripción. Análisis RT-PCR de los niveles de expresión génica de los factores de transcripción *MUC1*, *GATA3*, *c-MYC* y de la molécula de adhesión celular *CDH13* en células MCF-7 tratadas durante seis horas con docetaxel (1 μ M) y melatonina (1 nM). Todos los datos están expresados como cambios relativos a las células control a partir de al menos tres experimentos independientes (media $\pm$ SEM). a, $p < 0,001$ vs C; b, $p < 0,001$ vs Doc. C: control. Doc: docetaxel. Mel: melatonina.

Por último, decidimos analizar los niveles de expresión de *TWIST1* (proteína 1 relacionada con la torsión). El resultado del *array* indicó que el docetaxel inhibía su expresión a la mitad, y que el tratamiento conjunto con docetaxel y melatonina incrementaba este efecto inhibitor hasta prácticamente tres veces. En la **figura 4.2.8** se representan los datos obtenidos con respecto a la expresión de *TWIST1* y del miR-10b, (microARN regulado directamente por Twist1). Como se puede observar, el docetaxel inhibió la expresión de *TWIST1* y estimuló la expresión del miR-10b. En cambio, la melatonina, sola o combinada con docetaxel inhibió los niveles de expresión de *TWIST1* y de su diana miR-10b.

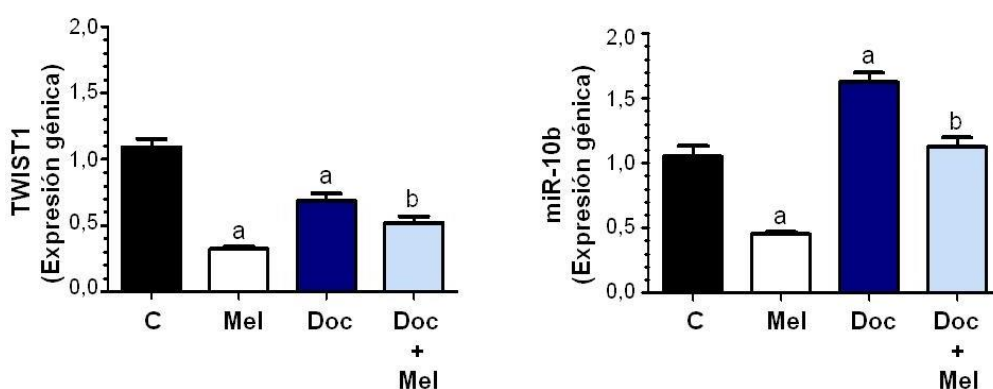


Figura 4.2.8: Cambios en la expresión del factor de transcripción *TWIST1* y de su diana el microARN miR-10b. Las células MCF-7 fueron tratadas durante seis horas con docetaxel (1 μ M) y/o melatonina (1 nM) y se analizó la expresión por RT-PCR. Todos los datos están expresados como cambios relativos a las células control a partir de al menos tres experimentos independientes (media $\pm$ SEM). a, $p < 0,001$ vs C; b, $p < 0,001$ vs Doc. C: control. Doc: docetaxel. Mel: melatonina.

4.2.6 Efectos de la melatonina y el docetaxel sobre el desarrollo de tumores mamarios en un modelo animal de xenógrafos con células MCF-7

Los resultados de los experimentos *in vitro* recopilados hasta ahora en este capítulo sugieren que la melatonina podría ejercer como agente sensibilizador a los efectos antitumorales del docetaxel actuando a diversos niveles: potenciando la muerte de las células MCF-7, inhibiendo su proliferación o modulando los numerosos cambios que el taxano induce en las diversas vías de señalización intracelular.

Por todo ello, en la última parte de este objetivo decidimos estudiar los posibles efectos del tratamiento con docetaxel y/o melatonina en un modelo *in vivo* de tumores mamarios desarrollados en ratones atímicos xenotransplantados con células MCF-7 de manera ortotópica en ambos flancos inguinales. Cuando los tumores alcanzaron un volumen

determinado (100 mm^3), los animales fueron asignados a cada uno de los grupos experimentales objeto de estudio: Control (C); Docetaxel (Doc), 15 mg/kg inyección i.p. una vez a la semana; Melatonina (Mel), administrada de forma continua en el agua de bebida a una concentración de 25 mg/l; y Docetaxel + Melatonina. Los animales control recibieron inyecciones intraperitoneales de solución salina y agua de bebida con 0,01% etanol (diluyente de la melatonina).

Como se puede observar en la **figura 4.2.9**, el peso corporal medio de los animales de cada grupo al comienzo del experimento estaba en torno a los 29 gramos. Tras seis semanas de tratamiento, el peso corporal de los animales tratados con docetaxel y melatonina fue significativamente menor con respecto a los animales del grupo control. No obstante, no se modificó el peso de los animales tratados con docetaxel y melatonina con respecto a los tratados solamente con docetaxel. El índice de supervivencia en todos los grupos experimentales fue del 100%.

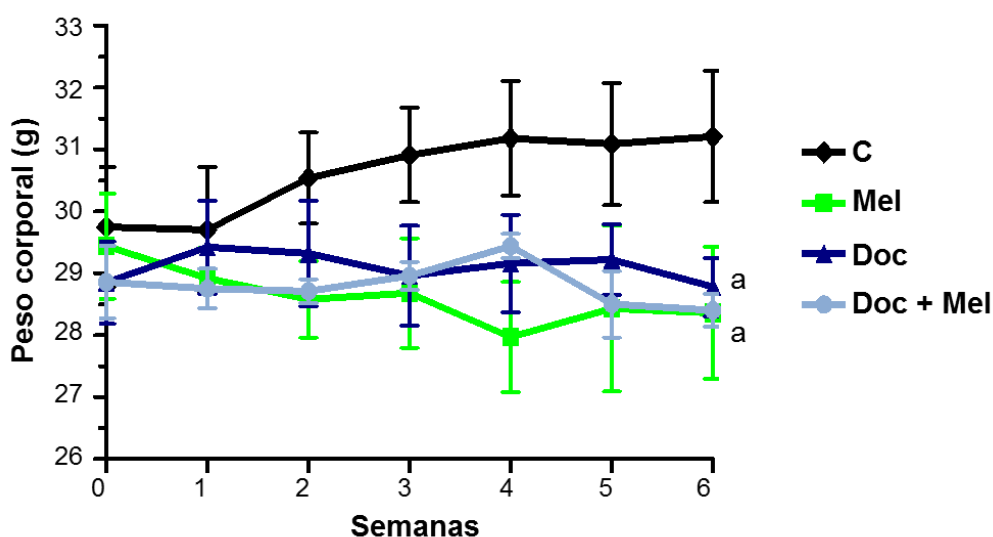


Figura 4.2.9: Efectos del tratamiento con docetaxel y/o melatonina sobre el peso corporal en hembras de ratón atímico NMRI-Foxn1 nu/nu durante seis semanas (n=6). Los datos se muestran como la media $\pm$ SEM. a, $p < 0,05$ vs peso medio del grupo control en la sexta semana. C: control. Doc: docetaxel. Mel: melatonina.

Para valorar el efecto del tratamiento con melatonina y/o docetaxel sobre el crecimiento tumoral, se realizaron medidas del tamaño de los tumores al menos dos veces por semana durante el tiempo que duró el experimento. El volumen tumoral en todos los casos se calculó mediante la fórmula $(\text{diámetro mayor (D)} \times \text{diámetro menor (d)}^2) / 2$. Los resultados obtenidos se muestran en la **figura 4.2.10**.

Tal y como se esperaba, el volumen tumoral medio en los animales control fue en aumento (desde los $178,2 \pm 18,7 \text{ mm}^3$ iniciales hasta un volumen de $607,5 \pm 27,1 \text{ mm}^3$ al final del experimento).

El tratamiento con melatonina en el agua de bebida ralentizó el crecimiento del tumor de manera significativa con respecto a los animales del grupo control, ya que el volumen pasó de ser $175,3 \pm 18,4 \text{ mm}^3$ al inicio del experimento a $161,5 \pm 13,5 \text{ mm}^3$ al final del mismo.

Por su parte, el tratamiento con docetaxel también ejerció un efecto inhibitor sobre el volumen tumoral, de una manera similar a como lo hizo la melatonina (volumen tumoral $176,1 \pm 12,8 \text{ mm}^3$ en la semana 0 y $196,3 \pm 13,8 \text{ mm}^3$ en la semana 6).

Por último, el volumen tumoral de aquellos animales que recibieron tratamiento con docetaxel y melatonina de manera conjunta fue ligeramente inferior (aunque las diferencias fueron significativas) al volumen tumoral de los ratones tratados con cada uno de los compuestos por separado a lo largo de todo el experimento, ($162,4 \pm 16,1 \text{ mm}^3$ en la semana 0 y $85,9 \pm 7,1 \text{ mm}^3$ en la semana 6).

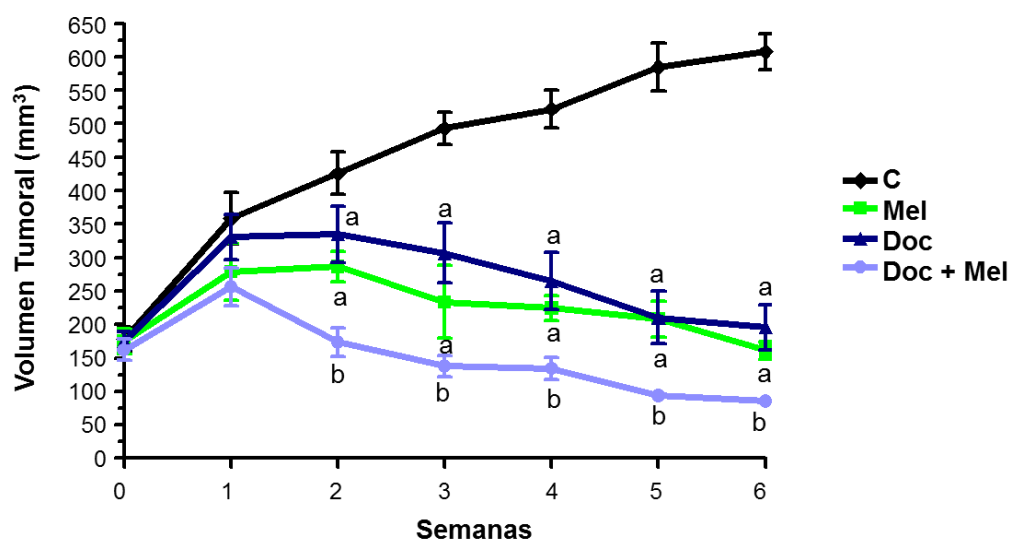


Figura 4.2.10: Efectos de la exposición a docetaxel y/o melatonina sobre el volumen tumoral en hembras de ratón NMRI-Foxn1 nu/nu' durante seis semanas (n=6). Los datos se muestran como la media $\pm$ SEM. a, $p < 0,05$ vs C; b, $p < 0,05$ vs Doc. C: control; Doc: docetaxel. Mel: melatonina.

Tras las seis semanas que duraron los tratamientos, los animales fueron sacrificados y se procedió a la extracción de los tumores para realizar estudios de los cambios en la expresión génica. Los genes que se seleccionaron para dicho estudio fueron algunos de los que ya habíamos estudiado previamente: *AKT1*, *TP53*, *CDKN1A*, *TWIST1*, *BAX2*, *BAD*, así como *ERK1/ERK2* y *VEGF1A*, factores que están implicados en la angiogénesis tumoral. En todos los casos los resultados muestran las medias normalizadas de al menos tres tumores de cada grupo experimental.

Los resultados correspondientes a *AKT1*, *TP53* y *CDKN1A* están representados en la **figura 4.2.11**. Con respecto al gen que codifica para la proteína Akt1, implicada en supervivencia e invasión, vio su expresión significativamente inhibida en aquellos tumores procedentes de ratones que habían sido tratados bien con melatonina, bien con docetaxel. Además, en aquellos tumores procedentes de animales que habían recibido ambos compuestos de manera simultánea, la melatonina potenció el efecto inhibitor del docetaxel de manera significativa. Este resultado concuerda con los datos obtenidos en modelos *in vitro*, lo que estaría indicando que la melatonina podría actuar de alguna manera inhibiendo vías de supervivencia e invasión mediadas por Akt1.

La proteína para la que codifica el gen *CDKN1A* (p21) es un supresor tumoral que interacciona con p53 y participa en vías de senescencia y apoptosis. En este caso, la administración de docetaxel y melatonina a los ratones resultó en un aumento significativo de la expresión de este gen en los tumores analizados. Asimismo, cuando se administraron de manera conjunta, la indolamina fue capaz de estimular de manera significativa el efecto del docetaxel. Sin embargo, en el modelo de xenotransplantes *in vivo* no ha sido posible reproducir los efectos estimuladores de la melatonina y/o del docetaxel sobre la expresión génica de *TP53*, obteniéndose una inhibición significativa en todos los grupos experimentales estudiados.

Otro de los genes que fueron analizados mediante RT-PCR fue el que codifica para la proteína Twist1, un factor de transcripción involucrado en el desarrollo embrionario y silenciado con posterioridad. La expresión de *TWIST1* se reprograma en el cáncer y se correlaciona con un mal pronóstico. Además, es uno de los genes implicados en la transición epitelio-mesénquima (EMT). En este caso, el docetaxel estimuló la expresión de *TWIST1* mientras que la melatonina contrarrestó parcialmente este efecto (**figura 4.2.12**).

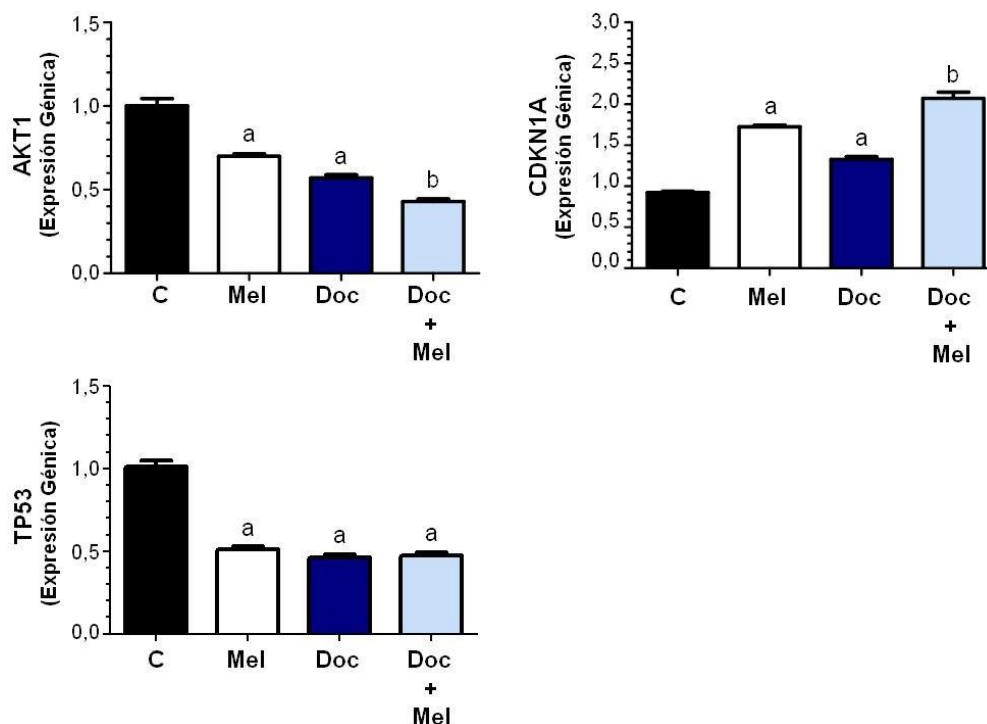


Figura 4.2.11: Cambios en la expresión génica de *AKT1*, *TP53* y *CDKN1A* en tumores mamarios inducidos en ratones atímicos a partir de células MCF-7. Los resultados se muestran como la media $\pm$ SEM del análisis de al menos tres tumores de cada grupo experimental, habiéndose realizado las RT-PCR por duplicado. Todos los datos están expresados como cambios relativos con respecto al grupo de animales control. a, $p < 0,001$ vs C; b, $p < 0,01$ vs Doc. C: tumores de animales control. Doc: tumores de animales tratados con docetaxel. Mel: tumores de animales tratados con melatonina.

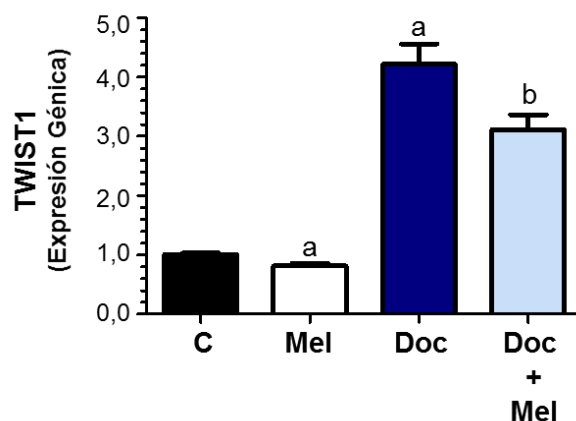


Figura 4.2.12: Cambios en la expresión génica de *TWIST1* en tumores mamarios obtenidos en ratones atímicos a partir de células MCF-7. Los resultados se muestran como la media $\pm$ SEM del análisis de al menos tres tumores de cada grupo experimental, habiéndose realizado las RT-PCR por duplicado. Todos los datos están expresados como cambios relativos con respecto al grupo de animales control. a, $p < 0,05$ vs C; b, $p < 0,001$ vs Doc. C: tumores de animales control. Doc: tumores de animales tratados con docetaxel. Mel: tumores de animales tratados con melatonina.

Parte de las acciones antitumorales de la melatonina están mediadas por la inducción de la apoptosis, como se ha descrito en los estudios *in vitro* recogidos en la primera parte de este capítulo, donde se ha demostrado que la melatonina potencia el efecto proapoptótico del docetaxel. Por esta razón decidimos valorar si estos efectos eran reproducibles en el modelo de xenotransplantes. Más concretamente se valoró la expresión de dos de los genes que codifican para proteínas proapoptóticas como son *BAX2* y *BAD*. En la **figura 4.2.13** se puede observar cómo en ambos casos, la administración de melatonina a los ratones potenció su expresión en los tumores mamarios, tanto cuando se administró sola como en combinación con el docetaxel. El efecto estimulador sobre la transcripción de *BAX2* y *BAD* fue aún más evidente cuando ambos compuestos se administraron de manera simultánea.

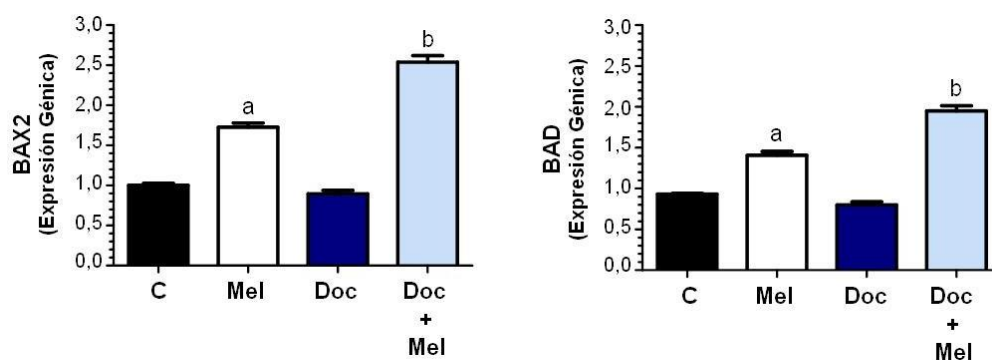


Figura 4.2.13: Cambios en la expresión génica de *BAX2* y *BAD* en tumores mamarios obtenidos en ratones atímicos a partir de células MCF-7. Los resultados se muestran como la media $\pm$ SEM del análisis de al menos tres tumores de cada grupo experimental, habiéndose realizado las RT-PCR por duplicado. Todos los datos están expresados como cambios relativos con respecto al grupo de animales control. a, $p < 0,001$ vs C; b, $p < 0,001$ vs Doc. C: tumores de animales control. Doc: tumores de animales tratados con docetaxel. Mel: tumores de animales tratados con melatonina.

Por último, decidimos explorar la expresión de alguno de los genes implicados en vías de angiogénesis. En la **figura 4.2.14** se muestran los resultados obtenidos cuando estudiamos la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular (*VEGFA*), un factor proangiogénico, y los genes que codifican para *ERK1/ERK2*, dos proteínas que forman parte de la vía Ras/Raf/MEK/ERK, y que están implicadas en el proceso angiogénico, así como en la supervivencia de la célula endotelial.

En el caso de la expresión génica de *ERK1* y *ERK2*, tanto la melatonina como el docetaxel inhibieron la expresión de ambos genes, obteniéndose una inhibición significativa adicional en aquellos tumores procedentes de ratones que habían recibido el cotratamiento de melatonina y el agente de quimioterapia.

En el caso del factor de crecimiento endotelial vascular (*VEGFA*), su expresión se vio inhibida tanto por el tratamiento con melatonina como con docetaxel. El tratamiento conjunto con ambos compuestos resultó en una inhibición de la expresión más acusada que la obtenida con cada uno de los compuestos de manera individual.

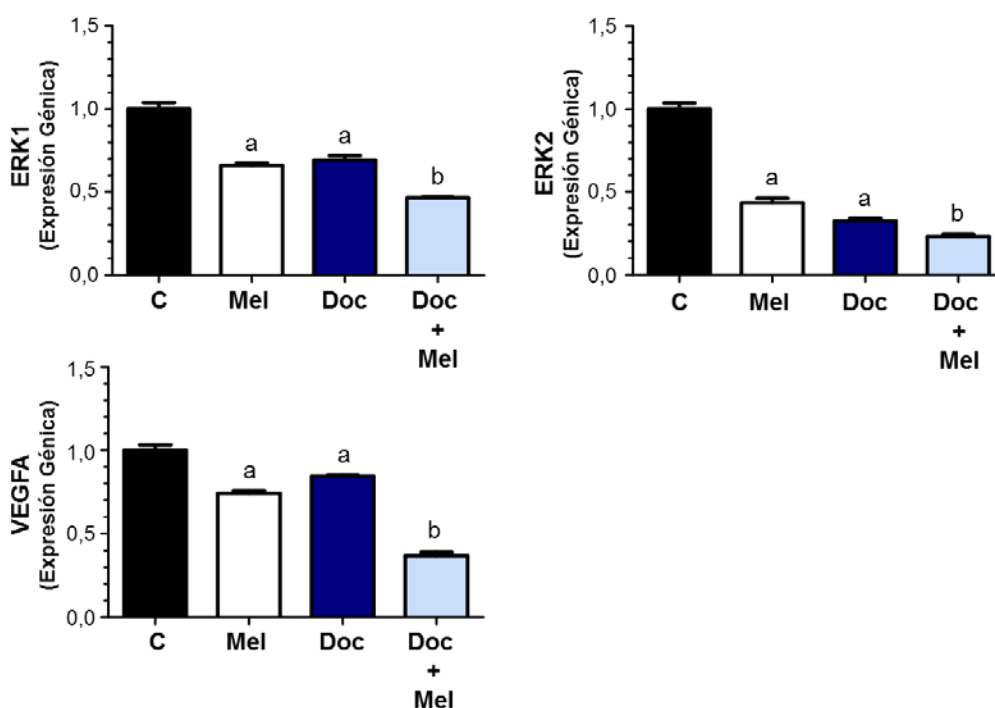


Figura 4.2.14: Cambios en la expresión de genes relacionados con vías angiogénicas (*ERK1/ERK2* y *VEGFA*) en tumores mamarios obtenidos en ratones atímicos a partir de células MCF-7. Los resultados se muestran como la media $\pm$ SEM del análisis de al menos tres tumores de cada grupo experimental, habiéndose realizado las RT-PCR por duplicado. Todos los datos están expresados como cambios relativos con respecto al grupo de animales control a, $p < 0,05$ vs C; b, $p < 0,05$ vs Doc. C: tumores de animales control. Doc: tumores de animales tratados con docetaxel. Mel: tumores de animales tratados con melatonina.

DISCUSIÓN

En pacientes diagnosticadas con cáncer de mama localmente avanzado y caracterizados como receptor de estrógenos positivos, la quimioterapia se recomienda habitualmente cuando el tumor ha diseminado al área axilar que rodea el pecho. Algunos de los protocolos de quimioterapia indicados para el cáncer de mama metastásico incluyen al docetaxel, un inhibidor de la mitosis que actúa interfiriendo con el huso mitótico (Iwao-Koizumi y cols., 2005). Es bien conocido que los agentes comúnmente utilizados en quimioterapia presentan una serie de problemas, como los efectos secundarios no deseados. De esta manera, las pacientes con cáncer de mama tratadas con docetaxel presentan una serie de efectos adversos negativos como pérdida de apetito, náuseas, mialgia, edema periférico y como efecto más frecuentemente observado, la neuropatía periférica (Prieto-Callejero y cols., 2020).

Por otra parte, los cambios moleculares inducidos por la quimioterapia en las células tumorales están comenzando a ser caracterizados. Así, por ejemplo, se están empleando modelos de xenoinjertos para tratar de establecer correlaciones entre la metilación diferencial entre muestras obtenidas de tumores sensibles o resistentes al docetaxel y la expresión diferencial de numerosos genes (Gómez-Miragaya y cols., 2019). Sin embargo, los cambios producidos en la expresión génica en respuesta a los diferentes tratamientos de quimioterapia distan aún de ser bien conocidos. La identificación de tales alteraciones contribuirá con toda seguridad a una mejora en la eficacia y podría ayudar a dilucidar los mecanismos responsables de procesos no deseados, como la resistencia a los fármacos. Recientemente se han obtenido perfiles de expresión génica y modificaciones postraduccionales en todos los tipos de tumores y líneas celulares de cáncer tratadas con agentes de quimioterapia (Lumachi y cols., 2015; Martínez-Campa y cols., 2017).

Tanto en modelos *in vitro* (líneas celulares) como *in vivo*, se ha demostrado que la melatonina lleva a cabo acciones oncostáticas en el cáncer de mama hormonodependiente, contrarrestando la activación mediada por estrógenos y modulando la expresión y la actividad de las enzimas involucradas en la síntesis de los mismos (Kiefer y cols., 2002; del Río y cols., 2004; Cos y cols., 2008; González y cols., 2008; Vriend y Reiter, 2015). El tratamiento con melatonina sensibiliza a las células MCF-7 a la radiación, disminuyendo su proliferación, incrementando la proporción de células en la fase subG₀-G₁ del ciclo e inhibiendo la expresión de proteínas implicadas en la

reparación del daño en la doble cadena de ADN (Alonso-González y cols., 2016). La melatonina regula la expresión génica global en células de cáncer de mama humano (Lee y cols., 2011). Sin embargo, los mecanismos moleculares a través de los cuales la melatonina modula los cambios en la expresión génica, la proliferación celular y la progresión del ciclo celular desencadenada por los agentes de quimioterapia en los tumores de mama que responden a estrógenos permanecen aún desconocidos. Por lo tanto, en este apartado del trabajo nos hemos propuesto examinar los efectos de la combinación de docetaxel y melatonina usando como modelo la línea celular MCF-7.

Como las células MCF-7 son muy sensibles a las concentraciones de docetaxel equivalentes a las utilizadas en los protocolos de quimioterapia (en torno a 75-200 mg/m²), decidimos probar concentraciones bajas de este taxano (1 nM y 0,1 nM) para examinar los efectos de la melatonina, administrada en combinación con el agente de quimioterapia, sobre la proliferación celular. Nuestros resultados sugieren que la combinación de melatonina a dosis fisiológicas y dosis subfarmacológicas de docetaxel resulta en un aumento cooperativo de la citotoxicidad. Además, el tratamiento de las células con melatonina como paso previo a la administración del taxano resultó en un aumento de la inhibición de la proliferación celular aún mayor. Estos resultados muestran que la melatonina podría ser un potenciador de los efectos antiproliferativos del docetaxel cuando el taxano se administre a dosis más bajas que las dosis administradas actualmente a pacientes con cáncer, lo que potencialmente abre la posibilidad a la modificación de los protocolos en uso, disminuyendo la concentración de los agentes quimioterápicos e incluyendo la melatonina en los mismos. En este sentido, en modelos *in vivo*, parece que la melatonina contribuye además a disminuir algunos de los efectos adversos del docetaxel, como el dolor neuropático y la neurotoxicidad oxidativa (Ertlav y cols., 2020).

Una vez determinado que la melatonina parece potenciar la inhibición por parte del docetaxel de la proliferación de las células MCF-7, procedimos a analizar los cambios que la melatonina y el docetaxel provocan en el ciclo celular, tanto por separado como administrados de manera conjunta. En concordancia con resultados previamente publicados (Nooshinfar y cols., 2016), la melatonina detiene el ciclo celular en la fase G₁. El empleo de concentraciones bajas de docetaxel provoca que una mayor proporción de células se encuentren en la fase subG₀-G₁, y además el cotratamiento con melatonina incrementa significativamente el número de células en dicha subfase, lo cual indica que la melatonina potencia estos efectos del docetaxel. Concentraciones bajas de docetaxel

reducen el número de células viables o vivas e incrementa el porcentaje de células en apoptosis temprana. La melatonina potencia este efecto, de manera aún mayor cuando se añade de manera previa al tratamiento con el taxano. Nuestros resultados concuerdan con los obtenidos en otro estudio previo en el que se ha descrito que la melatonina induce la apoptosis de las células MCF-7 a través de un incremento en la acetilación de p53 y la inhibición de Akt/PI3K, modulando la vía de MDM2/MDMX/p300 (Proietti y cols., 2014). Finalmente, con respecto a esta parte del trabajo en el que hemos estudiado la combinación de dosis fisiológicas de melatonina con dosis subfarmacológicas de docetaxel, procedimos a examinar la expresión transcripcional de algunos genes relacionados con apoptosis, como son: *BAD*, *BAX2* y *BCL-2*. Nuestros resultados indican que la melatonina potencia los efectos estimuladores del docetaxel sobre la expresión de *BAD* y provoca una fuerte inhibición de la expresión de *BCL-2*. Nuevamente, estos datos apuntan en la dirección de que concentraciones fisiológicas de melatonina potencian los efectos citotóxicos de las concentraciones bajas de docetaxel, lo cual permite plantear la atractiva posibilidad de reducir las concentraciones terapéuticas de los agentes antitumorales sin ver reducidos sus beneficios.

Como hemos mencionado anteriormente, en pacientes con cáncer de mama, el docetaxel se administra en dosis que oscilan entre 75 y 200 miligramos/m² cada tres semanas, lo que aproximadamente equivale a concentraciones de 1 μ M en las células de cáncer mamario en el medio de cultivo. Por esta razón consideramos necesario explorar los cambios en los perfiles de expresión génica en células MCF-7 tratadas con docetaxel 1 μ M y encontramos que 8 genes aumentaron su expresión y 36 la bajaron, al menos 1,5 veces. Cuando se añaden simultáneamente docetaxel y melatonina al medio de cultivo, 15 genes aumentaron su expresión y 29 genes la bajaron, al menos 1,5 veces. Decidimos entonces analizar la expresión de 9 de estos genes, seleccionados tomando como criterio fundamental la magnitud del cambio en expresión observado entre los distintos tratamientos. Los genes pueden ser clasificados como involucrados en la progresión celular (*TP53* y *CDKN1A*), en la angiogénesis (*CDH13*), en la apoptosis (*BAX2*, *BAD* y *BCL-2*) y factores de transcripción (*GATA3*, *MUC1* y *c-MYC*).

El “guardián del genoma” *TP53* codifica para p53, que mantiene la estabilidad genómica (Berger y cols., 2013). Se había descrito previamente que la expresión de *TP53* y *p21WAF1* se reduce en pacientes de cáncer de mama localmente avanzado que reciben docetaxel y epirubicina en su régimen de tratamiento (Tiezzi y cols., 2007). La activación transcripcional de *TP53* y *CDKN1A* tras el tratamiento con la melatonina ha sido sugerida como parte del mecanismo a través del cual la hormona pineal inhibe la proliferación de las células tumorales mamarias cuyo crecimiento es dependiente de estrógenos (Mediavilla y cols., 1999). En el presente trabajo, en concordancia con la reducción previamente observada en los pacientes de cáncer de mama localmente avanzado, el docetaxel disminuyó la expresión de *TP53* y *CDKN1A*, (proteínas p53 y p21, respectivamente), dos reguladores del ciclo celular. Niveles normales de p53 permiten predecir una buena respuesta (sensibilidad) ante la terapia del cáncer de mama y de la misma manera, niveles altos de p21 están asociados, o permiten pronosticar un tipo de cáncer de mama más benigno (Elledge y Allred, 1998). En nuestros experimentos, el docetaxel también disminuyó la expresión de *CDH13* (cadherina T), cuya pérdida se ha demostrado que está asociada a la malignidad, invasividad y metástasis del tumor (Moelans y cols., 2011). Más recientemente, se ha demostrado que la ADN polimerasa β induce la expresión de *CDH13* aumentando la desmetilación de su promotor, mientras que la eliminación (*knockdown*) de *CDH13* restaura las propiedades invasivas, migratorias y la capacidad angiogénica del tumor (Wang y cols., 2020). Nuestros resultados indican que la melatonina no solamente contrarresta el efecto negativo del docetaxel, sino que la presencia de la indolamina lleva la expresión de *CDH13* a niveles mucho más altos que los observados en las células control. En resumen, en la línea celular MCF-7, la melatonina actúa incrementando la expresión de estos tres genes (*TP53*, *CDKN1A* y *CDH13*), considerados como supresores tumorales con un papel clave en el control del ciclo celular y de la progresión tumoral.

BAX2 y *BAD* son genes proapoptóticos y *BCL-2* es un factor antiapoptótico clasificado como un oncogén (Tudor y cols., 2000). Bad neutraliza los efectos antiapoptóticos de los miembros de la familia de Bcl-2, el cual sucesivamente modula la vía apoptótica intrínseca mediante la unión y la neutralización de otras proteínas que actúan como permeabilizadores mitocondriales, como la proteína proapoptótica Bax2 (Correia y cols., 2015). Se ha descrito asimismo que la expresión de *BAX2* está estimulada por *TP53* y que Bax2 está involucrado en la apoptosis mediada por p53. Bad (promotor de muerte

asociado a Bcl2) es un miembro proapoptótico de la familia de genes de *BCL-2* involucrado en el inicio de la apoptosis. Bad forma heterodímeros con proteínas antiapoptóticas (como Bcl-2) inactivándolas, permitiendo la apoptosis mediada por Bax2 (Tudor y cols., 2000). Recientemente, se ha propuesto que la resistencia a docetaxel en líneas celulares de cáncer de próstata refractario xenotransplantadas en ratones está asociada a un incremento en los niveles de Bcl-2, consecuencia de la inhibición de la degradación de la proteína por parte del proteosoma (Li y cols., 2020a). En células MCF- 7, concentraciones nanomolares de docetaxel inducen apoptosis a través de la fosforilación de Bcl-2 (Berchem y cols., 1999). En esta parte de nuestro trabajo, encontramos que el tratamiento con docetaxel 1 μ M incrementa de manera significativa la expresión de *BAX2* y *BAD*, y disminuye los niveles de expresión de *BCL-2*. De manera importante, cabe resaltar que la melatonina potenció los efectos estimuladores del docetaxel sobre la expresión de los genes proapoptóticos *BAX2* y *BAD*, e inhibió aún más la expresión del gen antiapoptótico *BCL-2* en respuesta al taxano. Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que los efectos antiproliferativos de la melatonina en las células MCF- 7 pueden ser explicados, al menos en parte, porque potencia los efectos proapoptóticos del docetaxel en las células tumorales mamarias mediante la regulación de la expresión de los genes *BAX2*, *BAD* y *BCL-2*.

GATA3 es un factor de transcripción cuya expresión está alterada en el cáncer de mama (Zang y cols., 2017). *GATA3* media la sobreexpresión de *MUC1* (Abba y cols., 2006). La expresión de *MUC1* ha sido encontrada en células plasmáticas de pacientes con micrometástasis o metástasis en nodo linfático (Puttipanyalears y cols., 2016). El gen *c-MYC* es un oncogén clásico que está mutado, translocado o sobreexpresado en varios tipos de tumores y se estimula por estradiol en células MCF-7, mientras que la melatonina revierte ese efecto casi por completo (Girgert y cols., 2009). La melatonina, en combinación con trióxido arsénico, estimula la apoptosis mediante el incremento en los niveles de p53, aumentando la proporción Bax2/Bcl-2 y suprimiendo la expresión de *hTERT* y *c-MYC* (Nooshinfar y cols., 2016). Nuestros resultados indican que el docetaxel induce la expresión de *GATA3*, *MUC1* y *c-MYC*, y que la melatonina contrarresta estos efectos. De nuevo, la melatonina parece ejercer un efecto protector ya que la inhibición de los genes *MUC1*, *GATA3* y el protooncogén *c-MYC* puede relacionarse tanto con niveles bajos de la expresión de factores involucrados en el crecimiento celular como con fenotipos asociados o indicadores de una capacidad de invasión menos agresiva.

En cuanto a los resultados *in vivo*, en nuestro modelo experimental logramos desarrollar tumores a partir de células de adenocarcinoma mamario humano (MCF-7) xenotransplantadas en los ratones. Nuestros resultados sugieren que el cotratamiento con melatonina y docetaxel no influye en el peso corporal, no habiéndose observado diferencias con los grupos que han recibido cada compuesto por separado, aunque todos los grupos que han recibido algún tratamiento presentaron un peso corporal menor que el grupo control. El volumen tumoral se vio significativamente reducido en los animales que han sido tratados con docetaxel y melatonina de manera simultánea.

En relación a los experimentos de análisis de expresión génica, el modelo *in vivo* de ratones xenotransplantados con células MCF-7 nos ha permitido reproducir resultados similares a los obtenidos *in vitro* en la mayor parte de los casos. Así, por ejemplo, la combinación de melatonina y docetaxel parece aumentar la expresión de genes proapoptóticos como *BAX2* y *BAD*, en comparación con el grupo tratado sólo con docetaxel. Lo mismo ocurre en el caso de algunos genes supresores de tumores como *CDKN1A*. En cuanto a los genes implicados en vías de angiogénesis, la melatonina ejerció en todos los casos estudiados (*VEGFA*, *ERK1* y *ERK2*) acciones antiangiogénicas, aumentando significativamente el efecto inhibidor producido por el docetaxel.

En el modelo *in vivo* de ratones xenotransplantados también hemos obtenido algún resultado discrepante con los obtenidos en la primera parte del trabajo, como la disminución de la expresión de *TP53* observado en todos los grupos que han recibido tratamiento o el aumento de *TWIST1* que hemos obtenido en los grupos tratados con docetaxel, lo que hace necesario plantear la repetición de este tipo de experimentos implantando tanto células MCF-7 como muestras procedentes de biopsias en el futuro próximo, empleando un número mayor de animales tan grande como sea posible.

En conclusión, los resultados recogidos en este capítulo dedicado al docetaxel sugieren que la melatonina podría ser una molécula útil con potencial para ser considerada como un buen adyuvante en la terapia contra el cáncer de mama. Dado que el pico nocturno de melatonina en plasma es mucho más bajo en pacientes con cáncer de mama estrógeno-positivo que en mujeres sanas (Tamarkin y cols., 1982), la administración de la hormona pineal a dosis fisiológicas circulantes, podría compensar ese déficit de melatonina endógena en las pacientes. En el presente trabajo hemos obtenido una serie de resultados en cuanto a la capacidad proliferativa, la apoptosis y la expresión génica de las células MCF-7 que sugieren que el uso concomitante de melatonina con docetaxel

sensibiliza a las células de cáncer de mama humano a dicho agente de quimioterapia. Cuando el docetaxel se usa a concentraciones bajas, las combinaciones de melatonina con docetaxel tienen un efecto aparentemente sinérgico en la inducción de apoptosis y en la inhibición de la proliferación de las células MCF-7. La melatonina también modula los cambios en la expresión génica inducidos por el docetaxel a altas concentraciones (dosis equivalentes a las dosis utilizadas en clínica). Nuestros resultados sugieren que las pacientes que han de recibir docetaxel como parte de su tratamiento de quimioterapia podrían beneficiarse con un cotratamiento con melatonina como agente coadyuvante, permitiendo una reducción en la dosis del agente de quimioterapia administrado, lo cual podría traducirse en menores efectos secundarios y una mejor tolerancia. La eficacia de la melatonina cuando se administra junto con diversos agentes utilizados en quimioterapia ha sido probada en varios ensayos clínicos (Lissoni y cols., 1987; Lissoni y cols., 1991). Sin embargo, hasta la fecha, al menos hasta donde sabemos, no ha sido probada en combinación con docetaxel. Nuestros resultados nos permiten proponer la realización de ensayos clínicos en pacientes de cáncer de mama en el futuro próximo, para esclarecer definitivamente si la eficacia de esta combinación en los modelos *in vitro* tiene un reflejo en clínica.

4.3 EFECTOS DE LA MELATONINA SOBRE LOS CAMBIOS INDUCIDOS POR DOXORRUBICINA EN CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA

Las acciones oncostáticas de la melatonina sobre las células tumorales mamarias cuyo crecimiento es dependiente de estrógenos también se producen cuando dichas células son tratadas con agentes quimioterapéuticos como la doxorubicina. Esta antraciclina, que actúa como un agente intercalante en el ADN, ha sido previamente investigada en combinación con melatonina en las células MCF-7 y algunas de las vías de señalización implicadas han sido caracterizadas, como describiremos en la discusión correspondiente a este capítulo. Sin embargo, las bases moleculares sobre las que subyace el papel potenciador de la melatonina sobre las respuestas inducidas por la doxorubicina, al igual que en los capítulos anteriores (radiación y docetaxel) permanecen aún en gran medida desconocidos.

Por todo ello, nos pareció procedente abordar el estudio del papel de la melatonina como regulador de los cambios de expresión génica inducidos por la doxorubicina, así como determinar si la melatonina es capaz de alterar los efectos antiproliferativos de la antraciclina. También hemos abordado la caracterización de las acciones de la doxorubicina sobre la migración y el potencial invasivo de las células MCF-7, cuyo crecimiento es dependiente de estrógenos, en comparación con las células MDA-MB-231, de crecimiento independiente de estrógenos, con el objetivo de determinar si la melatonina es capaz de modular los efectos de la antraciclina en ambas líneas celulares.

Los resultados obtenidos tras desarrollar los objetivos de este capítulo se describen a continuación.

RESULTADOS

4.3.1 La melatonina potencia el efecto antiproliferativo de la doxorubicina en la línea celular MCF-7

El primer bloque de experimentos de esta parte del trabajo se llevó a cabo para determinar si la melatonina, aplicada a concentraciones fisiológicas (1 nM), es capaz de potenciar el efecto antiproliferativo de la doxorubicina (1 μ M) sobre las células MCF-7.

Como paso previo, procedimos a determinar el efecto de diferentes concentraciones de doxorubicina sobre estas células. Como se puede observar en la **figura 4.3.1 A**, esta antraciclina inhibió la proliferación celular de las células MCF-7 de una manera dependiente de la dosis. Al igual que ocurrió en el caso del docetaxel, la dosis de 1 μ M es demasiado alta, ya que el número de células viables remanente tras tres días de incubación con doxorubicina fue inferior a un 10% y por lo tanto, las células MCF-7 son muy sensibles a estas concentraciones del quimioterápico (equivalentes a las utilizadas en clínica, 60-75 mg/m²). Por el contrario, una dosis de 0,1 nM prácticamente no redujo el número de células viables indicando que la doxorubicina aplicada en dosis tan bajas no tiene un efecto antiproliferativo significativo sobre esta línea celular. De esta manera, decidimos estudiar el efecto de concentraciones fisiológicas de melatonina (1 nM) combinadas con tres concentraciones intermedias de doxorubicina (10 nM, 5 nM y 1 nM). Los resultados obtenidos tras 3 días de incubación se pueden observar en la **figura 4.3.1 B**.

Como ya habíamos descrito en nuestro grupo de investigación en numerosas ocasiones (también en el segundo capítulo de estos resultados), la melatonina por sí sola inhibe de manera modesta pero significativa la proliferación de las células MCF-7. La doxorubicina 10 nM, tras tres días de tratamiento, redujo el número de células viables a un 50%.

Para la concentración de 5 nM se pudo observar un descenso significativo de la viabilidad celular de un 10%, mientras que no se produjo un descenso apreciable para la concentración de 1 nM. El cotratamiento con doxorubicina (para las tres concentraciones ensayadas) y melatonina 1 nM provocó una disminución adicional significativa en la proliferación en comparación con las células tratadas sólo con doxorubicina, indicando que la melatonina fue capaz de potenciar el efecto antiproliferativo de la antraciclina en esta línea celular hormonodependiente.

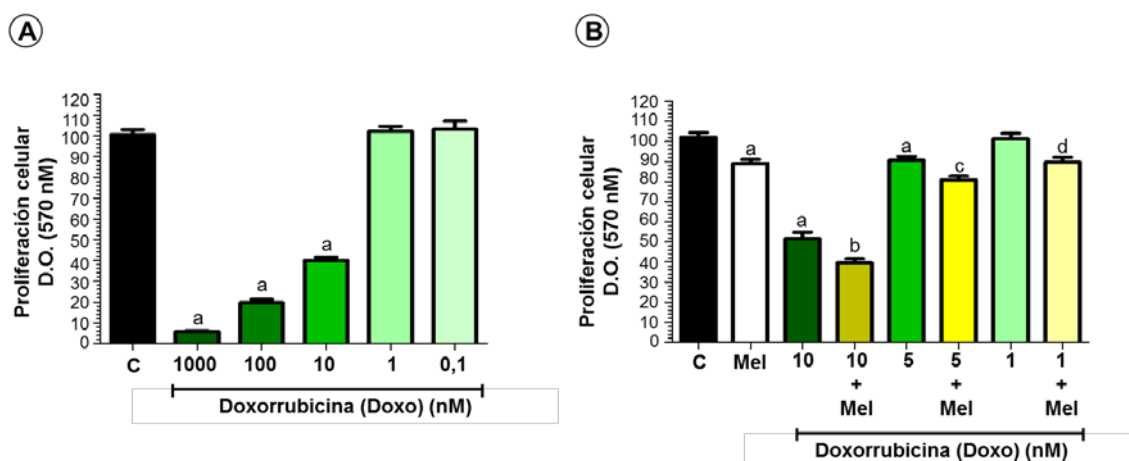


Figura 4.3.1: Efectos de la doxorrubicina y la melatonina sobre la proliferación de células MCF-7.

(A) Las células fueron tratadas con doxorrubicina (en un rango de 1000 nM a 0,1 nM). (B) En este caso, las células fueron tratadas con doxorrubicina (10 nM, 5 nM o 1 nM) sola o en combinación con melatonina (1 nM). En ambos casos la proliferación se midió por el método del MTT a los tres días. Los resultados se expresan en porcentaje en función del grupo control (media $\pm$ SEM). a, $p < 0,01$ vs C; b, $p < 0,05$ vs Doxo (10 nM); c, $p < 0,05$ vs Doxo (5 nM); d, $p < 0,05$ vs Doxo (1 nM). C: control. Mel: melatonina. Doxo: doxorrubicina.

La gráfica representada en la **figura 4.3.2** recoge los datos que se obtuvieron cuando los ensayos de proliferación se llevaron a cabo en la línea celular MDA-MB-231, cuyo crecimiento es independiente de estrógenos (RE-). En estas células pudimos observar que la doxorrubicina a una concentración alta (1 μ M) ocasionó que el número de células viables remanente tras tres días de incubación se situara en torno a un 10%, indicando que la mayor parte de las células estaban muertas tras ese tiempo. Concentraciones más bajas de la antraciclina (100 nM y 10 nM) redujeron el número de células viables a un 40 y un 60% respectivamente. Cabe destacar que, en esta línea celular, el tratamiento conjunto con doxorrubicina y melatonina no resultó en una inhibición de la proliferación estadísticamente diferente a la desencadenada por el quimioterápico a ninguna de las tres concentraciones probadas, lo que indica que la melatonina no potenció el efecto antiproliferativo de la doxorrubicina en las células MDA-MB-231.

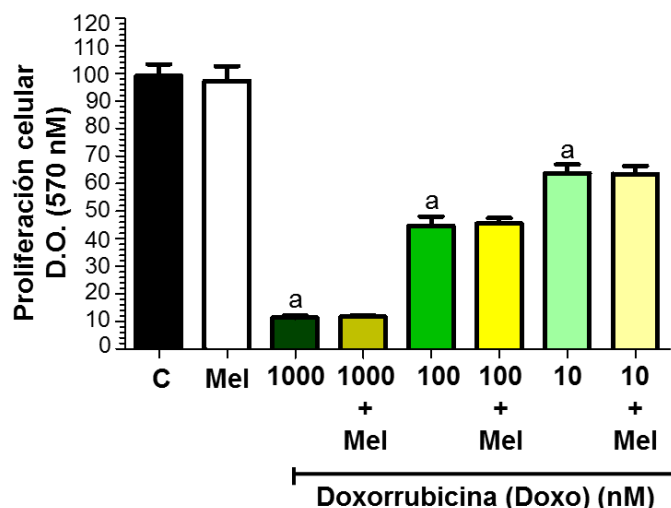


Figura 4.3.2: Efectos de la doxorubicina y la melatonina sobre la proliferación de las células tumorales mamarias MDA-MB-231. Las células fueron sembradas y tratadas con doxorubicina (en un rango de 1000 nM a 10 nM) sola o en combinación con melatonina (1 nM) durante tres días tras lo que se midió la proliferación celular por el método del MTT. Los resultados se expresan en porcentaje en función del grupo control (media $\pm$ SEM). a, $p < 0,01$ vs C. C: control. Mel: melatonina. Doxo: doxorubicina.

4.3.2 Efectos de la melatonina y la doxorubicina en la migración e invasión de las células MCF-7

Para investigar los efectos de la doxorubicina y la melatonina en la capacidad migratoria de las células MCF-7 utilizamos el ensayo de cicatrización de heridas (*wound healing assay*). La migración de las células tras permanecer 24 horas sometidas a los tratamientos se puede observar en la **figura 4.3.3 A** y la cuantificación se recoge en la **figura 4.3.3.B**. El tratamiento con doxorubicina (1 μ M) no alteró la migración de las células MCF-7 mientras que la adición de melatonina sí resultó en una disminución de la distancia migrada por las células, tanto por sí sola como en combinación con la antraciclina.

El paso siguiente consistió en analizar el potencial invasivo a través de la formación de esferoides celulares en una matriz de colágeno. Una microfotografía representativa de las células se recoge en la **figura 4.3.3 C** y la cuantificación de los datos obtenidos se ha representado en la **figura 4.3.3 D**. Los resultados obtenidos fueron en principio inesperados: la doxorubicina aumentó el potencial invasivo de las células MCF-7. Por el contrario, la adición de melatonina consiguió contrarrestar ese efecto negativo de la antraciclina.

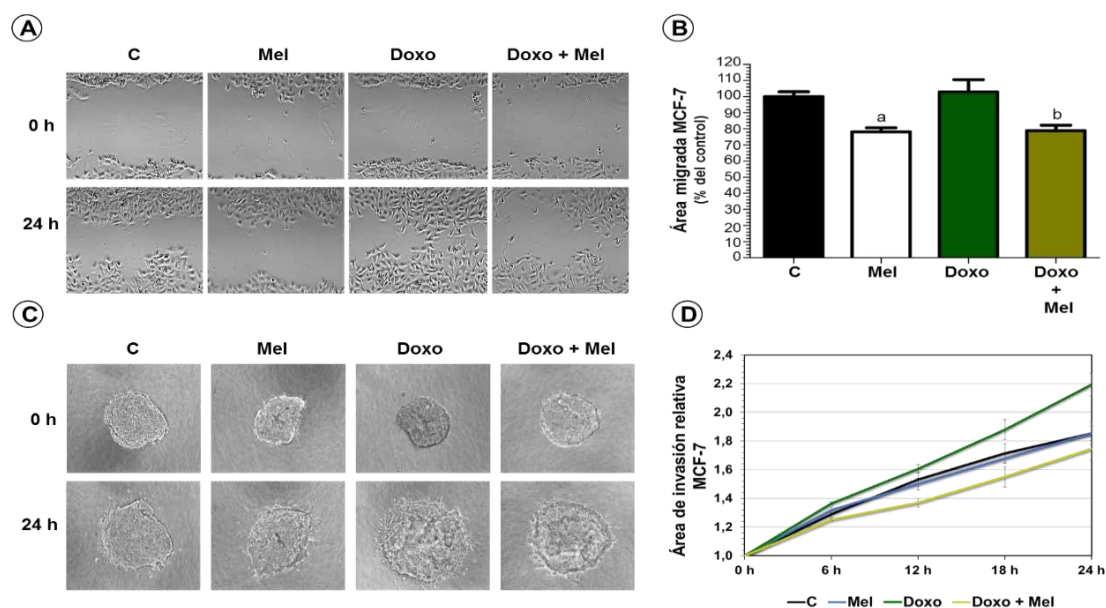


Figura 4.3.3: Efectos de la melatonina y la doxorrubicina sobre la migración y el potencial invasivo de las células MCF-7. (A) Microfotografías representativas iniciales (0 h) y finales (24 h) del ensayo de migración de células tratadas con melatonina (1 nM) y/o doxorrubicina (1 μ M). Escala 500 μ m. (B) Cuantificación del área migrada expresada en función del control (media $\pm$ SEM). a, $p < 0,05$ vs C; b, $p < 0,05$ vs Doxo. (C) Imágenes representativas del ensayo de invasión en 3D de los esferoides celulares embebidos en matriz de colágeno a tiempo inicial (0 h) y tiempo final (24 h). Escala 100 μ m. (D) Cuantificación del potencial invasivo en los tiempos indicados. Los datos están expresados como la media $\pm$ SEM. C: control. Mel: melatonina. Doxo: doxorrubicina.

4.3.3 Efectos de la melatonina y la doxorrubicina en la migración e invasión de las células MDA-MB-231

Una vez establecido el efecto inhibidor (protector) de la melatonina sobre la capacidad migratoria e invasiva de las células MCF-7, decidimos estudiar sus efectos sobre estas mismas propiedades en la línea celular MDA-MB-231.

En la **figura 4.3.4 A** hemos incluido una microfotografía de los resultados obtenidos y en la **figura 4.3.4 B** se ha representado la cuantificación de los mismos. En este caso ni la doxorrubicina ni la melatonina (en este último caso, al contrario de lo que sucedió para las células MCF-7) parecen tener un efecto sobre la capacidad migratoria de estas células.

Por otra parte, en esta misma línea celular, de crecimiento independiente de estrógenos, el potencial invasivo tampoco se vio alterado por los tratamientos individuales ni con el tratamiento conjunto. Una microfotografía representativa de las células se recoge en la **figura 4.3.4 C** y la cuantificación de los datos obtenidos en la **figura 4.3.4 D**.

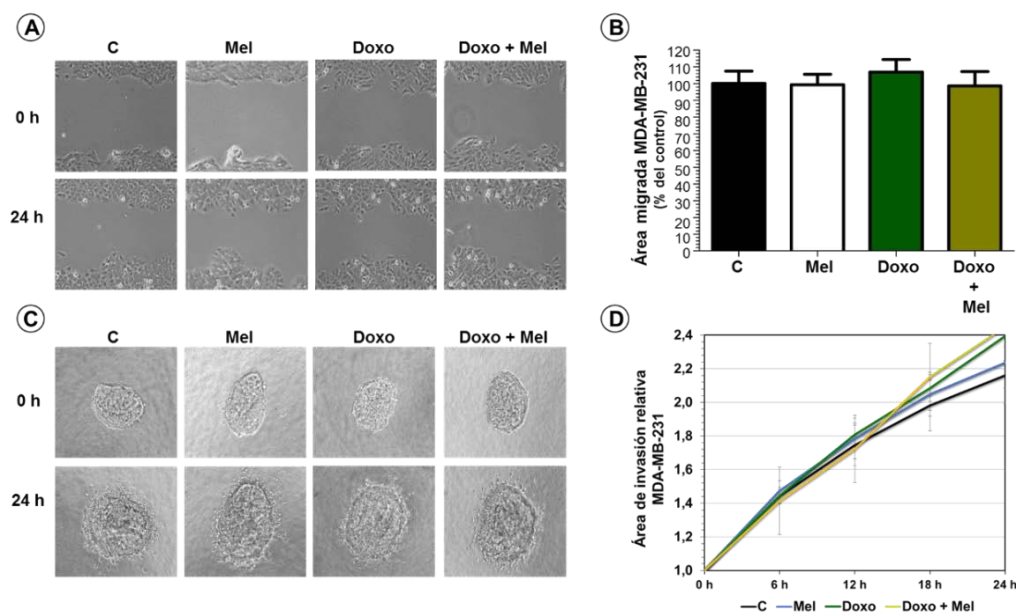


Figura 4.3.4: Efectos de la melatonina y la doxorrubicina sobre la migración y el potencial invasivo de las células MDA-MB-231. (A) Microfotografías representativas iniciales (0 h) y finales (24 h) del ensayo de migración de células tratadas con melatonina (1 nM) y/o doxorrubicina (1 μM). Escala 500 μm. (B) Cuantificación del área migrada expresada en función del control (media ± SEM). (C) Imágenes representativas del ensayo de invasión en 3D de los esferoides celulares embebidos en matriz de colágeno a tiempo inicial (0 h) y tiempo final (24 h). Escala 100 μm. (D) Cuantificación del potencial invasivo en los tiempos indicados. Los datos están expresados como la media ± SEM. C: control. Mel: melatonina. Doxo: doxorrubicina.

4.3.4 Efectos de la melatonina sobre los cambios inducidos por la doxorrubicina en la expresión de genes relacionados con el cáncer de mama en las células MCF-7

Siguiendo el mismo razonamiento que en el capítulo anterior, los cambios en la expresión génica en respuesta a tratamientos como la doxorrubicina utilizada a dosis clínicas están siendo elucidados en la actualidad, pero aún permanecen lejos de estar totalmente esclarecidos. Por lo tanto, el siguiente paso que decidimos llevar a cabo en nuestro trabajo consistió en la utilización del ensayo de PCR (*RT² Profiler PCR Array*) de genes relacionados con el cáncer de mama humano, para evaluar los cambios de expresión en células MCF-7 tras el tratamiento con doxorrubicina 1 μM sola o combinada con melatonina 1 nM. Como ya hemos descrito en los capítulos anteriores dedicados a la radiación y el docetaxel, este ensayo permite el análisis simultáneo de 84 genes involucrados en varios procesos claves para la biología del cáncer de mama, como son la angiogénesis, la adhesión celular, transducción de señales, ciclo celular, apoptosis o reparación de daño en el ADN. Como se explicó también anteriormente en esta memoria, algunos de los genes pueden encajar en uno o varios grupos diferentes debido a la

compleja interrelación entre los diferentes procesos moleculares que tienen lugar en una célula tumoral mamaria.

Tal y como se muestra en la **figura 4.3.5**, tomando como criterio un cambio de al menos 1,5 veces con doxorrubicina sola en comparación con las células del grupo control no tratadas, la antraciclina aumentó la expresión de 27 de esos genes e inhibió la expresión de 17. Cuando la doxorrubicina se combinó con melatonina, 9 genes aumentaron su expresión mientras que 26 la vieron reducida en comparación con los resultados obtenidos en las células tratadas solo con el agente de quimioterapia.

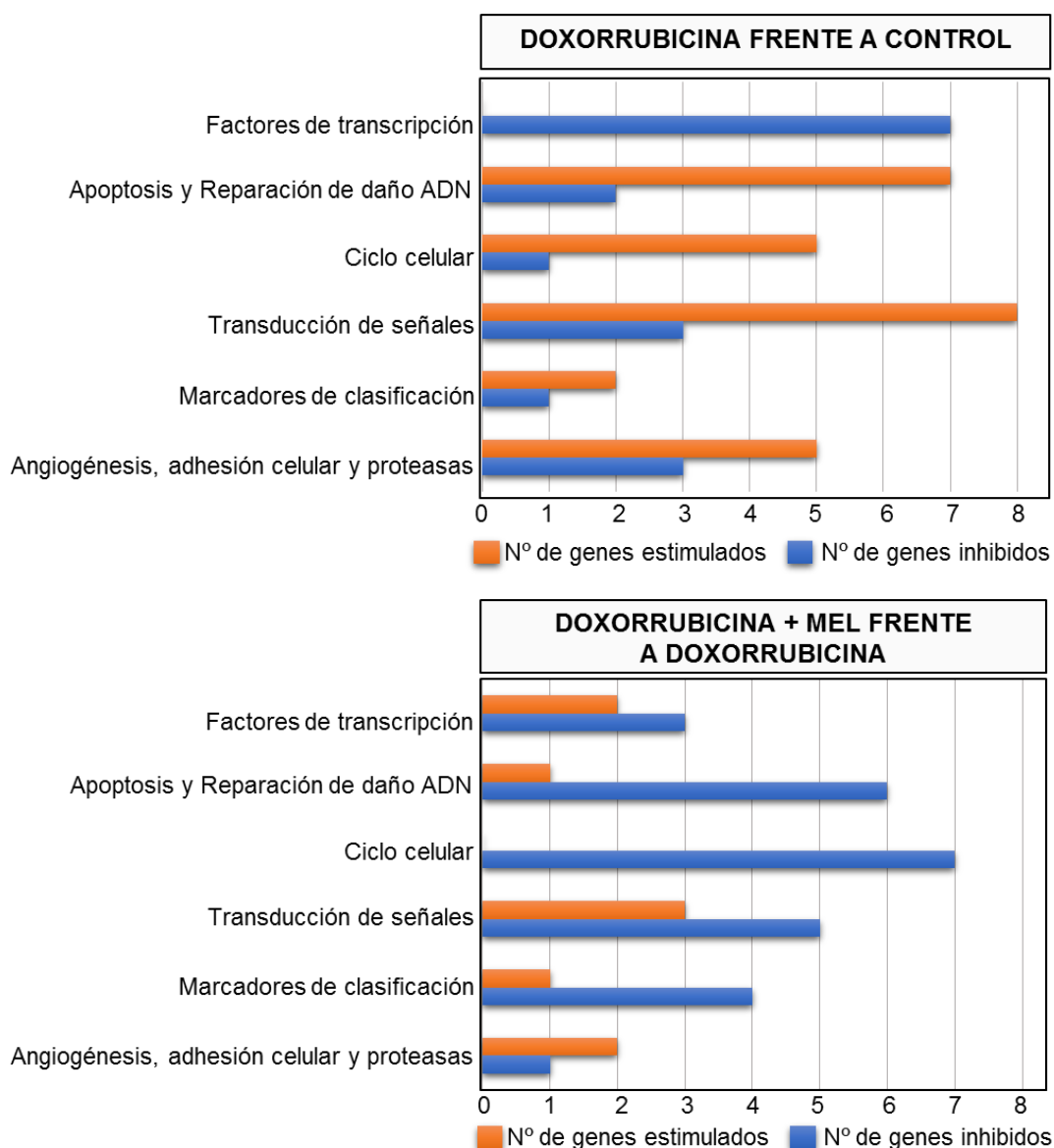


Figura 4.3.5: Genes estimulados o inhibidos en las células MCF-7 tratadas con doxorrubicina y/o melatonina. El panel de arriba compara el número de genes estimulados o inhibidos (al menos 1,5 veces) de cada categoría en células MCF-7 tratadas con doxorrubicina (1 μ M) durante seis horas frente a células control. El panel de abajo representa los cambios (al menos 1,5 veces) en células tratadas con melatonina (1 nM) y doxorrubicina frente a las incubadas solo con la antraciclina. En ambos casos el perfil de expresión génica se analizó utilizando el ensayo de RT²-PCR de cáncer de mama humano.

Finalmente, de todos ellos elegimos 16 candidatos para su posterior validación mediante RT-PCR. Se escogieron aquellos genes cuya expresión se vio alterada al menos 1,5 veces en alguno de los *arrays*, en comparación con las células tratadas con vehículo (control), excepto en un caso (*COP1*) que se incluyó en este grupo de experimentos por su conocido papel como supresor tumoral.

En la **figura 4.3.6**, se muestra el efecto de la melatonina, la doxorrubicina y la combinación de ambas sobre la expresión de aquellos genes incluidos en el grupo de transductores de señales. La doxorrubicina incrementó de manera sustancial la expresión de *NME1* (que codifica para la nucleósido-difosfato quinasa 1) y también los niveles de *SNAI2* (el gen correspondiente al represor 2 - slug - de la transcripción de la familia de *SNAIL*). En ambos casos, la melatonina revirtió de manera significativa el efecto estimulador de la doxorrubicina. La combinación de ambos compuestos inhibió de manera modesta pero significativa a *WEE1* (implicado en control de progresión de ciclo celular) y a *PGR* (receptor de progesterona, que habitualmente se encuentra sobreexpresado en carcinomas mamarios dependientes de estrógenos).

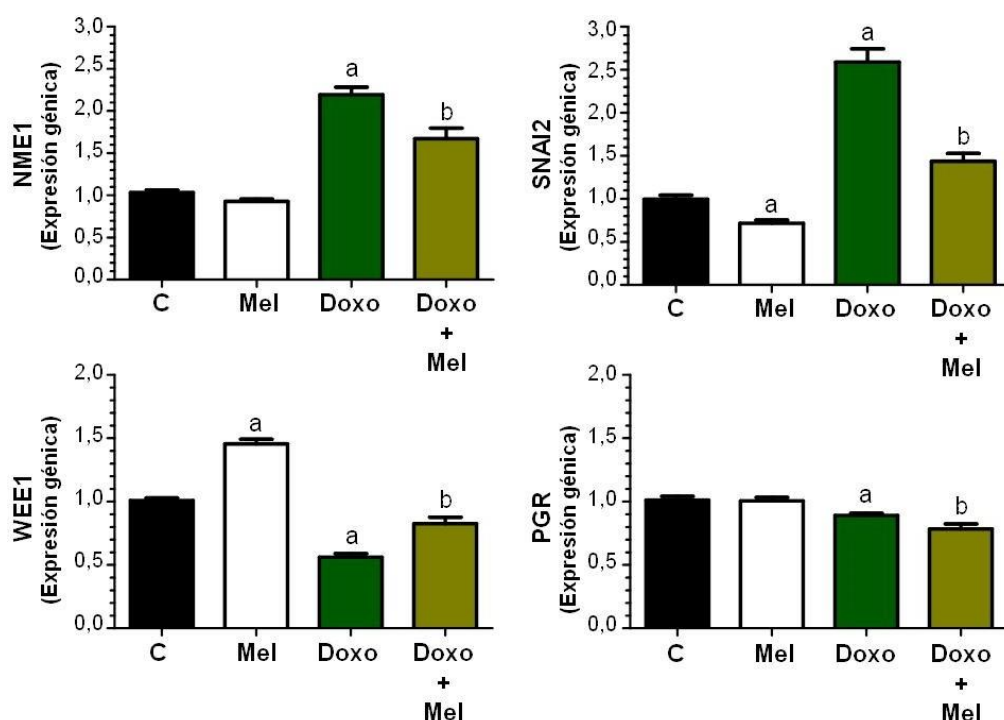


Figura 4.3.6: Comparación de los cambios en la regulación de los genes que codifican para factores implicados en transducción de señales en células MCF-7 tratadas con melatonina y/o doxorrubicina. Análisis RT-PCR de los niveles de expresión de los genes *NME1*, *SNAI2*, *WEE1* e *PGR* en células MCF-7 tratadas con doxorrubicina (1 μ M) y/o melatonina (1 nM) durante seis horas. Todos los datos están expresados como cambios relativos a las células control (media $\pm$ SEM) a partir de al menos tres experimentos independientes. a, $p < 0,05$ vs C; b, $p < 0,05$ vs Doxo. C: control. Doxo: doxorrubicina. Mel: melatonina.

De los factores implicados en la apoptosis y en la progresión del ciclo celular (**figuras 4.3.7 y 4.3.8**), la doxorubicina aumentó de manera significativa la expresión de *PTEN* (fosfatasa y homólogo de tensina), *CDKN1A* (inhibidor de la quinasa dependiente de ciclina 1A, cuyo producto es conocido como p21), *TP53* (p53, supresor de tumores), *BAX2* (proteína 4 similar a Bcl-2, proapoptótica), *MUC1* (Mucina epitelial polimórfica, supresor de p53) y *BIRC5* (inhibidor baculoviral de la apoptosis o survivina, implicada entre otros muchos procesos en resistencia a doxorubicina).

El tratamiento conjunto con melatonina potenció el efecto estimulador de la antraciclina sobre la transcripción de *PTEN* y *CDKN1A*, en este último caso de manera llamativa, no tuvo un efecto significativo sobre la expresión de *TP53* y *BAX2* y mostró un efecto inhibidor sobre los niveles de *MUC1* y *BIRC5*. Los niveles del oncogén *c-MYC* (myelocytomatosis, oncogén) fueron inhibidos por la doxorubicina, teniendo el tratamiento conjunto con melatonina un acusado efecto inhibidor adicional. *BCL2* (célula B de linfoma 2, proapoptótico) no se vio modificado por el tratamiento conjunto.

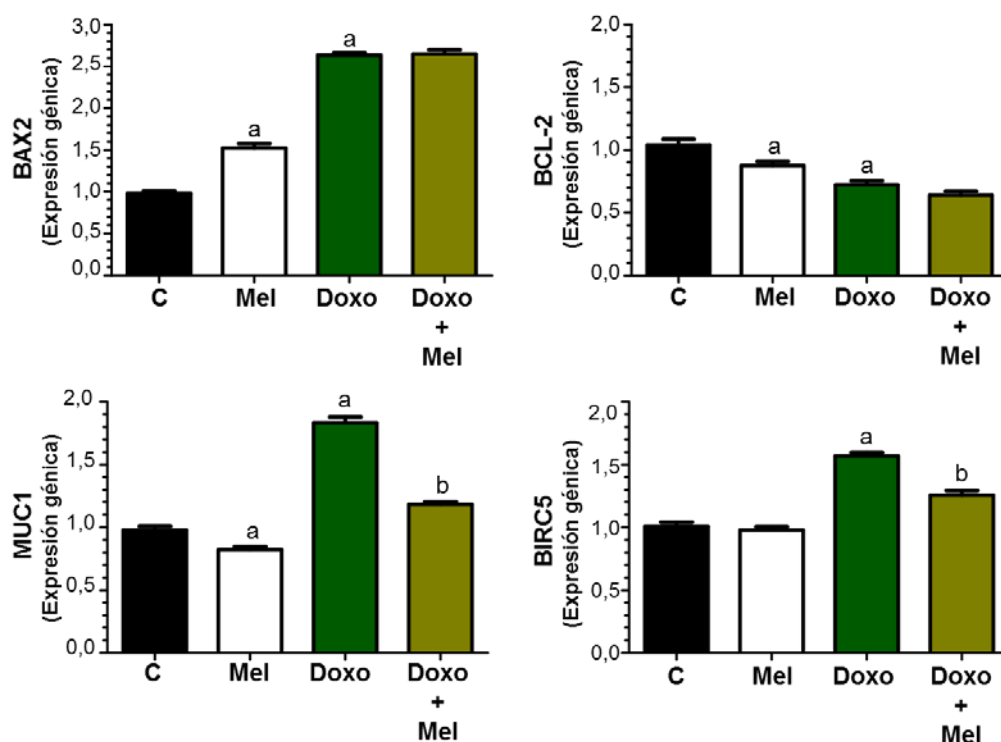


Figura 4.3.7: Comparación de los cambios en la regulación de genes relacionados con apoptosis en células MCF-7 tratadas con melatonina y/o doxorubicina. Análisis RT-PCR de los niveles de expresión de los genes *BAX2*, *BCL2*, *MUC1* y *BIRC5* en células MCF-7 tratadas con doxorubicina (1 μ M) y/o melatonina (1 nM) durante seis horas. Todos los datos están expresados como cambios relativos a las células control (media $\pm$ SEM) a partir de al menos tres experimentos independientes. a, $p < 0,01$ vs C; b, $p < 0,001$ vs Doxo. C: control. Doxo: doxorubicina. Mel: melatonina.

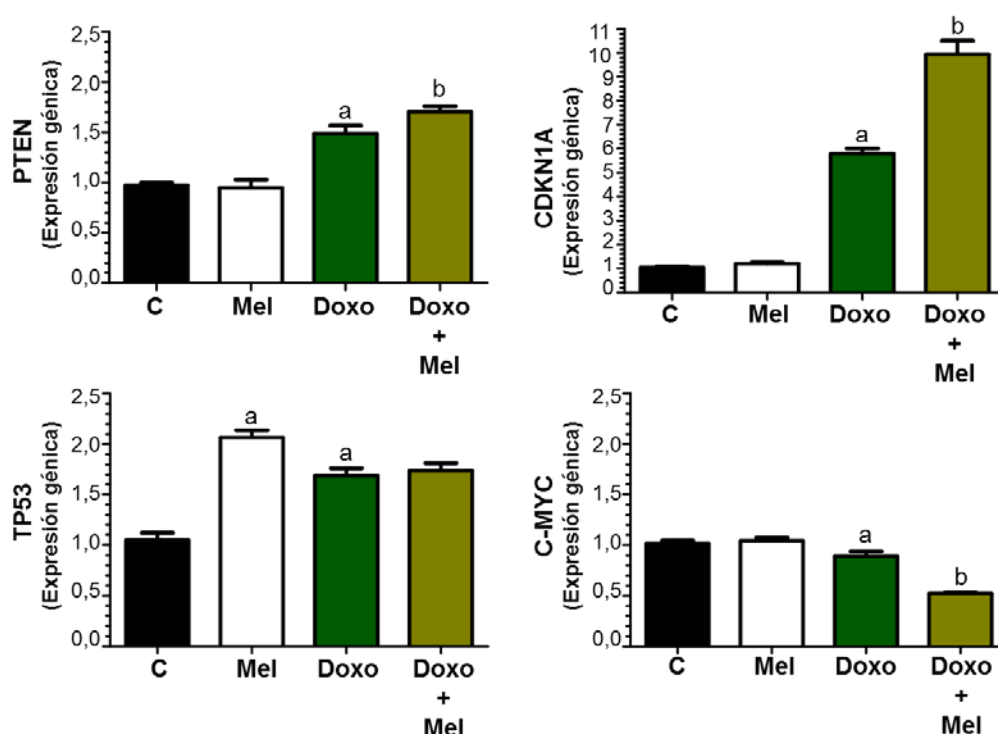


Figura 4.3.8: Comparación de los cambios en la regulación de genes relacionados con el ciclo celular en MCF-7 tratadas con melatonina y/o doxorubicina. Análisis RT-PCR de los niveles de expresión de los genes *PTEN*, *CDKN1A*, *TP53* y *c-MYC* en células MCF-7 tratadas con doxorubicina (1 μ M) y/o melatonina (1 nM) durante seis horas. Todos los datos están expresados como cambios relativos a las células control (media $\pm$ SEM) a partir de al menos tres experimentos independientes. a, $p < 0,01$ vs C; b, $p < 0,01$ vs Doxo. C: control. Doxo: doxorubicina. Mel: melatonina.

El último grupo de genes estudiados de manera específica mediante RT-PCR se corresponde con los que codifican para factores de transcripción. Como se puede observar en la **figura 4.3.9**, el tratamiento con la doxorubicina 1 μ M inhibió significativamente los niveles de expresión de *GATA3* (proteína de unión a GATA, sobreexpresado en tumores mamarios dependientes de estrógenos) y *XPB1* (proteína de unión a la caja X, promotor de la invasión tumoral); en ambos casos, el cotratamiento con melatonina no tuvo un efecto relevante sobre la acción del quimioterápico.

La doxorubicina estimuló la actividad transcripcional de *COP1* (fotomorfogénico constitutivo 1) y de *TWIST1* (proteína 1 relacionada con la torsión), en este último caso de manera muy potente. El tratamiento conjunto con ambos compuestos tuvo un efecto ligero pero significativo estimulando aún más la expresión de *COP1*, mientras que la melatonina revirtió totalmente el efecto estimulador de la antraciclina sobre la expresión de *TWIST1*.

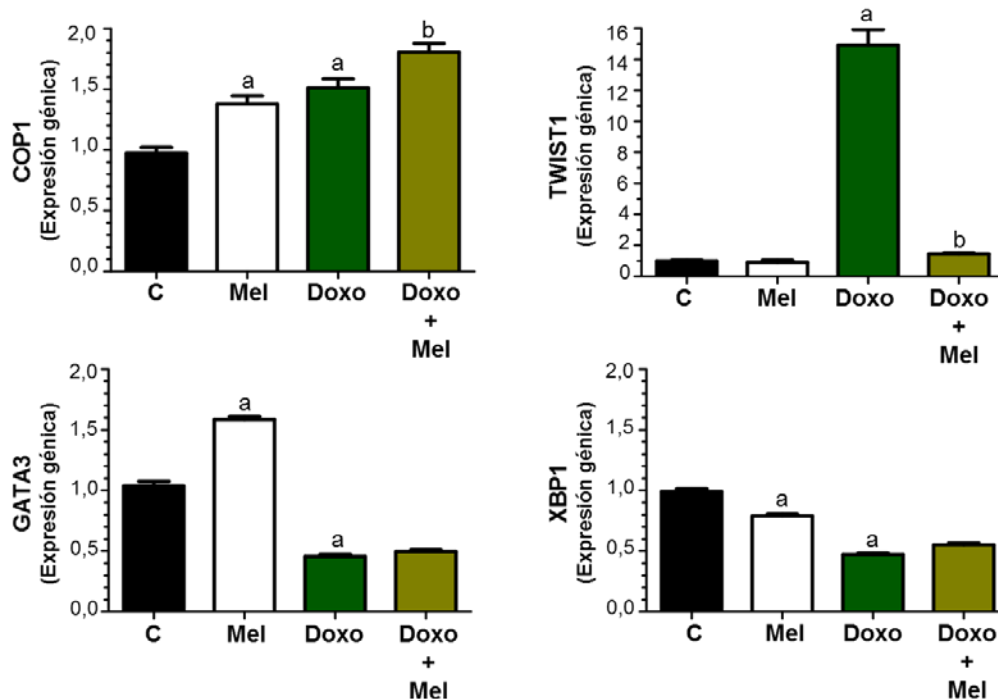


Figura 4.3.9. Efecto del tratamiento con doxorrubicina y/o melatonina sobre la transcripción de genes que codifican para factores de transcripción en la línea celular MCF-7. Validación mediante RT-PCR de los cambios en la transcripción de los genes *COP1*, *TWIST1*, *GATA3* y *XBP1* en células MCF-7 tratadas con doxorrubicina (1 μ M) y/o melatonina (1 nM) durante seis horas. Todos los datos están expresados como cambios relativos a los grupos control (media $\pm$ SEM) de al menos tres experimentos independientes. a, $p < 0,001$ vs C; b, $p < 0,01$ vs Doxo. C: control. Doxo: doxorrubicina. Mel: melatonina.

En el siguiente paso del trabajo, nos propusimos comprobar si los resultados que hemos obtenido en las células MCF-7 pueden relacionarse con la propiedad de crecimiento dependiente de estrógenos, o si bien se podían reproducir en la línea celular receptor de estrógenos negativa MDA-MB-231. Se priorizó el análisis de la expresión de los genes *CDKN1A* y *TWIST1* ya que vimos que su expresión cambiaba drásticamente en las células MCF-7 en respuesta al tratamiento con doxorrubicina, efecto fuertemente potenciado (en el primer caso) y contrarrestado (en el segundo) por la melatonina. En las células MDA-MB-231, la antraciclina aumentó ligeramente la expresión de *CDKN1A*, pero no así la de *TWIST1*, que sí fue reducida por el cotratamiento con melatonina (**figura 4.3.10**).

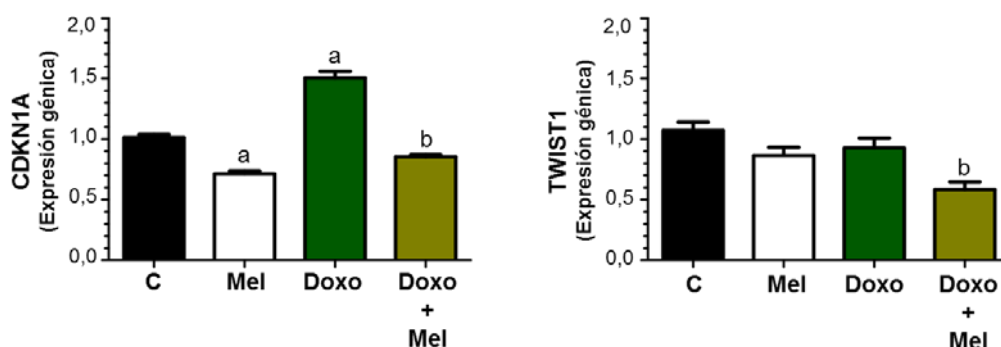


Figura 4.3.10: Efecto del tratamiento con doxorubicina y/o melatonina sobre la transcripción de genes relacionados con el ciclo celular en la línea celular MDA-MB-231. Análisis RT-PCR de los niveles de expresión génica de *CDKN1A* Y *TWIST1* en células MDA-MB-231 tratadas con doxorubicina (1 μ M) y/o melatonina (1 nM) durante seis horas. Todos los datos están expresados como cambios relativos a las células control (media $\pm$ SEM) a partir de al menos tres experimentos independientes. a, $p < 0,001$ vs C; b, $p < 0,001$ vs Doxo. C: control. Doxo: doxorubicina. Mel: melatonina.

4.3.5 Efectos de la melatonina y la doxorubicina sobre los niveles de la proteína Twist1 en células MCF-7

La llamativa inducción transcripcional de *TWIST1* observada en las células MCF-7 en respuesta al tratamiento con doxorubicina, unida a la potente respuesta de la melatonina aboliendo dicho efecto, nos hizo decidarnos a determinar y cuantificar los niveles proteicos de Twist1 presentes en las células MCF-7 tras ser sometidas a los distintos tratamientos.

En la **figura 4.3.11** se muestra la determinación de Twist1 mediante inmunofluorescencia. Como se puede observar en el panel correspondiente, el tratamiento de las células MCF-7 con doxorubicina durante doce horas resultó en un aumento de la expresión de la proteína Twist1 mientras que la melatonina contrarrestó este efecto estimulador de la antraciclina.

En concordancia con el resultado anterior, también corroboramos mediante experimentos de *western blot* que los niveles de Twist1 efectivamente se ven aumentados en respuesta al tratamiento con doxorubicina, y de la misma manera que habíamos observado en el caso de la detección mediante inmunofluorescencia, la melatonina revierte este efecto estimulador (**figura 4.3.12**).

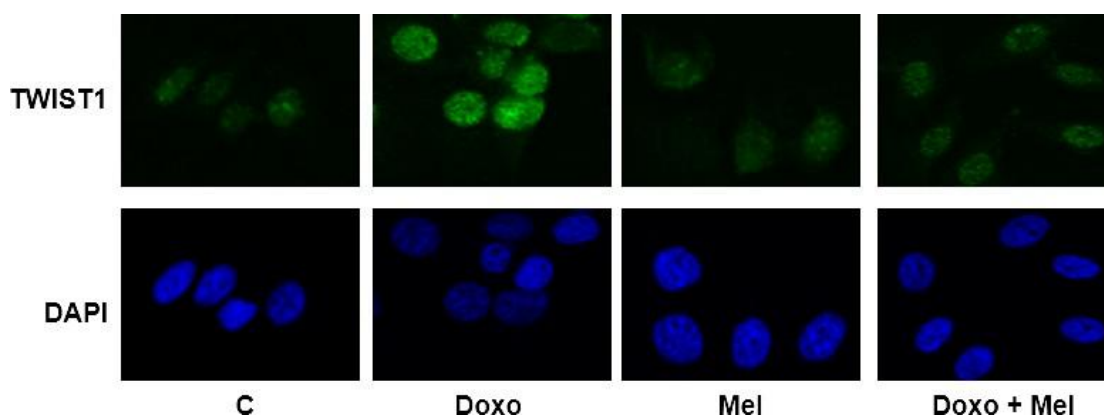


Figura 4.3.11: Efectos de la doxorubicina y/o la melatonina sobre los niveles de Twist1. Identificación mediante inmunofluorescencia. Las células MCF-7 fueron tratadas durante doce horas con doxorubicina (1 μ M) y/o melatonina (1 nM). Posteriormente se fijaron con formaldehído y fueron analizadas mediante inmunofluorescencia tras su tinción con los anticuerpos antiTwist1 y DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindol). C: control. Doxo: doxorubicina. Mel: melatonina. Escala: 15 μ M.

También comprobamos los niveles del receptor de estrógenos alfa ($RE\alpha$) ya que se sabe que: a) la melatonina regula negativamente al RE en las células MCF-7, b) la doxorubicina aumenta la expresión del RE, y c) altos niveles de Twist1 se correlacionan con bajos niveles de RE. Nuestros resultados indicaron que los niveles del $RE\alpha$ estaban inhibidos por la melatonina, aunque no hemos podido demostrar una regulación positiva por parte de la antraciclina.

En conjunto, los resultados de los experimentos de RT-PCR, inmunofluorescencia y *western blot* son concordantes y demuestran un fuerte incremento de la expresión y los niveles proteicos de Twist1 en respuesta a la doxorubicina y una fuerte inhibición por parte de la melatonina tanto a nivel transcripcional como de niveles proteicos en las células MCF-7.

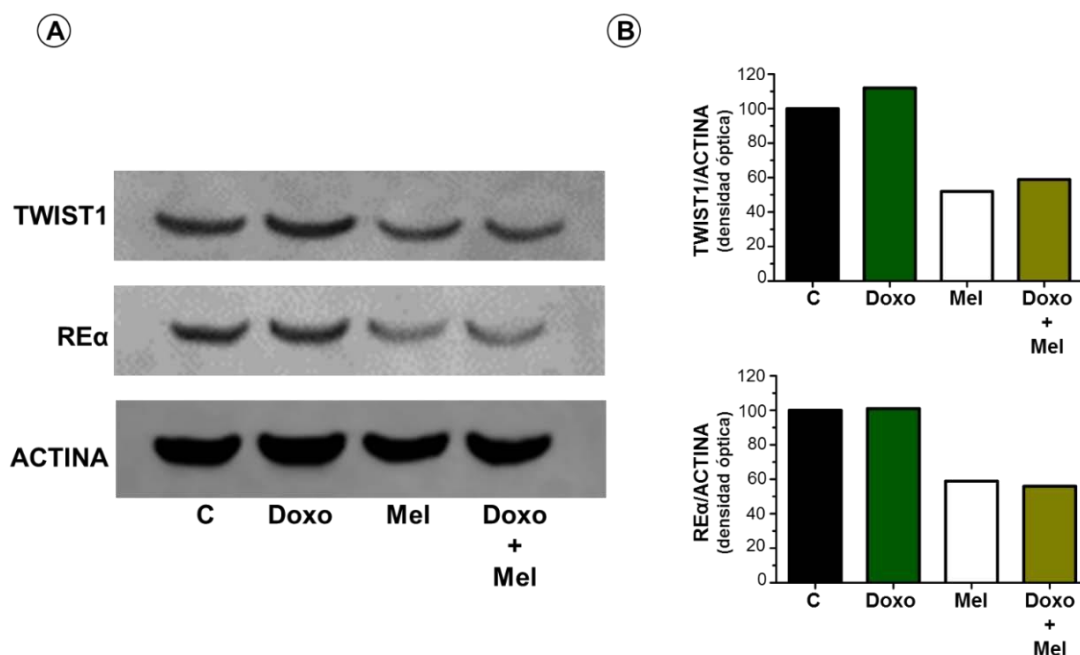


Figura 4.3.12: Efectos de la doxorrubicina y/o la melatonina sobre los niveles proteicos de Twist1 y REα. (A) Identificación mediante *western blot* de los niveles proteicos de Twist1 y REα en extractos proteicos de células MCF-7 tratadas durante doce horas con doxorrubicina (1 μ M) y/o melatonina (1 nM). Como control de carga se utilizó el anticuerpo anti- β -actina. (B) La intensidad de la señal se cuantificó mediante densitometría y los datos se expresaron como porcentaje del grupo control. C: control. Doxo: doxorrubicina. Mel: melatonina.

4.3.6 Efectos sobre la expresión de los genes *TWIST1* y *CDKN1A* en células MCF-7 cocultivadas con adipocitos

Se ha descrito que los adipocitos inducen la transición epitelio-mesénquima en las células de cáncer de mama a través del aumento en la expresión de algunos genes entre los que se encuentra *TWIST1*. Sobre esta base, examinamos si los adipocitos pueden inducir la actividad transcripcional de *TWIST1* en las células MCF-7. Debido a la regulación recíproca que existe entre Twist1 y p21, también se determinó la expresión del gen *CDKN1A* a partir de las mismas muestras. En la **figura 4.3.13** se muestran los resultados obtenidos. La actividad transcripcional del gen *CDKN1A* se vio estimulada por la mera presencia de los adipocitos, fue potenciada por el tratamiento con doxorrubicina y aumentada aún más cuando las células fueron tratadas simultáneamente con melatonina y el quimioterápico. Con respecto a *TWIST1*, la simple presencia de los adipocitos estimuló su expresión. El tratamiento con doxorrubicina potenció este efecto, pero en este caso, contrariamente a los que sucedió para *CDKN1A*, el tratamiento conjunto con melatonina disminuyó la expresión de *TWIST1* inducida por doxorrubicina en presencia de los adipocitos.

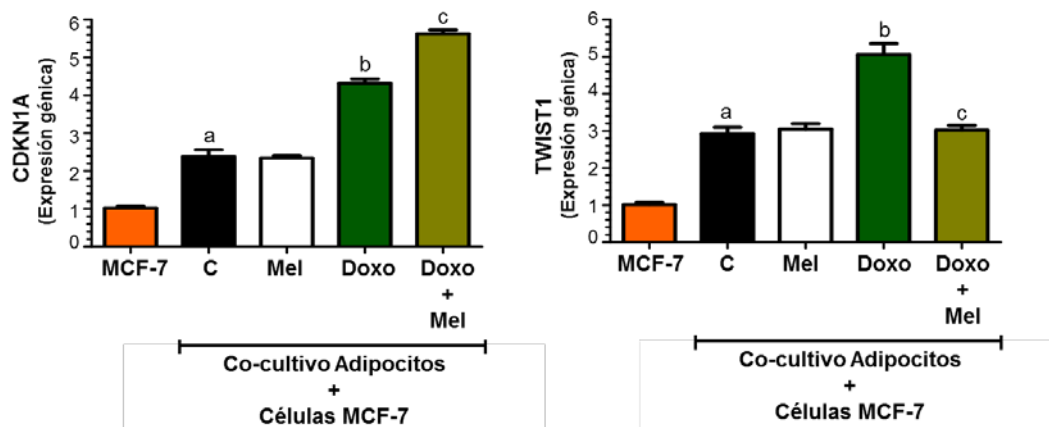


Figura 4.3.13: Efectos de la doxorrubicina y la melatonina en la expresión de los genes *CDKN1A* y *TWIST1* en células MCF-7 cocultivadas con adipocitos maduros. Las células MCF-7 y los adipocitos maduros diferenciados se cultivaron conjuntamente en presencia o ausencia de melatonina (1 nM) y/o doxorrubicina (1 μ M). Las células MCF-7 control fueron cultivadas en ausencia de adipocitos (columna naranja). En todos los casos, tras 24 horas de tratamiento se analizaron los cambios en la expresión génica de *CDKN1A* y *TWIST1* mediante RT-PCR. Todos los datos están expresados como cambios relativos a los grupos control (media $\pm$ SEM) a partir de al menos tres experimentos independientes. a, $p < 0,001$ vs MCF-7; b, $p < 0,001$ vs C; c, $p < 0,001$ vs Doxo. C: control. Doxo: doxorrubicina. Mel: melatonina.

4.3.7 Efectos de la melatonina y la doxorrubicina en la expresión de genes relacionados con la angiogénesis

Hasta ahora, en este capítulo hemos descrito una serie de experimentos que confirman que Twist1 presenta niveles más elevados en las células MCF-7 tratadas con doxorrubicina y que demuestran un papel protector de la melatonina revirtiendo dicho efecto. Debido a que Twist1 es un inductor de la angiogénesis, y que los cambios inducidos por los agentes quimioterapéuticos en la expresión de genes relacionados con la angiogénesis son en gran medida desconocidos, utilizamos un *array* de PCR específico para la angiogénesis (*Human Angiogenesis RT² ProfilerTM*), que permite el análisis simultáneo de 84 genes en un solo experimento. Estos genes están involucrados en diferentes procesos vinculados a la angiogénesis y pueden clasificarse en varias categorías como son: receptores y factores de crecimiento, proteasas, inhibidores de proteasas y proteínas de la matriz extracelular, citoquinas y moléculas de adhesión. De nuevo, algunos de los genes incluidos en el *array* pueden encajar en varios grupos diferentes debido a la compleja interrelación entre los diferentes procesos moleculares que tienen lugar en una célula tumoral mamaria.

Los datos generados tras el empleo de esta técnica nos permitieron determinar los cambios inducidos por la doxorrubicina (1 μ M), la melatonina (1 nM) o la combinación de ambas. Como se muestra en la **figura 4.3.14**, tomando como criterio un cambio de al menos 1,5 veces, la antraciclina por sí misma aumentó la expresión de 16 de estos genes y redujo la de 8 en comparación con las células no tratadas. Cuando se combinaron doxorrubicina y melatonina el número de genes estimulados se redujo a 5 mientras que 14 genes vieron su expresión inhibida en comparación con las células tratadas solo con el quimioterápico.

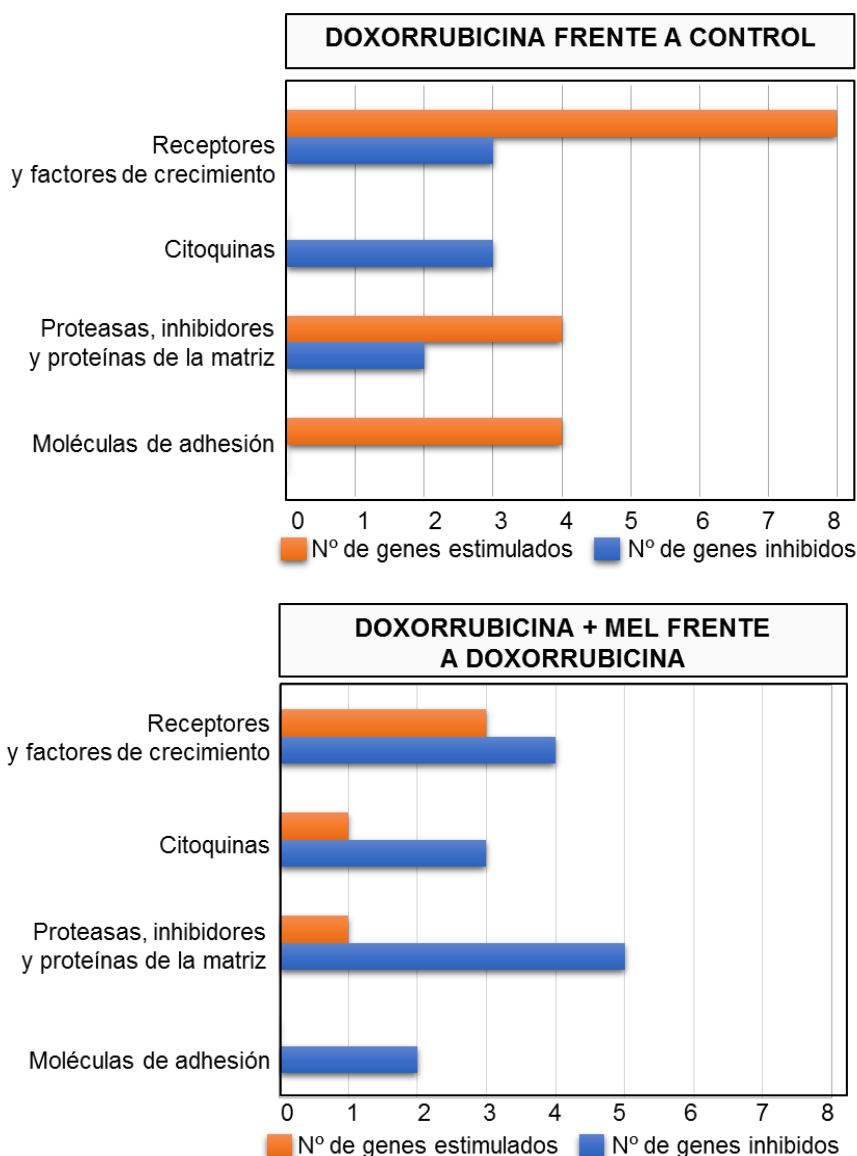


Figura 4.3.14: Genes relacionados con la angiogénesis estimulados o inhibidos en las células MCF-7 tratadas con doxorrubicina y/o melatonina. El panel de arriba compara el número de genes estimulados o inhibidos (al menos 1,5 veces) de cada categoría en células MCF-7 tratadas con doxorrubicina (1 μ M) durante seis horas frente a células control. El panel de abajo representa los cambios en células tratadas con melatonina (1 nM) y doxorrubicina frente a las incubadas solo con la antraciclina. En ambos casos el perfil de expresión génica se analizó utilizando el ensayo de RT²-PCR de angiogénesis humana.

Para validar algunos de estos resultados, se seleccionaron 8 genes (con un cambio superior a 1,5 veces) y se analizaron de manera específica mediante PCR a tiempo real. Los resultados obtenidos están representados en la **figura 4.3.15**. La realización de las PCR específicas para el estudio de los genes seleccionados nos permitió comprobar como el tratamiento con doxorubicina (1 μ M) estimuló significativamente la transcripción del gen *PLG* (que codifica para el plasminógeno, regulado negativamente por los inhibidores de Twist1), *ANGPT2* (cuya expresión está correlacionada con metástasis de cáncer de mama en el cerebro), *IGF-1* (estimulador de la expresión de *TWIST1*) y *GLI1* (cuya expresión se ve incrementada tras la activación de *TWIST1*). En todos los casos anteriormente citados, el tratamiento conjunto con melatonina (1 nM) bloqueó, al menos parcialmente, el efecto estimulante de la antraciclina sobre la expresión de los mismos.

La expresión del gen *VEGFA* (inductor de angiogénesis) y *AKT1* (participante en vías de señalización que conducen a la activación transcripcional de *TWIST1*) también se redujo significativamente cuando las células MCF-7 fueron sometidas a un cotratamiento con doxorubicina y melatonina. Por el contrario, la expresión de *SERPINE1*, incrementada en respuesta al tratamiento con la antraciclina, no se vio disminuida por el cotratamiento con la melatonina. En este mismo sentido, la expresión del inhibidor de proteasas *TIMP2* no se vio modificada por el tratamiento de las células con doxorubicina, pero resultó levemente inducida en respuesta a la melatonina.

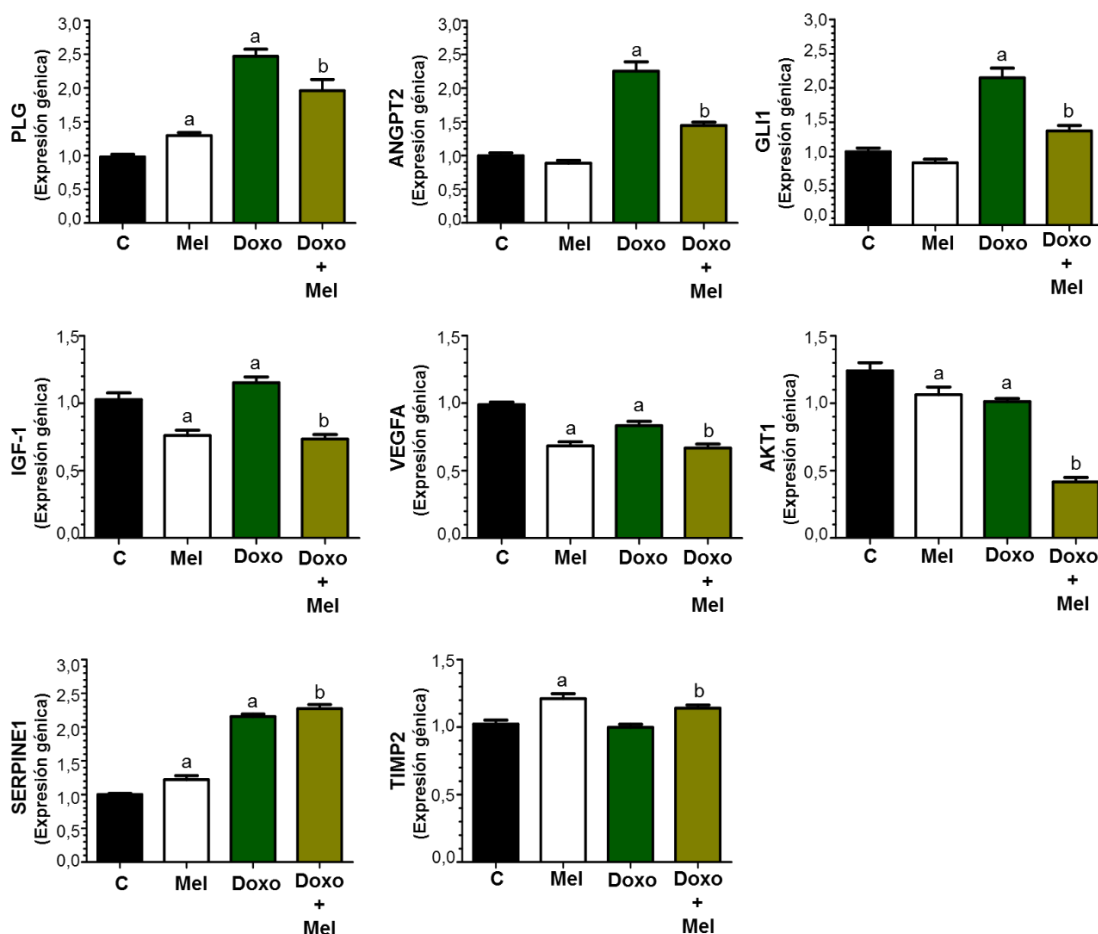


Figura 4.3.15: Efecto del tratamiento con doxorrubicina y/o melatonina sobre la transcripción de genes relacionados con la angiogénesis. Validación mediante RT-PCR de los cambios en la transcripción de los genes *PLG*, *ANGPT2*, *GLI1*, *IGF1*, *VEGFA*, *AKT1*, *SERPINE1* y *TIMP2* en células MCF-7 tratadas con doxorrubicina (1 μ M) y/o melatonina (1 nM) durante seis horas. Todos los datos están expresados como cambios relativos a los grupos control (media $\pm$ SEM) de al menos tres experimentos independientes. a, $p < 0,001$ vs C; b, $p < 0,001$ vs Doxo. C: control. Doxo: doxorrubicina. Mel: melatonina.

4.3.8 Efectos de la melatonina y la doxorrubicina en la expresión de genes reloj

Dado que la alteración (inactivación en algunos casos o sobreexpresión en otros) de los genes reloj (*CLOCK genes*) parece ser un mecanismo involucrado tanto en el riesgo de desarrollar cáncer de mama, como en la velocidad de progresión de los tumores mamarios, decidimos evaluar el efecto de la doxorrubicina y la melatonina sobre la expresión de 9 componentes genéticos del sistema del reloj circadiano. En la **figura 4.3.16** se pueden ver representados los resultados obtenidos.

La doxorrubicina por sí misma aumentó la expresión de 6 genes reloj y la melatonina por sí sola la de 7. La combinación de ambos compuestos aumentó significativamente la expresión de *CRY1*, *CRY2*, *CLOCK*, *NPas2*, *BMAL1*, *BMAL2* y *PER2*.

En cuanto a *TIMELESS* la doxorrubicina aumentó su expresión mientras que el cotratamiento con melatonina contrarrestó este efecto.

Por último, la expresión del gen *PER3* no se vio modificada por el tratamiento con doxorrubicina, pero fue estimulada en aquellas células tratadas con melatonina.

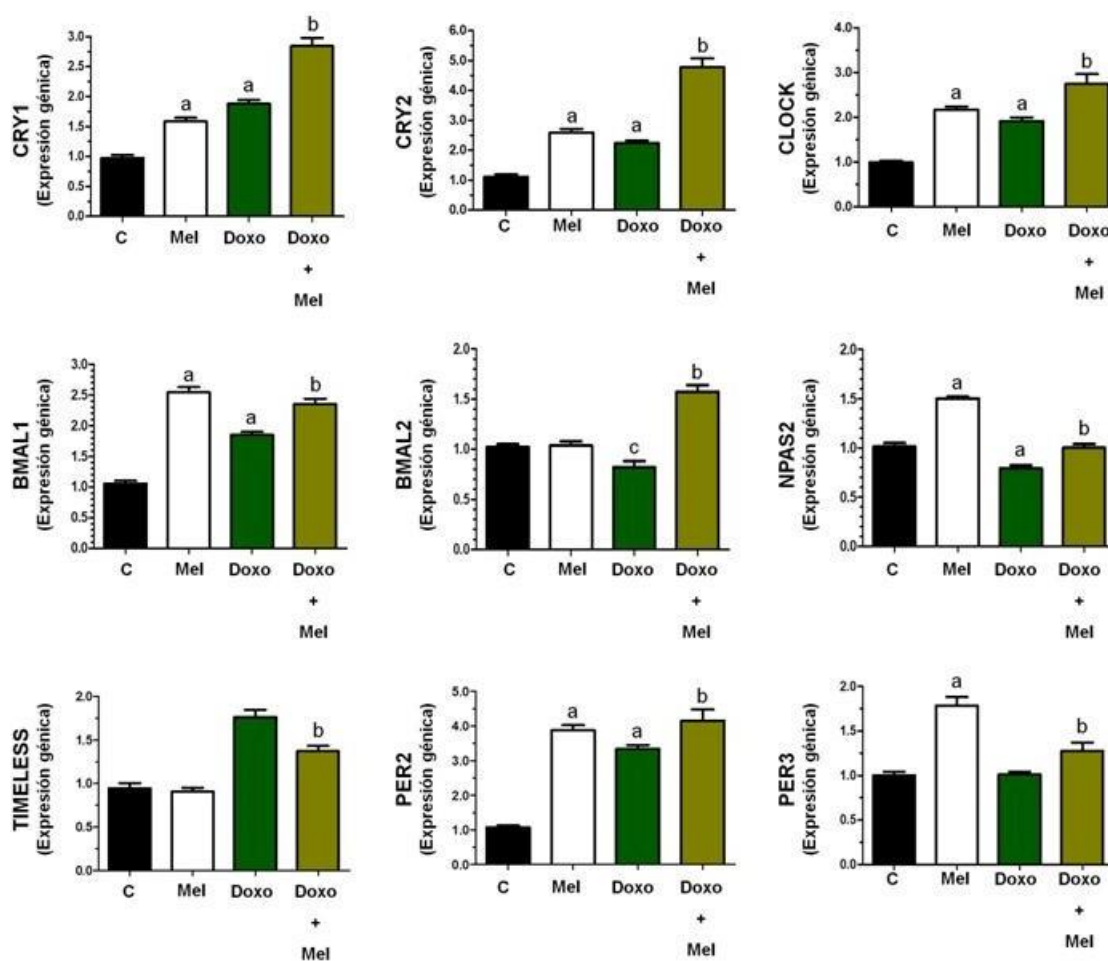


Figura 4.3.16: Efecto del tratamiento con doxorrubicina y/o melatonina sobre la transcripción de genes reloj. Validación mediante RT-PCR de los cambios en la transcripción de los genes *CRY1*, *CRY2*, *CLOCK*, *BMAL1*, *BMAL2*, *NPAS2*, *TIMELESS*, *PER2* y *PER3* en células MCF-7 tratadas con doxorrubicina (1 μ M) y/o melatonina (1 nM) durante seis horas. Todos los datos están expresados como cambios relativos a los grupos control (media $\pm$ SEM) de al menos tres experimentos independientes. a, $p < 0,001$ vs C; b, $p < 0,001$ vs Doxo. C: control. Doxo: doxorrubicina. Mel: melatonina.

4.3.9 Efectos de la melatonina y la doxorrubicina en el estado de activación de quinasas y otros factores implicados en vías de señalización

En el siguiente paso de este capítulo, decidimos investigar el efecto del tratamiento con doxorrubicina y melatonina sobre el estado de activación (valorado en función del nivel de fosforilación) de diversas proteínas en nuestro modelo de células MCF-7. Para ello utilizamos el ensayo *Proteome Profiler*TM (R&D Systems) que permite evaluar el nivel de fosforilación de múltiples proteínas (la mayor parte de ellas quinasas) involucradas en diferentes vías de señalización intracelular. Como se puede observar en la **figura 4.3.17 A y B**, el efecto más evidente del tratamiento con doxorrubicina se produjo sobre los niveles de fosforilación de la p70S6 quinasa, aumentándolos, efecto que fue contrarrestado por el tratamiento conjunto con la melatonina.

El estado de fosforilación de Akt (S473) y mTOR (S2448) (como reguladores de la p70 S6 quinasa) y la proteína ribosómica S6 (S240) (diana de la p70S6 quinasa) fueron analizados mediante *Western blot*. La melatonina por sí misma redujo los niveles de p-Akt y p-mTOR. Además, los niveles de p-Akt (Ser 473) fueron más bajos en las células MCF-7 tratadas con doxorrubicina más melatonina que en las células tratadas solamente con doxorrubicina (**figura 4.3.16 C y D**). Los niveles de p-S6 también disminuyeron con el tratamiento con melatonina, tanto por sí sola como administrada en combinación con doxorrubicina (**figura 4.3.16 E y F**).

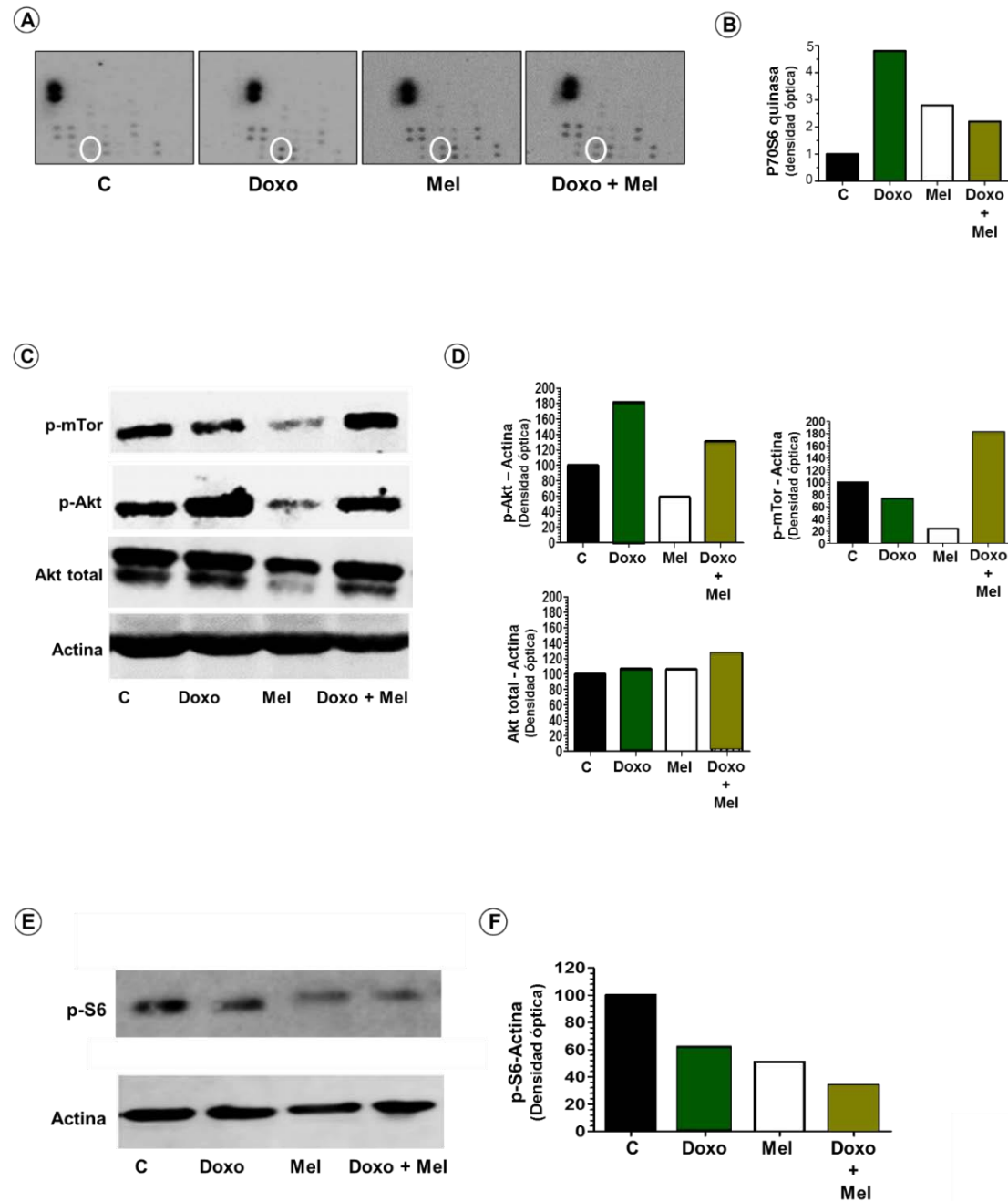


Figura 4.3.17: Efecto del tratamiento con doxorubicina y/o melatonina sobre el estado de fosforilación de proteínas transductoras de señales. (A) Imágenes de las transferencias de matriz de fosfoquinasas *Proteome Profiler™* Array ensayadas con extractos proteicos de células MCF-7 tratadas con doxorubicina (1 μ M) y/o melatonina (1 nM) durante seis horas. El óvalo blanco señala los puntos correspondientes a los niveles de p70S6 quinasa. (B) La intensidad de la señal de los puntos correspondientes a p70S6 quinasa se cuantificó por densitometría. (C) Detección mediante *western blot* de mTOR fosforilado (S2448), Akt fosforilado (S473) en extractos proteicos de células MCF-7. (D) Cuantificación por densitometría de los *western blot*. (E) Detección mediante *western blot* de la fosforilación de S6 (S240/S244) en células MCF-7. (F) Cuantificación por densitometría de los resultados obtenidos en el *western blot* de la proteína S6. En todos los casos, los datos se expresan en función del grupo control.

4.3.10 Efectos de la melatonina y la doxorubicina en la expresión de microARNs

En numerosos tipos de cáncer, incluido el cáncer de mama, se ha demostrado que una gran cantidad de microARNs (miARNs) pueden funcionar como oncogenes o como genes supresores de tumores mediante la regulación de multitud de vías de señalización intracelular. Por esta razón, decidimos analizar los efectos de la doxorubicina y la melatonina en la expresión de varios microARNs involucrados en la transición epitelio-mesénquima, el crecimiento celular, la migración, la invasión, la expansión de células madre o la progresión del cáncer de mama, centrando nuestro especial interés en algunos de ellos conocidos por su interrelación con Twist1. Los resultados más relevantes que hemos obtenido en esta serie de experimentos se pueden observar en la **figura 4.3.18**.

La expresión de miR-34a fue estimulada por melatonina y por doxorubicina. El cotratamiento con doxorubicina y melatonina produjo unos niveles de este miARN superiores a los observados en las células tratadas solamente con la antraciclina.

La expresión tanto de miR-29a como de miR-31 disminuyó con ambos tratamientos, y aún de manera más acusada cuando ambos compuestos se administraron simultáneamente.

En cuanto a los niveles de miR-145, éstos se vieron aumentados casi cuatro veces en respuesta al tratamiento con cada una de las moléculas por separado, pero no se vieron significativamente alterados cuando ambas moléculas se añadieron a la vez.

En lo que se refiere a miR-10a, su expresión aumentó con la antraciclina, pero al añadir melatonina se revirtió significativamente ese efecto.

Por último, los niveles de miR-10b también resultaron fuertemente inducidos en respuesta al tratamiento con doxorubicina, pero en este caso el cotratamiento con la melatonina redujo su expresión de manera significativa.

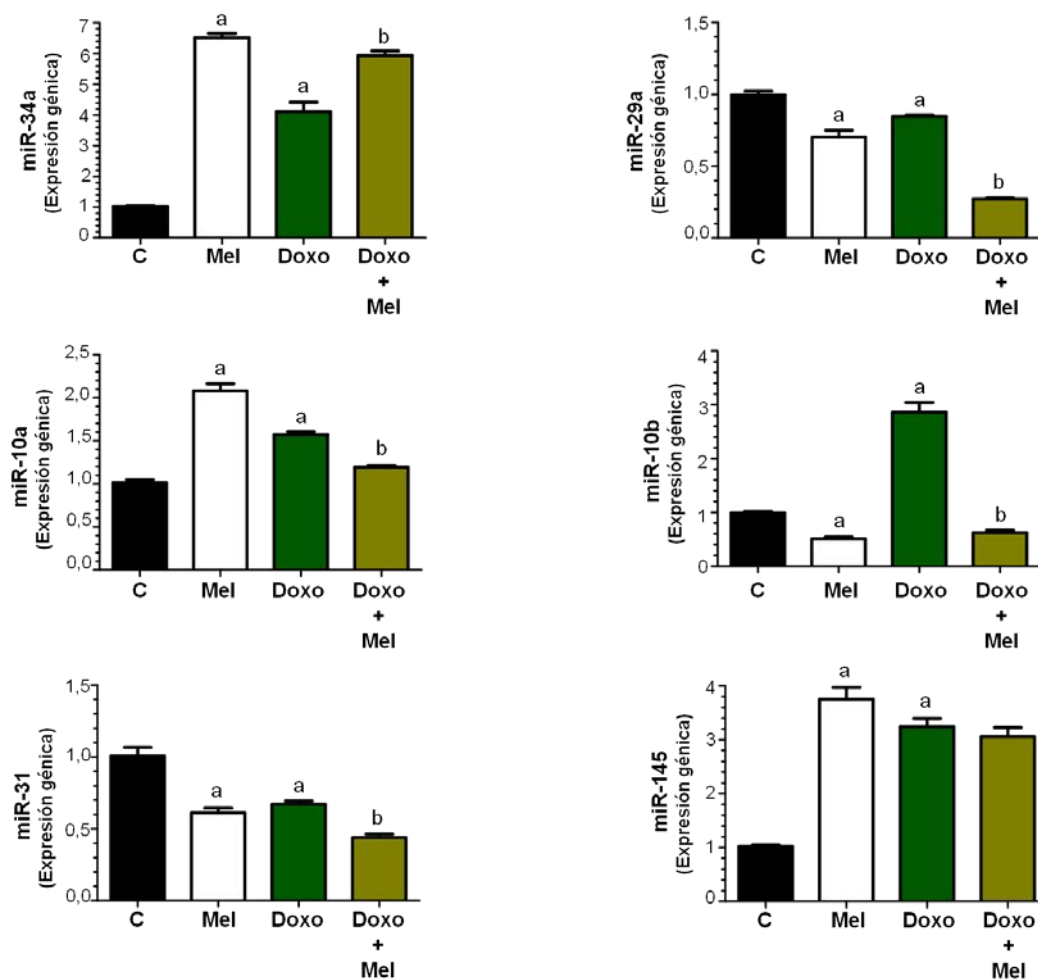


Figura 4.3.18: Efecto del tratamiento con doxorubicina y/o melatonina sobre la transcripción de microARNs (miARN). Detección por RT-PCR de miR-34a, miR-29a, miR-10a, miR-10b, miR-31 y miR-145. Los niveles de miARN se analizaron en células MCF-7 tratadas con doxorubicina (1 μ M) y/o melatonina (1 nM) durante seis horas. Todos los datos se expresan como cambio de veces en relación con las células control (media $\pm$ SEM) de tres experimentos independientes. a, $p < 0,001$ vs C; b, $p < 0,001$ vs Doxo. C: control. Doxo: doxorubicina. Mel: melatonina.

4.3.11 Efecto del bloqueo de *TWIST1* sobre la expresión de miR-10b

A continuación, procedimos a estudiar las consecuencias que tendría el bloqueo de la expresión de *TWIST1* sobre la expresión de algunos de los miARNs y genes estudiados en los apartados anteriores.

Para este propósito, las células MCF-7 se lipofectaron con una mezcla de cuatro siARNs de silenciamiento, según se describe en materiales y métodos (si*TWIST1*) o bien con siARNs no bloqueantes (siControl). En la **figura 4.3.19** se puede observar como el bloqueo de *TWIST1* redujo a la mitad aproximadamente los niveles de expresión de este gen.

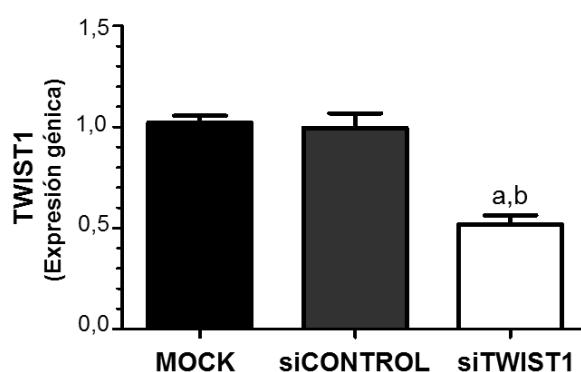


Figura 4.3.19: Silenciamiento de *TWIST1* en las células MCF-7. Las células se lipofectaron con los siARNs de silenciamiento y a continuación se llevó a cabo la detección por RT-PCR de los niveles de *TWIST1*. Todos los datos se expresan en relación al control (media $\pm$ SEM), de al menos tres experimentos independientes. a, $p < 0,05$ vs Mock; b, $p < 0,05$ vs siControl. MOCK: Ausencia de siARNs. siCONTROL: siARN no silenciador (control negativo); siTWIST1: siARN específico para *TWIST1*.

Una vez comprobada la inhibición de la expresión de *TWIST1*, procedimos a continuación a valorar la expresión de los miARNs (miR-10a y miR-10b) en estas mismas células lipofectadas (**figura 4.3.20**). El bloqueo de *TWIST1* disminuyó significativamente la inducción de miR-10a en respuesta a la doxorrubicina y también abolió por completo la inducción de miR-10b en respuesta al tratamiento con la antraciclina. Cabe destacar que en las células lipofectadas con si*TWIST1*, la combinación de melatonina y doxorrubicina desencadenó una fuerte inducción en la expresión de miR-10a.

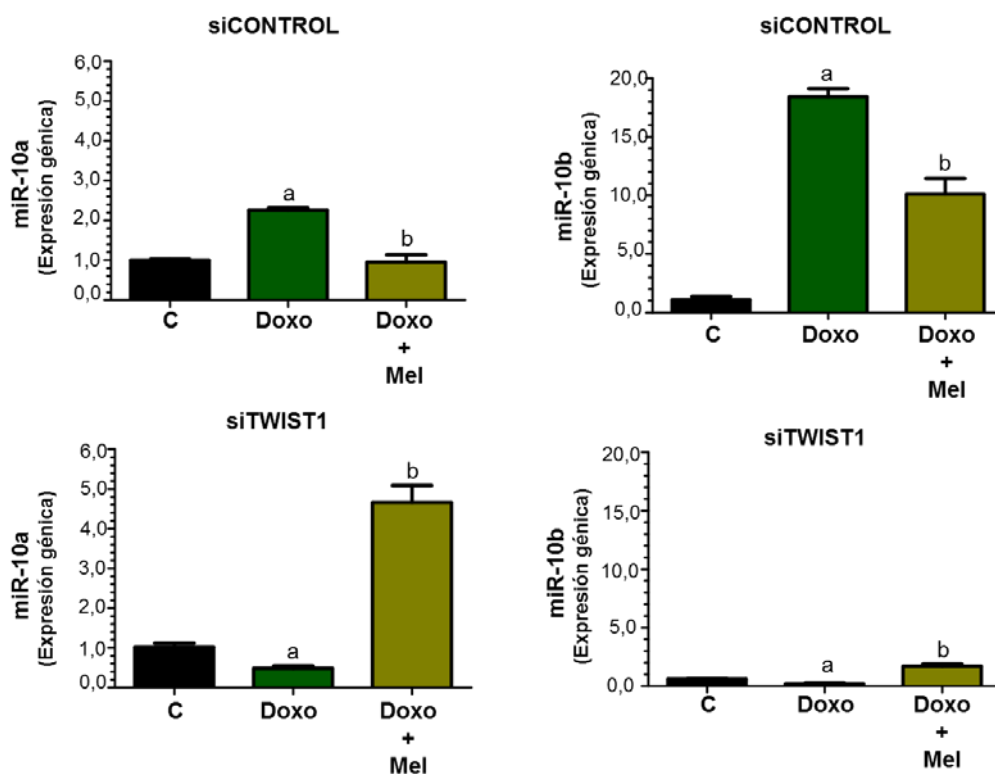


Figura 4.3.20: Detección por RT-PCR de miR-10a y miR-10b en células MCF-7 lipofectadas con siCONTROL o siTWIST1. Todos los datos se expresan como cambio de veces en relación con las células control (media $\pm$ SEM) de tres experimentos independientes. a, $p < 0,001$ vs C; b, $p < 0,001$ vs Doxo. C: control. Doxo: doxorubicina. Mel: melatonina. siCONTROL: siARNs no silenciadores (control negativo). siTWIST1: siARNs específicos para *Twist1*.

Por último, en estas células procedimos a determinar los niveles de expresión génica de *PLG*, *BIRC5* y *VEGFA*. La expresión de los tres se vio aumentada significativamente por doxorubicina en células MCF-7 lipofectadas con siControl y reducida drásticamente por el cotratamiento con melatonina. Sin embargo, la inducción en respuesta a la antraciclina se vio abolida por completo en las células lipofectadas con siTWIST1. Esto sugiere que la inducción de *PLG*, *BIRC5* y *VEGFA* por parte de la doxorubicina y la inhibición llevada a cabo por la melatonina son, al menos parcialmente, dependientes de Twist1 (**figura 4.3.21**).

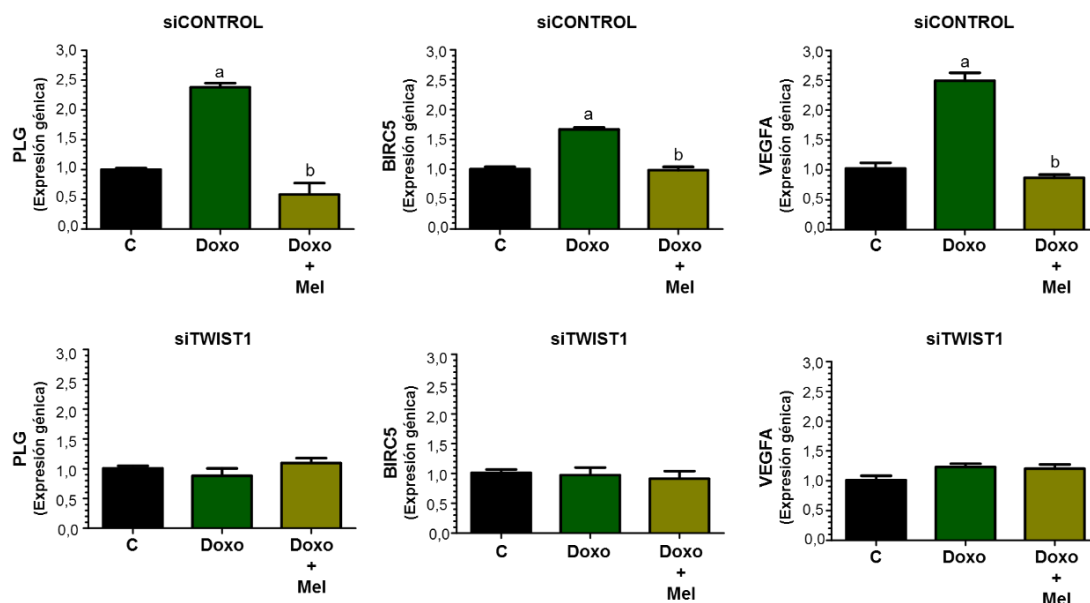


Figura 4.3.21: Detección por RT-PCR de la actividad transcripcional de *PLG*, *BIRC5* y *VEGFA* en células MCF-7 lipofectadas con siControl o siTWIST1. Después de 72 horas de lipofección con los siARNs correspondientes, las células se trataron durante seis horas con doxorrubicina (1 μ M) y melatonina (1 nM) y se analizó la expresión génica de *PLG*, *BIRC5* y *VEGFA* mediante RT-PCR. Todos los datos se expresan como cambio de veces en relación con las células control (media $\pm$ SEM) de tres experimentos independientes. a, $p < 0,01$ vs C; b, $p < 0,01$ vs Doxo. C: control. Doxo: doxorrubicina. Mel: melatonina. siCONTROL: siARN no silenciador (control negativo). siTWIST1: siARN específico para *TWIST1*.

4.3.12 Efecto de la melatonina y la doxorrubicina sobre el desarrollo de tumores mamarios en un modelo de xenógrafos de células MCF-7 en ratones atímicos

Al igual que en el capítulo anterior dedicado al docetaxel, los resultados de los experimentos *in vitro* recopilados hasta ahora en este capítulo sugieren que la melatonina podría ejercer como agente sensibilizador a los efectos antitumorales de la doxorrubicina.

Por ello, en la última parte de este objetivo decidimos estudiar los posibles efectos del tratamiento con doxorrubicina y/o melatonina en un modelo *in vivo* de tumores mamarios desarrollados en ratones atímicos de la cepa NMRI-Foxn1 nu^{-}/nu^{-} de seis semanas de edad, a los que se les implantaron de manera ortotópica células MCF-7 en ambos flancos inguinales. Cuando los tumores alcanzaron un volumen determinado (100 mm^3), los animales fueron asignados a cada uno de los grupos experimentales objeto de estudio: control (C); doxorrubicina (Doxo), administrada a una dosis de 2 mg/kg en inyección intraperitoneal una vez a la semana; melatonina (Mel), administrada de forma continua en el agua de bebida a una concentración de 25 mg/l; y doxorrubicina + melatonina. Los

animales control recibieron inyecciones intraperitoneales de solución salina y agua de bebida con 0,01% etanol (diluyente de la melatonina).

Como se puede observar en la **figura 4.3.22**, el peso corporal medio de los animales de cada grupo al comienzo del experimento estaba en torno a los 29 gramos. Tras seis semanas de tratamiento, el peso corporal de los animales tratados con doxorubicina, melatonina o ambos compuestos simultáneamente no se modificó de manera significativa con respecto a los animales del grupo control. El índice de supervivencia en todos los grupos experimentales fue del 100%.

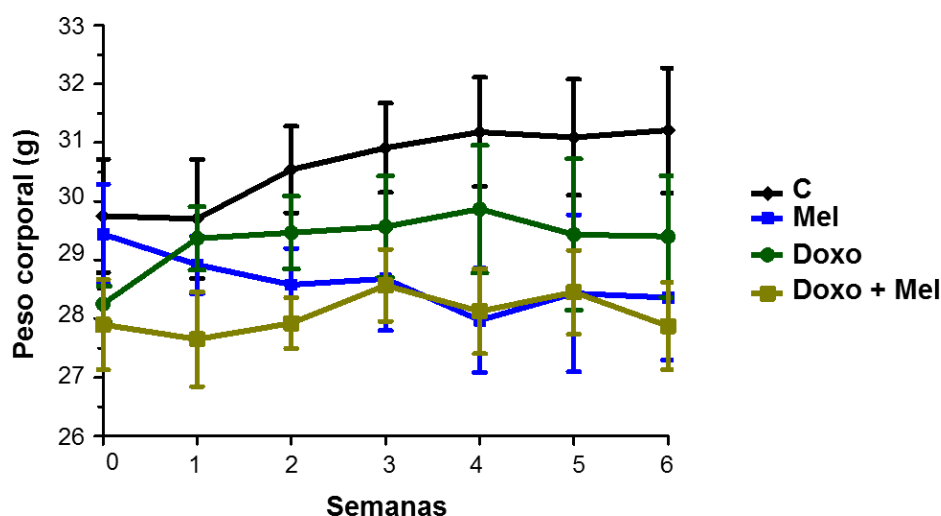


Figura 4.3.22: Efectos del tratamiento con doxorubicina y/o melatonina sobre el peso corporal en hembras de ratón atímico NMRI-Foxn1 nu/nu durante seis semanas (n=6). Los datos se muestran como la media $\pm$ SEM. C: control. Doxo: doxorubicina. Mel: melatonina.

Cuando analizamos la evolución del volumen tumoral en estos animales, pudimos comprobar que en el grupo control éste fue en aumento (desde los $178,2 \pm 18,7 \text{ mm}^3$ iniciales hasta un volumen de $607,5 \pm 27,1 \text{ mm}^3$ al final del experimento). Sin embargo, en aquellos animales que habían recibido melatonina, doxorubicina o una combinación de ambos tratamientos, se observó una disminución significativa del tamaño del tumor en comparación con los animales del grupo control a partir de la segunda semana. Más concretamente, en el grupo de melatonina el volumen pasó de ser $176,1 \pm 12,8 \text{ mm}^3$ al inicio del experimento a $96,3 \pm 13,8 \text{ mm}^3$ al final; en el caso del tratamiento con doxorubicina también se observó un descenso del volumen tumoral medio (desde $139,7 \pm 24,9 \text{ mm}^3$ en el inicio hasta $51,5 \pm 6,4 \text{ mm}^3$). Por último, en aquellos animales que recibieron tratamiento conjunto con doxorubicina y melatonina, el volumen descendió desde los $195 \pm 15 \text{ mm}^3$ iniciales hasta $61,25 \pm 8,3 \text{ mm}^3$ al final del experimento.

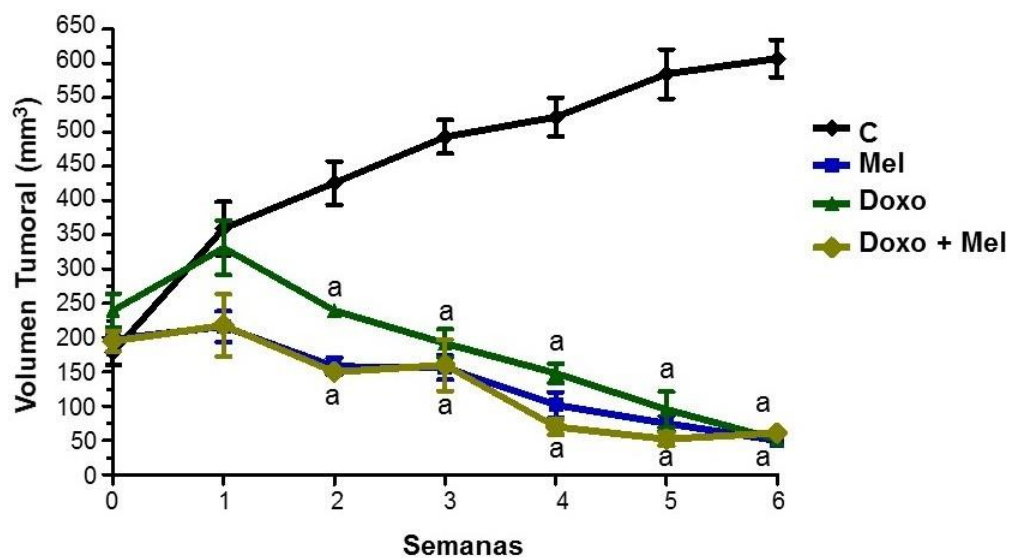


Figura 4.3.23: Efectos de la exposición a doxorubicina y/o melatonina sobre el volumen tumoral en hembras de ratón NMRI-Foxn1 nu/nu durante seis semanas (n=6). Los datos se muestran como la media $\pm$ SEM. a, $p < 0,05$ vs C. C: control; Doxo: doxorubicina. Mel: melatonina.

Por otra parte, el pequeño tamaño de los tumores extraídos de los ratones a las seis semanas trajo como consecuencia que no se pudiera extraer ARN de los mismos en cantidad y calidad suficientes como para poder llevar a cabo con éxito los experimentos de análisis de expresión multigénica.

DISCUSIÓN

Las antraciclinas como la doxorubicina se encuentran entre los fármacos más frecuentemente utilizados en quimioterapia, tanto adyuvante como neoadyuvante. La doxorubicina se une al ADN en un proceso de intercalación formando un complejo estable (Jawad y cols., 2019). Cabe recordar una vez más que los tratamientos de quimioterapia, incluida la doxorubicina, provocan una serie de efectos secundarios no deseados más o menos graves y el desarrollo de quimiorresistencia adquirida en muchos pacientes, lo que implica una variedad de eventos moleculares que aún no se conocen por completo (Ji y cols., 2019). Por lo tanto, el uso de compuestos adyuvantes al tratamiento con la doxorubicina podría jugar un papel fundamental a la hora de superar la resistencia, disminuir los efectos secundarios y mejorar la tolerancia a los agentes quimioterapéuticos. Aunque muchas de las modificaciones moleculares (tanto a nivel transcripcional como traduccional) desencadenadas por los fármacos quimioterapéuticos están siendo caracterizadas, todavía existen muchas otras respuestas moleculares inducidas en respuesta a la quimioterapia aún por elucidar (Lumachi y cols., 2015; Martínez-Campa y cols., 2017; Menéndez-Menéndez y Martínez-Campa, 2018). La melatonina se comporta como un agente protector contra la toxicidad inducida por doxorubicina (Rapoizzi y cols., 1998; Kim y cols., 2005). Más en concreto, en los últimos años, se ha descrito el efecto protector de la melatonina frente a la cardiotoxicidad (Li y cols., 2020b; Najafi y cols., 2020) y la nefrotoxicidad (Aygün y Gul, 2019) subsecuentes al tratamiento con la antraciclina. En cuanto a las células tumorales, la melatonina parece actuar potenciando la apoptosis y la citotoxicidad inducidas por la doxorubicina (Fic y cols., 2007; Koşar y cols., 2016; Pariente y cols., 2016, Yang y cols., 2020a). En ratas, la melatonina sensibiliza los tumores mamarios al tratamiento con la antraciclina (Ma y cols., 2015) y la interrupción de la producción nocturna de melatonina conduce a una pérdida completa de la sensibilidad tumoral a la doxorubicina (Xiang y cols., 2015). Sin embargo, la mayoría de mecanismos moleculares desencadenados por la doxorubicina y modulados por la melatonina siguen siendo desconocidos.

Por lo tanto, en este objetivo de nuestro trabajo nos propusimos profundizar en el conocimiento de los mecanismos moleculares desencadenados por la doxorubicina en la línea celular de adenocarcinoma mamario MCF-7, prestando especial interés a la identificación y caracterización de los cambios potencialmente negativos, para posteriormente estudiar el posible efecto protector de la melatonina administrada en combinación con la antraciclina.

En el primer bloque de experimentos realizados, comprobamos el efecto de la doxorubicina y la melatonina en la proliferación, migración e invasión de las células tumorales mamarias MCF-7 (RE+) y MDA-MB-231 (RE-). Como era de esperar, la doxorubicina ejerce un efecto claramente inhibitor sobre la proliferación de ambas líneas celulares. Nuestros resultados han puesto de manifiesto que la melatonina a dosis fisiológicas potencia el efecto represor de la antraciclina sobre la proliferación de las células MCF-7, pero no de las células MDA-MB-231, lo que sugiere que la efectividad de esta indolamina podría estar relacionada con la presencia o no del receptor de estrógenos en la célula tumoral.

Con respecto a la migración, nuestros resultados indican que el tratamiento con doxorubicina no influye sobre la capacidad migratoria de las células MCF-7, mientras que la presencia de melatonina, por sí sola o en combinación con la antraciclina, inhibe la misma. No sucede lo mismo con las células MDA-MB-231, cuya capacidad migratoria no se ve afectada por ninguno de los tratamientos. Por último, encontramos que el tratamiento con doxorubicina estimula el potencial invasivo de la línea celular MCF-7, efecto que es abolido cuando la melatonina es añadida conjuntamente con la antraciclina. Este resultado en principio sorprendente, no fue inesperado, ya que concuerda con estudios previos recogidos en la literatura donde ya se había descrito un efecto estimulador de la doxorubicina sobre el potencial invasivo en otros modelos (Bandyopadhyay y cols., 2010).

En contraposición, el potencial invasivo de la línea celular MDA-MB-231 no se vio alterado de manera significativa por ninguno de los dos compuestos, lo que sugiere de nuevo que el efecto de ambos podría estar relacionado con la expresión del receptor de estrógenos en las células tumorales mamarias.

En la siguiente batería de experimentos procedimos a caracterizar el perfil de expresión génica en células MCF-7, estudiando los cambios en la actividad transcripcional en respuesta a los diferentes tratamientos, mediante el estudio de 84 genes incluidos en el *RT² Profiler PCR Array* y catalogados como “relacionados con el cáncer de mama”. De esta manera, encontramos que la doxorrubicina regula al alza la expresión de 27 de esos genes e inhibe la de otros 17. Curiosamente, dentro del grupo de genes que clasifican como factores de transcripción, la doxorrubicina tiene un efecto inhibitor sobre un buen número de ellos, no encontrándose sin embargo ningún factor de transcripción estimulado en respuesta a la antraciclina. Cabe resaltar que la melatonina es capaz de modular muchas de las alteraciones a nivel transcripcional desencadenadas por la doxorrubicina, bien contrarrestándolas, bien potenciándolas.

No obstante, el estudio mediante *arrays* presenta la desventaja de que solamente se obtiene un valor único de expresión de cada gen en cada una de las membranas procesadas (correspondiente a un tratamiento experimental), por lo tanto, elegimos una serie de genes para su posterior estudio por RT-PCR, priorizando fundamentalmente aquellos para los que se obtuvieron valores muy diferentes entre al menos dos de los grupos experimentales comparados. En concreto, decidimos analizar la expresión de 16 genes con el objetivo de validar o descartar los resultados obtenidos en el análisis de los *arrays*. Es importante recordar una vez más que algunos de los genes pueden encajar en varios grupos diferentes debido a la variedad de sus funciones. Por ejemplo, p53 puede ser incluido en el grupo de “factores de transcripción”, “reguladores de ciclo celular” o “apoptosis y reparación del daño en el ADN”. Nosotros hemos clasificado los genes validados por RT-PCR eligiendo sólo uno de los posibles grupos de pertenencia para su inclusión.

Con respecto al grupo de transductores de señales, hemos comenzado por *NME1*, un gen supresor de tumores que actúa en el cáncer mamario como un supresor de metástasis (McCorkle y cols., 2014), y cuya rápida degradación a nivel transcripcional está asociada a la transición epitelio-mesénquima (Guo y cols., 2020). Nuestros datos indicaron que el tratamiento con doxorrubicina incrementó la expresión de este gen y que la melatonina no tuvo un efecto estimulador adicional sobre su expresión. *SNAI2* codifica para Slug, un factor que juega un papel fundamental en la diversificación y diferenciación de las células progenitoras del tejido epitelial mamario normal (Sterneck y cols., 2020) y que también se ha relacionado con la invasión y transición epitelio-mesénquima (Wang y cols., 2019). En nuestro estudio, hemos encontrado que la melatonina, por sí sola, reprime la

transcripción de *SNAI2* y revierte la activación transcripcional inducida por la doxorrubicina. Con respecto a *WEE1*, la doxorrubicina inhibe su expresión mientras que la hormona pineal tiene un modesto efecto activador sobre la misma. Este efecto no parece ser muy positivo ya que la inhibición de Wee1 está asociada a un efecto antitumoral induciendo la entrada en apoptosis de las células cancerosas mamarias, si bien es cierto que estos resultados recientemente publicados se han obtenido en una línea triple negativa (Pitts y cols., 2020). Por último, el gen *PGR* (receptor de progesterona, que habitualmente se encuentra sobre-expresado en carcinomas mamarios estrógeno-dependientes), es inhibido de una manera modesta pero significativa en respuesta a la doxorrubicina, efecto que es potenciado por el cotratamiento con melatonina, resultado en consonancia con estudios de expresión inmunohistoquímica llevados a cabo en pacientes (Kurozumi y cols., 2019).

Entre los genes relacionados con apoptosis, la melatonina contrarrestó significativamente el efecto estimulador de la doxorrubicina en la expresión de *MUC1*, un inhibidor de p53 que se encuentra comúnmente sobre-expresado en el cáncer (Wei y cols., 2007), y *BIRC5* (survivina), un inhibidor de la apoptosis altamente expresado en células resistentes a doxorrubicina (Hu y cols., 2015). En el cáncer de mama, altos niveles de expresión de *BIRC5* están relacionados con tiempos de supervivencia menores, y mayor riesgo de eventos metastásicos (Dai y cols., 2020). Con respecto al gen proapoptótico *BAX2* y al antiapoptótico *BCL-2*, los resultados que hemos obtenido en cuanto al tratamiento con doxorrubicina son muy similares a los que hemos descrito y discutido en el capítulo anterior con el docetaxel. El tratamiento con la antraciclina estimuló de manera significativa la expresión de *BAX2* y disminuyó los niveles de *BCL-2*. En este caso, aunque la melatonina por si sola estimuló la expresión de *BAX2* e inhibió la de *BCL-2*, no potenció de manera significativa el efecto de la antraciclina.

Dentro de los grupos de genes implicados en apoptosis y/o relacionados con el ciclo celular, en algunos casos, la melatonina y la doxorrubicina cooperaron para estimular la expresión génica como en el caso de *PTEN*, un gen supresor de tumores cuyas mutaciones causan quimiorresistencia, en particular en el cáncer de mama (Janaki-Ramaiah y Vaishnave, 2018). Recientemente se ha descrito que la doxorrubicina suprime la expresión de *PTEN* en tejido cardíaco de ratones, lo que podría ser uno de los mecanismos implicados en su cardiotoxicidad (Li y cols., 2020c). *CDKN1A* (p21), es el gen supresor tumoral que controla el ciclo celular y la progresión tumoral, aunque, recientemente, se

ha descrito que la sobreexpresión y una localización subcelular anormal de p21 podrían correlacionarse con una peor respuesta a quimioterapia (Zohny y cols., 2019). Además, se ha descrito que el grado de daño en el ADN, en relación a la dosis de doxorubicina empleada, va a determinar la respuesta de p21; un daño leve ocasionado por una dosis baja de la antraciclina va a resultar en un incremento en los niveles de p21, lo que llevaría a parada de ciclo celular y reparación del ADN mientras que un daño más severo por exposición a una dosis alta de la doxorubicina reprime la expresión de p21 y lleva a la célula a apoptosis (He y cols., 2020). Nuestros resultados indican que la expresión de *CDKN1A* es inducida por la antraciclina, teniendo la melatonina un potente efecto estimulador. En cuanto a *TP53*, tanto la melatonina por sí sola, como la doxorubicina ejercen un efecto estimulador sobre su expresión. Los resultados sobre la expresión de *CDKN1A* y *TP53* están en concordancia con estudios previos (Mediavilla y cols., 1999). En cuanto a los niveles del oncogén *c-MYC* (oncogén myelocytomatosis), al contrario de los que observamos en el caso del docetaxel, la doxorubicina no ejerció un efecto estimulador, sino que inhibió de manera modesta pero significativa la expresión del mismo. La adición de melatonina conjuntamente con la antraciclina tuvo un efecto inhibitor adicional. Este resultado puede tener su trascendencia ya que la sobre-expresión de *c-MYC* se ha relacionado con resistencia a doxorubicina en cáncer de mama (Cheng y cols., 2018).

El último grupo de genes estudiado mediante RT-PCR específicas fue el correspondiente a los factores de transcripción. *COP1*, es un factor con un efecto controvertido en el cáncer, ya que se ha descrito como un supresor de la progresión tumoral en el cáncer de mama (Shao y cols., 2013) pero también que intervine en la resistencia a la doxorubicina en las células de leucemia (Wan y cols., 2018). Nuestros resultados muestran que tanto la melatonina como la doxorubicina estimulan la expresión de *COP1*, y que el cotratamiento resulta en un efecto estimulador mayor que el de cada uno de los compuestos por separado. La doxorubicina 1 μ M inhibió significativamente los niveles de expresión de *GATA3*, sobre-expresado en tumores mamarios dependientes de estrógenos (Guo y cols., 2017b) y *XBP1*, que codifica para la proteína de unión a la caja X, resultado concordante con estudios previamente publicados (Jiang y cols., 2016). *Xbp1* promueve la transición epitelio-mesénquima y estimula la capacidad invasiva de las células tumorales mamarias (Li y cols., 2015). Para ambos genes (*GATA3* y *XBP1*), el

cotrataamiento con melatonina no tuvo un efecto relevante sobre la acción del quimioterápico.

La regulación transcripcional de *TWIST1* fue uno de los resultados más sorprendentes de esta parte del trabajo. Twist1 es un factor de transcripción involucrado en el desarrollo del mesodermo en la etapa embrionaria (Thisse y cols., 1987; Wang y cols., 1997) que se reexpresa en el cáncer, apareciendo elevado en el cáncer de mama invasivo (Cheng y cols., 2007) y evitando la detención del crecimiento que se produce en respuesta a p53 (Maestro y cols., 1999). Se ha descrito que Twist1 participa en la transición epitelio-mesénquima (Zhu y cols., 2016; Tang y cols., 2016) y se correlaciona con una baja supervivencia (Wushou y cols., 2014), invasión y metástasis (Mao y cols., 2020). Nuestros resultados muestran que el tratamiento de las células MCF-7 con doxorrubicina tuvo como consecuencia un llamativo aumento de la expresión de *TWIST1* mientras que el tratamiento conjunto con melatonina abolió este efecto. Los niveles de la proteína Twist1 aumentaron en las células tratadas con doxorrubicina y la melatonina disminuyó prácticamente por completo este efecto estimulador de la antraciclina. Estos resultados sugieren que la doxorrubicina tiene una doble acción: mata a las células tumorales, pero al mismo tiempo induce la expresión de *TWIST1* lo que conduce a la transición epitelio-mesénquima de las células supervivientes. Recientemente se ha descrito que niveles altos de expresión de *TWIST1* permiten predecir resistencia a la antraciclina (Demir y cols., 2019). El efecto estimulador de la doxorrubicina y el efecto inhibidor de la melatonina sobre la expresión de *TWIST1* en las células MCF-7 no se obtuvo en las células MDA-MB-231, lo que nuevamente sugiere una correlación entre las acciones de la doxorrubicina, los efectos protectores de la melatonina y la expresión del receptor de estrógenos. En esta misma línea celular el resultado de expresión de *CDKN1A* fue también muy dispar con respecto a lo observado en las células MCF-7, ya que la doxorrubicina indujo un modesto incremento en sus niveles, y la hormona pineal abolió este efecto estimulador.

El efecto inductor de la doxorrubicina y el efecto inhibidor de la melatonina sobre la expresión de *TWIST1* fueron concordantes con los resultados obtenidos al determinar los niveles de Twist1 en las células MCF-7 mediante técnicas de inmunofluorescencia y *western blot*. En resumen, los resultados de los experimentos de PCR, inmunofluorescencia y *western blot* demuestran que la doxorrubicina aumenta la expresión y los niveles de la proteína Twist1 en las células MCF-7, mientras que el

tratamiento con melatonina inhibe la expresión y reduce los niveles proteicos. A nuestro entender, esta es la primera vez que se documenta que la doxorrubicina estimula este factor implicado en la transición epitelio-mesénquima en células de cáncer de mama hormonodependiente, resultado que encaja con los descritos recientemente por otro grupo de investigación, quienes han documentado que la melatonina suprime metástasis del cáncer de pulmón, previniendo la transición epitelio-mesénquima al disminuir la regulación de *Twist1* (Chao y cols., 2019), indicando que *Twist1* podría ser una nueva diana molecular de la melatonina en diferentes tipos de cáncer.

El paso siguiente consistió en determinar la expresión de *TWIST1* en células MCF-7 cocultivadas con adipocitos. Nos pareció interesante llevar a cabo este experimento ya que se había descrito previamente que los adipocitos inducen la transición epitelio-mesénquima en las células de cáncer de mama al aumentar, entre otros factores, la expresión de *TWIST1* (Lee y cols., 2015; Yao-Borengasser y cols., 2015). Además, y dado que la activación transcripcional del promotor *CDKN1A* por p53 es suprimida significativamente por la inducción de *TWIST1* (Shiota y cols., 2008), decidimos comprobar si los adipocitos pueden inducir la expresión de *CDKN1A* en las células MCF-7. Efectivamente, el mero hecho de cocultivar estas células con adipocitos, incluso en ausencia de cualquier tratamiento, aumentó la expresión de *TWIST1* . Este efecto fue potenciado por la doxorrubicina. El tratamiento conjunto con melatonina abolió la acción estimuladora de la doxorrubicina sobre la expresión de este gen. Con respecto a la expresión de *CDKN1A* también fue estimulada por la presencia de adipocitos en los cocultivos y fue regulada positivamente por la doxorrubicina. En este caso, el cotratamiento con doxorrubicina más melatonina aumentó aún más los niveles de actividad transcripcional del gen *CDKN1A* . En conclusión, estos resultados sugieren que la presencia de los adipocitos promueve que las células de cáncer de mama adquieran un fenotipo más agresivo, y que el tratamiento con doxorrubicina contribuya a estimular los procesos de transición epitelio-mesénquima, mientras que la melatonina, en concentraciones fisiológicas, parece proteger contra la transición epitelio-mesénquima dependiente de *TWIST1* .

Dado que *Twist1* induce la angiogénesis *in vivo* (Mironchik y cols., 2005; Wang y cols., 2017), decidimos examinar el perfil de expresión génica de 84 genes relacionados con la angiogénesis en células MCF-7 tratadas o no con doxorrubicina y en presencia o no de melatonina. El tratamiento con doxorrubicina aumentó la expresión de 16 de estos genes

en relación a las células no tratadas y redujo la de 8. Cuando además de la antraciclina, se incluyó la melatonina en el tratamiento, el número de genes estimulados fue de tan sólo 5, mientras que el número de genes cuya expresión se vio inhibida aumentó hasta 14. Procedimos entonces a validar mediante PCR la expresión de 8 genes, con un cambio de expresión, entre alguno de los tratamientos o con respecto al grupo control de células no tratadas, de al menos 1,5 veces.

La doxorrubicina estimuló la expresión de los siguientes factores proangiogénicos: el plasminógeno (*PLG*), regulado negativamente por compuestos capaces de suprimir la transición epitelio-mesénquima dependiente de *Twist1* (Han y cols., 2018); la angiopoyetina 2 (*ANGPT2*), que participa en la interrupción de la barrera hematoencefálica y en la metástasis del cáncer de mama en el cerebro (Avraham y cols., 2014); el factor de crecimiento insulínico 1 (*IGF1*), que es un regulador positivo de *TWIST1* (Zhao y cols., 2017); *GLI1*, que se activa cuando *TWIST1* está activado y facilita la migración e invasión (Zhou y cols., 2016; Li y cols., 2018); y por último *SERPINE1*, con un papel importante a la hora de promover metástasis en cáncer de mama, y cuya expresión se encuentra aumentada en células cocultivadas con adipocitos (Yadav y cols., 2020). Es importante destacar que la melatonina bloqueó parcialmente el efecto estimulador de la doxorrubicina en la expresión de 4 de estos factores proangiogénicos: *PLG*, *ANGPT2*, *IGF-1* y *GLI1*, y su adición fue inefectiva solamente en el caso de *SERPINE1*, lo que en global indica un efecto antiangiogénico de la hormona pineal.

Además de esto, encontramos que la melatonina, la doxorrubicina y la combinación de ambas redujeron los niveles de *VEGFA*. *Twist1* regula positivamente este factor de crecimiento, lo que induce la angiogénesis en las células endoteliales de la vena umbilical humana (Wang y cols., 2016), tal y como ya se había descrito en algunos trabajos previos de nuestro laboratorio (Álvarez-García y cols., 2013). La expresión de *AKT1* también se redujo significativamente con melatonina como se ha descrito previamente (Proietti y cols., 2011; Xue y cols., 2012; Wang y cols., 2012). En las células de cáncer de ovario quimiorresistentes, la inhibición de la fosforilación de Akt tiene como consecuencia la inactivación de p70S6 quinasa lo que a su vez inactiva a *Twist1* (Wu y cols., 2019). Durante la noche, la exposición a la luz induce una interrupción circadiana de la síntesis nocturna de melatonina, lo que contribuye a la resistencia a la doxorrubicina en el cáncer de mama (Xiang y cols., 2015). Dado que tanto la melatonina como *Twist1* influyen en la expresión de multitud de genes reloj relacionados con la ritmicidad circadiana, que en

muchos casos desempeñan papeles importantes en la tumorigénesis (Hwang-Verslues y cols., 2013; Cadenas y cols., 2014; Meier y cols., 2015) y que la inactivación de algunos de ellos como: *CLOCK*, *CRY1*, *BMAL1* y *PER1* se ha propuesto como un mecanismo que aumenta el riesgo de cáncer de mama en trabajadores a turnos (Samulin y cols., 2017), estudiamos a continuación el efecto de la doxorrubicina en la expresión de los genes reloj en las células MCF-7. La doxorrubicina estimuló *CRY1*, *CRY2*, *CLOCK*, *BMAL1* y *PER2* y la melatonina mejoró significativamente estos efectos estimulantes de la antraciclina en la mayor parte de los casos, lo que puede interpretarse como un efecto global protector frente a la progresión tumoral. Con respecto a *TIMELESS*, su expresión es inducida por la doxorrubicina, efecto que se ve revertido cuando se incluye melatonina en el tratamiento. Este podría ser otro hallazgo importante ya que Timeless activa a c-Myc, mecanismo previamente descrito como implicado en la resistencia al tamoxifeno (Chi y cols., 2017; Magne Nde y cols., 2018).

Como habíamos mencionado anteriormente, *AKT1* es uno de los genes sobreexpresado con más frecuencia en muchos tipos de cáncer, entre ellos el de mama (López-Cortés y cols., 2020). Se ha descrito su relevancia en células de cáncer de ovario quimio-resistentes, puesto que la inhibición de la fosforilación de Akt desencadena la inactivación de p70S6 quinasa con la consecuente disminución de la actividad de Twist1 (Wu y cols., 2019).

Por lo tanto, en el siguiente grupo de experimentos centramos nuestra atención en las vías intracelulares desencadenadas por la fosforilación de diversos factores y proteínas quinasas, con el objetivo de identificar los posibles cambios desencadenados por la antraciclina y su hipotética modulación por la hormona pineal. En un ensayo de perfil de proteoma, encontramos que el tratamiento con doxorrubicina ocasionó un ligero efecto activador sobre la fosforilación de Akt. La fosforilación de Akt se correlaciona con un mal pronóstico y se ha encontrado en células MCF-7 pero no en MDA-MB-231 (Cicenas y cols., 2005; Yndestad y cols., 2017). La supresión de PTEN activa la señalización de la vía Akt/mTOR/p70S6K y disminuye la sensibilidad de las células MCF-7 a la doxorrubicina (Steelman y cols., 2008). La proteína p-Akt fosforila Twist1 contribuyendo así a la transición epitelio-mesénquima y a la metástasis del cáncer de mama (Xue y cols., 2012). Los resultados de nuestros experimentos nos permiten concluir que la melatonina disminuye los niveles de p-mTOR y p-Akt. La inhibición moderada de p-Akt en las células tratadas simultáneamente con doxorrubicina y melatonina sugiere que la

activación de Twist1 por la antraciclina podría estar regulada por otras vías de señalización diferentes de Akt/mTOR. También observamos un aumento en la fosforilación de p70S6 quinasa en respuesta a la doxorrubicina y una disminución cuando la antraciclina se administra junto con la melatonina. La activación de la vía S6 se ha correlacionado con la inducción de la transición epitelio-mesénquima y la metástasis en el carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (Wu y cols., 2016), y en el cáncer de mama, se ha correlacionado con el mal pronóstico y la resistencia al tamoxifeno (Bostner y cols., 2015). Curiosamente, nuestros resultados mostraron que la fosforilación de S6 es inhibida por doxorrubicina y más reprimida aún por la melatonina, en paralelo con una disminución en los niveles del RE α . Analizamos los niveles del RE α al mismo tiempo que los niveles de Twist1, ya que se ha descrito previamente que la melatonina regula negativamente al RE en las células MCF-7 (Molis y cols., 1995). La doxorrubicina aumenta al RE (Shirley y cols., 2009) y las líneas celulares que presentan altos niveles de Twist1 tienen bajos niveles de RE, siendo el aumento de los niveles de Twist1 un mecanismo que podría contribuir a la generación de cáncer de mama RE-negativo resistente a hormonas (Vesuna y cols., 2012). En nuestro modelo, el tratamiento con melatonina disminuyó los niveles de ambas proteínas, tanto sola como en combinación con doxorrubicina.

Los microARNs están implicados en una amplia gama de vías de señalización intracelular (Ambros, 2001). Con respecto a la carcinogénesis, pueden actuar como oncogenes o genes supresores de tumores (Zhang y cols., 2007). Por lo tanto, en otro de los bloques experimentales llevados a cabo en este objetivo, estudiamos la expresión de algunos microARNs que se sabe que juegan papeles importantes en el cáncer, algunos de ellos relacionados directamente con Twist1.

El miR-34a protege contra la proliferación, la invasión y la metástasis del cáncer de mama al inhibir directamente Twist1 (Rokavec y cols., 2014; Imani y cols., 2017; Rui y cols., 2018). Nuestros resultados indican que en las células MCF-7, la doxorrubicina estimula la expresión de miR-34a, quizás como mecanismo para compensar la inducción de *TWIST1*. Es importante destacar que el tratamiento con melatonina estimuló aún más la expresión de miR-34a.

El miR-29a participa en la proliferación e invasión de las células MCF-7 de manera dependiente de la vía de IGF1 (Li y cols., 2017). La regulación negativa de miR-29a se correlaciona de manera inversa con una regulación positiva de p21 y p53, lo que lleva a las células tumorales a la apoptosis (Khamisipour y cols., 2018). Nosotros encontramos que las células tratadas con doxorrubicina más melatonina mostraron niveles más bajos de miR-29a, lo que podría ser otro mecanismo de protección contra la malignidad.

Por su parte, el papel de miR-31 en el cáncer de mama resulta controvertido. Mientras algunos artículos concluyen que miR-31 inhibe la invasión y la metástasis en modelos de líneas celulares de cáncer de mama (Soheilyfar y cols., 2018), y que los niveles de expresión de miR-31 están disminuidos en pacientes de cáncer de mama (Kundaktepe y cols., 2020), otros autores afirman que promueve la proliferación celular y la metástasis (Lv y cols., 2017). En nuestro caso, los niveles de miR-31 están regulados negativamente por doxorrubicina y el tratamiento conjunto con melatonina inhibió aún más la expresión de este miARN.

El microARN-10a es un inhibidor de la progresión del cáncer de mama, que promueve la apoptosis de las células MCF-7 a través de PI3/Akt/mTOR. La sobreexpresión de miR-10a promueve la apoptosis e inhibe la proliferación y la migración, a la par que suprime la activación de p70S6 quinasa. Este microARN está suprimido en tumores mamarios altamente agresivos (Ke y Lou, 2017). También con respecto a esta molécula existe cierta controversia, ya que otros estudios indican que sus niveles son más altos de lo normal en células tumorales resistentes a doxorrubicina (Rong y cols., 2016). Nuestros resultados mostraron que, aunque la melatonina por sí sola tiene un efecto estimulante en su expresión, no puede mejorar la inducción de miR-10a en respuesta a la doxorrubicina, lo que sugiere que miR-10a no juega un papel crucial en la activación transcripcional de *TWIST1* en respuesta al quimioterápico.

El miR-145 parece actuar como un supresor de tumores en cáncer colorrectal inhibiendo a Twist1 (Shen y cols., 2019). En el cáncer de ovario, sin embargo, parece intervenir en un mecanismo completamente diferente (aunque con un resultado final similar) del que también forman parte p70S6 quinasa y Twist1. La p70S6 quinasa previene la maduración de miR-145 y en consecuencia los niveles de Twist1 aumentan, tanto por el aumento de la actividad transcripcional como por la estabilización de su ARNm, lo que en último término lleva a metástasis (Lam y cols., 2016). La reactivación de miR145 suprime la migración y la invasión de las células de cáncer de mama (Liu y cols., 2017a).

En nuestro modelo, la expresión de miR-145 es estimulada por doxorubicina y melatonina, sin embargo, el cotratamiento con ambos compuestos no trajo como consecuencia un aumento aditivo en los niveles de miR-145.

El último de los microARNs que estudiamos en este grupo de experimentos fue el miR-10b, descrito como un microARN oncogénico implicado en la invasión tumoral, la angiogénesis, la motilidad celular y la metástasis (Liu y cols., 2017b). En el cáncer de ovario este microARN está implicado en la resistencia a cisplatino y en la transición epitelio-mesénquima (Tan y cols., 2020). Twist1 induce miR-10b (Tsukerman y cols., 2014; Abdelmaksoud-Dammak y cols., 2017) promoviendo metástasis óseas de cáncer de mama (Croset y cols., 2014). En nuestros experimentos encontramos que la doxorubicina estimula fuertemente la expresión de miR-10b, pero la adición de la melatonina conjuntamente con la antraciclina revierte por completo ese efecto. Por lo tanto, la inhibición de miR-10b, probablemente una consecuencia directa de la inhibición de *Twist1* , podría ser otro mecanismo que podría explicar el papel protector de la melatonina en las células MCF-7 tratadas con doxorubicina.

Para determinar si el efecto estimulador de la doxorubicina sobre el miR-10b está directamente relacionado con la sobreexpresión de *TWIST1* en respuesta a la antraciclina, procedimos a silenciar *TWIST1* mediante el empleo de siARNs, y a estudiar el efecto de la doxorubicina sobre la expresión de miR-10b en las células lipofectadas. El bloqueo de la expresión de *TWIST1* por la tecnología siARN abolió por completo la inducción que provocaba la doxorubicina sobre la expresión de miR-10b, lo que sugiere que el efecto inductor de la antraciclina sobre miR-10b es dependiente de la inducción previa de *TWIST1* . Cabe señalar que si bien nuestros resultados sugieren que miR-10a no juega un papel crucial en la activación transcripcional de *TWIST1* en respuesta a la doxorubicina, el silenciamiento de este último sí parece permitir una expresión mayor de este microARN en las células tratadas conjuntamente con doxorubicina y melatonina. Además, en las células en las que la expresión de *TWIST1* ha sido silenciada, algunos genes inducidos en respuesta a la doxorubicina, como *PLG* , *BIRC5* y *VEGFA* , ven abolido el efecto estimulador de la antraciclina, lo que sugiere de nuevo que Twist1 podría estar involucrado en los cambios de expresión de estos genes observados durante el tratamiento con doxorubicina y melatonina.

Finalmente, en nuestro modelo experimental *in vivo* de xenógrafos generados en ratones atímicos a partir de células MCF-7, hemos demostrado que la administración a los ratones de melatonina, doxorubicina o ambos tratamientos a la vez disminuye de manera significativa el crecimiento del tumor con respecto a los tumores procedentes de animales del grupo control. Sin embargo, la drástica disminución del volumen tumoral tras seis semanas de tratamiento no nos permitió aislar ARN en cantidad y calidad suficientes como para llevar a cabo estudios de expresión génica.

En conclusión, nuestros resultados nuevamente apuntan a que la melatonina podría ejercer una serie de efectos protectores cuando se utiliza doxorubicina en el tratamiento del cáncer de mama hormonodependiente. La hormona pineal es capaz de modular muchos de los cambios desencadenados por el tratamiento con la antraciclina. Los resultados obtenidos en este capítulo abren nuevas perspectivas esperanzadoras en la hipótesis de que la melatonina podría ser un buen agente a utilizar en pacientes tratadas con doxorubicina. Al igual que sugerimos en el caso del docetaxel, nuestros resultados apuntan a que el empleo de melatonina en clínica debería estudiarse en ensayos controlados para esclarecer la eficacia de esta combinación. Quizás el resultado más interesante de este capítulo podría ser el efecto estimulador del quimioterápico sobre la actividad transcripcional y los niveles proteicos de Twist1, efecto no descrito anteriormente y que es totalmente abolido por el cotratamiento con melatonina. Este efecto podría ser dependiente de la vía de la mTOR/Akt1/p70S6K como elementos anteriores a la regulación de Twist1, mientras que el miR-10b podría ser una de las dianas clave de este factor transcripcional. La melatonina también suprime la expresión de este microARN, de manera dependiente de Twist1. Estos resultados en su conjunto nos han permitido profundizar en el conocimiento de los cambios moleculares que tienen lugar en las células tumorales en respuesta a la quimioterapia, de cómo algunos de estos cambios son potencialmente peligrosos pudiendo conducir a supervivencia y resistencia, y de cómo la melatonina puede ejercer efectos protectores impidiendo que al menos algunos de estos cambios acontezcan en las células tratadas con quimioterapia.

DISCUSIÓN GENERAL

5. DISCUSIÓN GENERAL

Durante las últimas décadas se ha podido constatar un aumento sostenido en la incidencia del cáncer de mama, de tal manera que en la actualidad es, en mujeres, el cáncer más frecuentemente detectado a nivel mundial. Se ha pasado de un caso por cada veintidós mujeres en la primera mitad del siglo XX a un caso por cada siete en la actualidad. A pesar de los avances en el diagnóstico precoz y en los tratamientos, esta enfermedad aún sigue siendo una de las causas más importantes de mortalidad por neoplasia entre las mujeres, según los datos que año a año ofrece la Organización Mundial de la Salud, diagnosticándose cerca de tres millones de nuevos casos cada año. Todos estos datos confirman por tanto que nos encontramos ante un complejo y grave problema de salud pública.

Este aumento sostenido de la incidencia a lo largo de las últimas décadas está directamente relacionado con los cambios que se han producido en el estilo de vida, lo que ha llevado parejo un aumento de los factores de riesgo ambientales, sin olvidar que un cierto porcentaje de casos están relacionados con factores genéticos. Algunos de los factores de riesgo más comunes son la edad (más de dos tercios de los tumores se detectan a partir de los 40 años) y el sexo (casi todos los tumores se detectan en mujeres). Cabe destacar que en más del 75% de los casos, los tumores mamarios son hormonodependientes, lo que equivale a decir que las células tumorales expresan cantidades anormalmente elevadas del receptor de estrógenos alfa, del receptor de progesterona o de ambos tipos de receptores simultáneamente.

Las tasas de incidencia de tumores mamarios son mayores en países desarrollados, como Estados Unidos y países de Europa. Afortunadamente, la tasa de mortalidad también ha descendido a lo largo de los años, debido en gran parte a los programas de detección precoz y a las mejoras introducidas en los tratamientos pautados. Dichos tratamientos incluyen quimioterapia y radioterapia neoadyuvante (buscando reducir el tamaño del tumor como paso previo a la cirugía), la cirugía propiamente dicha, la terapia hormonal, también denominada endocrina, la quimioterapia y la radioterapia adyuvante (que persigue la disminución de la tasa de recidiva locorregional) y, por último, otro tipo de estrategias más recientes como la inmunoterapia, en la que podemos incluir el uso de anticuerpos monoclonales contra determinadas proteínas expresadas de manera anómala en los tumores mamarios, y la búsqueda de vacunas activas, utilizando en algunos casos estas mismas dianas moleculares para el desarrollo de las mismas.

Con respecto a la terapia hormonal, evidentemente la idea se sustenta en el elevado número de tumores mamarios cuyo crecimiento, al menos inicialmente, es dependiente de los estrógenos. Debido a que los estrógenos pueden ejercer un papel carcinogénico, el tratamiento del cáncer hormonodependiente ha desarrollado estrategias encaminadas a neutralizar los efectos perjudiciales de los estrógenos sobre la mama. Desde que Beatson, a finales del siglo XIX, introdujera la ovariectomía como un tratamiento pionero se han ido desarrollando nuevas ideas que han resultado en la aparición de diversos fármacos antiestrogénicos (Beatson, 1896).

Tras la menopausia, (que coincide con edades en las que la incidencia de cáncer de mama aumenta considerablemente), aproximadamente el 90% de los estrógenos totales se sintetizan mediante la aromatización de la androstenediona en estrona. Teniendo en cuenta, además, que el tejido tumoral mamario y el tejido peritumoral (fibroblastos del tejido adiposo y células del endotelio vascular) sobreexpresan la aromatasa, enzima responsable de dicha conversión, la primera estrategia consistió en el desarrollo de inhibidores de la aromatasa (IAs). El primer inhibidor documentado con una cierta eficacia antitumoral fue la Aminoglutetimida. Tras ésta, aparecieron inhibidores de segunda generación, como el Fadrazol, y de tercera generación, como el Letrozol, el Examestano o el Anastrozol, con una mejor eficacia clínica en comparación con la Aminoglutetimida. Los fármacos de este grupo se clasifican como inhibidores selectivos de los enzimas requeridos para la síntesis de estrógenos (*SEEMs*).

Un segundo grupo de fármacos actúa inhibiendo de manera selectiva la actividad transcripcional mediada por el receptor de estrógenos alfa. Dentro de estos podemos encontrar el Tamoxifeno (que actúa como antagonista en la mama, pero presenta el problema de actuar como agonista en el endometrio) y el antiestrógeno puro Fulvestrant, que también se comporta como un antagonista del receptor de estrógenos, en este caso sin mostrar ninguna actividad de agonista parcial en otros tejidos. Ambos fármacos compiten con el estradiol y tras su unión, provocan un cambio conformacional en el receptor de estrógenos cuya consecuencia es que en lugar de comportarse como un factor de transcripción (como ocurre tras la unión del estradiol) pase a comportarse como un represor de la misma. Este grupo de fármacos se conocen como inhibidores selectivos del receptor de estrógenos (*SERMs*). Los *SEEMs* y *SERMs* son los fármacos más extensamente utilizados en el tratamiento del cáncer de mama hormonodependiente, aunque existen otras estrategias alternativas, como aquellas que se basan en inhibir

selectivamente a las quinasas dependientes de las ciclinas 4 y 6 (Palbociclib), la vía de PI3K/mTOR (Everolimus) o inhibidores de las histona-deacetilasas (HDACs), como la trichostatina A o el ácido valproico.

En 1958, Aaron B. Lerner aisló e identificó una molécula aislada a partir de glándulas pineales bovinas (Lerner y cols., 1958). Esta nueva molécula, un derivado del triptófano, es una indolamina (N-acetil-5-metoxitriptamina), que se denominó melatonina, nombre relacionado con su efecto en el aclaramiento de los melanóforos (*mela-*) de los anfibios y también debido a que el precursor de la melatonina es la serotonina (*-tonina*).

La melatonina es una hormona secretada principalmente durante la noche y, desde su descubrimiento, se le han atribuido múltiples funciones fisiológicas. Esta indolamina es una molécula pleiotrópica que actúa como hormona en los mamíferos. Entre sus funciones podemos destacar: a) El control de la reproducción estacional; b) La capacidad de reducir el estrés oxidativo directa o indirectamente (inhibiendo la actividad de las enzimas prooxidativas y estimulando las enzimas antioxidantes); c) La mejora sobre la inmunidad, tanto natural como adquirida, en los mamíferos; d) Su función como sincronizador del ritmo circadiano del ciclo sueño-vigilia, actuando como regulador fisiológico del sueño; e) La capacidad para prevenir el cáncer, un efecto inhibitor que involucra tanto a los mecanismos independientes como dependientes de su receptor de membrana en las fases de iniciación, promoción, progresión y metástasis maligna (Reiter, 1991b; Zhang y cols., 1997; Reiter y cols., 2016; Zisapel, 2018). Desde el punto de vista de este trabajo, éste es el efecto más interesante puesto que es la propiedad que nos ha permitido plantear las hipótesis de nuestros planteamientos experimentales. Más del 80% de los trabajos que intentan esclarecer las implicaciones de la melatonina en el cáncer se han publicado en las dos últimas décadas, lo que resalta la importancia de este campo de investigación. El papel de la melatonina se ha investigado ampliamente en muchas neoplasias diferentes, lo que ha permitido obtener multitud de resultados que evidencian que la administración de la hormona pineal está asociada con un menor riesgo y/o progresión del cáncer, como se demostró en diferentes modelos *in vivo* e *in vitro* (Blask y cols., 2002; Mediavilla y cols., 2010; Martínez-Campa y cols., 2017; Reiter y cols., 2017).

La mayoría de los efectos anticancerígenos de la melatonina se describieron inicialmente en modelos de tumores mamarios endocrinos. Sin embargo, cientos de artículos recientes han probado que la hormona pineal presenta efectos antitumorales en muchos otros tipos de cáncer.

En 1978, Cohen y colaboradores concibieron una hipótesis novedosa, en la que propusieron que una función disminuida de la glándula pineal podría promover un aumento en el riesgo de cáncer de mama, como consecuencia de un tiempo prolongado de exposición a los estrógenos circulantes. Esta hipótesis se basó en varias observaciones correspondientes a aquel momento: a) La incidencia de cáncer de mama era más baja en los países en los que la calcificación pineal era menor; b) Los pacientes que tomaban clorpromazina, un fármaco que aumenta los niveles circulantes de melatonina, presentaban una menor incidencia de cáncer de mama; c) Los datos *in vitro* existentes en aquel momento sugerían que la melatonina podía tener efectos directos sobre las células tumorales mamarias; d) Los receptores de melatonina están presentes en las células ováricas humanas, lo que les hizo pensar que la melatonina podía tener una influencia directa en la producción ovárica de estrógenos (Cohen y cols., 1978).

Tomando estas observaciones como punto de partida, se procedió a determinar los niveles de melatonina presentes en plasma de mujeres con cáncer de mama en estadio clínico I o II. Los resultados obtenidos permitieron concluir que la amplitud del pico nocturno de melatonina plasmática estaba reducida en mujeres con cáncer de mama con receptor de estrógeno positivo en comparación con pacientes con tumores con estrógeno negativo o personas sanas (grupo control), lo que llevó a proponer una correlación entre las concentraciones bajas de melatonina durante la noche y el riesgo de malignidad mamaria (Tamarkin y cols., 1982). En 1987, basándose en el trabajo de Cohen, Richard Stevens sugirió la hipótesis de que las mujeres que están expuestas a la luz nocturna (LAN) tendrían mayor incidencia de cáncer de mama (Stevens, 1987).

Ya en este siglo, en 2001, Schernhammer y colaboradores encontraron una relación entre el trabajo nocturno llevado a cabo durante periodos de tiempo largos y el riesgo de desarrollar cáncer de mama en una cohorte de enfermeras premenopáusicas, particularmente en aquellas mujeres que habían tenido más de 20 años de turnos nocturnos rotativos (Schernhammer y cols., 2001). Algunos otros estudios han evaluado la asociación entre la exposición a la luz exterior residencial durante las horas nocturnas y el riesgo de cáncer de mama o de próstata entre sujetos que nunca trabajaron de noche,

concluyendo que tanto el cáncer de próstata como el invasivo de mama se asociaron con una alta exposición a la LAN exterior (James y cols., 2017; García-Sáenz y cols., 2018). Todos estos resultados apoyan la hipótesis de que, en mujeres premenopáusicas sanas, la exposición a LAN puede resultar en un mayor riesgo de desarrollar tumores mamarios a través de la interrupción de las acciones oncostáticas circadianas de la melatonina.

La mayoría de los estudios *in vivo* que han permitido establecer el papel de la melatonina en el cáncer de mama sensible a los estrógenos han utilizado modelos animales de carcinomas inducidos en ratas con agentes químicos como el 7,12-dimetil-1,2-benzantraceno (DMBA) o la N-metil-N-nitrosourea (NMU). Los resultados obtenidos demostraron que los animales tratados con melatonina presentaban una mayor supervivencia y una menor incidencia de tumores, generalmente acompañado de una mayor regresión en los tumores previamente inducidos. Además, se ha descrito que en roedores tratados con DMBA y que recibieron melatonina la expresión del ER α a nivel tumoral era menor. En definitiva, los resultados obtenidos en estos modelos animales sugieren que la melatonina puede contrarrestar la acción de los estrógenos sobre el desarrollo tumoral (Blask y cols., 1991).

Las células MCF-7, con crecimiento dependiente de estrógenos debido a su alta expresión del ER α , se han utilizado ampliamente como modelo de cáncer mamario *in vitro*. Numerosos grupos de investigación han publicado que el tratamiento con la hormona pineal a la concentración fisiológica nocturna (1 nM) presenta un efecto antiproliferativo en estas células, basado en la capacidad de esta indolamina para modular la síntesis de estrógenos o las vías de señalización mediadas por los mismos (Cos y cols., 2006). De manera diferencial con respecto a otras moléculas antiestrogénicas utilizadas en la clínica, como el tamoxifeno, que funciona como un antagonista selectivo del receptor de estrógenos alfa debido a que en el complejo 4-hidroxitamoxifeno-hRE alfa, la hélice 12 ocluye el surco de reconocimiento del coactivador (Shiau y cols., 1998), la melatonina disminuye los niveles de expresión del RE α en las células MCF-7 (Molis y cols., 1994), y además, interfiere con la activación transcripcional desencadenada por el estradiol de muchos genes de respuesta a estrógenos a través de la desestabilización del complejo estradiol-RE, evitando su unión al ADN tanto en el elemento de respuesta al estrógeno (ERE) como en los promotores que contienen la proteína activadora 1 (AP1). Estas acciones de la melatonina probablemente estén mediadas por la calmodulina, proteína que se une al RE α y sobre la que la melatonina se comporta como un antagonista. Más

concretamente, la hormona pineal promueve cambios estructurales en el complejo calmodulina-RE α , lo que desestabiliza su unión a los promotores sensibles a estrógenos (Bouhoute y Leclercq, 1996; Rato y cols., 1999; del Río y cols., 2004). Debido a estas acciones diferenciales de la melatonina y el tamoxifeno en el receptor de estrógenos, se ha postulado que ambas moléculas podrían cooperar y efectivamente, se ha documentado que dosis fisiológicas de melatonina aumentaban la sensibilidad de las células MCF-7 al tamoxifeno *in vitro* (Wilson y cols., 1992). Además, las acciones *SERM* de la melatonina se pueden explicar a través de mecanismos mediados por su receptor de membrana tipo 1 (MT-1), ya que la unión de la hormona a su receptor da como resultado la inhibición de la enzima adenilato ciclasa, y por tanto reduce los niveles intracelulares de AMPc (Godson y Reppert, 1997).

La melatonina también es capaz de regular tanto la transcripción como la actividad de muchas de las enzimas involucradas en la síntesis de estrógenos, y lo hace tanto sobre las que participan convirtiendo los estrógenos inactivos en compuestos fisiológicamente activos, como sobre las que los inactivan a través de su conversión en sulfatos de estrógenos. Además, este efecto de la melatonina se produce no solamente sobre las células tumorales, sino también sobre las células endoteliales y fibroblásticas ubicadas en los tejidos adyacentes al tumor. Así, se ha descrito que la hormona pineal es capaz de regular los mecanismos paracrinós responsables de la interacción entre las células tumorales mamarias y los fibroblastos o las células endoteliales que las rodean, inhibiendo los procesos de proliferación, invasión y reorganización asociados a la angiogénesis (González y cols., 2012; Álvarez-García y cols., 2012; Álvarez-García y cols., 2013a; Álvarez-García y cols., 2013b; González y cols., 2015).

En los últimos años se han publicado varios trabajos que apuntan a que la melatonina es un agente prometedor a considerar como adyuvante de la quimioterapia a incluir en el tratamiento del cáncer de mama, pero también de otros muchos tipos de tumores. Así, la melatonina potenció el efecto antiproliferativo del ácido valproico sobre las células MCF-7 (Jawed y cols., 2007). La exposición a luz nocturna indujo una alteración circadiana de la secreción de melatonina en ratas xenotransplantadas con estas mismas células, lo que ocasionó una pérdida completa de la sensibilidad tumoral a la doxorrubicina (Xiang y cols., 2015). Combinada con esta misma antraciclina, la hormona pineal aumentó la apoptosis en un modelo *in vivo* de ratas con tumores de mama inducidos, que además presentaron una tasa de supervivencia a un mes más alta y tumores de menor peso

(Ma y cols., 2015). *In vitro*, en células MCF-7, la doxorubicina y la melatonina tuvieron un efecto sinérgico sobre la apoptosis y el estrés oxidativo mitocondrial, viéndose un aumento de las actividades procaspasa-9, PARP, caspasa-3 y caspasa-9 en el grupo que recibió ambos compuestos al mismo tiempo (Koşar y cols., 2016). Sin embargo, hasta la fecha, no hay muchos trabajos que identifiquen las dianas moleculares alteradas en las células tratadas con estas combinaciones.

En cuanto a la radiación ionizante, es una forma muy eficaz de destruir las células tumorales que quedan en la mama después de la cirugía. La radiación induce daño celular por una variedad de mecanismos directos e indirectos que finalmente resultan en daño del ADN y aberraciones cromosómicas. Es importante señalar que este daño ocurre también en los tejidos normales, por lo que una de las estrategias experimentales está centrada en la búsqueda de nuevas moléculas que actúen como radioprotectores de dichos tejidos. La melatonina es un buen candidato para ser un agente radioprotector, ya que se ha demostrado que puede disminuir la capacidad de las células tumorales para reparar las alteraciones de la estructura del ADN inducidas por la radiación, principalmente roturas de doble cadena (DSB). Es un hecho común que las células tumorales tienen niveles anormalmente altos de proteínas implicadas en los mecanismos de reparación del ADN como RAD51 y DNA-PKcs. En las células MCF-7, el pretratamiento con melatonina a dosis fisiológicas y farmacológicas antes de someter a las mismas a la radiación dio como resultado la inhibición de la proliferación, la detención del ciclo celular y la regulación negativa de proteínas involucradas en la reparación del daño en el ADN (Alonso-González y cols., 2015). Como se mencionó anteriormente, la melatonina es un agente con acciones antiestrogénicas capaz de sensibilizar a las células del cáncer de mama a la radioterapia, y otras moléculas, como los inhibidores de la aromatasa clásicos, han originado resultados similares en pacientes con cáncer de mama tratadas con radiación ionizante (Ishitobi y cols., 2014). Nuevamente, como ocurre en el caso de la quimioterapia, no hay muchos trabajos que identifiquen las dianas moleculares alteradas en las células tratadas con combinaciones de radioterapia y agentes adyuvantes como la melatonina.

Por lo tanto, el punto de partida del presente trabajo se basa en los siguientes precedentes: por un lado en los datos previos de nuestro laboratorio, donde durante años se han caracterizado muchas acciones oncostáticas de la melatonina en modelos *in vitro* e *in vivo* de cáncer de mama hormonodependiente; por otro, en los datos emergentes de la

literatura, donde han comenzado a demostrarse los efectos tanto potenciadores como sensibilizadores de la melatonina sobre las acciones de la quimioterapia y la radioterapia, en tumores mamarios y en otros muchos tipos de cáncer (a la par que es capaz de atenuar los efectos adversos y mejorar la supervivencia y calidad de vida de los pacientes). Todo ello apunta a que la melatonina puede ser considerada como un agente prometedor en combinación con la radioterapia y la quimioterapia.

La hipótesis general de trabajo es: si la melatonina es capaz de actuar como un agente oncostático en el cáncer de mama hormonodependiente, y si además es capaz de mejorar sensiblemente los resultados de los tratamientos de quimioterapia y radioterapia, potenciando los efectos antitumorales de los mismos, en las células tumorales deben producirse una serie de cambios diferenciales entre las células que reciben solamente tratamiento y las células que además de quimioterapia o radioterapia son tratadas con melatonina.

En un primer objetivo, nos hemos planteado comprobar si la melatonina era capaz de potenciar los efectos antiproliferativos y proapoptóticos observados en las células tumorales expuestas a la radiación ionizante. Una vez comprobado que efectivamente así era, el siguiente paso fue tratar de identificar los cambios moleculares que se producen en las células MCF-7 en respuesta a la radiación, para comprobar a continuación cuántas de estas alteraciones son potenciadas o revertidas por la melatonina. Hemos procedido a estudiar tanto la expresión génica como la activación/inactivación de diversas vías de señalización intracelular. En el último bloque experimental correspondiente a este apartado, hemos utilizado el modelo *in vivo* de la membrana corioalantoidea del embrión de pollo (*CAM assay*) para determinar los efectos de la radiación y la melatonina sobre la angiogénesis, implantando células MCF-7 en huevos de gallina fertilizados.

En el segundo objetivo del trabajo nos planteamos combinar melatonina y docetaxel. Hasta el momento, en la literatura científica no había trabajos publicados en los que estas dos moléculas se hubieran estudiado en modelos de cáncer mamario. Por lo tanto, nos propusimos en primer lugar comprobar que la melatonina es capaz de potenciar los efectos antiproliferativos y proapoptóticos observados en respuesta a concentraciones de docetaxel mucho más bajas que las utilizadas en clínica. Al igual que en el caso de la radiación, y teniendo en cuenta que los mecanismos moleculares que se modifican en las células tumorales en respuesta al docetaxel no están bien caracterizados, hemos tratado de identificar los cambios en la expresión génica que se producen en las células MCF-7

en respuesta al taxano, con la idea de establecer si alguno de esos cambios es modulado positiva o negativamente por la melatonina. Por último, hemos utilizado un modelo tumoral de ratones xenotransplantados con células MCF-7 para tratar de reproducir *in vivo* los resultados obtenidos en los experimentos *in vitro*.

El tercer y último objetivo del trabajo lo hemos dedicado al estudio de los efectos de la combinación melatonina-doxorrubicina en las células MCF-7. Hemos procedido en primer lugar a determinar el efecto de la antraciclina sobre la proliferación, migración y el potencial invasivo de esta línea celular para comprobar si la melatonina es capaz de potenciar o revertir dichas acciones. En paralelo, hemos llevado a cabo los mismos estudios sobre la línea celular MDA-MB-231, de crecimiento independiente de estrógenos. El siguiente paso de este objetivo consistió en identificar los cambios en expresión génica producidos como consecuencia del tratamiento con el quimioterápico, para compararlos con los observados en respuesta al tratamiento conjunto doxorrubicina-melatonina, tratando de identificar aquellos más relevantes. También se han estudiado los efectos de ambas moléculas sobre el fosfoproteoma y sobre una serie de microARNs con un papel conocido en la oncogénesis, bien como supresores de tumores o como estimuladores del crecimiento tumoral. Al igual que en el caso del docetaxel, hemos finalizado esta serie de experimentos tratando de reproducir *in vivo* los resultados obtenidos en los experimentos *in vitro* en un modelo de ratones xenotransplantados con células MCF-7.

Con respecto al primer objetivo, partimos del hecho de que la radioterapia es un tratamiento utilizado en el abordaje terapéutico del cáncer de mama. Es bien conocido que la radiación ionizante presenta una serie de inconvenientes entre los que probablemente los más importantes sean los efectos secundarios no deseados. Como ya se ha citado anteriormente en esta memoria, el uso de tratamientos adyuvantes pretende paliar los efectos negativos sobre el tejido normal, actuando por tanto como radioprotectores, y/o intensificar los efectos de la radioterapia sobre las células tumorales, actuando como radiosensibilizadores. Como parte de esta última propiedad, los compuestos adyuvantes también buscan evitar el desarrollo de resistencia a la radiación (Alonso-González y cols., 2020).

Es importante resaltar que no hay muchas publicaciones en las que se haya investigado el efecto potenciador de la melatonina sobre los efectos de la radiación en las células tumorales mamarias con crecimiento dependiente de estrógenos. Se ha propuesto que el

efecto radiosensibilizador de la melatonina podría radicar en su capacidad para incrementar los niveles de p53, p21 y Bax2 (Kastan y cols., 1991; Nooshinfar y cols., 2016). Por otra parte, nuestro grupo de investigación ha desarrollado algunos estudios encaminados a identificar los mecanismos moleculares subyacentes al efecto potenciador de la hormona pineal sobre la radiación ionizante. En concreto, previamente al desarrollo del trabajo experimental recogido en esta memoria, se había demostrado que la melatonina ejerce sus acciones radio-sensibilizadoras, al menos en parte, a través de la inhibición de las enzimas implicadas en la síntesis de estrógenos, en paralelo con un incremento en la expresión de *TP53* (Alonso-González y cols., 2016). La melatonina también mostró un efecto cooperativo con la radiación actuando sobre la expresión de los genes que codifican para dos de las principales proteínas implicadas en la reparación de las roturas en la doble hebra del ADN: *RAD51* y *DNA-PKcs* (Alonso-González y cols., 2015). Cuando se estudió el efecto de la melatonina y la radiación ionizante en fibroblastos (como modelo de tejido peri-tumoral) se encontraron resultados similares, con respecto a la regulación de las enzimas necesarias para sintetizar estradiol. Además, la radiación parece ejercer un efecto negativo bloqueando la diferenciación de los fibroblastos a través de la inhibición de la expresión de factores de diferenciación *C/EBPα* y *PPAR*, y de la estimulación de *TNFα*. La melatonina revierte esta situación, teniendo la radiación y la melatonina un efecto inhibitorio sobre la proliferación de estas células (González-González y cols., 2019a). En otros experimentos llevados a cabo en células endoteliales como modelo de angiogénesis, se encontró que la melatonina también potencia el efecto antiangiogénico de la radiación, principalmente a través de la disminución de los niveles de expresión de *VEGF* (González-González y cols., 2019b).

Parece claro pues que la melatonina protege, sobre todo, a las células de los tejidos normales circundantes y las células de la médula ósea frente a los efectos nocivos de la radiación, a la vez que potencia el efecto de la misma sobre las células tumorales. El empleo de melatonina como molécula adyuvante también mejora los efectos secundarios de la radioterapia, la supervivencia a un año y genera un mayor número de remisiones tumorales (Wang y cols., 2012). Sin embargo, aparte de los estudios anteriormente citados, no se ha profundizado en la identificación de los mecanismos moleculares alterados por la radiación ionizante y menos aún se conoce la forma en la que la melatonina puede modular dichas modificaciones. Todo esto nos llevó a plantear la hipótesis de que la radiación ionizante podría inducir muchos cambios en expresión

génica y en el estado de activación de las diversas vías de señalización intracelular, la mayor parte de ellos positivos, considerando como tales la inducción de genes supresores de tumores, de las vías de apoptosis, la inhibición de las proteínas antiapoptóticas, la represión de genes relacionados con proliferación y metástasis. La idea a partir de aquí fue tratar de determinar si la melatonina era capaz de estimular algunos de los cambios positivos (encaminados en definitiva a conducir a la muerte celular) y revertir algunos de los cambios negativos (promotores de malignización, resistencia y supervivencia) producidos en las células tumorales mamarias en respuesta a la radiación.

El primer bloque de experimentos llevados a cabo buscó comprobar si la radiación ionizante era capaz de inhibir la proliferación de las células MCF-7, valorando además si el pretratamiento con melatonina era capaz de potenciar dichos efectos. Como era de esperar, las células radiadas vieron notablemente reducida su proliferación y el pretratamiento con melatonina durante siete días, como paso previo a la radiación ionizante, potenció el efecto inhibitorio de la misma sobre la capacidad proliferativa de las células. En el siguiente apartado de este objetivo, abordamos la identificación de los cambios en expresión génica que se producen en las células MCF-7 en respuesta a la radiación (en presencia o no de melatonina) mediante el estudio, de manera simultánea y en un solo experimento, de 84 genes relacionados con el cáncer de mama. Así, pudimos determinar que la radiación estimula la expresión de 22 de los genes analizados e inhibe la expresión de 47 genes, en comparación con los niveles correspondientes de cada gen observados en las células que no han recibido tratamiento. Por otra parte, el tratamiento conjunto con melatonina y radiación estimuló la expresión de 23 genes y redujo la de otros 63. A continuación, se analizó de manera específica la expresión de 25 de estos genes identificados, eligiendo aquellos con variaciones más notables entre grupos.

La radiación ejerció un efecto potencialmente positivo de dos formas diferentes: estimulando la expresión de una serie de genes que presentan al menos alguna de estas propiedades: actuar como supresores de tumores, inducir la apoptosis, impedir el desarrollo de resistencia, ser inhibidores de metástasis o suprimir la angiogénesis. Dentro de este grupo están *TP53*, *CDKN1A*, *RASSF1*, *RB1*, *PGR*, *BAD*, *BAX2* y *CST6*. Cabe destacar que la melatonina ejerció un significativo efecto estimulador sobre todos ellos, y adicionalmente, también estimuló la expresión de *NME1* en comparación con las células que solamente han sido radiadas. El segundo efecto positivo de la radiación se produjo mediante la inhibición de otro grupo de genes que presentan al menos alguna de estas

otras propiedades: participar en el desarrollo de resistencia, actuar como promotor de tumores, estimular la proliferación, inhibir la angiogénesis, inducir la transición epitelio-mesénquima, la invasión y/o la metástasis: *MUC1*, *c-MYC*, *GATA3*, *TWIST1*, *BIRC5*, *BCL-2* y *ABCB1*. En todos estos casos excepto en *GATA3* y *TWIST1*, la melatonina potenció el efecto inhibitorio de la radiación. En cuanto a efectos potencialmente negativos, cabe destacar que la radiación estimuló la expresión de *ATM*, *AKT1*, *N3RC1*, *ERBB2*, *SERPINE* Y *PLAU*, todos ellos con alguna propiedad asociada al desarrollo tumoral, e inhibió la expresión de *PTEN* (supresor de tumores). Hay que resaltar en este punto que la melatonina revirtió el efecto negativo de la radiación en todos estos casos, mientras que no causó ningún efecto potencialmente negativo sobre la expresión de ninguno de los genes estudiados.

También hemos procedido al estudio de tres microARNs. La radiación disminuyó la expresión de miR-10a, que actúa como un inhibidor de la progresión del cáncer de mama, y también la de miR-10b, implicado en angiogénesis y metástasis. La melatonina no modificó el efecto de la radiación en ninguno de los dos casos, pero sí que potenció el efecto estimulador de la radiación sobre los niveles de miR-34a, un inhibidor de proliferación, invasión y metástasis y que es un candidato prometedor para el tratamiento del cáncer de mama metastásico (Yang y cols., 2020b).

Con respecto al estado de fosforilación de diversas quinasas y otras proteínas de señalización intracelular, hemos encontrado que la radiación disminuye la fosforilación de las proteínas Akt1 y de p70S6 quinasa, mientras que promueve la de p53. Estos tres resultados, potencialmente beneficiosos, se vieron incrementados por el cotratamiento con melatonina.

En el último bloque de experimentos de este primer objetivo estudiamos el efecto de la radiación y la melatonina en un ensayo de la membrana corioalantoidea como modelo *in vivo* de formación de nuevos vasos. Los resultados obtenidos mostraron que la melatonina y la radiación cooperaron de manera significativa reduciendo el número de vasos sanguíneos formados tras implantar las células MCF-7 tratadas en el embrión.

Los resultados que hemos obtenido en este primer objetivo, que se resumen en la **figura 5.1**, nos permiten afirmar que la melatonina ejerce una serie de efectos potenciadores sobre algunas de las acciones ejercidas por la radiación, como son la inhibición de la proliferación celular, la estimulación de la transcripción de algunos genes

proapoptóticos, de genes supresores de tumores, reguladores de la progresión del ciclo celular, o la inhibición de otros genes implicados en resistencia, angiogénesis, transición epitelio-mesénquima, invasión y metástasis. Hemos identificado algunos genes cuya expresión es modificada de una manera no deseada por la radiación y en todos estos casos la melatonina fue capaz de revertir este efecto potencialmente peligroso, mientras que la hormona pineal, en ninguno de los genes estudiados en este objetivo, alteró la expresión de los mismos de una manera no deseada. Además, hemos encontrado una cooperación entre ambos tratamientos en la modulación del estado de fosforilación de Akt1, p70S6 quinasa y p53. Por último, en los estudios utilizando el modelo *in vivo*, la melatonina también pareció potenciar el efecto antiangiogénico de la radiación.

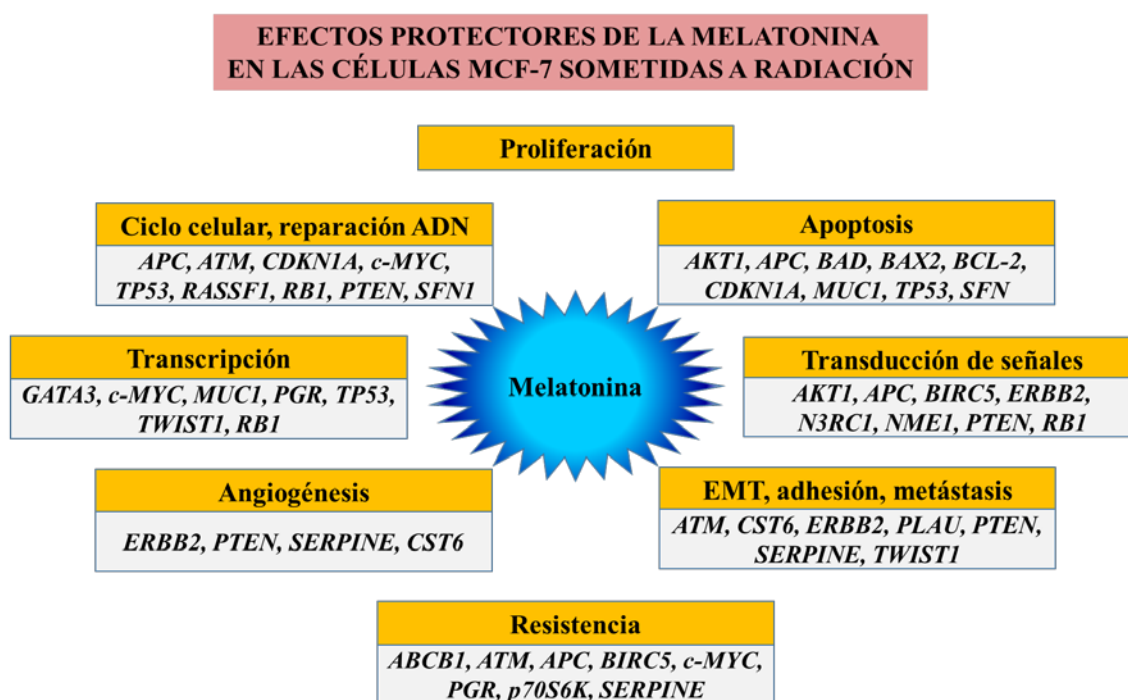


Figura 5.1: Efectos protectores del cotratamiento con melatonina en las células MCF-7 sometidas a radiación ionizante. Se muestra un resumen de los principales genes agrupados en distintas categorías cuya expresión se ha visto modificada positivamente cuando las células MCF-7 han sido pretratadas con melatonina como paso previo a la radiación ionizante. Se incluye además el efecto sensibilizador del pretratamiento con melatonina a los efectos antiproliferativos de la radiación. EMT: transición epitelio-mesénquima.

En el segundo objetivo de este trabajo, hemos estudiado los efectos de la administración conjunta de melatonina y docetaxel, un quimioterápico que en combinación con doxorubicina y ciclofosfamida está indicado como adyuvante en el tratamiento de pacientes con cáncer de mama operable, o bien, utilizado en monoterapia, en el tratamiento de pacientes con cáncer de mama metastásico o localmente avanzado tras el fracaso de la terapia citotóxica (normalmente una antraciclina como la doxorubicina). Al igual que en el caso de la radiación, la hipótesis de partida es que el tratamiento con docetaxel podría ejercer una serie de efectos sobre diversos procesos como la proliferación, la apoptosis o la expresión génica en las células MCF-7 y que seguramente, la melatonina podría modificar gran parte de estos cambios. Además, en el momento en el que comenzamos el desarrollo de este objetivo, aún no había ningún artículo publicado en el que se hubiera estudiado la combinación de docetaxel y melatonina en el cáncer de mama, y tan sólo uno en el cáncer de próstata (Rodríguez-García y cols., 2013).

Comenzamos examinando la respuesta de la proliferación celular al tratamiento combinado de melatonina con concentraciones de docetaxel bajas, ya que las células MCF-7 mostraron una gran sensibilidad a las dosis del taxano equivalentes a las utilizadas en clínica. Los resultados mostraron un aumento cooperativo de la citotoxicidad, indicando que la melatonina potenció los efectos antiproliferativos del docetaxel. El resultado fue aún más notorio cuando las células se trataron con la hormona pineal como paso previo a la administración del taxano. Este resultado es prometedor en el sentido de que abre la posibilidad de que algunos fármacos utilizados en quimioterapia podrían ver sus efectos potenciados si la melatonina se incluye en el protocolo, o bien que podrían ser utilizados, en combinación con la hormona pineal, a dosis más bajas de las que se están utilizando actualmente. Esta cooperación en la actividad antiproliferativa entre la melatonina y las dosis bajas de docetaxel también se vio reflejada en la proporción de células que se encontraban en la fase subG₀-G₁ del ciclo celular y además, el tratamiento simultáneo con ambos compuestos incrementó de manera significativa el número de células en proceso de apoptosis temprana, efecto aún más notable cuando la melatonina se administró 24 horas antes del tratamiento con el taxano, lo que también podría tener interesantes consecuencias clínicas si el mismo tipo de respuesta llegara a producirse en pacientes. Por último, hemos comprobado como este efecto potenciador de la melatonina sobre la apoptosis inducida por dosis bajas de docetaxel se vio traducido en un aumento de la expresión del gen proapoptótico *BAD* y en una fuerte inhibición del gen

antiapoptótico *BCL-2*. Todo el conjunto de datos obtenido en este bloque de experimentos permite cuando menos plantear la atractiva posibilidad de reducir las concentraciones terapéuticas de los agentes utilizados en quimioterapia sin que sus acciones beneficiosas se vean reducidas, pero sí sus efectos adversos.

Sin embargo, las dosis de docetaxel que reciben las pacientes equivalen aproximadamente a utilizar concentraciones de 1 μ M en el cultivo de las células de cáncer mamario. Por esto también nos pareció conveniente determinar los cambios que se producen en las células MCF-7 en respuesta a esta concentración alta del taxano. De esta manera, encontramos que 10 genes aumentaron su expresión y 44 la bajaron en respuesta al docetaxel, mientras que el uso simultáneo de melatonina y el taxano causó un aumento de expresión en 18 genes y una bajada en otros 36. Procedimos a continuación a analizar la expresión de 10 de estos genes tomando como criterio la magnitud del cambio en expresión observado entre los distintos tratamientos. El docetaxel ejerció una serie de efectos potencialmente positivos ya que estimuló la expresión de *BAX2* y *BAD* e inhibió la expresión de *BCL-2* y *TWIST1*. En los cuatro casos, encontramos que la melatonina intensificó el efecto del taxano. Por el contrario, en nuestro modelo hemos podido identificar algunos casos en los que el docetaxel modifica la expresión génica de una manera no deseada: disminuyendo la expresión de *TP53*, *CDKN1A* y *CDH13* y aumentando la de *c-MYC*, *MUC1* y *GATA3*. Es importante resaltar de nuevo que la melatonina revirtió estos resultados deletéreos en todos los casos, y que nuevamente, en ninguno de los genes analizados en este objetivo, encontramos un efecto de la hormona pineal potencialmente favorable en el inicio, progresión o diseminación del tumor. Debido a que miR-10b es una diana directa de *TWIST1*, uno de los factores inhibidos por el docetaxel, también decidimos proceder a estudiar sus niveles de expresión, ya que se ha descrito que niveles altos de este microARN se correlacionan con un aumento en la probabilidad de que se produzcan metástasis óseas de cáncer de mama (Croset y cols., 2014). Nuestros resultados muestran que el taxano indujo la expresión de miR-10b, mientras que la adición de la melatonina conjuntamente con el quimioterápico revierte por completo ese efecto.

En la última sección de este objetivo hemos inducido el desarrollo de tumores en ratones atímicos xenotransplantados con células MCF-7. Los tumores de aquellos ratones que recibieron tratamiento con melatonina, docetaxel o bien la combinación de ambos, mostraron un crecimiento significativamente menor que los ratones del grupo control. La expresión génica cuantificada en estos tumores mostró algunos paralelismos, pero también algunas diferencias con los resultados obtenidos *in vitro*. El docetaxel inhibió la expresión de *TP53* en los tumores (al igual que en las células MCF-7 *in vitro*), pero al contrario que en las células cultivadas, la melatonina no consiguió revertir esta inhibición. El taxano por sí solo no estimuló la expresión de *BAX2* y *BAD*, pero sí cuando se combinó con melatonina. Al contrario que en el modelo *in vitro*, el docetaxel estimuló la expresión de *CDKN1A* y la melatonina potenció este efecto. Curiosamente, *TWIST1* es estimulado por el docetaxel *in vivo*, y de manera importante, la melatonina revierte parcialmente la expresión de este gen implicado en la transición epitelio-mesénquima. *AKT1* (implicado en supervivencia e invasión) y *VEGFA*, *ERK1* y *ERK2*, con participación en la angiogénesis, fueron todos ellos inhibidos por el docetaxel y de nuevo hay que resaltar que la melatonina potenció este efecto inhibitor en todos los casos.

En la **figura 5.2** se han recopilado los efectos protectores de la melatonina obtenidos en ese objetivo. Nuevamente, tanto en las células MCF-7 *in vitro* como en el modelo de ratones xenotransplantados, la melatonina ejerce una serie de efectos potenciadores sobre algunas de las acciones del docetaxel, mientras que es capaz de revertir algunos de los efectos no deseados del quimioterápico. La hormona pineal por sí sola o combinada con el taxano, no alteró la expresión de ninguno de los genes estudiados de manera no deseada. Además, a concentraciones bajas de docetaxel, la melatonina potenció los efectos antiproliferativos y proapoptóticos del quimioterápico.

Hasta este momento, no se había hecho ningún estudio donde se hubiera probado la eficacia de la combinación melatonina-docetaxel. Nuestros resultados indican que podría ser interesante plantear la realización de ensayos clínicos en pacientes de cáncer de mama, con el propósito de corroborar si la eficacia de esta combinación en los modelos *in vitro* e *in vivo* que nosotros hemos utilizado en este trabajo tiene un reflejo en clínica.

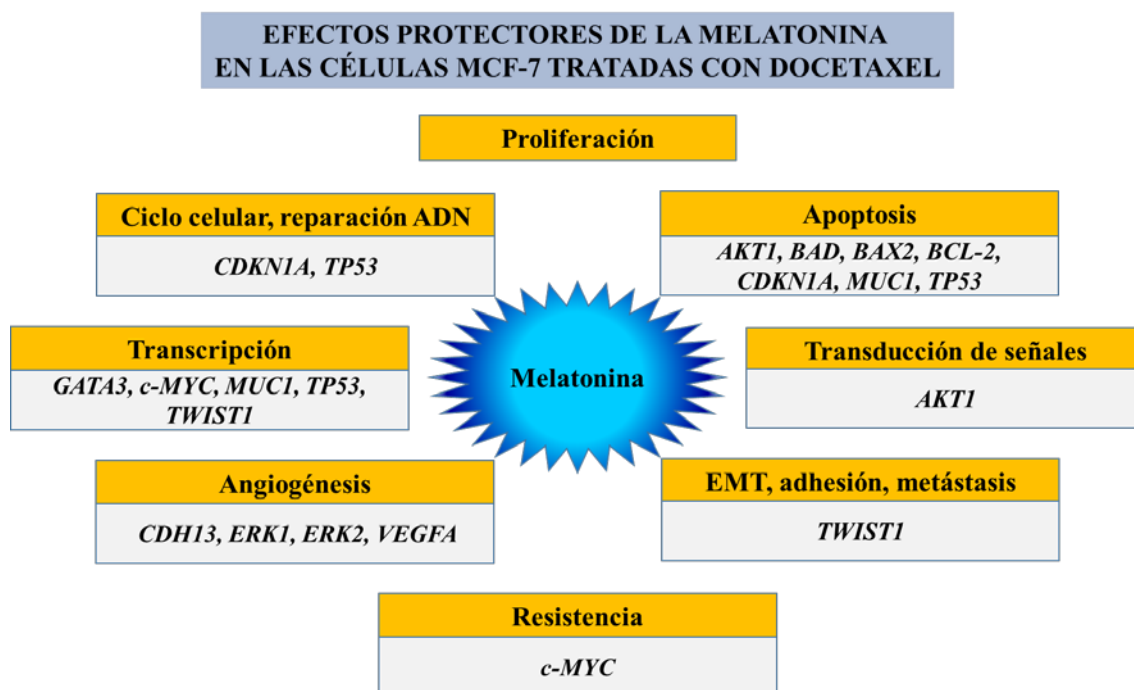


Figura 5.2: Efectos protectores de la melatonina en las células MCF-7 tratadas con docetaxel. Se muestra un resumen de los principales genes agrupados en distintas categorías cuya expresión se ha visto modificada positivamente cuando las células MCF-7 han sido cotratadas con melatonina y docetaxel en comparación con aquellas que solo recibieron tratamiento con el taxano. Se incluye además el efecto sensibilizador del pretratamiento con melatonina a los efectos antiproliferativos del docetaxel. EMT: transición epitelio-mesénquima.

En el tercer y último objetivo de este trabajo, hemos utilizado la doxorrubicina, una antraciclina que suele utilizarse como tratamiento adyuvante en el cáncer de mama, generalmente en combinación con ciclofosfamida (y a veces 5-fluorouracilo) normalmente antes de la utilización de taxanos como el docetaxel o el paclitaxel, combinados como Trastuzumab.

La combinación doxorrubicina-melatonina ha sido más estudiada que la combinación docetaxel-melatonina, pero la mayor parte de los trabajos se han orientado al efecto protector de la hormona pineal contra la cardiotoxicidad inducida por la antraciclina (Li y cols., 2020b). En lo que se refiere a las células tumorales, se ha demostrado que la melatonina aumenta la apoptosis y la citotoxicidad inducidas por la doxorrubicina (Fic y cols., 2007; Koşar y cols., 2016; Pariente y cols., 2016, Yang y cols., 2020a). También se ha descrito que la melatonina protege contra el desarrollo de resistencia en células de cáncer de colon a través de un incremento de la expresión del gen *ABCB1* (Fic y cols., 2017). Sin embargo, las bases moleculares en las que se basa el posible papel potenciador

de la melatonina sobre los efectos de la doxorubicina, al igual que en los objetivos anteriores (radiación y docetaxel) permanecen aún sin ser totalmente esclarecidos.

Esto nos animó a plantear el último de los objetivos de esta tesis, en el que nos propusimos identificar, en las células MCF-7, qué mecanismos moleculares son modificados en respuesta al tratamiento con doxorubicina, dando especial relevancia a los cambios potencialmente negativos, con la idea de estudiar a continuación si la melatonina administrada en combinación con la antraciclina podría revertir algunos de esos cambios.

Los resultados obtenidos en el primer bloque de experimentos, dedicado al estudio de la proliferación, migración e invasión de las células MCF-7, mostraron que la doxorubicina es capaz de inhibir la proliferación de las mismas, de acuerdo con lo esperado. La capacidad de migración de las células no fue modificada por la antraciclina y en cuanto al potencial invasivo, éste se vio estimulado por la misma, hecho en principio sorprendente pero concordante con resultados previamente descritos (Bandyopadhyay y cols., 2010). Todas estas propiedades (proliferación, migración e invasión) fueron inhibidas por la melatonina en estas células, pero no en las MDA-MB-231, lo que sugiere que el efecto inhibitorio de la melatonina podría estar relacionado con los niveles del receptor de estrógenos en las células tumorales.

El hecho de que la doxorubicina estimule el potencial invasivo de las células MCF-7, unido a la capacidad de la melatonina para revertir este efecto, nos permitió plantear la hipótesis de que, entre todos los cambios en el perfil de expresión génica en respuesta a la antraciclina, debería de haber bastantes con efectos positivos, pero también algunos potencialmente negativos. Como siempre, la idea fue comprobar si la melatonina es capaz de potenciar los primeros y bloquear los segundos. Los resultados mostraron que la doxorubicina aumentó la expresión de 27 genes y disminuyó la de 17, mientras que el tratamiento simultáneo con melatonina y la antraciclina aumentó los niveles de 9 genes y disminuyó la de 26.

Comenzando por los efectos potencialmente positivos de la antraciclina en la transcripción génica, estos pueden conseguirse, bien estimulando genes con propiedades antitumorales, bien inhibiendo genes implicados en proliferación, supervivencia, invasión, angiogénesis y metástasis. Dentro de este grupo, los genes que fueron estimulados por la doxorubicina fueron: *TP53*, *CDKN1A*, *PTEN*, *BAX2*, *NME1* y *COP1*, mientras que los inhibidos fueron: *c-MYC*, *GATA3*, *BCL-2*, *WEE1* y *XBP1*.

La presencia de melatonina moduló la expresión de estos genes en el sentido deseado en la mayor parte de los casos, excepto para *TP53*, *GATA3* y *XBP1*, donde no modificó el cambio en respuesta a la antraciclina, y para *NME1* y *WEE1*, donde alteró la expresión en un sentido negativo.

La doxorrubicina modificó la expresión génica en un sentido no deseado aumentando los niveles de *SNAI2*, *MUC1*, *BIRC5* y *TWIST1*, y disminuyendo los de *PGR*. La melatonina empeoró de una manera significativa este último resultado, pero consiguió revertir el efecto de la antraciclina en los cuatro anteriores. Nos llamó particularmente la atención el efecto sobre *TWIST1* puesto que fue estimulado por la doxorrubicina de una manera potente (más de 14 veces) y la melatonina abolió esta fuerte inducción prácticamente por completo. Este factor, implicado en la transformación epitelio-mesénquima no vio alterada su expresión en las células MDA-MB-231 en respuesta a la antraciclina, por lo que este resultado, al igual que el potencial invasivo, también parece asociado a la expresión del receptor de estrógenos en las células tumorales mamarias. Cabe resaltar que unos pocos meses después de la publicación de nuestro trabajo en el que describimos estos resultados, se ha encontrado que niveles altos de expresión de *TWIST1* permiten predecir resistencia a la doxorrubicina en el cáncer de mama (Demir y cols., 2019).

El hecho de que la doxorrubicina potenciara de una manera tan llamativa la expresión de un gen que aparece en el cáncer de mama invasivo (Cheng y cols., 2007), que se correlaciona con una baja supervivencia (Wushou y cols., 2014) y que permite predecir la resistencia a la propia antraciclina, unido a la fuerte represión de este efecto por parte de la melatonina, nos llevó a volcar nuestra atención en el estudio de este factor. Decidimos, por tanto, comprobar si el efecto sobre la transcripción se correlacionaba con los niveles proteicos de Twist1 en las células MCF-7 y efectivamente, los resultados obtenidos corroboraron que la proteína Twist1 es más abundante en las células tratadas con doxorrubicina y que la melatonina también reduce los niveles proteicos.

También decidimos estudiar si el cocultivo de las células MCF-7 con adipocitos aumentaba la expresión de *TWIST1*, comprobando el efecto de la doxorrubicina y de la melatonina sobre la misma, ya que se había descrito previamente que los adipocitos inducen la transición epitelio-mesénquima en las células de cáncer de mama al aumentar, entre otros factores, la expresión de *TWIST1* (Lee y cols., 2015; Yao-Borengasser y cols., 2015). Efectivamente, la presencia de los adipocitos estimuló la expresión de *TWIST1*, y este efecto fue potenciado por la doxorrubicina, mientras que la presencia de la

melatonina revirtió este efecto. Este resultado también puede ser importante puesto que los adipocitos son el tipo celular más abundante en el espacio peritumoral mamario e influyen de manera decisiva en las células tumorales.

Se ha descrito que Twist1 induce angiogénesis *in vivo* (Mironchik y cols., 2005; Wang y cols., 2017), lo que nos impulsó a estudiar el perfil de expresión génica de factores relacionados con la angiogénesis. Nuestros resultados mostraron que la doxorrubicina estimuló la expresión de varios factores proangiogénicos como *PLG*, *ANGPT2*, *IGF1*, *GLI1* y *SERPINE1* lo que podemos calificar como un efecto no deseado del quimioterápico. Es importante destacar que la melatonina bloqueó parcialmente el efecto estimulador de la doxorrubicina en la expresión de cuatro de estos factores proangiogénicos: *PLG*, *ANGPT2*, *IGF-1* y *GLI1*, y su adición fue inefectiva solamente en el caso de *SERPINE1*. Además, ambos compuestos cooperaron inhibiendo la expresión de otros dos factores proangiogénicos: *VEGFA* y *AKT1*.

En la literatura encontramos alguna publicación describiendo que la interrupción de la síntesis nocturna de melatonina está relacionada con resistencia a la doxorrubicina en el cáncer de mama (Xiang y cols., 2015). Teniendo en cuenta además que tanto melatonina como Twist1 influyen sobre la expresión de muchos de los genes reloj y que éstos, en muchos casos, promueven o inhiben la tumorigénesis (Hwang-Verslues y cols., 2013; Cadenas y cols., 2014; Meier y cols., 2015), decidimos a continuación estudiar el efecto de ambos compuestos sobre la expresión de una serie de genes reloj en las células MCF-7. La doxorrubicina aumentó la expresión de *CRY1*, *CRY2*, *CLOCK*, *BMAL1* y *PER2* y la melatonina la potenció en la mayor parte de los casos, lo que puede interpretarse como un efecto global protector. Sólo *TIMELESS* vio su expresión inducida por la doxorrubicina, efecto revertido por la melatonina. Este podría ser otro hallazgo importante ya que la proteína TIM (producto de la expresión de *TIMELESS*) activa a c-Myc, en un mecanismo implicado en la resistencia al tamoxifeno (Chi y cols., 2017; Magne y cols., 2018).

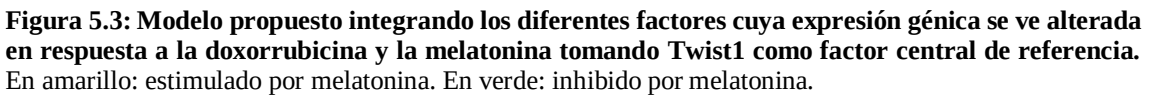
A continuación, llevamos a cabo un ensayo de perfil de proteoma donde encontramos que el tratamiento con doxorrubicina estimuló la fosforilación de Akt y p70S6 quinasa. La fosforilación de Akt se correlaciona con un mal pronóstico (Cicenas y cols., 2005; Yndestad y cols., 2017). La supresión de PTEN activa la señalización de la vía Akt /mTOR /p70S6K y disminuye la sensibilidad de las células MCF-7 a la doxorrubicina (Steelman y cols., 2008). La proteína p-Akt fosforila Twist1 contribuyendo así a la transición epitelio-mesénquima y a la metástasis del cáncer de mama (Xue y cols., 2012). Por otro lado, la activación de la vía S6 induce la transición epitelio-mesénquima y la metástasis en el carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (Wu y cols., 2016), y en el cáncer de mama se ha correlacionado con mal pronóstico y con resistencia al tamoxifeno (Bostner y cols., 2015). Los resultados de nuestros experimentos nos permiten concluir que la doxorrubicina estimula la fosforilación de Akt y p70S6 quinasa, y que la melatonina disminuye los niveles de p-mTOR, p-Akt y p-S6 (sustrato de p70S6 quinasa).

En el siguiente bloque de experimentos, procedimos a estudiar la expresión de algunos microARNs que desempeñan papeles importantes en el cáncer, eligiendo la mayor parte de los mismos debido a que están directamente relacionados con Twist1. Como efectos potencialmente positivos, debido a su papel antitumoral, cabe destacar que la doxorrubicina estimuló el miR-34a y el miR-10a. La combinación con melatonina estimuló aún más la expresión del primero, pero inhibió la del segundo. Ambos compuestos cooperan para inhibir miR-29a, implicado en invasión. La expresión de miR-145 (supresor de migración) fue estimulada por ambos compuestos por separado, pero el tratamiento conjunto no trajo como consecuencia un aumento en los niveles de miR-145. El resultado más importante, desde nuestro punto de vista, se obtuvo al estudiar miR-10b. Este microARN está implicado en invasión y angiogénesis (Liu y cols., 2017b), metástasis (Croset y cols., 2014), resistencia y transición epitelio-mesénquima (Tan y cols., 2020). Además, se ha descrito que Twist1 induce la expresión de miR-10b (Tsukerman y cols., 2014; Abdelmaksoud-Dammak y cols., 2017). En nuestros experimentos encontramos que la doxorrubicina estimula fuertemente la expresión de miR-10b, mientras que la presencia de la melatonina revierte por completo ese efecto. Este resultado sugiere que la inhibición de miR-10b (probablemente consecuencia de la inhibición de *TWIST1*) podría ser otro de los mecanismos que justifican el papel protector de la melatonina en las células MCF-7 tratadas con doxorrubicina. Para determinar si la sobreexpresión de *TWIST1* en respuesta a la antraciclina era directamente responsable del

aumento de miR-10b, bloqueamos la expresión de *TWIST1* con siARNs específicos, lo que se tradujo en una pérdida de la inducción de miR-10b, sugiriendo que el efecto inductor de la antraciclina sobre miR-10b es dependiente de la inducción previa de *TWIST1*. Además, en las células en las que la expresión de *TWIST1* ha sido silenciada, el efecto estimulador de la doxorubicina sobre la expresión de *PLG*, *BIRC5* y *VEGFA* se vio abolido, lo que sugiere de nuevo una implicación de Twist1 en el proceso de estimulación de angiogénesis en respuesta a la antraciclina.

Finalmente, procedimos al empleo del modelo experimental *in vivo* de xenógrafos generados en ratones atímicos a partir de células MCF-7, donde hemos demostrado que la administración a los ratones de melatonina, doxorubicina o ambos tratamientos a la vez disminuye de manera significativa el crecimiento del tumor.

Los resultados obtenidos en este capítulo se han representado en el modelo que se puede observar en la **figura 5.3**. Hemos pretendido caracterizar el mayor número posible de cambios moleculares en las células MCF-7 tratadas con doxorubicina, identificando algunas alteraciones potencialmente positivas, pero también otros muchos efectos negativos. Desde nuestro punto de vista, el resultado más relevante es el efecto inductor del quimioterápico sobre Twist1, que podría ser dependiente de la vía de mTOR/Akt1/p70S6 quinasa y que tendría en el miR-10b una de sus dianas clave. De manera importante, la activación de esta vía conducente a la transición epitelio-mesénquima, angiogénesis, invasión y metástasis es abolida por el cotratamiento con melatonina.



Como resumen final, podemos decir que hemos encontrado muchas alteraciones en la expresión de genes, de miRNAs y del estado de activación de vías de señalización en respuesta a cada uno de los tratamientos estudiados en los tres objetivos abordados en esta tesis. La melatonina potenció muchos de los efectos positivos de cada uno de los tratamientos y revirtió en muchos casos algunos de los efectos negativos. Únicamente en tres casos (en el estudio de la doxorubicina) hemos encontrado un efecto de la melatonina contrario al esperado, resultados que creemos que podemos considerar como excepciones puntuales en un contexto global de molécula con muchos efectos protectores a través de la modulación de múltiples factores.

Genes estimulados	Genes y miARN inhibidos
 	   
 	  

Figura 5.4: Efectos positivos comunes de la melatonina sobre los tres tratamientos estudiados (radiación, docetaxel y doxorubicina). En esta figura se recogen aquellas moléculas que de manera consistente han sido reguladas por la indolamina, y contribuyen a explicar sus acciones oncostáticas. En verde: genes cuya expresión se ha visto incrementada. En rojo: genes y microARN cuya expresión se ha visto disminuida.

En la **figura 5.4** se recogen aquellas moléculas, que de manera consistente en todos y cada uno los tratamientos, han sido reguladas por la melatonina de tal manera que el resultado obtenido en las células tratadas con la indolamina podría contribuir a explicar los efectos antitumorales de la hormona pineal. En algunos casos se trata de resultados esperados y concordantes con los descritos en publicaciones previas, como los obtenidos para los supresores de tumores *TP53* y *CDKN1A*, los genes promotores de apoptosis *BAD* y *BAX2*, el antiapoptótico *BCL-2* y el estado de activación de Akt1, participante en vías de señalización que estimulan la proliferación y supervivencia.

En otros casos, hemos obtenido resultados novedosos no descritos previamente, como el efecto inhibidor de la melatonina consistentemente reproducido en cada uno de los tratamientos estudiados sobre la expresión de *TWIST1* y de miR-10b y que puede

contribuir a conocer en más profundidad las bases moleculares en las que se sustenta el efecto oncostático y antitumoral de la melatonina.

Por último, consideramos importante resaltar los cambios moleculares negativos específicamente desencadenados en respuesta a cada uno de los tratamientos y que han sido revertidos por la melatonina, resumidos en la **figura 5.5**. La radiación estimuló *ATM* y *ERBB2* implicados en resistencia a la propia radiación; *N3RC1*, que estimula la supervivencia; *SERPINE1* y *PLAU* que estimulan angiogénesis; mientras que bloquea *PTEN*, un supresor de tumores. Con respecto al docetaxel, encontramos un efecto específico e inesperado de esta droga, como la inhibición de *TP53* y *CDKN1A* y la estimulación de *c-MYC*, lo que sugiere que, en paralelo a su efecto citotóxico, la droga induce una serie de cambios moleculares que pueden dirigir a las células tumorales a una mayor proliferación. En el caso de la doxorrubicina, es capaz de aumentar la expresión de varios factores proangiogénicos como *PLG*, *ANGPT2* o *GLI1*; otros implicados en la supervivencia como *BIRC5*; o en la transición epitelio-mesénquima como *SNAI2* o *TWIST1*, en este último caso, con una estimulación llamativamente potente. La melatonina consiguió bloquear de manera específica todos estos efectos negativos de cada uno de los tratamientos de una manera efectiva, lo que representa toda una serie de nuevos hallazgos a nivel molecular que permiten explicar las acciones antitumorales de la hormona pineal.

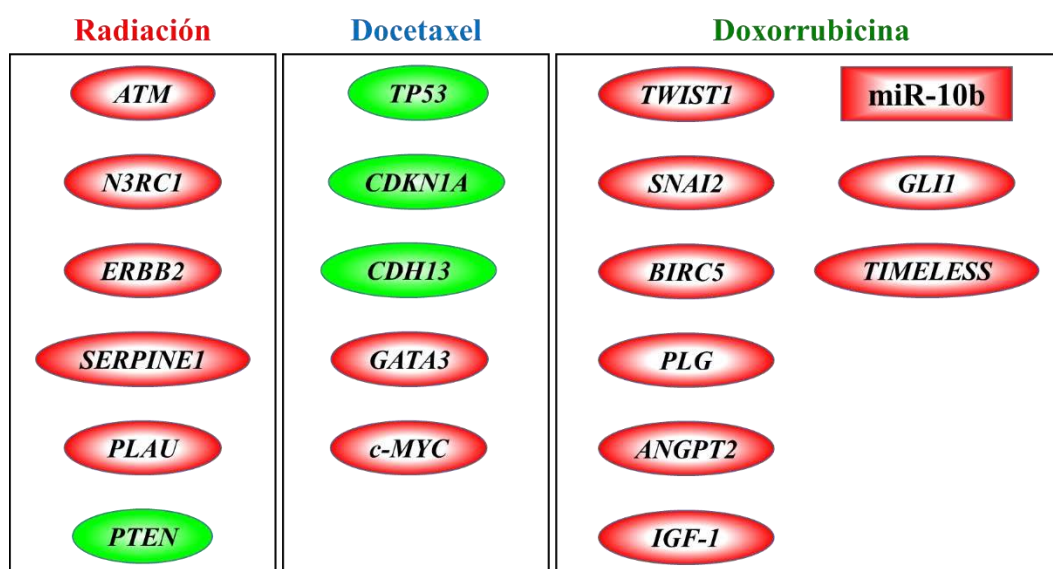


Figura 5.5: Efectos deletéreos específicos de cada tratamiento (radiación, docetaxel y doxorrubicina) revertidos por la melatonina (radiación, docetaxel y doxorrubicina). En esta figura se recogen los cambios moleculares negativos desencadenados en respuesta a cada uno de los tratamientos y que han sido revertidos por la melatonina. En verde: genes cuya expresión se considera un efecto positivo. En rojo: genes o microARNs cuyo aumento en expresión se considera un efecto negativo.

En conclusión, los resultados que hemos presentado en esta tesis doctoral apoyan la hipótesis de que la melatonina podría ejercer una serie de efectos protectores cuando se combina con distintos tratamientos antineoplásicos. En muchos casos, los efectos son aditivos con los que ya de por sí producen los tratamientos, pero en otros casos el uso de la melatonina revierte los efectos negativos inducidos de manera específica por cada la radiación, el docetaxel o la doxorubicina respectivamente. Algunos de estos cambios moleculares son potencialmente peligrosos pudiendo conducir a supervivencia y resistencia, y hemos comprobado a lo largo del desarrollo de este trabajo como la melatonina puede ejercer efectos protectores impidiendo que al menos algunos de los cambios no deseados acontezcan en las células tratadas.

Estos resultados en su conjunto nos han permitido profundizar en el conocimiento de los cambios moleculares que tienen lugar en las células tumorales en respuesta a la radiación ionizante y la quimioterapia, identificar algunos de estos cambios potencialmente peligrosos ya que pueden conducir a proliferación, invasión, transición epitelio-mesénquima, supervivencia, metástasis y resistencia, y nos permiten reafirmarnos en la propuesta de la necesidad de probar la melatonina en ensayos clínicos buscando corroborar su utilidad como adyuvante a utilizar conjuntamente con la radioterapia y la quimioterapia.

CONCLUSIONES

6.1 CONCLUSIONES

1. La melatonina potencia el efecto inhibitorio de la radiación, el docetaxel y la doxorubicina sobre la proliferación celular.
2. La radiación, el docetaxel y la doxorubicina aumentan la expresión de genes supresores de tumores y miARNs y reducen la expresión de algunos otros genes y miARNs involucrados en proliferación, angiogénesis, TEM e invasión. En muchos casos, la melatonina potencia estos efectos.
3. Cada tratamiento da como resultado un patrón no deseado de expresión de genes y miARNs; estimulando oncogenes y/o inhibiendo genes supresores de tumores. En la mayoría de los casos, la melatonina revierte estos efectos deletéreos.
4. En un modelo *in vivo*, la melatonina estimula el efecto antiangiogénico de la radiación en la formación de vasos sanguíneos inducida por células MCF-7 implantadas en la membrana corioalantoidea de embriones de pollo.
5. La melatonina potencia el efecto proapoptóticos de dosis subfarmacológicas de docetaxel aumentando la proporción de células en la fase subG₀-G₁.
6. En un modelo *in vivo* de ratones atímicos xenotransplantados con células MCF-7, la melatonina aumenta el efecto inhibitorio del docetaxel sobre el crecimiento tumoral. Adicionalmente la melatonina modula los cambios en la expresión génica inducidos por el taxano.
7. La melatonina inhibe la migración (no afectada por la doxorubicina) y el potencial invasivo (estimulado por la antraciclina) en las células MCF-7, pero no en las células MDA-MB-231, lo cual indica que la efectividad de la melatonina depende del estatus del receptor de estrógenos.
8. El docetaxel (*in vivo*) y la doxorubicina (*in vitro*) estimulan la expresión de *TWIST1*, un factor de transcripción involucrado en la transición epitelio-mesénquima. Adicionalmente, los niveles de la proteína Twist1 aumentan en las células tratadas con doxorubicina. La melatonina contrarresta estos efectos.

9. El bloqueo de *TWIST1* mediante siARNs específicos abole completamente la inducción por doxorubicina de su diana miR-10b y la activación transcripcional de genes proangiogénicos *PLG*, *BIRC5* and *VEGFA*.

10. La radiación y la doxorubicina inducen la fosforilación de Akt y p70S6K, transductores de señales involucrados en proliferación, migración y resistencia, los cuales activan directamente a Twist1. La melatonina reduce los niveles de fosforilación de ambas kinasas. Así, la melatonina podría sensibilizar a las células MCF-7 a la radioterapia y a la quimioterapia mediante la disminución de la activación de Twist1.

6.2 CONCLUSIONS

1. Melatonin potentiates the inhibitory effect of radiation, docetaxel or doxorubicin in MCF-7 cell proliferation.
2. Radiation, docetaxel and doxorubicin increase the expression of tumor suppressor genes and miRNAs and reduce the expression of some other genes and miRNAs involved in proliferation, angiogenesis, EMT and invasion. In most cases, melatonin enhances these effects.
3. Each treatment results in a pattern of unwanted gene and miRNA expression changes, stimulating oncogenic genes or inhibiting tumor suppressor genes; in most cases, melatonin reverts these deleterious effects.
4. In an *in vivo* model, melatonin stimulates the anti-angiogenic effect of radiation on blood vessel formation induced by MCF-7 cells implanted on the chicken chorioallantoic membrane.
5. Melatonin potentiates the pro-apoptotic effect of sub-pharmacological doses of docetaxel by increasing the proportion of cells in the subG0-G1 phase.
6. In an *in vivo* model in nude mice xenotransplanted with MCF-7 cells, melatonin increases the inhibitory effect of docetaxel on tumor growth. Additionally, melatonin modulates gene expression changes induced by the taxane.
7. Melatonin inhibits migration (unaffected by doxorubicin) and the invasive potential (stimulated by the anthracycline) in MCF-7 cells, but not in MDA-MB- 231 cells, indicating that the effectiveness of melatonin depends of the estrogen receptor status.
8. Docetaxel (*in vivo*) and doxorubicin (*in vitro*) stimulate the expression of *TWIST1*, a transcription factor involved in epithelial-to-mesenchymal transition. Additionally, Twist1 protein levels increase in doxorubicin treated cells. Melatonin counteracts these effects.

9. The blockade of *TWIST1* by specific siRNAs completely abolishes the induction of its target, miR-10b, and the transcriptional activation of the proangiogenic genes *PLG*, *BIRC5* and *VEGFA* by doxorubicin.

10. Radiation and doxorubicin induce the phosphorylation of Akt and p70S6K, signal transducers involved in proliferation, migration and resistance, which directly activate Twist1. Melatonin reduces the levels of phosphorylation of both kinases. Thus, melatonin could sensitize MCF-7 cells to radiotherapy and chemotherapy by diminishing Twist1 activation.

BIBLIOGRAFÍA

7. BIBLIOGRAFÍA

Abba M.C., Nunez M.I., Colussi A.G., Croce M.V., Segal-Eiras A., Aldaz C.M. (2006). GATA3 protein as a MUC1 transcriptional regulator in breast cancer cells. *Breast Cancer Res.* **8**: R642006.

Abdelmaksoud-Dammak R., Chamtouri N., Triki M., Saadallah-Kallel A., Ayadi W., Charfi S., Khabir A., Ayadi L., Sallemi-Boudawara T., Mokdad-Gargouri R. (2017). Overexpression of miR-10b in colorectal cancer patients: correlation with TWIST-1 and E-cadherin expression. *Tumour Biol.* **39(3)**: 1010428317695916.

Abdalla F., Singh B., Bhat H.K. (2020). MicroRNAs and gene regulation in breast cancer. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* **34(11)**: e22567.

Ahmad A., Ginnebaugh K.R., Yin S., Bollig-Fischer A., Reddy K.B., Sarkar F.H. (2015). Functional role of miR-10b in tamoxifen resistance of ER-positive breast cancer cells through down-regulation of HDAC4. *BMC Cancer.* **15**: 540.

Ahmed N., Maines-Bandiera S., Quinn M.A., Unger W.G., Dedhar S., Auersperg N. (2006). Molecular pathways regulating EGF-induced epithelio-mesenchymal transition in human ovarian surface epithelium. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **290(6)**: C1532-1542.

Allegra M., Reiter R.J., Tan D.X., Gentile C., Tesoriere L., Livrea M.A. (2003). The chemistry of melatonin's interaction with reactive species. *J. Pineal Res.* **34(1)**: 1-10.

Alonso-González C., González A., Martínez-Campa C., Gómez-Arozamena J., Cos S. (2015). Melatonin sensitizes human breast cancer cells to ionizing radiation by downregulating proteins involved in double-strand DNA break repair. *J. Pineal Res.* **58(2)**: 189-197.

Alonso-González C., González A., Martínez-Campa C., Menéndez-Menéndez J., Gómez-Arozamena J., García-Vidal A., Cos S. (2016). Melatonin enhancement of the radiosensitivity of human breast cancer cells is associated with the modulation of proteins involved in estrogen biosynthesis. *Cancer Lett.* **370(1)**: 145-152.

Alonso-González C., González A., Menéndez-Menéndez J., Martínez-Campa C., Cos S. (2020). Melatonin as a radio-sensitizer in cancer. *Biomedicines.* **8(8)**: 247.

Alonso-González C., Menéndez-Menéndez J., González-González A., González A., Cos S., Martínez-Campa C. (2018). Melatonin enhances the apoptotic effects and modulates the changes in gene expression induced by docetaxel in MCF7 human breast cancer cells. *Int. J. Oncol.* **52(2)**: 560-570.

Alvarez-García V., González A., Alonso-González C., Martínez-Campa C., Cos S. (2012). Melatonin interferes in the desmoplastic reaction in breast cancer by regulating cytokine production. *J. Pineal Res.* **52(3)**: 282-290.

Álvarez-García V., González A., Alonso-González C., Martínez-Campa C., Cos S. (2013a). Regulation of vascular endothelial growth factor by melatonin in human breast cancer cells. *J. Pineal Res.* **54(4)**: 373-380.

- Alvarez-García V., González A., Alonso-González C., Martínez-Campa C., Cos S.** (2013b). Antiangiogenic effects of melatonin in endothelial cell cultures. *Microvasc. Res.* **87**: 25-33.
- Alvarez-García V., González A., Martínez-Campa C., Alonso-González C., Cos S.** (2013c). Melatonin modulates aromatase activity and expression in endothelial cells. *Oncol Rep.* **29**(5): 2058-2064.
- Ambros V.** (2001). microRNAs: tiny regulators with great potential. *Cell.* **107**(7): 823- 826.
- American Cancer Society Cancer Facts and Figures 2017.** Consultado en abril de 2020. Disponible en línea: www.cancer.org/research/cancer-facts-statistics/all-cancer-facts-figures/cancer-facts-figures-2017.html.
- Angelousi A., Kassi E., Ansari-Nasiri N., Randeva H., Kaltsas G., Chrousos G.** (2019). Clock genes and cancer development in particular in endocrine tissues. *Endocr. Relat. Cancer.* **26**(6): R305-R317.
- Arendt J.** (1986). Role of the pineal gland and melatonin in seasonal reproductive function in mammals. *Oxf. Rev. Reprod. Biol.* **8**: 266-320.
- Aronica S.M., Kraus W.L., Katzenellenbogen B.S.** (1994). Estrogen action via the cAMP signaling pathway: stimulation of adenylate cyclase and cAMP-regulated gene transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**(18): 8517-8521.
- Arnerlöv C., Emdin S.O., Cajander S., Bengtsson N.O., Tavelin B., Roos G.** (2001). Intratumoral variations in DNA ploidy and s-phase fraction in human breast cancer. *Anal. Cell. Pathol.* **23**(1): 21-28.
- Atkinson G., Holder A., Robertson C., Gant N., Drust B., Reilly T., Waterhouse J.** (2005). Effects of melatonin on the thermoregulatory responses to intermittent exercise. *J. Pineal Res.* **39**(4): 353-359.
- Avraham H.K., Jiang S., Fu Y., Nakshatri H., Ovadia H., Avraham S.** (2014). Angiopoietin-2 mediates blood-brain barrier impairment and colonization of triple- negative breast cancer cells in brain. *J. Pathol.* **232**(3): 369-381.
- Aygun H., Gul S.S.** (2019). Protective effect of melatonin and agomelatine on adriamycin-induced nephrotoxicity in rat model: a renal scintigraphy and biochemical study. *Bratisl. Lek. Listy.* **120**(2): 113-118.
- Bandyopadhyay A., Wang L., Agyin J., Tang Y., Lin S., Yeh I.T., De K., Sun L.Z.** (2010). Doxorubicin in combination with a small TGFbeta inhibitor: a potential novel therapy for metastatic breast cancer in mouse models. *PLoS One.* **5**(4): e10365.
- Banerjee A., Wu Z.S., Qian P.X., Kang J., Pandey V., Liu D.X., Zhu T., Lobie P.E.** (2011). ARTEMIS synergizes with TWIST1 to promote metastasis and poor survival outcome in patients with ER negative mammary carcinoma. *Breast Cancer Res.* **13**(6): R112.
- Beatson G.T.** (1896). On the Treatment of inoperable cases of carcinoma of the mamma: suggestions for a new method of treatment, with illustrative cases. *Trans. Med. Chir. Soc. Edinb.* **15**: 153-179.

Becker-André M., Wiesenberg I., Schaeren-Wiemers N., André E., Missbach M., Saurat J.H., Carlberg C. (1994). Pineal gland hormone melatonin binds and activates an orphan of the nuclear receptor superfamily. *J. Biol. Chem.* **269(46)**: 28531-28534.

Benítez-King G., Huerto-Delgadillo L., Antón-Tay F. (1993). Binding of 3H- melatonin to calmodulin. *Life Sci.* **53(3)**: 201-207.

Berchem G.J., Bosseler M., Mine N., Avalosse B. (1999). Nanomolar range docetaxel treatment sensitizes MCF-7 cells to chemotherapy induced apoptosis, induces G2M arrest and phosphorylates bcl-2. *Anticancer Res.* **19A**: 535-540.

Berger C., Qian Y., and Chen X. (2013). The p53-estrogen receptor loop in cancer. *Curr. Mol. Med.* **13(8)**: 1229-1240.

Berk L., Berkey B., Rich T., Hrushesky W., Blask D., Gallagher M., Kudrimoti M., McGarry R.C., Suh J., Mehta M. (2007). Randomized phase II trial of high dose melatonin and radiation therapy for RPA class 2 patients with brain metastases (RTOG 0119). *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **68(3)**: 852-857.

Bernstein L. (2002). Epidemiology of endocrine-related risk factors for breast cancer. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia.* **7(1)**: 3-15.

Blask D.E., Hill S.M. (1986). Effects of melatonin on cancer: studies on MCF-7 human breast cancer cells in culture. *J. Neural Transm. Suppl.* **21**: 433-449.

Blask D.E., Pelletier D.B., Hill S.M., Lemus-Wilson A., Grosso D.S., Wilson S.T., M E Wise M.E. (1991). Pineal melatonin inhibition of tumor promotion in the N-nitroso- N-methylurea model of mammary carcinogenesis: potential involvement of antiestrogenic mechanisms *in vivo*. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **117(6)**: 526-532.

Blask D.E., Sauer L.A., Dauchy R.T. (2002). Melatonin as a chronobiotic/anticancer agent: cellular, biochemical, and molecular mechanisms of action and their implications for circadian-based cancer therapy. *Curr. Top. Med. Chem.* **2(2)**: 113-132.

Blickenstaff R.T., Brandstadter S.M., Reddy S., Witt R. (1994). Potential radioprotective agents: 1. Homologs of melatonin. *J. Pharm. Sci.* **83(2)**: 216-218.

Bocchinfuso W. P., Korach K. S. (1997). Mammary gland development and tumorigenesis in estrogen receptor knockout mice. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia.* **2(4)**: 323-334.

Bonnefont-Rousselot D, Collin F. (2010). Melatonin: action as antioxidant and potential applications in human disease and aging. *Toxicology.* **278(1)**: 55-67.

Botha J.L., Bray F., Sankila F., Parkin D.M. (2003). Breast cancer incidence and mortality trends in 16 European countries. *Eur. J. Cancer.* **39(12)**: 1718-1729.

Boudreau A., Tanner K., Wang D., Geyer F.C., Reis-Filho J.S., Bissell M.J. (2013). 14-3-3 σ stabilizes a complex of soluble actin and intermediate filament to enable breast tumor invasion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **110(41)**: E3937-944.

- Bouhoute A., Leclercq G.** (1996). Calmodulin decreases the estrogen binding capacity of the estrogen receptor," *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **227(3)**: 651-657.
- Bostner J., Karlsson E., Eding C.B., Perez-Tenorio G., Franzén H., Konstantinell A., Fornander T., Nordenskjöld B., Stål O.** (2015). S6 kinase signaling: tamoxifen response and prognostic indication in two breast cancer cohorts. *Endocr. Relat. Cancer.* **22(3)**: 331-343.
- Bradford M.M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
- Bray F., Ferlay J., Soerjomataram I., Siegel R.L., Torre L.A., Jemal A.** (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J. Clin.* **68(6)**: 394-424.
- Brewer H.R., Jones M.E., Schoemaker M.J., Ashworth A., Swerdlow A.J.** (2017). Family history and risk of breast cancer: an analysis accounting for family structure. *Breast Cancer Res. Treat.* **165(1)**: 193-200.
- Brown K.A., Simpson E.R.** (2012). Obesity and breast cancer: mechanisms and therapeutic implications. *Front. Biosci.* **4**: 2515-2524.
- Buscemi N., Vandermeer B., Pandya R., Hooton N., Tjosvold L., Hartling L., Baker G., Vohra S., Klassen T.** (2004). Melatonin for treatment of sleep disorders. *Evid. Rep. Technol. Assess. (Summ).* **(108)**: 1-7.
- Cadenas C., van de Sandt L., Edlund K., Lohr M., Hellwig B., Marchan R., Schmidt M., Rahnenführer J., Oster H., Hengstler J.G.** (2014). Loss of circadian clock gene expression is associated with tumor progression in breast cancer. *Cell Cycle.* **13(20)**: 3282-3291.
- Caputo R., Cianniello D., Giordano A., Piezzo M., Riemma M., Trovò M., Berretta M., De Laurentiis M.** (2020). Gene expression assay in the management of early breast cancer. *Curr. Med. Chem.* **27(17)**: 2826-2839.
- Chaffer C.L., Weinberg R.A.** (2011). A perspective on cancer cell metastasis. *Science.* **331(6024)**: 1559-1564.
- Chao C.C., Chen P.C., Chiou P.C., Hsu C.J., Liu P.I., Yang Y.C., Reiter R.J., Yang S.F., Tang C.H.** (2019). Melatonin suppresses lung cancer metastasis by inhibition of epithelial-mesenchymal transition through targeting to Twist. *Clin. Sci. (Lond).* **133(5)**: 709-722.
- Cheng C.C., Shi L.H., Wang X.J., Wang S.X., Wan X.Q., Liu S.R., Wang Y.F., Lu Z., Wang L.H., Ding Y.** (2018). Stat3/Oct-4/c-Myc signal circuit for regulating stemness-mediated doxorubicin resistance of triple-negative breast cancer cells and inhibitory effects of WP1066. *Int. J. Oncol.* **53(1)**: 339-348.
- Cheng G.Z., Chan J., Wang Q., Zhang W., Sun C.D., Wang L.H.** (2007). Twist transcriptionally up-regulates AKT2 in breast cancer cells leading to increased migration, invasion, and resistance to paclitaxel. *Cancer Res.* **67(5)**: 1979-1987.

- Chi L., Zou Y., Qin L., Ma W., Hao Y., Tang Y., Luo R., Wu Z.** (2017). TIMELESS contributes to the progression of breast cancer through activation of MYC. *Breast Cancer Res.* **19(1)**: 53.
- Chojnacki C., Walecka-Kapica E., Błońska A., Winczyk K., Stępień A., Chojnacki J.** (2016). Serotonin and melatonin secretion in postmenopausal women with eating disorders. *Endokrynol. Pol.* **67(3)**: 299-304.
- Chuffa L., Seiva F., Cuciello M., Silveira H., Reiter R.J., Lupi L.A.** (2019). Clock genes and the role of melatonin in cancer cells: an overview. *Melatonin Research.* **2(2)**: 133-157.
- Chottanapund S., Van Duursen M.B.M., Navasumrit P., Hunsonti P., Timtavorn S., Ruchirawat M., Van den Berg M.** (2014). Anti-aromatase effect of resveratrol and melatonin on hormonal positive breast cancer cells co-cultured with breast adipose fibroblasts. *Toxicol. In Vitro.* **28(7)**: 1215-1221.
- Cicenas J., Urban P., Vuaroqueaux V., Labuhn M., Küng W., Wight E., Mayhew M., Eppenberger U., Eppenberger-Castori S.** (2005). Increased level of phosphorylated akt measured by chemiluminescence-linked immunosorbent assay is a predictor of poor prognosis in primary breast cancer overexpressing ErbB-2. *Breast Cancer Res.* **7(4)**: R394-401.
- Cohen M., Lippman M., Chabner B.** (1978). Role of pineal gland in aetiology and treatment of breast cancer. *Lancet.* **2(8094)**: 814-816.
- Correia C., Lee S.H., Meng X.W., Vincelette N.D., Knorr K.L., Ding H., Nowakowski G.S., Dai H., Kaufmann S.H.** (2015). Emerging understanding of Bcl-2 biology: Implications for neoplastic progression and treatment. *Biochim. Biophys. Acta.* **1853(7)**: 1658-1671.
- Cos S., González A., Martínez-Campa C., Mediavilla M.D., Alonso-González C., Sánchez-Barceló E.J.** (2006). Estrogen-signaling pathway: a link between breast cancer and melatonin oncostatic actions. *Cancer Detect Prev.* **30(2)**: 118-128.
- Cos S., González A., Martínez-Campa C., Mediavilla M.D., Alonso-González C., Sánchez-Barceló E.J.** (2008). Melatonin as a selective estrogen enzyme modulator. *Curr. Cancer Drug Targets.* **8(8)**: 691-702.
- Cos S., Martínez-Campa C., Mediavilla M.D., Sánchez-Barceló E.J.** (2005). Melatonin modulates aromatase activity in MCF-7 human breast cancer cells. *J. Pineal Res.* **38(2)**: 136-142.
- Cos S., Recio J., Sánchez-Barceló E.J.** (1996). Modulation of the length of the cell cycle time of MCF-7 human breast cancer cells by melatonin. *Life Sci.* **58(9)**: 811-816.
- Cos S., Sánchez-Barceló E.J.** (2000). Melatonin and mammary pathological growth. *Front. Neuroendocrinol.* **21(2)**: 133-170.
- Criscitiello C., Viale G., Curigliano G., Goldhirsh A.** (2018). Profile of buparlisib and its potential in the treatment of breast cancer: evidence to date. *Breast Cancer (Dove Med. Press).* **10**: 23-29.

- Croset M., Goehrig D., Frackowiak A., Bonnelye E., Ansieau S., Puisieux A., Clézardin P.** (2014). TWIST1 expression in breast cancer cells facilitates bone metastasis formation. *J. Bone Miner. Res.* **29(8)**: 1886-1899.
- Dai J.B., Zhu B., Lin W.J., Gao H.Y., Dai H., Zheng L., Shi W.H., Chen W.X.** (2020). Identification of prognostic significance of BIRC5 in breast cancer using integrative bioinformatics analysis. *Biosci. Rep.* **40(2)**: BSR20193678.
- Danforth D.N.Jr., Tamarkin L., Mulvihill J.J., Bagley C.S., Lippman M.E.** (1985). Plasma melatonin and the hormone-dependency of human breast cancer. *J. Clin. Oncol.* **3(7)**: 941-948.
- Dauchy R.T., Xiang S., Mao L., Brimer S., Wren M.A., Yuan L., Anbalagan M., Hauch A., Frasch T., Rowan B.G., Blask D.E., Hill S.M.** (2014). Circadian and melatonin disruption by exposure to light at night drives intrinsic resistance to tamoxifen therapy in breast cancer. *Cancer Res.* **74(15)**: 4099-4110.
- Davis S., Mirick D. K., Stevens R. G.** (2001). Night-shift-work, light-at-night, and the risk of breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **93(20)**: 1557-1562.
- Davison S.L., Davis S.R.** (2003). Androgens in women. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **85(2-5)**: 363-366.
- De Mei C., Ercolani L., Parodi C., Veronesi M., Vecchio C.L., Bottegoni G., Torrente E., Scarpelli R., Marotta R., Ruffili R., Mattioli M., Reggiani A., Wade M., Grimaldi B.** (2015). Dual inhibition of REV-ERB β and autophagy as a novel pharmacological approach to induce cytotoxicity in cancer cells. *Oncogene.* **34(20)**: 2597-2608.
- Del Río B., García Pedrero J.M., Martínez-Campa C., Zuazua P., Lazo P.S., Ramos S.** (2004). Melatonin, an endogenous-specific inhibitor of estrogen receptor alpha via calmodulin. *J. Biol. Chem.* **279(37)**: 38294-38302.
- Demir S., Müslümanoğlu M.H., Müslümanoğlu M., Başaran S., Çalay Z.Z., Aydın A., Vogt U., Çakır T., Kadioğlu H., Artan S.** (2019). TWIST1 gene expression as a biomarker for predicting primary doxorubicin resistance in breast cancer. *Balkan J. Med. Genet.* **22(2)**: 25-30.
- Denizot F., Lang R.** (1986). Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J. Immunol. Methods.* **89(2)**: 271-277.
- Dickson R.B., Stancel G.M.** (2000). Estrogen receptor-mediated processes in normal and cancer cells. *J. Natl. Cancer Inst. Monogr.* **(27)**: 135-145.
- Dongre A., Weinberg R.A.** (2019). New insights into the mechanisms of epithelial-mesenchymal transition and implications for cancer. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **20(2)**: 69-84.
- Elledge R.M., Allred D.C.** (1998). Prognostic and predictive value of p53 and p21 in breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* **52(1-3)**: 79-98.

Elkashif A., Bingham V., Haddock P., Humphries M.P., McQuaid S., Mullan P.B., McCarthy H.O., Buckley N.E. (2020). Glucocorticoid receptor expression predicts good outcome in response to taxane-free, anthracycline-based therapy in triple negative breast cancer. *J. Oncol.* **2020**: 3712825.

Ertlav K., Naziroğlu M., Ataizi Z.S. (2020). Melatonin and selenium suppress docetaxel induced TRPV1 activation, neuropathic pain and oxidative neurotoxicity in mice. *Biol. Trace Elem. Res.* Online ahead of print.

Ertosun M.G., Pehlivanoğlu S., Dılmaç S., Tanrıöver G., Özeş O.N. (2020). AKT-mediated phosphorylation of TWIST1 is essential for breast cancer cell metastasis. *Turk. J. Biol.* **44(4)**: 158-165.

Farhood B., Goradel N.H., Mortezaee K., Khanlarkhani N., Salehi E., Nashtaei M.S., Mirtavoos-Mahyari H., Motevaseli E., Shabeeb D., Musa A.E., Najafi M. (2019). Melatonin as an adjuvant in radiotherapy for radioprotection and radiosensitization. *Clin. Transl. Oncol.* **21(3)**: 268-279.

Farsinejad S., Rahaie M., Alizadeh A.M., Mir-Derikvand M., Gheisary Z., Nosrati H., Khalighfard S. (2016). Expression of the circulating and the tissue microRNAs after surgery, chemotherapy, and radiotherapy in mice mammary tumor. *Tumour Biol.* **37(10)**: 14225-14234.

Fic M., Gomulkiewicz A., Grzegorzolka J., Podhorska-Okolow M., Zabel M., Dziegiel P., Jablonska K. (2017). The impact of melatonin on colon cancer cells' resistance to doxorubicin in an *in vitro* study. *Int. J. Mol. Sci.* **18(7)**: 1396.

Fic M., Podhorska-Okolow M., Dziegiel P., Gebarowska E., Wysocka T., Drag-Zalesinska M., Zabel M. (2007). Effect of melatonin on cytotoxicity of doxorubicin toward selected cell lines (human keratinocytes, lung cancer cell line A-549, laryngeal cancer cell line Hep-2). *In Vivo.* **21(3)**: 513-518.

Fu L., Pelicano H., Liu J., Huang P., Lee C. (2002). The circadian gene period2 plays an important role in tumor suppression and DNA damage response in vivo. *Cell.* **111(1)**: 41-50.

García Pedrero J.M., Del Rio B., Martínez-Campa C., Muramatsu M., Lazo P.S., Ramos S. (2002). Calmodulin is a selective modulator of estrogen receptors. *Mol. Endocrinol.* **16(5)**: 947-960.

Garcia-Saenz A., Sánchez de Miguel A., Espinosa A., Valentin A., Aragonés N., Llorca J., Amiano P., Martín Sánchez V., Guevara M., Capelo R., Tardón A., Peiró- Perez R., Jiménez-Moleón J.J., Roca-Barceló A., Pérez-Gómez B., Dierssen-Sotos T., Fernández-Villa T., Moreno-Iribas C., Moreno V., García-Pérez J., Castaño- Vinyals G., Marina Pollán M., Aubé M., Kogevinas M. (2018). Evaluating the Association between Artificial Light-at-Night Exposure and Breast and Prostate Cancer Risk in Spain (MCC-Spain Study). *Environ. Health Perspect.* **126(4)**: 047011.

Gartel A.L., Radhakrishnan S.K. (2005). Lost in transcription: p21 repression, mechanisms, and consequences. *Cancer Res.* **65(10)**: 3980-3985.

Germain D. (2011). Estrogen carcinogenesis in breast cancer. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* **40(3)**: 473-484.

- Girgert R., Hanf V., Emons G., Gründker C.** (2009). Membrane-bound melatonin receptor MT1 down-regulates estrogen responsive genes in breast cancer cells. *J. Pineal Res.* **47(1)**: 23-31.
- Gnutti A., Signoroni A., Leonardi R., Corsini M., Presta M., Mitola S.** (2015). A tool for the quantification of radial neo-vessels in chick chorioallantoic membrane angiogenic assays. *Conf. Proc. IEEE Eng. Med. Biol. Soc.* **2015**: 763-766.
- Godson C., Reppert S.M.** (1997). The Mel1a melatonin receptor is coupled to parallel signal transduction pathways. *Endocrinology.* **138(1)**: 397-404.
- Gómez-Miragaya J., Morán S., Calleja-Cervantes M.E., Collado-Sole A., Paré L., Gómez A., Serra V., Dobrolecki L.E., Lewis M.T., Diaz-Lagares A., Eroles P., Prat A., Esteller M., González-Suárez E.** (2019). The altered transcriptome and DNA methylation profiles of docetaxel resistance in breast cancer PDX models. *Molecular Cancer Research.* **17(10)**: 2063-2076.
- González A., Alvarez-García V., Martínez-Campa C., Alonso-González C., Cos S.** (2012). Melatonin promotes differentiation of 3T3-L1 fibroblasts. *J. Pineal Res.* **52(1)**: 12-20.
- González A., Cos S., Martínez-Campa C., Alonso-González C., Sánchez-Mateos S., Mediavilla M.D., Sánchez-Barceló E.J.** (2008). Selective estrogen enzyme modulator actions of melatonin in human breast cancer cells. *J. Pineal Res.* **45(1)**: 86-92.
- González-González A., García-Nieto E., González A., Sánchez-Fernández C., Alonso-González C., Menéndez-Menéndez J., Gómez-Arozamena J., Cos S., Martínez-Campa C.** (2019a). Melatonin modulation of radiation and chemotherapeutics-induced changes on differentiation of breast fibroblasts. *Int. J. Mol. Sci.* **20(16)**: 3935.
- González-González A., González A., Rueda N., Alonso-González C., Menéndez-Menéndez J., Gómez-Arozamena J., Martínez-Campa C., Cos S.** (2019b). Melatonin enhances the usefulness of ionizing radiation: involving the regulation of different steps of the angiogenic process. *Front. Physiol.* **10**: 879.
- González-González A., González A., Rueda N., Alonso-González C., Menéndez-Menéndez J., Martínez-Campa C., Mitola S., Cos S.** (2020). Usefulness of melatonin as complementary to chemotherapeutic agents at different stages of the angiogenic process. *Sci. Rep.* **10(1)**: 4790.
- González T.L., Rae J.M., Colacino J.A.** (2019). Implication of enviromental estrogens on breast cancer treatment and progression. *Toxicology.* **421**: 41-48.
- Granzotto M., Rapozzi V., Decorti G., Giralidi T.** (2001). Effects of melatonin on doxorubicin cytotoxicity in sensitive and pleiotropically resistant tumor cells. *J. Pineal Res.* **31(3)**: 206-213.
- Gray M., Turnbull A.K., Ward C., Meehan J., Martínez-Pérez C., Bonello M., Pang L.Y., Langdon S.P., Kunkler I.H., Murray A., Argyle D.** (2019). Development and characterisation of acquired radioresistant breast cancer cell lines. *Radiat. Oncol.* **14(1)**: 64.

Grillo E., Ravelli C., Corsini M., Ballmer-Hofer K., Zammataro L., Oreste P., Zoppetti G., Tobia C., Ronca R., Presta M., Mitola S. (2016). Monomeric gremlin is a novel vascular endothelial growth factor receptor-2 antagonist. *Oncotarget*. **7(23)**: 35353-35368.

Gündisch S., Boeckeler E., Behrends U., Amtmann E., Ehrhardt H., Jeremias I. (2012). Glucocorticoids augment survival and proliferation of tumor cells. *Anticancer Res.* **32(10)**: 4251-4261.

Guo G., Dai S., Chen Q. (2020). Long noncoding RNA LINC00261 reduces proliferation and migration of breast cancer cells via the NME1-EMT pathway. *Cancer Manag. Res.* **12**: 3081-3089.

Guo Q., Zhu D., Bu X., Wei X., Li C., Gao D., Wei X., Ma X., Zhao P. (2017a). Efficient killing of radioresistant breast cancer cells by cytokine-induced killer cells. *Tumour Biol.* **39(3)**: 1010428317695961.

Guo Y., Yu P., Liu Z., Maimaiti Y., Chen C., Zhang Y., Yin X., Wang S., Liu C., Huang T. (2017b). Prognostic and clinicopathological value of GATA binding protein 3 in breast cancer: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. **12(4)**: e0174843.

Hall E.J., Giaccia A.J. (2012). Radiobiology for the radiologist. 7th ed. *Lippincott Williams & Wilkins*. Philadelphia, PA, USA. p. 576.

Hamburger V., Hamilton H.L. (1951). A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J. Morphol.* **88(1)**: 49-92.

Han K.Y., Chen P.N., Hong M.C., Hseu Y.C., Chen K.M., Hsu L.S., Chen W.J. (2018). Naringenin attenuated prostate cancer invasion via reversal of epithelial-to-mesenchymal transition and inhibited uPA activity. *Anticancer Res.* **38(12)**: 6753-6758.

Hara M., Yoshida M., Nishijima H., Yokosuka M., Iigo M., Ohtani-Kaneko R., Shimada A., Hasegawa T., Akama Y., Hirata K. (2001). Melatonin, a pineal secretory product with antioxidant properties, protects against cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *J. Pineal Res.* **30(3)**: 129-138.

Harfouche R., Echavarria R., Rabbani S.A., Arakelian A., Hussein M.A., Hussain S.N. (2011). Estradiol-dependent regulation of angiopoietin expression in breast cancer cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **123(1-2)**: 17-24.

Hata A., Kashima R. (2016). Dysregulation of microRNA biogenesis machinery in cancer. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **51(3)**: 121-134.

He Y., Wang Z., Hu Y., Yi X., Wu L., Cao Z., Wang J. (2020). Sensitive and selective monitoring of the DNA damage-induced intracellular p21 protein and unraveling the role of the p21 protein in DNA repair and cell apoptosis by surface plasmon resonance. *Analyst*. **145(10)**: 3697-3704.

Heldring N., Pike A., Andersson S., Matthews J., Cheng G., Hartman J., Tujague M., Ström A., Treuter E., Warner M., Gustafsson J.A. (2007). Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets. *Physiol. Rev.* **87(3)**: 905-931.

Hill S.M., Belancio V.P., Dauchy R.T., Xiang S., Brimer S., Mao L., Hauch A., Lundberg P.W., Summers W., Yuan L., Frasci T., Blask D.E. (2015). Melatonin: an inhibitor of breast cancer. *Endocr. Relat. Cancer*. **22(3)**: R183-204.

Horn P.L., Thompson W.D. (1988). Risk of contralateral breast cancer: associations with histologic, clinical and therapeutic factors. *Cancer (Phila.)*. **62(2)**: 412-424.

Hu Y., Xu K., Yagüe E. (2015). miR-218 targets survivin and regulates resistance to chemotherapeutics in breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* **151(2)**: 269-280.

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

Hwang-Versluis W.W., Chang P.H., Jeng Y.M., Kuo W.H., Chiang P.H., Chang Y.C., Hsieh T.H., Su F.Y., Lin L.C., Abbondante S., Yang C.Y., Hsu H.M., Yu J.C., Chang K.J., Shew J.Y., Lee E.Y., Lee W.H. (2013). Loss of corepressor PER2 under hypoxia up-regulates OCT1-mediated EMT gene expression and enhances tumor malignancy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. **110(30)**: 12331-12336.

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

IARC World Cancer Report. (2020). Cancer research for cancer prevention.

Imani S., Wei C., Cheng J., Khan M.A., Fu S., Yang L., Tania M., Zhang X., Xiao X., Zhang X., Fu J. (2017). MicroRNA-34a targets epithelial to mesenchymal transition-inducing transcription factors (EMT-TFs) and inhibits breast cancer cell migration and invasion. *Oncotarget*. **8(13)**: 21362-21379.

Ishitobi M., Shiba M., Nakayama T., Motomura K., Koyama H., Nishiyama K., Tamaki Y. (2014). Treatment sequence of aromatase inhibitors and radiotherapy and long-term outcomes of breast cancer patients. *Anticancer Res.* **34(8)**: 4311-4314.

Iwao-Koizumi K., Matoba R., Ueno N., Kim S.J., Ando A., Miyoshi Y., Maeda E., Noguchi S., Kato K. (2005). Prediction of docetaxel response in human breast cancer by gene expression profiling. *J. Clin. Oncol.* **23(3)**: 422-431.

James P., Bertrand K.A., Hart J.E., Schernhammer E.S., Tamimi R.M., Laden F. (2017). Outdoor light at night and breast cancer incidence in the nurses' health study II. *Environ. Health Perspect.* **125(8)**: 087010.

Janaki-Ramaiah M., Vaishnav S. (2018). BMI1 and PTEN are key determinants of breast cancer therapy: A plausible therapeutic target in breast cancer. *Gene*. **678**: 302-311.

Jawad B., Poudel L., Podgornik R., Steinmetz N.F., Ching W.Y. (2019). Molecular mechanism and binding free energy of doxorubicin intercalation in DNA. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **21(7)**: 3877-3893.

- Jawed S., Kim B., Ottenhof T., Brown G.M., Werstiuk E.S., Niles L.P.** (2007). Human melatonin MT1 receptor induction by valproic acid and its effects in combination with melatonin on MCF-7 breast cancer cell proliferation. *Eur. J. Pharmacol.* **560(1)**: 17-22.
- Jechlinger M., Grunert S., Tamir I.H., Janda E., Lüdemann S., Waerner T., Seither P., Weith A., Beug H., Kraut N.** (2003). Expression profiling of epithelial plasticity in tumor progression. *Oncogene*. **22(46)**: 7155-7169.
- Ji X., Lu Y., Tian H., Meng X., Wei M., Cho W.C.** (2019). Chemoresistance mechanisms of breast cancer and their countermeasures. *Biomed. Pharmacother.* **114**: 108800.
- Jiang D., Lynch C., Medeiros B.C., Liedtke M., Bam R., Tam A.B., Yang Z., Alagappan M., Abidi P., Le Q.T., Giaccia A.J., Denko N.C., Niwa M., Koong A.C.** (2016). Identification of Doxorubicin as an Inhibitor of the IRE1 α -XBP1 Axis of the Unfolded Protein Response. *Sci. Rep.* **6**: 33353.
- Jin L., Zhang Y., Li H., Yao L., Fu D., Yao X., Xu L.X., Hu X., Hu G.** (2012). Differential secretome analysis reveals CST6 as a suppressor of breast cancer bone metastasis. *Cell Res.* **22(9)**: 1356-1373.
- Kaboli P.J., Rahmat A., Ismail P., Ling K.H.** (2015). MicroRNA-based therapy and breast cancer: A comprehensive review of novel therapeutic strategies from diagnosis to treatment. *Pharmacol. Res.* **97**: 104-121.
- Kang J., Qian P.X., Pandey V., Perry J.K., Miller L.D., Liu E.T., Zhu T., Liu D.X., Lobie P.E.** (2010). Artemin is estrogen regulated and mediates antiestrogen resistance in mammary carcinoma. *Oncogene*. **29(22)**: 3228-3240.
- Kastan M.B., Onyekwere O., Sidransky D., Vogelstein B., Craig R.W.** (1991). Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res.* **51(23pt1)**: 6304-6311.
- Katzenellenbogen B.S., Katzenellenbogen J.A.** (2000). Estrogen receptor transcription and transactivation: Estrogen receptor alpha and estrogen receptor beta: regulation by selective estrogen receptor modulators and importance in breast cancer. *Breast Cancer Res.* **2(5)**: 335-344.
- Ke K., Lou T.** (2017). MicroRNA-10a suppresses breast cancer progression via PI3K/Akt/mTOR pathway. *Oncol. Lett.* **14(5)**: 5994-6000.
- Kerr D.J.** (2004). Targeting angiogenesis in cancer: clinical development of bevacizumab. *Nat. Clin. Pract. Oncol.* **1(1)**: 39-43.
- Key T.J., Verkasalo P.K., Banks E.** (2001). Epidemiology of breast cancer. *Lancet Oncol.* **2(3)**: 133-140.
- Khamisipour G., Mansourabadi E., Naeimi B., Moazzeni A., Tahmasebi R., Hasanpour M., Mohammadi M.M., Mansourabadi Z., Shamsian S.** (2018). Knockdown of microRNA-29a regulates the expression of apoptosis-related genes in MCF-7 breast carcinoma cells. *Mol Clin Oncol.* **8(2)**: 362-369.

- Kiefer T., Ram P.T., Yuan L., Hill S.M.** (2002). Melatonin inhibits estrogen receptor transactivation and cAMP levels in breast cancer cells. *Breast Cancer Res. Treat.* **71(1)**: 37-45.
- Kim C., Kim N., Joo H., Youm J.B., Park W.S., Cuong D.V., Park Y.S., Kim E., Min C.K., Han J.** (2005). Modulation by melatonin of the cardiotoxic and antitumor activities of Adriamycin. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **46(2)**: 200-210.
- Kim J., Siverly A.N., Chen D, Wang M., Yuan Y., Wang Y., Lee H., Zhang J., Muller W.J., Liang H., Gan B., Yang X., Sun Y., You M.J., Ma L.** (2016). Ablation of miR- 10b suppresses oncogene-induced mammary tumorigenesis and metastasis and reactivates tumor-suppressive pathways. *Cancer Res.* **76(21)**: 6424-6435.
- Kim K.J., Choi J.S., Kang I., Kim K.W., Jeong C.H., Jeong J.W.** (2013). Melatonin suppresses tumor progression by reducing angiogenesis stimulated by HIF-1 in a mouse tumor model. *J. Pineal Res.* **54(3)**: 264-270.
- Kisková T., Ekmekcioglu C., Garajová M., Orendás P., Bojková B., Bobrov N., Jäger W., Kassayová M., Thalhammer T.** (2012). A combination of resveratrol and melatonin exerts chemopreventive effects in N-methyl-N-nitrosourea-induced rat mammary carcinogenesis. *Eur. J. Cancer Prev.* **21(2)**: 163-170.
- Koşar P.A., Nazıroğlu M., Övey İ.S., Çiğ B.** (2016). Synergic effects of doxorubicin and melatonin on apoptosis and mitochondrial oxidative stress in MCF-7 breast cancer cells: involvement of TRPV1 channels. *J. Membr. Biol.* **249(1-2)**: 129-140.
- Kothari L.S., Shah P.N., Mhatre M.C.** (1984). Pineal ablation in varying photoperiods and the incidence of 9,10-dimethyl-1,2-benzanthracene induced mammary cancer in rats. *Cancer Letters.* **22(1)**: 99-102.
- Kubatka P., Bojková B., Kassayová M., Orendáš P., Kajo K., Výbohová D., Kružliak P., Adamicová K., Pěč M., Stollárová N., Adamkov M.** (2014). Combination of Pitavastatin and melatonin shows partial antineoplastic effects in a rat breast carcinoma model. *Acta Histochem.* **116(8)**: 1454-1461.
- Kubatka P., Zubor P., Busselberg D., Kwon T.K., Adamek M., Petrovic D., Opatrilova R., Gazdikova K., Caprnda M., Rodrigo L., Danko J., Kruzliak P.** (2018). Melatonin and breast cancer: evidences from preclinical and human studies. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **122**: 133-143.
- Kundaktepe B.P., Sozer V., Papila C., Durmus S., Kocael P.C., Simsek G., Gelisgen R., Zengin K., Ulualp K., Uzun H.** (2020). Associations between miRNAs and two different cancers: breast and colon. *Cancer Manag. Res.* **12**: 871-879.
- Kuo S.J., Chen S.T., Yeh K.T., Hou M.F., Chang Y.S., Hsu N.C., Chang J.G.** (2009). Disturbance of circadian gene expression in breast cancer. *Virchows. Arch.* **454(4)**: 467-474.
- Kurozumi S., Yamaguchi Y., Matsumoto H., Kurosumi M., Hayashi S.I., Fujii T., Horiguchi J., Shirabe K., Inoue K.** (2019). Utility of Ki67 labeling index, cyclin D1 expression, and ER-activity level in postmenopausal ER-positive and HER2-negative breast cancer with neoadjuvant chemo-endocrine therapy. *PLoS One.* **14(5)**: e0217279.

- Lam S.S., Ip C.K., Mak A.S., Wong A.S.** (2016). A novel p70 S6 kinase-microRNA biogenesis axis mediates multicellular spheroid formation in ovarian cancer progression. *Oncotarget*. **7(25)**: 38064-38077.
- Lee S.E., Kim S.J., Youn J.P., Hwang S.Y., Park C.S. and Park Y.S.** (2011). MicroRNA and gene expression analysis of melatonin-exposed human breast cancer cell lines indicating involvement of the anticancer effect. *J. Pineal Res.* **51(3)**: 345-352.
- Lee Y., Jung W.H., Koo J.S.** (2015). Adipocytes can induce epithelial-mesenchymal transition in breast cancer cells. *Breast Cancer Treat.* **153(2)**: 323-335.
- Lehrer S., Green S., Dembitzer F.R., Rheinstein P.H., Rosenzweig K.E.** (2019). Increased RNA Expression of von Willebrand factor gene is associated with infiltrating lobular breast cancer and normal PAM50 subtype. *Cancer Genomics Proteomics*. **16(3)**: 147-153.
- Leong S.P.L., Shen Z.Z., Liu T.J., Agarwal G., Tajima T., Paik N.S., Sandelin K., Anna Derossis, Cody H., Foulkes W.D.** (2010). Is breast cancer the same disease in Asian and Western countries? **34(10)**: 2308-2324.
- Lerner A.B., Case J.D., Takahashi Y., Lee T.H., Mori W.** (1958) Isolation of Melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes. *J. Am. Chem. Soc.* **80(10)**: 2587-2587.
- Li H., Chen X., Gao Y., Wu J., Zeng F., Song F.** (2015). XBP1 induces snail expression to promote epithelial- to-mesenchymal transition and invasion of breast cancer cells. *Cell. Signal.* **27(1)**: 82-89.
- Li H.R., Wang C., Sun P., Liu D.D., Du G.Q., Tian J.W.** (2020b). Melatonin attenuates doxorubicin-induced cardiotoxicity through preservation of YAP expression. *J. Cell. Mol. Med.* **24(6)**: 3634-3646.
- Li J., He Y., Cao Y., Yu Y., Chen X., Gao X., Hu Q.** (2018). Upregulation of Twist is involved in Gli1 induced migration and invasion of hepatocarcinoma cells. *Biol. Chem.* **399(8)**: 911-919.
- Li Q.Q., Xu J.D., Wang W.J., Cao X.X., Chen Q., Tang F., Chen Z.Q., Liu X.P., Xu Z.D.** (2009). Twist1-mediated adriamycin-induced epithelial-mesenchymal transition relates to multidrug resistance and invasive potential in breast cancer cells. *Clin. Cancer Res.* **15(8)**: 2657-2665.
- Li Y., Zhang B., Xiang L., Xia S., Kucuk O., Deng X., Boise L.H., Dong J.T.** (2020a). TGF- β causes docetaxel resistance in prostate cancer via the induction of Bcl-2 by acetylated KLF5 and protein stabilization. *Theranostics*. **10(17)**: 7656-7670.
- Li Z., Li H., Liu B., Luo J., Qin X., Gong M., Shi B., Wei Y.** (2020c). Inhibition of miR-25 attenuates doxorubicin-induced apoptosis, reactive oxygen species production and DNA damage by targeting PTEN. *Int. J. Med. Sci.* **17(10)**: 1415-1427.
- Li Z.H., Xiong Q.Y., Xu L., Duan P., Yang Q.O., Zhou P., Tu J.H.** (2017). miR-29a regulated ER-positive breast cancer cell growth and invasion and is involved in the insulin signaling pathway. *Oncotarget*. **8(20)**: 32566-32575.

- Lin H.H., Farkas M.E.** (2018). Altered circadian rhythms and breast cancer: from the human to the molecular level. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. **9**: 219.
- Lissoni P.** (2002). Is there a role for melatonin in supportive care? *Support. Care Cancer*. **10**: 110-116.
- Lissoni P., Barni S., Cattaneo G., Tancini G., Esposti G., Esposti D., Frascchini F.** (1991). Clinical results with the pineal hormone melatonin in advanced cancer resistant to standard antitumor therapies. *Oncology*. **48(6)**: 448-450.
- Lissoni P., Barni S., Mandalà M., Ardizzioia A., Paolorossi F., Vaghi M., Longarini R., Malugani F., Tancini G.** (1999). Decreased toxicity and increased efficacy of cancer chemotherapy using the pineal hormone melatonin in metastatic solid tumour patients with poor clinical status. *Eur. J. Cancer*. **35(12)**: 1688-1692.
- Lissoni P., Barni S., Tancini G., Crispino S., Paolorossi F., Lucini V., Mariani M., Cattaneo G., Esposti D., Esposti G.** (1987). Clinical study of melatonin in untreatable advanced cancer patients. *Tumori Journal*. **73(5)**: 475-480.
- Lissoni P., Chilelli M., Villa S., Cerizza L., Tancini G.** (2003). Five years survival in metastatic non-small cell lung cancer patients treated with chemotherapy alone or chemotherapy and melatonin: A randomized trial. *J. Pineal Res*. **35(1)**: 12-15.
- Lissoni P., Meregalli S., Nosetto L., Barni S., Tancini G., Fossati V., Maestroni G.** (1996). Increased survival time in brain glioblastomas by a radioneuroendocrine strategy with radiotherapy plus melatonin compared to radiotherapy alone. *Oncology*. **53(1)**: 43-46.
- Lissoni P., Tancini G., Barni S., Paolorossi F., Ardizzioia A., Conti A., Maestroni G.** (1997). Treatment of cancer chemotherapy-induced toxicity with the pineal hormone melatonin. *Support. Care Cancer*. **5(2)**: 126-129.
- Liu S., Chen S., Yuan W., Wang H., Chen K., Li D., Li D.** (2017c). PD-1/PD-L1 interaction up-regulates MDR1/P-gp expression in breast cancer cells via PI3K/AKT and MAPK/ERK pathways. *Oncotarget*. **8(59)**: 99901-99912.
- Liu S.Y., Li X.Y., Chen W.Q., Hu H., Luo B., Shi Y.X., Wu T.W., Li Y., Kong Q.Z., Lu H.D., Lu Z.X.** (2017a). Demethylation of the *MIR145* promoter suppresses migration and invasion in breast cancer. *Oncotarget*. **8(37)**: 61731-61741.
- Liu X., Guan Y., Wang L., Niu Y.** (2017b). MicroRNA-10b expression in node-negative breast cancer-correlation with metastasis and angiogenesis. *Oncol. Lett*. **14(5)**: 5845-5852.
- Liu Y., Li Tang L., Gao N., Diao Y., Zhong J., Deng Y., Wang Z., Jin G., Wang X.** (2020). Synthetic MUC1 breast cancer vaccine containing a Toll-like receptor 7 agonist exerts antitumor effects. *Oncol. Lett*. **20(3)**: 2369-2377.
- Livak K.J., Schmittgen T.D.** (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. **25(4)**: 402-408.

- Longnecker M. P., Newcomb P. A., Mittendorf R., Greenberg E. R., Clapp R. W., Bodgan G. F., Baron J., MacMahon B., Willet W. C.** (1995). Risk of breast cancer in relation to lifetime alcohol consumption. *J. Natl. Cancer Inst.* **87(12)**: 923-929.
- López-Cortés A., Paz-Y-Miño C., Guerrero S., Cabrera-Andrade A., Barigye S.J., Munteanu C.R., González-Díaz H., Pazos A., Pérez-Castillo Y., Tejera E.** (2020). OncoOmics approaches to reveal essential genes in breast cancer: a panoramic view from pathogenesis to precision medicine. *Sci. Rep.* **10(1)**: 5285.
- López-Otín C., Diamandis E.P.** (1998). Breast and prostate cancer: an analysis of common epidemiological, genetic, and biochemical features. *Endocr. Rev.* **19(4)**: 365-396.
- Lumachi F., Chiara G.B., Foltran L., Basso S.M.** (2015). Proteomics as a guide for personalized adjuvant chemotherapy in patients with early breast cancer. *Cancer Genomics Proteomics.* **12(6)**: 385-390.
- Lv C., Li F., Li X., Tian Y., Zhang Y., Sheng X., Song Y., Meng Q., Yuan S., Luan L., Andl T., Feng X., Jiao B., Xu M., Plikus M.V., Dai X., Lengner C., Cui W., Ren F., Shuai J., Millar S.E., Yu Z.** (2017). MiR-31 promotes mammary stem cell expansion and breast tumorigenesis by suppressing Wnt signaling antagonists. *Nat Commun.* **8(1)**: 1036.
- Lyseng-Williamson K.A., Fenton C.** (2005). Docetaxel: a review of its use in metastatic breast cancer. *Drugs.* **65(17)**: 2513-2531.
- Ma C., Li L.X., Zhan Y., Xiang C., Ma T., Ma Z.Q., Zhang Z.P.** (2015). Protective and sensitive effects of melatonin combined with adriamycin on ER+ (estrogen receptor) breast cancer. *Eur. J. Gynaecol. Oncol.* **36(2)**: 197-202.
- Ma L., Teruya-Feldstein J., Weinberg R.A.** (2007). Tumour invasion and metastasis initiated by microRNA-10b in breast cancer. *Nature.* **449(7163)**: 682-688.
- MacMahon B., Lin T.M., Lowe C.R., Mirra A.P., Ravnihar B., Salber E.J., Trichopoulos D., Valaoras V.G., Yuasa S.** (1970). Lactation and cancer of the breast. A summary of an international study. *Bull. World Health Organ.* **42(2)**: 185-194.
- Maestro R., Dei Tos A.P., Hamamori Y., Krasnokutsky S., Sartorelli V., Kedes L., Doglioni C., Beach D.H., Hannon G.J.** (1999). Twist is a potential oncogene that inhibits apoptosis. *Genes Dev.* **13(17)**: 2207-2217.
- Magne Nde C.B., Casas Gimeno G., Docanto M., Knowler K.C., Young M.J., Buehn J., Sayed E., Clyne C.D.** (2018). Timeless is a novel estrogen receptor co-activator involved in multiple signaling pathways in MCF-7 cells. *J. Mol. Biol.* **430(10)**: 1531-1543.
- Mao X., Wu X., Guo J., Deng M., Zhang H., Ma T., Yu L.** (2020). Expression of AGGF1 and Twist1 in hepatocellular carcinoma and their correlation with vasculogenic mimicry. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **13(7)**: 1646-1654.
- Martin T.A., Goyal A., Watkins G., Jiang W.G.** (2005). Expression of the transcription factors snail, slug, and twist and their clinical significance in human breast cancer. *Ann. Surg. Oncol.* **12(6)**: 488-496.

- Martínez-Campa C.M., Alonso-González C., Mediavilla M.D., Cos S., González A., Sanchez-Barceló E.J.** (2008). Melatonin down-regulates hTERT expression induced by either natural estrogens (17beta-estradiol) or metalloestrogens (cadmium) in MCF-7 human breast cancer cells. *Cancer Lett.* **268(2)**: 272-277.
- Martínez-Campa C., González A., Mediavilla M.D., Alonso-González C., Alvarez-García V., Sánchez-Barceló E.J., Cos S.** (2009). Melatonin inhibits aromatase promoter expression by regulating cyclooxygenases expression and activity in breast cancer cells. *Br. J. Cancer.* **101(9)**: 1613-1619.
- Martínez-Campa C., Menéndez-Menéndez J., Alonso-González C., González A., Álvarez-García V., Cos S.** (2017). What is known about melatonin, chemotherapy and altered gene expression in breast cancer (Review). *Oncol. Lett.* **13(4)**: 2003-2014.
- Mayo J.C., Sainz R.M., Antoli I., Herrera F., Martin V., Rodriguez C.** (2002). Melatonin regulation of antioxidant enzyme gene expression. *Cell. Mol. Life Sci.* **59(10)**: 1706-1713.
- McCorkle J.R., Leonard M.K., Kraner S.D., Blalock E.M., Ma D., Zimmer S.G., Kaetzel D.M.** (2014). The metastasis suppressor NME1 regulates expression of genes linked to metastasis and patient outcome in melanoma and breast carcinoma. *Cancer Genomics Proteomics.* **11(4)**: 175-194.
- Mediavilla M.D., Cos S., Sánchez-Barceló E.J.** (1999). Melatonin increases p53 and p21WAF1 expression in MCF-7 human breast cancer cells in vitro. *Life Sci.* **65(4)**: 415-420.
- Mediavilla M.D., Sanchez-Barceló E.J., Tan D.X., Manchester L., Reiter R.J.** (2010). Basic mechanisms involved in the anti-cancer effects of melatonin. *Curr. Med. Chem.* **17(36)**: 4462-4481.
- Meier D., Lopez M., Franken P., Fontana A.** (2015). Twist1 is a TNF-inducible inhibitor of clock mediated activation of period genes. *PLoS One.* **10(9)**: e0137229.
- Menéndez-Menéndez J., Martínez-Campa C.** (2018). Melatonin: an anti-tumor agent in hormone-dependent cancers. *Int. J. Endocrinol.* **2018**: 3271948.
- Migliaccio A., Di Domenico M., Castoria G., de Falco A., Bontempo P., Nola E., Auricchio F.** (1996). Tyrosine kinase/p21ras/MAP-kinase pathway activation by estradiol-receptor complex in MCF-7 cells. *EMBO J.* **15(6)**: 1292-1300.
- Milik S.N., Lasheen D.S., Serya R.A.T., Abouzeid K.A.M.** (2017). How to train your inhibitor: design strategies to overcome resistance to epidermal growth factor receptor inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* **142**: 131-151.
- Mironchik Y., Winnard P.T. Jr., Vesuna F., Kato Y., Wildes F., Pathak A.P., Kominsky S., Artemov D., Bhujwala Z., Van Diest P., Burger H., Glackin C., Raman V.** (2005). Twist overexpression induces in vivo angiogenesis and correlates with chromosomal instability in breast cancer. *Cancer Res.* **65(23)**: 10801-1089.
- Moelans C.B., Verschuur-Maes A.H., van Diest P.J.** (2011). Frequent promoter hypermethylation of BRCA2, CDH13, MSH6, PAX5, PAX6 and WT1 in ductal carcinoma in situ and invasive breast cancer. *J. Pathol.* **225(2)**: 222-231.

- Molinari E.J., North P.C., Dubocovich M.L.** (1996). 2-[125I]iodo-5-methoxycarbonylamino-N-acetyltryptamine: a selective radioligand for the characterization of melatonin ML2 binding sites. *Eur. J. Pharmacol.* **301(1-3)**: 159-168.
- Molis T.M., Spriggs L.L., Hill S.M.** (1994). Modulation of estrogen receptor mRNA expression by melatonin in MCF-7 human breast cancer cells. *Mol. Endocrinol.* **8(12)**: 1681-1690.
- Molis T.M., Spriggs L.L., Jupiter Y., Hill S.M.** (1995). Melatonin modulation of estrogen-regulated proteins, growth factors, and proto-oncogenes in human breast cancer. *J. Pineal Res.* **18(2)**: 93-103.
- Morris G.J., Mitchell E.P.** (2008). Higher incidence of aggressive breast cancers in african-american women: a review. *J. Natl. Med. Assoc.* **100(6)**: 698-702.
- Morrison Joly M., Hicks D.J., Jones B., Sánchez V., Estrada M.V., Young C., Williams M., Rexer B.N., Sarbassov D.D., Muller W.J., Brantley-Sieders D., Cook R.S.** (2016). Rictor/mTORC2 drives progression and therapeutic resistance of HER2- amplified breast cancers. *Cancer Res.* **76(16)**: 4752-4764.
- Mosmann T.** (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods.* **65(1-2)**: 55-63.
- Mueller S.O., Clark J.A., Myers P.H., Korach K.S.** (2002). Mammary gland development in adult mice requires epithelial and stromal estrogen receptor alpha. *Endocrinology.* **143(6)**: 2357-2365.
- Murphree A.L., Benedict W.F.** (1984). Retinoblastoma: clues to human oncogenesis. *Science.* **223(4640)**: 1028-1033.
- Mustonen M.V., Pyrhonen S., Kellokumpu-Lehtinen P.L.** (2014). Toremifene in the treatment of breast cancer. *World J. Clin. Oncol.* **5(3)**: 393-405.
- Nair C.K.K., Parida D.K., Nomura T.** (2001). Radioprotectors in radiotherapy. *J. Radiat. Res.* **42**: 21-37.
- Najafi M., Hooshangi Shayesteh M.R., Mortezaee K., Farhood B., Haghi-Aminjan H.** (2020). The role of melatonin on doxorubicin-induced cardiotoxicity: A systematic review. *Life Sci.* **241**: 117173.
- National Cancer Institute Breast Cancer Prevention (PDQ®).** Consultado en octubre de 2020. Disponible en: <https://www.cancer.gov/types/breast/patient/breast-prevention-pdq>.
- Nilsson S., Mäkelä S., Treuter E., Tujague M., Thomsen J., Andersson G., Enmark E., Pettersson K., Warner M., Gustafsson J.A.** (2001). Mechanisms of estrogen action. *Physiol Rev.* **81(4)**: 1535-1565.
- Nooshinfar E., Bashash D., Safaroghli-Azar A., Bayati S., Rezaei-Tavirani M., Ghaffari S.H., Akbari M.E.** (2016). Melatonin promotes ATO-induced apoptosis in MCF-7 cells: Proposing novel therapeutic potential for breast cancer. *Biomed. Pharmacother.* **83**: 456-465.

Nunnery S.E., Mayer I.A. (2020). Targeting the PI3K/AKT/mTOR pathway in hormone-positive breast cancer. *Drugs*. **80(16)**: 1685-1697.

OMS: Organización Mundial de la Salud. Consultado en febrero 2019. Disponible en: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>.

Orendáš P., Kubatka P., Bojková B., Kassayová M., Kajo K., Výbohová D., Kružliak P., Pěč M., Adamkov M., Kapinová A., Adamicová K., Sadloňová V., Chmelová M., Stollárová N. (2014). Melatonin potentiates the anti-tumour effect of pravastatin in rat mammary gland carcinoma model. *Int. J. Exp. Pathol.* **95(6)**: 401-410.

Panchenko A.V., Tyndyk M.L., Maydin M.A., Baldueva I.A., Artemyeva A.S., Kruglov S.S., Kireeva G.S., Golubev A.G., Belyaev A.M., Anisimov V.N. (2020). Melatonin administered before or after a cytotoxic drug increases mammary cancer stabilization rates in HER2/Neu mice. *Chemotherapy*. **65(1-2)**: 42-50.

Pariente R., Pariente J.A., Rodríguez A.B., Espino J. (2016). Melatonin sensitizes human cervical cancer HeLa cells to cisplatin-induced cytotoxicity and apoptosis: effects on oxidative stress and DNA fragmentation. *J. Pineal Res.* **60(1)**: 55-64.

Park J.J., Irvine R.A., Buchanan G., Koh S.S., Park J.M., Tilley W.D., Stallcup M.R., Press M.F., Coetzee G.A. (2000). Breast cancer susceptibility gene 1 (BRCA1) is a coactivator of the androgen receptor. *Cancer Res.* **60(21)**: 5946-5949.

Parker M.G. (1998). Transcriptional activation by oestrogen receptor. *Biochem. Soc. Symp.* **63**: 45-50.

Pitts T.M., Simmons D.M., Bagby S.M., Hartman S.J., Yacob B.Y., Gittleman B., Tentler J.J., Cittelly D., Ormond D.R., Messersmith W.A., Eckhardt S.G., Diamond J.R. (2020). Wee1 inhibition enhances the anti-tumor effects of capecitabine in preclinical models of triple-negative breast cancer. *Cancers (Basel)*. **12(3)**: 719.

Plaimee P., Weerapreeyakul N., Barusrux S., Johns N.P. (2015). Melatonin potentiates cisplatin-induced apoptosis and cell cycle arrest in human lung adenocarcinoma cells. *Cell Prolif.* **48(1)**: 67-77.

Preston-Martin S., Pike M.C., Ross R.K., Jones P.A., Henderson B.E. (1990). Increased cell division as a cause of human cancer. *Cancer Res.* **50(23)**: 7415-7421.

Prieto-Callejero B., Rivera R., Fagundo-Rivera J., Romero A., Romero-Martín M., Gómez-Salgado J., Ruiz-Frutos C. (2020). Relationship between chemotherapy-induced adverse reactions and health-related quality of life in patients with breast cancer. *Medicine (Baltimore)*. **99(33)**: e21695.

Proietti S., Cucina A., Dobrowolny G., D'Anselmi F., Dinicola S., Masiello M.G., Pasqualato A., Palombo A., Morini V., Reiter R.J., Bizzarri M. (2014). Melatonin down-regulates MDM2 gene expression and enhances p53 acetylation in MCF-7 cells. *J. Pineal Res.* **57(1)**: 120-129.

Proietti S., Cucina A., D'Anselmi F., Dinicola S., Pasqualato A., Lisi E., Bizzarri M. (2011). Melatonin and vitamin D3 synergistically down-regulate Akt and MDM2 leading to TGFβ-1-dependent growth inhibition of breast cancer cells. *J. Pineal Res.* **50(2)**: 150-158.

- Puca R., Nardinocchi L., Givol D., D'Orazi G.** (2010). Regulation of p53 activity by HIPK2: molecular mechanisms and therapeutical implications in human cancer cells. *Oncogene*. **29(31)**: 4378-4387.
- Purohit A., Woo L.W., Potter B.V.** (2011). Steroid sulfatase: a pivotal player in estrogen synthesis and metabolism,” *Mol. Cell Endocrinol.* **340(2)**: 154-160.
- Puttipanyalears C., Kitkumthorn N., Buranapraditkun S., Keelawat S., Mutirangura A.** (2016). Breast cancer upregulating genes in stromal cells by LINE-1 hypermethylation and micro-metastatic detection. *Epigenomics*. **8(4)**: 475-486.
- Quick E.L., Parry E.M., Parry J.M.** (2008). Do oestrogens induce chromosome specific aneuploidy in vitro, similar to the pattern of aneuploidy seen in breast cancer? *Mutat. Res.* **651(1-2)**: 46-55.
- Rajapakse N., Silva E., Kortenkamp A.** (2002). Combining xenoestrogens at levels below individual no-observed-effect-concentrations dramatically enhance steroid hormone action. *Environ. Health Perspect.* **110(9)**: 917-921.
- Ranganathan P., Nadig N., Nambiar S.** (2019). Non-canonical estrogen signaling in endocrine resistance. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. **10**: 708.
- Raphael J., Lefebvre C., Allan A., Helou J., Boldt G., Vandenberg T., Blanchette P.S.** (2020). Everolimus in advanced breast cancer: a systematic review and meta- analysis. *Target. Oncol.* **15(6)**: 723-732.
- Rapozzi V., Zorzet S., Comelli M., Mavelli I., Perissin L., Giraldi T.** (1998). Melatonin decreases bone marrow and lymphatic toxicity of Adriamycin in mice bearing TLX5 lymphoma. *Life Sci.* **63(19)**: 1701-1713.
- Rato A.G., Pedrero J.G., Martinez M.A., del Rio B., Lazo P.S., Ramos S.** (1999). Melatonin blocks the activation of estrogen receptor for DNA binding. *FASEB J.* **13(8)**: 857-868.
- Reiter R.J.** (1991a). Melatonin: the chemical expression of darkness. *Mol. Cell. Endocrinol.* **79(1-3)**: C153-158.
- Reiter R.J.** (1991b). Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. *Endocrine Reviews*. **12(2)**: 151-180.
- Reiter R.J., Guerrero J.M., García J.J., Acuña-Castroviejo D.** (1998). Reactive oxygen intermediates, molecular damage and aging: relation to melatonin. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **854**: 410-424.
- Reiter R.J., Mayo J.C., Tan D.X., Sainz R.M., Alatorre-Jimenez M., Qin L.** (2016). Melatonin as an antioxidant: under promises but over delivers. *J. Pineal Res.* **61(3)**: 253-278.
- Reiter R.J., Rosales-Corral S.A., Tan D.X., Acuna-Castroviejo D., Qin L., Yang S.F., Xu K.** (2017). Melatonin, a full service anti-cancer agent: inhibition of initiation, progression and metastasis. *Int. J. Mol. Sci.* **18(4)**. pii: E843.

- Reppert S.M., Weaver D.R., Ebisawa T.** (1994). Cloning and characterization of a mammalian melatonin receptor that mediates reproductive and circadian responses. *Neuron*. **13(5)**: 1177-1185.
- Rodriguez C., Mayo J.C., Sainz R.M., Antolín I., Herrera F., Martín V., Reiter R.J.** (2004). Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. *J. Pineal Res.* **36(1)**: 1-9.
- Rodriguez-Garcia A., Mayo J.C., Hevia D., Quiros-Gonzalez I., Navarro M., Sainz R.M.** (2013). Phenotypic changes caused by melatonin increased sensitivity of prostate cancer cells to cytokine-induced apoptosis. *J. Pineal Res.* **54(1)**: 33-45.
- Rokavec M., Öner M.G., Li H., Jackstadt R., Jiang L., Lodygin D., Kaller M., Horst D., Ziegler P.K., Schwitalla S., Slotta-Huspenina J., Bader F.G., Greten F.R., Hermeking H.** (2014). IL-6R/STAT3/miR-34a feedback loop promotes EMT-mediated colorectal cancer invasion and metastasis. *J. Clin. Invest.* **124(4)**: 1853-1867.
- Román S.A., López-Cruz L., Monferrer-Sales L.** (2016). Métodos inmunológicos para la detección de cambios en el sistema dopaminérgico: western blot y neurohistología para la detección de darpp-32. ISSN: 2443-9827, pp. 21-27.
- Roncato R., Angelini J., Pani A., Cecchin E., Sartore-Bianchi A., Siena S., De Mattia E., Scaglione F., Toffoli G.** (2020). CDK4/6 inhibitors in breast cancer treatment: potential interactions with drug, gene, and pathophysiological conditions. *Int. J. Mol. Sci.* **21(17)**: 6350.
- Rong Y., Yuan C.H., Qu Z., Zhou H., Guan Q., Yang N., Leng X.H., Bu L., Wu K., Wang F.B.** (2016). Doxorubicin resistant cancer cells activate myeloid-derived suppressor cells by releasing PGE2. *Sci. Rep.* **6**: 23824.
- Ross R. K., Paganini A., Wan P. C., Pike M. C.** (2000). Effect of hormone replacement therapy on breast cancer risk: estrogen versus estrogen plus progestin. *J. Natl. Cancer Inst.* **92(4)**: 328-332.
- Rui X., Zhao H., Xiao X., Wang L., Mo L., Yao Y.** (2018). MicroRNA-34a suppresses breast cancer cell proliferation and invasion by targeting Notch1. *Exp. Ther. Med.* **16(6)**: 4387-4392.
- Russo I. H., Russo J.** (1998). Role of hormones in mammary cancer initiation and progression. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia*. **3**: 49-61.
- Russo J., Fernández S. V., Russo P. A., Fernbaugh R., Sheriff F. S., Lareef H. M., Garber J., Russo I. H.** (2006). 17 beta estradiol induces transformation and tumorigenesis in human breast epithelial cells. *FASEB J.* **20(10)**: 1-13.
- Sainz R.M., Mayo J.C., Rodriguez C., Tan D.X., Lopez-Burillo S., Reiter R.J.** (2003). Melatonin and cell death: differential actions on apoptosis in normal and cancer cells. *Cell. Mol. Life. Sci.* **60(7)**: 1407-1426.
- Samulin J.E., Skare Ø., Petersen-Overleir M., Notø H.Ø., Lie J.S., Reszka E., Peplowska B., Zienolddiny S.** (2017). Mechanisms of breast cancer in shift workers: DNA methylation in five core circadian genes in nurses working night shifts. *J. Cancer.* **8(15)**: 2876-2884.

- Sato Y., Rifkin D.B.** (1988). Autocrine activities of basic fibroblast growth factor: regulation of endothelial cell movement, plasminogen activator synthesis, and DNA synthesis. *J. Cell. Biol.* **107(3)**: 1199-1205.
- Schairer C., Lubin J., Troisi R., Sturgeon S., Brinton L., Hoover R.** (2000). Estrogen-progestin replacement and risk of breast cancer. *J. A. M. A.* **284**: 691-694.
- Schernhammer E.S., Kroenke C.H., Laden F., Hankinson S.E.** (2006). Night work and risk of breast cancer. *Epidemiology.* **17(1)**: 108-111.
- Schernhammer E.S., Laden F., Speizer F.E., Willett W.C., Hunter D.J., Kawachi I., Colditz G.A.** (2001). Rotating night shifts and risk of breast cancer in women participating in the nurses' health study. *J. Natl. Cancer Inst.* **93(20)**: 1563-1568.
- Shao J., Teng Y., Padia R., Hong S., Noh H., Xie X., Mumm J.S., Dong Z., Ding H.F., Cowell J., Kim J., Han J., Huang S.** (2013). COP1 and GSK3 β cooperate to promote c- Jun degradation and inhibit breast cancer cell tumorigenesis. *Neoplasia.* **15(9)**: 1075-1085.
- Sharon H., Giordano M.D.** (2018). Breast cancer in men. *N. Engl. J. Med.* **378**: 2311-2320.
- Shen H., Li L., Yang S., Wang D., Zhong S., Zhao J., Tang J.** (2016). MicroRNA-29a contributes to drug-resistance of breast cancer cells to adriamycin through PTEN/AKT/GSK3 β signaling pathway. *Gene.* **593(1)**: 84-90.
- Shen X., Jiang H., Chen Z., Lu B., Zhu Y., Mao J., Chai K., Chen W.** (2019). MicroRNA-145 Inhibits cell migration and invasion in colorectal cancer by targeting TWIST. *Onco. Targets Ther.* **12**: 10799-10809.
- Shiau A.K., Barstad D., Loria P.M., Cheng L., Kushner P.J., Agard D.A., Greene G.L.** (1998). The structural basis of estrogen receptor/coactivator recognition and the antagonism of this interaction by tamoxifeno. *Cell.* **95(7)**: 927-937.
- Shinomiya N.** (2001). New concepts in radiation-induced apoptosis: 'premitotic apoptosis' and 'postmitotic apoptosis' *J. Cell Mol. Med.* **5(3)**: 240-253.
- Shiota M., Izumi H., Onitsuka T., Miyamoto N., Kashiwagi E., Kidani A., Hirano G., Takahashi M., Naito S., Kohno K.** (2008). Twist and p53 reciprocally regulate target genes via direct interaction. *Oncogene.* **27(42)**: 5543-5553.
- Shirazi A., Ghobadi G., Ghazi-Khansari M.** (2007). A radiobiological review on melatonin: a novel radioprotector. *J. Radiat. Res.* **48(4)**: 263-272.
- Shirazi A., Mihandoost E., Mohseni M., Ghazi-Khansari M., Rabie Mahdavi S.** (2013). Radio-protective effects of melatonin against irradiation-induced oxidative damage in rat peripheral blood. *Phys. Med.* **29(1)**: 65-74.
- Shirley S.H., Rundhaug J.E., Tian J., Cullinan-Ammann N., Lambertz I., Conti C.J., Fuchs-Young R.** (2009). Transcriptional regulation of estrogen receptor-alpha by p53 in human breast cancer cells. *Cancer Res.* **69(8)**: 3405-3414.

Si W., Li Y., Shao H., Hu R., Wang W., Zhang K., Yang Q. (2016). MiR-34a inhibits breast cancer proliferation and progression by targeting Wnt in Wnt/ β -catenin signaling pathway. *Am. J. Med. Sci.* **352(2)**: 191-199.

Silva E., Rajapakse N., Kortenkamp A. (2002). Something from “nothing”-eight weak estrogenic chemicals combined at concentrations below NOECs produce significant mixture effects. *Environ. Sci. Technol.* **36(8)**: 1751-1756.

Silva R., Vilas-Boas V., Carmo H., Dinis-Oliveira R.J., Carvalho F., de Lourdes Bastos M., Remião F. (2015). Modulation of P-glycoprotein efflux pump: induction and activation as a therapeutic strategy. *Pharmacol. Ther.* **149**: 1-123.

Singer C.F., Filipits M., Jahn S.W., Abete L., Jakesz R., Greil R., Bauernhofer T., Kwasny W., Seifert M., Fitzal F., Kastner M., Schmitt M., Moinfar F., Gnant M. (2019). Stromal coexpression of uPA/PAI-1 protein predicts poor disease outcome in endocrine-treated postmenopausal patients with receptor-positive early breast cancer. *Breast.* **46**: 101-107.

Singh S., Chakrabarti R. (2019). Consequences of EMT-driven changes in the immune microenvironment of breast cancer and therapeutic response of cancer cells. *J. Clin. Med.* **8(5)**: 642.

Sizemore G.M., Balakrishnan S., Thies K.A., Hammer A.M., Sizemore S.T., Trimboli A.J., Cuitiño M.C., Steck S.A., Tozbikian G., Kladney R.D., Shinde N., Das M., Park D., Majumder S., Krishnan S., Yu L., Fernandez S.A., Arnab Chakravarti A., Shields P.G., White J.R., Yee L.D., Rosol T.J., Ludwig T., Morag Park M., Leone G., Ostrowski M.C. (2018). Stromal PTEN determines mammary epithelial response to radiotherapy. *Nat. Commun.* **9(1)**: 2783.

Soares J.M.Jr., Masana M.I., Erşahin C., Dubocovich M.L. (2003). Functional melatonin receptors in rat ovaries at various stages of the estrous cycle. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **306(2)**: 694-702.

Sohail M.F., Rehman M., Sarwar H.S., Naveed S., Salman O., Bukhari N.I., Hussain I., Webster T.J., Shahnaz G. (2018). Advancements in the oral delivery of docetaxel: challenges, current state-of-the-art and future trends. *Int. J. Nanomedicine.* **13**: 3145-3161.

Soheilyfar S., Velashjerdi Z., Sayed Hajizadeh Y., Fathi Maroufi N., Amini Z., Khorrami A., Haj Azimian S., Isazadeh A., Taefehshokr S., Taefehshokr N. (2018). *In vivo* and *in vitro* impact of miR-31 and miR-143 on the suppression of metastasis and invasion in breast cancer. *J. BUON.* **23(5)**: 1290-1296.

Stankevicius L., Almeida da Silva A.P., dos Passos F.V., dos Santos Ferreira E., Ribeiro C.M., David M.G., Pires E.J., Ferreira-Machado S.C., Yegor Vassetzky Y., de Almeida C.E., de Moura Gallo C.V. (2013). MiR-34a is up-regulated in response to low dose, low energy X-ray induced DNA damage in breast cells. *Radiat. Oncol.* **8**: 231.

- Steelman L.S., Navolanic P.M., Sokolosky M.L., Taylor J.R., Lehmann B.D., Chappell W.H., Abrams S.L., Wong E.W., Stadelman K.M., Terrian D.M., Leslie N.R., Martelli A.M., Stivala F., Libra M., Franklin R.A., McCubrey J.A.** (2008). Suppression of PTEN function increases breast cancer chemotherapeutic drug resistance while conferring sensitivity to mTOR inhibitors. *Oncogene*. **27(29)**: 4086-4095.
- Stefanski C.D., Keffler K., McClintock S., Milac L., Prosperi J.R.** (2019). APC loss affects DNA damage repair causing doxorubicin resistance in breast cancer cells. *Neoplasia*. **21(12)**: 1143-1150.
- Stefulj J., Hörtnner M., Ghosh M., Schauenstein K., Rinner I., Wölfler A., Semmler J., Liebmann P.M.** (2001). Gene expression of the key enzymes of melatonin synthesis in extrapineal tissues of the rat. *J. Pineal Res.* **30(4)**: 243-247.
- Sterneck E., Poria D.K., Balamurugan K.** (2020). Slug and E-Cadherin: stealth accomplices? *Front. Mol. Biosci.* **7**: 138.
- Stevens R.G.** (1987). Electric power use and breast cancer: a hypothesis. *Am. J. Epidemiol.* **125(4)**: 556-561.
- Tamarkin L., Danforth D., Lichter A., DeMoss E., Cohen M., Chabner B., Lippman M.** (1982). Decreased nocturnal plasma melatonin peak in patients with estrogen receptor positive breast cancer. *Science*. **216(4549)**: 1003-1005.
- Tan D.X., Manchester L.C., Hardeland R., Lopez-Burillo S., Mayo J.C., Sainz R.M., Reiter R.J.** (2003). Melatonin: a hormone, a tissue factor, an autocoid, a paracoid, and an antioxidant vitamin. *J. Pineal. Res.* **34(1)**: 75-78.
- Tan W.X., Sun G., Shanguan M.Y., Gui Z., Bao Y., Li Y.F., Jia Z.H.** (2020). Novel role of lncRNA CHRFB in cisplatin resistance of ovarian cancer is mediated by miR-10b induced EMT and STAT3 signaling. *Sci. Rep.* **10(1)**: 14768.
- Tang H., Massi D., Hemmings B.A., Mandalà M., Hu Z., Wicki A., Xue G.** (2016). AKT-ions with a TWIST between EMT and MET. *Oncotarget*. **7(38)**: 62767-62777.
- Tang H.L., Tang H.M., Mak K.H., Hu S., Wang S.S., Wong K.M., Wong C.S., Wu H.Y., Law H.T., Liu K., Talbot C.C.Jr., Lau W.K., Montell D.J., Fung M.C.** (2012). Cell survival, DNA damage, and oncogenic transformation after a transient and reversible apoptotic response. *Mol. Biol. Cell*. **23(12)**: 2240-2252.
- Tesch M.E., Gelmon K.A.** (2020). Targeting HER2 in breast cancer: latest developments on treatment sequencing and the introduction of biosimilars. *Drugs*. **80(17)**: 1811-1830.
- Thiery J.P., Acloque H., Huang R.Y.J., Nieto M.A.** (2009). Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell*. **139(5)**: 871-890.
- Thisse B., el Messal M., Perrin-Schmitt F.** (1987). The twist gene: isolation of a Drosophila zygotic gene necessary for the establishment of dorsoventral pattern. *Nucleic Acids Res.* **15(8)**: 3439-3453.

Thomas H. V., Reeves G. K., Key T. J. (1997). Endogenous estrogen and postmenopausal breast cancer: A quantitative review. *Cancer Causes Control*. **8(6)**: 922-928.

Tiezzi D.G., Andrade J.M., Ribeiro-Silva A., Zola F.E., Marana H.R., Tiezzi M.G. (2007) HER-2, p53, p21 and hormonal receptors proteins expression as predictive factors of response and prognosis in locally advanced breast cancer treated with neoadjuvant docetaxel plus epirubicin combination. *BMC Cancer*. **7**: 36-46.

Tinwell H., Ashby J. (2004). Sensitivity of the immature rat uterotrophic assay to mixtures of estrogens. *Environ. Health Perspect.* **112(5)**: 575-582.

Tomblin J.K., Salisbury T.B. (2014). Insulin like growth factor 2 regulation of aryl hydrocarbon receptor in MCF-7 breast cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **443(3)**: 1092-1096.

Trubiani O., Recchioni R., Moroni F., Pizzicannella J., Caputi S., Di Primio R. (2005). Melatonin provokes cell death in human B-lymphoma cells by mitochondrial- dependent apoptotic pathway activation. *J. Pineal Res.* **39(4)**: 425-431.

Tsukerman P., Yamin R., Seidel E., Khawaled S., Schmiedel D., Bar-Mag T., Mandelboim O. (2014). MiR-520d-5p directly targets TWIST1 and downregulates the metastamiR miR-10b. *Oncotarget*. **5(23)**: 12141-12150.

Tudor G., Aguilera A., Halverson D.O., Laing N.D., Sausville E.A. (2000) Susceptibility to drug-induced apoptosis correlates with differential modulation of Bad, Bcl-2 and Bcl-xL protein levels. *Cell Death Differ.* **7(6)**: 574-586.

Turek F.W. (1985). Circadian neural rhythms in mammals. *Annu. Rev. Physiol.* **47**: 49-64.

Uguz A.C., Cig B., Espino J., Bejarano I., Naziroglu M., Rodríguez A.B., Pariente J.A. (2012). Melatonin potentiates chemotherapy-induced cytotoxicity and apoptosis in rat pancreatic tumor cells. *J. Pineal. Res.* **53(1)**: 91-98.

van Landeghem A.A., Poortman J., Nabuurs M., Thijssen J.H. (1985). Endogenous concentration and subcellular distribution of estrogens in normal and malignant human breast tissue. *Cancer Res.* **45(6)**: 2900-2906.

van't Veer L.J., Dai H., van de Vijver M.J., He Y.D., Hart A.A., Mao M., Peterse H.L., van der Kooy K., Marton M.J., Witteveen A.T., Schreiber G.J., Kerkhoven R.M., Roberts C., Linsley P.S., Bernards R., Friend S.H. (2002). Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature*. **415(6871)**: 530-536.

Varkonyi-Gasic E., Hellens R.P. (2011). Quantitative stem-loop RT-PCR for detection of microRNAs. *Methods Mol. Biol.* **744**: 145-157.

Vesuna F., Lisok A., Kimble B., Domek J., Kato Y., van der Groep P., Artemov D., Kowalski J., Carraway H., van Diest P., Raman V. (2012). Twist contributes to hormone resistance in breast cancer by downregulating estrogen receptor- α . *Oncogene*. **31(27)**: 3223-3234.

Vijayalaxmi, Meltz M.L., Reiter R.J., Herman T.S. (1999). Melatonin and protection from genetic damage in blood and bone marrow: whole-body radiation studies in mice. *J. Pineal Res.* **27(4)**: 221-225.

Vijayalaxmi, Reiter R.J., Herman T.S., Meltz, M.L. (1996). Melatonin and radioprotection from genetic damage: *In vivo/in vitro* studies with human volunteers. *Mutat. Res.* **371(3-4)**: 221-228.

Vriend J., Reiter R.J. (2015). Breast cancer cells: Modulation by melatonin and the ubiquitin-proteasome system - a review. *Mol. Cell. Endocrinol.* **417**: 1-9.

Waldhauser F., Weiszenbacher G., Tatzer E., Gisinger B., Waldhauser M., Schemper M., Frisch H. (1988). Alterations in nocturnal serum melatonin levels in humans with growth and aging. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **66(3)**: 648-652.

Wan L., Tian Y., Zhang R., Peng Z., Sun J., Zhang W. (2018). MicroRNA-103 confers the resistance to long-treatment of Adriamycin to human leukemia cells by regulation of COP1. *J. Cell. Biochem.* **119(5)**: 3843-3852.

Wang J., Xiao X., Zhang Y., Shi D., Chen W., Fu L., Liu L., Xie F., Kang T., Huang W., Deng W. (2012). Simultaneous modulation of COX-2, p300, Akt, and Apaf-1 signaling by melatonin to inhibit proliferation and induce apoptosis in breast cancer cells. *J Pineal Res.* **53(1)**: 77-90.

Wang L., Zhou R., Zhao Y., Dong S., Zhang J., Luo Y., Huang N., Shi M., Bin J., Liao Y., Liao W. (2016). MACC-1 Promotes Endothelium-Dependent Angiogenesis in Gastric Cancer by Activating TWIST1/VEGF-A Signal Pathway. *PLoS One.* **11(6)**: e0157137.

Wang M., Long K., Li E., Li L., Li B., Ci S., He L., Pan F., Hu., Guo Z. (2020). DNA polymerase beta modulates cancer progression via enhancing CDH13 expression by promoter demethylation. *Oncogene.* **39(33)**: 5507-5519.

Wang S.M., Coljee V.W., Pignolo R.J., Rotenberg M.O., Cristofalo V.J., Sierra F. (1997). Cloning of the human twist gene: its expression is retained in adult mesodermally-derived tissues. *Gene.* **187(1)**: 83-92.

Wang Y., Jin B., Ai F., Duan C., Lu Y., Dong T., Fu Q. (2012). The efficacy and safety of melatonin in concurrent chemotherapy or radiotherapy for solid tumors: a meta- analysis of randomized controlled trials. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **69(5)**: 1213-1220.

Wang W., Dong L., Saville B., Safe S. (1999). Transcriptional activation of E2F1 gene expression by 17beta-estradiol in MCF-7 cells is regulated by NF-YSp1/estrogen receptor interactions. *Mol. Endocrinol.* **13(8)**: 1373-1387.

Wang W., Hind T., Lam B.W.S., Herr D.R. (2019). Sphingosine 1-phosphate signaling induces SNAI2 expression to promote cell invasion in breast cancer cells. *FASEB J.* **33(6)**: 7180-7191.

Wang Y., Chen D.Q., Chen M.Y., Ji K.Y., Ma D.X., Zhou L.F. (2017). Endothelial cells by inactivation of VHL gene direct angiogenesis, not vasculogenesis via Twist1 accumulation associated with hemangioblastoma neovascularization. *Sci Rep.* **7(1)**: 5463.

Wei X., Li S., He J., Du H., Liu Y., Yu W., Hu H., Han L., Wang C., Li H., Shi X., Zhan M., Lu L., Yuan S., Sun L. (2019). Tumor-secreted PAI-1 promotes breast cancer metastasis via the induction of adipocyte-derived collagen remodeling. *Cell. Commun. Signal.* **17(1)**: 58.

Wei X., Xu H., Kufe D. (2007). Human mucin 1 oncoprotein represses transcription of the p53 tumor suppressor gene. *Cancer Res.* **67(4)**: 1853-1858.

Weichselbaum R.R., Dahlberg W., Beckett M., Karrison T., Miller D., Clark J., Ervin T.J. (1986). Radiation-resistant and repair-proficient human tumor cells may be associated with radiotherapy failure in head- and neck-cancer patients. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* **83(8)**: 2684-2688.

Wilson S.T., Blask D.E., Lemus-Wilson A.M. (1992). "Melatonin augments the sensitivity of MCF-7 human breast cancer cells to tamoxifen in vitro. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **75 (2)**: 669-670.

Wolden-Hanson T., Mitton D.R., McCants R.L., Yellon S.M., Wilkinson C.W., Matsumoto A.M., Rasmussen D.D. (2000). Daily melatonin administration to middle-aged male rats suppresses body weight, intraabdominal adiposity, and plasma leptin and insulin independent of food intake and total body fat. *Endocrinology.* **141(2)**: 487-497.

Woo S.M., Min K.J., Kwon T.K. (2015). Melatonin-mediated Bim up-regulation and cyclooxygenase-2 (COX-2) down-regulation enhances tunicamycin-induced apoptosis in MDA-MDB-231 cells. *J. Pineal Res.* **58(3)**: 310-320.

Wu A.H. (2000). Diet and breast carcinoma in multiethnic populations. *Cancer.* **88(5 Suppl)**: 1239-1244.

Wu A.H., Pike M. C., Stram D. O. (1999). Meta-analysis: dietary fat intake, serum estrogen levels, and the risk of breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **91(6)**: 529-534.

Wu D., Cheng J., Sun G., Wu S., Li M., Gao Z., Zhai S., Li P., Su D., Wang X. (2016). p70S6K promotes IL-6-induced epithelial-mesenchymal transition and metastasis of head and neck squamous cell carcinoma. *Oncotarget.* **7(24)**: 36539-36550.

Wu Y.H., Huang Y.F., Chen C.C., Chou C.Y. (2019). Akt inhibitor SC66 promotes cell sensitivity to cisplatin in chemoresistant ovarian cancer cells through inhibition of COL11A1 expression. *Cell Death Dis.* **10(4)**: 322.

Wushou A., Hou J., Zhao Y.J., Shao Z.M. (2014). Twist-1 up-regulation in carcinoma correlates to poor survival. *Int. J. Mol. Sci.* **15(12)**: 21621-21630.

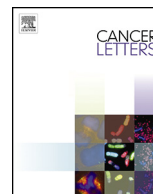
Xiang S., Dauchy R.T., Hauch A., Mao L., Yuan L., Wren M.A., Belancio V.P., Mondal D., Frasci T., Blask D.E., Hill S.M. (2015). Doxorubicin resistance in breast cancer is driven by light at night-induced disruption of the circadian melatonin signal. *J. Pineal. Res.* **59(1)**: 60-69.

Xiao H., Verdier-Pinard P., Fernandez-Fuentes N., Burd B., Angeletti R., Fiser A., Horwitz S.B., Orr G.A. (2006). Insights into the mechanism of microtubule stabilization by Taxol. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **103(27)**: 10166-10173.

- Xin L., Liu Y.H., Martin T.A., Jiang W.G.** (2017). The era of multigene panels comes? The clinical utility of oncotype DX and MammaPrint. *World J. Oncol.* **8(2)**: 34-40.
- Xue G., Restuccia D.F., Lan Q., Hynx D., Dirnhofer S., Hess D., Rüegg C., Hemmings B.A.** (2012). Akt/PKB-mediated phosphorylation of Twist1 promotes tumor metastasis via mediating cross-talk between PI3K/Akt and TGF- β signaling axes. *Cancer Discov.* **2(3)**: 248-259.
- Yadav N.V.S., Barcikowski A., Uehana Y., Jacobs A.T., Connelly L.** (2020). Breast adipocyte co-culture increases the expression of pro-angiogenic factors in macrophages. *Front. Oncol.* **10**: 454.
- Yager J.D.** (2000). Endogenous estrogens as carcinogens through metabolic activation. *J. Natl. Cancer Inst. Monogr.* **(27)**: 67-73.
- Yang M., Li L., Chen S., Li S., Wang B., Zhang C., Chen Y., Yang L., Xin H., Chen C., Xu X., Zhang Q., He Y., Ye J.** (2020a). Melatonin protects against apoptosis of megakaryocytic cells via its receptors and the AKT/mitochondrial/caspase pathway. *Aging (Albany NY)*. **12(13)**: 13633-13646.
- Yang X., Gao F., Zhang W., Li H., Huang X., Wei J., Bian J., Yang Y., Qian C., Sun M.** (2020b). "Star" miR-34a and CXCR4 antagonist based nanoplex for binary cooperative migration treatment against metastatic breast cancer. *J. Control. Release.* **326**: 615-627.
- Yancik R., Wesley M.N., Ries L.A., Havlik R.J., Edwards B.K., Yates J.W.** (2001). Effect of age and comorbidity in postmenopausal breast cancer patients aged 55 years and older. *JAMA.* **285(7)**: 885-892.
- Yao-Borengasser A., Monzavi-Karbassi B., Hedges R.A., Rogers L.J., Kadlubar S.A., Kieber-Emmons T.** (2015). Adipocyte hypoxia promotes epithelial-mesenchymal transition-related gene expression and estrogen receptor-negative phenotype in breast cancer cells. *Oncol Rep.* **33(6)**: 2689-2694.
- Ying S.Y., Chang D.C., Lin S.L.** (2007). The microRNA (miRNA): overview of the RNA genes that modulate gene function. *Mol. Biotechnol.* **38(3)**: 257-268.
- Yndestad S., Austreid E., Svanberg I.R., Knappskog S., Lønning P.E., Eikesdal H.P.** (2017). Activation of Akt characterizes estrogen receptor positive human breast cancers which respond to anthracyclines. *Oncotarget.* **8(25)**: 41227-41241.
- Yoshida K., Miki Y.** (2004). Role of BRCA1 and BRCA2 as regulators of DNA repair, transcription, and cell cycle in response to DNA damage. *Cancer Science.* **95(11)**: 866-871.
- Yu T., Cho B.J., Choi E.J., Park J.M., Kim D.H., Kim I.A.** (2016). Radiosensitizing effect of lapatinib in human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer cells. *Oncotarget.* **7(48)**: 79089-79100.
- Yu W., Huang W., Yang Y., Qiu R., Zeng Y., Hou Y., Sun G., Shi H., Leng S., Feng D., Chen Y., Wang S., Teng X., Yu H., Wang Y.** (2019). GATA3 recruits UTX for gene transcriptional activation to suppress metastasis of breast cancer. *Cell Death Dis.* **10(11)**: 832.

- Yue W., Santen R. J., Wang J. P., Li. Y., Verderame M. F., Bocchinfuso W. P., Korach K. S., Devanesan P., Todorovic R., Rogan E. G., Cavalieri E. L.** (2003). Genotoxic metabolites of estradiol in breast: potential mechanism of estradiol induced carcinogenesis. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **86**(3-5): 477-486.
- Yue W., Wang J. P., Hamilton C. J., Demers L. M., Santen R. J.** (1998). In situ aromatization enhances breast tumour estradiol levels and cellular proliferation. *Cancer Res.* **58**(5): 927-932.
- Yun M., Kim E.O., Lee D., Kim J.H., Kim J., Lee H., Lee J., Kim S.H.** (2014). Melatonin sensitizes H1975 non-small-cell lung cancer cells harboring a T790M-targeted epidermal growth factor receptor mutation to the tyrosine kinase inhibitor gefetinib. *Cell. Physiol. Biochem.* **34**(3): 865-872.
- Zang H., Li N., Pan Y., Hao J.** (2017). Identification of upstream transcription factors (TFs) for expression signature genes in breast cancer. *Gynecol. Endocrinol.* **33**(3): 193-198.
- Zhang B., Pan X., Cobb G.P., Anderson T.A.** (2007). microRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Dev. Biol.* **302**(1): 1-12.
- Zhang H., Cai K., Wang J., Wang X., Cheng K., Shi F., Jiang L., Zhang Y., Dou J.** (2014a). MiR-7, inhibited indirectly by lincRNA HOTAIR, directly inhibits SETDB1 and reverses the EMT of breast cancer stem cells by downregulating the STAT3 pathway. *Stem Cells.* **32**(11): 2858-2868.
- Zhang J., Ren L., Yu M., Liu X., Ma W., Huang L., Li X., Ye X.** (2019). S-equol inhibits proliferation and promotes apoptosis of human breast cancer MCF-7 cells via regulating miR-10a-5p and PI3K/AKT pathway. *Arch. Biochem. Biophys.* **672**: 108064.
- Zhang P., Wei Y., Wang L., Debeb B.G., Yuan Y., Zhang J., Yuan J., Wang M., Chen D., Sun Y., Woodward W.A., Liu Y., Dean D.C., Liang H., Hu Y., Ang K.K., Hung M.C., Chen J., Ma L.** (2014b). ATM-mediated stabilization of ZEB1 promotes DNA damage response and radioresistance through CHK1. *Nat. Cell. Biol.* **16**(9): 864-875.
- Zhang S., Qiu X., Zhang Y., Fu K., Zhao X., Wu J., Hu Y., Zhu W., Guo H.** (2015). Basic fibroblast growth factor ameliorates endothelial dysfunction in radiation-induced bladder injury. *Biomed. Res. Int.* **2015**: 967680.
- Zhang Y., Lai J., Du Z., Gao J., Yang S., Gorityala S., Xiong X., Deng O., Ma Z., Yan C., Susana G., Xu Y., Zhang J.** (2016). Targeting radioresistant breast cancer cells by single agent CHK1 inhibitor via enhancing replication stress. *Oncotarget.* **7**(23): 34688-34702.
- Zhang Y., Liu Q., Wang F., Ling E.A., Liu S., Wang L., Yang Y., Yao L., Chen X., Wang F., Shi W., Gao M., Hao A.** (2013). Melatonin antagonizes hypoxia-mediated glioblastoma cell migration and invasion via inhibition of HIF-1 α . *J. Pineal Res.* **55**(2): 121-130.
- Zhang Z., Inserra P.F., Liang B., Ardestani S.K., Elliott K.K., Molitor M., Watson R.R.** (1997) Melatonin, immune modulation and aging. *Autoimmunity.* **26**(1): 43-53.

- Zhao C., Wang Q., Wang B., Sun Q., He Z., Hong J., Kuehn F., Liu E., Zhang Z.** (2017). IGF-1 induces the epithelial-mesenchymal transition via Stat5 in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget*. **8(67)**: 111922-111930.
- Zhao H., Kang X., Xia X., Wo L., Gu X., Hu Y., Xie X., Chang H., Lou L., Shen X.** (2016). miR-145 suppresses breast cancer cell migration by targeting FSCN and inhibiting epithelial-mesenchymal transition. *Am. J. Transl. Res.* **8(7)**: 3106-3114.
- Zhao Y., Agarwal V.R., Mendelson C.R., Simpson E.R.** (1996). Estrogen biosynthesis proximal to a breast tumor is stimulated by PGE2 via cyclic AMP, leading to activation of promoter II of the CYP19 (aromatase) gene. *Endocrinology*. **137(12)**: 5739-5742.
- Zhao S.G., Chen W.S., Das R., Chang S.L., Tomlins S.A., Chou J., Quigley D.A., Dang H.X., Barnard T.J., Mahal B.A., Gibb E.A., Liu Y., Davicioni E., Duska L.R., Posadas E.M., Jolly S., Spratt D.E., Nguyen P.L., Maher C.A., Small E.J., Feng F.Y.** (2019). Clinical and genomic implications of luminal and basal subtypes across carcinomas. *Clin. Cancer Res.* **25(8)**: 2450-2457.
- Zhou M., Hou Y., Yang G., Zhang H., Tu G., Du Y.E., Wen S., Xu L., Tang X., Tang S., Yang L., Cui X., Liu M.** (2016). LncRNA-Hh strengthen cancer stem cells generation in twist-positive breast cancer via activation of hedgehog signaling pathway. *Stem Cells*. **34(1)**: 55-66.
- Zhu Q.Q., Ma C., Wang Q., Song Y., Lv T.** (2016). The role of TWIST1 in epithelial-mesenchymal transition and cancers. *Tumour Biol.* **37(1)**: 185-197.
- Zohny S.F., Al-Malki A.L., Zamzami M.A., Choudhry H.** (2019). p21^{Waf1/Cip1}: its paradoxical effect in the regulation of breast cancer. *Breast Cancer*. **26(2)**: 131-137.
- Zisapel N.** (2018). New perspectives on the role of melatonin in human sleep, circadian rhythms and their regulation. *Br. J. Pharmacol.* **175(16)**: 3190-3199.
- Zubidat A.E., Haim A.** (2017). Artificial light-at-night - a novel lifestyle risk factor for metabolic disorder and cancer morbidity. *J. Basic Clin. Physiol. Pharmacol.* **28(4)**: 295-313.



Original Articles

Melatonin enhancement of the radiosensitivity of human breast cancer cells is associated with the modulation of proteins involved in estrogen biosynthesis



Carolina Alonso-González ^a, Alicia González ^a, Carlos Martínez-Campa ^a,
Javier Menéndez-Menéndez ^a, José Gómez-Arozamena ^b, Angela García-Vidal ^a,
Samuel Cos ^{a,*}

^a Department of Physiology and Pharmacology, School of Medicine, University of Cantabria and Instituto de Investigación Valdecilla (IDIVAL), Spain

^b Department of Medical Physics, School of Medicine, University of Cantabria, 39011 Santander, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 28 July 2015

Received in revised form 14 October 2015

Accepted 15 October 2015

Keywords:

Melatonin

Breast cancer

Radiation

Aromatase

Sulfatase

17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1

ABSTRACT

Enhancing the radiosensitivity of cancer cells is one of the most important tasks in clinical radiobiology. Endocrine therapy and radiotherapy are two cancer treatment modalities which are often given together in patients with locally-advanced breast cancer and positive hormone-receptor status. Oncostatic actions of melatonin are relevant on estrogen-dependent mammary tumors. In the present study, we wanted to evaluate the effects of the combination of ionizing radiation and melatonin on proteins involved in estrogen biosynthesis in breast cancer cells. We demonstrated a role of melatonin in mediating the sensitization of human breast cancer cells to the ionizing radiation by decreasing around 50% the activity and expression of proteins involved in the synthesis of estrogens in these cells. Thus, melatonin pre-treatment before radiation reduces the amount of active estrogens at cancer cell level. Melatonin 1 nM induced a 2-fold change in p53 expression as compared to radiation alone. The regulatory action of melatonin on p53 could be a link between melatonin and its modulatory action on the sensitivity of breast cancer cells to ionizing radiation. These findings may have implications for designing clinical trials using melatonin and radiotherapy.

© 2015 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

Introduction

Melatonin is the main secretory product of the pineal gland that participates in the regulation of important physiological and pathological processes, such as the regulation of neoplastic cell growth. Oncostatic actions of melatonin are relevant on tumors corresponding to the mammary gland and especially on estrogen-dependent mammary tumors [1–6]. Evidence from *in vivo* studies on animal models and *in vitro* studies on breast cancer cell lines supports the hypothesis that melatonin's oncostatic effects on hormone-dependent mammary tumors are mainly dependent on its ability to interact with the estrogen-signaling pathway [5,7]. At the mammary tumor cell level, melatonin interferes with the estrogen receptor, modulates estrogen binding, DNA-binding, and transcriptional activity, and counteracts the effects of estrogens, thus behaving as a selective estrogen receptor modulator. Melatonin, at physiological concentrations, is also able to modulate the synthesis and transformation of androgens and biologically active estrogens

in human breast cancer cells, through the inhibition of aromatase, sulfatase and 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 activity and expression, and the stimulation of sulfotransferase activity and expression, enzymes involved in the estradiol formation in breast cancer cells, thus behaving as a selective estrogen enzyme modulator [8–10].

The identification of estrogen's central role in mammary carcinogenesis has led to investigation of estrogen pathways as major targets for breast cancer therapy. Breast-conserving surgery, radiotherapy for the affected breast, and adjuvant hormone therapy using antiestrogens, like tamoxifen, or aromatase inhibitors, like letrozol, are standard treatments for postmenopausal early breast cancer patients with hormone receptor-positive tumors [11,12]. Radiotherapy is considered a standard treatment option after surgery and adjuvant endocrine therapy is also universally used [11]. Timely initiation of radiation therapy is critical and contributes to a good recovery. Tamoxifen and letrozole are the current first-line endocrine therapy drugs. Tamoxifen, a selective estrogen receptor modulator, has provided a significant improvement in both local control and global survival rates [11,13]. Nowadays, it is estimated that tamoxifen may reduce the annual breast cancer death rate by 31% in estrogen receptor-positive mammary tumors [13,14]. *In vivo* studies have

* Corresponding author. Tel.: +34 942 201988; fax: +34 942 201903.

E-mail address: cos@unican.es (S. Cos).

shown a synergistic effect of concurrent antiestrogen treatment and radiotherapy on tumor cells [12–14]. Aromatase inhibitors of third generation, which were introduced in the late 1990s, have proven to be superior to tamoxifen for postmenopausal patients [15]. Although limited data on the use of aromatase inhibitors with radiotherapy are available, Azria et al. [16] described that letrozole, a non-steroid selective aromatase inhibitor, sensitizes breast cancer cells to ionizing radiation, and Ishitobi et al. [17] described that the administration of aromatase inhibitors after and concurrently with radiotherapy in patients with breast cancer is a reasonable treatment option.

Since melatonin has both antiestrogen and antiaromatase properties [4,5,8], we thought about the possibility that melatonin may regulate the sensitivity of human breast cancer cells to radiotherapy. Recently, our group demonstrated that melatonin pretreatment before radiation sensitizes breast cancer cells to the ionizing effects of radiation by decreasing cell proliferation, inducing cell cycle arrest and downregulating proteins involved in double-strand DNA break repair [18]. In the present study we investigated the effects of melatonin on radiated human breast cancer cells by regulating proteins involved in estrogen biosynthesis.

Materials and methods

Cells and culture conditions

MCF-7 human breast cancer cells were purchased from the American Tissue Culture Collection (Rockville, MD, USA). They were maintained as monolayer cultures in 75 cm² plastic culture flasks in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Biowest, Nuaille, France), penicillin (20 units/ml) and streptomycin (20 µg/ml) (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) at 37 °C in a humid atmosphere containing 5% CO₂.

Ionizing radiation treatment

MCF-7 cells were exposed to X irradiation using a model YXLON SMART 200 tube (Yxlon International, Hamburg, Germany) at room temperature. Based on a previous study [18], we used 8 Gy radiation as the optimal radiation dose. The radiation was delivered as a single dose of 8 Gy in an 11.5 cm × 8.5 cm field size, 96-multiwell plates, at a dose rate of 0.92 Gy/min. The source-half-depth distance was initially calculated to obtain a constant dose rate of 0.92 Gy/min. Control cells were removed from the incubator and were placed for the same period of time into the irradiator but without radiation.

Measurement of cellular proliferation and cytotoxicity

Cells were initially cultured for 24 h in DMEM supplemented with 0.5% dextran-charcoal stripped FBS (csFBS) and then media were replaced by fresh ones with 10% FBS and containing either 1 mM, 10 µM or 1 nM melatonin (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) and/or vehicle (ethanol at a final concentration lower than 0.0001%). Plates were incubated at 37 °C for 1 week in these media. Then, cells were seeded into 96-multiwell plates at a density of 8×10^3 cells per well in DMEM supplemented with 10% FBS and incubated at 37 °C for 24 h to allow for cell attachment before irradiation. After irradiation cells were cultured for 6 days. Cell proliferation was measured by the MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] method [19], reading absorbance at 570 nm in a microplate reader (Labsystems Multiskan RC 351, Vienna, VA, USA). MTT was obtained from Molecular Probes Inc. (Eugene, OR, USA).

The effect of melatonin pretreatment before radiation on cellular survival was measured in a clonogenic assay. Control and melatonin (1 mM, 10 µM or 1 nM) pretreated (a week) MCF-7 cells were cultured in a bilayer soft-agar system modified from that described by Hamburger and Salmon [20,21]. Briefly, the bottom layer consisted of DMEM enriched with FBS, penicillin (20 units/ml) and streptomycin (20 µg/ml). A 3% suspension of hot agar (70–75 °C) was added to the enriched DMEM to make a final concentration of 0.5% agar. One ml of the resultant suspension (40–42 °C) was then dispensed into a 35-mm² petri dish and allowed to cool at room temperature. The upper layer consisted of the same medium as the bottom layer and 3% agar was added to make a final concentration of 0.6%. Plating was performed by aspirating 0.5 ml of the cell suspension (1.75×10^5 viable cells) followed by 0.5 ml of the upper layer suspension (40–42 °C) and dispensing the 1 ml on top of the lower layer. Cells were then incubated at 37 °C with 5% CO₂ and 100% humidity. Then, cells were exposed to 8 Gy irradiation and colonies >150 µm were stained with crystal violet and counted 10 days after plating. The survival fraction was calculated according to the percentage of survival fraction of control non-irradiated cells.

Measurement of cellular aromatase activity

Aromatase activity in MCF-7 cells was measured by the tritiated water release assay, which is based on the formation of tritiated water during aromatization of a labeled androgenic substrate such as [1β -³H(N)]-androst-4-ene-3,17-dione [22]. Control and melatonin (1 mM, 10 µM or 1 nM) pretreated (a week) MCF-7 cells were seeded into six-well plates at a density of (1.5×10^5 cells/well) in DMEM supplemented with 10% FBS, 20 units/ml penicillin and 20 µg/ml streptomycin and incubated at 37 °C for 24 h in a humid atmosphere containing 5% CO₂, to allow for cell attachment before irradiation. Then, cells were irradiated and after 24 hours, media were aspirated and changed to serum-free media supplemented with 0.5% csFBS and containing the labeled substrate 300 nM [1β -³H(N)]-androst-4-ene-3,17-dione (NEN Life Science Products, Boston, MA, USA) (75–80 Ci/nM). After 24 hours, six-well plates were placed on ice for 15 min to condense any water vapor and media were transferred to tubes containing 0.25 ml ice-cold 30% trichloroacetic acid (w/v), vortexed and centrifuged at 1700 g for 20 min. The supernatants were extracted with chloroform, vortexed and centrifuged at 1700 g for 20 min. The resulting aqueous supernatants were adsorbed with 10% dextran-coated charcoal (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain), vortexed, centrifuged at 1700 g for 20 min, and the supernatants were added to vials with scintillation cocktail and counted in a beta counter (Beckman LS 6000 IC, Fullerton, CA, USA). The amount of radioactivity measured in [³H]-water was corrected by subtracting the blank values from each sample, obtained by incubating dishes containing medium with the tritiated androgen but no cells. The values were also corrected by taking into account the fractional retention of tritium in medium water throughout the processing, utilizing parallel dishes containing medium plus known amounts of [³H]-water (NEN Life Science Products, Boston, MA, USA) through incubation and assay. The fractional retention of tritium in medium water throughout the incubation and processing of samples was always higher than 85%.

Measurement of steroid sulfatase (STS) activity

STS activity in MCF-7 cells was assayed by the formation of estrone from a labeled substrate ([6,7-³H(N)]-estrone sulfate ammonium salt) [23]. Control and melatonin (1 mM, 10 µM or 1 nM) pretreated (a week) MCF-7 cells were seeded into six-well plates at a density of (1.5×10^5 cells/well) in DMEM supplemented with 10% FBS, 20 units/ml penicillin and 20 µg/ml streptomycin and incubated at 37 °C for 24 h in a humid atmosphere containing 5% CO₂, to allow for cell attachment before irradiation. Then, cells were irradiated and after 24 hours, media were aspirated and replaced with fresh ones (1 ml per plate) containing 5 pM [6,7-³H(N)]-estrone sulfate ammonium salt (NEN Life Science Products, Boston, MA, USA) (57.3 Ci/mM). After 24 h of incubation, culture dishes were placed on ice for 15 min to condense any water vapor and the media were transferred to tubes containing 5 ml of toluene, vortexed and centrifuged at 1000 × g for 10 min. The resulting organic phase was added to vials with scintillation cocktail and counted in a beta counter. The amount of radioactivity measured in the [³H]-toluene was corrected by subtracting the blank values from each sample, obtained by incubating dishes containing the medium but no cells with the tritiated estrone. The values were also corrected by taking into account the fractional retention of tritium in medium water throughout the procedure of incubation and processing, utilizing parallel dishes containing the medium plus known amounts of [³H] estrone (NEN Life Science Products, Boston, MA, USA) through incubation and assay. The fractional retention of tritium in medium water throughout the incubation and processing of samples was always higher than 92%.

Measurement of 17β-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (17β-HSD1) activity

Activity of 17β-HSD1 was assayed in MCF-7 cells by the formation of E₂ from a labeled substrate [2,4,6,7-³H(N)]-estrone [24]. Control and melatonin (1 mM, 10 µM or 1 nM) pretreated (a week) MCF-7 cells were seeded into six-well plates at a density of (1.5×10^5 cells/well) in DMEM supplemented with 10% FBS, 20 units/ml penicillin and 20 µg/ml streptomycin and incubated at 37 °C for 24 h in a humid atmosphere containing 5% CO₂, to allow for cell attachment before irradiation. Then, cells were irradiated and after 24 hours, media were aspirated and changed for fresh ones (1 ml per plate) containing 2 nM [2,4,6,7-³H(N)]-estrone (NEN Life Science Products, Boston, MA, USA) (100 Ci/mM). After 30 min of incubation, the media were transferred to tubes containing 4 ml of diethyl ether, vortexed and centrifuged at 800 × g for 5 min. The aqueous phase was frozen and the resulting organic phase was decanted, evaporated in tubes containing 50 µg of estradiol. The residue was resuspended in diethyl ether and separated by TLC using dichloromethane/ethyl acetate (4:1; v/v). Once the spots had been visualized, excised and eluted with methanol, they were counted in a liquid scintillation counter. Values were corrected for blanks and tritium recovery (higher than 82%) as described for STS activity.

Measurement of mRNA expression of STS, 17β-HSD1, aromatase, p53 and aromatase promoter regions pl.3, pl.1 and pl.7 gene expression

Expression of the mRNA from different enzymes (aromatase, STS and 17β-HSD1), p53 mRNA expression and aromatase mRNA promoter regions pl.3, pl.1 and pl.7 expression in MCF-7 cells were carried out by real-time reverse transcription (RT-PCR) after incubation of control and melatonin (1 mM, 10 µM or 1 nM) pretreated cells for 6 h after irradiation. The total cellular RNA was isolated from MCF-7

Table 1

Primers used for amplification of mRNA transcripts of human aromatase, aromatase promoter region pII, pI.3, pI.7, STS, 17 β -HSD1, p53 and S14 (control).

mRNA	Sequence	bp	[] nM
Aromatase FW	5'-GTCGTGGACTTGGTCATGC-3'	109	100
Aromatase RV	5'-CGAGTCTGTGCATCCTTCC-3'		100
pI.3 FW	5'-GTCTTGCCTAAATGTCTGATC-3'	119	200
pI.3 RV	5'-CAGAGATCCAGACTCGCATG-3'		200
pII FW	5'-CTCTGAAGCAACAGGAGCTATAGA-3'	167	200
pII RV	5'-CAGGCACGATGCTGGTGATG-3'		200
pI.7 FW	5'-AACACTCAGCTTTTCCCAAC-3'	100	200
pI.7 RV	5'-CTTGCTGATTTACCCCTTT-3'		200
STS FW	5'-TCCGTTCCTGCTTGTCTTGTG-3'	197	200
STS RV	5'-CCTGGTCCGATGTGAAGTAGATG-3'		200
17 β -HSD1 FW	5'-AAGTCCATTGGGGTGTCC-3'	189	200
17 β -HSD1 RV	5'-ACGGTGGCTTCCAGAGC-3'		200
p53 FW	5'-CAGCCAAGTCTGTGACTTGACGTAC-3'	252	100
p53 RV	5'-CTATGTCCGAAAAGTGTCTGTGATC-3'		100
S14 FW	5'-TCACCGCCCTACACATCAAAC-3'	159	100
S14 RV	5'-TCACCGCCCTACACATCAAAC-3'		100

bp: product size (base-pairs); [] nM: primer concentration.
FW, sense (forward) primer; RV, antisense (reverse) primer.

cells and purified with the Nucleospin RNA II kit (Macherey-Nagel GmbH & Co., Düren, Germany) following the manufacturer's instructions. The absorbance ratio A260 nm/A280 nm was greater than 1.9. For cDNA synthesis, 1 μ g of total RNA was denatured at 65 °C for 10 min and reverse-transcribed for 30 min at 45 °C with the Tetro cDNA synthesis Kit (Bioline, London, UK) in a final volume of 20 μ l in the presence of 500 ng of oligo (dT)12–18 primer. Real time PCRs were performed in an MX3005 (Agilent, CA, USA) using Brilliant® III Ultra-Fast SYBR® Green QPCR Master Mix (Agilent Technologies, CA, USA) following the manufacturer's instructions. The sets of human oligonucleotides (Sigma Genosys Ltd., Cambridge, UK) used as primers are indicated in Table 1. Ribosomal subunit (S14) mRNA expression was used for normalization. Amplifications were initiated by 1 cycle at 95 °C for 3 min and then performed for 40 cycles for quantitative analysis using the following temperature profile: 95 °C for 20 s (denaturation); 60 °C for 20 s (annealing/extension), setting the instrument to detect and report fluorescence at each cycle during the 60 °C annealing/extension step. Each reaction was run in triplicate. Melting curves were performed by using a dissociation curve to verify that only a single product with no primer-dimers was amplified. For the primers used there were no differences between transcription efficiencies, and the fold-change in each sample was calculated by the 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} method [25].

Statistical analysis

The data are expressed as the mean $\pm$ standard errors of the mean (SEM) of six independent experiments. Statistical differences between groups were analyzed by using one way analysis of variance (ANOVA), followed by the Student–Newman–Keuls test. Results were considered as statistically significant at $p < 0.05$.

Results

Effects of ionizing radiation and melatonin on cell proliferation and cytotoxicity

With radiation alone, the MCF-7 cell proliferation decreased in a dose-dependent manner, and for 8 Gy radiation, the inhibition of cell proliferation was 40% with respect to control non-irradiated cells (Fig. 1A). Treatment with physiological concentrations of melatonin (1 nM) for 7 days before radiation led to a significantly ($p < 0.001$) higher decrease in cell proliferation in comparison with control irradiated cells. Pretreatment with pharmacological concentrations of melatonin (1 mM and 10 μ M) also induced a marked decrease in cell proliferation but was less effective than pretreatment with physiological concentrations (1 nM) (Fig. 1A).

Fig. 1B shows the effect of ionizing radiation and melatonin pretreatment on cytotoxicity. The survival fraction after 8 Gy irradiation dose was reduced 84% with respect to non-irradiated cells. Pretreatment with melatonin (1 mM, 10 μ M and 1 nM) significantly led to the biggest decline in survival rates, with melatonin concentrations (1 mM) being the most effective in decrease the survival fraction (50 % of reduction when compared to control irradiated cells).

Effects of ionizing radiation and melatonin on aromatase activity and expression and aromatase promoter regions pI.3, pII and pI.7 expression

With 8 Gy radiation alone, aromatase activity was significantly ($p < 0.001$) decreased by 40%. Treatment with physiological concentrations of melatonin (1 nM) for 7 days before radiation led to a significantly higher decrease in aromatase activity (Fig. 2A) (70% of reduction when compared to control non-irradiated cells).

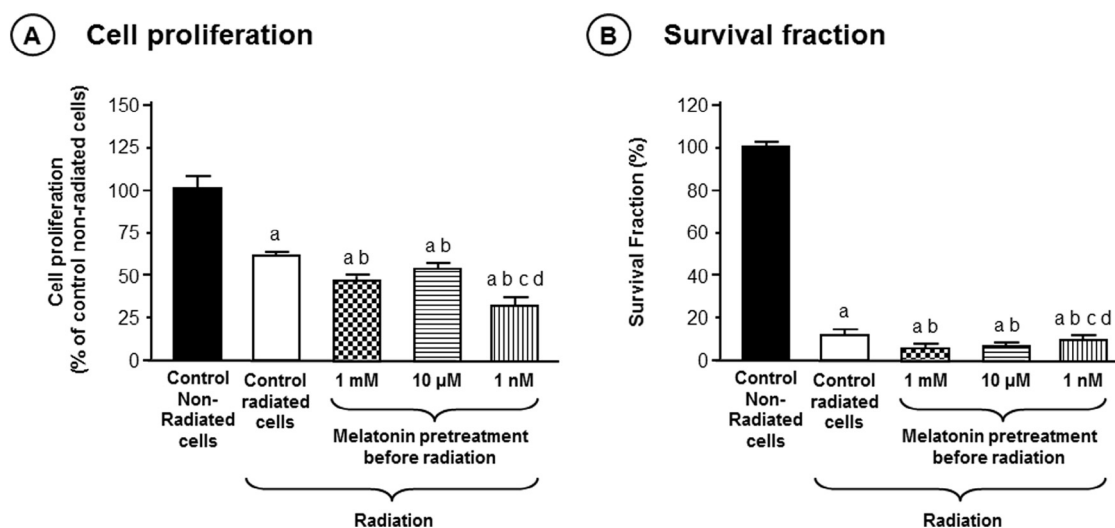


Fig. 1. Effects of melatonin pretreatment (1 mM, 10 μ M or 1 nM) and ionizing radiation on MCF-7 cell proliferation and survival fraction. (A) Control and melatonin pretreated MCF-7 cells for a week were seeded into 96-multiwell plates in DMEM supplemented with 10% FBS and incubated at 37 °C for 24 h. Then, cells were irradiated, cultured for 6 days and cell proliferation was measured by the MTT method. (B) Control and melatonin pretreated MCF-7 cells for a week were cultured in a bilayer soft-agar system in DMEM supplemented with 10% FBS and agar. After 24 h of incubation at 37 °C, cells were irradiated, cultured for 10 days and colonies >150 μ m were stained and counted. Survival fraction was calculated as described in Materials and Methods. Data are expressed as the percentage of the control non-irradiated group (mean $\pm$ SEM). a, $p < 0.001$ vs control non-irradiated cells; b, $p < 0.001$ vs control irradiated cells; c, $p < 0.001$ vs 1 mM melatonin; d, $p < 0.001$ vs 10 μ M melatonin.

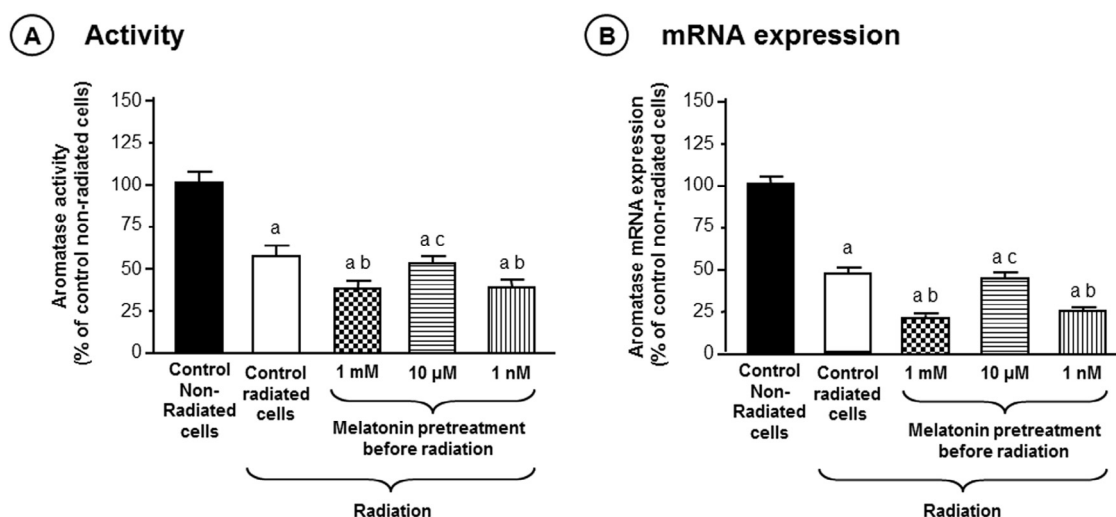


Fig. 2. (A) Effects of melatonin pretreatment (1 mM, 10 µM or 1 nM) and ionizing radiation on aromatase activity of MCF-7 cells. Control and melatonin pretreated MCF-7 cells for a week were seeded into six-well plates in DMEM supplemented with 10% FBS. After 24 h cells were irradiated and 24 h later media were aspirated and changed to serum-free media supplemented with 0.5% csFBS and tritiated androstenedione. Aromatase activity was determined after 24 h of incubation, as described in Materials and Methods. (B) Effects of melatonin pretreatment (1 mM, 10 µM or 1 nM) and ionizing radiation on the expression of mRNA aromatase in MCF-7 cells. Aromatase mRNA expression was carried out by RT-PCR after incubation of control and melatonin (1 mM, 10 µM or 1 nM) pretreated cells for 6 h after irradiation. Data are expressed as the percentage of the control non-radiated group (mean ± SEM). a, $p < 0.001$ vs control non-radiated cells; b, $p < 0.001$ vs control radiated cells; c, $p < 0.001$ vs 1 mM melatonin.

Pharmacological concentrations of melatonin (1 mM) were also effective to reduce ($p < 0.001$) the aromatase activity of breast cancer cells (Fig. 2A). With the aim of determining whether the inhibitory effect of melatonin on aromatase activity is due to the downregulation of aromatase expression, we irradiated control and melatonin pretreated MCF-7 cells, and after 6 h total RNA was isolated to perform real-time quantitative PCR with specific primers for human aromatase. Radiation (8 Gy) alone significantly decreased ($p < 0.001$) in a half aromatase RNA expression in MCF-7 cells (Fig. 2B). Physiological concentrations of melatonin pretreatment before radiation resulted in a significantly higher decrease in aromatase mRNA expression (50% of control radiated cells). Very

high pharmacological concentrations of melatonin (1 mM) were also effective to reduce ($p < 0.001$) the aromatase mRNA expression of breast cancer cells (Fig. 2B).

To determine the promoters involved in the melatonin control of aromatase expression, we used competitive RT-PCR to amplify each of the promoter-specific transcripts from RNA extracted from MCF-7 cells. As shown in Fig. 3, melatonin 1 nM exerted a significant ($p < 0.001$) inhibition in aromatase expression that is specific to the aromatase promoters I.3, pII and pI.7. Higher concentrations of melatonin were also effective to reduce ($p < 0.001$) the aromatase expression specific to the aromatase promoters I.3, pII and pI.7 (Fig. 3).

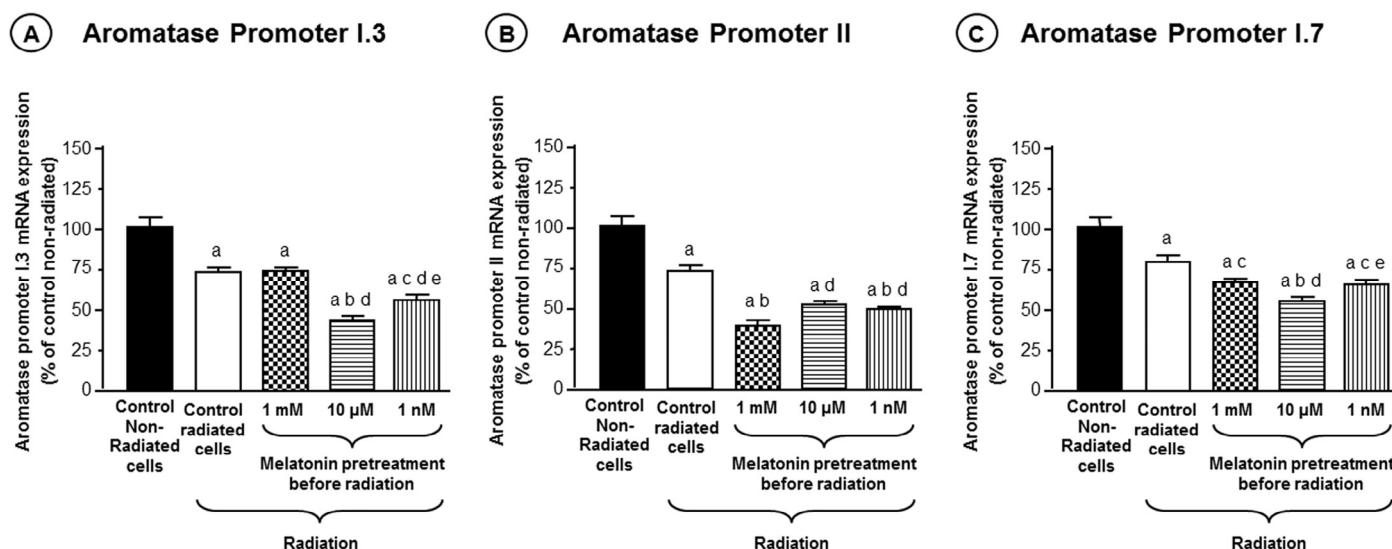


Fig. 3. Effects of melatonin pretreatment (1 mM, 10 µM or 1 nM) and ionizing radiation on aromatase promoter regions pI.3 (A), pII (B) and pI.7 (C) expression in MCF-7 cells. Control and melatonin pretreated cells were cultured for 6 h after irradiation. Total mRNA was extracted from MCF-7 cells and reverse transcribed. cDNA was subjected to PCR using specific primers for aromatase promoter I.3, II and I.7 or S14. Data are expressed as the percentage of the control non-radiated group (mean ± SEM). a, $p < 0.001$ vs control non-radiated cells; b, $p < 0.001$ vs control radiated cells; c, $p < 0.01$ vs control radiated cells; d, $p < 0.001$ vs 1 mM melatonin; e, $p < 0.001$ vs 10 µM melatonin.

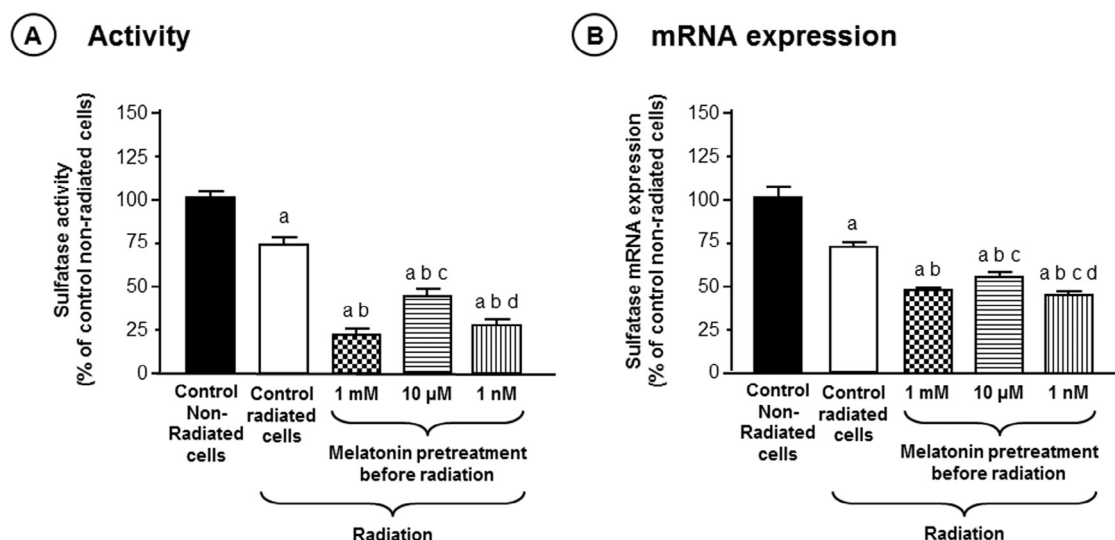


Fig. 4. (A) Effects of melatonin pretreatment (1 mM, 10 μM or 1 nM) and ionizing radiation on sulfatase activity of MCF-7 cells. Control and melatonin pretreated MCF-7 cells for a week were seeded into six-well plates in DMEM supplemented with 10% FBS. After 24 h cells were irradiated and 24 h later media were aspirated and changed to serum-free media containing tritiated estrone sulfate ammonium salt. Sulfatase activity was determined after 24 h of incubation, as described in Materials and Methods (B) Effects of melatonin pretreatment (1 mM, 10 μM or 1 nM) and ionizing radiation on sulfatase mRNA expression in MCF-7 cells. Control and melatonin pretreated cells were cultured for 6 h after irradiation and total mRNA was isolated from cells and reverse transcribed. cDNA was subjected to PCR using specific primers for sulfatase or S14. Data are expressed as the percentage of the control non-radiated group (mean ± SEM). a, $p < 0.001$ vs control non-radiated cells; b, $p < 0.001$ vs control radiated cells; c, $p < 0.01$ vs 1 mM melatonin; d, $p < 0.001$ vs 10 μM melatonin.

Effects of ionizing radiation and melatonin on STS activity and expression

In a second set of experiments, the effects of melatonin treatment before radiation on the STS activity and mRNA expression were studied. With radiation alone, a significant ($p < 0.001$) decrease in STS activity (30% less activity), the enzyme responsible for the conversion of estrogens to the less potent sulfate conjugated forms, was observed (Fig. 4A). When MCF-7 cells were pretreated with physiological concentrations of melatonin (1 nM) the inhibition of STS activity was 50% with respect to control radiated cells. Pretreatment with higher concentrations of melatonin was also effective to reduce ($p < 0.001$) the STS activity (Fig. 4A).

Radiation alone significantly decreased the expression of STS by 25%. Treatment with melatonin for 7 days before radiation led to a significantly greater decrease in STS mRNA expression compared with radiation alone and doubled the inhibition (Fig. 4B).

Effects of ionizing radiation and melatonin on 17β-HSD1 activity and expression

Next, the effects of melatonin treatment before radiation on the 17β-HSD1 activity and mRNA expression were studied. With radiation alone a significant ($p < 0.001$) decrease in 17β-HSD1 activity, the enzyme responsible for the conversion of the relatively inactive estrone to the most potent 17β-estradiol, was observed (Fig. 5A). When MCF-7 cells were pretreated with physiological concentrations of melatonin (1 nM) the inhibition of 17β-HSD1 activity was twice as much as that of control radiated cells. Pretreatment with higher concentrations of melatonin (1 mM) was even more effective to reduce ($p < 0.001$) the 17β-HSD1 activity (Fig. 5A).

Radiation alone significantly also decreased by 20% the expression of 17β-HSD1. Treatment with melatonin for 7 days before radiation led to a significantly greater decrease in 17β-HSD1 mRNA expression compared with radiation alone (Fig. 5B), with physiological melatonin concentrations (1 nM) being the most effective in decreasing the 17β-HSD1 mRNA expression (a half of expression than radiated cells).

Effects of ionizing radiation and melatonin on p53 mRNA expression

With 8 Gy radiation alone, the expression of mRNA p53 increased two-times ($p < 0.001$). Pretreatment with physiological concentrations of melatonin (1 nM) for 7 days before radiation led to a significantly higher increase in p53 mRNA expression, three-times as big as control non-radiated cells (Fig. 6). Higher concentrations of melatonin (10 μM) were also effective to increase ($p < 0.001$) p53 mRNA expression of breast cancer cells (Fig. 6).

Discussion

Endocrine therapy and radiotherapy are two cancer treatment modalities which are often given together in patients with locally-advanced breast cancer and positive hormone-receptor status. Enhancing the radiosensitivity of cancer cells while preserving the health of normal cells is one of the most important tasks in clinical radiobiology. Preclinical models have described changes in tumor cell kinetics and reduced tumor cell death with concurrent antiestrogen treatment and radiotherapy [12]. Preliminary results from simultaneous treatment with aromatase inhibitors and radiation also indicate that this combination of endocrine and radiation therapy could enhance cytotoxicity and improve tumor response [12,13]. Melatonin, the principal hormone synthesized and produced in the pineal gland, has been extensively reported as an important inhibitor of neoplastic proliferation, especially on tumors of the mammary gland, most of which are estrogen-responsive [1–4,26–28]. At cancerous cellular level, melatonin, on one hand, interferes with the estrogen-dependent pathways and partially abolishes the effects of estrogens, thus behaving as a selective estrogen receptor modulator. On the other hand, melatonin is also able to modulate both the catalytic activity and gene expression of some enzymes participating in the local synthesis of estrogens in human breast cancer and also in proximal vascular endothelial and adipose cells, thus behaving as a selective estrogen enzyme modulator [1,7,27–33]. Our group has described that melatonin, *in vitro*, could act as a radiosensitizer. Treatment for one week before radiation with melatonin enhances the sensitivity of breast cancer cells to the

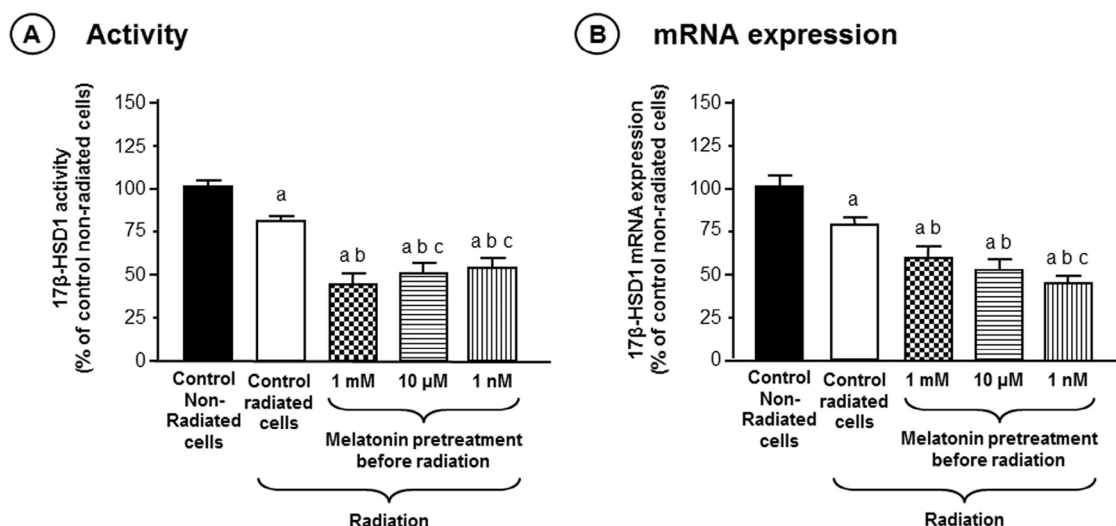


Fig. 5. (A) Effects of melatonin pretreatment (1 mM, 10 μM or 1 nM) and ionizing radiation on 17β-HSD1 activity in MCF-7 cells. Control and melatonin pretreated for a week MCF-7 cells were seeded into six-well plates in DMEM supplemented with 10% FBS. After 24 h cells were irradiated and 24 h later media were aspirated and changed to serum-free media containing tritiated estrone. 17β-HSD1 activity was determined after 30 min of incubation, as described in Materials and Methods. (B) Effects of melatonin pretreatment (1 mM, 10 μM or 1 nM) and ionizing radiation on 17β-HSD1 mRNA expression in MCF-7 cells. Control and melatonin pretreated cells were cultured for 6 h after irradiation and total mRNA was isolated from cells and reverse transcribed. cDNA was subjected to PCR using specific primers for 17β-HSD1 or S14. Data are expressed as the percentage of the control non-radiated group (mean ± SEM). a, $p < 0.001$ vs control non-radiated cells; b, $p < 0.001$ vs control radiated cells; c, $p < 0.001$ vs 1 mM melatonin.

ionizing effects of radiation by decreasing cell proliferation, inducing cell cycle arrest and downregulating proteins involved in double-strand DNA break repair [18]. In the present study, we wanted to evaluate *in vitro* the effects of the combination of ionizing radiation and melatonin on proteins involved in estrogen biosynthesis in malignant epithelial cells. Our results demonstrate that a combined treatment with melatonin and ionizing radiation could result in cooperative enhancement of cytotoxic and radiosensitizing effects in human breast cancer cells and that this enhancement of the

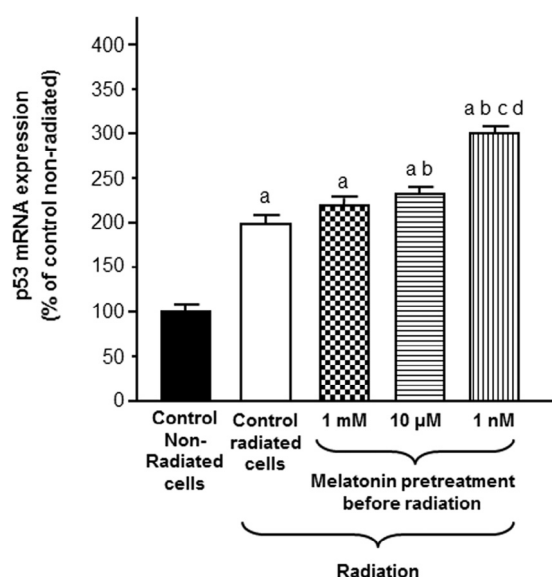


Fig. 6. Effects of melatonin pretreatment (1 mM, 10 μM or 1 nM) and ionizing radiation on p53 mRNA expression in MCF-7 cells. Control and melatonin pretreated cells were cultured for 6 h after irradiation. Total mRNA was extracted from MCF-7 cells and reverse transcribed. cDNA was subjected to PCR using specific primers for p53 or S14. Data are expressed as the percentage of the control non-radiated group (mean ± SEM). a, $p < 0.001$ vs control non-radiated cells; b, $p < 0.001$ vs control radiated cells; c, $p < 0.001$ vs 1 mM melatonin; d, $p < 0.001$ vs 10 μM melatonin.

radiosensitivity is associated with the modulation of enzymes involved in estrogen synthesis. Pretreatment of human breast cancer cells with melatonin one week before radiation led to a significantly higher decrease of MCF-7 cell proliferation (MTT assay) and survival fraction (clonogenic assay) compared with radiation alone. Those findings confirm the previous results of our group [19], suggesting that the addition of melatonin promotes inhibition of cell proliferation and enhances the effects of radiation. Similar to our findings, the sensitivity and dose–response characteristics of breast cancer cells to the inhibitory effect of melatonin are altered by the growth of cells in an anchorage-dependent culture as compared to anchorage-independent growth [1,2,21]. In proliferation assays (monolayer cultures) melatonin concentrations close to 1 nM, similar to those found in the serum of most mammals during the night, are the most effective [1,2]. However, in the clonogenic assay, in which cancer cells grow suspended in a semisolid medium without attaching to the plate, pharmacological concentrations produce a maximal inhibition [21]. Cell attachment modify the sensitivity of MCF-7 cells toward melatonin. In addition, ionizing radiation decreased both aromatase (the enzyme that transform androgens into estrogens) activity and expression in malignant cells. Melatonin pretreatment before radiation induced a higher decrease in aromatase activity and expression. In disease-free breast tissue, aromatase is primarily expressed in adipose stromal fibroblasts via the relatively weak promoter I.4 [34,35]. However, in breast cancer tissue, aromatase promoters I.3 and II are activated, leading to a marked increase in aromatase expression in malignant epithelial cells and adipose fibroblasts. Both promoters are considered the major drivers of aromatase expression in breast cancer and surrounding adipose tissue, accounting for 80–90% of total aromatase expression [34,35]. The present study demonstrates that melatonin-dependent regulation of aromatase gene expression occurs mainly through a downregulation of gene expression of the both major specific aromatase promoter regions pII and pI.3 in breast cancer cells. Ionizing radiation inhibited aromatase promoter I.3 and II mediated expression, and melatonin pretreatment enhanced the downregulatory action on aromatase promoters I.3 and II induced by radiation. Aromatase pII was the most abundantly expressed

compared to pL3, and melatonin inhibitory action was more potent on this aromatase promoter region pL1. Also, melatonin further enhanced the decrease triggered by radiation of the aromatase promoter region pL7 expression, a novel breast cancer-associated aromatase promoter mainly active in vascular endothelial cells but also present in malignant epithelial cells [36]. Besides this melatonin down-regulatory effect on aromatase activity and expression and on the two main promoters driving aromatase expression in breast cancer, in our study, melatonin also modulates the activity and expression of the STS and 17 β -HSD1. The estrone sulfatase pathway is the major route of estrogen formation in breast tumors and the estrogen sulfatase activity is 40–500 times higher than aromatase activity in breast cancer tissues [37,38]. Radiation alone decreased STS and 17 β -HSD1 activity and expression, and melatonin pretreatment for one week before radiation enhanced the decrease in STS and 17 β -HSD1 activity and expression induced by ionizing radiation. Thus, melatonin pretreatment, by down-regulating aromatase, STS and 17 β -HSD1, might reduce active estrogen levels at tumoral cell level.

The tumor suppressor p53 is a central factor for the maintenance of genome stability and, consequently, for the suppression of cancer [39]. p53 is upregulated and activated by genotoxic stress, like ionizing radiation, and induces a transcriptional program with effectors promoting apoptosis, cell cycle arrest, senescence and DNA repair [40,41]. There is growing evidence for a direct role of p53 in the fidelity control of DNA repair to ensure error-free DNA double-strand break repair and, therefore, to suppress detrimental genome rearrangements that drive cancer [39,42]. p53 modulates DNA repair and may assist in the down-regulation of inappropriate recombination, in particular through direct interaction and inhibition of repair proteins such as RAD51 [43]. In addition it has been recently demonstrated that p53 is a negative regulator of aromatase in the breast [44]. Radiation alone increased p53 expression. Pretreatment of breast cancer cells with physiological concentrations of melatonin before radiation led to a greater increase of p53 expression. The up-regulation of the expression of p53 and p21WAF1 proteins induced by melatonin has been suggested as an important mechanism through which this indolamine produces antiproliferative effects in human breast cancer cells [45]. Since melatonin pretreatment before radiation sensitizes breast cancer cells to the ionizing effects of radiation by decreasing cell proliferation, inducing cell cycle arrest, downregulating proteins involved in double-strand DNA break repair and estrogen biosynthesis, and that p53 promotes cell cycle arrest, DNA repair and aromatase down-regulation, the regulatory action of melatonin on p53 could be a link between melatonin and its modulatory action on the sensitivity of breast cancer cells to the ionizing radiation.

In summary, the findings present herein suggest that melatonin enhancement of the radiosensitivity of human breast cancer cells is associated with the modulation of proteins involved in estrogen biosynthesis.

Acknowledgements

This work was supported by grants from the Spanish Science Technology and Innovation Ministry (SAF2013-42012-P) and from Instituto de Investigación Valdecilla (IDIVAL) (APG/12).

Conflict of interest

None declared.

References

- [1] S. Cos, E.J. Sánchez-Barceló, Melatonin and mammary pathological growth, *Front. Neuroendocrinol.* 21 (2000) 133–170.
- [2] S.M. Hill, D.E. Blask, Effects of the pineal hormone melatonin on the proliferation and morphological characteristics of human breast cancer cells (MCF-7) in culture, *Cancer Res.* 48 (1988) 6121–6126.
- [3] S.M. Hill, V.P. Belancio, R.T. Dauchy, S. Xiang, S. Brimer, L. Mao, et al., Melatonin: an inhibitor of breast cancer, *Endocr. Relat. Cancer* 22 (2015) R183–R204.
- [4] E.J. Sánchez-Barceló, S. Cos, R. Fernández, M.D. Mediavilla, Melatonin and mammary cancer: a short review, *Endocr. Relat. Cancer* 10 (2003) 153–159.
- [5] S. Cos, A. González, C. Martínez-Campa, M.D. Mediavilla, C. Alonso-González, E.J. Sánchez-Barceló, Estrogen-signaling pathway: a link between breast cancer and melatonin oncostatic actions, *Cancer Detect. Prev.* 30 (2006) 118–128.
- [6] A. González, C. Martínez-Campa, M.D. Mediavilla, C. Alonso-González, S. Sánchez-Mateos, S.M. Hill, et al., Effects of MT₁ melatonin receptor overexpression on the aromatase-suppressive effect of melatonin in MCF-7 human breast cancer cells, *Oncol. Rep.* 17 (2007) 947–953.
- [7] S. Cos, A. González, C. Martínez-Campa, M.D. Mediavilla, C. Alonso-González, E.J. Sánchez-Barceló, Melatonin as a selective estrogen enzyme modulator, *Curr. Cancer Drug Tar.* 8 (2008) 691–702.
- [8] A. González, S. Cos, C. Martínez-Campa, C. Alonso-González, S. Sánchez-Mateos, M.D. Mediavilla, et al., Selective estrogen enzyme modulator (SEEM) actions of melatonin in human breast cancer cells, *J. Pineal Res.* 45 (2008) 86–92.
- [9] S. Cos, C. Martínez-Campa, M.D. Mediavilla, E.J. Sánchez-Barceló, Melatonin modulates aromatase activity in MCF-7 human breast cancer cells, *J. Pineal Res.* 38 (2005) 136–142.
- [10] S. Cos, A. González, A. Güezmes, M.D. Mediavilla, C. Martínez-Campa, C. Alonso-González, et al., Melatonin inhibits the growth of DMBA-induced mammary tumors by decreasing the local biosynthesis of estrogens through the modulation of aromatase activity, *Int. J. Cancer* 118 (2006) 274–278.
- [11] Z.J. Zeng, J.H. Li, Y.J. Zhang, S.T. Zhao, Optimal combination of radiotherapy and endocrine drugs in breast cancer treatment, *Cancer Radiother.* 17 (2013) 208–214.
- [12] C. Chargari, R.A. Toillon, D. MacDermid, P. Castadot, N. Magné, Concurrent hormone and radiation therapy in patients with breast cancer: what is the rationale?, *Lancet Oncol.* 10 (2009) 53–60.
- [13] D. Azria, C. Lemanski, A. Zouhair, M. Gutowski, Y. Belkacémi, J.B. Dubois, et al., Adjuvant treatment of breast cancer by concomitant hormonotherapy and radiotherapy: state of the art, *Cancer Radiother.* 8 (2004) 188–196.
- [14] S.A. Nazarali, S.A. Narod, Tamoxifen for women at high risk of breast cancer, *Breast Cancer (Dove Med. Press)* 6 (2014) 29–36.
- [15] P.E. Lonning, H.P. Eikesdal, Aromatase inhibition 2013: clinical state of the art and questions that remain to be solved, *Endocr. Relat. Cancer* 20 (2013) 183–201.
- [16] D. Azria, C. Larbouret, S. Cunat, M. Ozsahin, S. Gourgu, P. Martineau, et al., Letrozole sensitizes breast cancer cells to ionizing radiation, *Breast Cancer Res.* 7 (2005) R156–R163.
- [17] M. Ishitobi, M. Shiba, T. Nakayama, K. Motomura, H. Koyama, K. Nishiyama, et al., Treatment sequence of aromatase inhibitors and radiotherapy and long-term outcomes of breast cancer patients, *Anticancer Res.* 34 (2014) 4311–4314.
- [18] C. Alonso-González, A. González, C. Martínez-Campa, J. Gómez-Arozamena, S. Cos, Melatonin sensitizes human breast cancer cells to ionizing radiation by downregulating proteins involved in double-strand DNA break repair, *J. Pineal Res.* 58 (2015) 189–197.
- [19] T. Mosmann, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *J. Immunol. Methods* 65 (1983) 55–63.
- [20] A.W. Hamburger, S.E. Salmon, Primary bioassay of human tumor stem cells, *Science* 197 (1977) 461–463.
- [21] S. Cos, D.E. Blask, Effects of the pineal hormone melatonin on the anchorage-independent growth of human breast cancer cells (MCF-7) in a clonogenic culture system, *Cancer Lett.* 50 (1990) 115–119.
- [22] G.E. Ackerman, M.E. Smith, C.R. Mendelson, P.C. MacDonald, E.R. Simpson, Aromatization of androstenedione by human adipose tissue stromal cells in monolayer culture, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 53 (1981) 412–417.
- [23] L. Duncan, A. Purohit, N.M. Howarth, B.V. Potter, M.J. Reed, Inhibition of estrone sulfatase activity by estrone-3-methylthiophosphonate: a potential therapeutic agent in breast cancer, *Cancer Res.* 53 (1993) 298–303.
- [24] A. Singh, M.J. Reed, Insulin-like growth factor type I and insulin-like growth factor type II stimulate oestradiol-17 beta hydroxysteroid dehydrogenase (reductive) activity in breast cancer cells, *J. Endocrinol.* 129 (1991) 5–8.
- [25] K.J. Livak, T.D. Schmittgen, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(- $\Delta\Delta C_T$) method, *Methods* 25 (2001) 402–408.
- [26] V. Álvarez-García, A. González, C. Alonso-González, C. Martínez-Campa, S. Cos, Regulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) by melatonin in human breast cancer cells, *J. Pineal Res.* 54 (2013) 373–380.
- [27] A. González, V. Álvarez-García, C. Martínez-Campa, M.D. Mediavilla, C. Alonso-González, E.J. Sánchez-Barceló, et al., *In vivo* inhibition of the estrogen sulfatase enzyme and growth of DMBA-induced mammary tumors by melatonin, *Curr. Cancer Drug Tar.* 10 (2010) 279–286.
- [28] C. Martínez-Campa, A. González, M.D. Mediavilla, C. Alonso-González, V. Álvarez-García, E.J. Sánchez-Barceló, et al., Melatonin inhibits aromatase promoter expression by regulating cyclooxygenases expression and activity in breast cancer cells, *Br. J. Cancer* 101 (2009) 1613–1619.
- [29] S. Cos, C. Martínez-Campa, A. González, V. Álvarez-García, C. Alonso-González, M.D. Mediavilla, et al., Melatonin and aromatase in breast cancer, *Clin. Cancer Drugs* 1 (2014) 54–64.

- [30] V. Álvarez-García, A. González, C. Alonso-González, C. Martínez-Campa, S. Cos, Melatonin interferes in the desmoplastic reaction in breast cancer by cytokine production, *J. Pineal Res.* 52 (2012) 282–290.
- [31] V. Álvarez-García, A. González, C. Martínez-Campa, C. Alonso-González, S. Cos, Melatonin modulates aromatase activity and expression in endothelial cells, *Oncol. Rep.* 29 (2013) 2058–2064.
- [32] B. del Rio, J.M. García-Pedrero, C. Martínez-Campa, P. Zuazua, P.S. Lazo, S. Ramos, Melatonin: an endogenous specific inhibitor of estrogen receptor α via calmodulin, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 38294–38302.
- [33] J.M. García-Pedrero, B. del Rio, C. Martínez-Campa, M. Muramatsu, P.S. Lazo, S. Ramos, Calmodulin is a selective modulator of estrogen receptors, *Mol. Endocrinol.* 16 (2002) 947–960.
- [34] S.E. Bulun, Z. Lin, G. Imir, S. Amin, M. Demura, B. Yilmaz, et al., Regulation of aromatase expression in estrogen-responsive breast and uterine disease: from bench to treatment, *Pharmacol. Rev.* 57 (2005) 359–383.
- [35] D. Chen, S. Reierstad, M. Lu, Z. Lin, H. Ishikawa, S.E. Bulun, Regulation of breast cancer-associated aromatase promoters, *Cancer Lett.* 273 (2009) 15–27.
- [36] S. Sebastian, K. Takayama, M. Shozu, S.E. Bulun, Cloning and characterization of a novel endothelial promoter of the human CYP19 (aromatase P450) gene that is upregulated in breast cancer tissue, *Mol. Endocrinol.* 10 (2002) 2243–2254.
- [37] J.R. Pasqualini, The selective estrogen enzyme modulators in breast cancer: a review, *Biochim. Biophys. Acta* 1654 (2004) 123–143.
- [38] J. Shields-Botella, P. Bonnet, I. Duc, E. Duranti, S. Meschi, D. Cardinali, et al., *In vitro* and *in vivo* models for the evaluation of new inhibitors of human steroid sulfatase, devoid of residual estrogenic activity, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 84 (2003) 327–335.
- [39] M.B. Kastan, O. Onyekwere, D. Sidransky, B. Vogelstein, R.W. Craig, Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage, *Cancer Res.* 51 (1991) 6304–6311.
- [40] D. Speidel, The role of DNA damage responses in p53 biology, *Arch. Toxicol.* 89 (2015) 501–517.
- [41] C. Berger, Y. Qian, X. Chen, The p53–estrogen receptor loop in cancer, *Curr. Mol. Med.* 13 (2013) 1229–1240.
- [42] S.A. Gatz, L. Wiesmüller, p53 in recombination and repair, *Cell Death Differ.* 13 (2006) 1003–1016.
- [43] S.P. Linke, S. Sengupta, N. Khabie, B.A. Jeffries, S. Buchhop, S. Miska, et al., p53 interacts with hRAD51 and hRAD54, and directly modulates homologous recombination, *Cancer Res.* 63 (2003) 2596–2605.
- [44] X. Wang, M.M. Docanto, H. Sasano, Kathleen Cuninghame Foundation Consortium for Research into Familial Breast Cancer, C. Lo, E.R. Simpson, et al., Prostaglandin E2 inhibits p53 in human breast adipose stromal cells: a novel mechanism for the regulation of aromatase in obesity and breast cancer, *Cancer Res.* 75 (2015) 645–655.
- [45] M.D. Mediavilla, S. Cos, E.J. Sánchez-Barceló, Melatonin increases p53 and p21WAF1 expression in MCF-7 human breast cancer cells *in vitro*, *Life Sci.* 65 (1999) 415–420.

What is known about melatonin, chemotherapy and altered gene expression in breast cancer (Review)

CARLOS MARTÍNEZ-CAMPA¹, JAVIER MENÉNDEZ-MENÉNDEZ¹,
CAROLINA ALONSO-GONZÁLEZ¹, ALICIA GONZÁLEZ¹,
VIRGINIA ÁLVAREZ-GARCÍA² and SAMUEL COS¹

¹Department of Physiology and Pharmacology, School of Medicine, University of Cantabria and Research Institute Valdecilla, 39011 Santander, Spain; ²Institute of Biological Chemistry, Biophysics and Bioengineering, School of Engineering and Physical Sciences, Heriot Watt University, EH14 4AS Edinburgh, UK

Received May 4, 2016; Accepted November 17, 2016

DOI: 10.3892/ol.2017.5712

Abstract. Melatonin, synthesized in and released from the pineal gland, has been demonstrated by multiple *in vivo* and *in vitro* studies to have an oncostatic role in hormone-dependent tumors. Furthermore, several clinical trials point to melatonin as a promising adjuvant molecule to be considered for cancer treatment. In the past few years, evidence of a broader spectrum of action of melatonin as an antitumor agent has arisen; thus, melatonin appears to also have therapeutic effects in several types of hormone-independent cancer, including ovarian, leukemic, pancreatic, gastric and non-small cell lung carcinoma. In the present study, the latest findings regarding melatonin molecular actions when concomitantly administered with either radiotherapy or chemotherapy in cancer were reviewed, with a particular focus on hormone-dependent breast cancer. Finally, the present study discusses which direction should be followed in the next years to definitely clarify whether or not melatonin administration could protect against non-desirable effects (such as altered gene expression and post-translational protein modifications) caused by chemotherapy or radiotherapy treatments. As treatments move towards personalized medicine, comparative gene expression profiling with and without melatonin may be a powerful tool to better understand the antitumor effects of melatonin, the pineal gland hormone.

Contents

1. Introduction: Chemotherapy for breast cancer
2. Melatonin and mammary cancer: *In vitro* and animal studies

3. Melatonin and cancer: Clinical trials
4. Can melatonin enhance the beneficial and protect against the deleterious effects of chemotherapy?
5. Conclusions
6. Melatonin and cancer: What next?

1. Introduction: Chemotherapy for breast cancer

According to the World Cancer Research Fund International, breast cancer is the most frequent type of tumor suffered by women in the world, with ~1.7 million newly diagnosed cases in 2012 (1). Approximately 1 in 8 women will develop a mammary tumor during her lifetime. The American Cancer Society's report for the USA in 2015 informs of 231,840 new cases of invasive breast cancer, 60,290 women with carcinoma *in situ* and ~40,290 mortalities (2). In addition, breast cancer is the second cause of mortality by cancer in women, only exceeded by lung tumors (3). The mortality rates for breast cancer have been declining since 1989, particularly in premenopausal women, probably as a result of earlier detection as well as improved treatments (4). One fact that may also explain this decrease is the less frequent administration of hormone replacement therapy (HRT) following the publication of a report (the Women's Health Initiative) published in 2002, which suggests that HRT may be a risk factor that could explain the increase in the incidence of breast cancer (5).

Chemotherapy consists of treatment with cancer-killing drugs administered either intravenously or orally. Chemotherapy compounds are usually applied by intravenous infusion and, through the bloodstream, they reach growing cancer cells in almost all body tissues. Chemotherapy compounds work by targeting cells with a high rate of self-renewal, which is a hallmark of cancer cells (6). Chemotherapy is recommended following surgery (adjuvant chemotherapy): Surgery is performed to dissect the tumor, and adjuvant therapy is administered to try to eliminate any cancer cells that had not been removed by the surgery and may spread out later (7). The most frequently used adjuvant treatments to be administered subsequent to surgery are radiation, chemotherapy, targeted therapy and hormone therapy (8).

Correspondence to: Dr Carlos Martínez-Campa, Department of Physiology and Pharmacology, School of Medicine, University of Cantabria and Research Institute Valdecilla, Av. Cardenal Herrera Oria s/n, 39011 Santander, Spain
E-mail: martinezc@unican.es

Key words: cancer, breast cancer, chemotherapy, gene expression, melatonin

Neoadjuvant therapy refers to treatments that are administered prior to surgery instead of subsequent to surgery. The benefits of neoadjuvant chemotherapy are that drugs may cause a decrease in the size of the tumor, thus facilitating tumor removal with a less extensive surgery (9). In addition, administering chemotherapy prior to the tumor being removed may aid the subsequent monitoring of the disease, since in case the first cocktail of drugs does not diminish the tumor size, other compounds may be considered (10). Finally, chemotherapy is also employed as a treatment strategy for patients whose tumor has spread outside the mammary gland and underarm area. Combinations of drugs are commonly used to treat mammary tumors detected in the early stages of carcinogenesis, while advanced cancer is more commonly treated with a unique chemotherapeutic molecule (11). Chemotherapy is usually administered in cycles, with periods of administration followed by resting periods to allow patient recovery and to minimize the side effects of treatment (12).

Since microtubules participate in the migration of chromosomes to opposite ends of mitotic cells during the anaphase, microtubule inhibitors (MIs), also known as microtubule-stabilizing agents, are molecules suitable to use in the treatment of mammary tumors. MI agents include microtubule depolymerizing compounds (*Vinca* alkaloids) and polymerizing agents (taxanes) (13). *Vinca* alkaloids derive from the periwinkle plant *Catharanthus roseus* (14). The first clinical trial demonstrating their efficacy in cancer was reported in 1963 (15). Nowadays, these compounds are produced synthetically and include vinblastine, vincristine, vindesine and vinorelbine (14). The main mechanism that explains their cytotoxicity is their capability to interfere with tubulin, with subsequent microtubule function disruption (particularly concerning microtubules implicated in the formation of the mitotic spindle apparatus), leading to mitosis disruption and finally resulting in metaphase arrest (16). These agents interfere with the assembly of tubulin by introducing a wedge between the contact surfaces of two tubulin molecules (17).

Taxanes are diterpenes obtained from *Taxus brevifolia* (18). The first reported taxane, named taxol, was initially isolated in 1971 (19). Taxanes present difficulties in formulation because they are poorly soluble in water, and for this reason, the first clinical trial including taxanes was not reported until 1987 (20). The other taxane currently in use is docetaxel, which is obtained from *Taxus baccata* (21). Both paclitaxel and docetaxel act as spindle poisons, stabilising the tubulin polymers against depolymerisation. In addition, they also promote microtubulin assembly. These two actions together block microtubule dynamics and consequently lead to cell cycle arrest (22). Taxanes induce changes in tubulin spatial conformation, which interferes with the depolymerisation of microtubules in a precise directional way, by binding a specific domain of tubulin located in the internal surface of the microtubule (23,24).

Anthracyclines such as epirubicin and doxorubicin are also commonly used in chemotherapy combined with other chemotherapeutic drugs to treat breast cancer in patients who have had surgery to remove the tumor (25). Their mechanism of action is based on their ability of insertion between two DNA strands, resulting in a DNA-anthracycline complex that inhibits both DNA and RNA synthesis (26). This mechanism also targets DNA for cleavage by topoisomerase II, which leads

to a cellular cascade that eventually results in cell death (27). Epirubicin is frequently selected over doxorubicin in numerous chemotherapy protocols, since it appears to have fewer side effects (28). Eribulin is a new anthracycline approved by the Food and Drug Administration of USA in 2010 to treat women with metastatic tumors who had been previously treated with at least two chemotherapeutic compounds indicated for the treatment of metastatic breast cancer (29). This drug exerts its anticancer effects by triggering a mitotic blockade, leading cancer cells to enter apoptosis (30).

Other current approaches in the treatment of breast cancer include compounds developed against specific identified targets (molecular-targeted therapies) that contribute to tumor growth (31). As an example, trastuzumab is a monoclonal antibody used to treat patients with metastatic breast cancer. Trastuzumab is indicated against tumors overexpressing the oncogene human epidermal growth factor receptor 2 (HER2)/neu, since it targets the membrane HER2/neu receptor, which normally promotes normal cell growth and is also overexpressed in certain cancerous breast tissues (32). Despite several randomized clinical trials with promising results (33), other reports indicated that both *de novo* and acquired resistance to trastuzumab could be developed (34). Therefore, other recently described agents have been included in the list of chemicals available to treat HER2-overexpressing mammary tumors. One of them is lapatinib, a reversible inhibitor of both epidermal growth factor receptor (EGFR) and HER2/neu tyrosine protein-kinases (35), which was approved in 2007 for women undergoing metastatic breast cancer with acquired resistance to trastuzumab (36). Lapatinib was well tolerated and displayed encouraging clinical results when used as a first-line therapy agent in ErbB2-amplified tumors, either advanced local tumors or metastatic breast cancer (37). Another molecule to be considered is HKI-272, a (Her2)/neu receptor tyrosine kinase inhibitor with an irreversible mechanism of inactivation and a demonstrated clinical activity, which is well tolerated among both high-dose trastuzumab pre-treated and non pre-treated patients with advanced ErbB2-positive mammary tumors (38). HKI-272 targets a cysteine residue located in the adenosine triphosphate-binding pocket of the ERbB2 receptor, resulting in the inhibition of the downstream signal transduction cascade triggered, and consequently altering the cell cycle regulation (39).

Among the battery of promising new chemicals, drugs that target heat shock protein (Hsp) 90 must be mentioned. Hsp90 belongs to the family of chaperones and establishes associations with a set of different proteins that are known as 'Hsp90 client proteins' (40). Multiple Hsp90 client proteins are implicated in breast tumor progression and resistance to chemotherapy treatments, including the receptor protein-tyrosine kinases of the ErbB2 family, estrogen receptor (ER), Akt and mutated versions of p53 (41). The efficacy of Hsp90 inhibitors has been well documented in several preclinical cancer models. One of these inhibitors is 17-AAG, which has completed phase I testing (42,43).

Angiogenesis is a physiological process that consists in new vessel formation. When a tumorous mass of cells is growing, angiogenesis is crucial to maintain both tumor growth and progression (44). Therefore, numerous drugs have been tested during the past decades in the hope of identifying specific inhibitors of the different pathways necessary for angiogenesis (45). One of the key molecules in the formation

of new vessels is vascular endothelial growth factor (VEGF), probably the most studied angiogenic factor (46). VEGF is implicated in the progression of breast cancer and is also a potential prognosis biomarker (47). Bevacizumab (Avastin®) is a recombinant humanized monoclonal antibody that recognises all the known variants of VEGF-A (48). To date, bevacizumab is the unique anti-angiogenic chemical with clearly demonstrated benefits in metastatic breast cancer treatment clinical trials (49,50). Pazopanib is another inhibitor of VEGF receptor (VEGR) (51). Pazopanib also inhibits the signaling pathways downstream of the platelet-derived growth factor receptor and the mast/stem cell growth factor receptor c-KIT (52). Pazopanib treatment provides disease stability in patients with advanced breast cancer (53).

Estrogens are implicated in the development of the mammary gland, and are also known to be key stimulators of both the genesis and growth of mammary tumors (54). Therefore, one of the main strategies to fight breast cancer is neutralizing the stimulating actions of estrogens on the mammary gland (55). Several chemicals have been tested and commercialized, since they are selective inhibitors of the effects of estradiol on the breast. These include selective estrogen receptor modulators (SERMs), which are chemicals that directly bind to ER, thus inhibiting its actions by interfering with the binding of endogenous estrogens (56). Of these, tamoxifen (57,58) and a number of its derivatives (56) are the best known examples. Fulvestrant is an ER antagonist that has no agonist effect described and downregulates the protein levels of ER α (59). Fulvestrant is being currently administered to postmenopausal women with advanced breast cancer whose tumors are ER positive and have progressed upon receiving first-line endocrine therapy (60). Other compounds developed against estrogens are chemicals that prevent the production of steroids by downregulating the enzymes necessary for the conversion into estradiol from androgenic precursors. These drugs belong to the class known as selective estrogen enzyme modulators (SEEMs), which include both steroidal (such as formestane or exemestane) and non-steroidal (such as anastrozole and letrozole) compounds (61).

2. Melatonin and mammary cancer: *In vitro* and animal studies

Melatonin is an indolic hormone produced principally by the pineal gland. Melatonin is a ubiquitously distributed molecule with a variety of diverse functions (62). Melatonin employs a diverse set of mechanisms to regulate the physiology and molecular biology of cells (63). The majority of actions of melatonin are based on its ability to bind to melatonin membrane receptors, which are G-protein coupled receptors that trigger cellular signaling pathways (64). The pineal hormone also acts through orphan receptors or molecules such as calmodulin (65). Additionally, melatonin can detoxify free radicals and related oxygen derivatives via receptor-independent pathways (66).

Concerning tumorigenesis, numerous studies have been performed in animal models. Experimental approaches include increasing the activity of pinealocytes and administering exogenous melatonin, which cause a decrease in the number, incidence and development of chemically-induced mammary tumors (67). However, reduced levels of melatonin (for example, by removing the pineal gland) appear to stimulate breast

cancer progression (68). Several reports established a lower cancer risk among totally blind women (69-71). By contrary, a moderate but significant increase in the risk of developing breast cancer among women who have been working for long periods in rotating night shifts (which implicates that they were exposed to light during the night, and consequently, the nocturnal melatonin production was inhibited) has also been documented (72).

The antiproliferative effects of melatonin on the breast cancer cell line MCF-7 have been studied for more than two decades (73). The data available suggest that the inhibitory action of melatonin on mammary cancer estrogen-positive cell lines is based on its ability to regulate either the synthesis of estrogens or estrogen signaling pathways (74). Thus, the pineal hormone is capable of downregulating both the expression and activity of the enzymes necessary for the synthesis of estrogens from androgenic precursors, therefore acting as a SEEM. In the MCF-7 cell line, melatonin at physiological concentrations exhibits anti-aromatase properties (75). The pineal hormone is able to reduce the activity of aromatase, the principal enzyme in estrogen biosynthesis. Melatonin inhibits aromatase under basal conditions or when the enzyme activity is stimulated by cyclic adenosine monophosphate (cAMP) or cortisol (76). When gene expression was evaluated and the CYP19 gene (coding for aromatase) was examined, it was observed that melatonin downregulated its expression at the transcriptional level (76). The major bloodstream circulating form of physiologically inactive estrogen is estrone sulfate, which acts as an estrogen reserve (77). The enzyme steroid sulfatase (STS) converts inactive estrogen sulfates into estrone and estradiol. Estrone can be further transformed into physiologically active estrogen by the action of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (17 β -HSD1). Finally, the enzyme estrogen sulfotransferase (EST) sulfonates estrogens to form biologically inactive estrogen sulfates. Both enzymes, STS and EST, serve a role in the modulation of the *in situ* levels of estradiol in hormone-dependent tumors (78). Melatonin modulates the expression and activity of aromatase, STS, 17 β -HSD1 and EST not only in tumor cells, but also in surrounding cells such as fibroblasts and endothelial cells (74,79-82).

Melatonin can also counteract the different actions of estrogens, thus functioning as a naturally occurring SERM (83). The mechanisms implicated in the antiestrogenic effects of melatonin are yet being elucidated. Unlike other antiestrogenic molecules such as tamoxifen, melatonin does not directly bind to ER (84). In estrogen-positive breast cancer cells, melatonin decrease the expression of ER α (85) and impairs the estrogen-mediated transcriptional activation of genes through destabilization of the estradiol-ER complex, preventing its binding to DNA in both estrogen response element (ERE)- and activator protein 1-containing promoters (86). This effect appears to be mediated by calmodulin, since melatonin behaves as a calmodulin antagonist. The pineal hormone promotes structural changes in the calmodulin-ER α protein complex, thus facilitating its binding to an ERE (87,88). Remarkably, melatonin does not alter the recruitment of co-activators triggered by ER α , suggesting that melatonin mechanisms of action diverge from those of other anti-estrogen chemicals used in breast cancer treatment (88). It is important to mention that only ER α , but not ER β , binds to calmodulin (84). The substitution for glycine of two lysine

residues located at positions 302 and 303 of the hinge domain of ER α generated a mutant version of ER α that was incapable of binding to calmodulin, and that therefore turned into a melatonin non-regulated receptor (88). The effects of melatonin may also be explained in terms of binding to its specific membrane receptors, such as melatonin receptor type 1 (MT1), resulting in an interplay with the ER signaling pathway (89). MT1 receptors are present in normal human breast tissues and in tumor tissues (90). Melatonin and estradiol signaling pathways converge and they have opposite effects over cAMP intracellular concentrations. In breast cancer cells, estrogens trigger adenylate cyclase activation, which results in increased cAMP cytoplasmic levels in a classical short-time second-messenger mechanism that is independent of transcription (91). The increase in cAMP levels cooperates with long-time genomic effects of estradiol, thus enhancing ER-mediated transcriptional activation (91). By contrary, melatonin, through its specific binding to its membrane receptor MT1, inactivates adenylate cyclase, resulting in decreased cAMP levels (92).

The fact that only those human mammary cancer cell lines that are ER α ⁺ are sensitive to the antimetabolic actions of melatonin supports the theory that the antitumor effects of this indolamine occur through its actions on breast cancer cells' estrogen-responsive pathways (93). Melatonin is able to block, under different culture conditions, the mitogenic effects of estradiol (94). The antiproliferative effect of this indolamine could be explained through the modification of the levels of estrogen-modulated proteins, several growth factors and proto-oncogenes such as cMYC, transforming growth factor (TGF) α , Trefoil factor 1, also known as pS2, progesterone receptor (PGR), AP1 transcription factor subunit c-fos and TGF β in human estrogen-positive breast cancer cell lines (94,95). Estradiol enhances cell proliferation and provokes cell cycle progression (96). The inhibitory effect of melatonin (as occurs for tamoxifen) on cell proliferation is cell-cycle specific, causing the presence of melatonin a delay in the G₁-S transition (97). Changes in cell-cycle timing typically implicate modifications in various key proteins that regulate the process. The inhibitory action of the pineal hormone on cell cycle progression can be interpreted through its effects on the expression of certain proteins controlling the G₁-S cell cycle transition. Thus, several studies have demonstrated that melatonin increases the expression of p53 and p21^{Waf1} in experiments performed *in vitro* (98,99). The upregulation of these proteins may be a crucial mechanism explaining how melatonin impedes the progression through the cell cycle at the G₁-S transition. The accumulation of cells in G₁ forces them to enter G₀, causing the cancer cells to undergo a higher differentiation, since G₀ is characterized to be a quiescent state (100). This suggests that the anti-estrogenic, oncostatic and antiproliferative effects of melatonin on human mammary cancer estrogen-positive cell lines may be explained, at least in part, by the ability of the pineal hormone to inhibit cell proliferation at the same time that it enhances cell differentiation. Furthermore, several studies have demonstrated that melatonin inhibits human telomerase reverse transcriptase, which is the rate-limiting factor conditioning the telomerase activity in breast cancer cells (101,102).

Another effect of melatonin in MCF-7 cells is its ability to reduce their invasiveness (103,104). Melatonin

treatment decreases the attachment of the cells to the basement membrane (105). The pineal hormone reduces the chemotactic response of MCF-7 cells (105). Melatonin also blocks the cell migration and invasion that occurs in response to estradiol (105). Cancer cells' motility and invasion are known for being adhesion-dependent mechanisms that require the expression of cell-surface molecules necessary for adhesion (106). In tumor progression, downregulation or loss of expression of several of these surface-adhesion proteins frequently happens, which leads to the loss of cell-cell recognition and the acquisition of an invasive phenotype by the tumor cells; these events correlate with poor cell differentiation (107). All the factors mentioned above are associated with poor prognosis in cancer progression (108). Importantly, among the melatonin antitumor actions, it has been reported that melatonin induces the expression of both β_1 -integrin and E-cadherin, two main proteins essential for cell-cell and cell-matrix interactions; thus, melatonin changes estrogen-responsive tumor cells into a less invasive phenotype by inducing their differentiation (105).

Finally, melatonin exerts its modulatory effect in the tumor microenvironment by controlling the production and secretion of several cytokines. These cytokines are produced by breast cancer cells and regulate the differentiation of the fibroblasts located in close proximity to malignant epithelial cells. Additionally, it has been demonstrated that cytokines produced by malignant cells stimulate the aromatase expression and activity in these fibroblasts (109,110) and in proximal endothelial cells (111). VEGF is a growth factor that serves an essential role in angiogenesis. VEGF is produced and secreted by malignant epithelial cells and recognizes VEGFRs located in the cell surface of endothelial cells. The binding of VEGF to its receptor triggers a cascade of intracellular events that stimulate endothelial cells to undergo proliferation and migration (112,113). Therefore, pharmacological agents able to inhibit the production of this pro-angiogenic factor are of great interest, and could serve an essential role in impairing both tumor angiogenesis and tumor growth. Melatonin may be one molecule to consider, since it can regulate the paracrine mechanisms connecting tumor epithelial cells and the surrounding endothelial cells. One of the main actions of the pineal hormone is that melatonin treatment results in the downregulation of VEGF expression in estrogen-responsive breast cancer cells. As a result, the VEGF levels available for receptors expressed in endothelial cells are lower, and therefore, the number of cells producing estrogens in the proximity of the malignant cells is reduced. Reduced estrogen levels and a lower capability of formation of new vessels as a result of the presence of melatonin will diminish the tumor ability to spread and grow (114).

In summary, a unique molecule, melatonin, has anti-estrogenic properties: It selectively counterbalances the actions of estrogens in both normal and tumor breast tissues, and provides a novel strategy to reduce the local biosynthesis of estrogens from androgens (which in turn, is one of the principal objectives of antitumor pharmacological therapy) (115). These cumulative actions of the pineal hormone point to its potential application as an anticancer molecule in both the prevention and treatment of estrogen-positive tumors, since, as it has been pointed above, this molecule acts at different levels by

interfering with estradiol-dependent signaling pathways, both in tumor cells and in the surrounding endothelial cells and fibroblasts (116).

3. Melatonin and cancer: Clinical trials

As aforementioned, numerous experiments performed *in vitro* (breast cancer cell lines such as MCF-7) and *in vivo* (animal models) have well established the oncostatic properties of melatonin (117). Since melatonin plasma levels are diminished in estrogen-dependent breast cancer patients, various clinical trials have been performed to evaluate the potential beneficial effects of melatonin in human neoplasms. Following the pioneer clinical work of Lissoni *et al* (118), who evaluated the effect of melatonin in cancer patients bearing untreatable advanced solid tumors, multiple studies have been performed and published to date (119). However, the value of melatonin as an adjuvant agent in cancer treatment is not totally clear, and consensus about positive melatonin actions appears to be difficult to achieve. A number of studies point to melatonin as a treatment with no beneficial effects. In cachectic patients with gastrointestinal or advanced lung cancer, including a dose of melatonin at night did not improve parameters such as appetite, weight or quality of life of patients, in comparison with patients who received a placebo (120). In patients with brain metastases, high doses of melatonin did not produce any beneficial effect (121). By contrast, there are a large number of reports supporting the potential benefits of melatonin if included in chemotherapy protocols. In breast, lung and gastrointestinal cancer patients, melatonin protected against thrombocytopenia, and stomatitis, asthenia and neuropathy were less recurrent in the group of melatonin-treated patients (122). It has also been reported that melatonin offers certain protection to hematopoietic progenitors from the toxic actions of anticancer chemotherapeutic chemicals; thus, melatonin has been reported to attenuate the damage to precursor blood cells caused by both radiotherapy and chemotherapy treatments (123). It has also been suggested that melatonin may protect patients against side effects such as asthenia, cardiotoxicity and neurotoxicity caused by chemotherapy (124). Additionally, the pineal hormone increases the 1-year survival and tumor regression rates in cancer patients with metastatic solid tumors with poor clinical status (125). In metastatic non-small cell lung cancer patients treated either with just chemotherapeutic agents or with chemotherapy plus melatonin, both the overall tumor regression rate and the 5-year survival rate of patients concomitantly receiving melatonin were significantly higher as compared with those receiving only chemotherapeutic agents. It appears that chemotherapy was better tolerated in patients who also received the pineal hormone (126). The study points to melatonin as an adjuvant drug capable of improving the effectiveness of chemotherapy in terms of both quality of life and survival of patients (126). A recent report concludes that melatonin combined with chemotherapy did not significantly improved survival or ameliorated various adverse side effects in patients with non-small cell lung advanced cancer, although certain improvement in the quality of life of these patients was observed (127). A systematic review comprising data from 21 clinical trials (all the patients enrolled in the studies were bearing solid tumors), in which the effect of melatonin concomitantly added in conjunction with

chemotherapy or radiotherapy was evaluated, and supportive care, partial response, complete response, 1-year survival and chemotherapy-associated toxicities were assessed (128), concluded that melatonin may serve a beneficial role in cancer patients who are treated with chemotherapy. Patients who received melatonin experienced substantial improvements, particularly in terms of tumor remission and 1-year survival rates and melatonin also ameliorated the side effects of chemotherapy (127,128). Furthermore, another review summarising the data from eight eligible randomized controlled trials (n=761) obtained similar conclusions (129).

4. Can melatonin enhance the beneficial and protect against the deleterious effects of chemotherapy?

As aforementioned, it is well documented that melatonin diminishes the incidence of chemically induced cancers and is able to slow down the growth of certain hormone-responsive cancers (67,117). The antitumor actions of this indolamine have been described in breast cancer, both in *in vivo* animal experiments (in 7,12-dimethylbenz[a]anthracene chemically induced mammary tumors in rodents) and in *in vitro* assays (in estrogen-positive human mammary cancer cell lines) (64). Furthermore, there are numerous reports endorsing the beneficial use of melatonin during chemotherapy in clinical trials (118,122-124). Therefore, the ultimate goal of the present review is to provide a compilation on the current knowledge concerning the interplay of melatonin and chemotherapy agents at the molecular level. The PubMed database (www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed) was interrogated for citations of 84 genes known to be commonly involved in the dysregulation of several normal processes during breast carcinogenesis, which are also present in breast cancer cell lines. The list includes signal transduction genes and other genes involved in usually altered pathways, including cellular adhesion, angiogenesis, proteolytic activities, cell cycle progression, cell cycle control and apoptosis (Table I). Research into carcinogenic mechanisms (130) has identified during the last decades numerous functional alterations due to somatic mutations, gene expression alterations and altered post-translational protein modifications (131). Therefore, the database search was performed including as keywords i) the name of each gene, ii) breast cancer, iii) melatonin, and iv) chemotherapy.

For the majority of genes reviewed, there were thousands of citations in the literature when the search included the name of each gene and breast cancer as key words. When melatonin was included in the selection criteria, the number of articles was markedly reduced; thus, 53 out of the 84 genes surveyed did not have a single report associated under these criteria. Searching for ER together with melatonin and breast cancer led to ~100 articles, whereas p53 and PGR searches produced 15 and 12 reports respectively, and the rest of the 28 genes evaluated produced 1-9 articles.

The number of reports was further reduced if chemotherapy was also included in the selection criteria. Only 25 of the 84 genes assessed are included in the list (Table I), indicating that, for 59 out of 84 genes, there is not a single study published including the gene name, melatonin, breast cancer and chemotherapy as keywords.

In Table II, a search was performed including as keywords melatonin (20,724 articles) melatonin and breast cancer (524 articles), and 28 drugs commonly used as chemotherapy in breast cancer treatment (6,9). Apart from tamoxifen (23 articles fulfilled the criteria 'melatonin, breast cancer and tamoxifen'), the results show that there is limited information at the molecular level concerning the implication of co-treatment with the pineal indolamine and chemotherapy agents in breast cancer targeted therapy, and no report was available for 13 of the 28 drugs searched. In conclusion, despite the fact that during decades numerous articles have reported experimental data from *in vitro* and *in vivo* experiments showing the oncostatic actions of melatonin, the present review demonstrated that there are limited reports studying the effects of melatonin and chemotherapy agents in combination in cancer treatments, and particularly, in breast cancer. Similarly, little is known about the role of melatonin regarding the expression and functionality of the genes reported to be altered in cancer, particularly in breast cancer. There is little information available nowadays about gene expression profiles in all types of cancer, and particularly in estrogen-responsive breast tumors. There is also limited information available on how the gene expression profile may be altered by treatment with different chemotherapeutic compounds and, remarkably, whether or not melatonin has protective effects when administered together with chemotherapeutic agents. The majority of information available about melatonin, cancer, chemotherapy, and altered gene expression and function has been published (132,133) in the last few years (Fig. 1). This indicates that nowadays there is a growing field of research about this topic. Several of the most relevant findings recently reported with regard to the modulatory role of melatonin in cancer at the molecular level include the circadian interruption of melatonin production by exposure to light at night, which results in the development of resistance to tamoxifen treatment in breast cancer patients (134). In this context, it has also been described how nocturnal disruption of melatonin plasma levels originates a complete loss of tumor response to the chemotherapeutic agent doxorubicin (135). The resistance of cancer cells to chemotherapy treatments such as doxorubicin usually implicates an upregulation of P-glycoprotein, which is responsible for drug efflux from cells (136). In this context, there is a report describing that melatonin treatment increases doxorubicin intracellular concentrations in cancer cells, suggesting that melatonin may inhibit P-glycoprotein (137). In breast cancer xenografts implanted in animal models (nude mice), treatment with the pineal hormone stopped the tumor progression by reducing tumor size and cell proliferation (Ki-67), as well as by inhibiting angiogenesis (138). Melatonin treatment results in increased expression of Bcl-2-like protein 11 (Bim) parallel to lower levels of cyclooxygenase (COX)-2, which in turns potentiate tunicamycin-induced apoptosis in mammary cancer cells (139). Regulation of the COX-2, Akt, p300 and apoptotic protease activating factor-1 signaling pathways by melatonin inhibits cell proliferation and triggers apoptosis in breast cancer cells in *in vitro* models (140). Melatonin also regulates mouse double minute 2 homolog (MDM2), since this indolamine strongly represses MDM2 gene expression and inhibits MDM2 translocation into the nucleus of the cells (141). This can be explained because melatonin stimulates ribosomal

protein L11 and inhibits the phosphorylation of MDM2 by Akt-phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase (141). Melatonin downregulates sirtuin, which is a specific inhibitor of p300, and upregulates p300 and murine double minute X (MDMX) (141). As a consequence, cells exposed to melatonin exhibit significantly increased levels of p53 and of its acetylated form (141). Finally, there is a significant increase in p21 levels in melatonin-treated tumor cells (141). It has been reported that melatonin sensitizes non-small cell lung cancer cells harboring a mutated form of EGFR to gefitinib (a tyrosine kinase inhibitor) (142). In combination with cisplatin, melatonin enhances the cytotoxic effects of this chemotherapeutic agent and promotes the entry into apoptosis of lung cancer cells (143) and cervical cancer-derived HeLa cells (144). Consistently with these findings, co-treatment with melatonin and each of the following three chemotherapy agents: Cisplatin, 5-fluorouracil and doxorubicin, resulted in an enhancement of cytotoxicity and apoptosis triggered by chemotherapy in the cell line AR42J, which is derived from rat pancreatic tumors (145). There is only one report addressing the effect of melatonin combined with the purine nucleoside antimetabolite clofarabine, describing that melatonin use as co-treatment led to an enhanced cytotoxic effect of clofarabine in leukemic cell lines, which was associated with higher levels of acetylation (146). In ER⁺ breast cancer rat models treated with Adriamycin®, melatonin co-treatment results in lighter tumor weights, increased tumor cell apoptosis, higher expression of E-cadherin and higher survival rate (147). In combination with the nucleoside analogue gemcitabine, recent reports demonstrate that melatonin inhibits both proliferation and invasion of pancreatic ductal adenocarcinoma cells through nuclear factor-κB inhibition (148). Melatonin supports the effects of doxorubicin by activating transient receptor potential vanilloid 1 and apoptosis, thus inducing MCF-7 cell death (149). In a model of ovarian carcinoma, melatonin therapy promotes apoptosis along with the upregulation of p53, B-cell lymphoma (Bcl)-2-associated X protein (Bax) and cleaved caspase-3, suggesting that melatonin triggers apoptosis in ovarian cancer cells (150). In a gastric cancer cell line (AGS), p38, c-Jun N-terminal kinase and extracellular signal-regulated kinase were activated by melatonin, which also significantly increased caspase-3 activity, increased the expression of the pro-apoptotic gene Bax and decreased the expression of the anti-apoptotic gene Bcl-2 (151). Additionally, melatonin is able to strengthen the antitumor effects of cisplatin with low systemic toxicity (143).

5. Conclusions

Melatonin is a notable molecule to be considered in cancer treatment. A growing amount of evidence in the last few years has suggested that melatonin behaves as an oncostatic agent in a variety of cancer types in general, and in particular, in hormone-dependent breast cancer, as documented from numerous studies performed either in animal models *in vivo* or in cell lines derived from human breast cancer *in vitro* (64,67,81). Clinical trials suggest that melatonin can have protective effects when administered along with chemotherapy in patients suffering from advanced solid tumors (129). The mechanisms underlying the oncostatic actions of the pineal hormone in

Table I. PubMed search results.^a

Gene name	Gene ^a	Gene AND breast cancer	Gene AND melatonin	Gene AND breast cancer AND melatonin	Gene AND breast cancer AND melatonin AND chemotherapy	Gene AND cancer AND melatonin AND chemotherapy
ER	68,885	31,082	189	96	31	52
p53	78,342	7,698	80	15	7	12
p21	31,647	2,174	35	9	5	12
VEGF	57,030	2,737	64	12	3	11
PGR	33,762	13,582	73	96	3	5
TGFB1	22,043	561	25	4	3	4
MYC	29,932	1,882	17	5	3	3
CDH1	23,363	2,200	13	5	3	3
IL6	96,419	1,106	162	3	2	10
GSTP1	35,897	901	91	2	2	7
c-JUN	102,575	2,952	106	6	2	6
RARB	11,545	651	76	9	2	5
CCND1	16,332	2,205	16	6	2	2
AR	22,741	1,690	64	3	1	11
AKT	54,018	3,992	92	6	1	10
Ki-67	20,827	3,129	18	5	1	5
ERK1	26,166	1,153	61	4	1	3
ERBB2	22,268	14,282	72	3	1	3
EGFR	35,864	3,550	7	3	1	3
IGFBP3	5,003	432	6	2	1	2
EGF	29,673	2,215	24	6	1	2
Rb	19,405	1,017	16	1	1	1
IGF1	2,700	160	15	1	1	1
CDK2	6,054	491	5	1	1	1
p73	2,089	113	1	1	1	1

^aA search in PubMed database was performed for 84 genes known to be altered in breast cancer. The numbers refer to the citation found when the keywords used were: i) 'Gene name'; ii) 'gene name' AND 'breast cancer'; iii) 'gene name' AND 'melatonin'; iv) 'gene name' AND 'breast cancer' AND 'melatonin'; v) 'gene name' AND 'breast cancer' AND 'melatonin' AND 'chemotherapy'; and vi) 'gene name' AND 'cancer' AND 'melatonin' AND 'chemotherapy'. In the table, only the 25 genes that appear at least in one publication with the criteria 'gene name' AND 'breast cancer' AND 'melatonin' AND 'chemotherapy' are shown. The genes that have appear in any publication under these criteria of search are gelatinase A, PTGS2, Bad, Bcl-2, BIRC5, gelatinase B, CTNNB1, APC, ASC, ATM, ABCB1, ABCG2, BRCA1, TFF3, cathepsin, μ -PA, SRC, PAI-1, serpine 1, JNK1, IGF1R, CDKN2A, ADAM23, PTEN, NOTCH1, THBS1, ID1, keratin 5, GATA3. ERK2, CCNE1, XBP1, NR3C1, BRCA2, MUC1, MLH1, keratin 19, NME1, TWIST1, FOXA1, RASFF1, HIC1, SFN, MGMT, CCND2, cystatin, GRB7, keratin8, GLI1, keratin18, SFRP1, SNAI2, p57, cyclin A1, CDH13, CSF1, SLIT2, SLC39A6 and PRM2.

estrogen-dependent breast tumors are based on its behaviour as a SERM and SEEM, as well as on the ability of melatonin to influence the communication among malignant epithelial cells, endothelial cells and fibroblasts in breast cancer (110,116). However, to date, there is limited knowledge about the interplays of melatonin and chemotherapy on molecular aspects such as gene expression profiles and gene post-translational modifications, which must be further addressed in the future.

6. Melatonin and cancer: What next?

Melatonin is a pleiotropic molecule that exerts numerous physiological functions and serves important roles in different

processes, including circadian rhythm, sleep and reproduction (152). A particular characteristic of the pineal hormone is the diversity of molecular mechanisms that act to regulate the above physiological processes. Melatonin reduces cell proliferation and growth of estrogen-positive breast tumors by interfering with estrogen signaling pathways. Data obtained from experiments performed in breast cancer cell lines (93,94) and animal models (81,116) have provided evidence that melatonin diminishes the incidence of mammary tumors and limits their growth *in vivo*, and inhibits the proliferation of human breast cancer cell lines and interferes with their metastatic behaviour *in vitro* (81,97). There are several proposed theories to explain the mechanisms by which melatonin reduces the growth and

Table II. Number of publications identified in the MEDLINE (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) journal citation database (accessed November 2015), when using as search term each of the 28 molecules currently used in breast cancer research and/or treatment, alone (second column), including melatonin (third column) or including melatonin plus breast cancer (fourth column) as searching criteria.

Drug name	Drug alone	Melatonin	Melatonin AND breast cancer
-	-	20,724	524
Vincristine	27,607	10	0
Eribulin	252	0	0
Paclitaxel	27,688	8	2
Docetaxel	11,691	3	1
Epirubicin	6,131	5	1
Lapatinib	1,807	1	0
Trastuzumab	7,382	2	0
Pazopanib	825	0	0
Bevacizumab	11,697	6	0
Fulvestrant	2,278	5	1
Anastrozole	1,761	1	0
Irosustat	46	0	0
Tanespicin	665	0	0
Cisplatin	59,192	50	4
Gemcitabine	12,035	6	1
Pitavastin	658	3	1
Pravastatin	4,318	1	1
Vinblastine	1,582	14	0
Cyclophosphamide	64,488	63	8
Methotrexate	45,411	20	4
Fluorouracil	48,858	18	6
Adriamycin	60,505	74	8
Vinorelbine	3,472	2	0
Mitomycin	18,202	6	0
Capecitabine	4,746	1	0
Mitoxantrone	5,538	5	2
Carboplatin	13,873	4	0
Tamoxifen	25,107	44	23

development of tumors: i) Through an indirect mechanism, by downregulating the synthesis of estrogens via downregulation of the hypothalamic-pituitary-reproductive axis; ii) through a direct mechanism, by interfering with the activation of estradiol receptors at the cancer cell level, thus behaving as a SERM; and iii) melatonin can regulate the enzymes necessary for the synthesis of estrogens in other tissues, therefore behaving as a SEEM (79). It has been recently demonstrated that melatonin regulates the paracrine communication that occurs between malignant epithelial cancer cells, the surrounding adipose tissue (fibroblasts and adipocytes) and endothelial cells, mainly through the downregulation of the levels of growth factors and cytokines released by breast tumor cells (116). Thus, the effects of melatonin also include anti-angiogenic actions.

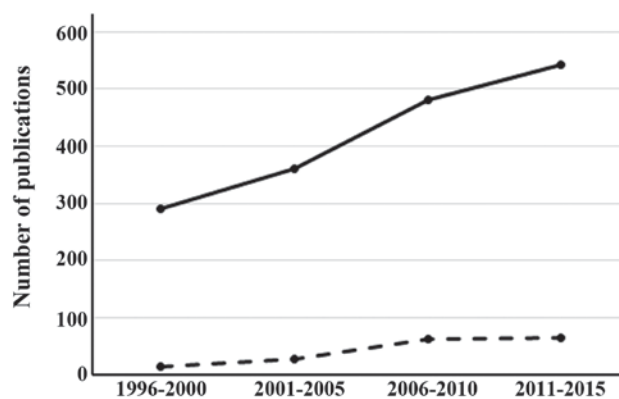


Figure 1. Number of publications regarding melatonin and cancer (solid line), and melatonin, cancer and gene expression (dotted line) published during the last two decades.

In summary, previous studies point to melatonin as a molecule that has a great potential to be useful as an anticancer chemical without producing adverse effects (128). Therefore, melatonin should be considered for both the prevention and therapy of estrogen-positive mammary tumors. There are, in our opinion, numerous noteworthy possibilities for future clinical applications of melatonin in several types of cancer, including breast cancer.

Recently, the inhibitory effects of melatonin have been described not only for estrogen-dependent breast tumors, but also for numerous different cancers, including gastric cancer, ovarian carcinoma, pancreatic ductal carcinoma, leukemic cell lines, cervical cancer and non-small lung carcinoma cells (25,137-139,142,143,153). The majority of the results are positive, and melatonin has been described as an inhibitor of tumor growth under both *in vitro* and *in vivo* experimental conditions (64,81,97). The results arisen in the past few years also suggest that melatonin, either alone or along with chemotherapy in cancer patients diagnosed with advanced solid tumors, helps to improve the outcomes of cancer regression and life expectancy of the patients (122,128). Additionally, chemotherapies are typically better tolerated by patients who are simultaneously treated with melatonin (125). Following the pioneer clinical study of melatonin potential positive effects in untreatable advanced cancer patients performed by Lissoni *et al* (118) several studies have been published (124-129). The main limitation is the requirement of further studies, including additional randomized double-blind controlled trials with much larger sample sizes and implicating several international hospital centres, since the data available nowadays derive from clinical trials including only a few hundred patients (128). Furthermore, it must be considered that not all the studies performed to date point to melatonin as a molecule that improves life expectancy and ameliorates the adverse effects of chemotherapy (120,121). Thus, in patients with advanced lung or gastrointestinal cancer, melatonin did not exhibit any beneficial effect, and as consequence, the value of melatonin as an adjuvant in the treatment of cancer remains unclear from these data (120).

One of the main objectives of the present review was to summarise the current knowledge regarding the interplay of melatonin and chemotherapy. Since the majority of the potentially beneficial effects of melatonin have been described in

estrogen-responsive breast cancer, the present study searched information published on 84 genes known to be dysregulated during breast carcinogenesis (corresponding to the genes included in The Human Breast Cancer RT² Profiler PCR array; Qiagen GmbH, Hilden, Germany). These genes encode proteins implicated in signal transduction, angiogenesis, proteolysis, cell cycle and apoptosis (154).

The present study also reviewed recently published articles associating melatonin with chemotherapeutic agents (135-137,142-149). The results indicate that, for 53 out of the 84 genes evaluated, there are no current data available regarding the effect of melatonin alone or in combination with chemotherapy, either in *in vivo* or in *in vitro* studies. Our findings also show that, apart from tamoxifen, there is limited information from research performed at the molecular level addressing the potential benefits of co-treatment of melatonin with chemotherapeutic agents (155).

In summary, in our opinion, melatonin is an endogenous produced hormone with a high potential of being included as an effective anticancer molecule in the prevention and treatment of, not only hormone-dependent cancers, but also, other types of cancer, since its inhibitory effects have been demonstrated in gastric, lung, pancreatic and hematopoietic cancers (145,148,151,153). However, in the next years, additional research must be conducted to clarify if melatonin administration in combination with chemotherapeutic agents may constitute a novel anticancer treatment. In particular, future research concerning the role of melatonin as a non-toxic and low-cost drug to be considered in breast and other types of tumors must be conducted, particularly at the molecular level. Systematic screenings addressing the effects of chemotherapy on genes known to be altered in different types of cancer, and on how melatonin can modulate the expression and activity of those genes, either when acting alone or in combination with chemotherapy, should be performed. Once larger clinical trials and additional molecular studies (including gene expression profiles, post-translational modifications and individual gene tests) have been conducted, it may be reasonable to recommend melatonin as a potential drug to be considered in the treatment of breast cancer.

Acknowledgements

The present study was supported by grants from the Spanish Science Technology and Innovation Ministry (grants no. SAF2013-42012-P, SAF2016-77103-P) and the Research Institute Valdecilla (grant no. APG/12).

References

- World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research: Second Expert Report. <http://www.wcrf.org/int/research-we-fund/continuous-update-project-cup/second-expert-report>. Accessed August 14, 2016.
- American Cancer Society: Cancer facts and figures 2015. <http://www.cancer.org/research/cancerfactsstatistics/cancer-factsfigures2015>. Accessed August 14, 2016.
- American Cancer Society: What are the key statistics about breast cancer? <http://www.cancer.org/cancer/breastcancer/detailedguide/breast-cancer-key-statistics>. Accessed August 14, 2016.
- Reynolds T: Declining breast cancer mortality: What's behind it? *J Natl Cancer Inst* 91: 750-753, 1999.
- Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, LaCroix AZ, Kooperberg C, Stefanick ML, Jackson RD, Beresford SA, Howard BV; Writing Group for the Women's Health Initiative Investigators, *et al*: Risks and benefits of estrogens plus progestin in healthy postmenopausal women. Principal results from the Women's Health Initiative Randomized Controlled trial. *J Am Med Assoc* 288: 321-333, 2002.
- Greig RG and Trainer DL: Shaping future strategies for the pharmacological control of tumor cell metastases. *Cancer Metastasis Rev* 5: 3-14, 1986.
- Perloff M and Holland JF: Surgical adjuvant chemotherapy. *Ann Rev Med* 28: 475-488, 1977.
- Maughan KL, Lutterbie MA and Ham PS: Treatment of breast cancer. *Am Fam Physician* 81: 1339-1346, 2010.
- Mamounas EP: Impact of neoadjuvant chemotherapy on locoregional surgical treatment of breast cancer. *Ann Surg Oncol* 22: 1425-1433, 2015.
- Masood S: Neoadjuvant chemotherapy in breast cancers. *Womens Health (Lond)* 12: 480-491, 2016.
- Suter R and Marcum JA: The molecular genetics of breast cancer and targeted therapy. *Biologics* 1: 241-258, 2007.
- BreastCancer.Org. How is Chemotherapy Given? <http://www.breastcancer.org/treatment/chemotherapy/process/how>. Accessed August 14, 2016.
- Jordan MA and Wilson L: Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nat Rev Cancer* 4: 253-265, 2004.
- Moudi M, Go R, Yien CY and Nazre M: *Vinca* alkaloids. *Int J Prev Med* 4: 1231-1235, 2013.
- Johnson IS, Armstrong JG, Gorman M and Burnett JP Jr: The *Vinca* Alkaloids: A new class of oncolytic agents. *Cancer Res* 23: 1390-1427, 1963.
- Himes RH: Interactions of the catharanthus (*Vinca*) alkaloids with tubulin and microtubules. *Pharmacol Ther* 51: 257-267, 1991.
- Gigant B, Wang C, Ravelli RB, Roussi F, Steinmetz MO, Curmi PA, Sobel A and Knossow M: Structural basis for the regulation of tubulin by vinblastine. *Nature* 435: 519-522, 2005.
- Graf E and Bertholdt H: Amorphous taxine & crystalline taxine A; *Taxus* alkaloids. II. *Pharm Zentralhalle Dtschl* 96: 385-395, 1957 (In German).
- Wani MC, Taylor HL, Wall ME, Coggon P and McPhail AT: Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *J Am Chem Soc* 93: 2325-2327, 1971.
- Wiernik PH, Schwartz EL, Strauman JJ, Dutcher JP, Lipton RB and Paietta E: Phase I clinical and pharmacokinetic study of taxol. *Cancer Res* 47: 2486-2493, 1987.
- Bissery MC, Guénard D, Guéritte-Voegelein F and Lavelle F: Experimental antitumor activity of Taxotere (RP 56976, NSC 628503), a taxol analogue. *Cancer Res* 51: 4845-4852, 1991.
- Ringel I and Horwitz SB: Studies with RP 56976 (Taxotere): A semisynthetic analogue of taxol. *J Natl Cancer Inst* 83: 288-291, 1991.
- Xiao H, Verdier-Pinard P, Fernandez-Fuentes N, Burd B, Angeletti R, Fiser A, Horwitz SB and Orr GA: Insights into the mechanism of microtubule stabilization by Taxol. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 10166-10173, 2006.
- Snyder JP, Nettles JH, Cornet B, Downing KH and Nogales E: The binding conformation of Taxol in beta-tubulin: A model based on electron crystallographic density. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 5312-5316, 2001.
- Jain KK, Casper ES, Geller NL, Hakes TB, Kaufman RJ, Currie V, Schwartz W, Cassidy C, Petroni GR, Young CW, *et al*: A prospective randomized comparison of epirubicin and doxorubicin in patients with advanced breast cancer. *J Clin Oncol* 3: 818-826, 1985.
- Mizuno NS, Zakis B and Decker RW: Binding of daunomycin to DNA and the inhibition of RNA and DNA synthesis. *Cancer Res* 35: 1542-1546, 1975.
- Andoh T: Inhibitors of DNA topoisomerases. *Gan To Kagaku Ryoho* 24: 1526-1535, 1997 (In Japanese).
- Khasraw M, Bell R and Dang C: Epirubicin: Is it like doxorubicin in breast cancer? A clinical review. *Breast* 21: 142-149, 2012.
- US Food and Drug Administration. Advisory Committees: 2010 Meeting Materials, Oncologic Drugs Advisory Committee. <http://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/drugs/fda-eribulinmesylate>. Accessed November 28, 2016.
- Towle MJ, Salvato KA, Wels BF, Aalfs KK, Zheng W, Seletsky BM, Zhu X, Lewis BM, Kishi Y, Yu MJ and Littlefield BA: Eribulin induces irreversible mitotic blockade: Implications of cell-based pharmacodynamics for in vivo efficacy under intermittent dosing conditions. *Cancer Res* 71: 496-505, 2011.

31. Marhold M, Bartsch R and Zielinski C: Recent developments and translational aspects in targeted therapy for metastatic breast cancer. *ESMO Open* 1: e000036, 2016.
32. Wong WM: Drug update: Trastuzumab: Anti-HER2 antibody for treatment of metastatic breast cancer. *Cancer Pract* 7: 48-50, 1999.
33. Pegram MD, Lipton A, Hayes DF, Weber BL, Baselga JM, Tripathy D, Baly D, Baughman SA, Twaddell T, Glaspy JA and Slamon DJ: Phase II study of receptor-enhanced chemosensitivity using recombinant humanized anti-p185HER2/neu monoclonal antibody plus cisplatin in patients with HER2/neu-overexpressing metastatic breast cancer refractory to chemotherapy treatment. *J Clin Oncol* 16: 2659-2671, 1998.
34. Mayer IA: Treatment of HER2-positive metastatic breast cancer following initial progression. *Clin Breast Cancer* 9 (Suppl 2): S50-S57, 2009.
35. Kaufman B, Trudeau M, Awada A, Blackwell K, Bachelot T, Salazar V, DeSilvio M, Westlund R, Zaks T, Spector N and Johnston S: Lapatinib monotherapy in patients with HER2-overexpressing relapsed or refractory inflammatory breast cancer: Final results and survival of the expanded HER2+ cohort in EGR103009, a phase II study. *Lancet Oncol* 10: 581-588, 2009.
36. Gomez HL, Doval DC, Chavez MA, Ang PC, Aziz Z, Nag S, Ng C, Franco SX, Chow LW, Arbushites MC, *et al*: Efficacy and safety of lapatinib as first-line therapy for ErbB2-amplified locally advanced or metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 26: 2999-3005, 2008.
37. Burris HA III: Dual kinase inhibition in the treatment of breast cancer: Initial experience with the EGFR/ErbB-2 inhibitor lapatinib. *Oncologist* 9 (Suppl 3): S10-S15, 2004.
38. Burstein HJ, Sun Y, Dirix LI, Jiang Z, Paridaens R, Tan AR, Awada A, Ranade A, Jiao S, Schwartz G, *et al*: Neratinib, an irreversible ErbB receptor tyrosine kinase inhibitor, in patients with advanced ErbB2-positive breast cancer. *J Clin Oncol* 28: 1301-1307, 2010.
39. Rabindran SK, Discafani CM, Rosfjord EC, Baxter M, Floyd MB, Golas J, Hallett WA, Johnson BD, Nilakantan R, Overbeek E, *et al*: Antitumor activity of HKI-272, an orally active, irreversible inhibitor of the HER-2 tyrosine kinase. *Cancer Res* 64: 3958-3965, 2004.
40. Darby JF and Workman P: Chemical biology: Many faces of a cancer-supporting protein. *Nature* 478: 334-335, 2011.
41. Hague A, Alam Q, Alam MZ, Azhar EI, Sait KH, Anfinan N, Mushtaq G, Kamal MA and Rasool M: Current understanding of HSP90 as a novel therapeutic target: An emerging approach for the treatment of cancer. *Curr Pharm Des* 22: 2947-2959, 2016.
42. Zsebk B, Citri A, Isola J, Yarden Y, Szöllosi J and Vereb G: Hsp90 inhibitor 17-AAG reduces ErbB2 levels and inhibits proliferation of the trastuzumab resistant breast tumor cell line JIMT-1. *Immunol Lett* 104: 146-155, 2006.
43. Beliakoff J and Whitesell L: Hsp90: An emerging target for breast cancer therapy. *Anticancer Drugs* 15: 651-662, 2004.
44. McDonald PC, Chafe SC and Dedhar S: Overcoming hypoxia-mediated tumor progression: Combinatorial approaches targeting pH regulation, angiogenesis and immune dysfunction. *Front Cell Dev Biol* 4: 27, 2016.
45. Rao N, Lee YE and Ge R: Novel endogenous angiogenesis inhibitors and their therapeutic potential. *Acta Pharmacol Sin* 36: 1177-1190, 2015.
46. Arjaans M, Schröder CP, Oosting SF, Dafni U, Kleibeuker JE and de Vries EG: VEGF pathway targeting agents, vessel normalization and tumor drug uptake: From bench to bedside. *Oncotarget* 7: 21247-21258, 2016.
47. Kerbel RS: Strategies for improving the clinical benefit of anti-angiogenic drug based therapies for breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 17: 229-239, 2012.
48. Kerr DJ: Targeting angiogenesis in cancer: Clinical development of bevacizumab. *Nat Clin Pract Oncol* 1: 39-43, 2004.
49. Mackey JR, Kerbel RS, Gelmon KA, McLeod DM, Chia SK, Rayson D, Verma S, Collins LL, Paterson AH, Robidoux A and Pritchard KI: Controlling angiogenesis in breast cancer: A systematic review of anti-angiogenic trials. *Cancer Treat Rev* 38: 673-688, 2012.
50. Miller KD, Chap LI, Holmes FA, Cobleigh MA, Marcom PK, Fehrenbacher L, Dickler M, Overmoyer BA, Reimann JD, Sing AP, *et al*: Randomized phase III trial of capecitabine compared with bevacizumab plus capecitabine in patients with previously treated metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 23: 792-799, 2005.
51. Sloan B and Scheinfeld NS: Pazopanib, a VEGF receptor tyrosine kinase inhibitor for cancer therapy. *Curr Opin Investig Drugs* 9: 1324-1335, 2008.
52. Gril B, Palmieri D, Qian Y, Smart D, Ileva L, Liewehr DJ, Steinberg SM and Steeg PS: Pazopanib reveals a role for tumor cell B-Raf in the prevention of HER2+ breast cancer brain metastasis. *Clin Cancer Res* 17: 142-153, 2011.
53. Taylor SK, Chia S, Dent S, Clemons M, Agulnik M, Greci P, Wang L, Oza AM, Ivy P, Pritchard KI and Leigh NB: A phase II study of pazopanib in patients with recurrent or metastatic invasive breast carcinoma: A trial of the princess Margaret Hospital phase II consortium. *Oncologist* 15: 810-818, 2010.
54. Mauvais-Jarvis P, Kuttann F and Gompel A: Estradiol/progesterone interaction in normal and pathological breast cells. *Ann N Acad Sci* 464: 152-167, 1986.
55. Lumachi F, Santeufemia DA and Basso SM: Current medical treatment of estrogen receptor-positive breast-cancer. *World J Biol Chem* 6: 231-239, 2015.
56. Ellis AJ, Hendrick VM, Williams R and Komm BS: Selective estrogen receptor modulators in clinical practice: A safety overview. *Expert Opin Drug Saf* 14: 921-934, 2015.
57. Jordan VC: Tamoxifen as the first targeted long-term adjuvant therapy for breast cancer. *Endocr Relat Cancer* 21: R235-R246, 2014.
58. Dalmau E, Armengol-Alonso A, Muñoz M and Seguí-Palmer MA: Current status of hormone therapy in patients with hormone receptor positive (HR+) advanced breast cancer. *Breast* 23: 710-720, 2014.
59. Morris C and Wakeling A: Fulvestrant ('Faslodex')-a new treatment option for patients progressing on prior endocrine therapy. *Endocr Relat Cancer* 9: 267-276, 2002.
60. Johnston SJ and Cheung KL: Fulvestrant-a novel endocrine therapy for breast cancer. *Curr Med Chem* 17: 902-914, 2010.
61. Wong ZW and Ellis MJ: First-line endocrine treatment of breast cancer: Aromatase inhibitor or antioestrogen? *Br J Cancer* 90: 20-25, 2004.
62. Reiter RJ, Tan DX and Fuentes-Broto L: Melatonin: A multitasking molecule. *Prog Brain Res* 181: 127-151, 2010.
63. Reiter RJ, Tan DX and Galano A: Melatonin: Exceeding expectations. *Physiology (Bethesda)* 29: 325-333, 2014.
64. Hill SM, Belancio VP, Dauchy RT, Xiang S, Brimer S, Mao L, Hauch A, Lundberg PW, Summers W, Yuan L, *et al*: Melatonin: An inhibitor of breast cancer. *Endocr Relat Cancer* 22: R183-R204, 2015.
65. Dai J, Ram PT, Yuan L, Spriggs LL and Hill SM: Transcriptional repression of RORalpha activity in human breast cancer cells by melatonin. *Mol Cell Endocrinol* 176: 111-120, 2001.
66. Reiter RJ, Tan DX, Manchester LC, Lopez-Burillo S, Sainz RM and Mayo JC: Melatonin: Detoxification of oxygen and nitrogen-based toxic reactants. *Adv Exp Med Biol* 527: 539-548, 2003.
67. Blask DE, Pelletier DB, Hill SM, Lemus-Wilson A, Grosso DS, Wilson ST and Wise ME: Pineal melatonin inhibition of tumor promotion in the N-nitroso-N-methylurea model of mammary carcinogenesis: Potential involvement of antiestrogenic mechanisms in vivo. *J Cancer Res Clin Oncol* 117: 526-532, 1991.
68. Tamarkin L, Almeida OF and Danforth DN Jr: Melatonin and malignant disease. *Ciba Found Symp* 117: 284-299, 1985.
69. Coleman MP and Reiter RJ: Breast cancer, blindness and melatonin. *Eur J Cancer* 28: 501-503, 1992.
70. Kliukiene J, Tynes T and Andersen A: Risk of breast cancer among norwegian women with visual impairment. *Br J Cancer* 84: 397-399, 2001.
71. Flynn-Evans EE, Stevens RG, Tabandeh H, Schernhammer ES and Lockett SW: Total visual blindness is protective against breast cancer. *Cancer Causes Control* 20: 1753-1756, 2009.
72. Schernhammer ES, Laden F, Speizer FE, Willet WC, Hunter DJ, Kawachi I and Colditz GA: Rotating night shifts and risk of breast cancer in women participating in the nurses' health study. *J Natl Cancer Inst* 93: 1563-1568, 2001.
73. González A, Cos S, Martínez-Campa C, Alonso-González C, Sánchez-Mateos S, Mediavilla MD and Sánchez-Barceló EJ: Selective estrogen enzyme modulator actions of melatonin in human breast cancer cells. *J Pineal Res* 45: 86-92, 2008.
74. Cos S, González A, Martínez-Campa C, Mediavilla MD, Alonso-González C and Sánchez-Barceló EJ: Estrogen-signaling pathway: A link between breast cancer and melatonin oncostatic actions. *Cancer Detect Prev* 30: 118-128, 2006.
75. Martínez-Campa C, González A, Mediavilla MD, Alonso-González C, Sánchez-Barceló EJ and Cos S: Melatonin enhances the inhibitory effect of aminoglutethimide on aromatase activity in MCF-7 human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 94: 249-254, 2005.

76. Cos S, Martínez-Campa C, Mediavilla MD and Sánchez-Barceló EJ: Melatonin modulates aromatase activity in MCF-7 human breast cancer cells. *J Pineal Res* 38: 136-142, 2005.
77. Purohit A, Woo LW and Potter BV: Steroid sulfatase: A pivotal player in estrogen synthesis and metabolism. *Mol Cell Endocrinol* 340: 154-160, 2011.
78. Sasano H, Suzuki T, Nakata T and Moriya T: New development in intracrinology of breast carcinoma. *Breast Cancer* 13: 129-136, 2006.
79. Cos S, González A, Martínez-Campa C, Mediavilla MD, Alonso-González C and Sánchez-Barceló EJ: Melatonin as a selective estrogen enzyme modulator. *Curr Cancer Drug Targets* 8: 691-702, 2008.
80. Álvarez-García V, González A, Martínez-Campa C, Alonso-González C and Cos S: Melatonin modulates aromatase activity and expression in endothelial cells. *Oncol Rep* 29: 2058-2064, 2013.
81. González A, Álvarez-García V, Martínez-Campa C, Mediavilla MD, Alonso-González C, Sánchez-Barceló EJ and Cos S: In vivo inhibition of the estrogen sulfatase enzyme and growth of DMBA-induced mammary tumors by melatonin. *Curr Cancer Drug Targets* 10: 279-286, 2010.
82. González A, Martínez-Campa C, Alonso-González C and Cos S: Melatonin affects the dynamic steady-state equilibrium of estrogen sulfates in human umbilical vein endothelial cells by regulating the balance between estrogen sulfatase and sulfotransferase. *Int J Mol Med* 36: 1671-1676, 2015.
83. Sánchez-Barceló EJ, Cos S, Mediavilla D, Martínez-Campa C, González A and Alonso-González C: Melatonin-estrogen interactions in breast cancer. *J Pineal Res* 38: 217-222, 2005.
84. García Pedrero JM, Del Río B, Martínez-Campa C, Muramatsu M, Lazo PS and Ramos S: Calmodulin is a selective modulator of estrogen receptors. *Mol Endocrinol* 16: 947-960, 2002.
85. Molis TM, Spriggs LL and Hill SM: Modulation of estrogen receptor mRNA expression by melatonin in MCF-7 human breast cancer cells. *Mol Endocrinol* 8: 1681-1690, 1994.
86. Rato AG, Pedrero JG, Martínez MA, del Río B, Lazo PS and Ramos S: Melatonin blocks the activation of estrogen receptor for DNA binding. *FASEB J* 13: 857-868, 1999.
87. Bouhoute A and Leclercq G: Calmodulin decreases the estrogen binding capacity of the estrogen receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 227: 651-657, 1996.
88. del Río B, García Pedrero JM, Martínez-Campa C, Zuazua P, Lazo PS and Ramos S: Melatonin, an endogenous-specific inhibitor of estrogen receptor alpha via calmodulin. *J Biol Chem* 279: 38294-38302, 2004.
89. Ram PT, Dai J, Yuan L, Dong C, Kiefer TL, Lai L and Hill SM: Involvement of the mtl melatonin receptor in human breast cancer. *Cancer Lett* 179: 141-150, 2002.
90. Dillon DC, Easley SE, Asch BB, Cheney RT, Brydon L, Jockers R, Winston JS, Brooks JS, Hurd T and Asch HL: Differential expression of high-affinity melatonin receptors (MT1) in normal and malignant human breast tissue. *Am J Clin Pathol* 118: 451-458, 2002.
91. Aronica SM, Kraus WL and Katzenellenbogen BS: Estrogen action via the cAMP signaling pathway: Stimulation of adenylate cyclase and cAMP-regulated gene transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 8517-8521, 1994.
92. Godson C and Reppert SM: The Mella melatonin receptor is coupled to parallel signal transduction pathways. *Endocrinology* 138: 397-404, 1997.
93. Hill SM, Spriggs LL, Simon MA, Muraoka H and Blask DE: The growth inhibitory action of melatonin on human breast cancer cells is linked to the estrogen response system. *Cancer Lett* 64: 249-256, 1992.
94. Cos S and Blask DE: Melatonin modulates growth factor activity in MCF-7 human breast cancer cells. *J Pineal Res* 17: 25-32, 1994.
95. Molis TM, Spriggs LL, Jupiter Y and Hill SM: Melatonin modulation of estrogen-regulated proteins, growth factors, and proto-oncogenes in human breast cancer. *J Pineal Res* 18: 93-103, 1995.
96. Hong J, Shah NN, Thomas TJ, Gallo MA, Yurkow EJ and Thomas T: Differential effects of estradiol and its analogs on cyclin D1 and CDK4 expression in estrogen receptor positive MCF-7 and estrogen receptor-transfected MCF-10Aewt5 cells. *Oncol Rep* 5: 1025-1033, 1998.
97. Cos S, Blask DE, Lemus-Wilson A and Hill AB: Effects of melatonin on the cell kinetics and 'estrogen-rescue' of MCF-7 human breast cancer cells in culture. *J Pineal Res* 10: 36-42, 1991.
98. Mediavilla MD, Cos S and Sánchez-Barceló EJ: Melatonin increases p53 and p21WAF1 expression in MCF-7 human breast cancer cells in vitro. *Life Sci* 65: 415-420, 1999.
99. Alonso-González C, González A, Martínez-Campa C, Menéndez-Menéndez J, Gómez-Arozamena J, García-Vidal A and Cos S: Melatonin enhancement of the radiosensitivity of human breast cancer cells is associated with the modulation of proteins involved in estrogen biosynthesis. *Cancer Lett* 370: 145-152, 2016.
100. Wang SC, Lin SH, Su LK and Hung MC: Changes in BRCA2 expression during progression of the cell cycle. *Biochem Biophys Res Commun* 234: 247-251, 1997.
101. Leon-Blanco MM, Guerrero JM, Reiter RJ, Calvo JR and Pozo D: Melatonin inhibits telomerase activity in the MCF-7 tumor cell line both in vivo and in vitro. *J Pineal Res* 35: 204-211, 2003.
102. Martínez-Campa CM, Alonso-González C, Mediavilla MD, Cos S, González A and Sánchez-Barceló EJ: Melatonin down-regulates hTERT expression induced by either natural estrogens (17beta-estradiol) or metalloestrogens (cadmium) in MCF-7 human breast cancer cells. *Cancer Lett* 268: 272-277, 2008.
103. Alonso-González C, Mediavilla D, Martínez-Campa C, González A, Cos S and Sánchez-Barceló EJ: Melatonin modulates the cadmium-induced expression of MT-2 and MT-1 metallothioneins in three lines of human tumor cells (MCF-7, MDA-MB-231 and HeLa). *Toxicol Lett* 181: 190-195, 2008.
104. Mao L, Yuan L, Slakey LM, Jones FE, Burrow ME and Hill SM: Inhibition of breast cancer cell invasion by melatonin is mediated through regulation of the p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathway. *Breast Cancer Res* 12: R107, 2010.
105. Cos S, Fernández R, Güezmes A and Sánchez-Barceló EJ: Influence of melatonin on invasive and metastatic properties of MCF-7 human breast cancer cells. *Cancer Res* 58: 4383-4390, 1998.
106. Kawaguchi T: Cancer metastasis: Characterization and identification of the behavior of metastatic tumor cells and the cell adhesion molecules, including carbohydrates. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord* 5: 39-64, 2005.
107. Canel M, Serrels A, Frame MC and Brunton VG: E-cadherin-integrin crosstalk in cancer invasion and metastasis. *J Cell Sci* 126: 393-401, 2013.
108. Gui GP, Puddefoot JR, Vinson GP, Wells CA and Carpenter R: Altered cell-matrix contact: A prerequisite for breast cancer metastasis? *Br J Cancer* 75: 623-633, 1997.
109. González A, Álvarez-García V, Martínez-Campa C, Alonso-González C and Cos S: Melatonin promotes differentiation of 3T3-L1 fibroblasts. *J Pineal Res* 52: 12-20, 2012.
110. Álvarez-García V, González A, Alonso-González C, Martínez-Campa C and Cos S: Melatonin interferes in the desmoplastic reaction in breast cancer by regulating cytokine production. *J Pineal Res* 52: 282-290, 2012.
111. Álvarez-García V, González A, Alonso-González C, Martínez-Campa C and Cos S: Regulation of vascular endothelial growth factor by melatonin in human breast cancer cells. *J Pineal Res* 54: 373-380, 2013.
112. Gingis-Velitski S, Zetser A, Flugelman MY, Vlodavsky I and Ilan N: Heparanase induces endothelial cell migration via protein kinase B/Akt activation. *J Biol Chem* 279: 23536-23541, 2004.
113. Gu Q, Wang D, Wang X, Peng R, Liu J, Jiang T, Wang Z, Wang S and Deng H: Basic fibroblast growth factor inhibits radiation-induced apoptosis of HUVECs. I. The PI3K/AKT pathway and induction of phosphorylation of BAD. *Radiat Res* 161: 692-702, 2004.
114. Álvarez-García V, González A, Alonso-González C, Martínez-Campa C and Cos S: Antiangiogenic effects of melatonin in endothelial cell cultures. *Microvasc Res* 87: 25-33, 2013.
115. Ahmad I and Shagufata: Recent developments in steroidal and nonsteroidal aromatase inhibitors for the chemoprevention of estrogen-dependent breast cancer. *Eur J Med Chem* 102: 375-386, 2015.
116. Cos S, Álvarez-García V, González A, Alonso-González C and Martínez-Campa C: Melatonin modulation of crosstalk among malignant epithelial and adipose cells in breast cancer (Review). *Oncol Lett* 8: 487-492, 2014.
117. Proietti S, Cucina A, Reiter RJ and Bizarri M: Molecular mechanisms of melatonin's inhibitory actions on breast cancers. *Cell Mol Life Sci* 70: 2139-2157, 2013.

118. Lissoni P, Barni S, Tancini G, Crispino S, Paolorossi F, Lucini V, Mariani M, Cattaneo G, Esposti D, Esposti G, *et al*: Clinical study of melatonin in untreatable advanced cancer patients. *Tumori* 73: 475-480, 1987.
119. Grant SG, Melan MA, Latimer JJ and Witt-Enderby PA: Melatonin and breast cancer: Cellular mechanisms, clinical studies and future perspectives. *Expert Rev Mol Med* 11: e5, 2009.
120. Del Fabbro E, Dev R, Hui D, Palmer L and Bruera E: Effects of melatonin on appetite and other symptoms in patients with advanced cancer and cachexia: A double-blind placebo controlled trial. *J Clin Oncol* 31: 1271-1276, 2013.
121. Berk L, Berkey B, Rich T, Hrushesky W, Blask D, Gallagher M, Kudrimoti M, McGarry RC, Suh J and Mehta M: Randomized phase II trial of high-dose melatonin and radiation therapy for RPA class 2 patients with brain metastases (RTOG 0119). *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 68: 852-857, 2007.
122. Lissoni P, Tancini G, Barni S, Paolorossi F, Ardizzoia A, Conti A and Maestroni G: Treatment of cancer chemotherapy-induced toxicity with the pineal hormone melatonin. *Support Care Cancer* 5: 126-129, 1997.
123. Vijayalaxmi, Thomas CR Jr, Reiter RJ and Herman TS: Melatonin: From basic research to cancer treatment clinics. *J Clin Oncol* 20: 2575-2601, 2002.
124. Lissoni P: Is there a role for melatonin in supportive care? *Support Care Cancer* 10: 110-116, 2002.
125. Lissoni P, Barni S, Mandalà M, Ardizzoia A, Paolorossi F, Vaghi M, Longarini R, Malugani F and Tancini G: Decreased toxicity and increased efficacy of cancer chemotherapy using the pineal hormone melatonin in metastatic solid tumour patients with poor clinical status. *Eur J Cancer* 35: 1688-1692, 1999.
126. Lissoni P, Chillelli M, Villa S, Cerizza L and Tancini G: Five years survival in metastatic non-small cell lung cancer patients treated with chemotherapy alone or chemotherapy and melatonin: A randomized trial. *J Pineal Res* 35: 12-15, 2003.
127. Sookprasert A, Johns NP, Phunmanee A, Pongthai P, Cheawchanwattana A, Johns J, Konsil J, Plaimee P, Porasuphatana S and Jitpimolmard S: Melatonin in patients with cancer receiving chemotherapy: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Anticancer Res* 34: 7327-7337, 2014.
128. Seely D, Wu P, Fritz H, Kennedy DA, Tsui T, Seely AJ and Mills E: Melatonin as adjuvant cancer care with and without chemotherapy: A systematic review and meta-analysis of randomized trials. *Integr Cancer Ther* 11: 293-303, 2012.
129. Wang YM, Jin BZ, Ai F, Duan CH, Lu YZ, Dong TF and Fu QL: The efficacy and safety of melatonin in concurrent chemotherapy or radiotherapy for solid tumors: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Cancer Chemother Pharmacol* 69: 1213-1220, 2012.
130. Russo J and Russo IH: The role of estrogen in the initiation of breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 102: 89-96, 2006.
131. Chakravarthi BV, Nepal S and Varambally S: Genomic and epigenomic alterations in cancer. *Am J Pathol* 186: 1724-1735, 2016.
132. Lee SE, Kim SJ, Youn JP, Hwang SY, Park CS and Park YS: MicroRNA and gene expression analysis of melatonin-exposed human breast cancer cell lines indicating involvement of the anticancer effect. *J Pineal Res* 51: 345-352, 2011.
133. Lee SE, Kim SJ, Yoon HJ, Yu SY, Yang H, Jeong SI, Hwang SY, Park CS and Park YS: Genome-wide profiling in melatonin-exposed human breast cancer cell lines identifies differentially methylated genes involved in the anticancer effect of melatonin. *J Pineal Res* 54: 80-88, 2013.
134. Dauchy RT, Xiang S, Mao L, Brimer S, Wren MA, Yuan L, Anbalagan M, Hauch A, Frasch T, Rowan BG, *et al*: Circadian and melatonin disruption by exposure to light at night drives intrinsic resistance to tamoxifen therapy in breast cancer. *Cancer Res* 74: 4099-4110, 2014.
135. Xiang S, Dauchy RT, Hauch A, Mao L, Yuan L, Wren MA, Belancio VP, Mondal D, Frasch T, Blask DE and Hill SM: Doxorubicin resistance in breast cancer is driven by light at night-induced disruption of the circadian melatonin signal. *J Pineal Res* 59: 60-69, 2015.
136. He SM, Li R, Kanwar JR and Zhou SF: Structural and functional properties of human multidrug resistance protein 1 (MRP1/ABCC1). *Curr Med Chem* 18: 439-481, 2011.
137. Granzotto M, Rapozzi V, Decorti G and Giraldo T: Effects of melatonin on doxorubicin cytotoxicity in sensitive and pleiotropically resistant tumor cells. *J Pineal Res* 31: 206-213, 2001.
138. Jardim-Perassi BV, Arbab AS, Ferreira LC, Borin TF, Varma NR, Iskander AS, Shankar A, Ali MM and de Campos Zuccari DA: Effect of melatonin on tumor growth and angiogenesis in xenograft model of breast cancer. *PLoS One* 9: e85311, 2014.
139. Woo SM, Min KJ and Kwon TK: Melatonin-mediated Bim up-regulation and cyclooxygenase-2 (COX-2) down-regulation enhances tunicamycin-induced apoptosis in MDA-MDB-231 cells. *J Pineal Res* 58: 310-320, 2015.
140. Wang J, Xiao X, Zhang Y, Shi D, Chen W, Fu L, Liu L, Xie F, Kang T, Huang W and Deng W: Simultaneous modulation of COX-2, p300, Akt, and Apaf-1 signaling by melatonin to inhibit proliferation and induce apoptosis in breast cancer cells. *J Pineal Res* 53: 77-90, 2012.
141. Proietti S, Cucina A, Dobrowolny G, D'Anselmi F, Dinicola S, Masiello MG, Pasqualato A, Palombo A, Morini V, Reiter RJ and Bizarri M: Melatonin down-regulates MDM2 gene expression and enhances p53 acetylation in MCF-7 cells. *J Pineal Res* 57: 120-129, 2014.
142. Yun M, Kim EO, Lee D, Kim JH, Kim J, Lee H, Lee J and Kim SH: Melatonin sensitizes H1975 non-small-cell lung cancer cells harboring a T790M-targeted epidermal growth factor receptor mutation to the tyrosine kinase inhibitor gefitinib. *Cell Physiol Biochem* 34: 865-872, 2014.
143. Plaimee P, Weerapreeyakul N, Barusrux S and Johns NP: Melatonin potentiates cisplatin-induced apoptosis and cell cycle arrest in human lung adenocarcinoma cells. *Cell Prolif* 48: 67-77, 2015.
144. Pariente R, Pariente JA, Rodríguez AB and Espino J: Melatonin sensitizes human cervical cancer HeLa cells to cisplatin-induced cytotoxicity and apoptosis: Effects on oxidative stress and DNA fragmentation. *J Pineal Res* 60: 55-64, 2016.
145. Uguz AC, Cig B, Espino J, Bejarano I, Naziroglu M, Rodríguez AB and Pariente JA: Melatonin potentiates chemotherapy-induced cytotoxicity and apoptosis in rat pancreatic tumor cells. *J Pineal Res* 53: 91-98, 2012.
146. Yamanishi M, Narazaki H and Asano T: Melatonin overcomes resistance to clofarabine in two leukemic cell lines by increased expression of deoxycytidine kinase. *Exp Hematol* 43: 207-214, 2015.
147. Ma C, Li LX, Zhang Y, Xiang C, Ma T, Ma ZQ and Zhang ZP: Protective and sensitive effects of melatonin combined with Adriamycin on ER+ (estrogen receptor) breast cancer. *Eur J Gynaecol Oncol* 36: 197-202, 2015.
148. Ju HQ, Li H, Tian T, Lu YX, Bai L, Chen LZ, Sheng H, Mo HY, Zeng JB, Deng W, *et al*: Melatonin overcomes gemcitabine resistance in pancreatic ductal adenocarcinoma by abrogating nuclear factor- κ B activation. *J Pineal Res* 60: 27-38, 2016.
149. Kosar PA, Naziroglu M, Övey IS and Çiğ B: Synergic effects of doxorubicin and melatonin on apoptosis and mitochondrial oxidative stress in MCF-7 breast cancer cells: Involvement of TRPV1 channels. *J Membr Biol* 249: 129-140, 2016.
150. Chuffa LG, Alves MS, Martínez M, Camargo IC, Pinheiro PF, Domeniconi RF, Júnior LA and Martinez FE: Apoptosis is triggered by melatonin in an in vivo model of ovarian carcinoma. *Endocr Relat Cancer* 23: 65-76, 2016.
151. Li W, Fan M, Chen Y, Zhao Q, Song C, Yan Y, Jin Y, Huang Z, Lin C and Wu J: Melatonin induces cell apoptosis in AGS cells through the activation of JNK and P38 MAPK and the suppression of nuclear factor-kappa B: A novel therapeutic implication for gastric cancer. *Cell Physiol Biochem* 37: 2323-2338, 2015.
152. Reiter RJ, Tamura H, Tan DX and Xu XY: Melatonin and the circadian system: Contributions to successful female reproduction. *Fertil Steril* 102: 321-328, 2014.
153. Ma Z, Yang Y, Fan C, Han J, Wang D, Di S, Hu W, Liu D, Li X, Reiter RJ and Yan X: Melatonin as a potential anticarcinogen for non-small-cell lung cancer. *Oncotarget* 7: 46768-46784, 2016.
154. Stover DG and Wagle N: Precision medicine in breast cancer: Genes, genomes, and the future of genomically driven treatments. *Curr Oncol Rep* 17: 15, 2015.
155. Sanchez-Barcelo EJ, Mediavilla MD, Alonso-Gonzalez C and Reiter RJ: Melatonin uses in oncology: Breast cancer prevention and reduction of the side effects of chemotherapy and radiation. *Expert Opin Investig Drugs* 21: 819-831, 2012.

Melatonin enhances the apoptotic effects and modulates the changes in gene expression induced by docetaxel in MCF-7 human breast cancer cells

CAROLINA ALONSO-GONZÁLEZ*, JAVIER MENÉNDEZ-MENÉNDEZ*, ALICIA GONZÁLEZ-GONZÁLEZ, ALICIA GONZÁLEZ, SAMUEL COS and CARLOS MARTÍNEZ-CAMPA

Department of Physiology and Pharmacology, School of Medicine, University of Cantabria and Valdecilla Research Institute (IDIVAL), ES-39011 Santander, Spain

Received August 29, 2017; Accepted November 15, 2017

DOI: 10.3892/ijo.2017.4213

Abstract. Results from clinical trials and multiple *in vivo* and *in vitro* studies point to melatonin as a promising adjuvant molecule with many beneficial effects when concomitantly administered with chemotherapy. Melatonin palliates side-effects and enhances the efficacy of chemotherapeutic agents. However, the mechanisms through which melatonin regulates molecular changes induced by chemotherapeutic agents remain largely unknown. In this study, we demonstrated that melatonin enhanced the anti-proliferative and apoptotic responses to low doses of docetaxel in breast cancer cells. Importantly, these effects were more potent when melatonin was added prior to docetaxel. Treatment with 1 μ M docetaxel (equivalent to the therapeutic dosage) induced changes in gene expression profiles and melatonin modulated these changes. Specifically, docetaxel downregulated *TP53*, cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (*CDKN1A*) and cadherin 13 (*CDH13*), and upregulated mucin 1 (*MUC1*), GATA binding protein 3 (*GATA3*) and *c-MYC*, whereas melatonin counteracted these effects. Melatonin further stimulated the expression of the pro-apoptotic *BAD* and *BAX* genes, and enhanced the inhibition of the anti-apoptotic gene *BCL-2* induced by docetaxel. The findings of this study suggest that melatonin is a molecule with potential for use as an adjuvant in cancer chemotherapy, which may have implications for designing clinical trials using chemotherapeutic drugs in combination with melatonin.

Introduction

Melatonin, mainly synthesized and secreted by the pineal gland, is known for its oncostatic actions on estrogen-dependent mammary tumors. Studies using both breast cancer animal models and breast cancer cell lines have examined the effects of nocturnal physiological concentrations of melatonin (1 nM), concluding that the pineal hormone, at this concentration, impairs the growth of estrogen-responsive breast cancer cell lines stimulated with estradiol through at least two different mechanisms: i) the downregulation of the neuroendocrine axis (therefore resulting in a reduction in estrogen levels); and ii) direct effects on tumoral and peritumoral cells. At this level, melatonin regulates the expression and activity of several enzymes necessary for the local synthesis of estradiol, thus behaving as a selective estrogen enzyme modulator (SEEM) (1-3). Additionally, the pineal hormone interferes directly with the effects of estrogens after their binding with the estrogen receptor (ER), therefore behaving as a selective estrogen receptor modulator (SERM). Melatonin impairs the transcriptional activation triggered by the E₂-ER α -calmodulin complex through destabilization of its binding at both ERE- and AP1 containing promoters (4). Of note, melatonin does not alter the recruitment of activators induced by the E₂-ER α complex, indicating that its actions differ from those of other anti-estrogens used in cancer therapy (5,6). Several findings point to cyclic adenosine monophosphate (cAMP) as the likely link between the melatonin and estradiol pathways. In mammary tumor cells, estrogens activate adenylate cyclase, increasing cAMP levels; the increase in cAMP synergizes with the genomic actions of estradiol, promoting transcription (7). On the contrary, melatonin acting through its membrane receptor, MT1, decreases cAMP levels (8). As a result, this indoleamine reduces the expression of estrogen-regulated proteins, growth factors and proto-oncogenes [transforming growth factor (*TGF*) α , *c-MYC*, *pS2*, progesterone receptor (*PGR*), *cFOS* and *TGF β*] in human breast cancer cells (9,10).

Similar to the effects of tamoxifen, the treatment of human breast cancer cells with melatonin has been shown to cause a G₁-S transition delay (11), probably through the differential expression of proteins controlling the G₁-S transition. Thus,

Correspondence to: Dr Carlos Martínez-Campa, Department of Physiology and Pharmacology, School of Medicine, University of Cantabria, Cardenal Herrera Oria s/n, ES-39011 Santander, Spain
E-mail: martinezcem@unican.es

*Contributed equally

Key words: melatonin, breast cancer, docetaxel, chemotherapy, MCF-7 cells, gene expression, cell cycle, transcription factors, apoptosis

melatonin increases the expression of *TP53* (12) and inhibits that of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) (13,14). Additionally, melatonin blocks the invasion of cells induced by estradiol (15), and importantly, melatonin exerts a modulatory effect in the tumor microenvironment, inhibiting the secretion of cytokines by breast cancer cells (16-18).

Several clinical trials have been performed to assess the value of melatonin as an adjuvant in human neoplasms and have revealed multiple beneficial effects of melatonin when used concomitantly with chemotherapeutic agents. Chemotherapy is better tolerated when administered to cancer patients in conjunction with melatonin. The pineal hormone protects from side-effects, such as asthenia, cardiotoxicity and neurotoxicity, and it increases both the 1- and 5-year survival rates and the objective tumor regression in patients with metastatic solid tumors (19-23).

Melatonin exerts anticancer effects at different phases of carcinogenesis, namely initiation, progression and spreading from the primary tumor (24). Recently, studies have addressed the potential benefits that melatonin could have on the effects of chemotherapeutic agents (25). The disruption of the nocturnal melatonin rhythm contributes to a complete loss of tumor sensitivity to doxorubicin (26), whereas melatonin co-treatment sensitizes cancer cells to this drug, increasing doxorubicin intracellular concentrations, possibly through a downregulation in the levels of P-glycoprotein (27). Melatonin induces *Bim* upregulation and cyclooxygenase (*COX*)-2 down-regulation, thus enhancing the tunicamycin-induced apoptosis of breast cancer cells (28), and sensitizing non-small-cell lung cancer cells harbouring an epidermal growth factor receptor (*EGFR*) mutation to gefitinib, a specific tyrosine kinase inhibitor (29). The pineal hormone enhances cisplatin-induced cytotoxicity and the apoptosis of lung cancer and cervical cancer cells (30,31). Additionally, co-treatment with melatonin and each of three different chemotherapeutic agents (5-fluorouracil, cisplatin and doxorubicin) has been shown to result in the enhanced chemotherapy-induced cytotoxicity and apoptosis of the rat pancreatic tumor cell line, AR42J (32). In ER-responsive mammary cancer rat models treated with adriamycin, melatonin co-treatment was shown to result in lighter tumor weights, increased apoptosis, a higher expression of E-cadherin and a higher survival rate (33). In MCF-7 cells, melatonin has been shown to exert synergistic effects with doxorubicin on apoptosis and the activation of transient receptor potential vanilloid (TRPV)1 channels (34). In prostate cancer cells, melatonin combined with doxorubicin, docetaxel or etoposide, has been shown to make cells more sensitive to these compounds (35). Finally, as regards its ability to modulate global gene expression, melatonin influences both microRNA (miRNA or miR) and gene expression. In a global gene expression study on MCF-7 cells, 22 miRNAs were found to be differentially expressed in melatonin-treated cells (36).

Thus, since melatonin: i) is associated with oncostatic actions both *in vivo* and *in vitro*; ii) sensitizes many cell lines to treatment with different chemotherapeutic agents; and iii) seems to exert several beneficial effects when administered concomitantly with chemotherapeutic agents to patients bearing solid tumors, in the present study we investigated the effects of melatonin on the proliferation, cell cycle progression and gene transcription in estrogen-sensitive MCF-7 human

breast cancer cells treated with docetaxel, a microtubule-interfering agent that stabilizes microtubules, commonly used in chemotherapy. Docetaxel belongs to the family of taxanes, a class of diterpenes used in the treatment of various types of cancer, including breast cancer.

Materials and methods

Cells and culture conditions. MCF-7 human breast cancer cells were purchased from the American Tissue Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA). They were maintained as monolayer cultures in 75-cm² plastic culture flasks in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (PAA Laboratories, Pasching, Austria), penicillin (20 U/ml) and streptomycin (20 µg/ml) (Sigma-Aldrich) at 37°C in a humid atmosphere containing 5% CO₂.

Cell proliferation assay. The cells were initially cultured for 24 h in DMEM supplemented with 0.5% dextran-charcoal stripped FBS (csFBS) prior to being seeded in 96-multi-well plates in DMEM supplemented with 10% FBS and incubated at 37°C for 24 h to allow for cell attachment. Melatonin pre-treated cells were incubated for 24 h in DMEM supplemented with 10% FBS containing melatonin (1 nM). Following pre-treatment, both the melatonin-treated and the control cells were seeded into 96-multi-well plates at a density of 3x10³ cells per well, and incubated at 37°C for 24 h to allow for cell attachment. The media were replaced with fresh media with 10% FBS containing docetaxel ranging from 1 µM to 10 pM, plus/minus melatonin (1 nM) and/or the vehicle (ethanol at a final concentration <0.0001%). The cells were cultured for 3 or 6 days and cell proliferation was measured by 3(4,5dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay. Briefly, yellow MTT (5 mg/ml in PBS) is reduced to purple formazan in the mitochondria of living cells. This reduction takes place only when mitochondrial reductase enzymes are active, and therefore conversion can be directly related to the number of viable cells. The formazan crystals can be dissolved by the addition of 4 mM HCl. An increase in cell number is directly related to the increase in absorbance due to the amount of MTT formazan formed (37). After 24 h, the absorbance is read at 570 nm on a microplate reader (Labsystems Multiskan RC 351; Thermo LabSystems Inc. Vienna, VA, USA). MTT solution was obtained from Molecular Probes Inc. (Eugene, OR, USA). Each result represents the median ± standard error of the mean (SEM) of 3 independent experiments and data are presented as a percentage of the untreated control cells.

Measurement of cell cycle kinetics. The cells were initially cultured for 24 h in DMEM supplemented with 0.5% dextran-csFBS prior to being seeded in 96-multi-well plates in DMEM supplemented with 10% FBS and incubated at 37°C for 24 h to allow for cell attachment. The control cells and cells pre-treated with melatonin (1 nM) for 24 h were seeded in 6-well plates at a density of 5x10⁵ cells per well, in DMEM supplemented with 10% FBS and incubated at 37°C for 24 h to allow cell attachment. The media were then replaced with fresh media with 10% FBS containing either docetaxel alone (1 nM) or in combination with melatonin (1 nM) and/or the vehicle (ethanol

at a final concentration <0.0001%). After 24 h of incubation, the cells were harvested with trypsin, washed twice with phosphate-buffered saline (PBS), and fixed in 70% cold ethanol for 30 min. Following the removal of ethanol by centrifugation for 5 min at 300 x g, the cells were stained with a solution containing 50 μ g/ml propidium iodide (PI) (Sigma-Aldrich) and incubated in the dark for 30 min at room temperature. In total, 10,000 cells were acquired for each sample on a BD FACSCanto II analyzer (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). The cell cycle distribution was determined using a DNA software program (FACSDiva software; BD Biosciences).

Determination of cell apoptosis. The induction of apoptosis was determined using an Annexin V-FITC apoptosis detection kit (Miltenyi Biotec GmbH, Germany), according to the manufacturer's instructions. Briefly, the control cells and cells pre-treated with melatonin (1 nM) were seeded in 6-well plates at a density of 3×10^5 cells per well in DMEM supplemented with 10% FBS and incubated at 37°C for 24 h to allow for cell attachment. The media were then replaced by fresh media containing docetaxel (1 nM) plus/minus melatonin (1 nM) and/or the vehicle (ethanol at a final concentration <0.0001%). After 24 h of incubation, the cells were harvested, washed twice with PBS, and centrifuged at 300 x g for 10 min; the cells were resuspended in 100 μ l binding buffer containing 5 μ l of Annexin V-FITC, incubated for 15 min at room temperature, washed twice, and finally resuspended in 500 μ l binding buffer containing 5 μ l of PI. Cells were immediately analyzed following incubation with the probes using a flow cytometer (BD FACSCanto II analyzer; BD Biosciences). A total of 10,000 events were analyzed using the FL-1 (green; Annexin V-FITC) and FL-3 (red; PI) detectors. Each sample was tested 3 times in independent experiments. Under all conditions tested, the percentages of Annexin/PI (alive) and Annexin⁺/PI⁺ cells (early apoptotic) cells were compared.

RNA isolation and cDNA synthesis. Total RNA was isolated from the MCF-7 cells and purified using the Nucleospin RNA II kit (Macherey-Nagel GmbH & Co., Düren, Germany) following the manufacturer's instructions. The concentration and purity of the RNA was quantified by measuring the absorbance on a spectrophotometer (Nanodrop 1000; Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA). The absorbance ratio A260 nm/A280 nm was always >1.9. For cDNA synthesis, 0.5 μ g of total RNA was used as template using the RT² First Strand kit (Qiagen, Valencia, CA, USA), following the manufacturer's instructions. First, the genomic DNA was eliminated by incubating the samples 5 min at 42°C. After mixing with the reverse transcription mix, the samples were incubated for exactly 15 min at 42°C in a final volume of 20 μ l. The reaction was terminated by incubation at 95°C for 5 min. Subsequently, 91 μ l of RNA-free water was added to each reaction and the samples were kept on ice until proceeding with the real-time PCR protocol.

RT² Profiler™ PCR array. Pathway-focused gene expression profiling was performed using a 96-well human breast cancer PCR array (RT² Profiler PCR array - PAHS-131ZA, Human Breast Cancer PCR array, Qiagen, Valencia, CA, USA). In this array, each well contains all the components required and

designed to generate single, gene-specific amplicons, testing the expression of 84 genes related to breast cancer pathways (apoptosis, metabolism, cell cycle and DNA repair), plus 5 housekeeping genes. Each RT² Profiler PCR array plate also includes controls for data normalization, genomic DNA contamination detection, RNA sample quality and general PCR performance.

Briefly, the MCF-7 cells were seeded in 6-well plates in DMEM supplemented with 10% FBS and incubated at 37°C for 24 h to allow for cell attachment. The media were then replaced with fresh media with 10% FBS and containing either docetaxel (Sigma-Aldrich) alone (1 μ M) or in combination with 1 nM melatonin (Sigma-Aldrich) and/or the vehicle (ethanol at a final concentration <0.0001%). After 6 h of incubation, total RNA was extracted and reverse transcribed as explained in the 'RNA isolation and cDNA synthesis' section. The cDNA template was mixed with the appropriate amount of RT² SYBR-Green qPCR Mastermix (Qiagen GmbH, Hilden, Germany), aliquoted 25 μ l to each well of the same plate, and then the real-time PCR cycling program was performed on an MX3005P (Agilent, CA, USA) following the manufacturer's instructions. Amplification was initiated by 1 cycle at 95°C for 10 min and then performed for 40 cycles for quantitative analysis using the following temperature profile: 95°C for 30 sec (denaturation); 60°C for 60 sec (annealing/extension). Dissociation curves were performed to verify that only a single product was amplified. The Ct data for each gene were analyzed using the Qiagen RT² profiler PCR array data analysis software. Data are represented as the fold-regulation between the experimental groups and the control cells. Fold change values <1 indicate a negative result or downregulation, and the fold -regulation is the negative inverse of the fold change.

Measurement of specific mRNA gene expression. The analysis of mRNA gene expression was carried out by RT-qPCR following incubation of the cells for 6 h with docetaxel (1 μ M or 1 nM), in the presence or absence of melatonin (1 nM). Total cellular RNA was isolated and reverse transcribed as indicated above and RT-PCR was performed on an Mx3005P QPCR System (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) using the same temperature profile. Reactions were run in triplicate and melting curves were performed to verify that only a single product was amplified. Each result represents the median of 3 to 5 independent experiments and data are presented as the fold change between the experimental groups and the control cells. The primers used for amplification (Sigma Genosys Ltd., Cambridge, UK) are listed in Table I.

Analysis of RT-qPCR data. For the primers used there were no differences between transcription efficiencies, and the fold change in each sample was calculated using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method (38). The fractional cycle at which the amount of amplified target becomes significant (Ct) was automatically calculated by the PCR program. The relative expression of β -actin was used to normalize gene expression.

Statistical analysis. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism software. The data are expressed as the means $\pm$ SEM. Statistical differences between groups

Table I. Primers used for the amplification of mRNA transcripts.

mRNA	Sequence
β-ACTIN FW	5'-TCCTGCGAGTGCTGTCAGAG-3'
β-ACTIN RV	5'-TCACCGCCCTACACATCAAAC-3'
BAX FW	5'-AACTGGACAGTAACATGGAG-3'
BAX RV	5'-TTGCTGGCAAAGTAGAAAAG-3'
BAD FW	5'-ATCATGGAGGCGCTG-3'
BAD RV	5'-CTTAAAGGAGTCCACAACTC-3'
BCL-2 FW	5'-CCTTTGGAATGGAAGCTTAG-3'
BCL-2 RV	5'-GAGGGAATGTTTTCTCCTTG-3'
CDKN1A (p21) FW	5'-CAGCATGACAGATTTCTACC-3'
CDKN1A (P21) RV	5'-CAGGGTATGTACATGAGGAG-3'
GATA3 FW	5'-CGGTCCAGCACAGGCAGGGAGT-3'
GATA3 RV	5'-GAGCCACAGGCATTGCAGACA-3'
MYC FW	5'-TGAGGAGGAACAAGAAGATG-3'
MYC RV	5'-ATCCAGACTCTGACCTTTTG-3'
MUC1 FW	5'-GCAAGAGCACTCCATTCTCAATT-3'
MUC1 RV	5'-TGGCATCAGTCTTGGTGCTATG-3'
TP53 FW	5'-CAGCCAAGTCTGTGACTTGCACGTAC-3'
TP53 RV	5'-CTATGTGCGAAAAGTGTTTCTGTCATC-3'

FW, sense (forward) primer; RV, antisense (reverse) primer.

were analyzed using one-way analysis of variance (ANOVA), followed by the Student-Newman-Keuls test. Results were considered as statistically significant at $p < 0.05$. To confirm whether the effects of docetaxel and melatonin are synergistic as regards gene expression (*BAD* and *BCL-2* expression) and apoptosis, linear regression models were obtained in order to estimate the independent effects of melatonin, docetaxel and their interaction.

Results

Effects of docetaxel and melatonin on cell proliferation and cytotoxicity. Our first goal was to determine whether melatonin potentiates the anti-proliferative effects of docetaxel in MCF-7 cells. As expected, docetaxel inhibited the proliferation of the MCF-7 cells in a dose-dependent manner. When the cells were treated with docetaxel at $1 \mu\text{M}$, proliferation was decreased by almost 80% after 3 days, indicating that the majority of the cells were dead (Fig. 1A). For this reason, we examined the effect of physiological concentrations of melatonin (1 nM) combined with low concentrations of docetaxel at 1 nM and 0.1 nM.

Consistent with previous findings of our group (1), after 6 days of treatment, melatonin alone induced an inhibitory effect on the proliferation of MCF-7 cells (Fig. 1B). Docetaxel (0.1 nM) also had a slight, but significant inhibitory effect on cell proliferation (8%), whereas docetaxel (1 nM) treatment resulted in a 62% decrease in cell viability. Of note, co-treatment of the cells with docetaxel and a physiological concentration of melatonin

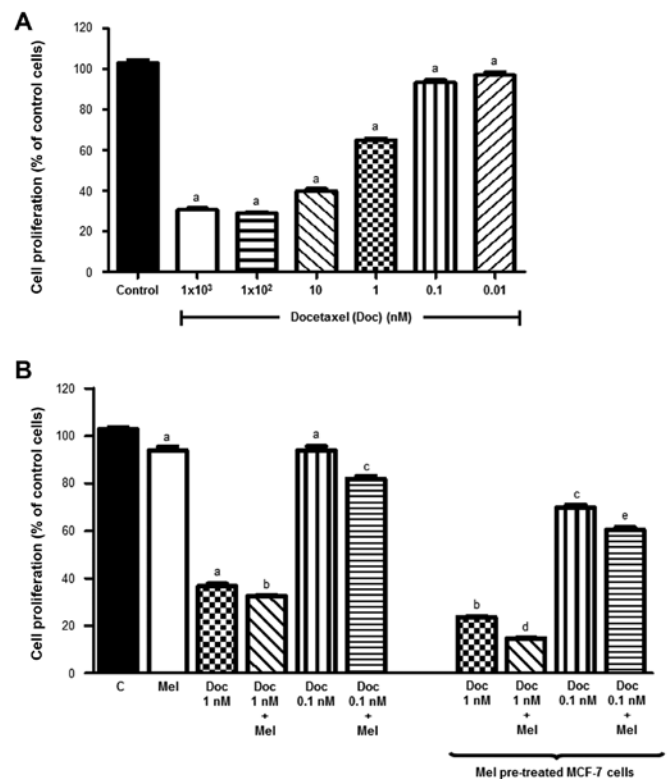


Figure 1. Effects of docetaxel and melatonin on MCF-7 cell proliferation. (A) Control (untreated) and docetaxel-treated (ranging from $1 \mu\text{M}$ to 10 pM) MCF-7 cells were seeded in 96-multi-well plates in DMEM supplemented with 10% FBS and incubated at 37°C for 3 days. Cell proliferation was then measured by MTT assay. (B) MCF-7 cells were seeded in 96-multi-well plates in DMEM supplemented with 10% FBS and docetaxel (1 nM or 0.1 nM) alone or in combination with melatonin (1 nM). Melatonin pre-treated MCF-7 cells were seeded for 24 h in DMEM supplemented with 10% FBS containing melatonin (1 nM) prior to docetaxel (1 nM or 0.1 nM) treatment. Cell proliferation was measured by MTT assay after 6 days of incubation. Data are expressed as the percentage of the control group (means $\pm$ SEM) from 4 independent experiments; ^a $p < 0.001$ vs. control; ^b $p < 0.001$ vs. docetaxel 1 nM; ^c $p < 0.001$ vs. docetaxel 0.1 nM. Doc, docetaxel; Mel, melatonin.

(1 nM) significantly potentiated the inhibitory effects on cell proliferation induced at both docetaxel concentrations. When the cancer cells were pre-treated with melatonin for 24 h, a significant further decrease in cell proliferation was obtained. For docetaxel (1 nM), a 77% decrease in cell proliferation was obtained when the cells were pre-treated with melatonin (whereas for non pre-treated cells the decrease in cell proliferation observed was 62%). For docetaxel (0.1 nM), a 27% decrease in cell proliferation was obtained when the cells were pre-treated with 1 nM melatonin, (whereas an 8% decrease was obtained in the non pre-treated cells). Moreover, significant differences were observed when melatonin was maintained in the medium following treatment with docetaxel, the effect of the indolamine being a further reduction in cell proliferation.

Effects of docetaxel and melatonin on cell cycle phase distribution. The effects of melatonin, docetaxel and co-treatment with both molecules on cell cycle phase distribution in the MCF-7 cells are shown in Fig. 2A, and the percentage of cells in the sub G_0 - G_1 , G_1 , S, and G_2 -M phases is represented in Fig. 2B. As expected, treatment of the cells with melatonin (1 nM) for 24 h induced an increase in the proportion of cells

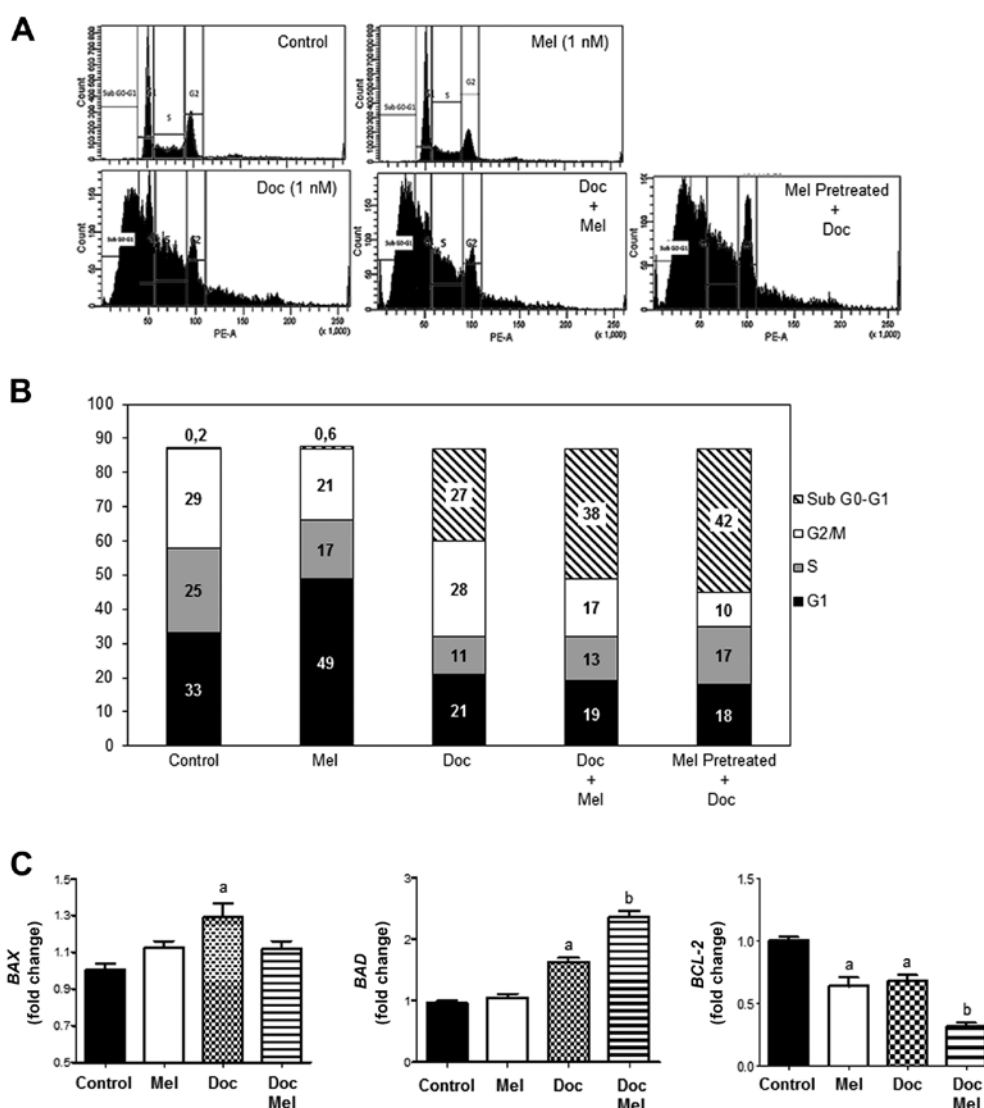


Figure 2. Effects of docetaxel and melatonin on cell cycle distribution and the expression of apoptosis-related genes in MCF-7 cells. Cells were seeded in 6-well plates in DMEM supplemented with 10% FBS containing either docetaxel (1 nM) alone or in combination with melatonin (1 nM). Melatonin pre-treatment consisted of incubation with melatonin (1 nM) for 24 h prior to the addition of docetaxel. After 24 h, the cells were harvested, stained with propidium iodide (PI) and analyzed by flow cytometry to determine the number of cells present in each phase of the cell cycle. (A) Histograms showing cell cycle distribution by flow cytometry. (B) Quantification of the number of cells present in each phase of the cell cycle, including the number of cells present in the sub-G₀-G₁ phase. (C) Effects of docetaxel (1 nM) and melatonin (1 nM) on the mRNA expression of pro-apoptotic BAX and BAD, and anti-apoptotic BCL-2. MCF-7 cells were incubated with docetaxel (1 nM), melatonin (1 nM) or both molecules for 6 h, and total mRNA was then isolated from the cells and reverse transcribed. Data are expressed as a fold change relative to the control cells (means $\pm$ SEM). All data are representative of 3 independent experiments; ^ap<0.001 vs. control; ^bp<0.001 vs. docetaxel. Doc, docetaxel; Mel, melatonin.

in the G₁ phase, thus causing a delay in the transition to the S phase. As expected, a higher number of cells in the sub G₀-G₁ phase was evident when the cells were treated with docetaxel (1 nM) for 24 h (27%). When the cells were treated with a combination of melatonin and the taxane, a significant increase in the number of cells in this phase was observed (38%). Of note, treatment with melatonin for 24 h prior to the addition of docetaxel resulted in the highest percentage of cells in the sub G₀-G₁ phase (42%), suggesting DNA fragmentation as a consequence of cell death (Fig. 2B).

We then wished to determine whether the results obtained by flow cytometric analysis correlated with the expression of genes involved in apoptosis. The mRNA expression of the pro-apoptotic genes, *BAD* and *BAX*, was stimulated, whereas the mRNA levels of the anti-apoptotic *BCL-2* gene

were significantly decreased by docetaxel (1 nM). When the cells were treated with both compounds, melatonin further enhanced the effects of the taxane on *BAD* and *BCL-2* expression. However, at this low concentration of docetaxel (together with melatonin), the pineal hormone had no significant effect on *BAX* expression. Melatonin alone induced a moderate, yet significant downregulation in the levels of *BCL-2* (Fig. 2C).

Effects of docetaxel and melatonin on cell apoptosis. To examine whether the anti-proliferative effects and the changes in the cell cycle phase distribution were related to the induction of apoptosis, we treated the MCF-7 cells with docetaxel (1 nM), alone or in combination with 1 nM melatonin for 24 h and used an Annexin V-FITC apoptosis detection kit, which enables the differentiation of viable cells from apoptotic and

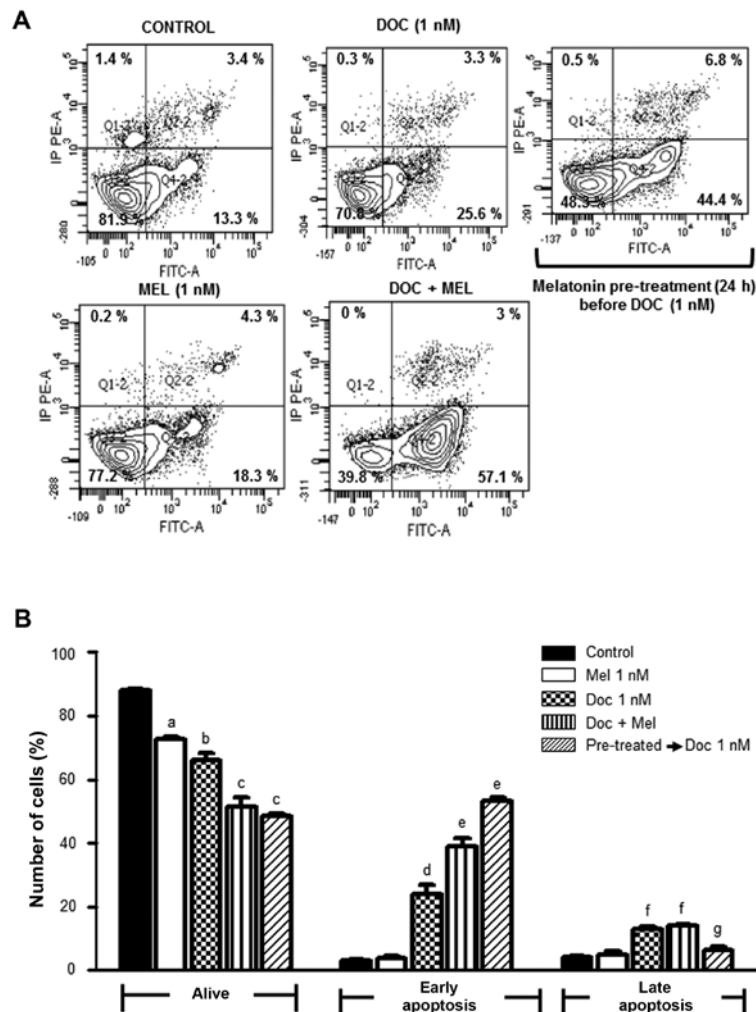


Figure 3. Potentiating effect of melatonin on the docetaxel-induced apoptosis of MCF-7 cells. MCF-7 cells were treated with docetaxel (1 nM), melatonin (1 nM) or both for 24 h. Melatonin pre-treatment consisted of incubation for 24 h with melatonin (1 nM) prior to the addition of docetaxel. Apoptosis was evaluated by the Annexin V-PI binding assay. (A) Representative dot-plots showing viable/live cells (left bottom panel, Annexin V/PI⁺), early apoptotic (right bottom panel, Annexin V⁺/PI⁺) and necrotic (left top panel, Annexin V⁺/PI⁻) cells. The number represents the percentage of cells in each condition. (B) Quantification of the number of cells in each population. Data are expressed as the means $\pm$ SEM of 3 independent experiments; ^a $p < 0.01$ vs. control (live) cells; ^b $p < 0.001$ vs. control (live) cells; ^c $p < 0.001$ vs. docetaxel alone-treated live cells; ^d $p < 0.05$ vs. control early apoptotic cells; ^e $p < 0.05$ vs. docetaxel alone-treated early apoptotic cells; ^f $p < 0.001$ vs. control late apoptotic cells; ^g $p < 0.001$ vs. docetaxel alone-treated late apoptotic cells. Doc, docetaxel; Mel, melatonin.

necrotic cells. The effects of melatonin pre-treatment for 24 h were also examined. The results of Annexin V-FITC assay are shown in Fig. 3A and the quantification of the results obtained are shown in Fig. 3B. Following treatment with melatonin alone, we observed a slight decrease in the percentage of live cells compared to the control cells. Similarly, treatment with docetaxel (1 nM) resulted in a decrease in the number of viable cells parallel to an increase in the percentage of cells undergoing early apoptosis. Of note, when the cells were simultaneously treated with docetaxel and melatonin, the number of viable cells was further decreased and the number of cells undergoing early apoptosis was augmented, suggesting that melatonin enhanced the apoptotic effects of docetaxel. Melatonin pre-treatment seemed to sensitize the MCF-7 cells to this chemotherapeutic agent, significantly further increasing the number of cells undergoing early apoptosis.

Effects of docetaxel and melatonin on gene expression. The changes in gene expression induced by chemotherapeutic

agents employed at clinical doses remain largely unknown. In this study, we employed the human breast cancer RT² Profiler PCR Array, to determine the changes induced by docetaxel (1 μ M) either alone or in combination with melatonin (1 nM) on the gene expression profiles in MCF-7 cells. The RT² Profiler PCR Array allows the simultaneous analysis of 84 genes relevant to a specific pathway or disease state and includes genes involved in one or more processes, such as angiogenesis, adhesion, proteolysis, cell cycle progression and apoptosis. Melatonin alone significantly enhanced the expression of some genes, such as *TP53*, cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (*CDKN1A*), cadherin 13 (*CDH13*) or *PGR*, whereas it diminished the expression of other genes, such as *c-MYC*, interleukin (*IL-6*) or *BCL-2* (data not shown). Establishing as criteria a change of at least 1.5-fold either with docetaxel alone or in combination with melatonin (in comparison with expression of the untreated cells), we found that treatment with docetaxel upregulated the expression of 8 genes and downregulated the expression of 36 genes. When docetaxel was used

Table II. List of the genes induced or repressed at least 1.5-fold in MCF-7 cells treated either with docetaxel (1 μ M) or docetaxel (1 μ M) + melatonin (1 nM) for 6 h.

Docetaxel	Fold regulation	Docetaxel + melatonin	Fold regulation
<i>GSTP1</i>	-7.31	<i>GSTP1</i>	-10.10
<i>PGR</i>	-6.50	<i>BIRC5</i>	-7.36
<i>KRT8</i>	-4.08	<i>TP73</i>	-5.66
<i>TP73</i>	-3.97	<i>PGR</i>	-4.89
<i>CST6</i>	-3.71	<i>CST6</i>	-3.94
<i>HIC1</i>	-3.43	<i>SFN</i>	-3.76
<i>MAPK1</i>	-2.96	<i>TWIST1</i>	-2.97
<i>PTGS2</i>	-2.85	<i>NR3C1</i>	-2.77
<i>NR3C1</i>	-2.75	<i>MUC1</i>	-2.61
<i>TP53</i>	-2.69	<i>THBS1</i>	-2.53
<i>BRCA1</i>	-2.60	<i>NME1</i>	-2.48
<i>GRB7</i>	-2.51	<i>BRCA1</i>	-2.46
<i>JUN</i>	-2.45	<i>PTGS2</i>	-2.46
<i>SRC</i>	-2.28	<i>MKI67</i>	-2.41
<i>CDK2</i>	-2.23	<i>RB1</i>	-2.33
<i>SFN</i>	-2.23	<i>GATA3</i>	-2.28
<i>TWIST1</i>	-2.22	<i>SERPINE1</i>	-2.15
<i>THBS1</i>	-2.17	<i>KRT8</i>	-2.08
<i>FOXA1</i>	-2.14	<i>MYC</i>	-2.06
<i>VEGFA</i>	-1.96	<i>KRT18</i>	-2.03
<i>RB1</i>	-1.95	<i>MAPK1</i>	-1.96
<i>NME1</i>	-1.87	<i>IL6</i>	-1.95
<i>TGFB1</i>	-1.87	<i>JUN</i>	-1.82
<i>CDKN1C</i>	-1.84	<i>ABCB1</i>	-1.79
<i>RARB</i>	-1.83	<i>KRT19</i>	-1.79
<i>SLIT2</i>	-1.80	<i>VEGFA</i>	-1.75
<i>RASSF1</i>	-1.79	<i>AKT1</i>	-1.74
<i>CDKN1A</i>	-1.75	<i>BCL-2</i>	-1.65
<i>CTNNB1</i>	-1.70	<i>BRCA2</i>	-1.52
<i>CDH13</i>	-1.69	<i>IGF1R</i>	1.55
<i>CDKN2A</i>	-1.69	<i>CCNA1</i>	1.60
<i>CSF1</i>	-1.68	<i>TP53</i>	1.86
<i>KRT5</i>	-1.67	<i>ID1</i>	1.88
<i>SFRP1</i>	-1.65	<i>CCND1</i>	1.95
<i>XPB1</i>	-1.61	<i>ATM</i>	2.04
<i>KRT18</i>	-1.54	<i>IGFBP3</i>	2.14
<i>ESR2</i>	1.69	<i>CDKN1A</i>	2.17
<i>ID1</i>	1.71	<i>APC</i>	2.55
<i>SNAI2</i>	1.77	<i>EGF</i>	2.71
<i>GATA3</i>	1.91	<i>BAD</i>	2.83
<i>MUC1</i>	1.92	<i>CCND2</i>	3.29
<i>GLI1</i>	2.00	<i>CDH13</i>	5.35
<i>MYC</i>	2.17	<i>SNAI2</i>	5.86
<i>CCNA1</i>	2.43	<i>IGF1</i>	8.86

in combination with melatonin, we observed the upregulation of 15 genes and the downregulation of 29 genes (Table II). *TP53*, *BAD* and *CDKN1A* were upregulated >3-fold and mucin

1 (*MUC1*), *BCL-2* and *c-MYC* were downregulated >3-fold (Fig. 4A). The following genes were selected for further analysis by specific RT-qPCR: *TP53* and *CDKN1A* as cell cycle regulators, and *BAD* and *BCL-2* as genes involved in apoptosis. Docetaxel (1 μ M) significantly inhibited the expression of *TP53* and *CDKN1A* (Fig. 4B), and treatment with melatonin (1 nM) counteracted this inhibitory effect. The expression of the pro-apoptotic gene *BAD* was stimulated by docetaxel and co-treatment with melatonin further increased its expression, whereas the expression of the anti-apoptotic *BCL-2* gene was significantly decreased. Treatment with melatonin enhanced this inhibitory effect (Fig. 4C). We analyzed the expression of *BAX*, another pro-apoptotic member of the family; similar to *BAD*, *BAX* expression was stimulated by docetaxel and melatonin enhanced this stimulatory effect (Fig. 4C).

Among the genes classified as transcription factors or involved in angiogenesis and/or cell adhesion, *MUC1*, GATA binding protein 3 (*GATA3*) and *c-MYC* were downregulated (>3-fold), and *TP53* and *CDH13* were upregulated (>4-fold) when the cells were treated simultaneously with melatonin and docetaxel in comparison with the cells treated only with the taxane (Fig. 5A). Specific RT-PCR analyses confirmed that docetaxel (1 μ M) stimulated the expression of the transcription factors, *MUC1*, *GATA3* and *c-MYC*, whereas a physiological concentration of melatonin counteracted this stimulatory effect of the chemotherapeutic agent (Fig. 5B). The expression of *CDH13* (involved in angiogenesis) was inhibited by docetaxel and melatonin reversed this effect (Fig. 5C).

Discussion

In patients diagnosed with locally advanced breast cancer and a positive estrogen receptor status, chemotherapy is often recommended when cancer spreads outside the breast and axillary area. Several chemotherapy protocols for breast cancer include docetaxel, a mitotic inhibitor acting as a spindle poison (39).

Apart from undesirable side-effects, the molecular changes induced by chemotherapy in cancer cells remain largely unknown. The identification of such alterations may contribute to an improved efficacy and may help to elucidate the mechanisms responsible for undesirable processes, such as drug resistance. Gene expression and post-translational modification profiles have recently been obtained in all types of tumors and cancer cell lines treated with chemotherapeutic drugs (25,40).

Melatonin has oncostatic actions, counteracting the estrogen-mediated activation and modulating the expression and activity of enzymes involved in the synthesis of estrogens (2,6,41-43). Melatonin treatment sensitizes MCF-7 cells to radiation, decreasing cell proliferation, increasing the proportion of cells in the G₀-G₁ phase of the cell cycle and downregulating the expression of proteins implicated in double-strand DNA break repair (12). Melatonin regulates global gene expression in human breast cancer cells (36). However, the molecular mechanisms through which melatonin modulates changes in gene expression, cell proliferation and cell cycle progression triggered by chemotherapeutic drugs in estrogen-responsive breast tumors remain largely unknown.

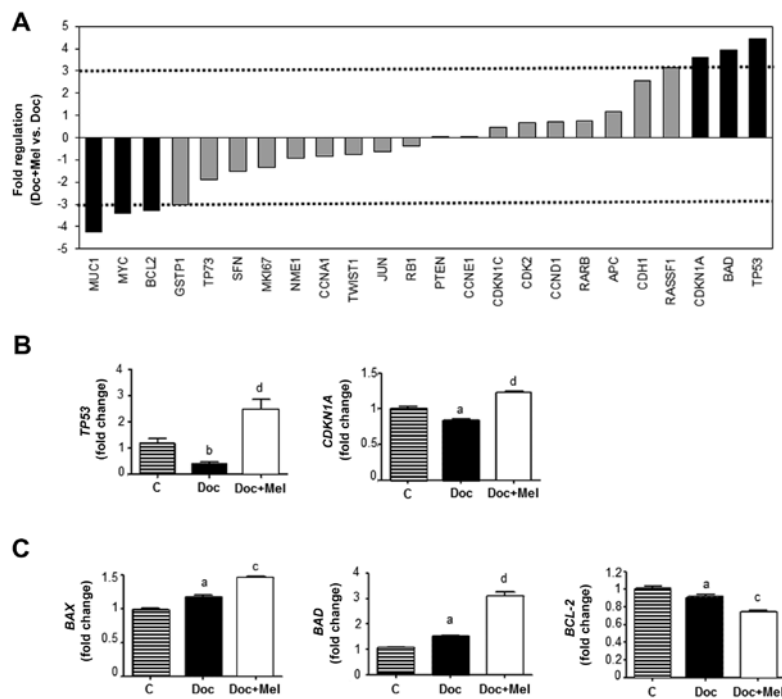


Figure 4. Comparison of the changes in fold regulation of genes involved in apoptosis and cell cycle in MCF-7 cells treated with docetaxel or docetaxel + melatonin. (A) PCR data from the RT² PCR Array. MCF-7 cells were treated for 6 h with docetaxel (1 μ M) alone or in combination with melatonin (1 nM) and total RNA was isolated from the cells and reverse transcribed. The cDNA were used to perform the RT² PCR Array. Data are expressed as the (Doc + Mel)-induced fold regulation relative to docetaxel treatment alone. Genes that showed a >3-fold difference in expression (black bars) were selected for validation by specific RT-qPCR. (B) RT-qPCR analysis of the cell cycle-related genes, *TP53* and *CDKN1A*. (C) RT-qPCR analysis of the apoptosis-related genes, *BAX*, *BAD* and *BCL-2*. All data are expressed as fold changes relative to the control cells (means $\pm$ SEM) from 3 independent experiments; ^a*p*<0.05 vs. control; ^b*p*<0.001 vs. control; ^c*p*<0.01 vs. docetaxel; ^d*p*<0.001 vs. docetaxel. Doc, docetaxel; Mel, melatonin.

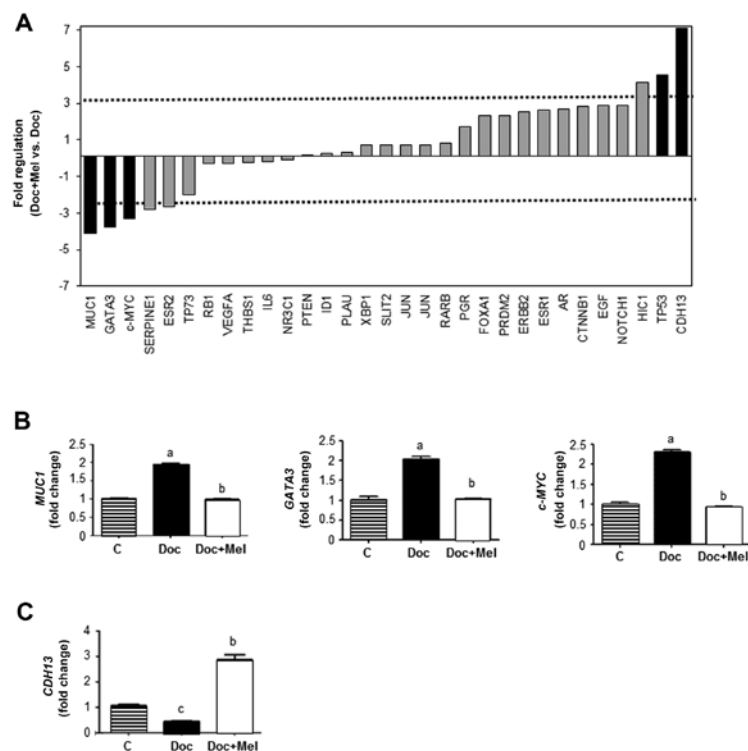


Figure 5. Comparison of the changes in fold regulation of genes encoding transcription factors and angiogenesis in MCF-7 cells. (A) PCR array data. MCF-7 cells were treated for 6 h with docetaxel (1 μ M), alone or in combination with melatonin (1 nM) and total RNA was isolated from the cells and reverse transcribed. cDNA were used to perform the RT² PCR array. Data are expressed as the (Doc + Mel)-induced fold regulation relative to docetaxel treatment alone. Genes that showed a >3-fold difference in expression (black bars) were selected for validation by specific RT-qPCR. (B) RT-qPCR analysis of the mRNA expression levels of the transcription factors, *MUC1*, *GATA3* and *c-MYC*. (C) RT-qPCR analysis of the mRNA expression levels of the cell adhesion molecule, *CDH13*. Data are expressed as fold changes relative to the control cells (means $\pm$ SEM) from 3 independent experiments; ^a*p*<0.001 vs. control; ^b*p*<0.001 vs. docetaxel; ^c*p*<0.01 vs. control. Doc, docetaxel; Mel, melatonin.

Therefore, in the present study, we examined the effects of the combination of docetaxel and melatonin using MCF-7 cells as a model.

Since MCF-7 cells are very sensitive to concentrations of docetaxel in the range of those used in chemotherapy protocols, we decided to test low concentrations of the taxane (1 nM and 0.1 nM) to examine the effects of melatonin combined with the chemotherapeutic agent on cell proliferation. Our results strongly suggested that the combination of melatonin and low doses of docetaxel resulted in the cooperative enhancement of cytotoxicity. Of note, treatment of the cells with melatonin prior to docetaxel treatment resulted in a higher inhibition of cell proliferation. These results point to melatonin as an enhancer of the anti-proliferative effects of docetaxel when the taxane is administered at lower doses than those administered to cancer patients.

We then analysed the changes that melatonin and docetaxel cause on the cell cycle. As previously reported (44), melatonin induces cell cycle arrest in the G₁ phase. Low concentrations of docetaxel induced a higher proportion of cells in the sub G₀-G₁ phase and of note, co-treatment with melatonin significantly increased the number of cells in the sub G₀-G₁ phase, indicating that melatonin potentiated the effects of docetaxel. Low concentrations of docetaxel decreased the number of viable/live cells and increased the percentage of cells undergoing early apoptosis. Melatonin enhanced this effect, more potently when added prior to treatment with the taxane. Our results are in agreement with those of a recent study reporting that melatonin induced cell inhibition and the apoptosis of MCF-7 cells through an increase in p53 acetylation and the inhibition of Akt/PI3K, modulating the MDM2/MDMX/p300 pathway (45). Finally, we examine the expression of the apoptosis-related genes, *BAD*, *BAX* and *BCL-2*, and found that melatonin potentiated the stimulatory effects of docetaxel on the expression of *BAD*, and provoked a strong inhibition of the expression of *BCL-2*. Thus, physiological concentrations of melatonin potentiated the cytotoxic effects of low concentrations of docetaxel, which may allow the therapeutic concentrations of anticancer drugs to be reduced.

In breast cancer patients, docetaxel is administered in doses oscillating from 75-200 mg/m² every 3 weeks, roughly equivalent to concentrations of 1 μ M in breast cancer cells in culture medium. For this reason, we then examined the changes in gene expression profiles when the MCF-7 cells were treated with docetaxel (1 μ M), and found that 8 genes were upregulated and 36 were downregulated by at least 1.5-fold. When docetaxel and melatonin were simultaneously added to the culture medium, 15 genes were upregulated and 29 downregulated by at least 1.5-fold. We further analyzed the expression of 9 genes involved in cell cycle progression (*TP53* and *CDKN1A*) angiogenesis (*CDH13*), apoptosis (*BAX*, *BAD* and *BCL-2*), and gene transcription (*GATA3*, *MUC1* and *c-MYC*). The genome guardian p53 maintains genome stability (46), and the expression of p53 and p21WAF1 is reduced in locally advanced breast cancer patients receiving neoadjuvant docetaxel plus epirubicin (47). The induction of p53 and p21WAF1 by melatonin has been suggested as part of the mechanism through which melatonin inhibits the proliferation of breast cancer cells (48). In the present study, docetaxel decreased the expression of *TP53*, *CDKN1A*, two

key regulators of cell cycle. An intact p53 predicts sensitivity to breast cancer therapy and higher levels of p21 indicate a more indolent type of breast cancer (49). In our hands, docetaxel also decreased the expression of *CDH13*, the loss of which has been shown to be associated with tumor malignancy, invasiveness and metastasis (50). Of note, melatonin counteracted the negative effect of docetaxel, increasing the expression of these 3 genes, considered as tumor suppressors with a key role in cell cycle control and tumor progression.

BAX and *BAD* are pro-apoptotic and *BCL-2* is an anti-apoptotic factor classified as an oncogene (51). *BAD* neutralizes anti-apoptotic *BCL-2* members, which in turn, modulate the intrinsic apoptotic pathway by binding and neutralizing other proteins that act as mitochondrial permeabilizers, such as the pro-apoptotic protein, *BAX* (52). *BAX* expression is upregulated by p53 and *BAX* is involved in p53-mediated apoptosis. *BAD* (*BCL-2*-associated death promoter) is a pro-apoptotic member of the *BCL-2* gene family involved in the initiation of apoptosis. *BAD* forms heterodimers with anti-apoptotic proteins (such as *BCL-2*) inactivating them, allowing for *BAX*-triggered apoptosis (51). Docetaxel has been reported to both stimulate and inhibit the apoptosis of human melanoma (53), whereas in MCF-7 cells, nanomolar concentrations of docetaxel have been shown to induce apoptosis likely through the phosphorylation of *BCL-2* (54). In this study, we found that treatment with docetaxel (1 μ M) significantly increased the expression of *BAX* and *BAD*, and decreased the levels of *BCL-2*. Importantly, melatonin potentiated the stimulatory effects of docetaxel on the expression of the pro-apoptotic genes, *BAX* and *BAD*, and further inhibited the expression of the anti-apoptotic gene, *BCL-2*. Our results strongly suggest that melatonin potentiates the pro-apoptotic effects of docetaxel in breast cancer cells by modulating the expression of the *BAX*, *BAD* and *BCL-2* genes.

GATA3 is a transcription factor differentially expressed in breast cancer (55). *GATA3* mediates the transcriptional upregulation of *MUC1* (56). *MUC1* expression has been found in plasma cells of patients with lymph node metastasis or micro-metastasis (57). *c-MYC* is a classical oncogene that is mutated, translocated or overexpressed in many types of tumors and is upregulated by estradiol in MCF-7 cells, whereas melatonin abolishes this effect almost completely (58). Melatonin, in combination with arsenic trioxide, has been shown to stimulate apoptosis by increasing p53 protein levels, increasing the ratio of *BAX/BCL-2* and suppressing survivin-mediated *c-MYC* and *hTERT* expression (44). In this study, we found that docetaxel induced the expression of *GATA3*, *MUC1* and *c-MYC*, whereas melatonin counteracted the stimulatory effects of this chemotherapeutic agent. Again, melatonin seemed to exert a protective effect, since the inhibition of the expression of *MUC1*, *GATA3* and the proto-oncogene, *c-MYC*, may well correlate with both lower levels of the expression of factors involved in cellular growth and a less aggressive invasion phenotype.

In conclusion, our results point once more to melatonin as a useful molecule with a potential to be considered as an adjuvant in breast cancer therapy. Since the nocturnal increase in plasma melatonin is much lower in patients with estrogen-positive breast cancer than in healthy women (59), the administration of melatonin at physiological doses may compensate this deficit of

melatonin in these patients. We report herein that the concomitant use of melatonin and docetaxel sensitizes human breast cancer cells to the chemotherapeutic agent. When docetaxel is used at low concentrations, combinations of melatonin plus docetaxel have a synergistic effect in arresting cell proliferation and inducing the apoptosis in MCF-7 cells. Melatonin also modulates changes in gene expression induced by docetaxel at higher concentrations (equivalent to the docetaxel dose in chemotherapy protocols). Our results suggest that patients receiving docetaxel as part of their chemotherapy treatment may benefit in the next future with a co-treatment with melatonin as an adjuvant agent, allowing for a reduction in the dose of the chemotherapeutic agent administered, which may result in better tolerance and less adverse effects. The efficacy of melatonin when administered together with chemotherapy has been tested in several trials; however, to date, at least to the best of our knowledge, it has never been tested in combination with docetaxel. Our results indicate that it may be worthy to perform randomized, double blind, placebo-controlled trials in the near future in breast cancer patients to clarify the efficacy of this association.

Acknowledgements

The present study was supported by grants from the Spanish Science Technology and Innovation Ministry (grant no. SAF2016-77103-P) and the Research Institute Valdecilla (grant no. APG/12).

References

1. Cos S, Martínez-Campa C, Mediavilla MD and Sánchez-Barceló EJ: Melatonin modulates aromatase activity in MCF-7 human breast cancer cells. *J Pineal Res* 38: 136-142, 2005.
2. Cos S, González A, Martínez-Campa C, Mediavilla MD, Alonso-González C and Sánchez-Barceló EJ: Melatonin as a selective estrogen enzyme modulator. *Curr Cancer Drug Targets* 8: 691-702, 2008.
3. Cos S, González A, Güezmes A, Mediavilla MD, Martínez-Campa C, Alonso-González C and Sánchez-Barceló EJ: Melatonin inhibits the growth of DMBA-induced mammary tumors by decreasing the local biosynthesis of estrogens through the modulation of aromatase activity. *Int J Cancer* 118: 274-278, 2006.
4. Rato AG, Pedrero JG, Martínez MA, del Río B, Lazo PS and Ramos S: Melatonin blocks the activation of estrogen receptor for DNA binding. *FASEB J* 13: 857-868, 1999.
5. Bouhoute A and Leclercq G: Calmodulin decreases the estrogen binding capacity of the estrogen receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 227: 651-657, 1996.
6. del Río B, García Pedrero JM, Martínez-Campa C, Zuazua P, Lazo PS and Ramos S: Melatonin, an endogenous-specific inhibitor of estrogen receptor alpha via calmodulin. *J Biol Chem* 279: 38294-38302, 2004.
7. Aronica SM, Kraus WL and Katzenellenbogen BS: Estrogen action via the cAMP signaling pathway: Stimulation of adenylate cyclase and cAMP-regulated gene transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 8517-8521, 1994.
8. Godson C and Reppert SM: The Mela melatonin receptor is coupled to parallel signal transduction pathways. *Endocrinology* 138: 397-404, 1997.
9. Cos S and Blask DE: Melatonin modulates growth factor activity in MCF-7 human breast cancer cells. *J Pineal Res* 17: 25-32, 1994.
10. Molis TM, Spriggs LL, Jupiter Y and Hill SM: Melatonin modulation of estrogen-regulated proteins, growth factors, and proto-oncogenes in human breast cancer. *J Pineal Res* 18: 93-103, 1995.
11. Cos S, Blask DE, Lemus-Wilson A and Hill AB: Effects of melatonin on the cell cycle kinetics and 'estrogen-rescue' of MCF-7 human breast cancer cells in culture. *J Pineal Res* 10: 36-42, 1991.
12. Alonso-González C, González A, Martínez-Campa C, Menéndez-Menéndez J, Gómez-Arozamena J, García-Vidal A and Cos S: Melatonin enhancement of the radiosensitivity of human breast cancer cells is associated with the modulation of proteins involved in estrogen biosynthesis. *Cancer Lett* 370: 145-152, 2016.
13. Leon-Blanco MM, Guerrero JM, Reiter RJ, Calvo JR and Pozo D: Melatonin inhibits telomerase activity in the MCF-7 tumor cell line both in vivo and in vitro. *J Pineal Res* 35: 204-211, 2003.
14. Martínez-Campa CM, Alonso-González C, Mediavilla MD, Cos S, González A and Sánchez-Barceló EJ: Melatonin down-regulates hTERT expression induced by either natural estrogens (17beta-estradiol) or metalloestrogens (cadmium) in MCF-7 human breast cancer cells. *Cancer Lett* 268: 272-277, 2008.
15. Cos S, Fernández R, Güezmes A and Sánchez-Barceló EJ: Influence of melatonin on invasive and metastatic properties of MCF-7 human breast cancer cells. *Cancer Res* 58: 4383-4390, 1998.
16. González A, Alvarez-García V, Martínez-Campa C, Alonso-González C and Cos S: Melatonin promotes differentiation of 3T3-L1 fibroblasts. *J Pineal Res* 52: 12-20, 2012.
17. Alvarez-García V, González A, Alonso-González C, Martínez-Campa C and Cos S: Melatonin interferes in the desmoplastic reaction in breast cancer by regulating cytokine production. *J Pineal Res* 52: 282-290, 2012.
18. Alvarez-García V, González A, Martínez-Campa C, Alonso-González C and Cos S: Melatonin modulates aromatase activity and expression in endothelial cells. *Oncol Rep* 29: 2058-2064, 2013.
19. Lissoni P, Barni S, Mandalà M, Ardizzoia A, Paolorossi F, Vaghi M, Longarini R, Malugani F and Tancini G: Decreased toxicity and increased efficacy of cancer chemotherapy using the pineal hormone melatonin in metastatic solid tumour patients with poor clinical status. *Eur J Cancer* 35: 1688-1692, 1999.
20. Lissoni P, Chillelli M, Villa S, Cerizza L and Tancini G: Five years survival in metastatic non-small cell lung cancer patients treated with chemotherapy alone or chemotherapy and melatonin: A randomized trial. *J Pineal Res* 35: 12-15, 2003.
21. Sookprasert A, Johns NP, Phunmanee A, Pongthai P, Cheawchanwattana A, Johns J, Konsil J, Plaimee P, Porasuphatana S and Jitpimolmard S: Melatonin in patients with cancer receiving chemotherapy: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Anticancer Res* 34: 7327-7337, 2014.
22. Seely D, Wu P, Fritz H, Kennedy DA, Tsui T, Seely AJ and Mills E: Melatonin as adjuvant cancer care with and without chemotherapy: A systematic review and meta-analysis of randomized trials. *Integr Cancer Ther* 11: 293-303, 2012.
23. Wang YM, Jin BZ, Ai F, Duan CH, Lu YZ, Dong TF and Fu QL: The efficacy and safety of melatonin in concurrent chemotherapy or radiotherapy for solid tumors: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Cancer Chemother Pharmacol* 69: 1213-1220, 2012.
24. Reiter RJ, Rosales-Corral SA, Tan DX, Acuña-Castroviejo D, Qin L, Yang SF and Xu K: Melatonin, a full service anti-cancer agent: Inhibition of initiation, progression and metastasis. *Int J Mol Sci* 18: E843, 2017.
25. Martínez-Campa C, Menéndez-Menéndez J, Alonso-González C, González A, Álvarez-García V and Cos S: What is known about melatonin, chemotherapy and altered gene expression in breast cancer (Review). *Oncol Lett* 13: 2003-2014, 2017.
26. Xiang S, Dauchy RT, Hauch A, Mao L, Yuan L, Wren MA, Belancio VP, Mondal D, Frasch T, Blask DE, *et al*: Doxorubicin resistance in breast cancer is driven by light at night-induced disruption of the circadian melatonin signal. *J Pineal Res* 59: 60-69, 2015.
27. Granzotto M, Rapozzi V, Decorti G and Giraldo T: Effects of melatonin on doxorubicin cytotoxicity in sensitive and pleiotropically resistant tumor cells. *J Pineal Res* 31: 206-213, 2001.
28. Woo SM, Min KJ and Kwon TK: Melatonin-mediated Bim up-regulation and cyclooxygenase-2 (COX-2) down-regulation enhances tunicamycin-induced apoptosis in MDA-MB-231 cells. *J Pineal Res* 58: 310-320, 2015.
29. Yun M, Kim EO, Lee D, Kim JH, Kim J, Lee H, Lee J and Kim SH: Melatonin sensitizes H1975 non-small-cell lung cancer cells harboring a T790M-targeted epidermal growth factor receptor mutation to the tyrosine kinase inhibitor gefitinib. *Cell Physiol Biochem* 34: 865-872, 2014.
30. Plaimee P, Weerapreeyakul N, Barusrux S and Johns NP: Melatonin potentiates cisplatin-induced apoptosis and cell cycle arrest in human lung adenocarcinoma cells. *Cell Prolif* 48: 67-77, 2015.

31. Pariente R, Pariente JA, Rodríguez AB and Espino J: Melatonin sensitizes human cervical cancer HeLa cells to cisplatin-induced cytotoxicity and apoptosis: Effects on oxidative stress and DNA fragmentation. *J Pineal Res* 60: 55-64, 2016.
32. Uguz AC, Cig B, Espino J, Bejarano I, Naziroglu M, Rodríguez AB and Pariente JA: Melatonin potentiates chemotherapy-induced cytotoxicity and apoptosis in rat pancreatic tumor cells. *J Pineal Res* 53: 91-98, 2012.
33. Ma C, Li LX, Zhang Y, Xiang C, Ma T, Ma ZQ and Zhang ZP: Protective and sensitive effects of melatonin combined with adriamycin on ER⁺ (estrogen receptor) breast cancer. *Eur J Gynaecol Oncol* 36: 197-202, 2015.
34. Koşar PA, Naziroğlu M, Övey IS and Çiğ B: Synergic effects of doxorubicin and melatonin on apoptosis and mitochondrial oxidative stress in MCF-7 breast cancer cells: Involvement of TRPV1 channels. *J Membr Biol* 249: 129-140, 2016.
35. Rodríguez-García A, Mayo JC, Hevia D, Quirós-González I, Navarro M and Sainz RM: Phenotypic changes caused by melatonin increased sensitivity of prostate cancer cells to cytokine-induced apoptosis. *J Pineal Res* 54: 33-45, 2013.
36. Lee SE, Kim SJ, Youn JP, Hwang SY, Park CS and Park YS: MicroRNA and gene expression analysis of melatonin-exposed human breast cancer cell lines indicating involvement of the anticancer effect. *J Pineal Res* 51: 345-352, 2011.
37. Mosmann T: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65: 55-63, 1983.
38. Livak KJ and Schmittgen TD: Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25: 402-408, 2001.
39. Iwao-Koizumi K, Matoba R, Ueno N, Kim SJ, Ando A, Miyoshi Y, Maeda E, Noguchi S and Kato K: Prediction of docetaxel response in human breast cancer by gene expression profiling. *J Clin Oncol* 23: 422-431, 2005.
40. Lumachi F, Chiara GB, Foltran L and Basso SM: Proteomics as a guide for personalized adjuvant chemotherapy in patients with early breast cancer. *Cancer Genomics Proteomics* 12: 385-390, 2015.
41. Kiefer T, Ram PT, Yuan L and Hill SM: Melatonin inhibits estrogen receptor transactivation and cAMP levels in breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 71: 37-45, 2002.
42. González A, Cos S, Martínez-Campa C, Alonso-González C, Sánchez-Mateos S, Mediavilla MD and Sánchez-Barceló EJ: Selective estrogen enzyme modulator actions of melatonin in human breast cancer cells. *J Pineal Res* 45: 86-92, 2008.
43. Vriend J and Reiter RJ: Breast cancer cells: Modulation by melatonin and the ubiquitin-proteasome system - a review. *Mol Cell Endocrinol* 417: 1-9, 2015.
44. Nooshinfar E, Bashash D, Safaroghli-Azar A, Bayati S, Rezaei-Tavirani M, Ghaffari SH and Akbari ME: Melatonin promotes ATO-induced apoptosis in MCF-7 cells: Proposing novel therapeutic potential for breast cancer. *Biomed Pharmacother* 83: 456-465, 2016.
45. Proietti S, Cucina A, Dobrowolny G, D'Anselmi F, Dinicola S, Masiello MG, Pasqualato A, Palombo A, Morini V, Reiter RJ, et al: Melatonin down-regulates MDM2 gene expression and enhances p53 acetylation in MCF-7 cells. *J Pineal Res* 57: 120-129, 2014.
46. Berger C, Qian Y and Chen X: The p53-estrogen receptor loop in cancer. *Curr Mol Med* 13: 1229-1240, 2013.
47. Tiezzi DG, Andrade JM, Ribeiro-Silva A, Zola FE, Marana HR and Tiezzi MG: HER-2, p53, p21 and hormonal receptors proteins expression as predictive factors of response and prognosis in locally advanced breast cancer treated with neoadjuvant docetaxel plus epirubicin combination. *BMC Cancer* 7: 36-46, 2007.
48. Mediavilla MD, Cos S and Sánchez-Barceló EJ: Melatonin increases p53 and p21WAF1 expression in MCF-7 human breast cancer cells in vitro. *Life Sci* 65: 415-420, 1999.
49. Elledge RM and Allred DC: Prognostic and predictive value of p53 and p21 in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 52: 79-98, 1998.
50. Moelans CB, Verschuur-Maes AH and van Diest PJ: Frequent promoter hypermethylation of BRCA2, CDH13, MSH6, PAX5, PAX6 and WT1 in ductal carcinoma in situ and invasive breast cancer. *J Pathol* 225: 222-231, 2011.
51. Tudor G, Aguilera A, Halverson DO, Laing ND and Sausville EA: Susceptibility to drug-induced apoptosis correlates with differential modulation of Bad, Bcl-2 and Bcl-xL protein levels. *Cell Death Differ* 7: 574-586, 2000.
52. Correia C, Lee SH, Meng XW, Vincelette ND, Knorr KL, Ding H, Nowakowski GS, Dai H and Kaufmann SH: Emerging understanding of Bcl-2 biology: Implications for neoplastic progression and treatment. *Biochim Biophys Acta* 1853: 1658-1671, 2015.
53. Mhaidat NM, Zhang XD, Jiang CC and Hersey P: Docetaxel-induced apoptosis of human melanoma is mediated by activation of c-Jun NH2-terminal kinase and inhibited by the mitogen-activated protein kinase extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathway. *Clin Cancer Res* 13: 1308-1314, 2007.
54. Berchem GJ, Bosseler M, Mine N and Avalosse B: Nanomolar range docetaxel treatment sensitizes MCF-7 cells to chemotherapy induced apoptosis, induces G2M arrest and phosphorylates bcl-2. *Anticancer Res* 19A: 535-540, 1999.
55. Zang H, Li N, Pan Y and Hao J: Identification of upstream transcription factors (TFs) for expression signature genes in breast cancer. *Gynecol Endocrinol* 33: 193-198, 2017.
56. Abba MC, Nunez MI, Colussi AG, Croce MV, Segal-Eiras A and Aldaz CM: GATA3 protein as a MUC1 transcriptional regulator in breast cancer cells. *Breast Cancer Res* 8: R64, 2006.
57. Puttipanyalears C, Kitkumthorn N, Buranapraditkun S, Keelawat S and Mutirangura A: Breast cancer upregulating genes in stromal cells by LINE-1 hypermethylation and micro-metastatic detection. *Epigenomics* 8: 475-486, 2016.
58. Girgert R, Hanf V, Emons G and Gründker C: Membrane-bound melatonin receptor MT1 down-regulates estrogen responsive genes in breast cancer cells. *J Pineal Res* 47: 23-31, 2009.
59. Tamarkin L, Danforth D, Lichter A, DeMoss E, Cohen M, Chabner B and Lippman M: Decreased nocturnal plasma melatonin peak in patients with estrogen receptor positive breast cancer. *Science* 216: 1003-1005, 1982.

Review Article

Melatonin: An Anti-Tumor Agent in Hormone-Dependent Cancers

Javier Menéndez-Menéndez and Carlos Martínez-Campa 

Department of Physiology and Pharmacology, School of Medicine, University of Cantabria and Instituto de Investigación Valdecilla (IDIVAL), 39011 Santander, Spain

Correspondence should be addressed to Carlos Martínez-Campa; martinezc@unican.es

Received 11 June 2018; Revised 30 July 2018; Accepted 12 August 2018; Published 2 October 2018

Academic Editor: Dario Acuña-Castroviejo

Copyright © 2018 Javier Menéndez-Menéndez and Carlos Martínez-Campa. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Melatonin (N-acetyl-5-methoxytryptamine) is a hormone synthesized and secreted by the pineal gland mainly during the night, since light exposure suppresses its production. Initially, an implication of this indoleamine in malignant disease was described in endocrine-responsive breast cancer. Data from several clinical trials and multiple experimental studies performed both *in vivo* and *in vitro* have documented that the pineal hormone inhibits endocrine-dependent mammary tumors by interfering with the estrogen signaling-mediated transcription, therefore behaving as a selective estrogen receptor modulator (SERM). Additionally, melatonin regulates the production of estradiol through the control of the enzymes involved in its synthesis, acting as a selective estrogen enzyme modulator (SEEM). Many more mechanisms have been proposed during the past few years, including signaling triggered after activation of the membrane melatonin receptors MT-1 and MT-2, or else intracellular actions targeting molecules such as calmodulin, or binding intranuclear receptors. Similar results have been obtained in prostate (regulation of enzymes involved in androgen synthesis and modulation of androgen receptor levels and activity) and ovary cancer. Thus, tumor metabolism, gene expression, or epigenetic modifications are modulated, cell growth is impaired and angiogenesis and metastasis are inhibited. In the last decade, many more reports have demonstrated that melatonin is a promising adjuvant molecule with many potential beneficial consequences when included in chemotherapy or radiotherapy protocols designed to treat endocrine-responsive tumors. Therefore, in this state-of-the-art review, we aim to compile the knowledge about the oncostatic actions of the indoleamine in hormone-dependent tumors, and the latest findings concerning melatonin actions when administered in combination with radio- or chemotherapy in breast, prostate, and ovary cancers. As melatonin has no toxicity, it may be well deserve to be considered as an endogenously generated agent helpful in cancer prevention and treatment.

1. Introduction

It was in 1958 when Lerner et al. reported the isolation and identification of a substance from the pineal gland from beef [1]. This new molecule, a derivative of tryptophan, is an indoleamine (N-acetyl-5-methoxytryptamine) that was called melatonin, name derived from its effect in blanching the melanophores (mela-) in amphibians and because the precursor to melatonin is serotonin (-tonin).

Melatonin is a hormone mainly secreted during the night, and, since its discovery, many physiological functions have been attributed to this indoleamine, which is a

pleiotropic molecule that acts as a hormone in mammals. We can highlight among its functions: (i) the control of the seasonal reproduction [2]. (ii) The ability to reduce the oxidative stress either by direct detoxification or indirectly (inhibiting the activity of prooxidative enzymes and stimulating antioxidant enzymes) [3]. (iii) The effect on the immune system by enhancing both natural and acquired immunity in mammals [4]. (iv) Its function as a circadian rhythm synchronizer of the sleep-wake cycle acting as a physiological sleep regulator [5]. (v) The ability to prevent cancer, an inhibitory effect involving both membrane receptor-dependent and independent mechanisms at the

initiation, promotion, progression, and malignant metastasis phases [6–8].

More than eighty percent of the works trying to elucidate the implications of melatonin in cancer have been published in the recent two decades, which highlights the importance of this field of research. The role of melatonin has been extensively investigated in many different neoplasias, and there is growing evidence that the pineal hormone is associated with a lower risk of cancer as demonstrated in different *in vivo* and *in vitro* models [6, 9].

Most of the anticancer effects of melatonin were initially described on endocrine mammary tumor models. However, hundreds of recent reports demonstrate an anticancer effect of the pineal hormone on many other kinds of cancers. Therefore, the main objective of this review is to compile the state-of-the-art of the current knowledge about melatonin oncostatic effects on estrogen-dependent breast and ovarian cancers and in androgen-dependent prostate cancer. We will pay special attention to the intracellular signaling pathways that are usually altered after melatonin addition, particularly when it is coadministered either with conventional chemotherapeutic drugs or with radiotherapy.

2. Melatonin and Hormone-Dependent Breast Cancer

Breast development at puberty and during sexual maturity is stimulated by estradiol, which is the most physiologically active hormone in breast tissues. However, estrogens contribute to mammary tumor initiation and progression. According to the American Cancer Society, more than 70% of newly diagnosed cases of breast cancer are at their initial stages hormone-dependent [10], playing estrogens a crucial role in tumor genesis and progression. In this situation, estrogen receptor alpha is usually overexpressed. We refer to this class of tumors as hormone receptor-positive breast cancer. Since 1896, when Beatson reported the observation of regression of advanced breast cancer after bilateral ovariectomy in premenopausal women [11], there is considerable evidence pointing to estrogens as mammary carcinogens [12].

In 1978, Cohen et al. proposed that a diminished function of the pineal gland might promote an increase in the risk of breast cancer, as a consequence of a prolonged time of exposure to circulating estrogens. This hypothesis is based on several observations: (i) the incidence of breast cancer is lowest in countries in which pineal calcification shows a low incidence. (ii) Patients taking chlorpromazine, a drug that raises melatonin levels, have lower rates of breast cancer. (iii) *In vitro* data suggests that melatonin may have direct effects on breast cancer cells. (iv) Melatonin receptors are present on human ovarian cells, which suggest that melatonin may have a direct influence on the ovarian production of estrogen [13].

Plasma melatonin levels were determined in women with clinical stage I or II breast cancer. The amplitude of the nighttime peak of nocturnal plasma melatonin was diminished in women with estrogen receptor-positive breast cancer in comparison with estrogen-negative disease patients or healthy matched control subjects, suggesting that low concentrations

of melatonin during the night may increase the risk of hormone-dependent breast malignancy [14]. In 1987, based on Cohen's work, Richard Stevens suggested the hypothesis that women who are exposed to light-at-night (LAN) will have higher rates of breast cancer [15].

In 2001, Schernhammer et al. established a relation between rotating night-shift work and breast cancer risk in a cohort of premenopausal nurses, particularly in those women who reported more than 20 years of rotating night shifts [16]. Some other studies have evaluated the association between residential outdoor light during sleeping time with breast and prostate cancer among subjects that never worked at night, concluding that both prostate and invasive breast cancer were associated with high exposure to outdoor LAN [17, 18]. All these results support the hypothesis that, in healthy premenopausal women, LAN exposure can result in enhancement of mammary oncogenesis through disruption of the circadian oncostatic actions of melatonin.

The majority of *in vivo* studies performed to elucidate the role of melatonin in estrogen-responsive breast cancer have used as a model that chemically induced dimethylbenz(a)anthracene (DMBA) or N-methyl-N-nitrosourea mammary (NMU) carcinoma in young rats. Pinelectomized rats treated with DMBA and kept in short photoperiods (LD 10/14) showed a higher tumor incidence and a shorter latency period [19]. In contrast, animals with enhanced pineal function or receiving exogenous melatonin at pharmacological concentrations (dose: 500 mg/day, 2 weeks prior to DMBA during 20 weeks, injected at late afternoon) as the treatment had a decrease in the number of tumors. Additionally, an increase in tumor latency and a lower tumor incidence, generally accompanied by a smaller size and a higher frequency of tumor regression in previously induced tumors was obtained [20]. Moreover, the rodents treated with DMBA and receiving melatonin showed a reduced expression of estrogen receptor alpha at the tumor level. Therefore, the results from these animal models suggest that melatonin may counteract the action of estrogens in tumor cells *in vivo*.

MCF-7, the first hormone-responsive breast cancer cell line has been widely used as an *in vitro* model of mammary tumors. The antiproliferative actions of the pineal hormone at the physiological nocturnal concentration (1 nM) on the breast cancer cell line MCF-7 have been studied for nearly thirty years [21]. There is abundant evidence suggesting that the inhibitory action of melatonin on mammary cancer estrogen-positive cell lines is based on its ability to regulate either the synthesis of estrogens or estrogen signaling pathways [22]. Concerning the antiestrogenic actions of melatonin, it is clear that the pineal hormone behaves as a selective estrogen receptor modulator (SERM). Whereas other antiestrogenic molecules used in clinical, such as tamoxifen, function as a selective antagonist for estrogen receptor alpha, in such way that in the 4-hydroxytamoxifen-hER alpha complex, helix 12 occludes the coactivator recognition groove [23] melatonin does not bind, at least directly, to the estrogen receptor. It has been described that a dose of melatonin equivalent to the physiological concentration found in plasma at night (1 nM) decreases the levels of ER α in *in vitro* experiments in MCF-7 cells [24]. Additionally, melatonin interferes

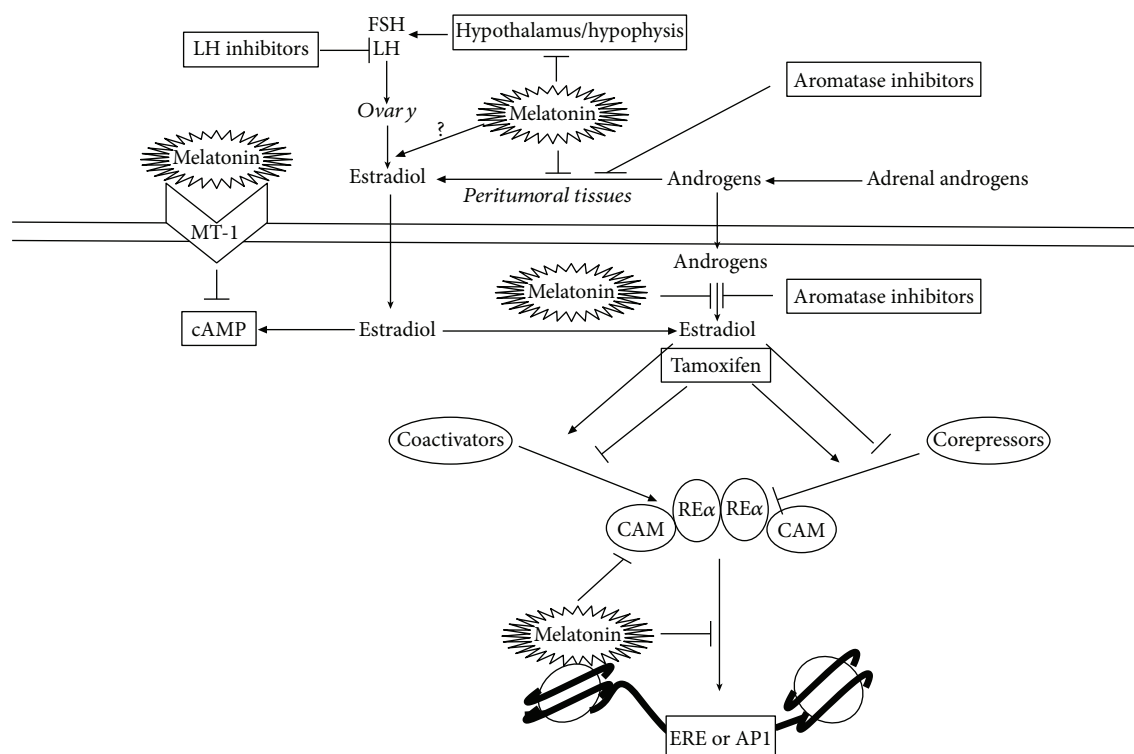


FIGURE 1: Melatonin antiestrogenic actions in estrogen-dependent human breast cancer cells: downregulation of the neuroendocrine/reproductive axis. Inhibition of the enzymes necessary for the conversion of adrenal androgens into estrogens in tumor surrounding tissues and in estrogen-dependent breast cancer cells. Inhibition of adenylate cyclase through binding to the MT-1 membrane receptor in epithelial malignant cells, counteracting the stimulatory effect of estradiol. Binding to the calmodulin-ER α complex, provoking destabilization of the estradiol-ER α complex, preventing its binding to DNA in both estrogen response element- (ERE-) and activator protein 1- (AP1-) containing promoters (whereas tamoxifen directly binds to the estrogen receptor, interfering with the binding of coactivators).

with estradiol-triggered transcriptional activation of many estradiol-responsive genes through destabilization of the estradiol-ER complex, preventing its binding to DNA in both estrogen response element- (ERE-) and activator protein 1- (AP1-) containing promoters [25]. These actions of melatonin are likely mediated by calmodulin, since calmodulin binds to ER α and melatonin behaves as a calmodulin antagonist. The pineal hormone promotes structural changes in the calmodulin-ER α protein complex, thus impairing its binding to estrogen-responsive promoters [26, 27]. Due to these differential actions of melatonin and tamoxifen on the estrogen receptor, both molecules can cooperate; thus, it has been documented that physiological doses of melatonin (range from 2.32 pg/l to 23.2 ng/l) enhances the sensitivity of MCF-7 cells to tamoxifen [28]. Additionally, the SERM actions of melatonin can be explained since breast cancer cells express the melatonin receptor type 1 (MT-1) located in the membrane (Figure 1); the binding of melatonin to the MT-1 receptor results in inhibition of adenylate cyclase, therefore decreasing cAMP intracellular levels [29]. Conversely, estradiol activates adenylate cyclase, which results in higher cAMP cytoplasmic levels in a classical short-time second-messenger mechanism independent of gene transcription. Higher cAMP levels cooperate with long-time genomic effects of estradiol, thus enhancing ER-dependent transcriptional activation [30]. It is clear then that estrogens and the pineal hormone signaling pathways converge and

have opposite effects over cAMP intracellular concentrations (Figure 1).

The oncostatic action of melatonin on hormone-dependent breast cancer cell lines is also based on its ability to limit the production of estrogens. Melatonin downregulates both the transcription and activity of many of the enzymes involved in the synthesis of estrogens, therefore behaving as a selective estrogen enzyme modulator (SEEM). Melatonin regulates both the transcriptional levels of steroid sulfatase (STS) and 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (17 β -HSD1), enzymes necessary to convert inactive estrogen precursors into physiologically active estradiol; estrogen sulfotransferase (EST), the enzyme that inactivates estrogens through their conversion to inactive estrogen sulfates; and aromatase, the enzyme responsible for the aromatization of androgens into estrogens (Figure 1). The regulation of melatonin takes account not only in tumor cells but also in endothelial and fibroblast cells located at the tumor cells adjacent tissues [31–36]. Interestingly, whereas the inhibitory effect of melatonin in MCF-7 cells is achieved at 1 nM, in *in vitro* experiments performed using fibroblasts or endothelial cells, a pharmacological dose of 1 mM is required. It has been reported that cytokines synthesized and released by tumor cells influence the surrounding fibroblasts, regulating their differentiation and stimulating both the aromatase expression and activity in them; melatonin at pharmacological concentrations (1 mM) counteracts this stimulatory effect,

by inhibiting cytokines release from malignant cells (such as IL-6) and through the inhibition of the activity of aromatase [37, 38]. The vascular endothelial growth factor (VEGF) released by estrogen-responsive breast cancer cells binds to its receptor expressed in the membranes of adjacent endothelial cells. As a result, endothelial cells undergo proliferation, migration, and reorganization in a typical process of angiogenesis. Melatonin (1 mM) can regulate the paracrine mechanisms responsible for the interplay between mammary tumor cells and surrounding fibroblasts and endothelial cells in experiments performed *in vivo*, by downregulating the levels of VEGF and by inhibiting the production of aromatase in those cell lines [39, 40].

The *in vitro* anticancer actions of nocturnal human blood melatonin levels (1 nM) on hormone-dependent breast cancer cell lines can partially be explained since melatonin counteracts mitosis stimulated by estradiol [41]. Several protooncogenes (such as c-Myc) growth factors (TGF α) and transcription factors (NF- κ B) targeted by the estrogen signaling pathways are modulated by this concentration of melatonin in breast cancer cells [42]. Similar results (at pharmacological doses) have been obtained *in vivo*, in Balb/c nude athymic mice (melatonin dose: 40 mg/kg of body weight, 5 days/week during 21 days) [43]. Estradiol and estrogen-like endocrine disrupting chemicals promote cell-cycle progression by increasing the levels of cell-cycle-related proteins such as cyclin D1 and cathepsin D, whereas it decreases the levels of p21 [44–46]. Melatonin (1 nM) inhibits cell-cycle progression causing a time delay in the G₁-S transition, probably through an increase in the levels of p53 and p21 [47, 48]. The accumulation of cells in G₁ forces them to enter into the G₀ phase, inducing the endocrine-responsive cancer cells to undergo a higher differentiation. Additionally, it has been described that estrogens downregulate proteins implicated in adhesion such as E-cadherin and beta-(1) integrin. Melatonin (1 nM) increased the expression of these two cell surface adhesion proteins, leading to inhibition of cancer invasion and metastasis via ROCK- (Rho-associated protein kinase-) regulated microfilament and microtubule organization [49]. In tumor invasion, downregulation of adhesion proteins frequently occurs, leading to the loss of cell-to-cell recognition and transformation into a more aggressive invasive phenotype [50].

Melatonin is a promising agent to be considered as an adjuvant to chemotherapy and radiotherapy or to be combined with other molecules with anticancer activity in breast cancer treatment protocols. In humans, it has been reported that breast cancer patients receiving melatonin (a therapeutic dose: 20 mg/day in the evening administered for at least two months) during chemotherapy showed less side effects than matched controls receiving only chemotherapy [51]. Back to *in vitro* experiments, when a physiological dose of melatonin (1 nM or 10 nM) was combined with valproic acid, the melatonin MT-1 receptor expression was upregulated and the antiproliferative effect of valproic acid was more effective [52]. Melatonin (at a pharmacological dose, 1 mM) and troglitazone (a peroxisome proliferator-activated receptor- γ agonist) together induced apoptosis in the breast cancer cell line MDA-MB-231 [53]. *In vivo*, the combination

of pharmacological doses of melatonin (500 mg/day, 2 weeks prior to DMBA during 20 weeks, injected at late afternoon) and resveratrol reduced tumor incidence and decreased the quantity of invasive and *in situ* carcinomas in a rat model of experimental estrogen-responsive mammary carcinogenesis [54]. In a similar model of NMU-induced mammary tumors in rats *in vivo*, melatonin (dose: 20 μ g/ml in water starting 7 days prior to DMBA and kept for 16 additional weeks) potentiated the antitumor effect of pravastatin, further decreasing tumor frequency and lengthening tumor latency of this statin [55]. Exposure to dim LAN induced a circadian disruption of nocturnal melatonin in nude rats bearing estrogen receptor alpha-positive MCF-7 human breast cancer xenografts and consequently, a complete loss of tumor sensitivity to doxorubicin, indicating that chemotherapy resistance might be due to a disruption of the circadian structure ultimately leading to low levels of melatonin at night [56]. Combined with doxorubicin, the pineal hormone enhanced cancer cells apoptosis *in vivo* in rats bearing breast tumors. The animals treated with both doxorubicin plus melatonin (10 mg/kg of body weight, daily injected during 15 days) had the highest one-month survival rate and the lighter tumor weights [57]. *In vitro*, in MCF-7 cells, doxorubicin and melatonin had a synergic effect on apoptosis and mitochondrial oxidative stress. The apoptosis level, procaspase-9, PARP, caspase-3, and caspase-9 activities were higher in the group receiving both compounds at the same time (melatonin dose: 0.3 nM) [58]. Nocturnal human blood melatonin levels (1 nM) enhanced the antiproliferative and apoptotic responses to low doses of docetaxel in MCF-7 cells, modulating the changes in gene expression induced by this taxane. Docetaxel downregulated the mRNA levels of p53, cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (CDKN1A), and cadherin-13 and upregulated mucin1 (MUC1), GATA-binding protein 3 (GATA3), and c-MYC, whereas melatonin reverted this actions. Moreover, *in vitro*, melatonin enhanced the expression of BAD and BAX and the inhibition of BCL-2 induced by docetaxel [59].

Ionizing radiation is a highly effective way of destroying any cancer cells remaining in the breast after surgery. Radiotherapy can cause a variety of adverse events in normal tissues leading to syndromes such as acute radiation (ARS) and multiorgan dysfunction syndromes (MODS) [60]. Radiation induces cellular damage by a variety of direct and indirect mechanisms ultimately resulting in DNA damage and chromosomal aberrations. The finding of new molecules acting as radioprotectors of normal tissues and organs is of great interest, and melatonin is a good candidate to be a radioprotective agent due to its hydroxyl radical scavenging ability [61]. Importantly, a physiological dose of melatonin (1 nM) decreased the ability of tumor cells to repair radiation-induced alterations of the DNA structure *in vitro*, mainly double-strand breaks (DSBs) that direct the cancer cells to undergo apoptosis. It is a common fact that cancer cells have abnormal high levels of proteins necessary for repair mechanisms. Thus, when the double-strand repair proteins such as RAD51 were downregulated, cells became more sensitive to radiotherapy [62]. Conversely, high levels of DNA-PKcs, a key player in nonhomologous end

joining, accelerated the radiotherapy induced DSB repair mechanism [63].

In vitro experiments performed with leukemia cells showed that melatonin at a pharmacological dose (1 mM) increased the rate of apoptosis induced by radiotherapy, which is an effect that seemed to be dependent of p53 [64]. In the estrogen-dependent MCF-7 breast cancer cell line, melatonin treatment at physiological and pharmacological doses (1 nM, 10 μ M, 1 mM) prior to radiation resulted in inhibition of cell proliferation, induction of cell cycle arrest, and downregulation of RAD51 and DNA-PKcs [65]. Additionally, the levels of p53 were much higher in pretreated (melatonin 1 nM) cells [66]. As mentioned above, melatonin is an antiestrogen agent able to sensitize breast cancer cells to radiotherapy, and similar results have been obtained with classical aromatase inhibitors administered to breast cancer patients treated with ionizing radiation [67].

3. Melatonin and Hormone-Dependent Prostate Cancer

Prostate cancer (PC) is one of the leading causes of death by cancer among males in the developed world. As prostate physiology is under the control of androgens (testosterone and dihydrotestosterone) and their metabolites, androgen deprivation therapy (by inhibition of hormone biosynthesis or androgen receptor deprivation) has been extensively used in PC. However, most patients will develop hormone-refractory cancer [68]. As well as in the case of the mammary gland, the role of melatonin in the prostate has been established a long time ago. *In vivo*, melatonin (at a pharmacological dose of 150 mg/100 g of body weight, administered for 4 weeks) induced a significant decrease in the ventral prostate weight in castrated and castrated-testosterone-treated rats [69]. Conversely, pinealectomy was effective in stimulating androstenedione and testosterone production indicating an inhibitory action of the pineal gland on testicular steroidogenesis in rats [70]. Shortly after these findings, the involvement of melatonin in prostate cancer was unrevealed. In humans (patients with nonmetastasizing carcinoma), the pineal hormone did not show significant circadian rhythms indicating that the modulation of melatonin plasma levels might be related to prostate cancer genesis and growth [71]. Because of the antigonadotropic effect of melatonin, the hypothesis that the pineal hormone could inhibit prostate cancer was tested *in vivo* in rat prostatic adenocarcinoma. The main conclusion was that melatonin (50 μ g/rat, daily injected one hour before darkness) suppressed the growth of prostate tumors [72]. Back to humans, when the circadian rhythms of melatonin and 6-sulfatoxymelatonin were analyzed in the serum of elder patients with primary prostate cancer, a reduced pineal activity was found [73]. Also in humans, a clinical combination of melatonin and the LHRH analogue triptorelin was tested in metastatic prostate cancer patients with promising results. The concomitant administration of melatonin (a therapeutic dose, orally administered at 20 mg/day, in the evening every day until progression, starting 7 days prior to triptorelin) may overcome the resistance to LHRH analogues and palliate the adverse side effects

[74]. According to these results, a physiological dose of melatonin (1 nM) attenuated the growth of the human androgen-sensitive prostatic tumor cell line LNCaP *in vitro* [75]. The expression of the membrane Mella melatonin receptor was demonstrated in this cell line, and an accumulation of the cells in G₀/G₁ and a decrease in S phase were obtained by treatment with melatonin at nanomolar concentrations [76]. Interestingly, the direct oncostatic activity of melatonin (1 nM) was also demonstrated *in vitro* in human androgen-independent DU 145 prostate cancer cells. As occurred in breast cancer, the indoleamine caused cell-cycle withdrawal by accumulation of cells in G₀/G₁ and inhibition of cell proliferation [77]. Back to the androgen-responsive prostatic LNCaP cells, a melatonin-mediated nuclear exclusion of the androgen receptor (AR) was demonstrated, indicating that melatonin (used at concentrations ranging from 1 nM to 100 nM) might regulate AR activity [78]. At 100 nM, melatonin induced a rise in intracellular cGMP, leading to an increase in calcium levels and PKC activation [79]. *In vivo* experiments in rodents showed that epidermal growth factor (EGF) stimulated LNCaP tumor growth in nude mice and induced an increase in the levels of Cyclin D1, whereas melatonin (at a pharmacological dose of 4 mg/g of body weight, administered intraperitoneally 1 h before lighting was switched off) counteracted this effect [80]. An *in vitro* study evaluating the effect of melatonin in both androgen-dependent (LNCaP) and androgen-independent (PC3) cells demonstrated that treatment with the indoleamine (10 nM to 1 mM) dramatically reduced the number of both types of cells and, in addition, induced cellular differentiation. The effect of melatonin was not mediated by PKA although a transitory rise in cAMP levels was observed [81]. In androgen-dependent prostate cancer cells, it has been demonstrated that pharmacological doses of melatonin (ranging from 50 nM to 1 mM) increased p21 levels, decreased NF- κ B activation, and Bcl-2 and survivin were downregulated [82]. The inhibition of NF- κ B signaling via melatonin-dependent activation (melatonin dose: 10 nM) of PKA and PKC resulted in transcriptional upregulation of p27 (Kip1), a MT1-dependent antiproliferative signaling mechanism [83]. In LNCaP cells, the pineal hormone (at different concentrations from 0–3 mM) induced both early and late apoptosis, both dependent of activation of c-JUN kinase (JNK) and p38 kinase, strongly suggesting that these kinases directly participate in apoptosis triggered by melatonin [84]. In androgen-dependent but also in androgen-independent prostate cancer cell lines, melatonin (1 mM) seemed to exert an antiangiogenic effect since it reduced hypoxia-inducible factor (HIF-1) protein levels and the release of the vascular endothelial growth factor, which correlated with dephosphorylation of p70S6 kinase and its target, ribosomal protein RPS6 [85]. In prostate cancer cell lines (*in vitro*) and transgenic adenocarcinoma or mouse prostate (TRAMP) mice (*in vivo*), melatonin (dose: 10–20 mg/l in drinking water, for 18 weeks) inhibited tumorigenesis by decreasing the serum levels of IGF-1, IGFBP3, and proliferation markers such as PCNA and Ki-67. Sirt1, a NAD(+)-dependent histone deacetylase overexpressed in prostate cancer, was also inhibited by melatonin in correlation to a significant

antiproliferative effect [86]. *In vitro*, in both androgen-sensitive LNCaP and insensitive PC-3 cell lines, the pineal hormone (1 mM) limited glycolysis, the tricarboxylic acid cycle, and the pentose phosphate pathways, indicating that melatonin slows down glucose metabolism in both prostate cancer cell lines [87]. Yet more molecular mechanisms have been recently characterized *in vitro* (prostate cancer cell lines) and *in vivo* (TRAMP mice models). KLK2, KLK3 (kallikreins), and IGF1R were downregulated, whereas IGFBP3 was upregulated by melatonin (pharmacological doses: 10–20 mg/l in drinking water, for 18 weeks), demonstrating the role of the IGF signaling pathways in the oncostatic effect of the pineal hormone [88]. Additionally, an increase in phosphorylation of Akt in melatonin-treated (dose: 18 i.p. injections at 1 mg/kg of body weight, treatment lasting for 41 days) nude mice in which LNCaP cells were xenografted has been demonstrated *in vivo* [89]. Recent evidence suggests that microRNAs (miRNAs) are good candidates to be considered as targets in cancer treatments. In androgen insensitive PC-3 lines subjected to hypoxia, melatonin (1 mM) upregulated miRNA3195 and miRNA374b. Overexpression of miRNA3195 and miRNA374b decreased the levels of the proangiogenic proteins VEGF, HIF-1, and HIF-2, thus explaining, at least in part, the antiangiogenic properties of melatonin in prostate cancer [90]. It is widely accepted that desynchronization of the clock circuitry after alterations in the circadian rhythms is implicated in cancer. Indeed, melatonin (100 μ M to 2 mM) increased the levels of Per2 and Clock, whereas reduced Bmal1 in prostate cancer cells [91]. Combined with chemotherapeutic agents (etoposide, doxorubicin, or docetaxel), melatonin (1 mM) enhanced the sensitivity of cancer cells to cytokine-induced apoptosis *in vitro* [92].

As in breast cancer, some attention has been drowned into the hypothesis that light-at-night (LAN) exposure can inhibit nocturnal melatonin, and consequently, prostate cancer risk would be elevated. The countries with higher levels of nocturnal light yielded a higher risk of prostate cancer [93]. Men who never worked at night in night-shift turns have a lower risk of prostate cancer in comparison with night-shift workers [94]. Men who reported sleep problems had lower morning levels of urinary 6-sulfatoxymelatonin in association with an increased prostate cancer risk [95]. Aggregate genetic variation in melatonin and circadian rhythms were also significantly associated with the risk of prostate cancer, but no significant association could be established for lung and ovarian cancer, supporting a potential role of melatonin pathways and circadian rhythms in prostate carcinogenesis [96].

4. Melatonin and Ovarian Cancer

Ovarian cancer (OC) is the main cause of death in the world when speaking about gynecological malignancies. Sexual hormones (estrogens, progesterone, and testosterone) seem to increase the risk of ovarian cancer. The use of oral contraceptives has a strong protective association with ovarian cancer risk. Parity correlates with lower risk, with a greater reduction for each additional pregnancy. However, menopause at late

ages increases the risk of OC [97]. Another study in pregnant women indicates that higher concentrations of testosterone and 17-hydroxy-progesterone increase the risk of borderline serous tumors; if androstenedione is elevated, the risk of mucinous tumors is increased; in conclusion, higher than average concentrations of estradiol increase the risk of endometrioid tumors [98].

At first, melatonin, in *in vitro* experiments, (range from 20 to 200 μ M) was found to be the only neuroendocrine hormone that stimulated cell proliferation of the KF cell line, derived from human serous cystadenocarcinoma [99]. Despite this negative result, many others investigated the effects of melatonin in OC. As melatonin is synthesized by granulosa cells of preovulatory follicles, it has been attributed as a role influencing sex steroid hormones production essential for ovulation [100]. After this hypothesis, many works related, at least indirectly, a melatonin-deficient production with lower levels of progesterone and higher levels of estradiol. After menopause, melatonin secretion dramatically decreases in correlation with most frequent anovulatory cycles and increased risk of endometrial carcinoma [101].

As aforementioned, prostate and breast cancer have been associated with night-shift work. For these sexual hormone-related cancers, the higher risk in people exposed to LAN might be explained in terms of cessation of melatonin production. However, there was no association between rotating night-shift work and risk of ovarian cancer [102]. Additionally, when urinary 6-sulfatoxymelatonin (aMT6) was measured in ovarian cancer and healthy women samples, the results showed that aMT6 was not significantly associated with risk of OC [103]. Conversely, another recent study, in which melatonin was measured in serum from women with ovarian cancer and healthy controls, a significant reduction in serum melatonin levels was found in ovarian cancer patients [104].

Despite these apparently discrepant results, melatonin (at a tentative therapeutic dose: 40 mg/day orally taken, weeks until progression) was tested in humans (advanced ovarian cancer patients) in combination with IL-2. Although the number of cases was too low to establish solid conclusions, the combination of low-dose IL-2 plus this therapeutic dose of melatonin showed some promising results [105]. Since melatonin had been previously reported to be effective in reducing proliferation in many cell lines derived from different types of cancer, the pineal hormone was tested *in vitro* in the estrogen-dependent BG-1 ovarian adenocarcinoma cell line. Melatonin at physiological concentrations (1 to 100 nM) caused a reduction in cell number, indicating an oncostatic action of the indoleamine [106]. The melatonin MT-1 membrane receptor is likely to be implicated in the pineal hormone effect, since it is expressed in both normal ovarian epithelial and ovarian cancer cell lines. As previously described in breast cancer cells, binding of melatonin to its receptors in OC cell lines inhibits adenylate cyclase, therefore reducing the levels of cAMP [107, 108].

In rodents, in an *in vivo* model of chemically induced ovarian carcinomas in ethanol-preferring rats, melatonin treatment (dose: 200 μ g/100 g of body weight, administered from 60 days) reduced ovarian masses and the incidence of

adenocarcinomas in ethanol deprived rats [109]. When the molecular mechanisms underlying this effect were explored, it was revealed that melatonin administration suppressed the increase in the levels of Her-2, p38, phospho-AKT, and mTOR that usually take place in OC [110]. Other proteins whose levels are usually increased in OC were diminished by melatonin: Toll-like receptor 4 (TLR4), MyD88, IkK α , NF- κ B, TRIF, and IRF-3, all involved in MyD88- and TRIF-dependent signaling pathways induced by TLR4 [111]. In the same ethanol-preferring rat model, melatonin promoted apoptosis through the upregulation of p53, BAX, and caspase-3 and downregulation of Bcl-2 and survivin [112]. A proteomic analysis performed in animals receiving long-term melatonin showed that the pineal hormone induced downregulation of several proteins involved in metabolic processes, generation of metabolites, hypoxia signaling, endoplasmic reticulum stress-associated proteins, and cancer-related proteoglycans. A few proteins were upregulated; fatty acid-binding protein (FABP), mitochondrial heat shock protein 10 (hsp10), or the product of the gene ATP5F1B, which is ATP synthase subunit B [113]. In the same *in vivo* model, melatonin also inhibited angiogenesis, which is a process that occurs in many types of cancer, including OC. In ethanol-preferring rats with serous papillary OC, VEGF, the key signal to induce the formation of new vessels, is downregulated by the pineal hormone [114]. *In vitro*, in the OC cell lines OVCAR-429 and PA-1, melatonin treatment (0–800 μ M) resulted in an accumulation of cells in the G₁ phase of the cell cycle in parallel with a downregulation of CDK2 and CDK4, another finding that contributes to explain the antitumor activity of melatonin in ovarian cancer [115]. Invasion and metastasis are two processes that allow tumor cells to spread throughout the body. In cancer stem cells obtained from ER α (–) SK-OV-3 ovarian cancer cells, melatonin inhibited proliferation (as seen by an important decrease in the proliferation marker Ki-67). Additionally, ZEB1, ZEB2, vimentin, and snail, genes related to epithelial-to-mesenchymal transition, were decreased after the indoleamine treatment. Migration of cancer stem cells was also inhibited by melatonin (3.4 mM), indicating that the pineal hormone might be an important adjuvant to prevent invasion and metastasis [116].

Recently, many researchers have focused their attention on the potential benefits that melatonin might have modulating the actions of chemotherapeutic agents [6]. Most of the studies testing the ability of melatonin to enhance the antiproliferative effects of chemo in OC have been performed combining melatonin with cisplatin. In a pioneer chemosensitivity assay performed *in vitro*, melatonin (0.1 nM to 10 nM) proved to be more efficient than cisplatin inhibiting the cell growth of primary cells from ovarian tumors [117]. In OC HTOA cells (sensitive to cisplatin) and OVCAR-3 (resistant to cisplatin), melatonin (1 nM and 1 μ M) did not have an antiproliferative effect when applied alone but enhanced the sensitivity of cisplatin. Additionally, telomerase activity was lower in the OVCAR-3 cell line treated with this indoleamine [118].

The apparent inefficacy of melatonin (range from 0 to 2 mM) to impair by itself the growth of ovarian cancer was

confirmed in SK-OV-3 cells. However, when combined with cisplatin, melatonin synergistically cooperate with the chemo drug to diminish the viability in this cell line, effect accompanied by an increase in the cleavage of PARP and caspase-3, an inhibition of ERK phosphorylation along with dephosphorylation of p90RSK and HSP27. Importantly, melatonin showed a protective effect against cisplatin toxicity in OSEN noncarcinogenic ovarian epithelial cells [119].

The pineal hormone protective effect was also observed *in vivo*; in mice, pharmacological doses of melatonin (ranging from 15–30 mg/Kg of body weight, i.p. injected 3 days) prevented from cisplatin-induced loss of the follicle reserve, likely through an inhibition of the activation of PTEN/AKT/FOXO3a signaling pathway [120]. Melatonin, at the same doses, in combination with ghrelin in cisplatin-treated ovaries increased the affinity of FOXO3a to p27kip promoter, restoring its expression, which is critical to maintain the dormant status of primordial follicles using an *ex vivo* ovary culture system [121]. *In vivo*, this protective action was abolished in mice (pharmacological doses of melatonin ranging from 5–20 mg/kg of body weight, i.p. injected 3 days prior to cisplatin) when the intracellular signaling triggered by the MT-1 receptor was blocked, indicating that the cytoprotective effect of the indoleamine is mediated by the MT-1 membrane receptor [122]. However, melatonin (0.1 mM to 2 mM) enhanced the cytotoxic effect of cisplatin *in vitro* in three independent OC cancer cell lines in an MT-1 independent manner [123]. Additionally, melatonin (range from 0 to 10 mM) further stimulated apoptosis induced by laser treatment in OC tumor cells [124].

5. Melatonin Influences Breast, Prostate, and Ovary Cancer at Different Levels

5.1. Light-at-Night and the Risk of Breast, Ovarian, and Prostate Cancer. Light-at-night (LAN) exposure impairs the nocturnal peak of melatonin, and consequently, the pineal gland hormone cannot reduce the production of estrogens and androgens. These sexual hormones, together with progesterone, control the normal physiology of the breast, the prostate gland, and the ovary; however, augmented levels of these hormones can increase the incidence of breast, prostate, and ovarian cancer. Therefore, it was proposed that an increased exposure to nocturnal light might result in a higher risk of endocrine-related cancers. As aforementioned, there is a clear association between rotating night-shift work and breast cancer risk, supporting the hypothesis that LAN exposure, in healthy premenopausal women, can enhance mammary oncogenesis through disruption of the circadian rhythms [17–19]. In men, there is a clear association of LAN with a higher risk of prostate cancer [93–96]. However, in ovarian cancer, such an association has not been established [102].

5.2. Melatonin Levels in Patients with Hormone-Dependent Cancers. The amplitude of the nocturnal peak of melatonin was decreased in women with estrogen receptor-positive breast cancer in comparison with healthy women [14]. Melatonin lost the circadian rhythmic production in men with prostate cancer as compared to healthy men [73], and

some discrepant results have been obtained in the case of ovarian cancer. Whereas some studies reported no clear association between urinary melatonin and ovarian cancer risk [103], others found lower serum levels of melatonin in women with ovarian cancer compared to healthy matches [104].

5.3. Melatonin Receptors in Hormone-Dependent Cancers.

Concerning the expression of the melatonin membrane receptors, in the breast, prostate, and ovarian cancer cells, the expression of the MT-1 receptor has been reported [29, 76, 83, 107, 108, 125, 126], indicating a potential prognostic and therapeutic significance of MT-1 in hormone-dependent cancers.

In breast cancer cells, melatonin and estradiol signaling pathways converge, since they have opposite effects over cAMP intracellular concentrations. The effect of the pineal hormone is dependent on its binding to the MT-1 melatonin receptor located in the membrane [29, 30]. A similar inhibitory effect of melatonin (dose range from 1–100 nM) on adenylate cyclase, therefore reducing the levels of cAMP, has been described in both ovarian cancer cells [107, 108] and ovarian granulosa cells (melatonin dose range from 0.1 μ M to 10 μ M) [127]. However, the regulation of AR activity in prostate cancer cells by melatonin is likely to be dependent of a rise in intracellular cGMP, leading to an increase in calcium and activation of PKC [78, 79].

5.4. Melatonin Regulates the Synthesis of Estrogens and Androgens in Normal and Cancer Tissues.

The effect of melatonin on steroid production (estradiol is the natural growth factor of breast and ovarian cancers) by normal granulosa cells depends on the model chosen for the study: in ovine granulosa cells, the pineal hormone (tested at several concentrations from 0.86 to 86 nM) had no significant effect on the production of estradiol [128]. In porcine ovaries (doses range: from 1 pg to 100 ng/ml of the medium during 9 days) and human granulosa cultured cells, melatonin (from 10 nM to 1 mM) stimulated estradiol secretion [129, 130]. In contrast, in preovulatory follicles in the cyclic hamster, a clear inhibition of progesterone and estradiol production by melatonin (0.1–10 ng/l) was observed, likely through a reduction in the levels of cAMP [131]. Increased levels of estradiol have been found in women who worked 15 or more years of night shifts, a change that might be associated with an increased cancer risk [132]. Contrary to the discrepancies obtained in normal granulosa cells, it has been extensively demonstrated that the pineal hormone is an inhibitor of sexual hormones synthesis in breast cancer cell models. Melatonin downregulates some of the enzymes necessary for the synthesis of estrogens, such as aromatase (cytochrome P450), steroid sulfatase (STS), and 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (17 β -HSD1), whereas it stimulates estrogen sulfotransferase (EST), the enzyme that inactivates estrogens. Therefore, melatonin can be labelled as a selective estrogen enzyme modulator. Interestingly, the effect of melatonin takes account in both epithelial malignant breast tumor cells and adjacent peritumoral endothelial cells and fibroblasts; strikingly, melatonin is effective at nanomolar concentrations in breast cancer cells but only at millimolar concentrations in

peritumoral cell models [31–36]. Steroid sulfatase (STS), estrogen sulfotransferase (EST), and 17 β -hydroxysteroid dehydrogenases 2 (17 β HSD2) and 5 (17 β HSD5) have been detected in ovarian cancer cell lines, with a higher formation of estradiol in comparison to normal ovarian epithelium cells [133]. In ovarian cancer samples from patients, higher levels of estrogen inactivating enzymes are associated with ER α abundance and with a better overall survival rate [134]. To date, the potential inhibitory role of melatonin in these enzymes in ovarian cancer cells has not been tested.

Testosterone is the natural growth factor of prostate cancer. The inhibitory action of melatonin (10 pM to 1 μ M) on both testosterone-induced prostate growth and testosterone production by Leydig cells has been known for decades [135, 136]. This reduction of testosterone production by melatonin (10 pM to 1 μ M) likely takes account through the binding of the pineal hormone to the MT-1 receptor expressed in Leydig cells, resulting in decreased levels of cAMP [137]. In hamsters, melatonin (10 pM to 1 μ M) suppresses testicular steroidogenesis through inhibition of several enzymes, such as steroidogenic acute regulatory protein (STAR), cholesterol side-chain cleavage enzyme (cytochrome P450SCC), and 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase (3 β -HSD) [137, 138]. In Leydig cell lines from mice, the reduction of testosterone production by melatonin (range from 1 pM to 1 μ M) is related to a decrease in cAMP levels and downregulation of GATA-4 and SF-1 transcription factors [139]. Back in human, higher levels of androgens and a delayed peak of androgen production have been described in night-shift workers [140]. Although androgens contribute to prostate hyperplasia and cancer, and androgen deprivation therapy has been used for decades, most patients will develop refractory cancer, probably by the coexistence of different populations of cells, some dependent and some not dependent of androgens [141]. Recent findings suggest that 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase is induced upon androgen stimulation via androgen receptor in prostate cancer cells, establishing an androgen production positive feedback loop [142].

5.5. Estrogen and Androgen Receptors Are Regulated by Melatonin.

Additionally, to inhibition of androgen and estrogen production, melatonin can also control the intracellular levels and activity of the estrogen and androgen receptors. Therefore, the inhibitory action of melatonin on hormone-dependent cancer cells is primarily based on its ability to regulate estrogen and androgen signaling pathways; again, most of the research has been conducted in breast cancer models. The pineal hormone decreases the levels of ER α in MCF-7 cells [24] and destabilizes the estradiol-ER complex preventing its binding to estradiol-responsive promoters [25], likely through interaction with calmodulin bound to ER α [26, 27]. In prostate cancer cells, a melatonin-mediated nuclear exclusion of the androgen receptor has been described, indicating that melatonin might regulate the androgen receptor activity [78]. In ovarian cancer, the effect of the pineal hormone on the ER α levels remains unexplored, although it is known that melatonin (100 μ g/100 g of body weight/day, 150 days) decreases estradiol,

increases progesterone, and downregulates androgen receptor, ER α , and ER β levels in oviducts and uteri of rats [143].

5.6. Melatonin Exerts Antiproliferative Effects and Induces Apoptosis in Breast, Ovarian, and Prostate Cancers. Melatonin at physiological concentrations (1 nM) exerts antiproliferative actions in breast, prostate, and ovarian cancer cells. A common fact after melatonin treatment is the accumulation of cells in the G₁ phase of the cell cycle. In estrogen-responsive breast cancer cells, this effect is probably reached through an increase in the levels of p53 and p21 in parallel with a downregulation of cyclin D1; p53 participates in growth suppression and apoptosis; the activation of p21 by p53 leads to a failure in phosphorylation of the retinoblastoma factor and cell cycle arrest [144]. Therefore, cells are forced to enter into the G₀ phase, undergoing a higher stage of differentiation [47, 48]. Interestingly, the accumulation of cells in G₀/G₁ after treatment with melatonin at nanomolar concentrations has been described in both estrogen-responsive and estrogen-independent breast cancer cells [145, 146] and also in androgen-sensitive and androgen-independent cancer cells [76, 77]. The stimulated levels of p53 in response to melatonin correlate with enhanced release of TGF β -1 in breast cancer [24] and prostate benign cells (melatonin dose: 10–500 μ M) [147]. In ovarian cancer, the effect of melatonin on the TGF β -1 pathway has not yet been addressed. Nevertheless, in ovary cancer, it is known that the increase in the percentage of cells in G₁ in response to melatonin (range from 0 to 800 μ M) is associated with a downregulation of cyclin-dependent kinases 2 and 4 (CDK2 and CDK4) [115].

When cells accumulate in the G₀ phase, they can differentiate or else they can undergo apoptosis. Melatonin (1 nM) promotes apoptosis in hormone-sensitive breast cancer cells [148], prostate cancer cells (melatonin dose: 0–3 mM) [84], and in an *in vivo* (rat) model of ovary cancer (melatonin dose: 200 μ g/100 g of body weight, administered from 60 days) [112]. Concerning apoptosis mediators, a significant increase in caspase-3 activity has been described in a breast cancer model developed in rats (melatonin administered from 2 weeks prior to DMBA for 3 months, at 250 mg/100 g of body weight) [149]. In MCF-7 cells, melatonin (1 nM) induced activation of caspases-9 and -7 and cleavage of PARP in parallel to a reduction of the Bcl-2/Bax ratio [148]. These results suggest that melatonin can trigger two apoptotic processes in MCF-7 cells: one TGF β 1 and caspase-independent response and another process dependent of TGF β 1 in which caspase-7 is the effector [148]. Melatonin also has proapoptotic effects in ER-negative breast cancer cells through inhibition of Cox-2, Akt, PI3K, p300, and NF- κ B signaling pathways, although this effect takes account at pharmacological doses (1 mM) [150]. The pineal gland hormone (0.3 nM) also enhanced apoptosis combined with chemotherapeutic agents such as doxorubicin in rats bearing mammary tumors. PARP, procaspase 9 and caspase-3, and caspase-9 activities were higher in the animals simultaneously treated with both compounds [58]. In the MCF-7 cells, melatonin (1 nM) enhanced the expression of BAX and BAD and reduced the levels of BCL-2 induced by docetaxel. In a model of ovarian

carcinoma in rats, melatonin (dose: 200 μ g/100 g of body weight, administered from 60 days) inhibited the phosphorylation of AKT and mTOR [110], diminished the levels of TLR4, MyD88, IkK α , NF- κ B, TRIF, and IRF-3 [111], and promoted apoptosis through the upregulation of p53, BAX, and caspase-3 and downregulation of Bcl-2 and survivin [112]. In prostate cancer cells, the apoptotic effect of melatonin (0–3 mM) has also been observed, and the molecular mechanism does not differ much from those described in breast and ovary cancers: increased expression of p53, p27, and p21, fragmentation of PARP and activation of caspases-3, -8, and -9 [84, 151]. Bax expression was markedly activated and Bcl-2 inhibited; the apoptotic effect of melatonin involved activation of JNK and p38 [151].

5.7. Melatonin Inhibits Angiogenesis in Breast, Prostate, and Ovarian Cancers. The antiangiogenic activity of melatonin was described for the first time in metastatic patients. When melatonin was given orally at 20 mg/day during two months, a significant decline in VEGF secretion was observed [152]. An apoptotic and antiproliferative effect of melatonin (tested from 0.1 nM to 1 mM) has been described in human umbilical vein endothelial cells in association with upregulation of p53 and Bax and downregulation of Bcl-2 [153]. VEGF is released by estrogen-responsive cancer cells and binds to its receptor located in the membranes of adjacent endothelial cells. The pineal hormone, administered at pharmacological concentrations (1 mM), downregulated the levels of VEGF and the production of aromatase [39, 40]. In cocultures of breast cancer (MCF-7) and endothelial cells (HUVECs), melatonin (1 mM) exerted its antiangiogenic action by downregulating the expression of angiopoietins (ANG-1 and ANG-2) and VEGF levels and upregulating the expression of Tie2, which is the angiopoietin receptor [154]. Similar results have been obtained in xenograft models of hormone-dependent breast cancer (melatonin administered for 21 days at 40 mg/kg of body weight, 5 days a week) [155] and in triple-negative breast cancer cell lines (melatonin dose: 1 μ M to 1 mM) [156]. In androgen-dependent breast cancer, melatonin (1 mM) reduced the levels of HIF-1 and inhibited the release of VEGF [85]. Lower angiogenesis was found in melatonin-treated (18 i.p. injections of 1 mg/kg in 41 days) mice xenografted with LNCaP cells [89]. Melatonin (1 mM) upregulated miRNA3195 and miRNA374b in prostate cancer cells in parallel with a reduction of VEGF, HIF-1, and HIF-2 levels [90]. Melatonin also inhibited angiogenesis in ethanol-preferring rats with ovarian carcinoma. As in breast and prostate cancer, the proangiogenic factor VEGF was downregulated by the pineal hormone [114].

5.8. Melatonin Protection against Invasion and Metastasis. A pilot phase II study including patients with metastatic breast cancer concluded that the administration of melatonin (20 mg/day in the evening) might induce tumor regression [157]. Melatonin, at physiological concentrations (1 nM), reduced the invasiveness of hormone-dependent MCF-7 cells and increased the levels of E-cadherin and beta1 integrin [158]. Melatonin (1 nM) stimulated the Rho-associated protein kinase (ROCK-1) in MCF-7 cells [49] and in an *in vivo*

model (female mice) of breast cancer (melatonin administered at 100 mg/kg of body weight, 5 days a week, up to 6 weeks) metastasis in the lung [159]. The pineal hormone activated glycogen synthase kinase 3β (GSK3 β) by inhibiting Akt phosphorylation, inducing β -catenin degradation, and thus inhibiting epithelial-to-mesenchymal transition [160]. After treatment with 1 mM melatonin, MCF-7 cells reduced cell migration and invasion; E-cadherin expression was increased, whereas OCT4, N-cadherin, and vimentin were reduced [161]. In MCF-7 cells overexpressing Her2, melatonin (range from 0.1 pM to 1 μ M) repressed the epithelial-to-mesenchymal transition by suppressing RSK2 expression [162]. In ovarian cancer cells, ZEB1, ZEB2, vimentin, and snail, genes related to epithelial-to-mesenchymal transition, were downregulated after melatonin (3.4 mM) treatment [116].

5.9. Synergistic Actions of Melatonin in Breast, Prostate, and Ovarian Cancers. The protective role of melatonin against chemotherapy side effects is well documented; thus, in clinical trials, melatonin (20 mg/day orally every day at evening at least two months) enhanced the efficacy and reduced the toxicity of chemotherapy [163, 164]. The protective effect of melatonin (10 μ M) was also observed in hematopoietic stem cells treated with doxorubicin [165]. Patients receiving melatonin (daily 21 mg at bedtime) showed a reduction of taxane-induced neuropathy [166]. In rats, the pineal hormone (tested at 5/10/50 mg/kg of body weight, daily, starting 3 days prior to paclitaxel, during 5 days) protected against paclitaxel-induced neuropathic pain [167].

In breast cancer, melatonin has been tested in combination with many substances, and, in most cases, potential positive effects have been documented. In MCF-7 cells, melatonin 1 nM promoted apoptosis and/or inhibited cell proliferation in combination with all-trans retinoic acid [168], valproic acid (primarily used to treat epilepsy) [52], troglitazone (a peroxisome proliferator-activated receptor- γ agonist) [53], somatostatin [169], or arsenic trioxide [170]. In animal models, treatment with melatonin (200 μ g/rat per day, 300 days) enhanced the chemoprophylactic effect of tamoxifen [171] and resveratrol (melatonin dose: 500 mg/day, 2 weeks prior to DMBA, during 20 weeks, injected at late afternoon) [54]. The pineal hormone administered by subcutaneous injection (500 μ g daily, 1 h before darkness, 20 weeks) potentiated the tumor prevention by 9-cis-retinoic [172]. At 20 mg/ml added in the water (7 days prior to the carcinogen, administered during 15 weeks), melatonin potentiated the antitumor effect of statins [55, 173].

Light-at-night (LAN) and subsequent melatonin disruption have been related to the development of resistance to tamoxifen [174] and doxorubicin [56]. The pineal hormone has also been tested in combination with chemotherapeutic agents. Thus, melatonin (0.3 mM) and doxorubicin had synergic effects on apoptosis in MCF-7 cells [58] and, at 1 nM, enhanced the antiproliferative and apoptotic effects induced by docetaxel [59].

In ovarian cancer, a pioneer study including a modest number of patients addressed the effect of melatonin (dose:

40 mg/day orally taken, weeks until progression) with IL-2, with some promising results [105]. However, to date, melatonin has not been used as an adjuvant at a clinical level [175]. In studies performed in ovarian cancer cell lines, melatonin (1 nM) and cisplatin synergistically cooperated, diminishing proliferation [118] and increasing apoptosis (cleavage of PARP and activation of caspase-3). These effects were independent of membrane MT-1 receptors [123]. Importantly, melatonin showed a protective effect against cisplatin toxicity *in vitro* (noncarcinogenic ovarian epithelial cells) [119] and *in vivo* (mice models, melatonin doses: 15–30 mg/Kg of body weight, i.p. injected 3 days) [120, 121]. This protective action is likely mediated by the MT-1 membrane receptor [122].

In prostate cancer, it has been described that a combination of melatonin (orally at 20 mg/day, in the evening every day until progression, starting 7 days prior to triptorelin) and the LHRH analogue triptorelin may overcome the resistance to LHRH analogues and palliate the adverse side effects [74]. Melatonin (1 mM) enhanced the apoptotic effects of etoposide, doxorubicin, or docetaxel in prostate cancer cells [92].

6. Conclusions and Remarks

Melatonin is a naturally produced hormone with high expectations to be included as an adjuvant in cancer treatments, although the intracellular mechanisms triggered by this indoleamine are not yet completely characterized. In breast, ovary, and prostate cancer, an inhibitory action of the pineal gland on sexual hormones steroidogenesis has been demonstrated. Additionally, melatonin regulates the levels and modulates the transcriptional activity of the estrogen (ER) and androgen (AR) receptors. Concerning estrogens, there is abundant evidence pointing to melatonin as a molecule able to regulate estrogens synthesis (acting as a SEEM) and estrogen receptor activity (acting as a SERM). Melatonin regulates enzymes involved in the synthesis of androgens as well as the androgen receptor activity. Exposure to light-at-night (which abolishes the nocturnal peak of melatonin) is associated with an increase in the risk of breast and prostate cancer, although the association with the risk of ovary cancer is not totally clear.

Some of the cellular processes regulated by the pineal hormone are gathered in Table 1. The molecular target genes which expression, translation, or posttranslational modifications are enhanced by melatonin are shown in Table 2, and those which expression, translation, or posttranslational modifications are downregulated by melatonin are shown in Table 3. The results have been compiled from research performed in various cancer-derived cell lines, animal models, and samples obtained from cancer patients. With practically no reports claiming the contrary, melatonin exerts antiproliferative actions in prostate, breast, and ovary tumors, by itself or enhancing the sensitivity to chemotherapeutic drugs.

Melatonin is a proapoptotic molecule, and some of the molecular targets involved in apoptosis found in the different cancer models eventually resulted to be the same in the three kinds of cancer. Breast, ovary, and prostate cancer cells undergo a delay in cell-cycle progression after melatonin treatment. The pineal hormone impairs the epithelial-to-

TABLE 1: Association of light-at-night (LAN) and melatonin levels with the different types of cancer; melatonin actions on sexual hormones synthesis, proliferation, apoptosis, cell cycle, invasion, and synergistic effects with other molecules in different cancers; yes¹: only described in one report; yes²: at least one contradictory study.

	LAN and cancer risk		Melatonin levels and cancer risk		Synthesis of sexual hormones	Antiproliferation	Apoptosis	Cell cycle	Antiangiogenesis	Invasion	Synergistic actions
	Association	Inverse association	Inverse association	Inhibition							
Breast				Inhibition	Yes	Yes	Delay G ₀ -G ₁	Yes	Yes	Yes	Yes
Prostate	Association	Inverse association		Inhibition	Yes	Yes	Delay G ₀ -G ₁	Yes	Not described	Yes ¹	Yes ¹
Ovary	No association	Not described		Not tested	Yes ²	Yes	Accumulation in G ₁	Not described	Yes	Yes	Yes

TABLE 2: Melatonin upregulated and/or activated molecular targets in breast, prostate, and ovary cancer.

	Synthesis of sexual hormones	Antiproliferation	Apoptosis	Cell cycle	Antiangiogenesis	Invasion-metastasis
Breast cancer	EST	p53, p21	p53, p21, caspase3, caspase7, caspase9, PARP, Bax, Bad, TGFb-1	p53, p21	Tie-2	E-cadherin, betal-integrin, ROCK, cadherin13, GSK3β,
Prostate cancer		p53, p21, Kip1, IGFBP3, Per2, Clock, pAKT	p53, p21, Kip1, JNK, p38, PKC, caspase3, caspase8, caspase9, TGFb-1, PARP, Bax	p53,	miRNA3195, miRNA374b, HIF-1	
Ovary cancer		p53,	p53, caspase3, Bax, PARP	p53,		FABP, ATP5F1B, HSP10

TABLE 3: Melatonin downregulated and/or inhibited molecular targets in breast, prostate, and ovary cancer. ¹: indirect effect on estradiol synthesis in adipocytes.

	Synthesis of sex steroids in gonads or tumoral tissues	Antiproliferation	Apoptosis	Cell cycle	Angiogenesis	Invasion-metastasis
Breast cancer	STS, 17 β -HSD1, aromatase, (IL-6, IL-11, TNF- α) ¹	MUC1, GATA3, c-myc, TGF α , ER α , cyclin D1, COX-2, AKT, PI3K, p300, NF- κ B	NF- κ B, Bcl-2, RAD51, DNA-PKcs, COX-2, AKT, PI3K, NF- κ B p300,	Cyclin D1	VEGF, ANG-1, ANG-2	p38, MMP-2, MMP-9, pAKT, OCT4, Ncadherin, vimentin, RSK, β -catenin
Prostate cancer	StAR, cytochrome P450SCC, 3 β -HSD, GATA-4, SF-1	AR, Sirt1, KLK2, KLK3, IGF1R, Ki-67, PCNA, Bmi1, NF-Kb	NF- κ B, Bcl-2, survivin	Cyclin D1	VEGF, HIF-1, HIF2, p70S6K, RPS6	KLK2, KLK3
Ovary cancer	Estradiol secretion stimulated/ inhibited depending on the model	p38, pAKT, Her-2, mTOR, MyD88, interferon β , pERK, p90RSK, pHSP27, IRF3, Ki-67	NF- κ B, TLR4, IKK- α , TRIF, Bcl-2, survivin	CDK2, CDK4	VEGF, VEGFR2	MyD88, TRAF6, IKK α , interferon β , ZEB1, ZEB2, snail, vimentin

mesenchymal transition, inhibits cell migration, invasion, and metastasis (either alone or in combination with chemotherapy). The pineal hormone also inhibits angiogenesis.

In many different types of cancer, melatonin has been combined with many antitumor agents, among them were tamoxifen, valproic acid, pravastatin, doxorubicin, epirubicin, docetaxel, etoposide, cisplatin, methotrexate, irinotecan, ursolic acid, 5'-fluorouracil, celecoxib, capecitabine, gemcitabine, cyclophosphamide, sorafenib, gefitinib, aracytin, piroxicam, clofarabine, everolimus, barasertib, or temozolomide [6]. Additionally, melatonin has been tested in cells lines, animals, and even patients receiving radiotherapy.

The results obtained to date are really promising, since melatonin synergizes the chemotherapy effects, allows to use lower doses (which might result in better tolerance), and protects from the undesirable side effects of radiotherapy and most of the chemotherapeutic agents aforementioned. In summary, after additional molecular studies and newly designed clinical trials combining melatonin and either chemo- or radiotherapy have been conducted, it might be reasonable to consider the pineal hormone as a potential agent to be included in cancer treatments.

Conflicts of Interest

The authors declare that there is no conflict of interest regarding the publication of this paper.

Acknowledgments

This work was funded by Grant SAF2016-77103-P from the Ministry of Economy and Competitiveness of Spain.

References

- [1] A. B. Lerner, J. D. Case, Y. Takahashi, T. H. Lee, and W. Mori, "Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 80, no. 10, pp. 2587–2587, 1958.
- [2] R. J. Reiter, "Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions," *Endocrine Reviews*, vol. 12, no. 2, pp. 151–180, 1991.
- [3] R. J. Reiter, J. C. Mayo, D. X. Tan, R. M. Sainz, M. Alatorre-Jimenez, and L. Qin, "Melatonin as an antioxidant: under promises but over delivers," *Journal of Pineal Research*, vol. 61, no. 3, pp. 253–278, 2016.
- [4] Z. Zhang, P. F. Inseña, B. Liang et al., "Melatonin, immune modulation and aging," *Autoimmunity*, vol. 26, no. 1, pp. 43–53, 1997.
- [5] N. Zisapel, "New perspectives on the role of melatonin in human sleep, circadian rhythms and their regulation," *British Journal of Pharmacology*, vol. 175, no. 16, pp. 3190–3199, 2018.
- [6] C. Martínez-Campa, J. Menéndez-Menéndez, C. Alonso-González, A. González, V. Álvarez-García, and S. Cos, "What is known about melatonin, chemotherapy and altered gene expression in breast cancer," *Oncology Letters*, vol. 13, no. 4, pp. 2003–2014, 2017.
- [7] D. E. Blask, L. A. Sauer, and R. T. Dauchy, "Melatonin as a chronobiotic/anticancer agent: cellular, biochemical and molecular mechanisms of action and their implications for circadian-based cancer therapy," *Current Topics in Medicinal Chemistry*, vol. 2, no. 2, pp. 113–132, 2002.
- [8] R. J. Reiter, S. A. Rosales-Corral, D. Acuna-Castroviejo, L. Qin, S.-F. Yang, and K. Xu, "Melatonin, a full service anti-cancer agent: inhibition of initiation, progression and metastasis," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 18, no. 4, 2017.
- [9] M. D. Mediavilla, E. J. Sanchez-Barcelo, D. X. Tan, L. Manchester, and R. J. Reiter, "Basic mechanisms involved in the anti-cancer effects of melatonin," *Current Medicinal Chemistry*, vol. 17, no. 36, pp. 4462–4481, 2010.
- [10] American Cancer Society, "Cancer Facts and Figures," 2017, May 2018, <http://www.cancer.org/research/cancer-facts-statistics/all-cancer-facts-figures/cancer-facts-figures-2017.html>.
- [11] C. T. Beatson, "On the treatment of inoperable cases of carcinoma of the mamma: suggestions for a new method of treatment with illustrative cases," *The Lancet*, vol. 148, no. 3803, pp. 162–165, 1896.
- [12] I. H. Russo and J. Russo, "Role of hormones in mammary cancer initiation and progression," *Journal of Pineal Research*, vol. 3, no. 1, pp. 49–61, 1998.
- [13] M. Cohen, M. Lippman, and B. Chabner, "Role of pineal gland in aetiology and treatment of breast cancer," *The Lancet*, vol. 312, no. 8094, pp. 814–816, 1978.
- [14] L. Tamarkin, D. Danforth, A. Lichter et al., "Decreased nocturnal plasma melatonin peak in patients with estrogen receptor positive breast cancer," *Science*, vol. 216, no. 4549, pp. 1003–1005, 1982.
- [15] R. G. Stevens, "Electric power use and breast cancer: a hypothesis," *American Journal of Epidemiology*, vol. 125, no. 4, pp. 556–561, 1987.
- [16] E. S. Schernhammer, F. Laden, F. E. Speizer et al., "Rotating night shifts and risk of breast cancer in women participating in the nurses' health study," *Journal of the National Cancer Institute*, vol. 93, no. 20, pp. 1563–1568, 2001.
- [17] P. James, K. A. Bertrand, J. E. Hart, E. S. Schernhammer, R. M. Tamimi, and F. Laden, "Outdoor light at night and breast cancer incidence in the nurses' health study II," *Environmental Health Perspectives*, vol. 125, no. 8, article 087010, 2017.
- [18] A. García-Saenz, A. Sánchez de Miguel, A. Espinosa et al., "Evaluating the association between artificial light-at-night exposure and breast and prostate cancer risk in Spain (MCC-Spain study)," *Environmental Health Perspectives*, vol. 126, no. 4, article 047011, 2018.
- [19] L. S. Kothari, P. N. Shah, and M. C. Mhatre, "Pineal ablation in varying photoperiods and the incidence of 9,10-dimethyl-1,2-benzanthracene induced mammary cancer in rats," *Cancer Letters*, vol. 22, no. 1, pp. 99–102, 1984.
- [20] D. E. Blask, D. B. Pelletier, S. M. Hill et al., "Pineal melatonin inhibition of tumor promotion in the N-nitroso-N-methylurea model of mammary carcinogenesis: potential involvement of antiestrogenic mechanisms in vivo," *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, vol. 117, no. 6, pp. 526–532, 1991.
- [21] A. Gonzalez, S. Cos, C. Martinez-Campa et al., "Selective estrogen enzyme modulator actions of melatonin in human breast cancer cells," *Journal of Pineal Research*, vol. 45, no. 1, pp. 86–92, 2008.

- [22] S. Cos, A. González, C. Martínez-Campa, M. D. Mediavilla, C. Alonso-González, and E. J. Sánchez-Barceló, "Estrogen-signaling pathway: a link between breast cancer and melatonin oncostatic actions," *Cancer Detection and Prevention*, vol. 30, no. 2, pp. 118–128, 2006.
- [23] A. K. Shiau, D. Barstad, P. M. Loria et al., "The structural basis of estrogen receptor/coactivator recognition and the antagonism of this interaction by tamoxifen," *Cell*, vol. 95, no. 7, pp. 927–937, 1998.
- [24] T. M. Molis, L. L. Spriggs, and S. M. Hill, "Modulation of estrogen receptor mRNA expression by melatonin in MCF-7 human breast cancer cells," *Molecular Endocrinology*, vol. 8, no. 12, pp. 1681–1690, 1994.
- [25] A. G. Rato, J. G. Pedrero, M. A. Martínez, B. Del Rio, P. S. Lazo, and S. Ramos, "Melatonin blocks the activation of estrogen receptor for DNA binding," *The FASEB Journal*, vol. 13, no. 8, pp. 857–868, 1999.
- [26] A. Bouhoute and G. Leclercq, "Calmodulin decreases the estrogen binding capacity of the estrogen receptor," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 227, no. 3, pp. 651–657, 1996.
- [27] B. del Río, J. M. García Pedrero, C. Martínez-Campa, P. Zuazua, P. S. Lazo, and S. Ramos, "Melatonin, an endogenous-specific inhibitor of estrogen receptor alpha via calmodulin," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 279, no. 37, pp. 38294–38302, 2004.
- [28] S. T. Wilson, D. E. Blask, and A. M. Lemus-Wilson, "Melatonin augments the sensitivity of MCF-7 human breast cancer cells to tamoxifen in vitro," *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, vol. 75, no. 2, pp. 669–670, 1992.
- [29] C. Godson and S. M. Reppert, "The Mel1a melatonin receptor is coupled to parallel signal transduction pathways," *Endocrinology*, vol. 138, no. 1, pp. 397–404, 1997.
- [30] S. M. Aronica, W. L. Kraus, and B. S. Katzenellenbogen, "Estrogen action via the cAMP signaling pathway: stimulation of adenylate cyclase and cAMP-regulated gene transcription," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 91, no. 18, pp. 8517–8521, 1994.
- [31] S. Cos, C. Martínez-Campa, M. D. Mediavilla, and E. J. Sánchez-Barceló, "Melatonin modulates aromatase activity in MCF-7 human breast cancer cells," *Journal of Pineal Research*, vol. 38, no. 2, pp. 136–142, 2005.
- [32] A. Purohit, L. W. L. Woo, and B. V. L. Potter, "Steroid sulfatase: a pivotal player in estrogen synthesis and metabolism," *Molecular and Cellular Endocrinology*, vol. 340, no. 2, pp. 154–160, 2011.
- [33] S. Cos, A. Gonzalez, C. Martinez-Campa, M. Mediavilla, C. Alonso-Gonzalez, and E. Sanchez-Barcelo, "Melatonin as a selective estrogen enzyme modulator," *Current Cancer Drug Targets*, vol. 8, no. 8, pp. 691–702, 2008.
- [34] V. Alvarez-García, A. González, C. Martínez-Campa, C. Alonso-González, and S. Cos, "Melatonin modulates aromatase activity and expression in endothelial cells," *Oncology Reports*, vol. 29, no. 5, pp. 2058–2064, 2013.
- [35] S. Chottanapund, M. B. M. van Duursen, P. Navasumrit et al., "Anti-aromatase effect of resveratrol and melatonin on hormonal positive breast cancer cells co-cultured with breast adipose fibroblasts," *Toxicology In Vitro*, vol. 28, no. 7, pp. 1215–1221, 2014.
- [36] A. González, C. Martínez-Campa, C. Alonso-González, and S. Cos, "Melatonin affects the dynamic steady-state equilibrium of estrogen sulfates in human umbilical vein endothelial cells by regulating the balance between estrogen sulfatase and sulfotransferase," *International Journal of Molecular Medicine*, vol. 36, no. 6, pp. 1671–1676, 2015.
- [37] A. González, V. Alvarez-García, C. Martínez-Campa, C. Alonso-González, and S. Cos, "Melatonin promotes differentiation of 3T3-L1 fibroblasts," *Journal of Pineal Research*, vol. 52, no. 1, pp. 12–20, 2012.
- [38] V. Alvarez-García, A. González, C. Alonso-González, C. Martínez-Campa, and S. Cos, "Melatonin interferes in the desmoplastic reaction in breast cancer by regulating cytokine production," *Journal of Pineal Research*, vol. 52, no. 3, pp. 282–290, 2012.
- [39] V. Alvarez-García, A. González, C. Alonso-González, C. Martínez-Campa, and S. Cos, "Regulation of vascular endothelial growth factor by melatonin in human breast cancer cells," *Journal of Pineal Research*, vol. 54, no. 4, pp. 373–380, 2013.
- [40] V. Alvarez-García, A. González, C. Alonso-González, C. Martínez-Campa, and S. Cos, "Antiangiogenic effects of melatonin in endothelial cell cultures," *Microvascular Research*, vol. 87, pp. 25–33, 2013.
- [41] S. Cos and D. E. Blask, "Melatonin modulates growth factor activity in MCF-7 human breast cancer cells," *Journal of Pineal Research*, vol. 17, no. 1, pp. 25–32, 1994.
- [42] T. M. Molis, L. L. Spriggs, Y. Jupiter, and S. M. Hill, "Melatonin modulation of estrogen-regulated proteins, growth factors, and proto-oncogenes in human breast cancer," *Journal of Pineal Research*, vol. 18, no. 2, pp. 93–103, 1995.
- [43] J. K. Colombo, B. V. Jardim-Perassi, J. P. S. Ferreira et al., "Melatonin differentially modulates NF- κ B expression in breast and liver cancer cells," *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, vol. 18, 2018.
- [44] J. Hong, N. N. Shah, T. J. Thomas, M. A. Gallo, E. J. Yurkow, and T. Thomas, "Differential effects of estradiol and its analogs on cyclin D1 and CDK4 expression in estrogen receptor positive MCF-7 and estrogen receptor-transfected MCF-10A Ewt5 cells," *Oncology Reports*, vol. 5, no. 5, pp. 1025–1033, 1998.
- [45] J. M. Tian, B. Ran, C. L. Zhang, D. M. Yan, and X. H. Li, "Estrogen and progesterone promote breast cancer cell proliferation by inducing cyclin G1 expression," *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, vol. 51, no. 3, pp. 1–7, 2018.
- [46] S.-J. In, S.-H. Kim, R.-E. Go, K.-A. Hwang, and K.-C. Choi, "Benzophenone-1 and nonylphenol stimulated MCF-7 breast cancer growth by regulating cell cycle and metastasis-related genes via an estrogen receptor α -dependent pathway," *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, vol. 78, no. 8, pp. 492–505, 2015.
- [47] M. D. Mediavilla, S. Cos, and E. J. Sánchez-Barceló, "Melatonin increases p 53 and p21WAF1 expression in MCF-7 human breast cancer cells in vitro," *Life Sciences*, vol. 65, no. 4, pp. 415–420, 1999.
- [48] S. Proietti, A. Cucina, G. Dobrowolny et al., "Melatonin down-regulates MDM2 gene expression and enhances p 53 acetylation in MCF-7 cells," *Journal of Pineal Research*, vol. 57, no. 1, pp. 120–129, 2014.
- [49] L. Ortiz-López, S. Morales-Mulia, G. Ramírez-Rodríguez, and G. Benítez-King, "ROCK-regulated cytoskeletal dynamics participate in the inhibitory effect of melatonin on cancer

- cell migration," *Journal of Pineal Research*, vol. 46, no. 1, pp. 15–21, 2009.
- [50] M. Canel, A. Serrels, M. C. Frame, and V. G. Brunton, "E-cadherin-integrin crosstalk in cancer invasion and metastasis," *Journal of Cell Science*, vol. 126, no. 2, pp. 393–401, 2013.
- [51] P. Lissoni, G. Tancini, S. Barni et al., "Treatment of cancer chemotherapy-induced toxicity with the pineal hormone melatonin," *Journal of Pineal Research*, vol. 5, no. 2, pp. 126–129, 1997.
- [52] S. Jawed, B. Kim, T. Ottenhof, G. M. Brown, E. S. Werstiuik, and L. P. Niles, "Human melatonin MT1 receptor induction by valproic acid and its effects in combination with melatonin on MCF-7 breast cancer cell proliferation," *European Journal of Pharmacology*, vol. 560, no. 1, pp. 17–22, 2007.
- [53] A. Korkmaz, H. Tamura, L. C. Manchester, G. B. Ogden, D. X. Tan, and R. J. Reiter, "Combination of melatonin and a peroxisome proliferator-activated receptor- γ agonist induces apoptosis in a breast cancer cell line," *Journal of Pineal Research*, vol. 46, no. 1, pp. 115–116, 2009.
- [54] T. Kisková, C. Ekmekcioglu, M. Garajová et al., "A combination of resveratrol and melatonin exerts chemopreventive effects in *N*-methyl-*N*-nitrosourea-induced rat mammary carcinogenesis," *European Journal of Cancer Prevention*, vol. 21, no. 2, pp. 163–170, 2012.
- [55] P. Orendáš, P. Kubatka, B. Bojková et al., "Melatonin potentiates the anti-tumour effect of pravastatin in rat mammary gland carcinoma model," *International Journal of Experimental Pathology*, vol. 95, no. 6, pp. 401–410, 2014.
- [56] S. Xiang, R. T. Dauchy, A. Hauch et al., "Doxorubicin resistance in breast cancer is driven by light at night-induced disruption of the circadian melatonin signal," *Journal of Pineal Research*, vol. 59, no. 1, pp. 60–69, 2015.
- [57] C. Ma, L. X. Li, Y. Zhang et al., "Protective and sensitive effects of melatonin combined with Adriamycin on ER+ (estrogen receptor) breast cancer," *European Journal of Gynaecological Oncology*, vol. 36, no. 2, pp. 197–202, 2015.
- [58] P. A. Kosar, M. Naziroglu, I. S. Ovey, and B. Cig, "Synergic effects of doxorubicin and melatonin on apoptosis and mitochondrial oxidative stress in MCF-7 breast cancer cells: involvement of TRPV1 channels," *The Journal of Membrane Biology*, vol. 249, no. 1–2, pp. 129–140, 2016.
- [59] C. Alonso-González, J. Menéndez-Menéndez, A. González-González, A. González, S. Cos, and C. Martínez-Campa, "Melatonin enhances the apoptotic effects and modulates the changes in gene expression induced by docetaxel in MCF-7 human breast cancer cells," *International Journal of Oncology*, vol. 52, no. 2, pp. 560–570, 2018.
- [60] K. L. Koenig, R. E. Goans, R. J. Hatchett et al., "Medical treatment of radiological casualties: current concepts," *Annals of Emergency Medicine*, vol. 45, no. 6, pp. 643–652, 2005.
- [61] Vijayalaxmi, R. J. Reiter, D. X. Tan, T. S. Herman, and C. R. Thomas Jr, "Melatonin as a radioprotective agent: a review," *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, vol. 59, no. 3, pp. 639–653, 2004.
- [62] S. J. Veuger, N. J. Curtin, C. J. Richardson, G. C. Smith, and B. W. Durkacz, "Radiosensitization and DNA repair inhibition by the combined use of novel inhibitors of DNA-dependent protein kinase and poly(ADP-ribose) polymerase-1," *Cancer Research*, vol. 63, no. 18, pp. 6008–6015, 2003.
- [63] A. J. Davis, B. P. C. Chen, and D. J. Chen, "DNA-PK: a dynamic enzyme in a versatile DSB repair pathway," *DNA Repair*, vol. 17, pp. 21–29, 2014.
- [64] S. S. Jang, W. D. Kim, and W. Y. Park, "Melatonin exerts differential actions on X-ray radiation-induced apoptosis in normal mice splenocytes and Jurkat leukemia cells," *Journal of Pineal Research*, vol. 47, no. 2, pp. 147–155, 2009.
- [65] C. Alonso-González, A. González, C. Martínez-Campa, J. Gómez-Arozamena, and S. Cos, "Melatonin sensitizes human breast cancer cells to ionizing radiation by downregulating proteins involved in double-strand DNA break repair," *Journal of Pineal Research*, vol. 58, no. 2, pp. 189–197, 2015.
- [66] C. Alonso-González, A. González, C. Martínez-Campa et al., "Melatonin enhancement of the radiosensitivity of human breast cancer cells is associated with the modulation of proteins involved in estrogen biosynthesis," *Cancer Letters*, vol. 370, no. 1, pp. 145–152, 2016.
- [67] M. Ishitobi, M. Shiba, T. Nakayama et al., "Treatment sequence of aromatase inhibitors and radiotherapy and long-term outcomes of breast cancer patients," *Anticancer Research*, vol. 34, no. 8, pp. 4311–4314, 2014.
- [68] Z. Cai, W. Chen, J. Zhang, and H. Li, "Androgen receptor: what we know and what we expect in castration-resistant prostate cancer," *International Urology and Nephrology*, 2018.
- [69] L. Debeljuk, V. M. Feder, and O. A. Paulucci, "Effects of melatonin on changes induced by castration and testosterone in sexual structures of male rats," *Endocrinology*, vol. 87, no. 6, pp. 1358–1360, 1970.
- [70] F. Peat and G. A. Kinson, "Testicular steroidogenesis in vitro in the rat in response to blinding, pinealectomy and to the addition of melatonin," *Steroids*, vol. 17, no. 1–5, pp. 251–264, 1971.
- [71] C. Bartsch, H. Bartsch, S. H. Flüchter, A. Attanasio, and D. Gupta, "Evidence for modulation of melatonin secretion in men with benign and malignant tumors of the prostate: relationship with the pituitary hormones," *Journal of Pineal Research*, vol. 2, no. 2, pp. 121–132, 1985.
- [72] J. G. Toma, H. M. Amerongen, S. C. Hennes, M. G. O'Brien, W. A. McBlain, and G. R. Buzzell, "Effects of olfactory bulbectomy, melatonin, and/or pinealectomy on three sublines of the Dunning R3327 rat prostatic adenocarcinoma," *Journal of Pineal Research*, vol. 4, no. 3, pp. 321–338, 1987.
- [73] C. Bartsch, H. Bartsch, A. Schmidt, S. Ilg, K. H. Bichler, and S. H. Flüchter, "Melatonin and 6-sulfatoxymelatonin circadian rhythms in serum and urine of primary prostate cancer patients: evidence for reduced pineal activity and relevance of urinary determinations," *Clinica Chimica Acta*, vol. 209, no. 3, pp. 153–167, 1992.
- [74] P. Lissoni, M. Cazzaniga, G. Tancini et al., "Reversal of clinical resistance to LHRH analogue in metastatic prostate cancer by the pineal hormone melatonin: efficacy of LHRH analogue plus melatonin in patients progressing on LHRH analogue alone," *European Urology*, vol. 31, no. 2, pp. 178–181, 1997.
- [75] Z. Lupowitz and N. Zisapel, "Hormonal interactions in human prostate tumor LNCaP cells," *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 68, no. 1–2, pp. 83–88, 1999.
- [76] R. M. Moretti, M. M. Marelli, R. Maggi, D. Dondi, M. Motta, and P. Limonta, "Antiproliferative action of melatonin on

- human prostate cancer LNCaP cells," *Oncology Reports*, vol. 7, no. 2, pp. 347–351, 2000.
- [77] M. M. Marelli, P. Limonta, R. Maggi, M. Motta, and R. M. Moretti, "Growth-inhibitory activity of melatonin on human androgen-independent DU 145 prostate cancer cells," *The Prostate*, vol. 45, no. 3, pp. 238–244, 2000.
- [78] A. Rimler, Z. Culig, G. Levy-Rimler et al., "Melatonin elicits nuclear exclusion of the human androgen receptor and attenuates its activity," *Prostate*, vol. 49, no. 2, pp. 145–154, 2001.
- [79] Z. Lupowitz, A. Rimler, and N. Zisapel, "Evaluation of signal transduction pathways mediating the nuclear exclusion of the androgen receptor by melatonin," *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 58, no. 14, pp. 2129–2135, 2001.
- [80] S. W. F. Siu, K. W. Lau, P. C. Tam, and S. Y. W. Shiu, "Melatonin and prostate cancer cell proliferation: interplay with castration, epidermal growth factor, and androgen sensitivity," *The Prostate*, vol. 52, no. 2, pp. 106–122, 2002.
- [81] R. M. Sainz, J. C. Mayo, D. X. Tan, J. León, L. Manchester, and R. J. Reiter, "Melatonin reduces prostate cancer cell growth leading to neuroendocrine differentiation via a receptor and PKA independent mechanism," *The Prostate*, vol. 63, no. 1, pp. 29–43, 2005.
- [82] R. M. Sainz, R. J. Reiter, D. X. Tan et al., "Critical role of glutathione in melatonin enhancement of tumor necrosis factor and ionizing radiation-induced apoptosis in prostate cancer cells in vitro," *Journal of Pineal Research*, vol. 45, no. 3, pp. 258–270, 2008.
- [83] S. Y. W. Shiu, W. Y. Leung, C. W. Tam, V. W. S. Liu, and K.-M. Yao, "Melatonin MT₁ receptor-induced transcriptional up-regulation of p27^{Kip1} in prostate cancer antiproliferation is mediated via inhibition of constitutively active nuclear factor kappa B (NF- κ B): potential implications on prostate cancer chemoprevention and therapy," *Journal of Pineal Research*, vol. 54, no. 1, pp. 69–79, 2013.
- [84] S. S. Joo and Y. M. Yoo, "Melatonin induces apoptotic death in LNCaP cells via p38 and JNK pathways: therapeutic implications for prostate cancer," *Journal of Pineal Research*, vol. 47, no. 1, pp. 8–14, 2009.
- [85] J.-W. Park, M.-S. Hwang, S.-I. Suh, and W.-K. Baek, "Melatonin down-regulates HIF-1 α expression through inhibition of protein translation in prostate cancer cells," *Journal of Pineal Research*, vol. 46, no. 4, pp. 415–421, 2009.
- [86] B. Jung-Hynes, T. L. Schmit, S. R. Reagan-Shaw, I. A. Siddiqui, H. Mukhtar, and N. Ahmad, "Melatonin, a novel Sirt1 inhibitor, imparts antiproliferative effects against prostate cancer in vitro in culture and in vivo in TRAMP model," *Journal of Pineal Research*, vol. 50, no. 2, pp. 140–149, 2011.
- [87] D. Hevia, P. Gonzalez-Menendez, M. Fernandez-Fernandez et al., "Melatonin decreases glucose metabolism in prostate cancer cells: a ¹³C stable isotope-resolved metabolomic study," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 18, no. 8, 2017.
- [88] J. C. Mayo, D. Hevia, I. Quiros-Gonzalez et al., "IGFBP3 and MAPK/ERK signaling mediates melatonin-induced antitumor activity in prostate cancer," *Journal of Pineal Research*, vol. 62, no. 1, article e12373, 2017.
- [89] R. Paroni, L. Terraneo, F. Bonomini et al., "Antitumour activity of melatonin in a mouse model of human prostate cancer: relationship with hypoxia signalling," *Journal of Pineal Research*, vol. 57, no. 1, pp. 43–52, 2014.
- [90] E. J. Sohn, G. Won, J. Lee, S. Lee, and S. H. Kim, "Upregulation of miRNA3195 and miRNA374b mediates the anti-angiogenic properties of melatonin in hypoxic PC-3 prostate cancer cells," *Journal of Cancer*, vol. 6, no. 1, pp. 19–28, 2015.
- [91] B. Jung-Hynes, W. Huang, R. J. Reiter, and N. Ahmad, "Melatonin resynchronizes dysregulated circadian rhythm circuitry in human prostate cancer cells," *Journal of Pineal Research*, vol. 49, no. 1, pp. 60–68, 2010.
- [92] A. Rodriguez-Garcia, J. C. Mayo, D. Hevia, I. Quiros-Gonzalez, M. Navarro, and R. M. Sainz, "Phenotypic changes caused by melatonin increased sensitivity of prostate cancer cells to cytokine-induced apoptosis," *Journal of Pineal Research*, vol. 54, no. 1, pp. 33–45, 2013.
- [93] I. Kloog, A. Haim, R. G. Stevens, and B. A. Portnov, "Global co-distribution of light at night (LAN) and cancers of prostate, colon, and lung in men," *Chronobiology International*, vol. 26, no. 1, pp. 108–125, 2009.
- [94] M. E. Parent, M. el-Zein, M. C. Rousseau, J. Pintos, and J. Siemiatycki, "Night work and the risk of cancer among men," *American Journal of Epidemiology*, vol. 176, no. 9, pp. 751–759, 2012.
- [95] L. G. Sigurdardottir, S. C. Markt, J. R. Rider et al., "Urinary melatonin levels, sleep disruption, and risk of prostate cancer in elderly men," *European Urology*, vol. 67, no. 2, pp. 191–194, 2015.
- [96] F. Gu, H. Zhang, P. L. Hyland et al., "Inherited variation in circadian rhythm genes and risks of prostate cancer and three other cancer sites in combined cancer consortia," *International Journal of Cancer*, vol. 141, no. 9, pp. 1794–1802, 2017.
- [97] K. K. Tsilidis, N. E. Allen, T. J. Key et al., "Oral contraceptive use and reproductive factors and risk of ovarian cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition," *British Journal of Cancer*, vol. 105, no. 9, pp. 1436–1442, 2011.
- [98] H. Schock, H. M. Surcel, A. Zeleniuch-Jacquotte et al., "Early pregnancy sex steroids and maternal risk of epithelial ovarian cancer," *Endocrine-Related Cancer*, vol. 21, no. 6, pp. 831–844, 2014.
- [99] Y. Kikuchi, T. Kita, M. Miyauchi, I. Iwano, and K. Kato, "Inhibition of human ovarian cancer cell proliferation in vitro by neuroendocrine hormones," *Gynecologic Oncology*, vol. 32, no. 1, pp. 60–64, 1989.
- [100] H. Tamura, Y. Nakamura, A. Korkmaz et al., "Melatonin and the ovary: physiological and pathophysiological implications," *Fertility and Sterility*, vol. 92, no. 1, pp. 328–343, 2009.
- [101] R. Sandyk, P. G. Anastasiadis, P. A. Anninos, and N. Tsagas, "Is the pineal gland involved in the pathogenesis of endometrial carcinoma," *International Journal of Neuroscience*, vol. 62, no. 1-2, pp. 89–96, 1991.
- [102] E. M. Poole, E. S. Schernhammer, and S. S. Tworoger, "Rotating night shift work and risk of ovarian cancer," *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*, vol. 20, no. 5, pp. 934–938, 2011.
- [103] E. M. Poole, E. Schernhammer, L. Mills, S. E. Hankinson, and S. S. Tworoger, "Urinary melatonin and risk of ovarian cancer," *Cancer Causes and Control*, vol. 26, no. 10, pp. 1501–1506, 2015.
- [104] M. Zhao, J. Wan, K. Zeng et al., "The reduction in circulating melatonin level may contribute to the pathogenesis of ovarian cancer: a retrospective study," *Journal of Cancer*, vol. 7, no. 7, pp. 831–836, 2016.

- [105] P. Lissoni, A. Ardizzoia, S. Barni, G. Tancini, and M. Muttini, "Immunotherapy with subcutaneous low dose interleukin-2 plus melatonin as salvage therapy of heavily chemotherapy-pretreated ovarian cancer," *Oncology Reports*, vol. 3, no. 5, pp. 947–949, 1996.
- [106] J. Petranka, W. Baldwin, J. Biermann, S. Jayadev, J. C. Barrett, and E. Murphy, "The oncostatic action of melatonin in an ovarian carcinoma cell line," *Journal of Pineal Research*, vol. 26, no. 3, pp. 129–136, 1999.
- [107] O. Treeck, C. Haldar, and O. Ortmann, "Antiestrogens modulate MT1 melatonin receptor expression in breast and ovarian cancer cell lines," *Oncology Reports*, vol. 15, no. 1, pp. 231–235, 2006.
- [108] K. Jablonska, B. Pula, A. Zemla et al., "Expression of the MT1 melatonin receptor in ovarian cancer cells," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 15, no. 12, pp. 23074–23089, 2014.
- [109] L. G. A. Chuffa, B. A. Fioruci-Fontanelli, L. O. Mendes et al., "Characterization of chemically induced ovarian carcinomas in an ethanol-preferring rat model: influence of long-term melatonin treatment," *PLoS One*, vol. 8, no. 12, article e81676, 2013.
- [110] G. M. Ferreira, M. Martinez, I. C. C. Camargo, R. F. Domeniconi, F. E. Martinez, and L. G. A. Chuffa, "Melatonin attenuates Her-2, p38 MAPK, p-AKT, and mTOR levels in ovarian carcinoma of ethanol-preferring rats," *Journal of Cancer*, vol. 5, no. 9, pp. 728–735, 2014.
- [111] L. G. A. Chuffa, B. A. Fioruci-Fontanelli, L. O. Mendes et al., "Melatonin attenuates the TLR4-mediated inflammatory response through MyD88- and TRIF-dependent signaling pathways in an in vivo model of ovarian cancer," *BMC Cancer*, vol. 15, no. 1, p. 34, 2015.
- [112] L. G. Chuffa, M. S. Alves, M. Martinez et al., "Apoptosis is triggered by melatonin in an in vivo model of ovarian carcinoma," *Endocrine-Related Cancer*, vol. 23, no. 2, pp. 65–76, 2016.
- [113] L. G. A. Chuffa, L. A. Lupi Júnior, F. R. F. Seiva et al., "Quantitative proteomic profiling reveals that diverse metabolic pathways are influenced by melatonin in an in vivo model of ovarian carcinoma," *Journal of Proteome Research*, vol. 15, no. 10, pp. 3872–3882, 2016.
- [114] Y. R. Zonta, M. Martinez, I. C. Camargo et al., "Melatonin reduces angiogenesis in serous papillary ovarian carcinoma of ethanol-preferring rats," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 18, no. 4, 2017.
- [115] C. J. Shen, C. C. Chang, Y. T. Chen, C. S. Lai, and Y. C. Hsu, "Melatonin suppresses the growth of ovarian cancer cell lines (OVCAR-429 and PA-1) and potentiates the effect of G1 arrest by targeting CDKs," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 17, no. 2, 2016.
- [116] M. Akbarzadeh, A. A. Movassaghpour, H. Ghanbari et al., "The potential therapeutic effect of melatonin on human ovarian cancer by inhibition of invasion and migration of cancer stem cells," *Scientific Reports*, vol. 7, no. 1, article 17062, 2017.
- [117] H. Bartsch, A. Buchberger, H. Franz et al., "Effect of melatonin and pineal extracts on human ovarian and mammary tumor cells in a chemosensitivity assay," *Life Sciences*, vol. 67, no. 24, pp. 2953–2960, 2000.
- [118] M. Futagami, S. Sato, T. Sakamoto, Y. Yokoyama, and Y. Saito, "Effects of melatonin on the proliferation and cis-diamminedichloroplatinum (CDDP) sensitivity of cultured human ovarian cancer cells," *Gynecologic Oncology*, vol. 82, no. 3, pp. 544–549, 2001.
- [119] J.-H. Kim, S.-J. Jeong, B. Kim, S.-M. Yun, D. Y. Choi, and S.-H. Kim, "Melatonin synergistically enhances cisplatin-induced apoptosis via the dephosphorylation of ERK/p90 ribosomal S6 kinase/heat shock protein 27 in SK-OV-3 cells," *Journal of Pineal Research*, vol. 52, no. 2, pp. 244–252, 2012.
- [120] H. Jang, O. H. Lee, Y. Lee et al., "Melatonin prevents cisplatin-induced primordial follicle loss via suppression of PTEN/AKT/FOXO3a pathway activation in the mouse ovary," *Journal of Pineal Research*, vol. 60, no. 3, pp. 336–347, 2016.
- [121] H. Jang, Y. Na, K. Hong et al., "Synergistic effect of melatonin and ghrelin in preventing cisplatin-induced ovarian damage via regulation of FOXO3a phosphorylation and binding to the p27^{kip1} promoter in primordial follicles," *Journal of Pineal Research*, vol. 63, no. 3, 2017.
- [122] R. S. Barberino, V. G. Menezes, A. E. A. S. Ribeiro et al., "Melatonin protects against cisplatin-induced ovarian damage in mice via the MT1 receptor and antioxidant activity," *Biology of Reproduction*, vol. 96, no. 6, pp. 1244–1255, 2017.
- [123] A. Zemla, I. Grzegorek, P. Dzięgiel, and K. Jabłońska, "Melatonin synergizes the chemotherapeutic effect of cisplatin in ovarian cancer cells independently of MT1 melatonin receptors," *In Vivo*, vol. 31, no. 5, pp. 801–809, 2018.
- [124] M. Akbarzadeh, M. Nouri, M. V. Banekohal et al., "Effects of combination of melatonin and laser irradiation on ovarian cancer cells and endothelial lineage viability," *Lasers in Medical Science*, vol. 31, no. 8, pp. 1565–1572, 2016.
- [125] K. Jablonska, B. Pula, A. Zemla et al., "Expression of melatonin receptor MT1 in cells of human invasive ductal breast carcinoma," *Journal of Pineal Research*, vol. 54, no. 3, pp. 334–345, 2013.
- [126] P. T. Ram, J. Dai, L. Yuan et al., "Involvement of the mt1 melatonin receptor in human breast cancer," *Cancer Letters*, vol. 179, no. 2, pp. 141–150, 2002.
- [127] J. M. Soares Jr., M. I. Masana, C. Erşahin, and M. L. Dubocovich, "Functional melatonin receptors in rat ovaries at various stages of the estrous cycle," *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, vol. 306, no. 2, pp. 694–702, 2003.
- [128] M. Baratta and C. Tamanini, "Effect of melatonin on the in vitro secretion of progesterone and estradiol 17 β by ovine granulosa cells," *Acta Endocrinologica*, vol. 127, no. 4, pp. 366–370, 1992.
- [129] A. V. Sirotkin, "Direct influence of melatonin on steroid, nonapeptide hormones, and cyclic nucleotide secretion by granulosa cells isolated from porcine ovaries," *Journal of Pineal Research*, vol. 17, no. 3, pp. 112–117, 1994.
- [130] J. Bódis, M. Koppán, L. Kornya, H. R. Tinneberg, and A. Török, "Influence of melatonin on basal and gonadotropin-stimulated progesterone and estradiol secretion of cultured human granulosa cells and in the superfused granulosa cell system," *Gynecologic and Obstetric Investigation*, vol. 52, no. 3, pp. 198–202, 2001.
- [131] H. Tamura, Y. Nakamura, S. Takiguchi et al., "Melatonin directly suppresses steroid production by preovulatory follicles in the cyclic hamster," *Journal of Pineal Research*, vol. 25, no. 3, pp. 135–141, 1998.

- [132] E. S. Schernhammer, B. Rosner, W. C. Willett, F. Laden, G. A. Colditz, and S. E. Hankinson, "Epidemiology of urinary melatonin in women and its relation to other hormones and night work," *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, vol. 13, no. 6, pp. 936–943, 2004.
- [133] X. Ren, X. Wu, S. G. Hillier et al., "Local estrogen metabolism in epithelial ovarian cancer suggests novel targets for therapy," *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 150, pp. 54–63, 2015.
- [134] F. Mungenast, S. Aust, I. Vergote et al., "Clinical significance of the estrogen-modifying enzymes steroid sulfatase and estrogen sulfotransferase in epithelial ovarian cancer," *Oncology Letters*, vol. 13, no. 6, pp. 4047–4054, 2017.
- [135] E. Damian and O. Ianăs, "Inhibition of testosterone-induced prostate growth in the rat by melatonin-free pineal extract," *Endocrinologie*, vol. 17, no. 4, pp. 241–244, 1979.
- [136] S. Persengiev and J. Kehajova, "Inhibitory action of melatonin and structurally related compounds on testosterone production by mouse Leydig cells in vitro," *Cell Biochemistry and Function*, vol. 9, no. 4, pp. 281–286, 1991.
- [137] M. B. Frungieri, A. Mayerhofer, K. Zitta, O. P. Pignataro, R. S. Calandra, and S. I. Gonzalez-Calvar, "Direct effect of melatonin on Syrian hamster testes: melatonin subtype 1a receptors, inhibition of androgen production, and interaction with the local corticotropin-releasing hormone system," *Endocrinology*, vol. 146, no. 3, pp. 1541–1552, 2005.
- [138] A. Mukherjee and C. Haldar, "Photoperiodic regulation of melatonin membrane receptor (MT1R) expression and steroidogenesis in testis of adult golden hamster, *Mesocricetus auratus*," *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, vol. 140, pp. 374–380, 2014.
- [139] F. Qin, J. Zhang, L. Zan et al., "Inhibitory effect of melatonin on testosterone synthesis is mediated via GATA-4/SF-1 transcription factors," *Reproductive Biomedicine Online*, vol. 31, no. 5, pp. 638–646, 2015.
- [140] K. Papantoniou, O. J. Pozo, A. Espinosa et al., "Increased and mistimed sex hormone production in night shift workers," *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, vol. 24, no. 5, pp. 854–863, 2015.
- [141] P. P. Banerjee, S. Banerjee, T. R. Brown, and B. R. Zirkin, "Androgen action in prostate function and disease," *American Journal of Clinical and Experimental Urology*, vol. 6, no. 2, pp. 62–77, 2018.
- [142] D. Hettel, A. Zhang, M. Alyamani, M. Berk, and N. Sharifi, "AR signaling in prostate cancer regulates a feed-forward mechanism of androgen synthesis by way of *HSD3B1* upregulation," *Endocrinology*, vol. 159, no. 8, pp. 2884–2890, 2018.
- [143] L. G. A. Chuffa, F. R. F. Seiva, W. J. Fávaro et al., "Melatonin and ethanol intake exert opposite effects on circulating estradiol and progesterone and differentially regulate sex steroid receptors in the ovaries, oviducts, and uteri of adult rats," *Reproductive Toxicology*, vol. 39, pp. 40–49, 2013.
- [144] T. Abbas and A. Dutta, "p21 in cancer: intricate networks and multiple activities," *Nature Reviews Cancer*, vol. 9, no. 6, pp. 400–414, 2009.
- [145] S. Cos, J. Recio, and E. J. Sánchez-Barceló, "Modulation of the length of the cell cycle time of MCF-7 human breast cancer cells by melatonin," *Life Sciences*, vol. 58, no. 9, pp. 811–816, 1996.
- [146] L. Mao, L. Yuan, L. M. Slakey, F. E. Jones, M. E. Burow, and S. M. Hill, "Inhibition of breast cancer cell invasion by melatonin is mediated through regulation of the p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathway," *Breast Cancer Research*, vol. 12, no. 6, article R107, 2010.
- [147] A. Rimler, H. Matzkin, and N. Zisapel, "Cross talk between melatonin and TGF β 1 in human benign prostate epithelial cells," *Prostate*, vol. 40, no. 4, pp. 211–217, 1999.
- [148] A. Cucina, S. Proietti, F. D'Anselmi et al., "Evidence for a biphasic apoptotic pathway induced by melatonin in MCF-7 breast cancer cells," *Journal of Pineal Research*, vol. 46, no. 2, pp. 172–180, 2009.
- [149] M. A. A. el-Aziz, H. A. Hassan, M. H. Mohamed, A. R. M. A. Meki, S. K. H. Abdel-Ghaffar, and M. R. Hussein, "The biochemical and morphological alterations following administration of melatonin, retinoic acid and *Nigella sativa* in mammary carcinoma: an animal model," *International Journal of Experimental Pathology*, vol. 86, no. 6, pp. 383–396, 2005.
- [150] J. Wang, X. Xiao, Y. Zhang et al., "Simultaneous modulation of COX-2, p300, Akt, and Apaf-1 signaling by melatonin to inhibit proliferation and induce apoptosis in breast cancer cells," *Journal of Pineal Research*, vol. 53, no. 1, pp. 77–90, 2012.
- [151] C. H. Kim and Y. M. Yoo, "Melatonin induces apoptotic cell death via p53 in LNCaP cells," *Korean Journal of Physiology and Pharmacology*, vol. 14, no. 6, pp. 365–369, 2010.
- [152] P. Lissoni, F. Rovelli, F. Malugani, R. Bucovec, A. Conti, and G. J. Maestroni, "Anti-angiogenic activity of melatonin in advanced cancer patients," *Neuro Endocrinology Letters*, vol. 22, no. 1, pp. 45–47, 2001.
- [153] P. Cui, Z. Luo, H. Zhang et al., "Effect and mechanism of melatonin's action on the proliferation of human umbilical vein endothelial cells," *Journal of Pineal Research*, vol. 41, no. 4, pp. 358–362, 2006.
- [154] A. González-González, A. González, C. Alonso-González, J. Menéndez-Menéndez, C. Martínez-Campa, and S. Cos, "Complementary actions of melatonin on angiogenic factors, the angiopoietin/Tie2 axis and VEGF, in co-cultures of human endothelial and breast cancer cells," *Oncology Reports*, vol. 39, no. 1, pp. 433–441, 2018.
- [155] B. V. Jardim-Perassi, A. S. Arbab, L. C. Ferreira et al., "Effect of melatonin on tumor growth and angiogenesis in xenograft model of breast cancer," *PLoS One*, vol. 9, no. 1, article e85311, 2014.
- [156] J. H. M. Marques, A. L. Mota, J. G. Oliveira et al., "Melatonin restrains angiogenic factors in triple negative breast cancer by targeting miR-152-3p: *in vivo* and *in vitro* studies," *Life Sciences*, vol. 208, pp. 131–138, 2018.
- [157] P. Lissoni, S. Barni, S. Meregalli 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," *British Journal of Cancer*, vol. 71, no. 4, pp. 854–856, 1995.
- [158] S. Cos, R. Fernández, A. Güezmes, and E. J. Sánchez-Barceló, "Influence of melatonin on invasive and metastatic properties of MCF-7 human breast cancer cells," *Cancer Research*, vol. 58, no. 19, pp. 4383–4390, 1998.
- [159] T. F. Borin, A. S. Arbab, G. B. Gelaleti et al., "Melatonin decreases breast cancer metastasis by modulating Rho-associated kinase protein-1 expression," *Journal of Pineal Research*, vol. 60, no. 1, pp. 3–15, 2016.

- [160] L. Mao, R. T. Dauchy, D. E. Blask et al., "Circadian gating of epithelial-to-mesenchymal transition in breast cancer cells via melatonin-regulation of GSK3 β ," *Molecular Endocrinology*, vol. 26, no. 11, pp. 1808–1820, 2012.
- [161] N. do Nascimento Gonçalves, J. Colombo, J. R. Lopes et al., "Effect of melatonin in epithelial mesenchymal transition markers and invasive properties of breast cancer stem cells of canine and human cell lines," *PLoS One*, vol. 11, no. 3, article e0150407, 2016.
- [162] L. Mao, W. Summers, S. Xiang et al., "Melatonin represses metastasis in *Her2*-positive human breast cancer cells by suppressing RSK2 expression," *Molecular Cancer Research*, vol. 14, no. 11, pp. 1159–1169, 2016.
- [163] P. Lissoni, S. Barni, M. Mandalà et al., "Decreased toxicity and increased efficacy of cancer chemotherapy using the pineal hormone melatonin in metastatic solid tumour patients with poor clinical status," *European Journal of Cancer*, vol. 35, no. 12, pp. 1688–1692, 1999.
- [164] P. Lissoni, G. Tancini, F. Paolorossi et al., "Chemoneuroendocrine therapy of metastatic breast cancer with persistent thrombocytopenia with weekly low-dose epirubicin plus melatonin: a phase II study," *Journal of Pineal Research*, vol. 26, no. 3, pp. 169–173, 1999.
- [165] K. Greish, I. Sanada, Saad Ael-D et al., "Protective effect of melatonin on human peripheral blood hematopoietic stem cells against doxorubicin cytotoxicity," *Anticancer Research*, vol. 25, no. 6B, pp. 4245–4248, 2005.
- [166] Z. Nahleh, J. Pruemer, J. Lafollette, and S. Sweany, "Melatonin, a promising role in taxane-related neuropathy," *Clinical Medicine Insights: Oncology*, vol. 4, pp. 35–41, 2010.
- [167] H. F. Galley, B. McCormick, K. L. Wilson, D. A. Lowes, L. Colvin, and C. Torsney, "Melatonin limits paclitaxel-induced mitochondrial dysfunction in vitro and protects against paclitaxel-induced neuropathic pain in the rat," *Journal of Pineal Research*, vol. 63, no. 4, article e12444, 2017.
- [168] K. M. Eck, L. Yuan, L. Duffy et al., "A sequential treatment regimen with melatonin and all-trans retinoic acid induces apoptosis in MCF-7 tumour cells," *British Journal of Cancer*, vol. 77, no. 12, pp. 2129–2137, 1998.
- [169] M. Margheri, N. Pacini, A. Tani et al., "Combined effects of melatonin and all-trans retinoic acid and somatostatin on breast cancer cell proliferation and death: molecular basis for the anticancer effect of these molecules," *European Journal of Pharmacology*, vol. 681, no. 1–3, pp. 34–43, 2012.
- [170] E. Nooshin, D. Bashash, A. Safaroghli-Azar et al., "Melatonin promotes ATO-induced apoptosis in MCF-7 cells: proposing novel therapeutic potential for breast cancer," *Biomedicine & Pharmacotherapy*, vol. 83, pp. 456–465, 2016.
- [171] A. Kothari, A. Borges, A. Ingle, and L. Kothari, "Combination of melatonin and tamoxifen as a chemoprophylaxis against *N*-nitroso-*N*-methylurea-induced rat mammary tumors," *Cancer Letters*, vol. 111, no. 1–2, pp. 59–66, 1997.
- [172] S. Nowfar, S. R. Teplitzky, K. Melancon et al., "Tumor prevention by 9-*cis*-retinoic acid in the *N*-nitroso-*N*-methylurea model of mammary carcinogenesis is potentiated by the pineal hormone melatonin," *Breast Cancer Research and Treatment*, vol. 72, no. 1, pp. 33–43, 2002.
- [173] P. Kubatka, B. Bojková, M. Kassayová et al., "Combination of pitavastatin and melatonin shows partial antineoplastic effects in a rat breast carcinoma model," *Acta Histochemica*, vol. 116, no. 8, pp. 1454–1461, 2014.
- [174] R. T. Dauchy, S. Xiang, L. Mao et al., "Circadian and melatonin disruption by exposure to light at night drives intrinsic resistance to tamoxifen therapy in breast cancer," *Cancer Research*, vol. 74, no. 15, pp. 4099–4110, 2014.
- [175] L. G. de Almeida Chuffa, R. J. Reiter, and L. A. Lupi, "Melatonin as a promising agent to treat ovarian cancer: molecular mechanisms," *Carcinogenesis*, vol. 38, no. 10, pp. 945–952, 2017.

Article

Deciphering the Molecular Basis of Melatonin Protective Effects on Breast Cells Treated with Doxorubicin: TWIST1 a Transcription Factor Involved in EMT and Metastasis, a Novel Target of Melatonin

Javier Menéndez-Menéndez ¹, Francisco Hermida-Prado ^{2,3,†}, Rocío Granda-Díaz ^{2,3,†}, Alicia González ¹, Juana María García-Pedrero ^{2,3}, Nagore Del-Río-Ibisate ^{2,3}, Alicia González-González ¹, Samuel Cos ¹, Carolina Alonso-González ^{1,*} and Carlos Martínez-Campa ^{1,*}

¹ Department of Physiology and Pharmacology, School of Medicine, University of Cantabria and Instituto de Investigación Valdecilla (IDIVAL), 39011 Santander, Spain

² Department of Otolaryngology, Hospital Universitario Central de Asturias and Instituto de Investigación Sanitaria del Principado de Asturias, 33011 Oviedo, Spain

³ Instituto Universitario de Oncología del Principado de Asturias, University of Oviedo, 33011 Oviedo, Spain

* Correspondence: alonsogc@unican.es (C.A.-G.); martinezc@unican.es (C.M.-C.)

† These authors equally contributed to this work.

Received: 30 April 2019; Accepted: 16 July 2019; Published: 19 July 2019



Abstract: Melatonin mitigates cancer initiation, progression and metastasis through inhibition of both the synthesis of estrogens and the transcriptional activity of the estradiol-ER (Estrogen receptor) complex in the estrogen-dependent breast cancer cell line MCF-7. Moreover, melatonin improves the sensitivity of MCF-7 to chemotherapeutic agents and protects against their side effects. It has been described that melatonin potentiates the anti-proliferative effects of doxorubicin; however, the molecular changes involving gene expression and the activation/inhibition of intracellular signaling pathways remain largely unknown. Here we found that melatonin enhanced the anti-proliferative effect of doxorubicin in MCF-7 but not in MDA-MB-231 cells. Strikingly, doxorubicin treatment induced cell migration and invasion, and melatonin effectively counteracted these effects in MCF-7 but not in estrogen-independent MDA-MB-231 cells. Importantly, we describe for the first time the ability of melatonin to downregulate TWIST1 (Twist-related protein 1) in estrogen-dependent but not in estrogen-independent breast cancer cells. Combined with doxorubicin, melatonin inhibited the activation of p70S6K and modulated the expression of breast cancer, angiogenesis and clock genes. Moreover, melatonin regulates the levels of TWIST1-related microRNAs, such as miR-10a, miR-10b and miR-34a. Since TWIST1 plays a pivotal role in the epithelial to mesenchymal transition, acquisition of metastatic phenotype and angiogenesis, our results suggest that inhibition of TWIST1 by melatonin might be a crucial mechanism of overcoming resistance and improving the oncostatic potential of doxorubicin in estrogen-dependent breast cancer cells.

Keywords: melatonin; breast cancer; doxorubicin; chemotherapy; MCF-7 cells; TWIST1; p70S6K; miR-10b

1. Introduction

Melatonin is an indolamine mainly secreted by the pineal gland during the night. It is a multitasking molecule acting through various mechanisms (e.g., G-protein coupled membrane receptors, interactions with orphan receptors or cytosolic molecules such as calmodulin), thereby playing multiple

different roles as an antioxidant, immunomodulatory, endocrine regulatory molecule, circadian rhythm synchronizer or anticancer agent controlling cell physiology [1–3]. Melatonin prevents cancer at the initiation, tumor progression and metastatic dissemination [4,5]. In particular, the oncostatic actions of melatonin have been largely described in hormone-dependent tumors, either when administered alone or in combination with chemotherapeutic agents [6–8].

In breast cancer, the pineal hormone controls the transcriptional activity of the estradiol-estrogen receptor complex, therefore behaving as a selective estrogen receptor modulator (SERM), and also diminishes the production of estrogens through the regulation of the enzymes involved in estrogen activation/inactivation, thus behaving as a selective estrogen enzyme modulator (SEEM) [9–11].

Melatonin has been tested in combination with different molecules and, as such, beneficial effects have been demonstrated in preclinical studies [12], in vivo animal models [13,14] and in vitro cellular models [15].

Melatonin sensitizes the estrogen-dependent breast cancer cell line MCF-7 to doxorubicin by increasing its intracellular concentration, probably through inhibition of the P-glycoprotein [16]. Conversely, disruption of nocturnal melatonin driven by light-at-night in a model of MCF-7 cancer xenografts grown in nude rats induces doxorubicin resistance that involves inhibition of phospho-AKT activation. Importantly, melatonin acts dually as a tumor inhibitor and a circadian regulatory molecule, thereby contributing to re-establish the sensitivity of breast tumors to doxorubicin, probably by suppression of the Warburg effect (related to phospho-activation of AKT) and by inhibition of various transcription factors such as STAT3 and NF- κ B and proliferation and survival pathways including the EGF and ERK families [17]. In both MCF-7 cells and rats bearing ER-responsive mammary tumors, melatonin cooperates with doxorubicin resulting in lighter tumor weights, increased apoptosis, higher expression of E-cadherin and higher survival rate, therefore indicating that melatonin potentiates tumor sensitivity to doxorubicin [18,19].

However, the molecular basis of the protective role of melatonin and the impact on doxorubicin response of breast cancer cells still largely remain to be elucidated. This prompted us to perform a thorough analysis to decipher the functional role of melatonin on doxorubicin-treated breast cancer cells and to identify the molecular mechanisms and signaling pathways involved in the regulation by melatonin. We found that melatonin enhanced the anti-proliferative effect of doxorubicin and counteracted the stimulatory effect of the anthracycline on cell migration and invasion in MCF-7 cells. The pineal hormone inhibited activation of the Akt and p70S6 kinases and modulated multiple changes in the expression of cancer, angiogenesis and clock genes. Importantly, we describe for the first time the ability of melatonin to counteract the stimulatory effect of doxorubicin on TWIST1 (Twist-related protein 1) expression and protein levels in estrogen-dependent but not in estrogen-independent breast cancer cells. TWIST1 is involved in epithelial to mesenchymal transition and cancer metastasis and its up-regulation correlates to poor survival [20–22].

Finally, we found that melatonin produced a significant regulation of several TWIST1-related miRNAs which expression was altered by doxorubicin. Among them, melatonin was able to revert the stimulatory effect of doxorubicin on the expression of miR-10b, known to be induced by TWIST1, thus contributing to the acquisition of the metastatic phenotype and stimulation of angiogenesis [23,24].

Our results revealed that melatonin modulated multiple changes induced by doxorubicin, and we found, for the first time, that melatonin counteracted the stimulatory effect of doxorubicin on the expression of TWIST1 in breast cancer cells.

2. Results

2.1. Effects of Melatonin and Doxorubicin on the Proliferation of MCF-7 and MDA-MB-231 Cells

We first investigated the ability of melatonin to modulate the anti-proliferative effects of doxorubicin, by using two different breast cancer cell lines: the hormone-dependent MCF-7 and the hormone-independent MDA-MB-231.

As expected, doxorubicin inhibited the proliferation of MCF-7 cells in a dose dependent manner (Figure 1A). We next tested the effect of the addition of physiological doses of melatonin (1 nM) to cell cultures treated with doxorubicin ranging from 10 to 1 nM. After 3 days of treatment, the proliferation of MCF-7 cells decreased at doxorubicin concentrations of 5 and 10 nM. Lower concentrations of doxorubicin had no effect on cell proliferation. Co-treatment with a physiological dose of melatonin (1 nM) led to a significant further decrease in cell proliferation compared to cells treated with doxorubicin alone (Figure 1B). However, in the triple-negative breast cancer cell line MDA-MB-231, co-treatment with melatonin (1 nM) did not significantly alter the inhibitory effect of doxorubicin at any of the (even high) doses tested (Figure 1C).

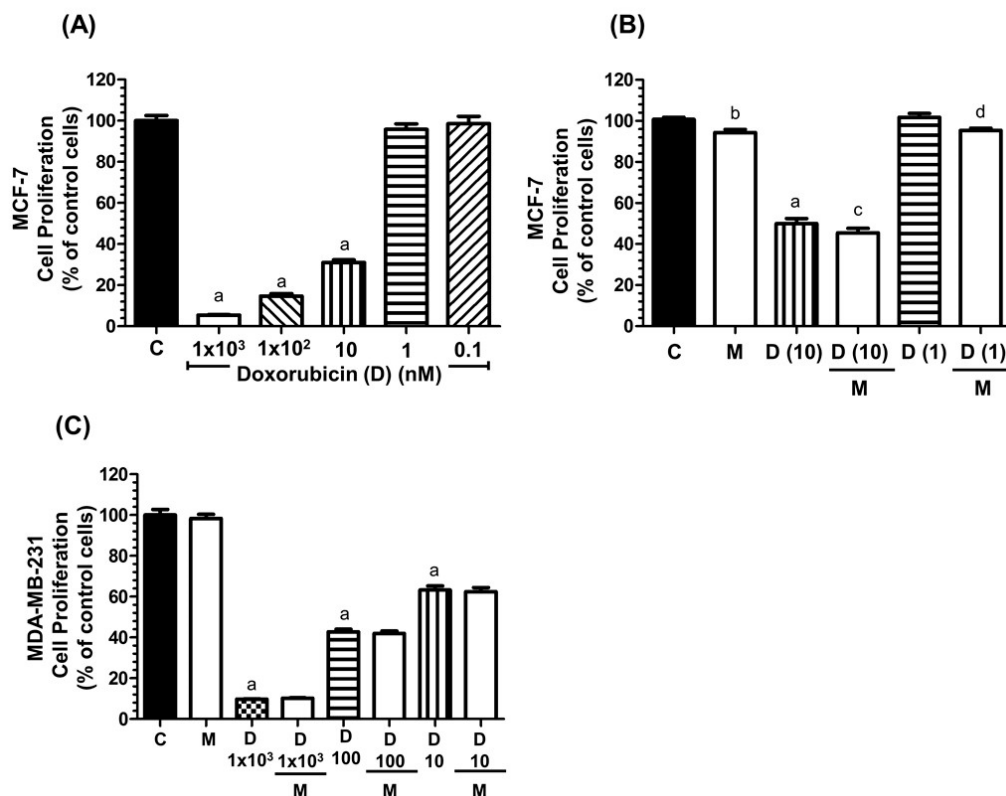


Figure 1. Effects of doxorubicin (D) and melatonin (M) on the proliferation of breast cancer cells. Cell proliferation was measured by the MTT [3(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] method after 3 days of incubation with the different treatments specified below. **(A)** MCF-7 cells were seeded into 96-well plates in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) supplemented with 10% FBS and treated with vehicle (control) or doxorubicin (ranging from 1 μ M to 0.1 nM). **(B)** MCF-7 cells were seeded into 96-multiwell plates in DMEM supplemented with 10% FBS and treated with doxorubicin (10 nM or 1 nM) alone or in combination with melatonin (1 nM) and incubated at 37 °C for 3 days. Cell proliferation was measured by the MTT method. **(C)** MDA-MB-231 cells were seeded into 96-multiwell plates in DMEM supplemented with 10% FBS and treated with doxorubicin (ranging from 1 mM to 10 nM) alone or in combination with melatonin (1 nM). a, $p < 0.001$ vs. C; b, $p < 0.05$ vs. C; c, $p < 0.01$ vs. D (10 nM); d, $p < 0.01$ vs. D (1 nM).

2.2. Effects of Melatonin and Doxorubicin on Cell Migration and Invasion in MDA-MB-231 and MCF-7 Cells

We next investigated the effects of doxorubicin and melatonin on the migratory capacity of MCF-7 and MDA-MB-231 cells by using wound-healing assays. As shown in Figure 2A,B, doxorubicin treatment did not alter cell migration in MCF-7 cells, whereas melatonin significantly decreased cell migration either alone or in combination with doxorubicin. In marked contrast, neither doxorubicin nor melatonin had any effect on the migratory capacity of MDA-MB-231 cells (Figure 2C,D). When the

invasive potential was tested, we found that doxorubicin enhanced the invasive potential of MCF-7 cells, whereas addition of melatonin counteracted this stimulatory effect (Figure 2G,H). In contrast, the invasive potential of MDA-MB-231 was not altered by doxorubicin, and melatonin treatment did not have any significant effect (Figure 2E,F).

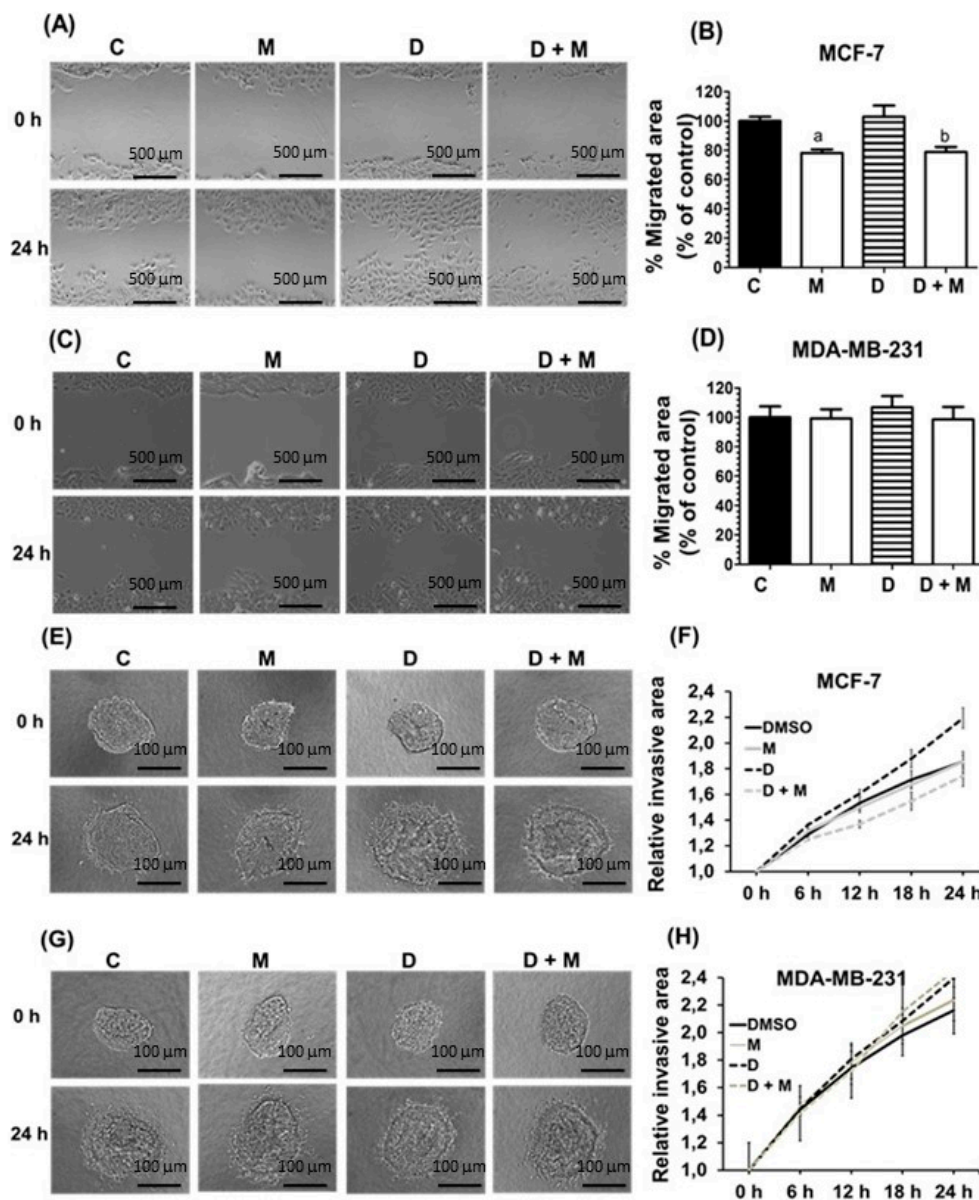


Figure 2. Effect of melatonin and doxorubicin on migration and on the invasive potential of MCF-7 and MDA-MB-231 cells. **A, C** Effects of melatonin (1 nM) and doxorubicin (1 μ M) on MCF-7 (**A**) or MDA-MB-231 (**C**) cell migration analyzed through the wound healing assay. Quantification of MCF-7 (**B**) or MDA-MB-231 (**D**) cell migration was expressed as mean $\pm$ SEM. Representative microphotographs of initial and after 24 h are shown. (**E, G**) Effects of melatonin (1 nM) and doxorubicin (1 μ M) on MCF-7 (**E**) or MDA-MB-231 (**G**) invasive potential. Representative images from the 3D invasion assays of cell spheroids embedded into a collagen matrix at initial ($t = 0$ h) and final time ($t = 24$ h) for the different treatments are shown. (**F, H**) Graphs represent the quantification of the invasive area of MDA-MB-231 (**F**) or MCF-7 (**H**) cells at the indicated times. Data was expressed as mean $\pm$ SEM. **A, C:** Scale bar: 500 μ m; **E, G:** Scale bar: 100 μ m.

2.3. Effects of Doxorubicin and Melatonin on the Expression of Cancer-Related Genes

We used the human breast cancer RT² Profiler PCR Array to assess the expression changes in MCF-7 cells upon treatment with doxorubicin (1 μ M) either alone or combined with a physiological dose of melatonin (1 nM). The RT² Profiler PCR Array allows the simultaneous analysis of 84 genes involved in various different key processes for breast cancer biology, such as angiogenesis, cell adhesion, proteases, breast cancer classification markers, signal transduction, cell cycle, transcription factors, apoptosis, DNA damage and repair. As shown in Table 1, doxorubicin alone upregulated the expression of 27 genes and downregulated 17 genes.

Table 1. The table summarizes the distribution of breast cancer gene categories induced or repressed in MCF-7 cells treated with doxorubicin (1 μ M), doxorubicin plus melatonin (1 nM) or melatonin (1 nM) for 6 h. Pathway-focused gene expression profiling was performed using the Human Breast Cancer RT² Profiler PCR Array. The number of up and downregulated genes in each category is indicated.

Breast Cancer Array	D vs. C		D + M vs. D		M vs. C	
	Up	Down	Up	Down	Up	Down
Angiogenesis, cell adhesion and proteases	5	3	2	1	0	2
Breast cancer classification markers	2	1	1	4	1	5
Signal transduction	8	3	3	5	3	6
Cell cycle	5	1	0	7	4	3
Apoptosis and DNA damage and repair	7	2	1	6	7	3
Transcription factors	0	7	2	3	2	3

D: Doxorubicin (1 μ M), M: Melatonin (1 nM), C: control.

When doxorubicin was combined with melatonin, only nine genes were upregulated and the number of downregulated genes increased to 26 (Table 1). Sixteen genes were selected for further validation by performing specific real time RT-PCR analysis, establishing as selection criteria an expression level change of at least 1.5-fold either with doxorubicin alone or in combination with melatonin compared to vehicle-treated (control) cells. Thus, we were able to confirm (Figure 3A) that doxorubicin (1 μ M) significantly induced the expression levels of *PTEN* (phosphatase and tensin homolog), *COP1* (constitutive photomorphogenic 1) and *CDKN1A* (cyclin-dependent kinase inhibitor 1A). These three genes are known to act as tumor suppressors in breast cancer, and their mutations can cause chemoresistance [25–27]. Combination with melatonin (1 nM) further enhanced the anthracyclin stimulatory effect. Importantly, melatonin counteracted the stimulatory effect of doxorubicin over the expression of *NME1* (a suppressor of metastasis in breast carcinoma) [28]; *MUC1* (a p53 suppressor) [29]; *SNAIL2* (involved in invasion and EMT) [30]; *BIRC5* (involved in doxorubicin resistance) [31]; and *TWIST1* (elevated in invasive breast cancer and involved in EMT [32,33]) (Figure 3A).

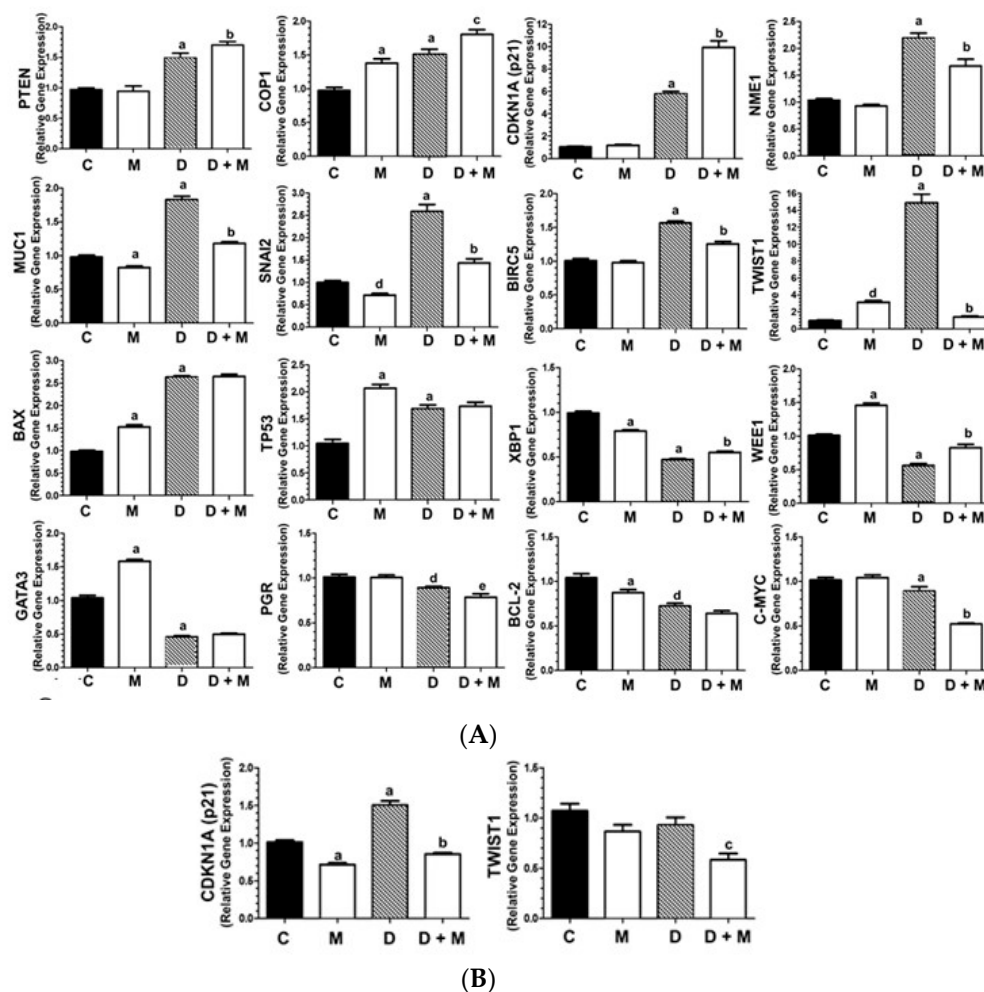


Figure 3. Gene expression profile of breast cancer related genes. (A) Validation of gene expression changes of selected 16 genes (>1.5 fold-change) by specific RT-PCR in MCF-7 cells treated with doxorubicin (1 μ M) and/or melatonin (1 nM). All data are expressed as fold changes relative to vehicle-treated (control) cells (mean $\pm$ SEM) from three independent experiments. (B) RT-PCR analysis of *TWIST1* and *CDKN1A* genes in MDA-MB-231 cells treated with doxorubicin (1 μ M) and/or melatonin (1 nM) for 6 h. Data are expressed as fold changes relative to control cells (mean $\pm$ SEM) from three independent experiments. a, $p < 0.001$ vs. C; b, $p < 0.001$ vs. D; c, $p < 0.01$ vs. D; d, $p < 0.05$ vs. C; e, $p < 0.01$ vs. D.

In some other cases, melatonin did not significantly change the expression levels of doxorubicin inducers (*BAX2*, *TP53*). *BAX2* and *TP53* are largely described as apoptosis inducers [34]. Finally, the pineal hormone further enhanced the inhibition of gene expression induced by doxorubicin, as in the case of *XBP1* (a promoter of tumor invasion) [35]; *WEE1* (involved in checkpoint progression) [36]; *GATA3* (highly expressed in estrogen dependent breast cancers) [37]; *PGR*, that usually is overexpressed in estrogen positive breast carcinomas [38] and *BCL-2*, a pro-survival protein whose targeting enhances vulnerability to therapy in ER-positive breast cancer [39]. The expression of the oncogene *c-MYC* [40] was slightly downregulated by doxorubicin and dramatically inhibited by melatonin co-treatment (Figure 3A).

The effect of combined treatment with doxorubicin and melatonin on gene expression was also tested in the triple negative hormone-independent MDA-MB-231 cell line. The expression of *TWIST1* and *CDKN1A* genes were prioritized for analysis, since the expression levels of these two genes were found to dramatically change and be highly modulated by melatonin in MCF-7 cells. An increase on the expression of *CDKN1A* was obtained after treatment with the anthracyclin; however, the expression of

TWIST1 was not stimulated by doxorubicin in this cell line. The addition of melatonin and doxorubicin together seem to cooperate to reach an additive effect on *TWIST1* inhibition in MDA-MB-231, although the inhibition reached after addition of melatonin is not as (Figure 3B).

2.4. *TWIST1* Protein Levels Are Upregulated by Doxorubicin and Inhibited by Melatonin in MCF-7 Cells

As shown in Figure 3A, doxorubicin treatment induced a potent stimulation of *TWIST1* expression whereas co-treatment with melatonin counteracts this effect. For this reason, the protein levels of *TWIST1* were determined by confocal microscopy and immunoblotting. As seen in Figure 4A, *TWIST1* protein expression increased upon treatment with doxorubicin; however, melatonin alone or combined with doxorubicin decreased *TWIST1* levels. We also tested the levels of ER α (Estrogen Receptor alpha), since it is known that: melatonin downregulates ER in MCF-7 cells [41], doxorubicin upregulates ER [42], and high levels of *TWIST1* correlate with low levels of ER [43]. We found that the levels of ER α were also downregulated by melatonin (Figure 4B). Therefore, analogous regulation of *TWIST1* expression by doxorubicin and melatonin was observed at both mRNA and protein levels in MCF-7 cells, which seem to be associated to ER expression (the whole western blots are available in supplementary data, Figure S1; the quantification of the density of the bands can be seen in supplementary data, Figure S3).

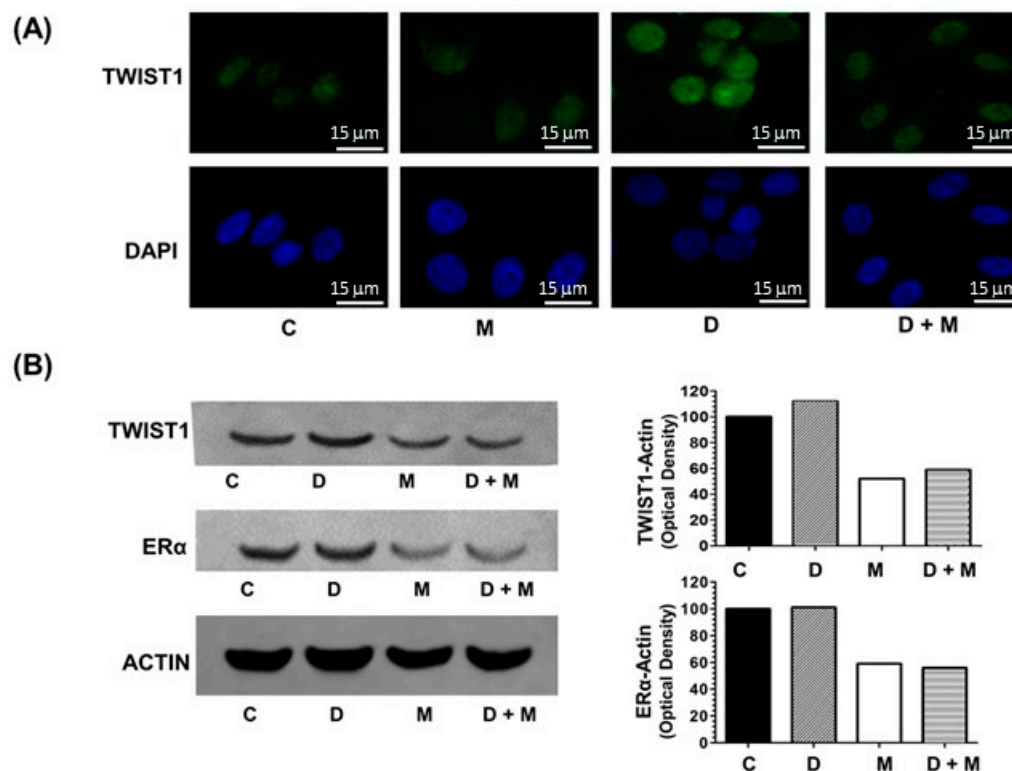


Figure 4. (A) *TWIST1* detection by immunofluorescence (IF). MCF-7 cells treated for 12 h with doxorubicin (1 μM) and/or melatonin (1 nM) were fixed with formaldehyde and analyzed by IF microscopy after staining with anti-*TWIST1* antibody and DAPI (4′6-diamidino-2-phenylindole). (B) Western blotting detection of *TWIST1* and ER α in MCF-7 cells treated for 12 h with doxorubicin (1 μM) and/or melatonin (1 nM). B-actin was used as loading control. Scale bar: 15 μm.

2.5. *TWIST1* Gene Expression Is Regulated by Co-Culture of MCF-7 with Adipocytes

Adipocytes induce EMT in breast cancer cells, and *TWIST1* upregulation among other factors. On this basis, we examined whether adipocytes may induce the expression of *TWIST1* in breast cancer cells. The expression levels of *CDKN1A* gene were stimulated by adipocytes co-culture, potentiated by doxorubicin and further increased by melatonin (Figure 5A). Co-culture of MCF-7 cells with adipocytes

increased the expression levels of the *TWIST1* gene, and doxorubicin treatment further enhanced *TWIST1* levels. Co-treatment with melatonin diminished doxorubicin-induced expression of *TWIST1* (Figure 5B).

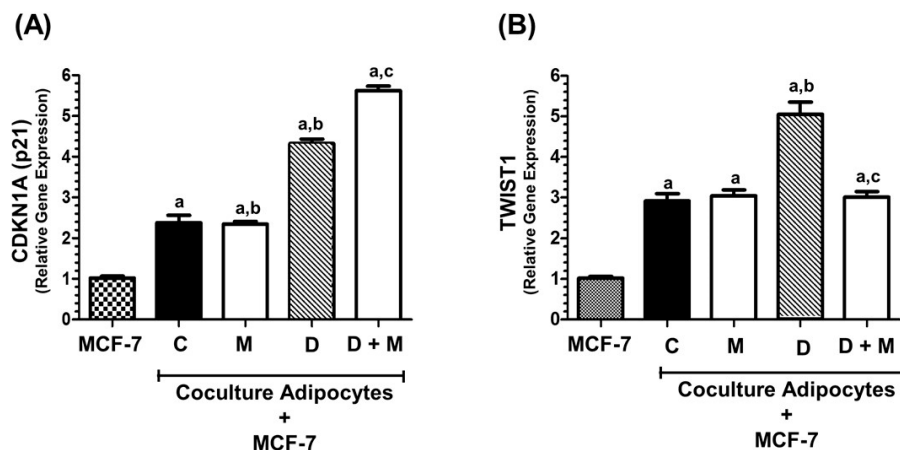


Figure 5. Effects of doxorubicin and/or melatonin on *CDKN1A* and *TWIST1* mRNA expression in MCF-7 cells co-cultured with mature adipocytes. Confluent human breast pre-adipocytes were differentiated in adipocyte differentiation media. MCF-7 cells and differentiated adipocytes were co-cultured as described in Materials and Methods, in the presence or absence of melatonin (1 nM) and/or doxorubicin (1 μ M) or vehicle (ethanol at a final concentration lower than 0.0001%). Control MCF-7 cells were grown in the absence of adipocytes (column designated as MCF-7). After 24 h, total RNA was isolated from MCF-7 cells, reverse transcribed and cDNAs were used for analysis of (A) *CDKN1A* and (B) *TWIST1* mRNA expression by real time RT-PCR. All data are expressed as fold change relative to control cells (mean $\pm$ SEM) from three independent experiments. a, $p < 0.001$ vs. A; b, $p < 0.001$ vs. C; c, $p < 0.001$ vs. D.

2.6. Effects of Doxorubicin and Melatonin on the Expression of Angiogenesis-Related Genes

We used the human angiogenesis RT² Profiler PCR Array, to determine the gene expression changes in MCF-7 cells upon treatment with doxorubicin (1 μ M) either alone or in combination with melatonin (1 nM). The angiogenesis RT² Profiler PCR Array allows the simultaneous analysis of 84 genes involved in different processes linked to angiogenesis.

Doxorubicin alone upregulated the expression of 16 genes and downregulated eight genes involved in different aspects of angiogenesis (e.g., cell adhesion regulation, matrix degradation or growth factors) (Table 2). When both compounds were combined, the number of upregulated genes was reduced to five, whereas 14 genes were downregulated. To further validate these data, eight genes were selected (>1.5-fold change) and specifically analyzed by real time RT-PCR. Doxorubicin (1 μ M) was found to significantly stimulate the expression of *PLG* (plasminogen, downregulated by Twist1 inhibitors [44]; *ANGPT2* (involved in breast cancer metastasis in brain) [45]; *IGF-1* (a stimulator of TWIST1) [46] and *GLI1* (activated upon TWIST1 activation) [47]. Co-treatment with melatonin (1 nM) blocked, at least partially, the stimulatory effect of the anthracycline (Figure 6). The expression of *VEGFA* (inducer of angiogenesis) [48] and *AKT1* (inducer of TWIST1 activation) [49] was also significantly reduced by combined treatment with doxorubicin and melatonin, while *SERPINE1* expression was unaffected by melatonin. Finally, the expression of the protease inhibitor *TIMP2* was independent of doxorubicin, but induced by melatonin (Figure 6).

Table 2. The table summarizes the number of angiogenesis related genes which expression was induced or repressed in MCF-7 cells treated with doxorubicin (1 μ M), doxorubicin plus melatonin (1 nM) or melatonin (1 nM) for 6 h. Genes were grouped as “adhesion molecules”, “proteases, inhibitors and matrix proteins”, “cytokines and other factors” and “growth factors and receptors”. Pathway-focused gene expression profiling was performed using the Human Angiogenesis RT² Profiler PCR Array.

Angiogenesis Array	D vs. C		D + M vs. D		M vs. C	
	Up	Down	Up	Down	Up	Down
Adhesion molecules	4	0	0	2	0	1
Proteases, inhibitors and matrix proteins	4	2	1	5	2	1
Cytokines and other factors	0	3	1	3	0	0
Growth factors and receptors	8	3	3	4	2	0

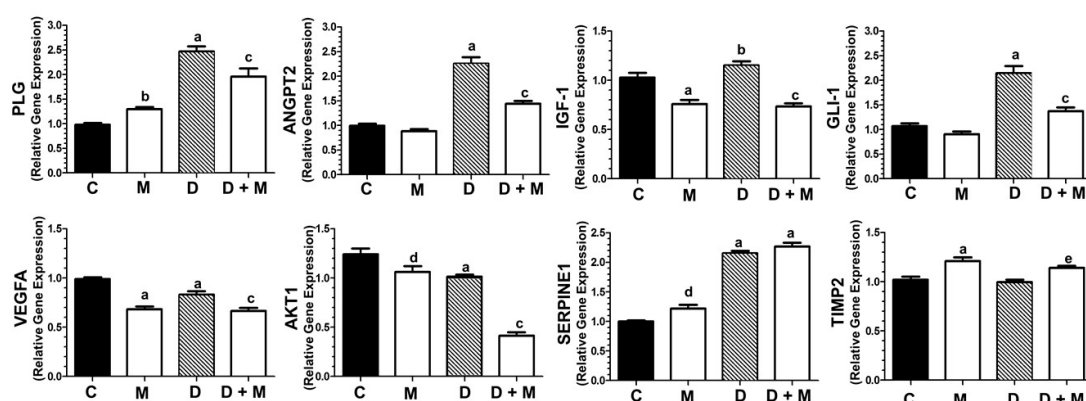


Figure 6. Gene expression profile of angiogenesis related genes. Effect of doxorubicin (1 μ M) and/or melatonin (1 nM) on the gene expression in MCF-7 cells of the genes selected for analysis by specific RT-PCR: *PLG*, *ANGPT2*, *IGF1*, *GLI1*, *VEGFA*, *AKT1*, *SERPINE1* and *TIMP2*. All data are expressed as fold changes relative to control cells (mean $\pm$ SEM) from three independent experiments. a, $p < 0.001$ vs. C; b, $p < 0.001$ vs. C; c, $p < 0.001$ vs. D; d, $p < 0.01$ vs. C; e, $p < 0.01$ vs. D.

2.7. Effects of Doxorubicin and Melatonin on the Expression of Clock Genes

Since the inactivation of *CLOCK* genes seems to be a mechanism involved in breast cancer risk [50], we next assessed the effect of doxorubicin and melatonin on the expression of nine genes components of the circadian clock system. Doxorubicin alone enhanced the transcription of six genes and melatonin alone stimulated the expression of seven genes. The combination of both compounds remarkably enhanced the expression of *CRY1*, *CRY2*, *CLOCK*, *Npas2*, *BMAL1*, *BMAL2* and *PER2*. Only *TIMELESS* expression was enhanced by doxorubicin whereas the stimulatory effect of the anthracycline was partially counteracted by melatonin. *PER3* expression was independent of doxorubicin and stimulated by the presence of melatonin (Figure 7).

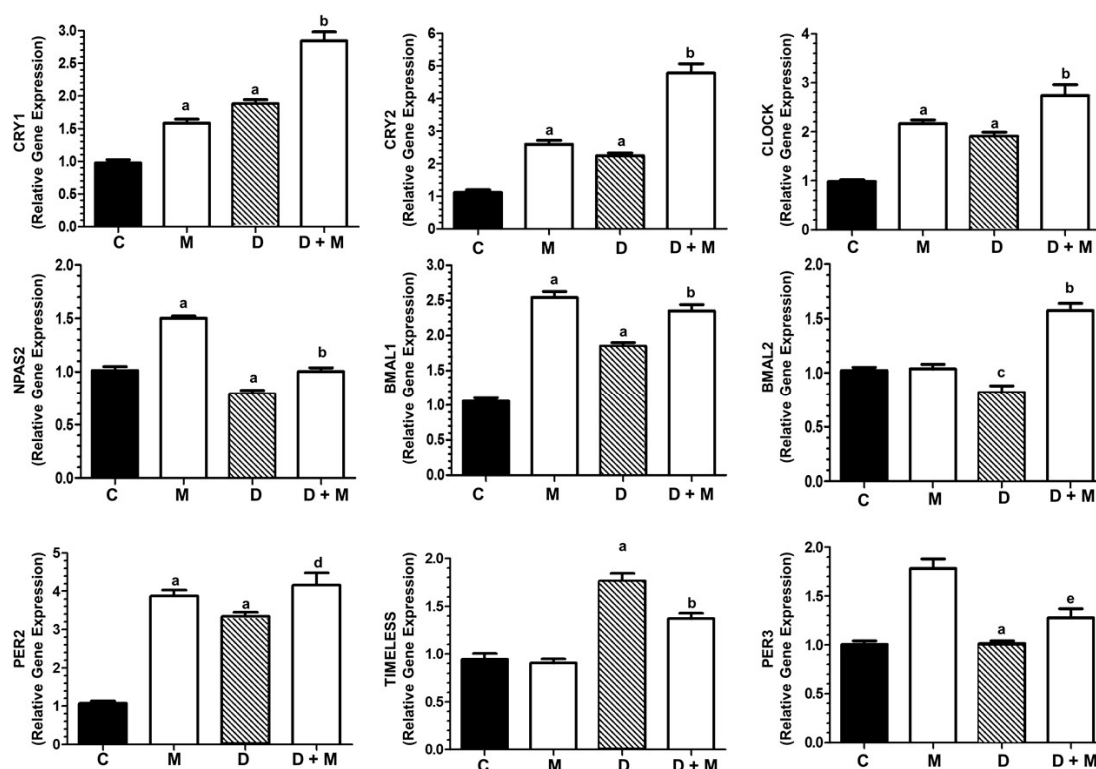


Figure 7. Expression of CLOCK genes. CLOCK genes expression changes upon treatment with doxorubicin (1 μ M) and/or melatonin (1 nM) in MCF-7 cells. The following clock genes were selected for analysis by specific RT-PCR: *CRY1*, *CRY2*, *CLOCK*, *NPas2*, *BMAL1*, *BMAL2*, *PER2*, *TIMELESS* and *PER3*. All data are expressed as fold changes relative to control cells (mean $\pm$ SEM) from three independent experiments. a, $p < 0.001$ vs. C; b, $p < 0.001$ vs. D; c, $p < 0.01$ vs. C; d, $p < 0.01$ vs. D; e, $p < 0.05$ vs. D.

2.8. Combination of Melatonin and Doxorubicin on Kinase Intracellular Regulators

Next, we investigated the effect of treatment with doxorubicin and melatonin of MCF-7 cells on the activation/inactivation status of protein kinases by phosphorylation. This was accomplished by using the Proteome ProfilerTM Array (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) to test the level of phosphorylation of multiple protein kinases involved in different intracellular signaling pathways.

As shown in Figure 8A, doxorubicin induced the phosphorylation levels of p70S6 Kinase and this effect was counteracted by co-treatment with melatonin. The level of p70S6 Kinase phosphorylation relative to vehicle-treated control cells is represented in Figure 8B. The state of phosphorylation of Akt (S473) and mTOR (S2448) (as upstream regulators of p70S6 kinase) and the ribosomal protein S6 (S240) (as downstream target) were analyzed by western-blot. Melatonin alone reduced p-mTOR and both total and p-Akt levels. The levels of p-Akt (Ser 473) and total Akt were lower in MCF-7 cells treated with doxorubicin plus melatonin in comparison with cells treated only with doxorubicin (Figure 8C). The levels of p-S6 also decreased by melatonin treatment either alone or administered with doxorubicin (Figure 8D). (The whole western blots are available in supplementary data, Figure S2; Quantification of the density of the bands is available in supplementary data, Figures S4 and S5).

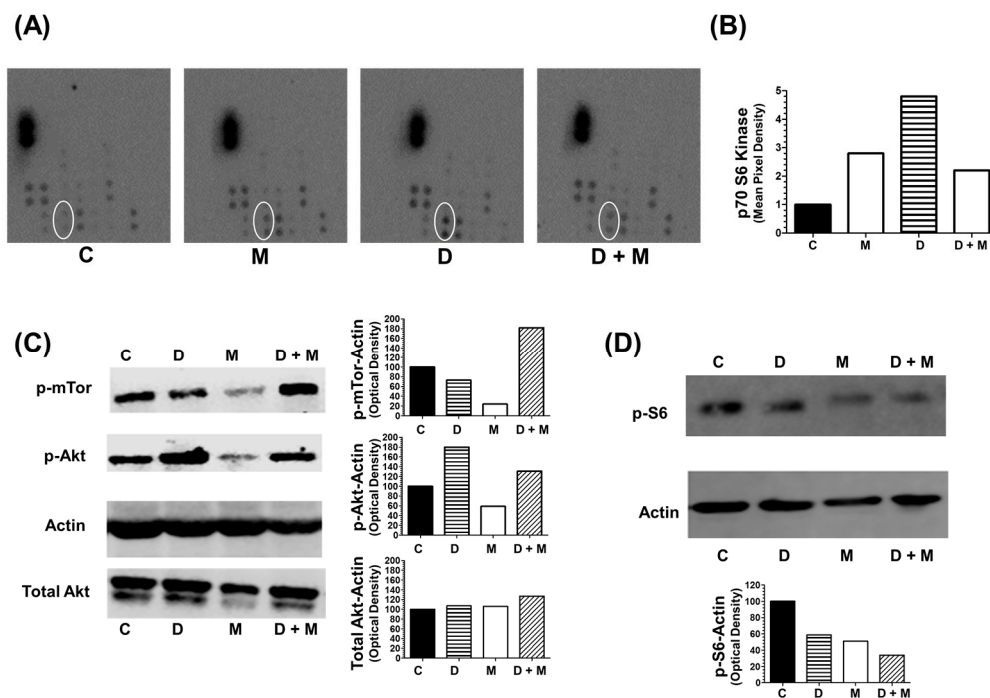


Figure 8. State of phosphorylation of protein kinases. (A) Representative images of phospho-kinase array blots assayed with protein extracts from MCF-7 cells, indicative the state of phosphorylation of multiple kinases was assayed using the Proteome Profiler™ Array and protein extracts from MCF-7 cells treated for 6 h with doxorubicin (1 μ M) and/or melatonin (1 nM). The white oval remarks the dots corresponding to p70S6K levels. (B) The intensity of the signal of the dots corresponding to p70S6K was quantified by densitometry and expressed relative to the control. (C) Western blotting detection of phosphorylated mTOR (S2448), total Akt and phosphorylated Akt (S473) in MCF-7 cells treated for 6 h with doxorubicin (1 μ M) and/or melatonin (1 nM). (D) Western blotting detection of S6 phosphorylation (S240/S244) in MCF-7 cells treated for 6 h with doxorubicin (1 μ M) and/or melatonin (1 nM).

2.9. Doxorubicin and Melatonin Modulate the Expression of miR-34a, miR-29a, miR-31, miR-10a, miR145 and miR-10b in MCF-7 Cells

MicroRNAs can function either as oncogenes or tumor suppressors by regulating intracellular signaling pathways [51]. Therefore, we decided to test the effect of doxorubicin and melatonin on the expression of various miRNAs involved in epithelial to mesenchymal transition (EMT), cell growth, migration, invasion, stem cell expansion and breast cancer progression, in correlation or not with TWIST1. As shown in Figure 9, the expression of miR-34a was stimulated by doxorubicin and further increased by melatonin co-treatment. miR-10b levels were also robustly induced by doxorubicin, although completely reduced by melatonin co-treatment. Contrasting this, miR-29a expression and miR-31 levels diminished by doxorubicin and melatonin co-treatment. The expression of miR-145, stimulated by doxorubicin, was not altered by melatonin co-treatment. The anthracycline induced the expression of miR-10a, and melatonin significantly reduced this effect.

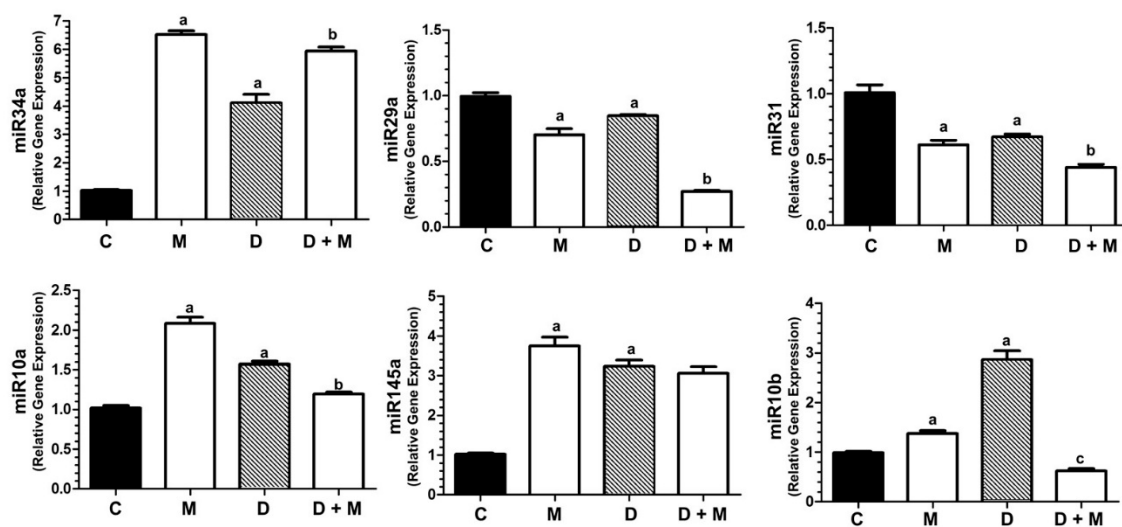


Figure 9. RT-PCR detection of miR-34a, miR-29a, miR-31, miR-10a, miR-145 and miR-10b. miRNA levels were analyzed in MCF-7 cells treated with doxorubicin alone (1 μ M) and/or melatonin (1 nM) or vehicle (ethanol at a final concentration lower than 0.0001%). All data are expressed as fold change relative to control cells (mean $\pm$ SEM) from three independent experiments. a, $p < 0.001$ vs. C; b, $p < 0.001$ vs. D; c, $p < 0.01$ vs. C.

2.10. TWIST1 Blockade Abolishes the Stimulatory Effect of Doxorubicin on the Expression of miR-10b, miR-10a and VEGFA

We next investigated the effect of knocking down *TWIST1* in MCF-7 cells. For this purpose, MCF-7 cells were transfected with either siCONTROL or siTWIST1, and expression of miR-10b, miR-10a and *VEGFA* was determined. As seen in Figure 10, the blockade of *TWIST1* completely abolished the strong induction of miR-10b, and also significantly diminished the induction of miR-10a by doxorubicin. In addition, the expression levels of *PLG*, *BIRC5* and *VEGFA* were significantly induced by doxorubicin in siControl-transfected MCF-7 cells and dramatically reduced by melatonin cotreatment; however, the expression changes observed upon doxorubicin and combination treatment with melatonin were completely abolished in siTWIST1-transfected cells. These data indicate that these expression changes caused by treatment with doxorubicin and melatonin are at least partially mediated by *TWIST1*.

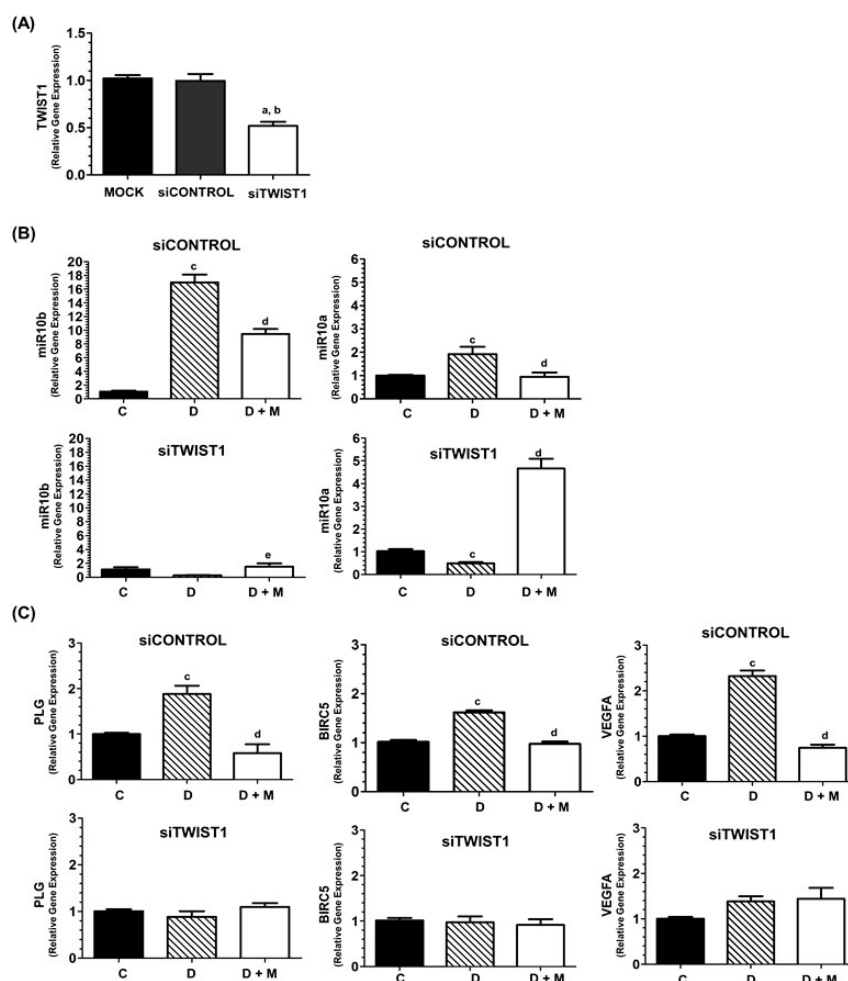


Figure 10. (A) RT-PCR detection of TWIST1 levels in MCF-7 cells transfected in the absence of siRNA (mock column), siControl or specific siTWIST1. (B) RT-PCR detection of miR-10b and miR-10a in MCF-7 cells transfected with siControl or siTWIST1. (C) RT-PCR detection of *PLG*, *BIRC5* and *VEGFA* levels in MCF-7 cells transfected with siControl or siTWIST1. After 72 h transfection, cells were treated for 6 h with doxorubicin alone (1 μ M) and doxorubicin plus melatonin (1 nM) or vehicle (ethanol at a final concentration lower than 0.0001%). All data are expressed as fold change relative to control cells (mean $\pm$ SEM) from three independent experiments. a, $p < 0.001$ vs. mock; b, $p < 0.0001$ vs. siControl; c, $p < 0.001$ vs. C; d, $p < 0.001$ vs. doxorubicin.

3. Discussion

The American Cancer Society reports that more than 70% of breast cancers are, at their initial stages, hormone-dependent [52], meaning that their growth is promoted by estrogens. When the tumor spreads out the breast, chemotherapy is a therapeutic option. Anthracyclines such as doxorubicin are amongst the most common drugs used for adjuvant and neoadjuvant chemotherapy. Doxorubicin binds to DNA in an intercalation process forming a stable complex [53]. Chemotherapy treatments provoke undesirable severe side effects and development of acquired chemoresistance, involving a variety of molecular events still not fully elucidated [54]. Thus, the use of adjuvant compounds might help to overcome resistance, to diminish side effects, and to improve drug tolerance. Although many of the gene expression and post-translational modifications triggered by chemotherapeutic drugs have been characterized [7,8,55], there are many molecular modifications triggered in tumor cells in response to chemotherapy remaining largely unknown.

Melatonin behaves as a protective agent against doxorubicin-induced toxicity [56,57], enhancing apoptosis and cytotoxicity in cancer cells [19,58,59]. In rats, melatonin sensitizes mammary tumors

to doxorubicin [18]; disruption of melatonin nocturnal production lead to a complete loss of tumor sensitivity to doxorubicin [17]. Yet most of the molecular mechanisms triggered by doxorubicin and modulated by melatonin remain unknown. As we have previously done for docetaxel [15], the aim of this work was to deepen into the knowledge of the molecular mechanisms triggered by doxorubicin and modified by the combination of doxorubicin and melatonin in breast cancer cells.

First, we tested the effect of doxorubicin and melatonin on the proliferation, migration and invasion of MCF-7 and MDA-MB-231 cells. Melatonin potentiated the inhibitory effect of the anthracycline on MCF-7 proliferation, inhibited migration (independent of doxorubicin) and the invasive potential in MCF-7 cells, counteracting the stimulatory effect of the anthracycline, but not in MDA-MB-231 cells, indicating that the effectiveness of melatonin may be related to the estrogen receptor status.

When we examined the gene expression profile of breast cancer related genes in MCF-7 cells, we found that melatonin modulated some of the changes induced by doxorubicin. We further analyzed the expression of 16 genes by specific RT-PCR. In some cases, melatonin and doxorubicin cooperated to stimulate gene expression: *PTEN*, a tumor suppressor gene whose mutations (particularly in breast cancer) cause chemoresistance [25]. *CDKN1A* (p21), the tumor suppressor controlling cell cycle and tumor progression, although, recently, it has been described that overexpression and an abnormal subcellular localization of p21 might correlate with poor response to chemotherapy [26]. *COP1*, another factor with a controversial effect in cancer, since it has been described both as involved in resistance to doxorubicin in leukemia cells [60] and as a suppressor of breast cancer progression [27].

Not all the tumor suppressor genes were modulated by melatonin; thus, *NME1*, a suppressor of metastasis in breast carcinoma [28], was stimulated by doxorubicin and melatonin had no effect on its expression.

Melatonin significantly counteracted the stimulatory effect of doxorubicin on the expression of some genes: *MUC1*, (a p53 repressor) overexpressed in cancer [29], *SNAIL2*, involved in invasion and epithelial to mesenchymal transition [30] and *BIRC5*, an inhibitor of apoptosis highly expressed in doxorubicin-resistant cells [31]. The regulation of *TWIST1* was the most striking result. *TWIST1* is a transcription factor involved in mesoderm development [61,62]. *TWIST1* is re-expressed in cancer, since it bypasses p53-induced growth arrest [63], is elevated in invasive breast cancer [32], involved in EMT [20,21], and correlates with poor survival [22]. We found that treatment of MCF-7 cells with doxorubicin resulted in a strong induction of *TWIST1* expression and co-treatment with melatonin completely abolished this effect. The protein levels of *TWIST1* were increased in doxorubicin treated cells and melatonin impaired this stimulatory effect. Our results suggest that doxorubicin has a dual action: it kills cancer cells, but simultaneously induces *TWIST1* expression leading to EMT of the surviving cells. The effect of doxorubicin on *TWIST1* in MCF-7 cells was not obtained in MDA-MB-231 cells, again suggesting a correlation between melatonin action and the estrogen receptor status.

TWIST1 induces angiogenesis in vivo [64,65]. This prompted us to examine the gene expression profile of angiogenesis related genes in MCF-7 cells. Doxorubicin stimulated the expression of plasminogen (*PLG*), downregulated by compounds able to suppress the *TWIST1*-dependent EMT [44]. Angiopoietin 2 (*ANGPT2*) involved in blood-brain barrier disruption and breast cancer metastasis in brain [45]. Insulin like growth factor 1 (*IGF1*) a positive regulator of *TWIST1* [46]. *GLI1* (GLI family zinc finger 1), activated when the hedgehog signaling and *TWIST1* are activated, leading to migration and invasion [47,66]. Importantly, melatonin partially blocked the stimulatory effect of doxorubicin on *PLG*, *ANGPT2*, *IGF-1* and *GLI1* expression indicating an anti-angiogenic effect of the indoleamine.

Dim light exposure at night induces a circadian disruption of nocturnal melatonin, thus contributing to doxorubicin resistance in breast cancer [17]. Since both melatonin and *TWIST1* influence the expression of *CLOCK*-related genes [50,67,68], and inactivation of *CLOCK*, *CRY1*, *BMAL1*, and *PER1* has been proposed as a mechanism increasing breast cancer risk in shift workers [69], we next studied the effect of doxorubicin in the expression of *CLOCK* genes in MCF-7 cells. Doxorubicin stimulated *CRY1*, *CRY2*, *CLOCK*, *BMAL1*, *BMAL2* and *PER2* and melatonin significantly enhanced this stimulatory effect. The only exception was *TIMELESS*, induced by doxorubicin and downregulated

when melatonin is included in the treatment. This might be another important finding of this work, since TIMELESS activates MYC, enhances ER α -mediated transactivation and contributes to tamoxifen resistance [70,71].

Moreover, we found that melatonin reduces the levels of VEGFA. This growth factor is upregulated by TWIST1, thus inducing angiogenesis in human umbilical vein endothelial cells [48], result in agreement with previous work [72]. AKT1 was also significantly downregulated by melatonin, as previously described [49,73,74]. In chemoresistant ovarian cancer cells, inhibition of Akt phosphorylation, resulted in p70S6K inactivation and TWIST1 downregulation [75]. Therefore, we focused our attention on the intracellular pathways triggered by protein kinases phosphorylation. In a proteome profiler assay, we found that doxorubicin treatment induced a modest effect of melatonin on Akt phosphorylation at Ser473. Phosphorylation of Akt correlates with poor prognosis and has been found in MCF-7 cells but not in MDA-MB-231 [76,77]. Suppression of PTEN activates the Akt/mTOR/p70S6K signaling and decreases sensitivity of MCF-7 cells to doxorubicin [78]. p-Akt phosphorylates TWIST1 thus contributing to EMT and breast cancer metastasis [49]. In our hands, melatonin downregulates p-mTOR and both total and p-Akt. However, we did not observe significant changes in the levels of p-mTOR after treatment with doxorubicin or co-treatment with melatonin; the modest inhibition of p-Akt in the cells treated simultaneously with both compounds suggests that TWIST1 activation by doxorubicin might respond to other signaling pathways apart from Akt/mTOR. We also observed an increase in the phosphorylation of P70S6K in response to doxorubicin. In head and neck squamous cell carcinoma, activation of the S6 pathway has been correlated with EMT induction and metastasis [79], and poor prognosis and tamoxifen resistance in breast cancer [80]. Interestingly, our results showed that the phosphorylation of S6 induced by doxorubicin is inhibited by melatonin, in parallel with a decrease in the levels of ER α . We tested ER α levels in parallel to TWIST levels, since it has been previously described that melatonin downregulates ER in MCF-7 cells [41]. Doxorubicin upregulates ER [42] and cell lines with high levels of TWIST1 have low levels of ER, being an increase of TWIST1 levels a mechanism that might contribute to the generation of hormone-resistant ER-negative breast cancer [43]. In our model, melatonin treatment decreased the levels of both proteins.

We next determined the expression of TWIST1 in MCF-7 cells co-cultured with adipocytes. Adipocytes induce EMT in breast cancer cells by increasing, among some other factors, the expression of TWIST1 [81,82]. Since transcriptional activation of the CDKN1A promoter by p53 is significantly repressed by induction of TWIST1 [83], we tested whether adipocytes can induce the expression of TWIST1 in MCF-7 cells. Indeed, co-culturing MCF-7 cells with adipocytes, even in absence of any treatment, increased the expression of TWIST1. This effect was enhanced by doxorubicin. Co-treatment with melatonin abolished the stimulatory action of doxorubicin over TWIST1 expression. The expression of CDKN1A was also stimulated by the presence of adipocytes in the co-cultures and was upregulated by doxorubicin. In this case, cotreatment with doxorubicin plus melatonin further increased the levels of CDKN1A. Therefore, adipocytes promote breast cancer cells acquisition of a more aggressive phenotype and doxorubicin treatment contributes to stimulate the EMT processes, whereas melatonin, at physiological concentrations, protects against TWIST1-mediated EMT.

MicroRNAs have been implicated in a wide range of intracellular signaling pathways [84]. Concerning carcinogenesis, they can act as oncogenes or tumor suppressor genes [51]. In the last set of experiments of this work, we tested the expression of some microRNAs known to play different roles in cancer, directly or indirectly related to TWIST1.

MicroRNA-34a protects against breast cancer proliferation, invasion and metastasis by directly targeting TWIST1 [85–87]. In MCF-7 cells, doxorubicin stimulates the expression of miR-34a, perhaps a mechanism trying to compensate TWIST1 induction. Importantly, melatonin treatment further stimulated the expression of miR-34a. MicroRNA-29a has been involved in MCF-7 cell proliferation and invasion dependent on the IGF pathway [88]. Downregulation of miR-29a correlates with p21 and p53 upregulation, leading cancer cells to apoptosis [89]. We found that cells treated with both doxorubicin plus melatonin showed lower levels of miR-29a, what might be another protective mechanism against

malignity. The role of miR-31 in breast cancer is controversial. Whilst some reports conclude that miR-31 inhibits invasion and metastasis in breast cancer cell line models [90], other authors claim that miR-31 promote cell proliferation and metastasis [91]. In our hands, miR-31 levels are downregulated by doxorubicin and co-treatment with melatonin further inhibited miR-31 expression.

MicroRNA-10a is an inhibitor of breast cancer progression, promoting apoptosis in MCF-7 cells, via PI3K/Akt/mTOR. Upregulation of miR-10a also suppresses the activation of p70S6K [92]. Our results showed that, although melatonin alone has a stimulatory effect on its expression, is not able to enhance the modest induction of miR-10a in response to doxorubicin, suggesting that miR-10a does not play a crucial role in *TWIST1* induction by doxorubicin.

miR-145 provides a link between p70S6K to *TWIST1*. P70S6K prevents the maturation of miR-145, and consequently, *TWIST1* is upregulated, leading to metastasis [93]. Reactivation of miR145 suppressed migration and invasion of breast cancer cells [94]. In our model, the expression of miR-145 is stimulated by doxorubicin and melatonin, however, the addition of both compounds simultaneously does not further increase miR-145 levels.

We also tested the levels of miR-10b, described as an oncogenic microRNA involved in tumor invasion, angiogenesis, cellular motility and metastasis [95,96]. *TWIST1* induces miR-10b [23,96] promoting breast cancer bone metastasis [97]. We found that doxorubicin strongly stimulates miR-10b expression, whereas melatonin concomitantly added with the anthracyclin abolishes this stimulatory effect. Thus, the inhibition of miR-10b, probably a consequence of *TWIST* inhibition, might be another mechanism participating in the protective role of melatonin on doxorubicin breast cancer treated cells. When we were preparing our manuscript, Chao et al. reported that melatonin suppresses lung cancer metastasis, preventing EMT by downregulating *TWIST1*, which agrees with our results, indicating that *TWIST1* might be a novel target of melatonin in different cancer types [98].

Importantly, the blockade of *TWIST1* expression by siRNA technology completely abolished the induction of miR-10b, *PLG* and *BIRC5* by doxorubicin, allows a higher effect of melatonin on miR-10a expression and partially impaired the stimulatory action of doxorubicin on *VEGFA* expression. These data indicate that *TWIST* could be involved in the expression changes of these genes and miRNAs observed upon treatment with doxorubicin and melatonin.

4. Materials and Methods

4.1. Cell Lines and Culture Conditions

Human breast cancer cell lines MCF-7 (hormone-dependent, ER α -positive) and MDA-MB-231 (hormone-independent, triple negative) were acquired from the American Tissue Culture Collection (Rockville, MD, USA). They were maintained as monolayer cultures in 75 cm² plastic culture flasks in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (PAA Laboratories, Pasching, Austria), 2 mM L-Glutamine (GIBCO, Langley, OK, USA), penicillin (20 units/mL) and streptomycin (20 μ g/mL) (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) at 37 °C in a humid atmosphere containing 5% CO₂.

Breast preadipocytes (ZenBio, RTP, Durham, NC, USA) were plated in six-well TC plates (Corning, Lowell, MA, USA), and propagated in preadipocyte media (ZenBio, RTP, Durham, NC, USA) at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO₂.

4.2. Co-Culture of Breast Adipocytes and MCF-7 Cells as an In Vitro Breast Cancer Model

Confluent pre-adipocytes were propagated in adipocyte differentiation media (ZenBio, RTP, Durham, NC, USA) for 7 days. Following the differentiation media, the resulting adipocytes were propagated in DMEM:F12 (GIBCO®, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) containing 1% PSF (GIBCO®, Invitrogen), 10% fetal bovine serum (Sigma, St. Louis, MO, USA), and 5 ng/mL insulin (GIBCO®, Invitrogen) for 7 days.

Mature adipocytes and MCF-7 cells were co-cultured together using Falcon 24-multiwell plates and Falcon cell culture inserts. First, mature adipocytes (12×10^3 cells/well) were cultured in the

upper chamber in DMEM supplemented with 10% FBS for 24 h. At this time, inserts containing MCF-7 cells (5×10^3 cells/well) were seeded in the lower chamber and co-cultured with or without mature adipocytes (12×10^3 cells/well) in fresh DMEM medium containing melatonin (1 nM) and/or doxorubicin (1 μ M) or vehicle (ethanol at a final concentration lower than 0.0001%). After 24 h, total RNA was isolated from MCF-7 cells and purified with the Nucleospin RNA II kit (Macherey-Nagel, GmbH & Co. Düren, Germany), and used for cDNA synthesis.

4.3. Cell Proliferation Assay

MDA-MB-231 and MCF-7 cells were cultured for 3 days in media containing melatonin (1 nM) and/or doxorubicin (ranging from 0.1 nM to 1 μ M) or vehicle (ethanol at a final concentration lower than 0.0001%). Cell proliferation was measured by the MTT [3(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] method [99], reading absorbance at 570 nm in a microplate reader (Labsystems Multiskan RC 351, Vienna, VA, USA). MTT was obtained from Molecular Probes Inc (Molecular Probes, Eugene, OR, USA). Each result represents the media $\pm$ S.E.M of at least three independent experiments and data are presented as percentage of control untreated cells.

4.4. Cell Migration Assay: Wound Healing Assay

MDA-MB-231 and MCF-7 cells were seeded into 6-well plates (Life Sciences, Tewksbury, MA, USA) and cultured for 24 h in DMEM supplemented with 10% FBS (csFBS) to reach full confluence. A line of cells was scraped away in each plate using a pipette tip. Media were replaced by fresh ones containing melatonin (1 nM) and/or doxorubicin (1 μ M) or vehicle (ethanol at a final concentration lower than 0.0001%). At least four randomly selected views along the scraped line in each plate were photographed using an ORCA R2 camera (Hamamatsu Photonics, Massy Cedex, France) attached to a microscope set Nikon Ti (Werfen Group, Barcelona, Spain) at 10 $\times$ magnification. Microphotographs were taken every ten minutes during the course of the experiment, which was terminated after 24 h. Initial and final wound sizes were determined using the Nis Elements v.3.8 software (Nikon, Tokyo, Japan) and the difference between the two was used to determine migration distance as follows: initial wound size minus final wound size divided by two. Each assay was performed at least three times.

4.5. Three-Dimensional Spheroid Invasion Assays

MDA-MB-231 and MCF-7 cells were suspended in DMEM medium plus 5% methyl cellulose (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) at 80,000 cells/mL. Cell spheroids were subsequently formed by serial pipetting of 25 μ L into a non-adhesive petri dish (2000 cells/spheroid) and incubated in an inverted position for 18 h. Next, each spheroid was transferred to an individual well of 96-well plate and embedded into a volume of 110 μ L of 2.3 mg/mL bovine collagen type I matrix (PureCol, San Diego, CA, USA) from advanced Biomatrix, and filled with 100 μ L of complete media.

Collective cell invasion was monitored using a Zeiss Cell Observer Live Imaging microscope coupled with a CO₂ and temperature maintenance system. Time-lapse images were acquired every 20 min during 24 h using a Zeiss AxioCam MRc camera (Carl Zeiss, Sliedrecht, The Netherlands). The area of each individual spheroid was measured using ImageJ Fiji analysis program (version 1.50i, Bethesda, MD, USA). The invasive area was determined by calculating the difference between the final area (at each represented time) and the initial area ($t = 0$ h), and data were normalized to the control (vehicle-treated) cells. Each assay was performed at least three times using quadruplicates.

4.6. RNA Isolation and cDNA Synthesis

Total RNA was isolated from MCF-7 and MDA-MB-231 cells and purified with the Nucleospin RNA II kit (Macherey-Nagel, GmbH & Co. Düren, Germany) following the manufacturer's instructions. The concentration and purity of RNA was quantified by measuring the absorbance in a spectrophotometer (Nanodrop, Thermofisher, Control Técnica, Boadilla del Monte, Spain). The absorbance ratio A260 nm/A280 nm was always > 1.9 . For cDNA synthesis, 0.5 μ g of total RNA was used as template using the RT² First Strand Kit (Qiagen, Germantown, MD, USA), following the manufacturer's instructions. First, the genomic DNA was eliminated by incubating the samples 5 min

at 42 °C. After mixing with the reverse-transcription mix, the samples were incubated for exactly 15 min at 42 °C in a final volume of 20 µL. The reaction was stopped by incubating at 95 °C for 5 min. 91 µL of RNA-free water was added to each reaction and samples were kept on ice until proceeding with the real-time PCR protocol.

4.7. RT² ProfilerTM PCR Array

Pathway-focused gene expression profiling was performed using a 96-well human breast cancer PCR array (RT² Profiler PCR array-PAHS-131ZA, Human Breast Cancer PCR Array, Qiagen, Germantown, MD, USA) and a 96-well human angiogenesis PCR array (RT² Profiler PCR array-PAHS-024ZA, Human Angiogenesis PCR Array, Qiagen, Germantown, MD, USA). In these arrays, each well contains all the components required and designed to generate single, gene-specific amplicons, testing the expression of 84 genes related to breast cancer pathways or to angiogenesis, 5 housekeeping genes and controls for data normalization, genomic DNA contamination detection, RNA sample quality and general PCR performance.

Briefly, MCF-7 were treated for 6 h with doxorubicin (1 µM) alone or in combination with 1 nM melatonin and/or vehicle (ethanol at a final concentration lower than 0.0001%). RNA was extracted and reverse transcribed as explained in the Section 4.6. The cDNA template was mixed with the appropriate amount of RT² SYBR Green qPCR Mastermix (Qiagen GmbH, Hilden, Germany), aliquoted 25 µL to each well of the same plate, and then the real-time PCR cycling program was performed in an MX3005P (Agilent, Santa Clara, CA, USA) following the manufacturer's instructions.

Cycling conditions were: 1 cycle at 95 °C for 10 min followed by 40 cycles using the following temperature profile: 95 °C for 30 sec (denaturation) and 60 °C for 60 sec (annealing/extension). Dissociation curves were performed to verify that only a single product was amplified. The Ct data for each gene were analyzed using the Qiagen RT² profiler PCR array data analysis software. Data are represented as fold-regulation between the experimental groups and the control cells.

4.8. Measurement of Specific mRNA Gene Expression

Analysis of specific mRNA gene expression was carried out by RT-PCR after incubation of cells for 6 h with doxorubicin (1 µM) and/or melatonin (1 nM), or vehicle (ethanol at a final concentration lower than 0.0001%). Total cellular RNA was isolated, reverse transcribed and the RT-PCRs were performed using the same temperature profile described in Section 4.7.

Reactions were run in triplicate and melting curves were performed to verify that only a single product was amplified. Each result represents the media of three to five independent experiments and data are presented as fold-change between the experimental groups and the control cells. The primers used for amplification (Sigma Genosys Ltd., Cambridge, UK) are listed in Table 3.

Table 3. Primer sequences of genes tested by real time RT-PCR.

Gene	Forward	Reverse
<i>PTEN</i>	AGGTTTCCTCTGGTCCTGGT	CGACGGGAAGACAAGTTCAT
<i>COP1</i>	CTGGAAGCAGAAATCACATGC	TGTGCTATCCTCACTGACAGG
<i>CDKN1A</i>	CAGCATGACAGATTCTACC	CAGGGTATGTACATGAGGAG
<i>NME1</i>	CAGAAGTCTCCACGGATGGT	AGAAAGGATTCCGCCTTGTT
<i>MUC1</i>	GCAAGAGCACTCCATTCTCAATT	TGGCATCAGTCTTGGTGCTATG
<i>SNAI2</i>	CAGTGATTATTTCCCGTATC	CCCCAAAGATGAGGAGTATC
<i>BIRC5</i>	TCTCCGCAGTTTCTCAAAT	GGACCACCGCATCTCTACAT
<i>TWIST1</i>	CTAGATGTCAATTGTTCCAGAG	CCCTGTTTCTTTCAATTTGG
<i>BAX</i>	AACTGGACAGTAACATGGAG	TTGCTGGCAAAGTAGAAAAG
<i>TP53</i>	CCTATGCTTGATGGCTAAC	TAGATCCATGCCTTCTTCTTC

Table 3. Cont.

Gene	Forward	Reverse
<i>XBP1</i>	ACTGGGTCCAAGTTGTCCAG	TCACCCCTCCAGAACATCTC
<i>WEE1</i>	AGTGCCATTGCTGAAGGTCT	ACCTCGGATACCACAAGTGC
<i>GATA3</i>	CGGTCCAGCACAGGCAGGGAGT	GAGCCCACAGGCATTGCAGACA
<i>PGR</i>	GAGAGCTCATCAAGGCAATTGG	CACCATCCCTGCCAATATCTTG
<i>BCL2</i>	CCTTGGAATGGAAGCTTAG	GAGGGAATGTTTTCTCCTTG
<i>c-MYC</i>	TGAGGAGGAACAAGAAGATG	ATCCAGACTCTGACCTTTTG
<i>PLG</i>	TAGATTCTCACCTGCTACAC	CGCAGTAGTCATATCTCTTTTC
<i>ANGPT2</i>	AAGAGAAAGATCAGCTACAGG	CCTTAGAGTTTGATGTGGAC
<i>IGF1</i>	ATAGAGCCTGCGCAATGGAA	GAGATGGGAGATGTTGAGAGCA
<i>GLI1</i>	CTCGTAGCTTTCATCAACT	TTTTTGGTGATTCATCTGGG
<i>VEGFA</i>	TGGTGATGTTGGACTCCTCA	GGGCAGAATCATCACGAAGT
<i>AKT1</i>	AAGTACTCTTCCAGACCC	TTCTCCAGCTTGAGGTC
<i>SERPINE1</i>	ATCCACAGCTGTCATAGTC	CACTTGCCCCATGAAAAG
<i>TIMP2</i>	GGCCTGAGAAGGATATAGAG	CTTTCCTGCAATGAGATATTCC
<i>CRY1</i>	TTTTGCAGGGAAGCCTCTTA	CTGCTATTGCCCTGTTGGTT
<i>CRY2</i>	GCGAAAGCTGCTGGTAAATC	TACCTGCCCAAATTGAAAGC
<i>CLOCK</i>	TATCATGCGTGTCGGTTGTT	ACAAGGCATGTCCAGTTTC
<i>NPAS2</i>	AAGGCTTCCAGTCTTGCTGA	CGGGACCAGTTCAATGTTCT
<i>BMAL1</i>	GACGAGGCAGCTGAGGTTAC	CCACAGCACAGGCTATTTGA
<i>BMAL2</i>	AATCCAACTGTGCACCATCA	GCTACCAGGCAAAACCAGAG
<i>PER2</i>	AGTGGGACTGGAAAATGCTG	CACACACAGAAGGAGGAGCA
<i>TIMELESS</i>	CACTGGCGTCATCATCAATC	GCAGGAGGAAGACAACCTGC
<i>PER3</i>	TCTTTGGGTCCAGTTGTTCC	TCCTGGCGTCTTCTCACTTT
<i>ACTIN</i>	TAGCACAGCCTGGATAGCAA	AAATCTGGCACCACACCTTC

4.9. Real-Time RT-PCR Data Analysis

For the primers used there were no differences between transcription efficiencies, and the fold-change in each sample was calculated by the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method [100]. The fractional cycle at which the amount of amplified target becomes significant (C_t) was automatically calculated by the PCR program. The relative expression of β -actin was used to normalize gene expression.

4.10. Quantification of miRNAs Expression

Total RNA, including the small RNA fraction, was extracted from MCF-7 cells using TRIzol reagent (Invitrogen). TaqMan[®] MicroRNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) was used for the RT step. Corresponding TaqMan[®] Human MicroRNA Assays (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) were used to determine the copy number of miR-10a, miR-10b, miR-29a, miR-31, miR-34a, miR-133a and miR-145. MiRNAs levels were normalized to the expression levels of RNU6B, which was measured in parallel for each specific miRNA determination. Each sample was assayed in triplicate and a negative control was included in each experiment. Cycling conditions were an initial cycle of 95 °C for 10 min, followed by 50 cycles of 95 °C for 15 s, and 60 °C for 90 s, performed in an MX3005P (Agilent, Santa Clara, CA, USA) thermocycler.

4.11. Phosphokinase Screening

MCF-7 cells were initially seeded into 6-well plates at a density of 5×10^5 cells per well in DMEM supplemented with 10% FBS and incubated at 37 °C for 24 h to allow for cell attachment. Then, media were replaced by fresh ones with 10% FBS and containing either doxorubicin alone (1 μ L) and/or melatonin (1 nM) or vehicle (ethanol at a final concentration lower than 0.0001%). After 6 h of incubation, cells were washed with PBS, lysed and screened for phosphorylation of kinases with the Proteome Profiler™ Array (Human Phospho-kinase Array Kit, Catalog Number ARY003B, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) according to manufacturer's instructions.

4.12. Antibodies

Antibody against actin (A5441) was purchased from Sigma Aldrich (Madrid, Spain). Antibodies against TWIST1 (2c1a, Cc-81417) and ER (F-10, Sc-8002) were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). Antibodies against phospho-S6 ribosomal protein (D68F8), Phospho-Akt (Ser473) (92712), Akt (4691L) and phospho-mTOR (Ser2448) (D9C2) were purchased from Cell Signaling (Danvers, MA, USA).

4.13. Western Blotting

MCF-7 cells were initially seeded into 6-well plates at a density of 5×10^5 cells per well in DMEM supplemented with 10% FBS and incubated at 37 °C for 24 h to allow for cell attachment. Then, media were replaced by fresh ones with 10% FBS and containing either doxorubicin alone (1 μ M) or in combination with melatonin (1 nM) and/or vehicle (ethanol at a final concentration lower than 0.0001%). Samples for Western blotting were prepared by harvesting cells under appropriate conditions for centrifugation, resuspending the pellet in SDS buffer, and boiling for 5 min. Equal amounts of protein lysate were resolved by SDS-PAGE, transferred to polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane and blocked in a buffer containing 5% non-fat milk. Western blots were probed with various primary antibodies listed above. The blots were stripped and re-probed with anti- β -actin antibody (Sigma, St. Louis, MO, USA) to evaluate loading. Images were acquired with the Odyssey infrared imaging system and analyzed by the software program as specified in the Odyssey software manual.

4.14. Immunofluorescence Staining

For immunofluorescence assays, MCF-7 cells were seeded onto glass coverslips in 6-well plates and grown for 24 h. Then, media were replaced by fresh ones with 10% FBS and containing either doxorubicin alone (1 μ M) and/or melatonin (1 nM), or vehicle (ethanol at a final concentration lower than 0.0001%). After 12 h, cells were washed with PBS, fixed in 4% formaldehyde solution for 30 min and then permeabilized with 0.2% Triton X-100/PBS for 15 min (twice). Coverslips were incubated with anti-TWIST1 primary antibodies overnight at 4 °C, followed by 1 h incubation with fluorescence-tagged secondary antibody at room temperature, and then stained with DAPI for 5 min. Finally, coverslips were observed, and cell images were captured at 40 $\times$ magnification with an LSM-510 laser scanning microscope (Carl Zeiss Inc., Sliedrecht, The Netherlands) fluorescence microscope.

4.15. Small Interfering RNA (siRNA)

Small interfering RNA (siRNA) technology was used to knock down TWIST1 expression. A mixture of four siRNA (ON-TARGETplus SMARTpool TWIST1 siRNA) were purchased from Dharmacon (Lafayette, CO, USA). The target sequences were: 5'-UGAGCAACAGCGAGGAAGA-3', 5'-GGAGUCCGCAGUCUACGA-3', 5'-GCAAAUAGAUCGUGUCU-3' and 5'-AAUCAGAGGAACUAUAAGA-3'. A non-silencing siRNA siGENOME RISC-Free Control was used as negative control. MCF-7 cells were transfected with pooled siRNA using Lipofectamine 2000 (Invitrogen). The group designed as Mock corresponded to MCF-7 cells going through the transfection process without addition of siRNA. After 72 h, cells were

treated with doxorubicin and/or melatonin for 6 h and RNA was extracted using Trizol (Gibco). Gene expression and miRNAs expression were determined by real time RT-PCR, as described in Sections 4.8 and 4.10.

4.16. Statistical Analysis

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism software. The data are expressed as the means $\pm$ standard errors of the mean (SEM). Statistical differences between groups were analyzed using One-Way Analysis of Variance (ANOVA), followed by the Student-Newman-Keuls test. Results were considered as statistically significant at $p < 0.05$.

5. Conclusions

In summary, this study has extensively contributed to deciphering multiple molecular changes modulated by doxorubicin and melatonin treatment in breast cancer cells that include gene expression changes, kinase activation and miRNAs expression. A model is proposed in Figure 11, indicating the factors induced or inhibited by melatonin.

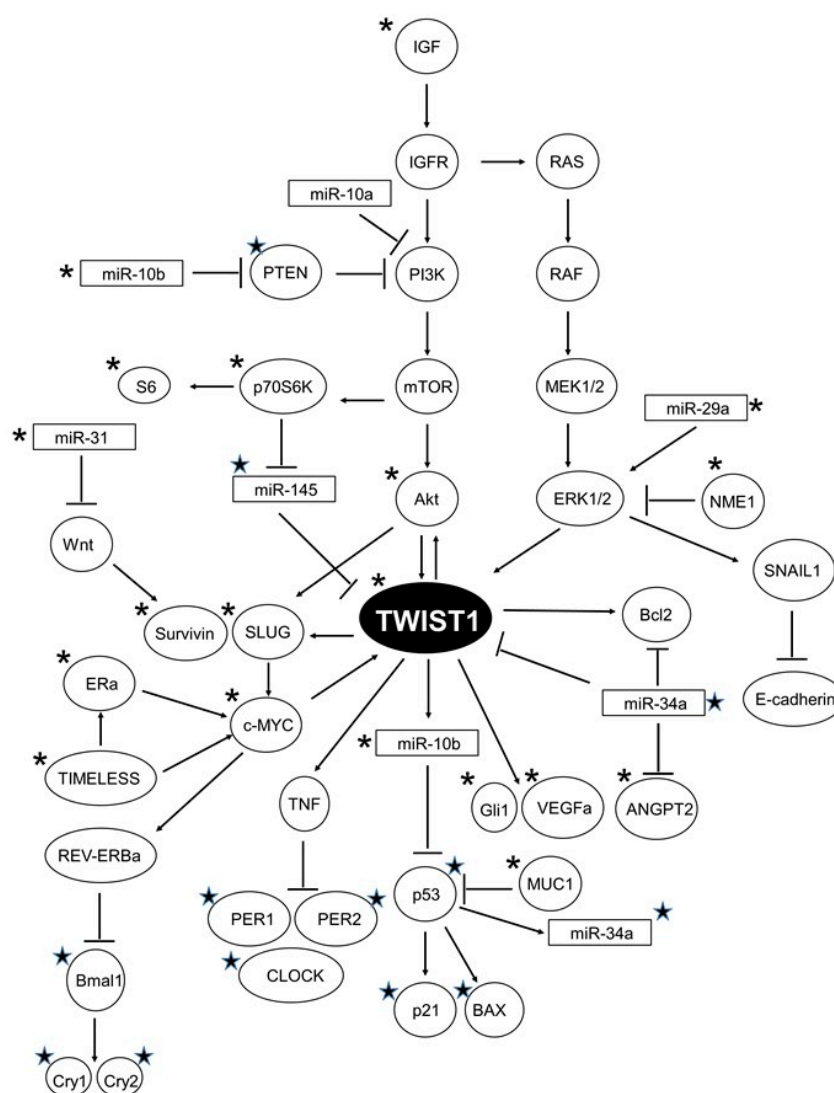


Figure 11. Proposed model of the pathways converging on TWIST1 that are altered by doxorubicin and modulated by melatonin. ★: Upregulated by melatonin; *: downregulated by melatonin.

According to these original data, TWIST1 emerges as a central player in doxorubicin-treated breast cancer cells, since some of the upstream regulators of TWIST1 (PTEN, Akt, IGF, p70S6K, c-Myc, TIMELESS, miR-29a, miR-34a, miR145) and downstream effectors (GLI1, Survivin, p21, Bcl-2, Bax, VEGFa, SLUG1, Per1, Per2, miR-10b) have all been found altered upon doxorubicin treatment. Importantly, melatonin may exert a protective role thereby modulating many of the undesirable effects of this chemotherapeutic agent, preventing cell proliferation, migration, invasion and EMT in ER-positive breast cancer cells.

Supplementary Materials: The following are available online at <http://www.mdpi.com/2072-6694/11/7/1011/s1>, Figure S1: Western blot analysis of TWIST1, ER and actin, Figure S2: Western blot analysis of p-mTOR, Total Akt, p-Akt and actin, Figure S3: Western Cuantification of the density of the bands included in Figure 4. It was made by using the image processing package ImageJ Fiji, Figure S4: Western Cuantification of the density of the bands included in Figure 8C. It was made by using the image processing package ImageJ Fiji, Figure S5: Western Cuantification of the density of the bands included in Figure 8D. It was made by using the image processing package ImageJ Fiji.

Author Contributions: Conceptualization: C.A.-G., C.M.-C., S.C.; Data curation: C.A.-G., C.M.-C., J.M.-M.; Formal analysis: C.A.-G., C.M.-C., J.M.-M., S.C.; Funding acquisition: S.C., C.M.-C.; Investigation: J.M.-M., F.H.-P., R.G.-D., J.M.G.-P., N.D.-R.-I., C.A.-G., A.G., A.G.-G.; Methodology: J.M.-M.; Supervision: C.M.-C., C.A.-G.; Writing—original draft: C.M.-C.; Writing—review and editing: C.M.-C., C.A.-G.

Funding: The present study was funded by grants from the Spanish Economy and Competitiveness Ministry (SAF2016-77103-P) and from Instituto de Investigación Sanitaria Valdecilla (NVAL 16/01).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Reiter, R.J.; Tan, D.X.; Fuentes-Broto, L. Melatonin: A multitasking molecule. *Prog. Brain. Res.* **2010**, *181*, 127–151. [PubMed]
- Majidinia, M.; Reiter, R.J.; Shakouri, S.K.; Yousefi, B. The role of melatonin, a multitasking molecule, in retarding the processes of ageing. *Ageing Res. Rev.* **2018**, *47*, 198–213. [CrossRef] [PubMed]
- Zisapel, N. New perspectives on the role of melatonin in human sleep, circadian rhythms and their regulation. *Br. J. Pharmacol.* **2018**, *10*, 3190–3199. [CrossRef] [PubMed]
- Reiter, R.J.; Rosales-Corral, S.A.; Tan, D.X.; Acuna-Castroviejo, D.; Qin, L.; Yang, S.F.; Xu, K. Melatonin, a full service anti-cancer agent: Inhibition of initiation, progression and metastasis. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 843. [CrossRef] [PubMed]
- Favero, G.; Moretti, E.; Bonomini, F.; Reiter, R.J.; Rodella, L.F.; Rezzani, R. Promising antineoplastic actions of melatonin. *Front. Pharmacol.* **2018**, *9*, 1086. [CrossRef] [PubMed]
- Najafi, M.; Salehi, E.; Farhood, B.; Nashtaei, M.S.; Hashemi Goradel, N.; Khanlarkhani, N.; Namjoo, Z. Adjuvant chemotherapy with melatonin for targeting human cancers: A review. *J. Cell. Physiol.* **2018**, *7*, 2356–2372. [CrossRef] [PubMed]
- Martínez-Campa, C.; Menéndez-Menéndez, J.; Alonso-González, C.; González, A.; Álvarez-García, V.; Cos, S. What is known about melatonin, chemotherapy and altered gene expression in breast cancer. *Oncol. Lett.* **2017**, *13*, 2003–2014. [CrossRef]
- Menéndez-Menéndez, J.; Martínez-Campa, C. Melatonin: An anti-tumor agent in hormone-dependent cancers. *Int. J. Endocrinol.* **2018**, *2018*, 3271948. [CrossRef]
- Cos, S.; González, A.; Martínez-Campa, C.; Mediavilla, M.D.; Alonso-González, C.; Sánchez-Barceló, E.J. Melatonin as a selective estrogen enzyme modulator. *Curr. Cancer Drug Targets* **2008**, *8*, 691–702. [CrossRef]
- Rato, A.G.; Pedrero, J.G.; Martínez, M.A.; del Río, B.; Lazo, P.S.; Ramos, S. Melatonin blocks the activation of estrogen receptor for DNA binding. *FASEB J.* **1999**, *13*, 857–868. [CrossRef]
- Bouhoute, A.; Leclercq, G. Calmodulin decreases the estrogen binding capacity of the estrogen receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1996**, *227*, 651–657. [CrossRef] [PubMed]
- Lissoni, P.; Tancini, G.; Paolorossi, F.; Mandalà, M.; Ardizzoia, A.; Malugani, F.; Giani, L.; Barni, S. Chemoneuroendocrine therapy of metastatic breast cancer with persistent thrombocytopenia with weekly low-dose epirubicin plus melatonin: A phase II study. *J. Pineal Res.* **1999**, *26*, 169–173. [CrossRef] [PubMed]

13. Kisková, T.; Ekmekcioglu, C.; Garajová, M.; Orendás, P.; Bojková, B.; Bobrov, N.; Jäger, W.; Kassayová, M.; Thalhammer, T. A combination of resveratrol and melatonin exerts chemopreventive effects in N-methyl-N-nitrosourea-induced rat mammary carcinogenesis. *Eur. J. Cancer Prev.* **2012**, *21*, 163–170. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Orendás, P.; Kubatka, P.; Bojková, B.; Kassayová, M.; Kajo, K.; Výbohová, D.; Kruzliak, P.; Péc, M.; Adamkov, M.; Kapinová, A.; et al. Melatonin potentiates the anti-tumour effect of pravastatin in rat mammary gland carcinoma model. *Int. J. Exp. Pathol.* **2014**, *95*, 401–410. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Alonso-González, C.; Menéndez-Menéndez, J.; González-González, A.; González, A.; Cos, S.; Martínez-Campa, C. Melatonin enhances the apoptotic effects and modulates the changes in gene expression induced by docetaxel in MCF-7 human breast cancer cells. *Int. J. Oncol.* **2018**, *52*, 560–570.
16. Granzotto, M.; Rapozzi, V.; Decorti, G.; Giralaldi, T. Effects of melatonin on doxorubicin cytotoxicity in sensitive and pleiotropically resistant tumor cells. *J. Pineal Res.* **2001**, *31*, 206–213. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Xiang, S.; Dauchy, R.T.; Hauch, A.; Mao, L.; Yuan, L.; Wren, M.A.; Belancio, V.P.; Mondal, D.; Frasch, T.; Blask, D.E.; et al. Doxorubicin resistance in breast cancer is driven by light at night-induced disruption of the circadian melatonin signal. *J. Pineal Res.* **2015**, *59*, 60–69. [[CrossRef](#)]
18. Ma, C.; Li, L.X.; Zhang, Y.; Xiang, C.; Ma, T.; Ma, Z.Q.; Zhang, Z.P. Protective and sensitive effects of melatonin combined with adrimycin on ER+ (estrogen receptor) breast cancer. *Eur. J. Gynaecol. Oncol.* **2015**, *36*, 197–202.
19. Kosar, P.A.; Naziroglu, M.; Övey, I.S.; Cig, B. Synergic effects of doxorubicin and melatonin on apoptosis and mitochondrial oxidative stress in MCF-7 breast cancer cells: Involvement of TRPV1 channels. *J. Membr. Biol.* **2016**, *249*, 129–140. [[CrossRef](#)]
20. Zhu, Q.Q.; Ma, C.; Wang, Q.; Song, Y.; Lv, T. The role of TWIST1 in epithelial-mesenchymal transition and cancers. *Tumour Biol.* **2016**, *37*, 185–197. [[CrossRef](#)]
21. Tang, H.; Massi, D.; Hemmings, B.A.; Mandalà, M.; Hu, Z.; Wicki, A.; Xue, G. AKT-ions with a TWIST between EMT and MET. *Oncotarget* **2016**, *7*, 62767–62777. [[CrossRef](#)]
22. Wushou, A.; Hou, J.; Zhao, Y.J.; Shao, Z.M. Twist-1 up-regulation in carcinoma correlates to poor survival. *Int. J. Mol. Sci.* **2014**, *15*, 21621–21630. [[CrossRef](#)]
23. Abdelmaksoud-Dammak, R.; Chamtour, N.; Triki, M.; Saadallah-Kallel, A.; Ayadi, W.; Charfi, S.; Khabir, A.; Ayadi, L.; Sallemi-Boudawara, T.; Mokdad-Gargouri, R. Overexpression of miR-10b in colorectal cancer patients: Correlation with TWIST-1 and E-cadherin expression. *Tumour Biol.* **2017**, *39*, 1010428317695916. [[CrossRef](#)]
24. Shen, X.; Fang, J.; Lv, X.; Pei, Z.; Wang, Y.; Jiang, S.; Ding, K. Heparin impairs angiogenesis through inhibition of microRNA-10b. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 26616–26627. [[CrossRef](#)]
25. M, J.R.; S, V. BMI1 and PTEN are key determinants of breast cancer therapy: A plausible therapeutic target in breast cancer. *Gene* **2018**, *678*, 302–311. [[CrossRef](#)]
26. Zohny, S.F.; Al-Malki, A.L.; Zamzami, M.A.; Choudhry, H. p21 Waf1/Cip1: Its paradoxical effect in the regulation of breast cancer. *Breast Cancer* **2019**, *26*, 131–137. [[CrossRef](#)]
27. Shao, J.; Teng, Y.; Padia, R.; Hong, S.; Noh, H.; Xie, X.; Mumm, J.S.; Dong, Z.; Ding, H.F.; Cowell, J.; et al. COP1 and GSK3 β cooperate to promote c-Jun degradation and inhibit breast cancer cell tumorigenesis. *Neoplasia* **2013**, *15*, 1075–1085. [[CrossRef](#)]
28. McCorkle, J.R.; Leonard, M.K.; Kraner, S.D.; Blalock, E.M.; Ma, D.; Zimmer, S.G.; Kaetzel, D.M. The metastasis suppressor NME1 regulates expression of genes linked to metastasis and patient outcome in melanoma and breast carcinoma. *Cancer Genom. Proteom.* **2014**, *11*, 175–194.
29. Wei, X.; Xu, H.; Kufe, D. Human mucin 1 oncoprotein represses transcription of the p53 tumor suppressor gene. *Cancer Res.* **2007**, *67*, 1853–1858. [[CrossRef](#)]
30. Wang, W.; Hind, T.; Lam, B.W.S.; Herr, D.R. Sphingosine 1-phosphate signaling induces SNAI2 expression to promote cell invasion in breast cancer. *FASEB J.* **2019**, *7*, 7180–7191. [[CrossRef](#)]
31. Hu, Y.; Xu, K.; Yagüe, E. miR-218 targets survivin and regulates resistance to chemotherapeutics in breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* **2015**, *151*, 269–280. [[CrossRef](#)]
32. Cheng, G.Z.; Chan, J.; Wang, Q.; Zhang, W.; Sun, C.D.; Wang, L.H. Twist transcriptionally up-regulates AKT2 in breast cancer cells leading to increased migration, invasion, and resistance to paclitaxel. *Cancer Res.* **2007**, *67*, 1979–1987. [[CrossRef](#)]

33. Li, Q.Q.; Xu, J.D.; Wang, W.J.; Cao, X.X.; Chen, Q.; Tang, F.; Chen, Z.Q.; Liu, X.P.; Xu, Z.D. Twist1-mediated Adriamycin-induced epithelial-mesenchymal transition relates to multidrug resistance and invasive potential in breast cancer cells. *Clin. Cancer Res.* **2009**, *15*, 2657–2665. [\[CrossRef\]](#)
34. Basu, A.; Halder, S. The relationship between Bcl2, Bax and p53: Consequences for cell cycle progression and cell death. *Mol. Hum. Reprod.* **1998**, *4*, 1099–1109. [\[CrossRef\]](#)
35. Sun, Y.; Jiang, F.; Pan, Y.; Chen, X.; Chen, J.; Wang, Y.; Zheng, X.; Zhang, J. XBP1 promotes tumor invasion and is associated with poor prognosis in oral squamous cell carcinoma. *Oncol. Rep.* **2018**, *40*, 988–998. [\[CrossRef\]](#)
36. Matheson, C.J.; Backos, D.S.; Reigan, P. Targeting WEE1 kinase in cancer. *Trends Pharmacol. Sci.* **2016**, *37*, 872–881. [\[CrossRef\]](#)
37. Asch-Kendrick, R.; Cimino-Mathews, A. The role of GATA3 in breast carcinomas: A review. *Hum. Pathol.* **2016**, *48*, 37–47. [\[CrossRef\]](#)
38. Yip, C.H.; Rhodes, A. Estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *Future Oncol.* **2014**, *10*, 2293–2301. [\[CrossRef\]](#)
39. Merino, D.; Lok, S.W.; Visvader, J.E.; Lindeman, G.J. Targeting BCL-2 to enhance vulnerability to therapy in estrogen receptor-positive breast cancer. *Oncogene* **2016**, *35*, 1877–1887. [\[CrossRef\]](#)
40. Fallah, Y.; Brundage, J.; Allegakoen, P.; Shajahan-Haq, A.N. MYC-driven pathways in breast cancer subtypes. *Biomolecules* **2017**, *7*, 53. [\[CrossRef\]](#)
41. Molis, T.M.; Spriggs, L.L.; Jupiter, Y.; Hill, S.M. Melatonin modulation of estrogen-regulated proteins, growth factors, and proto-oncogenes in human breast cancer. *J. Pineal Res.* **1995**, *18*, 93–103. [\[CrossRef\]](#)
42. Shirley, S.H.; Rundhaug, J.E.; Tian, J.; Cullinan-Ammann, N.; Lambertz, I.; Conti, C.J.; Fuchs-Young, R. Transcriptional regulation of estrogen receptor- α by p53 in human breast cancer cells. *Cancer Res.* **2009**, *69*, 3405–3413. [\[CrossRef\]](#)
43. Vesuna, F.; Lisok, A.; Kimble, B.; Domek, J.; Kato, Y.; van der Groep, P.; Artemov, D.; Kowalski, J.; Carraway, H.; van Diest, P.; et al. Twist contributes to hormone resistance in breast cancer by downregulating estrogen receptor- α . *Oncogene* **2012**, *31*, 3223–3234. [\[CrossRef\]](#)
44. Han, K.Y.; Chen, P.N.; Hong, M.C.; Hseu, Y.C.; Chen, K.M.; Hsu, L.S.; Chen, W.J. Naringenin attenuated prostate cancer invasion via reversal of epithelial-to-mesenchymal transition and inhibited uPA activity. *Anticancer Res.* **2018**, *38*, 6753–6758. [\[CrossRef\]](#)
45. Avraham, H.K.; Jiang, S.; Fu, Y.; Nakshatri, H.; Ovadia, H.; Avraham, S. Angiopoietin-2 mediates blood-brain barrier impairment and colonization of triple-negative breast cancer cells in brain. *J. Pathol.* **2014**, *232*, 369–381. [\[CrossRef\]](#)
46. Zhao, C.; Wang, Q.; Wang, B.; Sun, Q.; He, Z.; Hong, J.; Kuehn, F.; Liu, E.; Zhang, Z. IGF-1 induces the epithelial-mesenchymal transition via Stat5 in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget* **2017**, *8*, 111922–111930. [\[CrossRef\]](#)
47. Li, J.; He, Y.; Cao, Y.; Yu, Y.; Chen, X.; Gao, X.; Hu, Q. Upregulation of twist is involved in Gli1 induced migration and invasion of hepatocarcinoma cells. *Biol. Chem.* **2018**, *399*, 911–919. [\[CrossRef\]](#)
48. Wang, L.; Zhou, R.; Zhao, Y.; Dong, S.; Zhang, J.; Luo, Y.; Huang, N.; Shi, M.; Bin, J.; Liao, Y.; et al. MACC-1 promotes endothelium-dependent angiogenesis in gastric cancer by activating TWIST1/VEGFA signal pathway. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0157137.
49. Xue, G.; Restuccia, D.F.; Lan, Q.; Hynx, D.; Dirnhofer, S.; Hess, D.; Rüegg, C.; Hemmings, B.A. Akt/PKB-mediated phosphorylation of Twist1 promotes tumor metastasis via mediating cross-talk between PI3K/Akt and TGF- β signaling axes. *Cancer Discov.* **2012**, *2*, 248–259. [\[CrossRef\]](#)
50. Cardenas, C.; van de Sandt, L.; Edlund, K.; Lohr, M.; Hellwig, B.; Marchan, R.; Schmidt, M.; Rahnenführer, J.; Oster, H.; Hengstler, J.G. Loss of circadian clock gene expression is associated with tumor progression in breast cancer. *Cell Cycle* **2014**, *13*, 3282–3291. [\[CrossRef\]](#)
51. Zhang, B.; Pan, X.; Cobb, G.P.; Anderson, T.A. microRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Dev. Biol.* **2007**, *302*, 1–12. [\[CrossRef\]](#)
52. American Cancer Society. Cancer Facts and Figures 2017. Available online: www.cancer.org/research/cancer-facts-statistics/all-cancer-facts-figures/cancer-facts-figures-2017.html (accessed on 17 May 2018).
53. Jawad, B.; Poudel, L.; Podgornik, R.; Steinmetz, N.F.; Ching, W.Y. Molecular mechanism and binding free energy of doxorubicin intercalation in DNA. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2019**, *21*, 3877–3893. [\[CrossRef\]](#)
54. Ji, X.; Lu, Y.; Tian, H.; Meng, X.; Wei, M.; Cho, W.C. Chemoresistance mechanisms of breast cancer and their countermeasures. *Biomed. Pharmacother.* **2019**, *114*, 108800. [\[CrossRef\]](#)

55. Lumachi, F.; Chiara, G.B.; Foltran, L.; Basso, S.M. Proteomics as a guide for personalized adjuvant chemotherapy in patients with early breast cancer. *Cancer Genom. Proteom.* **2015**, *12*, 385–390.
56. Kim, C.; Kim, N.; Joo, H.; Youm, J.B.; Park, W.S.; Cuong, D.V.; Park, Y.S.; Kim, E.; Min, C.K.; Han, J. Modulation by melatonin of the cardiotoxic and antitumor activities of adriamycin. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **2005**, *46*, 200–210. [\[CrossRef\]](#)
57. Rapozzi, V.; Zorzet, S.; Comelli, M.; Mavelli, I.; Perissin, L.; Giraldi, T. Melatonin decreases bone marrow and lymphatic toxicity of Adriamycin in mice bearing TLX5 lymphoma. *Life Sci.* **1998**, *63*, 1701–1713. [\[CrossRef\]](#)
58. Fic, M.; Podhorska-Okolow, M.; Dziegiel, P.; Gebarowska, E.; Wysocka, T.; Drag-Zalesinska, M.; Zabel, M. Effect of melatonin on cytotoxicity of doxorubicin toward selected cell lines (human keratinocytes, lung cancer cell line A-549, laryngeal cancer cell line Hep-2). *In Vivo* **2007**, *21*, 513–518.
59. Pariente, R.; Pariente, J.A.; Rodríguez, A.B.; Espino, J. Melatonin sensitizes human cervical cancer HeLa cells to cisplatin-induced cytotoxicity and apoptosis: Effects on oxidative stress and DNA fragmentation. *J. Pineal Res.* **2016**, *60*, 55–64. [\[CrossRef\]](#)
60. Wan, L.; Tian, Y.; Zhang, R.; Peng, Z.; Sun, J.; Zhang, W. MicroRNA-103 confers the resistance to long-treatment of Adriamycin to human leukemia cells by regulation of COP1. *J. Cell. Biochem.* **2018**, *119*, 3843–3852. [\[CrossRef\]](#)
61. Thisse, B.; el Messal, M.; Perrin-Schmitt, F. The twist gene: Isolation of a Drosophila zygotic gene necessary for the establishment of dorsoventral pattern. *Nucleic Acids Res.* **1987**, *15*, 3439–3453. [\[CrossRef\]](#)
62. Wang, S.M.; Coljee, V.W.; Pignolo, R.J.; Rotenberg, M.O.; Cristofalo, V.J.; Sierra, F. Cloning of the human twist gene: Its expression is retained in adult mesodermally-derived tissues. *Gene* **1997**, *187*, 83–92. [\[CrossRef\]](#)
63. Maestro, R.; Dei Tos, A.P.; Hamamori, Y.; Krasnokutsky, S.; Sartorelli, V.; Kedes, L.; Doglioni, C.; Beach, D.H.; Hannon, G.J. Twist is a potential oncogene that inhibits apoptosis. *Genes Dev.* **1999**, *13*, 2207–2217. [\[CrossRef\]](#)
64. Wang, Y.; Chen, D.Q.; Chen, M.Y.; Ji, K.Y.; Ma, D.X.; Zhou, L.F. Endothelial cells by inactivation of VHL gene direct angiogenesis, not vasculogenesis via Twist1 accumulation associated with hemangioblastoma neovascularization. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 5463. [\[CrossRef\]](#)
65. Mironchik, Y.; Winnard, P.T., Jr.; Vesuna, F.; Kato, Y.; Wildes, F.; Pathak, A.P.; Kominsky, S.; Artemov, D.; Bhujwalla, Z.; Van Diest, P.; et al. Twist overexpression induces in vivo angiogenesis and correlates with chromosomal instability in breast cancer. *Cancer Res.* **2005**, *65*, 10801–10809. [\[CrossRef\]](#)
66. Zhou, M.; Hou, Y.; Yang, G.; Zhang, H.; Tu, G.; Du, Y.E.; Wen, S.; Xu, L.; Tang, X.; Tang, S.; et al. LncRNA-Hh strengthen cancer stem cells generation in twist-positive breast cancer via activation of Hedgehog signaling pathway. *Stem Cells* **2016**, *34*, 55–66. [\[CrossRef\]](#)
67. Mier, D.; Lopez, M.; Franken, P.; Fontana, A. Twist1 is a TNF-inducible inhibitor of Clock mediated activation of period genes. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0137229. [\[CrossRef\]](#)
68. Hwang-Verslues, W.W.; Chang, P.H.; Jeng, Y.M.; Kuo, W.H.; Chiang, P.H.; Chang, Y.C.; Hsieh, T.H.; Su, F.Y.; Lin, L.C.; Abbondante, S.; et al. Loss of corepressor PER2 under hypoxia up-regulates OCT1-mediated EMT gene expression and enhances tumor malignancy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, *110*, 12331–12336. [\[CrossRef\]](#)
69. Samulin Erdem, J.; Skare, O.; Petersen-Overleir, M.; Noto, H.O.; Lie, J.S.; Reszka, E.; Peplonska, B.; Zienolddiny, S. Mechanisms of breast cancer in shift workers: DNA methylation in five core circadian genes in nurses working night shifts. *J. Cancer* **2017**, *8*, 2876–2884. [\[CrossRef\]](#)
70. Chi, L.; Zou, Y.; Qin, L.; Ma, W.; Hao, Y.; Tang, Y.; Luo, R.; Wu, Z. TIMELESS contributes to the progression of breast cancer through activation of MYC. *Breast Cancer Res.* **2017**, *19*, 53. [\[CrossRef\]](#)
71. Magne Nde, C.B.; Casas Gimeno, G.; Docanto, M.; Knower, K.C.; Young, M.J.; Buehn, J.; Sayed, E.; Clyne, C.D. Timeless is a novel estrogen receptor co-activator involved in multiple signaling pathways in MCF-7 cells. *J. Mol. Biol.* **2018**, *430*, 1531–1543. [\[CrossRef\]](#)
72. Álvarez-García, V.; González, A.; Alonso-González, C.; Martínez-Campa, C.; Cos, S. Regulation of vascular endothelial growth factor by melatonin in human breast cancer cells. *J. Pineal Res.* **2013**, *54*, 373–380. [\[CrossRef\]](#)
73. Proietti, S.; Cucina, A.; D’Anselmi, F.; Dinicola, S.; Pasqualato, A.; Lisi, E.; Bizzarri, M. Melatonin and vitamin D3 synergistically down-regulate Akt and MDM2 leading to TGFβ-1-dependent growth inhibition of breast cancer cells. *J. Pineal Res.* **2011**, *50*, 150–158. [\[CrossRef\]](#)

74. Wang, J.; Xiao, X.; Zhang, Y.; Shi, D.; Chen, W.; Fu, L.; Liu, L.; Xie, F.; Kang, T.; Huang, W.; et al. Simultaneous modulation of COX-2, p300, Akt, and Apaf-1 signaling by melatonin to inhibit proliferation and induce apoptosis in breast cancer cells. *J. Pineal Res.* **2012**, *53*, 77–90. [\[CrossRef\]](#)
75. Wu, Y.H.; Huang, Y.F.; Chen, C.C.; Chou, C.Y. Akt inhibitor SC66 promotes cell sensitivity to cisplatin in chemoresistant ovarian cancer cells through inhibition of COL11A1 expression. *Cell Death Dis.* **2019**, *10*, 322. [\[CrossRef\]](#)
76. Cicenast, J.; Urban, P.; Vuaroqueaux, V.; Labuhn, M.; Küng, W.; Wight, E.; Mayhew, M.; Eppenberger, U.; Eppenberger-Castori, S. Increased level of phosphorylated akt measured by chemiluminescence-linked immunosorbent assay is a predictor of poor prognosis in primary breast cancer overexpressing ErbB-2. *Breast Cancer Res.* **2005**, *7*, R394–R401. [\[CrossRef\]](#)
77. Yndestad, S.; Austreid, E.; Svanberg, I.R.; Knappskog, S.; Lonning, P.E.; Eikesdal, H.P. Activation of Akt characterizes estrogen receptor positive human breast cancer which respond to anthracyclines. *Oncotarget* **2017**, *8*, 41227–41241. [\[CrossRef\]](#)
78. Steelman, L.S.; Navolanic, P.M.; Sokolosky, M.L.; Taylor, J.R.; Lehmann, B.D.; Chappell, W.H.; Abrams, S.L.; Wong, E.W.; Stadelman, K.M.; Terrain, D.M.; et al. Suppression of PTEN function increases breast cancer chemotherapeutic drug resistance while conferring sensitivity to mTOR inhibitors. *Oncogene* **2008**, *27*, 4086–4095. [\[CrossRef\]](#)
79. Wu, D.; Cheng, J.; Sun, G.; Wu, S.; Li, M.; Gao, Z.; Zhai, S.; Li, P.; Su, D.; Wang, X. p70S6K promotes IL-6-induced epithelial-mesenchymal transition and metastasis of head and neck squamous cell carcinoma. *Oncotarget* **2016**, *7*, 36539–36550. [\[CrossRef\]](#)
80. Bostner, J.; Karlsson, E.; Eding, C.B.; Perez-Tenorio, G.; Franzén, H.; Konstantinell, A.; Fornander, T.; Nordenskjöld, B.; Stal, O. S6 kinase signaling: Tamoxifen response and prognostic indication in two breast cancer cohorts. *Endocr. Relat. Cancer* **2015**, *22*, 331–343. [\[CrossRef\]](#)
81. Lee, Y.; Jung, W.H.; Koo, J.S. Adipocytes can induce epithelial-mesenchymal transition in breast cancer cells. *Breast Cancer Res. Treat.* **2015**, *153*, 323–335. [\[CrossRef\]](#)
82. Yao-Borengasser, A.; Monzavi-Karbassi, B.; Hedges, R.A.; Rogers, L.J.; Kadlubar, S.A.; Kieber-Emmons, T. Adipocyte hypoxia promotes epithelial-mesenchymal transition-related gene expression and estrogen receptor-negative phenotype in breast cancer cells. *Oncol. Rep.* **2015**, *33*, 2689–2694. [\[CrossRef\]](#)
83. Shiota, M.; Izumi, H.; Onitsuka, T.; Miyamoto, N.; Kashiwagi, E.; Kidani, A.; Hirano, G.; Takahashi, M.; Naito, S.; Kohno, K. Twist and p53 reciprocally regulate target genes via direct interaction. *Oncogene* **2008**, *27*, 5543–5553. [\[CrossRef\]](#)
84. Ambros, V. microRNAs: Tiny regulators with great potential. *Cell* **2001**, *107*, 823–826. [\[CrossRef\]](#)
85. Rui, X.; Zhao, H.; Xiao, X.; Wang, L.; Mo, L.; Yao, Y. MicroRNA-34a suppresses breast cancer cell proliferation and invasion by targeting Notch1. *Exp. Ther. Med.* **2018**, *16*, 4387–4392. [\[CrossRef\]](#)
86. Imani, S.; Wei, C.; Cheng, J.; Khan, M.A.; Fu, S.; Yang, L.; Tania, M.; Zhang, X.; Xiao, X.; Zhang, X.; et al. MicroRNA-34a targets epithelial to mesenchymal transition-inducing transcription factors (EMT-TFs) and inhibits breast cancer cell migration and invasion. *Oncotarget* **2017**, *8*, 21362–21379. [\[CrossRef\]](#)
87. Rokavec, M.; Öner, M.G.; Li, H.; Jackstadt, R.; Jiang, L.; Lodygin, D.; Kaller, M.; Horst, D.; Ziegler, P.K.; Schwitala, S.; et al. IL-6R/STAT3/miR-34a feedback loop promotes EMT-mediated colorectal cancer invasion and metastasis. *J. Clin. Investig.* **2014**, *124*, 1853–1867. [\[CrossRef\]](#)
88. Li, Z.H.; Xiong, Q.Y.; Xu, L.; Duan, P.; Yang, Q.O.; Zhou, P.; Tu, J.H. miR-29a regulated ER-positive breast cancer cell growth and invasion and is involved in the insulin signaling pathway. *Oncotarget* **2017**, *8*, 32566–32575. [\[CrossRef\]](#)
89. Khamisipour, G.; Mansourabadi, E.; Naeimi, B.; Moazzeni, A.; Tahmasebi, R.; Hasanpour, M.; Mohammadi, M.M.; Mansourabadi, Z.; Shamsian, S. Knockdown of microRNA-29a regulates the expression of apoptosis-related genes in MCF-7 breast carcinoma cells. *Mol. Clin. Oncol.* **2018**, *8*, 362–369. [\[CrossRef\]](#)
90. Soheilyfar, S.; Velashjerdi, Z.; Sayed Hajizadeh, Y.; Fathi Maroufi, N.; Amini, Z.; Khorrami, A.; Haj Azimian, S.; Isazadeh, A.; Taefehshokr, S.; Taefehshokr, N. In vivo and in vitro impact of miR-31 and miR143 on the suppression of metastasis and invasion in breast cancer. *J. BOUN* **2018**, *23*, 1290–1296.
91. Lv, C.; Li, F.; Li, X.; Tian, Y.; Zhang, Y.; Sheng, X.; Song, Y.; Meng, Q.; Yuan, S.; Luan, L.; et al. MiR-31 promotes mammary stem cell expansion and breast tumorigenesis by suppressing Wnt signaling antagonists. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 1036. [\[CrossRef\]](#)

92. Ke, K.; Lou, T. MicroRNA-10a suppresses breast cancer progression via PI3K/Akt/mTOR pathway. *Oncol. Lett.* **2017**, *14*, 5994–6000. [[CrossRef](#)]
93. Lam, S.S.; Ip, C.K.; Mak, A.S.; Wong, A.S. A novel p70 S6 kinase-microRNA biogenesis axis mediates multicellular spheroid formation in ovarian cancer progression. *Oncotarget* **2016**, *7*, 38064–38077. [[CrossRef](#)]
94. Liu, S.Y.; Li, X.Y.; Chen, W.Q.; Hu, H.; Luo, B.; Shi, Y.X.; Wu, T.W.; Li, Y.; Kong, Q.Z.; Lu, H.D.; et al. Demethylation of the *MIR145* promoter suppresses migration and invasion in breast cancer. *Oncotarget* **2017**, *8*, 61731–61741. [[CrossRef](#)]
95. Liu, X.; Guan, Y.; Wang, L.; Niu, Y. MicroRNA-10b expression in node-negative breast cancer-correlation with metastasis and angiogenesis. *Oncol. Lett.* **2017**, *14*, 5845–5852. [[CrossRef](#)]
96. Tsukerman, P.; Yamin, R.; Seidel, E.; Khawaled, S.; Schmiedel, D.; Bar-Mag, T.; Mandelboim, O. MiR-520d-5p directly targets TWIST1 and downregulates the metastamiR miR-10b. *Oncotarget* **2014**, *5*, 12141–12150. [[CrossRef](#)]
97. Croset, M.; Goehrig, D.; Frackowiak, A.; Bonnelye, E.; Ansieau, S.; Puisieux, A.; Clézardin, P. TWIST1 expression in breast cancer cells facilitates bone metastasis formation. *J. Bone Miner. Res.* **2014**, *29*, 1886–1899. [[CrossRef](#)]
98. Chao, C.C.; Chen, P.C.; Chiou, P.C.; Hsu, C.J.; Liu, P.I.; Yang, Y.C.; Reiter, R.J.; Yang, S.F.; Tang, C.H. Melatonin suppresses lung cancer metastasis by inhibition of epithelial-mesenchymal transition through targeting to Twist. *Clin. Sci.* **2019**, *133*, 709–722. [[CrossRef](#)]
99. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* **1983**, *65*, 55–63. [[CrossRef](#)]
100. Livak, K.J.; Schmittgen, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ Method. *Methods* **2001**, *25*, 402–408. [[CrossRef](#)]



© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).



Review

Melatonin as a Radio-Sensitizer in Cancer

Carolina Alonso-González , Alicia González *, Javier Menéndez-Menéndez, Carlos Martínez-Campa *  and Samuel Cos

Department of Physiology and Pharmacology, School of Medicine, University of Cantabria and Instituto de Investigación Sanitaria Valdecilla (IDIVAL), 39011 Santander, Spain; carolina.alonso@unican.es (C.A.-G.); javier.menendezm@alumnos.unican.es (J.M.-M.); coss@unican.es (S.C.)

* Correspondence: gonzalav@unican.es (A.G.); martinezcm@unican.es (C.M.-C.); Tel.: +34-942-201965 (A.G.); +34-942-201963 (C.M.-C.)

Received: 1 July 2020; Accepted: 22 July 2020; Published: 27 July 2020



Abstract: Radiotherapy is one of the treatments of choice in many types of cancer. Adjuvant treatments to radiotherapy try, on one hand, to enhance the response of tumor cells to radiation and, on the other hand, to reduce the side effects to normal cells. Radiosensitizers are agents that increase the effect of radiation in tumor cells by trying not to increase side effects in normal tissues. Melatonin is a hormone produced mainly by the pineal gland which has an important role in the regulation of cancer growth, especially in hormone-dependent mammary tumors. Different studies have showed that melatonin administered with radiotherapy is able to enhance its therapeutic effects and can protect normal cells against side effects of this treatment. Several mechanisms are involved in the radiosensitization induced by melatonin: increase of reactive oxygen species production, modulation of proteins involved in estrogen biosynthesis, impairment of tumor cells to DNA repair, modulation of angiogenesis, abolition of inflammation, induction of apoptosis, stimulation of preadipocytes differentiation and modulation of metabolism. At this moment, there are very few clinical trials that study the therapeutic usefulness to associate melatonin and radiotherapy in humans. All findings point to melatonin as an effective adjuvant molecule to radiotherapy in cancer treatment.

Keywords: melatonin; radiotherapy; radiosensitization; cancer cells

1. Introduction

Radiotherapy is widely used for curative or palliative patient malignancies in many types of cancer [1–3]. It has been assessed that nearly 80% of cancer patients received radiation therapy alone or in combination with chemotherapy or hormonal therapy [4]. Besides its well-known properties, ionizing radiation has also been linked to numerous deleterious effects, produced by direct or indirect mechanisms. Thus, cell signaling is directly affected by the production of highly reactive oxygen species (ROS) involved in oxidative damage which may result in apoptosis, cell growth inhibition or EMT (epithelial-to-mesenchymal transition) transformation [5]. Despite technological advancements in radiotherapy that allow the administration of high doses of radiation to a specific and well-defined area, the irradiation of some degree of the surrounding normal tissue is still unavoidable. Adjuvant treatments to radiotherapy have two main objectives, on one hand, to enhance the response of tumor cells to radiation treatment and, on the other hand, to reduce side effects to normal tissues. For this reason, the two therapeutic strategies employed are the use of radiosensitizers targeted above all to cancer cells and radioprotectors for reducing deleterious side effects in the normal cells. Radiosensitizing agents should increase the effect of radiation in tumor cells without increasing side effects in normal tissues. Moreover, radiosensitizers have a potential role contributing to overcoming resistance to radiation, a major therapeutic problem. Hypoxia and nutrient depletion in the tumor can influence the response to treatments in such a way that cancer cells in a hypoxic microenvironment may be as

much as three times more resistant to radiation damage. Thus, developing effective radiosensitizers is critical to improve the curative effects of radiotherapy. Several approaches have been recently tested: the use of inhibitors of the EGFR/mTOR/HIF-1 (epidermal growth factor receptor/mammalian target of rapamycin/hypoxia inducible factor-1) signaling pathway, such as cetuximab [6], the use of silica nanoparticles to deliver hypoxia-activated prodrugs such as tirapazamine [7], the development of nitroimidazole analogues [8], HSP90 inhibitor such as ganetespib [9] or the identification of miRNAs secreted by hypoxic cancer cells [10]. In the same way, radioprotector agents should decrease the adverse effects on normal tissues without reducing the efficacy of radiation on tumor tissue.

In this review, we will compile the main actions of ionizing radiation, the pathways involved in the cell response to irradiation, some of best known radiosensitizers and finally we will describe some of the mechanisms through which melatonin is known to sensitize cancer cells to ionizing radiation.

2. Biological Effects of Radiation

The main target of ionizing radiation is DNA. An ionizing radiation may pass through cells and directly interact with DNA or ionize water molecules producing highly reactive radicals (reactive oxygen species and reactive nitrogen species) which interact with DNA and other organelles in tumor cells. This action may damage a nucleobase, cause a break in the sugar-phosphate backbone and produce a single- or a double-strand break or a DNA crosslink. For cell survival, the damage of a base or a single-strand break is not relevant because cells have mechanisms, like base excision repair mechanism, to fix the break [11]. In addition, most of the double-strand breaks induced by low linear energy transfer are also repaired by cells. However, a small proportion of the double-strand breaks induced by low linear energy transfer and most of the double-strand breaks induced by high linear energy transfer are not repaired by cells due to its great complexity, and therefore they lead to cell death, senescence, mutations or genomic instability. Cell response may be either the death of the cell or the genesis of a neoplasia. Damaged cells and adjacent lymphocytes and macrophages are involved in the activation of pathways related to inflammation, DNA repair and redox metabolism. Besides free radicals production, these processes stimulate the synthesis of many cytokines, such as IL-1, IL-4, IL-6, IL-8, IL-13, TNF- α or TGF- β that play a key role in the chronic oxidative stress and are also involved in the DNA breaks and cell death [12–14].

3. Signaling Pathways of the Cellular Radiation Response

Several cellular pathways are involved in the cellular radiation response that leads to survival or induction of either cell death or senescence of cells.

3.1. p53

One of the first stage in the response of cells to DNA damage is the cell cycle arrest mediated by ATM (ataxia-telangiectasia mutated), a main regulator of cell response to the double-strand break produced by ionizing radiation. The arrest of the cell cycle allows the repair of the DNA. Then, the activation of ATM phosphorylates and activates p53. Depending on cell damage and alterations of p53, the survival pathway or the cell death pathway is activated. For cell cycle arrest, p53 enhances the expression of the cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitor p21, which arrests cell cycle progression during the G₁ and G₂ phases [15,16].

3.2. DNA Double-Strand Break Repair Pathways

DNA double-strand breaks are repaired by two pathways, non-homologous end joining and homologous recombination. The chosen mechanism depends on the phase of the cell cycle. Homologous recombination is a complex error-free pathway, which requires the proximity of the sister chromatid and because of that, only takes place in late S and the G₂ phases of the cell cycle, before the cells enter mitosis [17,18]. However, non-homologous end joining repairs the broken ends without the requirement of a second template and is preeminent in G₁ phase [19,20]. Some of the main elements

of the non-homologous end-joining pathway are the Ku70/80 heterodimer and the catalytic subunit of DNA-dependent protein kinase (DNA-PKcs), which together make the active DNA-PK, XRCC4, ligase IV and the endonuclease artemis [20,21]. The over or under-expression of DNA-PKcs has been related with highly sensitivity or resistance to ionizing radiation [22–24]. The homologous recombination is initiated by the MRN(Mre11, Rad50, Nbs1), complex and CTIP (CtBP-Interacting Protein). In this process RAD51 plays a main function developing nucleoprotein filaments on single-strand DNA before the strand exchange. After the double-strand break, BRCA2, a complex that recruits RAD51 to sites of DNA damage, is activated by phosphorylation.

When the damage in DNA after radiation is solved, cells will progress through the cell cycle but, if the repair is not adequate, cells will be directed to cell death, either by apoptosis, mitotic catastrophe or senescence, depending on the dose of radiation, the phase of the cell cycle in which the cells are, the cell type or the presence or not of oxygen [16,25].

3.3. Apoptosis

Irradiation induces apoptosis primarily through both the intrinsic and the extrinsic apoptotic pathways and also through the membrane stress pathway. The intrinsic apoptotic pathway is associated with mitochondria and is influenced by proteins of the BCL (B-cell lymphoma family) family, such as Bax and Bcl-2 which are respectively anti-apoptotic and apoptotic. Radiation also induces apoptosis through the extrinsic pathway mediated by the death receptors, mainly those belonging to the tumor necrosis factor receptor (TNFR) family. Intrinsic and extrinsic apoptotic pathways are mediated by the activation of p53 in the DNA damage response. The membrane stress apoptotic pathway is a DNA damage-independent apoptotic process that does not require p53 activation and is mediated by the release of ceramide of the plasma membrane [16].

3.4. Mitotic Catastrophe

Mitotic catastrophe is the most relevant kind of cell death induced by ionizing radiation. It is a form of cell death based on induction of mitosis before completing the S and G₂ phase. It is triggered by a combination of deficient cell-cycle checkpoints and cellular damage and, as a consequence, cell death is induced in the next division following irradiation [16].

3.5. Senescence

The activation of p53 after irradiation often leads to activation of p21. This fact induces a permanent cell-cycle arrest that causes senescence. Many tumor cells respond to ionizing radiation by triggering stress-induced premature senescence. Senescent cells are metabolically active and can sometimes secrete growth factors that stimulate tumor growth. Senescence in tumor cells has been described as a way to escape from cytotoxic effects of radiation [16,26].

3.6. Autophagy

Autophagy is a process of lysosomal degradation of organelles through the formation of autophagosomes. In response to radiation-induced stress, autophagy has two different functions in cancer cells, on the one hand cytoprotection, whose inhibition can sensitize cancer cells to radiation; on the other hand cytotoxic function, which induces the death of cancer cells [27]. Cancer cells often utilize autophagy as a survival mechanism against different kinds of stress caused either by chemotherapy or radiotherapy. Autophagy has been proposed to be responsible for radio-resistance by eliminating ROS-produced damage [16,28].

3.7. EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) Signalling

Ionizing radiation can mimic the effects of ligand binding to EGFR and stimulates cell cycle progression and proliferation and inhibit apoptosis [16,29,30]. In addition, the irradiation

of EGFR induces DNA repair by activation of non-homologous end joining and homologous recombination [16,29].

4. Radiosensitizers

Radiosensitizers are agents used in the treatment of cancer to augment cancer cell damage after irradiation by increasing the sensibility of tumor cells. Depending on their structure, the radiosensitizers can be classified in three groups: small-molecules, nanostructures and macromolecules.

Oxygen and small molecules with similar characteristics fix the damage, avoiding repair by reductants that contain a thiol group, such as glutathione, neutralizing free radicals which results in an increase of the efficacy of ionizing radiation. Some of the small molecules known to function like radiosensitizers are, among many others: nocotinamide, clofibrate, misonidazole, etanidazole, amifostine, capecitabine, SN30000 and AQ4N. Some Hypoxia-specific cytotoxins with high cytotoxicity towards hypoxic cells, such as tirapazamine, increase the damage induced by radiation. The efficacy of some sensitizers (HDAC4, PI3K-Akt-mTOR, RSU1069, etc) has been related with their influence in different signaling pathways of DNA repair, apoptosis, metastasis, etc. [30]. The use of modified nucleosides is another option. Incorporation of 5-substituted uracils or 5-bromo-2'-deoxyuridine into genomic DNA sensitizes cellular DNA to radiation. The reactive nucleobase radical formed as a primary product quickly stabilizes and leads to DNA damage, like cross-links or strand breaks [31,32]

A new way to expand the diversity of radiosensitizers has been the development of nanostructures. Nanomaterials are able to interact with ionizing radiation at chemical, physical and biological levels by enhancing ROS production, stimulating oxidative stress and sensitizing DNA by direct binding, resulting in the increase of the efficacy of irradiation. Metallic nanomaterials or nano delivery systems are strategies employed to increase radiosensitizer concentrations at tumor cell level [33].

Finally, a third group of radiosensitizers include macromolecules, such as microRNAs, proteins, peptides, oligonucleotides, siRNAs, which have been associated with the regulation of sensitivity to ionizing radiation through different mechanisms: complementary binding to DNA, down or up-regulation of miRNAs, interaction with key proteins, delivery of radiosensitizers, etc. [34–36].

5. Melatonin: An Antitumor Hormone

Melatonin is a natural hormone produced mainly by the pineal gland which is ubiquitously distributed and exerts an important role in the regulation of cancer growth, especially in hormone-dependent mammary tumors. It is well known from animal models that melatonin diminished the incidence and growth of breast tumors, whereas pinealectomy usually stimulates breast cancer growth. Also, in *in vitro* human breast cancer cells models, melatonin shows a wide broad of oncostatic actions inhibiting cell proliferation and invasiveness and also promoting apoptosis [37,38]. This indolamine exerts many of its actions through binding to specific G-protein membrane receptors (MT₁, MT₂) but also through some other mechanisms like binding to orphan receptors or interaction with intracellular molecules such as calmodulin [39].

It has been confirmed that melatonin exerts oncostatic actions through different biological mechanisms (Figure 1), such as: indirect effects of melatonin at the level of the hypothalamic-pituitary-reproductive axis, which induces a decrease of biosynthesis of some of the hormones that stimulate the proliferation of cancer cells, such as the estrogenic compounds produced by the gonads [40]; antiestrogenic actions of melatonin directly at cancer cell level [41,42]; enhancement of the anticancer immunity and hemopoiesis [43]; inhibition of telomerase in cancer cells [44,45]; reduction of angiogenesis [46–48]; antioxidant effects [49]; inhibition of fatty acid uptake and fat metabolic pathways [50,51] and modulation of cell cycle, differentiation and apoptosis [38].

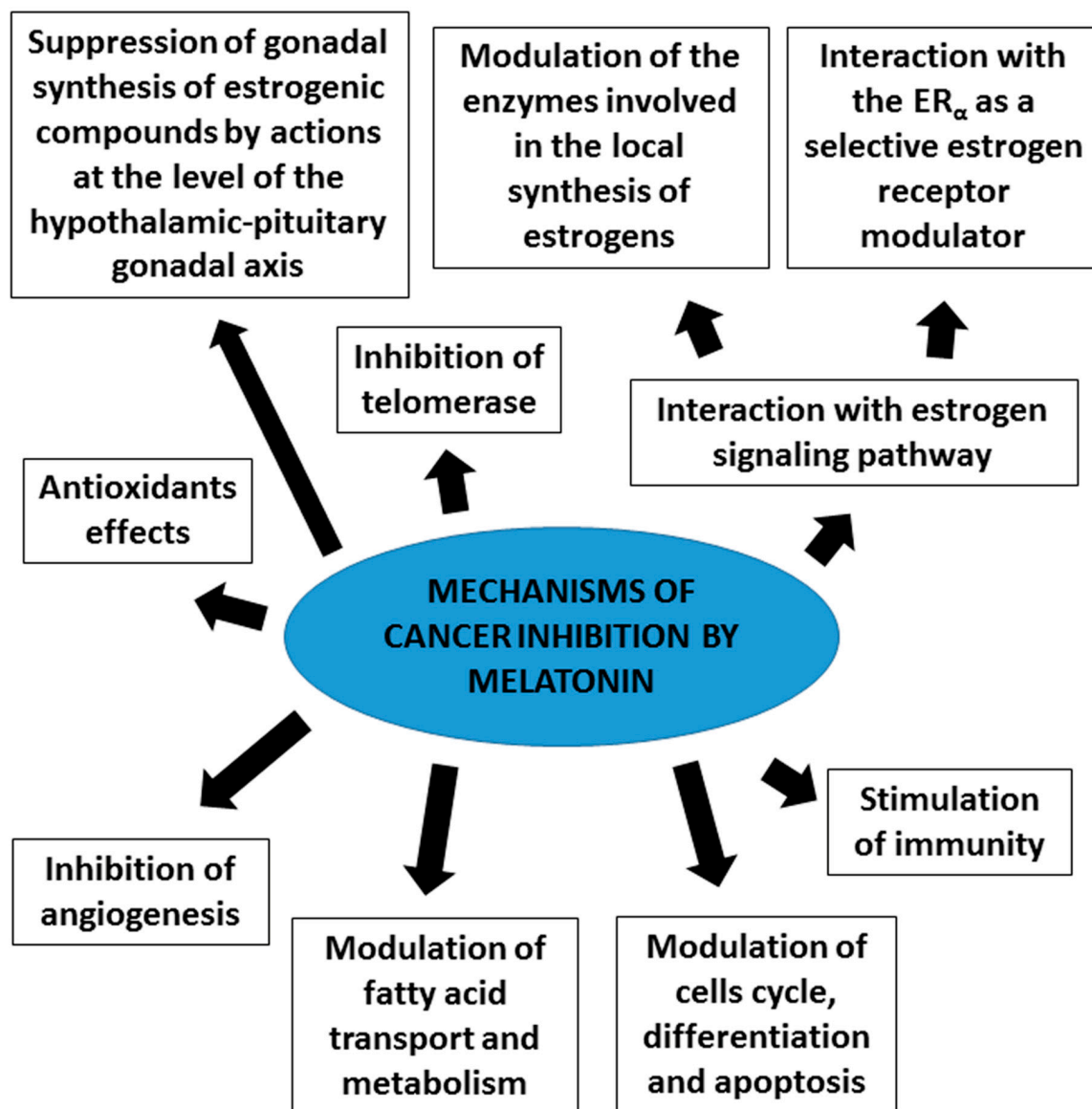


Figure 1. Mechanisms involved in melatonin antitumor actions.

6. Radiosensitizing Effects of Melatonin on Cancer: Mechanisms Involved in the Radiosensitization Induced by Melatonin

In recent years several studies have showed that melatonin administered with radiotherapy is able to enhance its therapeutic effects and can protect normal cells against side effects of this treatment. The radiosensitizing effects of melatonin have been described both in *in vivo* and *in vitro* studies and many reports have identified a variety of mechanisms that explain how melatonin potentiates the effects of radiation (Table 1).

Table 1. Mechanisms of melatonin radiosensitizing effects.

Radiosensitizing Effects of Melatonin		Cell Type/ <i>In vivo</i> Model	Reference
Oxidative Stress	Increase ROS production	Head and neck squamous cell carcinoma	[52]
	Increase of <i>HSP70</i> expression	Ovarian carcinoma cells	[53]
	Activation of c-Jun NH2 kinase signaling	Human cervical cancer cells	[54]
	Inhibition of p65 phosphorylation	Thyroid cancer cells	[55]
Modulation of estrogen biosynthesis	Decrease aromatase, sulfatase and 17 β -HSD1 activity	Breast cancer cells	[56]
	Increase sulfotransferase activity	Breast cancer cells	[56]
	Up-regulation of p53 protein	Breast cancer cells	[56–58]
	Inhibition of cell proliferation, migration and tubular network	Endothelial cells	[59]
	Decrease aromatase, sulfatase and 17 β -HSD1 activity	Breast adipose fibroblasts	[60]
	Inhibition of COX enzymes	Breast adipose fibroblasts	[60]
DNA repair mechanisms	Decrease the effectiveness of DNA repair proteins	Breast cancer cells	[61]
	Up-regulation of p53 protein	Breast cancer cells	[61–63]
	Enhance DNA damage and reduce DNA repair mechanisms	Non-small-cell lung cancer cells	[64]
	Increase sensitivity to ionizing radiation	Colorectal adenocarcinoma cells	[65]
	Increase Cdkn1 and RAD50 proteins regulating DSB repair	Colorectal carcinoma xenografts tumor model	[66]
Modulation of angiogenesis	Inhibition of pro-angiogenic factors (<i>VEGF</i> , <i>ANG2</i>)	Rat peripheral blood	[66]
	Decrease vascular area	Endothelial cells	[59]
	Inhibition of the activation of p-AKT and p-ERK	Chick chorioallantoic membrane assay	[59]
Modulation of inflammatory response	Reduce DNA damage	Endothelial cells	[59]
	Reduce the expression of inflammatory cytokines	Lung cancer cells	[68]
	Reduce the expression of NF- κ B, decreasing cytokines production	Lung cancer cells	[68,69]
	Decrease IL-4 signaling pathways, reducing ROS production and inflammatory cells infiltration	Rats irradiated with 15Gy ^{60}Co gamma rays	[69]
Induction of apoptosis	Enhance the apoptosis induced by laser irradiation	Ovarian cancer cells	[54]
	Upregulation of Akt and activation of Fas/FasL pathway	Malignant hematological cells	[70]
	Upregulation of p53, p21 and Bax expression	Breast cancer cells	[71]
	Inhibition of Akt and activation of pro-apoptotic caspases	Esophageal squamous cell carcinoma	[70]
	Inhibition of COX-2 and stimulation of cell death receptors signaling pathways	Hepatocellular carcinoma	[72,73]
Modulation of metabolism	Inhibition of aerobic glycolysis and inhibition of metastasis	Leiomyosarcoma	[74]
	Inhibition of the Warburg effect	Ewing Sarcoma	[75]
	Inhibition of aerobic glycolysis, lipid signaling and proliferative activity	Tissue-isolated breast cancer xenografts rats	[76]
	Inhibition of aerobic glycolysis and proliferative activity	Tissue-isolated prostate cancer xenografts rats	[77]

6.1. Increase of Reactive Oxygen Species (ROS) Production

Free radicals and oxidative stress have been frequently related to cancer. ROS play a main role in the regulation of several functions, such as proliferation and apoptosis. Among the oncostatic actions of melatonin, one of the mechanisms described has been its antioxidant effect, which has been deeply explored since 1993, when it was first defined that melatonin is a free radical scavenger [78]. These antioxidative effects of melatonin classify into two types of actions: direct actions as a free radical scavenger, such as reactive oxygen and nitrogen species, and indirect effects through the regulation of the activity and gene transcription of antioxidant or pro-oxidant enzymes [79,80]. Melatonin at high concentrations (500 μ M) potentiates the acute cytotoxic effects of radiation in head and neck squamous cell carcinoma. The improvement of the actions of radiation is partly due to enhanced mitochondrial function. Melatonin induces apoptosis in head and neck squamous cell carcinoma by generating intracellular ROS, which play a role in mitochondria-mediated apoptosis and autophagy [52]. In these kinds of tumors, melatonin combined with irradiation enhances the increase of expression of ATG12-ATG5, a complex essential for autophagosome formation, induced by radiation [52]. In addition, melatonin potentiates laser irradiation by increasing the content of generated intracellular ROS, particularly in ovarian carcinoma cells and endothelial cells adjacent to tumor cells. An increase of HSP70, associated with the generation of ROS induced by laser irradiation, was also enhanced by melatonin. HSP70 has an important function in apoptosis and in the defense of cells against stress oxidative status. Melatonin potentiates laser irradiation effects by stimulation of free-radical mediated apoptosis [53]. In human cervical cancer cells, the effects of melatonin on the radiosensitivity are dose-dependent and a concentration of 10 μ M enhances the cell-killing effect of X-rays irradiation, mediated by an increase in ROS induced by melatonin, whereas 1 mM concentration neutralizes X-rays irradiation-induced cell inactivation [54].

Melatonin can either stimulate or inhibit signal transduction pathways in a receptor-dependent or receptor-independent manner. It binds with high affinity to the membrane receptors in the picomolar range. In the nanomolar range, it can interact with nuclear receptors (RZR/ROR) as well as to calmodulin. At millimolar concentrations, it can behave as an antioxidant compound [81]. Administration of melatonin 10 μ M increased the cell killing effect caused by X-rays irradiation, mainly by activation of the c-Jun NH2-terminal kinase signaling, depending on the binding of the pineal hormone to its melatonin receptor on the membrane [81]. Radiosensitization by melatonin of thyroid cancer cells have been related with an increase of reactive oxygen species and an inhibition of p65 phosphorylation, a protein involved in NF- κ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) signaling [55].

6.2. Modulation of Proteins Involved in Estrogen Biosynthesis

The estrogen-signaling pathway is a main target in hormone-dependent cancer treatment. Since estrogens are associated with the genesis and growth of breast cancer, one of the objectives in the malignant mammary tumors therapy has always been to neutralize the action of estrogens. Some examples of therapies with this goal are: ovariectomy, the usage of drugs that interfere with the action of the estrogens at the estrogen receptor level on the breast, or drugs that modulate the enzymes involved in the estrogen biosynthesis. On the other hand, since the pineal gland and the melatonin, its main secretion product, are involved in the inhibition of the gonadal maturation and sex hormone secretion in mammals, a relationship between melatonin levels and the genesis and growth of malignant estrogen-responsive tumors was established [82,83]. Melatonin, at tumor cell level, disrupts estrogen-dependent pathways by reducing estrogen effects through regulating both the estrogen receptor expression and its transactivation. In addition, melatonin modulates the activity and expression of the enzymes involved in the local synthesis of estrogens at human breast cancer cell level. In the normal mammary tissue, the local estrogen biosynthesis tends towards estrone production from the circulating inactive precursors androstenedione and estrone sulfates, whereas in the breast cancer tissues tends towards the production of the more potent 17 β -estradiol. In malignant breast tumors, aromatase, which converts androstenedione into estrone, sulfatase, which transform the estrone sulfates

to estrone, and 17 β -HSD1, which converts the estrone to the more active 17 β -estradiol, are often overexpressed. The expression of estrogen sulfotransferase, the enzyme that inactivates estrone and 17 β -estradiol, is frequently decreased. As a consequence, the levels of 17 β -estradiol in breast cancer tissues are elevated. Melatonin modifies the activity and expression of these enzymes by taking them to values similar to those observed in normal tissue. Thus, melatonin decreases the activity and expression of aromatase, sulfatase and 17 β -HSD1 and increases the activity and expression of estrogen sulfotransferase, and in this way, it reduces the estrogenic effects on the mammary tissue [84–86].

Alonso-González et al. (2016) described that melatonin treatment before ionizing radiation increases the cytotoxic and radiosensitizing effects in human breast cancer cells and that is associated with the regulation of several proteins involved in estrogen biosynthesis [56]. Radiation decreased aromatase, sulfatase and 17 β -HSD1 activity and expression by itself and melatonin pre-treatment enhanced this inhibitory effect induced by the radiation (Figure 2). The down-regulation on the aromatase gene expression induced by melatonin was due to the inhibition of the two main specific aromatase promoter regions pII and pI.3 in breast cancer tissue. These authors suggest that the up-regulation of p53 could be the link between melatonin and its regulatory effect on breast cancer cells sensitivity to the ionizing radiation. p53, besides being a regulator of effectors which promote cell cycle arrest, DNA repair or apoptosis induction, is a negative modulator of aromatase in the breast [57,58].

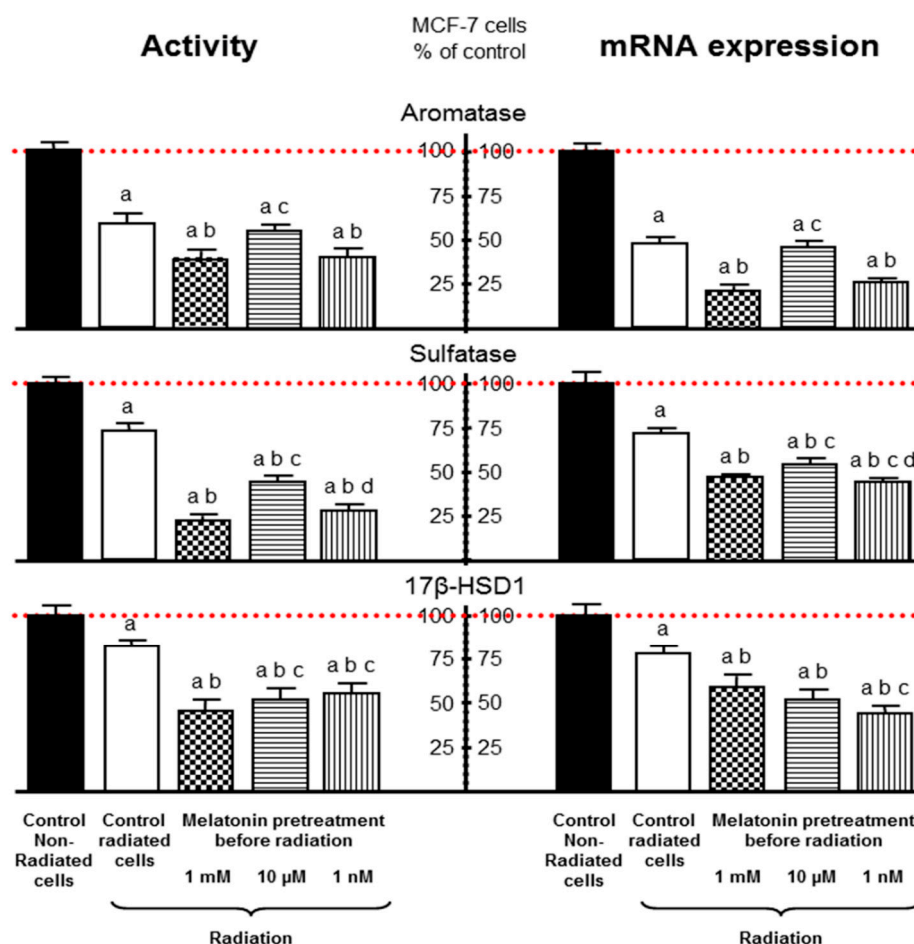


Figure 2. Modulation of proteins involved in estrogen biosynthesis. Melatonin pre-treatment (1 mM, 10 μ M or 1 nM) enhances the inhibitory effect induced by the radiation on aromatase, sulfatase and 17 β -HSD1 (17 β -Hydroxysteroid dehydrogenase) activity and expression of MCF-7 cells. Data are expressed as the percentage of the control non-radiated group (mean $\pm$ SEM). (a), $p < 0.001$ vs. control non-radiated cells; (b), $p < 0.001$ vs. control radiated cells; (c), $p < 0.01$ vs. 1 mM melatonin; (d), $p < 0.001$ vs. 10 μ M melatonin. Modified from Alonso-González et al. [57].

Recently, it has also been demonstrated that melatonin sensitizes, not only cancer cells but also peritumoral cells, such as endothelial cells or breast pre-adipocytes. Melatonin at 1 mM concentration potentiated the inhibitory effect exerted by ionizing radiation in human endothelial cells on several stages of the angiogenic process, such as endothelial cell proliferation, migration or tubular network formation, as well as on the enzymes implicated in estrogen biosynthesis [59]. In co-cultures of human endothelial cells and breast cancer cells, radiation decreased aromatase mRNA expression, sulfatase activity and expression and 17 β -HSD1 activity and mRNA expression, and melatonin pre-treatment significantly increased this inhibitory effect of radiation [59]. The regulation of aromatase expression was exerted through an inhibition of the aromatase promoter I.7, the most active aromatase promoter in endothelial cells.

Breast adipose fibroblasts, like endothelial cells, are a source of estrogen biosynthesis. Radiation also decreased aromatase activity and expression in breast adipose fibroblasts. Melatonin pre-treatment enhanced the down-regulation of aromatase activity and expression induced by radiation [60]. This melatonin effect was mediated through an increase in the inhibition of aromatase promoter II mRNA expression. In addition, it is known that cyclooxygenases (COX) enzymes are associated with aromatase expression through an increase of PGE₂ (Prostaglandin E₂), which raises the levels of intracellular cAMP, that enhances promoter II and I.3 mediated transcription, thus increasing aromatase expression. Radiation decreased COX-1 and COX-2 mRNA expression and melatonin enhanced this inhibitory effect of radiation [60].

6.3. Impairment of Tumor Cells to DNA Repair

The efficacy of treatments like ionizing radiation or chemotherapeutics agents in cancer has been associated with the mechanisms of DNA repair [61,87]. DNA double-strand break (DSB) is the main cytotoxic lesion exerted by ionizing radiation that promotes cell-cycle arrest and then cell death [62]. An enhancement in DNA repair capability has been involved in therapy resistance [88]. Homologous recombination and non-homologous end-joining are the two pathways that mediate the repair of DSBs [89]. RAD51 is a protein that plays a main role in the homologous recombinant mediated repair of double-strand break and its levels are increased in cancer cells [90]. DNA-PKcs play a main role in the non-homologous DNA end joining and its overexpression in cancer cells is involved in resistance to ionizing radiation [22]. Ionizing radiation decreases both RAD51 and DNA-protein kinase mRNA expression in human breast cancer cells. Treatment with melatonin before radiation caused a significantly higher decrease in RAD51 and DNA-protein kinase mRNA expression and sensitizes human breast cancer cells to ionizing radiation by reducing their proliferation, promoting cell-cycle arrest and decreasing the effectiveness of DNA repair [61]. Alonso-González et al. (2015) suggested that this modulatory action of melatonin on DNA repair could be mediated by p53, since melatonin increases p53 expression and this protein intervenes in the homologous recombination and in the non-homologous DNA end joining [61–63]. In human non-small-cell lung cancer and human colorectal adenocarcinoma cell lines, melatonin not only reduces the capability of tumor cells to repair DNA, but even enhances DNA damage exerted by irinotecan, a camptothecin analog used in clinic [64]. Besides its anti-oxidative actions by which this hormone protects DNA, melatonin also influences DNA repair by modulating some genes that induce protein synthesis related to DNA repair.

The combination of melatonin with ionizing radiation decreased DNA repair efficiency and induced a decrease of the expression of RAD51 and BRCA1 in a colorectal carcinoma cell line. Melatonin increased sensitivity of colorectal cancer cells to ionizing radiation and its oncostatic actions were corroborated in *in vivo* xenograft tumor models in mice exposed to γ -ray radiation [65]. Moreover, pre-treatment with melatonin before 2–8 Gy ionizing radiation, increased the expression of Cdkn1 and RAD50 in rat peripheral blood and regulated DNA double strand breaks repair [66].

6.4. Modulation of Angiogenesis

Since the formation of new blood vessels plays an outstanding role in cancer growth, the inhibition of angiogenesis has been proposed as an adjuvant therapy in cancer treatment to maximize its effectiveness. In this sense, angiogenesis inhibitors enhance ionizing radiation effects in the treatment of non-small cell lung cancer [91]. Thus, at this moment, anti-VEGF/VEGFR (vascular endothelial growth factor/vascular endothelial growth factor receptor) monoclonal antibodies, antisense suppression of VEGF, VEGFR tyrosine kinase inhibitors, viral-directed targeting of VEGFR signaling or the use of endogenous angiogenic inhibitors are under investigation as potential adjuvants to radiation in the cancer treatment [92].

Melatonin exerts oncostatic actions in different cancer types through several mechanisms, among them the antiangiogenic actions [46,47,93]. Recently, González-González et al. (2019) described that melatonin is able to potentiate the usefulness of radiation by increasing antiangiogenic actions and by neutralizing pro-angiogenic actions induced by ionizing radiation, through modulating several steps of the angiogenic process [60]. They described that ionizing radiation inhibits cell proliferation, migration and tubular network formation. Interestingly, in co-cultures of human breast cancer and endothelial cells, treatment with melatonin has a synergic effect and potentiates the inhibition induced by radiation of some pro-angiogenic factors, like VEGF and ANG-2, on different steps of the angiogenesis. Besides, melatonin neutralizes the stimulatory effect of ionizing radiation on endothelial cell permeability and on the expression of some proangiogenic genes, like FGFR3, TGF α , IGF-1, KDR, JAG1, MMP14, CXCL6, CCL2, ERK1, ERK2 and AKT1. This melatonin potentiation of antiangiogenic effects induced by radiation was also described in an *in vivo* model of angiogenesis study, the chick chorioallantoic membrane assay, where melatonin enhanced the decrease of vascular area exerted by radiation. The authors described that these melatonin effects could be mediated through the potentiation of the inhibitory effect exerted by ionizing radiation on the activation of *p*-AKT (protein kinase B) and *p*-ERK (extracellular signal regulated kinase). In addition, the effectiveness of radiation can be reduced by some side effects and melatonin pre-treatment counteracts these negative actions of radiation [60].

6.5. Abolition of Inflammation

As a result of radiotherapy, short and long term side effects often appear and many of them are linked to the inflammatory response, especially at high doses of radiation. Immune cells infiltration and cytokine secretion play a principal role in tumor response to irradiation. After irradiation, different mechanisms of cell death are triggered and can stimulate different signaling pathways in immune cells with changes in the cytokines production in both irradiated and non-irradiated tissues. Some of the molecules implicated in radiation-induced immune response are cytokines, like IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, IL-18, IL-33, IL-1 β and IFN- γ , transcription factors, like NF- κ B, TNF- α , protein kinases, like MAPK, or growth factors like IGF-1, TGF- β , bFGF and PDGF. Melatonin is a modulator of the immune response to radiation. Immune cells, such as T cells, B cells, or macrophages, express melatonin receptors [91,94]. Melatonin treatment reduces DNA damage and ameliorates the effects of radiation on peripheral and bone marrow lymphocyte numbers [67]. In addition, melatonin stimulates the production of IL-2, IFN- γ , GM-CSF, IL-3, IL-4, IL-10 and IL-6, with an increase in activity of NK and production of macrophages, neutrophils, granulocytes and erythrocytes [67]. Melatonin behaves as an anti-inflammatory molecule and reduces the expression of TNF- α , IL-1 β or IFN- γ , Th1 cytokines, which are involved in inflammation and on the contrary, it stimulates Th2 response. In lung cancer, melatonin treatment before radiation reduces the increase of TNF- α , IL-6 and TGF- β induced by ionizing radiation [68]. In many kinds of cancer, the increase of cytokines after radiation is mediated through NF- κ B [95]. It is known that melatonin down-regulates the expression of NF- κ B [67]. The lung is one of the most sensitive organs to the effects of radiation and side effects such as inflammatory response often turns into a main problem. The up-regulation of IL-4 signaling pathways activates the expression of duox1 and duox2, which mediate ROS production and stimulation of infiltration of macrophages, lymphocytes and mast cells. In rats irradiated with 15 Gy ^{60}Co gamma rays, melatonin treatment before

irradiation reversed all these changes and attenuated the inflammatory cells infiltration [69]. All these immunomodulatory actions of melatonin improved the survival of patients after radiotherapy.

Another main factor that mediates inflammatory response to radiation is the COX-2. The anti-oxidative and anti-inflammatory actions of melatonin included both inhibition of COX-2 and a general decline in the expression of transcriptional factors that mediate the inflammatory response to radiation [96]. In addition, in human pre-adipocytes exposed to ionizing radiation, melatonin inhibited COX-2 mRNA expression and this inhibition has been associated with local estrogen biosynthesis. The inhibition of cyclooxygenases expression in pre-adipocytes decreased the production of PGE₂ and consequently, reduced the intracellular levels of cAMP and therefore the activation of aromatase promoter II. The final results are a decrease of aromatase expression and a reduction of estrogens production in pre-adipocytes [60].

6.6. Induction of Apoptosis

Apoptosis is the most common mechanism of cell death that is activated after irradiation of tumor cells and it is associated with a reduction of tumor development. Radiation targets DNA, either directly or through the generation of free radicals. When cells are not able to repair the damaged DNA they die through different mechanisms of cell death such as autophagy, mitotic catastrophe, senescence or apoptosis. The degree of apoptosis depends on some factors like the dose of radiation and the type of cells. Cells are going to be more sensitive to apoptosis in the face of stress conditions when they exhibit a high proliferation rate, high expression of pro-apoptotic genes and low expression of anti-apoptotic genes. Melatonin, contrary to what happens in normal cells where it has anti-apoptotic actions, potentiates apoptosis in malignant cells. In ovarian cancer cells, melatonin enhances the apoptosis induced by laser irradiation [54]. Melatonin sensitization of cancer cells to the induction of apoptosis after ionizing radiation is performed through several mechanisms, which have been summarized in a recent review [70]. In malignant hematological cells, melatonin treatment up-regulates Akt which induces ROS production and activate the Fas/FasL pathway, one of the main targets involved in induction of apoptosis in cancer cells after radiation and/or chemotherapy [70]. The levels of the tumor suppressor protein p53 are augmented in cells under genotoxic stress, like ionizing radiation, and induce apoptosis, cell-cycle arrest, senescence and DNA repair [58,97]. Conversely, the down-regulation of p53 has been associated with inhibition of both intrinsic and extrinsic pathway of apoptosis and tumor growth. In addition, the up-regulation of p53 potentiates the response of cancer cells to radiation via induction of apoptosis [98]. Melatonin through an increase of p53 mRNA expression sensitized human breast cancer cells to the effects of ionizing radiation [56]. Nooshinfar et al. (2016) described that melatonin potentiated the activation of p53 and p21 and the up-regulation of Bax expression induced by arsenic trioxide that lead to apoptosis [71]. Another way to regulate apoptosis is through the modulation of mitochondrial metabolism. The kind of metabolism determines the response to the pineal hormone. Melatonin is not able to modulate mitochondrial respiration in cancer cells with highly glycolytic profile [99]. In human breast cancer cells and in pituitary prolactin secretory tumor melatonin disrupted the activity of mitochondrial complexes inducing a mitochondrial dysfunction that leads to apoptosis. Melatonin also sensitizes cancer cells to radiation through regulation of NF-κB. NF-κB is a transcription factor involved in the induction of cell death, in the intrinsic pathway of apoptosis and in the generation of many inflammatory cytokines. Radiation increases NF-κB expression in cancer cells and melatonin inhibits, on some of them such as thyroid cancer cells, the phosphorylation and nuclear expression of NF-κB/p65, which induces apoptosis and a decrease of tumor invasive markers [55]. The activation of MAPKs (Mitogen Activated Protein Kinases) is also associated with proliferation and apoptosis. Thus, Jun N-terminal kinase (JNK), p38 and extracellular-signal-regulated kinase (ERK) intervene in the modulation of apoptosis by interacting with other pathways like AKT and PI3K. PI3K activation up-regulates Bcl-2 through NF-κB, leading to apoptosis in cancer cells. In addition, an increased AKT expression is observed in several kind of tumors, such as breast, colon, ovarian, pancreatic or colorectal malignancies [100–103]. In many of them, melatonin stimulates

apoptosis through the inhibition of PI3K [72]. In esophageal squamous cell carcinoma melatonin activates pro-apoptotic caspases through the inhibition of AKT [70]. In addition, the inhibition of COX-2 has been related with stimulation of apoptosis mediated by stimulation of TRAIL (TNF-related apoptosis-induced ligand) and FasL (Fas ligand) receptors which are associated with cell death [73]. The inhibition of COX-2 by melatonin enhanced apoptosis in hepatocellular carcinoma [72].

6.7. Differentiation of Pre-Adipocytes

González-González et al. (2019) have recently showed that melatonin sensitizes breast fibroblasts to ionizing radiation. In co-cultures of human breast pre-adipocytes and human breast cancer cells, radiation is able to inhibit both proliferation and differentiation of breast fibroblasts through the down-regulation of the two main adipogenic transcription factors CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP α) and peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR γ) and by stimulating the expression of TNF α (Tumor necrosis factor alpha), an anti-adipogenic cytokine secreted by breast malignant epithelial cells. In addition, radiation reduced aromatase activity and expression, another marker of undifferentiated pre-adipocyte phenotype, by decreasing aromatase promoter II and both COX-1 and COX-2 expression. Melatonin counteracted the inhibitory action of radiation on differentiation of pre-adipocytes, by increasing C/EBP α and PPAR γ expression and by decreasing TNF α expression. Melatonin also potentiated the inhibition induced by radiation on aromatase activity and expression by increasing the down-regulation of promoter II, COX-1 and COX-2 expression (Figure 3). This study showed that, in a tumor microenvironment model, melatonin is able to modulate the response of pre-adipocytes (differentiation, aromatase activity and expression) to ionizing radiation [60].

6.8. Modulation of Metabolism

Cancer cells show an altered metabolic activity in comparison to normal cells and they obtain ATP mainly through glycolysis (which is enhanced) whereas mitochondrial oxidative phosphorylation activity is reduced, which is called Warburg effect [104]. Multiple regulators are involved in this metabolic switch: HIF-1 α , NF- κ B, Akt and mTOR signaling pathways, diverse oncogenes (c-myc), tumor suppressors, energy sensors, etc. [105]. Exposure to fractionated radiation with 0.5 Gy of X-rays of human cancer cells induces radio-resistance through an increase of aerobic glycolysis [106]. On the contrary, in lymphoma cells, the inhibition of glycolysis increased sensitivity of cancer cells to apoptosis [107]. In leiomyosarcoma melatonin inhibits aerobic glycolysis and this fact was related with an inhibition of metastasis [74]. The inhibition by melatonin of the Warburg effect in Ewing sarcoma has also been associated with an increase of cytotoxicity [75]. Blask et al. (2014) described, in tissue-isolated human breast cancer xenografts grown in nude rats that dim light at night (LAN)-induced melatonin suppression disrupts the circadian-regulated host/cancer balance among several important cancer inhibitory signaling mechanisms, inducing hyperglycemia and hyperinsulinemia in the host and enhancing aerobic glycolysis, lipid signaling and proliferative activity in the tumor [76]. The same group demonstrated that amplification of night-time melatonin levels in nude rats exposed to blue light during the day-time significantly reduces aerobic glycolysis and proliferative activity in human prostate cancer xenografts [77].

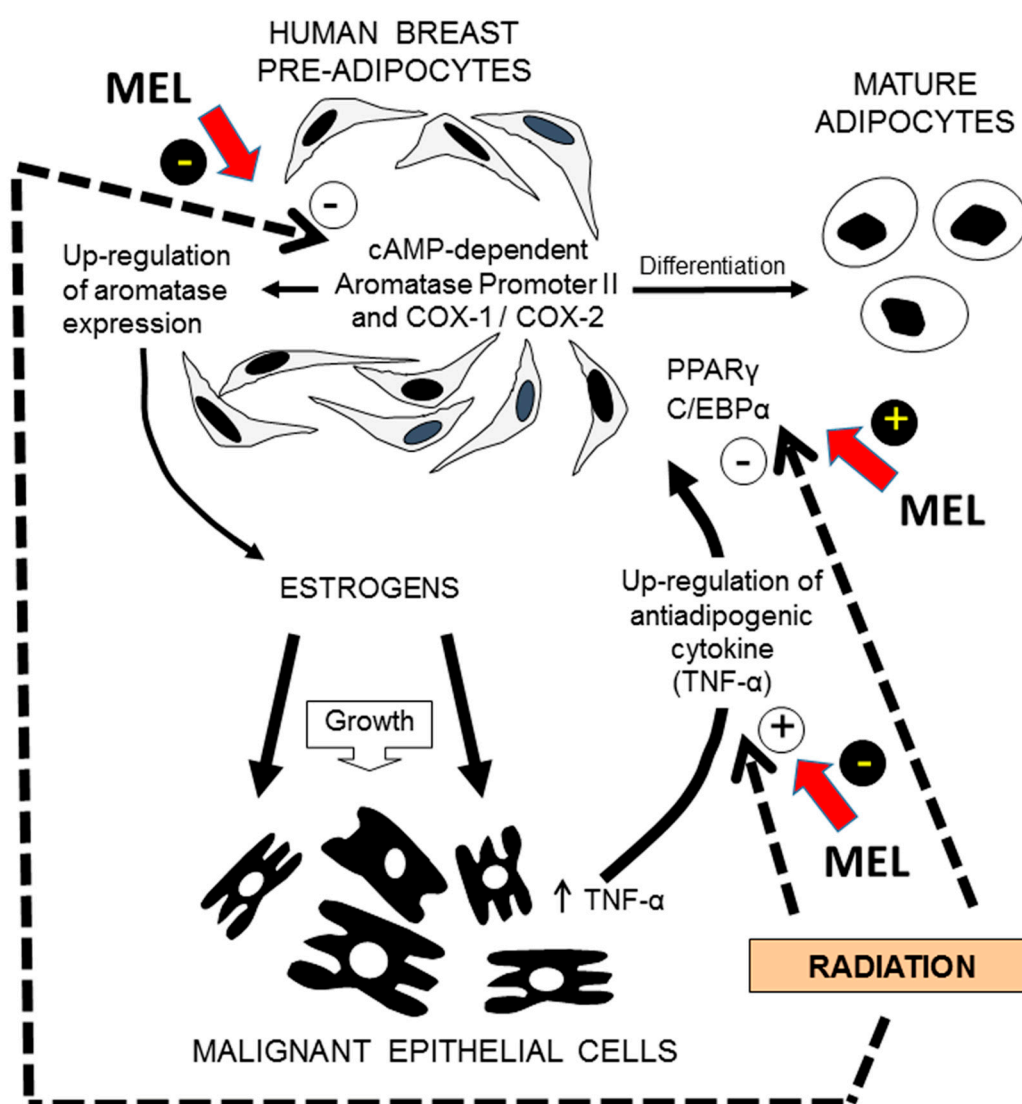


Figure 3. Modulation by melatonin of the pre-adipocytes response (differentiation, aromatase activity and expression) to ionizing radiation. In co-cultures of human breast pre-adipocytes and human breast cancer cells melatonin (MEL) counteracts the inhibitory action of radiation on differentiation of pre-adipocytes, by increasing C/EBP α (CCAAT/enhancer binding protein alpha) and PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptor gamma) expression and by decreasing TNF α (Tumor necrosis factor α) expression, an anti-adipogenic cytokine secreted by breast malignant epithelial cells. Melatonin also potentiates the inhibition induced by radiation on aromatase activity and expression by increasing the down-regulation of aromatase promoter II, COX-1 and COX-2 expression. Figure drawn from data published by González-González et al. [87].

7. Clinical Trials with Melatonin as an Adjuvant to Radiotherapy

Despite the amount of *in vivo* and *in vitro* studies about the efficacy of melatonin treatment associated to ionizing radiation, there are very few clinical trials that study its therapeutic usefulness in humans. One of the first attempts to associate melatonin and radiotherapy was made by Lissoni's group, who studied the effects of melatonin treatment adjuvant to radiotherapy (60 Gy) in 30 patients with glioblastoma. Their preliminary study suggests that melatonin associated to radiation may ameliorate the quality of life and enhance the 1-year survival rate of patients [108].

However, in a randomized phase II clinical trial with patients with brain metastases that received radiation therapy in the afternoon (30 Gy in 10 fractions) and randomized to melatonin (20 mg), administered in the morning or in the evening, there were no significant benefits in the melatonin treated group in relation with the survival of the patients and their neurological deterioration [109].

Melatonin-containing emulsion treatment significantly decreased the appearance of dermatitis induced by radiation in stages 0-II breast cancer patients treated with breast whole radiation therapy (50 Gy) [110]. However, in other study, in a small group of cancer patients who underwent pelvic irradiation and were treated with or without melatonin, the appearance of another side effect of radiotherapy such as lymphocytopenia was studied. The main conclusion was that melatonin treatment did not modify the radiotherapy effects [111].

There is a meta-analysis of 21 clinical trials with patients with metastatic, solid tumor cancers. In some of them the combination of chemotherapy and melatonin decreased 1-year mortality and improved outcomes of complete response, partial response, and stable disease. In these studies, melatonin also significantly reduced asthenia, leucopenia, nausea and vomiting, hypotension and thrombocytopenia. The authors suggest that melatonin may benefit cancer patients who are also receiving chemotherapy, radiotherapy, supportive therapy, or palliative therapy by improving survival and ameliorating the side effects of chemotherapy. In this meta-analysis there is only one clinical trial with melatonin as an adjuvant to radiotherapy [112].

8. Conclusions

Improving the effectiveness of radiotherapy in cancer treatment can offer many benefits for cancer patients. The oncostatic properties of melatonin make it an interesting molecule in the treatment of cancer. The association of melatonin with radiotherapy has remarkable results both *in vitro* and *in vivo*. Radiosensitization of some types of cancer cells by melatonin have been related with an increase of reactive oxygen species and an enhancement of the cell-killing effect of radiation. In breast cancer cells melatonin treatment before ionizing radiation also increases the cytotoxic effects of radiation associated with the regulation of several proteins involved in estrogen biosynthesis. The up-regulation of p53, a regulator of effectors which promote cell-cycle arrest, DNA repair, apoptosis induction or a negative modulator of aromatase in the breast, has been suggested as the link between melatonin and its regulatory effect on breast cancer cells sensitivity to the ionizing radiation. Melatonin also reduces the capability of tumor cells to repair injured DNA and enhances DNA damage exerted by radiation by modulating proteins that intervene in both the homologous recombination and in the non-homologous DNA end joining. The usefulness of melatonin to potentiate the effects of radiation has been also related with an increase of anti-angiogenic actions and a neutralization of pro-angiogenic effects induced by ionizing radiation, through modulating several steps of the angiogenic process. Melatonin also behaves as an anti-inflammatory agent and reduces the expression some cytokines, which are involved in the inflammation induced by radiation. The sensitization of cancer cells by melatonin is also exerted by an increase of apoptosis induced by ionizing radiation. In tumor microenvironment, melatonin also may modulate the response of pre-adipocytes (differentiation, aromatase activity and expression) to ionizing radiation. The inhibition of glycolysis by melatonin in cancer cells also increases the sensitivity of cancer cells to the cytotoxicity of radiation. All these actions of melatonin make it a promising agent used as adjuvant to radiotherapy.

Author Contributions: Paper design: C.A.-G., A.G., C.M.-C. and S.C. Literature collection and summary A.G. and J.M.-M. Drafting manuscript: C.A.-G. and S.C. Revising manuscript: C.A.-G., A.G., C.M.-C., and S.C. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by a grant from the Spanish Economy and Competitiveness Ministry (SAF2016-77103-P) and from Instituto de Investigación Sanitaria Valdecilla (IDIVAL) (APG/12).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Abbreviations

ROS	Reactive Oxygen Species
HSP70	Heat Shock Protein 70
p65	Nuclear factor NF-kappa-B p65 subunit
17 β -HSD1	17 β -Hydroxysteroid-dehydrogenase type 1
CDKN1	cyclin-dependent kinase inhibitor 1
RAD50	Double Strand Break Repair Protein
DSB repair	Double Strand Break repair
COX-2	Cyclooxygenase-2
VEGF	Vascular endothelial growth factor
ANG-2	Angiopoietin-2
p-AKT	protein kinase B
p-ERK	extracellular signal regulated kinase
pNF- κ B	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
IL-4	Interleukine-4
p21	cyclin-dependent kinase inhibitor 1
Bax	BCL2 Associated X, Apoptosis Regulator

References

- Rodrigues, G.; Choy, H.; Bradley, J.; Rosenzweig, K.E.; Bogart, J.; Curran, W.J., Jr.; Gore, E.; Langer, C.; Louie, A.V.; Lutz, S.; et al. Definitive radiation therapy in locally advanced non small cell lung cancer: Executive summary of an American Society for Radiation Oncology (ASTRO) evidence-based clinical practice guideline. *Pract. Radiat. Oncol.* **2015**, *5*, 141–148. [\[CrossRef\]](#)
- Klopp, A.; Smith, B.D.; Alektiar, K.; Cabrera, A.; Damato, A.L.; Erickson, B.; Fleming, G.; Gaffney, D.; Greven, K.; Lu, K.; et al. The role of postoperative radiation therapy for endometrial cancer: Executive summary of an American Society for Radiation Oncology evidence-based guideline. *Pract. Radiat. Oncol.* **2014**, *4*, 137–144. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Valicenti, R.K.; Thompson, I., Jr.; Albertsen, P.; Davis, B.J.; Goldenberg, S.L.; Wolf, J.S.; Sartor, O.; Klein, E.; Hahn, C.; Michalski, J.; et al. Adjuvant and salvage radiation therapy after prostatectomy: American Society for Radiation Oncology/American Urological Association guidelines. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **2013**, *86*, 822–828. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Nair, C.K.K.; Parida, D.K.; Nomura, T. Radioprotectors in radiotherapy. *J. Radiat. Res.* **2001**, *42*, 21–37. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Shinomiya, N. New concepts in radiation-induced apoptosis: ‘premitotic apoptosis’ and ‘postmitotic Apoptosis’. *J. Cell Mol. Med.* **2001**, *5*, 240–253. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Coliat, P.; Ramolu, L.; Jégu, J.; Gaidon, C.; Jung, A.C.; Pencreach, E. Constitutive or induced HIF-2 addiction is involved in resistance to anti-EGFR treatment and radiation therapy in HNSCC. *Cancers* **2019**, *11*, 1607. [\[CrossRef\]](#)
- Wang, Z.; Chang, Z.M.; Shao, D.; Zhang, F.; Chen, F.; Li, L.; Ge, M.F.; Hu, R.; Zheng, X.; Wang, Y.; et al. Janus gold triangle-mesoporous silica nanoplateforms for hypoxia-activated radio-chemo-photothermal therapy of liver cancer. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2019**, *11*, 34755–34765. [\[CrossRef\]](#)
- Bonnet, M.; Hong, C.H.; Wong, W.W.; Liew, L.P.; Shome, A.; Wang, J.; Gu, Y.; Stevenson, R.J.; Qi, W.; Jamieson, S.M.F.; et al. Next-generation hypoxic cell radiosensitizers: Nitroimidazole alkylsulfonamides. *J. Med. Chem.* **2018**, *61*, 1241–1254.
- Nagaraju, G.P.; Zakka, K.M.; Landry, J.C.; Shaib, W.L.; Lesinski, G.B.; El-Rayes, B. Inhibition of HSP90 overcomes resistance to chemotherapy and radiotherapy in pancreatic cancer. *Int. J. Cancer* **2019**, *145*, 1529–1537. [\[CrossRef\]](#)
- Yue, X.; Lan, F.; Xia, T. Hypoxic glioma cell-secreted exosomal miR-301a activates Wnt/ β -catenin signaling and promotes radiation resistance by targeting TCEAL7. *Mol. Ther.* **2019**, *27*, 1939–1949. [\[CrossRef\]](#)
- Hall, E.J.; Giaccia, A.J. *Radiobiology for the Radiologist*, 7th ed.; LippincottWilliams & Wilkins: Philadelphia, PA, USA, 2012; p. 576.

12. Yahyapour, R.; Amini, P.; Rezapour, S.; Cheki, M.; Rezaeyan, A.; Farhood, B.; Shabeeb, D.; Musa, A.E.; Fallah, H.; Najafi, M. Radiation-induced inflammation and autoimmune diseases. *Mil. Med. Res.* **2018**, *5*, 9. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Yahyapour, R.; Motevaseli, E.; Rezaeyan, A.; Abdollahi, H.; Farhood, B.; Cheki, M.; Najafi, M.; Villa, V. Mechanisms of radiation bystander and non-targeted effects: Implications to radiation carcinogenesis and radiotherapy. *Curr. Radiopharm.* **2018**, *11*, 34–45. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Yahyapour, R.; Motevaseli, E.; Rezaeyan, A.; Abdollahi, H.; Farhood, B.; Cheki, M.; Rezapoor, S.; Shabeeb, D.; Musa, A.E.; Najafi, M.; et al. Reduction-oxidation (redox) system in radiation-induced normal tissue injury: Molecular mechanisms and implications in radiation therapeutics. *Clin. Transl. Oncol.* **2018**, *20*, 975–988. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Lukas, J.; Lukas, C.; Bartek, J. Mammalian cell cycle checkpoints: Signalling pathways and their organization in space and time. *DNA Repair* **2004**, *3*, 997–1007. [[CrossRef](#)]
16. Maier, P.; Hartmann, L.; Wenz, F.; Herskind, C. Cellular pathways in response to ionizing radiation and their targetability for tumor radiosensitization. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17*, 102. [[CrossRef](#)]
17. San Filippo, J.; Sung, P.; Klein, H. Mechanism of eukaryotic homologous recombination. *Annu. Rev. Biochem.* **2008**, *77*, 229–257. [[CrossRef](#)]
18. Choudhury, A.; Cuddihy, A.; Bristow, R.G. Radiation and new molecular agents part 1: Targeting ATM-ATR checkpoints, DNA repair and the proteasome. *Semin. Radiat. Oncol.* **2006**, *16*, 51–58. [[CrossRef](#)]
19. Rothkamm, K.; Kruger, I.; Thompson, L.H.; Löbrich, M. Pathways of DNA double-strand break repair during the mammalian cell cycle. *Mol. Cell Biol.* **2003**, *23*, 5706–5715. [[CrossRef](#)]
20. Lieber, M.R. The mechanism of human nonhomologous DNA end joining. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 1–5. [[CrossRef](#)]
21. Davis, A.J.; Chen, B.P.C.; Chen, D.J. DNA-PK: A dynamic enzyme in a versatile DSB repair pathway. *DNA Repair* **2014**, *17*, 21–29. [[CrossRef](#)]
22. Veuger, S.J.; Curtin, N.J.; Richardson, C.J.; Smith, G.C.; Durkacz, B.W. Radiosensitization and DNA repair inhibition by the combined use of novel inhibitors of DNA-dependent protein kinase and poly(ADP-ribose) polymerase-1. *Cancer Res.* **2003**, *63*, 6008–6015. [[PubMed](#)]
23. Shen, H.; Schultz, M.; Kruh, G.D.; Tew, K.D. Increased expression of the DNA-dependent protein kinase confers resistance to Adriamycin. *Biochim. Biophys. Acta* **1998**, *1381*, 131–138. [[CrossRef](#)]
24. Hansen, L.T.; Lunding, C.; Helleday, T.; Poulsen, H.S.; Sørensen, C.S.; Petersen, L.N.; Spang-Thomsen, M. DNA repair rate and etoposide (VP16) resistance of tumour cell subpopulations derived from a single human small cell lung cancer. *Lung Cancer* **2003**, *40*, 157–164. [[CrossRef](#)]
25. Stewart, R.D.; Yu, V.K.; Georgakilas, A.G.; Koumenis, C.; Park, J.H.; Carlson, D.J. Effects of radiation quality and oxygen on clustered DNA lesions and cell death. *Radiat. Res.* **2011**, *176*, 587–602. [[CrossRef](#)]
26. Gewirtz, D.A. Autophagy, senescence and tumor dormancy in cancer therapy. *Autophagy* **2009**, *5*, 1232–1234. [[CrossRef](#)]
27. Yang, Y.; Yang, Y.; Yang, X.; Zhu, H.; Guo, Q.; Chen, X.; Zhang, H.; Cheng, H.; Sun, X. Autophagy and its function in radiosensitivity. *Tumor Biol.* **2015**, *36*, 4079–4087. [[CrossRef](#)]
28. Goehe, R.W.; Di, X.; Sharma, K.; Bristol, M.L.; Henderson, S.C.; Valerie, K.; Rodier, F.; Davalos, A.R.; Gewirtz, D.A. The autophagy-senescence connection in chemotherapy: Must tumor cells (self) eat before they sleep? *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2012**, *343*, 763–778. [[CrossRef](#)]
29. Toulany, M.; Rodemann, H.P. Membrane receptor signalling and control of DNA repair after exposure to ionizing radiation. *Nuklearmedizin* **2010**, *49* (Suppl. S1), S26–S30. [[CrossRef](#)]
30. Karni, R.; Jove, R.; Levitzki, A. Inhibition of pp60c-Src reduces BCL-XL expression and reverses the transformed phenotype of cells overexpressing EGF and HER-2 receptors. *Oncogene* **1999**, *18*, 4654–4662. [[CrossRef](#)]
31. Chomicz, L.; Zdrowowicz, M.; Kasprzykowski, F.; Rak, J.; Buonaugurio, A.; Wang, Y.; Bowen, K.H. How to find out whether a 5-substituted uracil could be a potential radiosensitizer. *J. Phys. Chem. Lett.* **2013**, *4*, 2853–2857. [[CrossRef](#)]
32. Rak, J.; Chomicz, L.; Wicz, J.; Westphal, K.; Zdrowowicz, M.; Wityk, P.; Zyndul, M.; Makurat, S.; Golon, L. Mechanisms of damage to DNA labeled with electrophilic nucleobases induced by ionizing radiation or UV radiation. *J. Phys. Chem. B* **2015**, *119*, 8227–8238. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Wang, H.; Mu, X.; He, H.; Zhang, X.-D. Cancer Radiosensitizers. *Trends Pharmacol. Sci.* **2018**, *39*, 24–48. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

34. Gandellini, P.; Rancati, T.; Valdagni, R.; Zaffaroni, N. miRNAs in tumor radiation response: Bystanders or participants? *Trends Mol. Med.* **2014**, *20*, 529–539. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Buglione, M.; Maddalo, M.; Corvò, R.; Pirtoli, L.; Paiar, F.; Lastrucci, L.; Stefanacci, M.; Belgioia, L.; Crociani, M.; Vecchio, S.; et al. Subgroup analysis according to human papillomavirus status and tumor site of a randomized phase II trial comparing cetuximab and cisplatin combined with radiation therapy for locally advanced head and neck cancer. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **2017**, *97*, 462–472. [[CrossRef](#)]
36. Lei, Y.; Tang, L.; Xie, Y.; Xianyu, Y.; Zhang, L.; Wang, P.; Hamada, Y.; Jiang, K.; Zheng, W.; Jiang, X. Gold nanoclusters-assisted delivery of NGF siRNA for effective treatment of pancreatic cancer. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 15130. [[CrossRef](#)]
37. Cos, S.; Sánchez-Barceló, E.J. Melatonin and mammary pathological growth. *Front. Neuroendocrinol.* **2000**, *21*, 133–170. [[CrossRef](#)]
38. Hill, S.M.; Belancio, V.P.; Dauchy, R.T.; Xiang, S.; Brimer, S.; Mao, L.; Hauch, A.; Lundberg, W.; Summers, W.; Yuan, L.; et al. Melatonin: An inhibitor of breast cancer. *Endocr. Relat. Cancer* **2015**, *22*, R183–R204. [[CrossRef](#)]
39. Del Río, B.; García Pedrero, J.M.; Martínez-Campa, C.; Zuazua, P.; Lazo, P.S.; Ramos, S. Melatonin, an endogenous-specific inhibitor of estrogen receptor alpha via calmodulin. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 38294–38302. [[CrossRef](#)]
40. Reiter, R.J. The pineal and its hormones in the control of reproduction in mammals. *Endocr. Rev.* **1980**, *1*, 109–131. [[CrossRef](#)]
41. Molis, T.M.; Spriggs, L.L.; Hill, S.M. Modulation of estrogen receptor mRNA expression by melatonin in MCF-7 human breast cancer cells. *Mol. Endocrinol.* **1994**, *8*, 1681–1690.
42. Cos, S.; Blask, D.E.; Lemus-Wilson, A.; Hill, S.M. Effects of melatonin on the cell cycle kinetics and estrogen rescue of MCF-7 human breast cancer cells in culture. *J. Pineal Res.* **1991**, *10*, 36–42. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Fraschini, F.; Demartini, G.; Esposti, D.; Scaglione, F. Melatonin involvement in immunity and cancer. *Biol. Signals Recept.* **1998**, *7*, 61–72. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Leon-Blanco, M.M.; Guerrero, J.M.; Reiter, R.J.; Calvo, J.R.; Pozo, D. Melatonin inhibits telomerase activity in the MCF-7 tumor cell line both in vivo and in vitro. *J. Pineal Res.* **2003**, *35*, 204–211. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Martínez-Campa, C.M.; Alonso-González, C.; Mediavilla, M.D.; Cos, S.; González, A.; Sánchez-Barceló, E.J. Melatonin down-regulates hTERT expression induced by either natural estrogens (17beta-estradiol) or metalloestrogens (cadmium) in MCF-7 human breast cancer cells. *Cancer Lett.* **2008**, *268*, 272–277. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Álvarez-García, V.; González, A.; Martínez-Campa, C.; Alonso-González, C.; Cos, S. Melatonin modulates aromatase activity and expression in endothelial cells. *Oncol. Rep.* **2013**, *29*, 2058–2064. [[CrossRef](#)]
47. Álvarez-García, V.; González, A.; Alonso-González, C.; Martínez-Campa, C.; Cos, S. Regulation of vascular endothelial growth factor by melatonin in human breast cancer cells. *J. Pineal Res.* **2013**, *54*, 373–380. [[CrossRef](#)]
48. Álvarez-García, V.; González, A.; Alonso-González, C.; Martínez-Campa, C.; Cos, S. Antiangiogenic effects of melatonin in endothelial cell cultures. *Microvasc. Res.* **2013**, *87*, 25–33. [[CrossRef](#)]
49. Allegra, M.; Reiter, R.J.; Tan, D.X.; Gentile, C.; Tesoriere, L.; Livrea, M.A. The chemistry of melatonin's interaction with reactive species. *J. Pineal Res.* **2003**, *34*, 1–10. [[CrossRef](#)]
50. Blask, D.E.; Dauchy, R.T.; Sauer, L.A.; Krause, J.A.; Brainard, G.C. Growth and fatty acid metabolism of human breast cancer (MCF-7) xenografts in nude rats: Impact of constant light-induced nocturnal melatonin suppression. *Breast Cancer Res. Treat.* **2003**, *79*, 313–320. [[CrossRef](#)]
51. Blask, D.E.; Dauchy, R.T.; Sauer, L.A. Putting cancer to sleep at night. *Endocrine* **2005**, *27*, 179–188. [[CrossRef](#)]
52. Fernandez-Gil, B.I.; Guerra-Librero, A.; Shen, Y.Q.; Florido, J.; Martínez-Ruiz, L.; García-López, S.; Adan, C.; Rodríguez-Santana, C.; Acuña-Castroviejo, D.; Quiñones-Hinojosa, A.; et al. Melatonin enhances cisplatin and radiation cytotoxicity in head and neck squamous cell carcinoma by stimulating mitochondrial ROS generation, apoptosis, and autophagy oxidative medicine and cellular longevity. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2019**, *2019*, 7187128. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Akbarzadeh, M.; Nouri, M.; Banekohal, M.V.; Cheraghi, O.; Tajalli, H.; Movassaghpour, A.; Soltani, S.; Cheraghi, H.; Feizy, N.; Montazersaheb, S.; et al. Effects of combination of melatonin and laser irradiation on ovarian cancer cells and endothelial lineage viability. *Lasers Med. Sci.* **2016**, *31*, 1565–1572. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Zhu, H.; Chen, Y.; Bai, L.C.; Cao, X.R.; Xu, R. Different effects of melatonin on X-rays-irradiated cancer cells in a dose-dependent manner. *Dose Response* **2019**, *17*, 1–6. [[CrossRef](#)]

55. Zou, Z.W.; Liu, T.; Li, Y.; Chen, P.; Peng, X.; Ma, C.; Zhang, W.J.; Li, P.D. Melatonin suppresses thyroid cancer growth and overcomes radioresistance via inhibition of p65 phosphorylation and induction of ROS. *Redox Biol.* **2018**, *16*, 226–236. [\[CrossRef\]](#)
56. Alonso-González, C.; González, A.; Martínez-Campa, C.; Menéndez-Menéndez, J.; Gómez-Arozamena, J.; García-Vidal, A.; Cos, S. Melatonin enhancement of the radiosensitivity of human breast cancer cells is associated with the modulation of proteins involved in estrogen biosynthesis. *Cancer Lett.* **2016**, *370*, 145–152. [\[CrossRef\]](#)
57. Kastan, M.B.; Onyekwere, O.; Sidransky, D.; Vogelstein, B.; Craig, R.W. Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res.* **1991**, *51*, 6304–6311. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
58. Wang, X.; Docanto, M.M.; Sasano, H.; Lo, C.; Simpson, E.R.; Brown, K.A.; Kathleen Cuninghame Foundation Consortium for Research into Familial Breast Cancer. Prostaglandin E2 inhibits p53 in human breast adipose stromal cells: A novel mechanism for the regulation of aromatase in obesity and breast cancer. *Cancer Res.* **2015**, *75*, 645–655. [\[CrossRef\]](#)
59. González-González, A.; González, A.; Rueda, N.; Alonso-González, C.; Menéndez-Menéndez, J.; Gómez-Arozamena, J.; Martínez-Campa, C.; Cos, S. Melatonin enhances the usefulness of ionizing radiation: Involving the regulation of different steps of the angiogenic process. *Front. Physiol.* **2019**, *10*, 879. [\[CrossRef\]](#)
60. González-González, A.; García-Nieto, E.; González, A.; Sánchez-Fernández, C.; Alonso-González, C.; Menéndez-Menéndez, J.; Gómez-Arozamena, J.; Cos, S.; Martínez-Campa, C. Melatonin modulation of radiation and chemotherapeutics-induced changes on differentiation of breast fibroblasts. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 3935. [\[CrossRef\]](#)
61. Alonso-González, C.; González, A.; Martínez-Campa, C.; Gómez-Arozamena, J.; Cos, S. Melatonin sensitizes human breast cancer cells to ionizing radiation by downregulating proteins involved in double-strand DNA break repair. *J. Pineal Res.* **2015**, *58*, 189–197. [\[CrossRef\]](#)
62. Valerie, K.; Povirk, L.F. Regulation and mechanisms of mammalian double-strand break repair. *Oncogene* **2003**, *22*, 5792–5812. [\[CrossRef\]](#)
63. Gatz, S.A.; Wiesmüller, L. p53 in recombination and repair. *Cell Death Differ.* **2006**, *13*, 1003–1016. [\[CrossRef\]](#)
64. Kontek, R.; Nowicka, H. The modulatory effect of melatonin on genotoxicity of irinotecan in healthy human lymphocytes and cancer cells. *Drug Chem. Toxicol.* **2013**, *36*, 335–342. [\[CrossRef\]](#)
65. Wang, Q.; Sun, Z.; Du, L.; Xu, C.; Wang, Y.; Yang, B.; He, N.; Wang, J.; Ji, K.; Liu, Y.; et al. Melatonin sensitizes human colorectal cancer cells to γ -ray ionizing radiation in vitro and in vivo. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 3974. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
66. Rezaeejam, H.; Shirazi, A.; Izadi, P.; Bazzaz, J.T.; Ghazi-Khansari, M.; Valizadeh, M.; Tabesh, G.A. Radioprotective effect of melatonin on expression of Cdkn1a and Rad50 genes in rat peripheral blood. *J. Cancer Res. Ther.* **2018**, *14* (Suppl. S1), S1070–S1075. [\[PubMed\]](#)
67. Nagafi, M.; Shirazi, A.; Motevaseli, E.; Geraily, G.; Norouzi, F.; Heidari, M. The melatonin immunomodulatory actions in radiotherapy. *Biophys. Rev.* **2017**, *9*, 139–148. [\[CrossRef\]](#)
68. Jang, S.S.; Kim, H.G.; Lee, J.S.; Han, J.M.; Park, H.J.; Huh, G.J.; Son, C.G. Melatonin reduces X-ray radiation-induced lung injury in mice by modulating oxidative stress and cytokine expression. *Int. J. Radiat. Biol.* **2013**, *89*, 97–105. [\[CrossRef\]](#)
69. Aliasgharzadeh, A.; Farhood, B.; Amini, P.; Saffar, H.; Motevaseli, E.; Rezapoor, S.; Nouruzi, F.; Shabeeb, D.; Musa, A.E.; Mohseni, M.; et al. Melatonin Attenuates Up-regulation of Duox1 and Duox2 and protects against lung injury following chest irradiation in rats. *Cell J.* **2019**, *21*, 236–242.
70. Mortezaee, K.; Najafi, M.; Farhood, B.; Ahmadi, A.; Potese, Y.; Shabeeb, D.; Musa, A.E. Modulation of apoptosis by melatonin for improving cancer treatment efficiency: An updated review. *Life Sci.* **2019**, *228*, 228–241. [\[CrossRef\]](#)
71. Nooshinfar, E.; Bashash, D.; Safaroghli-Azar, A.; Bayati, S.; Rezaei-Tavirani, M.; Ghaffari, S.H.; Akbari, M.E. Melatonin promotes ATO-induced apoptosis in MCF-7 cells: Proposing novel therapeutic potential for breast cancer. *Biomed. Pharmacother.* **2016**, *83*, 456–465. [\[CrossRef\]](#)
72. Fan, L.; Sun, G.; Ma, T.; Zhong, F.; Wei, W. Melatonin overcomes apoptosis resistance in human hepatocellular carcinoma by targeting survivin and XIAP. *J. Pineal Res.* **2013**, *55*, 174–183. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
73. Kern, M.A.; Haugg, A.M.; Koch, A.F.; Schilling, T.; Breuhahn, K.; Walczak, H.; Fleischer, B.; Trautwein, C.; Michalski, C.; Schulze-Bergkamen, H.; et al. Cyclooxygenase-2 inhibition induces apoptosis signaling via death receptors and mitochondria in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.* **2006**, *66*, 7059–7066. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

74. Mao, L.; Dauchy, R.T.; Blask, D.E.; Dauchy, E.M.; Slakey, L.M.; Brimer, S.; Yuan, L.; Xiang, S.; Hauch, A.; Smith, K.; et al. Melatonin suppression of aerobic glycolysis (Warburg effect), survival signalling and metastasis in human leiomyosarcoma. *J. Pineal Res.* **2016**, *60*, 167–177. [[CrossRef](#)]
75. Sánchez-Sánchez, A.M.; Antolin, I.; Puente-Moncada, N.; Suarez, S.; Gomez-Lobo, M.; Rodriguez, C.; Martin, V. Melatonin cytotoxicity is associated to Warburg effect inhibition in Ewing sarcoma cells. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0135420. [[CrossRef](#)]
76. Blask, D.E.; Dauchy, R.T.; Dauchy, E.M.; Mao, L.; Hill, S.M.; Greene, M.W.; Belancio, V.P.; Sauer, L.A.; Davidson, L. Light exposure at night disrupts host/cancer circadian regulatory dynamics: Impact on the Warburg effect, lipid signaling and tumor growth prevention. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e102776. [[CrossRef](#)]
77. Dauchy, R.T.; Hoffman, A.E.; Wren-Dail, M.A.; Hanifin, J.P.; Warfield, B.; Brainard, G.C.; Xiang, S.; Yuan, L.; Hill, S.M.; Belancio, V.P.; et al. Daytime blue light enhances the nighttime circadian melatonin inhibition of human prostate cancer growth. *Comp. Med.* **2015**, *65*, 473–485.
78. Tan, D.X.; Chen, L.D.; Poeggeler, B.; Manchester, L.C.; Reiter, R.J. Melatonin: A potent, endogenous hydroxyl radical scavenger. *Endocr. J.* **1993**, *1*, 57–60.
79. Rodríguez, C.; Mayo, J.C.; Sáinz, R.M.; Antolín, I.; Herrera, F.; Martín, V.; Reiter, R.J. Regulation of antioxidant enzymes: A significant role for melatonin. *J. Pineal Res.* **2004**, *36*, 1–9. [[CrossRef](#)]
80. Galano, A.; Tan, D.X.; Reiter, R.J. Melatonin: A versatile protector against oxidative DNA damage. *Molecules* **2018**, *23*, 530. [[CrossRef](#)]
81. Carlberg, C. Gene regulation by melatonin. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2000**, *917*, 387–396. [[CrossRef](#)]
82. Cohen, M.; Lippman, M.; Chabner, B. Role of pineal gland in aetiology and treatment of breast cancer. *Lancet* **1978**, *2*, 814–816. [[CrossRef](#)]
83. Cos, S.; González, A.; Martínez-Campa, C.; Mediavilla, M.D.; Alonso-González, C.; Sánchez-Barceló, E.J. Estrogen-signaling pathway: A link between breast cancer and melatonin oncostatic actions. *Cancer Detect. Prev.* **2006**, *30*, 118–128. [[CrossRef](#)]
84. González, A.; Álvarez-García, V.; Martínez-Campa, C.; Mediavilla, M.D.; Alonso-González, C.; Sánchez-Barceló, E.J.; Cos, S. In Vivo inhibition of the estrogen sulfatase enzyme and growth of DMBA-induced mammary tumors by melatonin. *Curr. Cancer Drug Targets* **2010**, *10*, 279–286. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
85. Cos, S.; Álvarez-García, V.; González, A.; Alonso-González, C.; Martínez-Campa, C. Melatonin modulation of crosstalk among malignant epithelial, endothelial and adipose cells in breast cancer. *Oncol. Lett.* **2014**, *8*, 487–492. [[CrossRef](#)]
86. González, A.; Cos, S.; Martínez-Campa, C.; Alonso-González, C.; Sánchez-Mateos, S.; Mediavilla, M.D.; Sánchez-Barceló, E.J. Selective estrogen enzyme modulator (SEEM) actions of melatonin in human breast cancer cells. *J. Pineal Res.* **2008**, *45*, 86–92. [[CrossRef](#)]
87. Gavande, N.S.; VanderVere-Carozza, P.S.; Hinshaw, H.D.; Jalal, S.I.; Sears, C.R.; Pawelczak, K.S.; Turchi, J.J. DNA repair targeted therapy: The past or future of cancer treatment? *Pharmacol. Ther.* **2016**, *160*, 65–83. [[CrossRef](#)]
88. Chaney, S.G.; Sancar, A. DNA repair: Enzymatic mechanisms and relevance to drug response. *J. Natl. Cancer Inst.* **1996**, *88*, 1346–1360. [[CrossRef](#)]
89. Goodarzi, A.A.; Jeggo, P.A. The repair and signaling responses to DNA double-strand breaks. *Adv. Genet.* **2013**, *82*, 1–45.
90. Raderschall, E.; Stout, K.; Freier, S.; Suckow, V.; Schweiger, S.; Haaf, T. Elevated levels of Rad51 recombination protein in tumor cells. *Cancer Res.* **2002**, *62*, 219–225.
91. Pozo, D.A.; Delgado, M.; Fernández-Santo, J.M.; Calvo, J.R.; Gomariz, R.P.; Martin-Lacave, I.; Ortiz, G.G.; Guerrero, J.M. Expression of the Mel1a-melatonin receptor mRNA in T and B subsets of lymphocytes from rat thymus and spleen. *FASEB J.* **1997**, *11*, 466–473. [[CrossRef](#)]
92. Raben, D.; Helfrich, B. Angiogenesis inhibitors: A rational strategy for radiosensitization in the treatment of non-small-cell lung cancer? *Clin. Lung Cancer* **2004**, *6*, 48–57. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
93. González, A.; Martínez-Campa, C.; Mediavilla, M.D.; Alonso-González, C.; Sánchez-Barceló, E.J.; Cos, S. Inhibitory effects of pharmacological doses of melatonin on aromatase activity and expression in rat glioma cells. *Br. J. Cancer* **2007**, *97*, 755–760. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
94. García-Pergañeda, A.; Guerrero, J.M.; Rafii-El-Idrissi, M.; Romero, M.P.; Pozo, D.; Calvo, J.R. Characterization of membrane melatonin receptor in mouse peritoneal macrophages: Inhibition of adenylyl cyclase by a pertussis toxin-sensitive G protein. *J. Neuroimmunol.* **1999**, *95*, 85–94. [[CrossRef](#)]

95. Zhou, D.; Yu, T.; Chen, G.; Brown, S.A.; Yu, Z.; Mattson, M.P.; Thompson, J.S. Effects of NF-kappaB1 (p50) targeted gene disruption on ionizing radiation-induced NF-kappaB activation and TNFalpha, IL-1alpha, IL-1beta and IL-6 mRNA expression in vivo. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2001**, *298*, 103–109. [[PubMed](#)]
96. Korkmaz, A.; Reiter, R.J.; Topal, T.; Manchester, L.C.; Oter, S.; Tan, D.X. Melatonin: An established antioxidant worthy of use in clinical trials. *Mol. Med.* **2009**, *15*, 43–50. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
97. Speidel, D. The role of DNA damage responses in p53 biology. *Arch. Toxicol.* **2015**, *89*, 501–517. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
98. Beckta, J.M.; Ahmad, S.F.; Yang, H.; Valerie, K.; Beckta, J.M. Revisiting p53 for cancer-specific chemo- and radiotherapy: Ten years after. *Cell Cycle* **2014**, *13*, 710–713. [[CrossRef](#)]
99. Loureiro, R.; Magalhães-Novais, S.; Mesquita, K.A.; Baldeiras, I.; Sousa, I.S.; Tavares, L.C.; Barbosa, I.A.; Oliveira, P.J.; Vega-Naredo, I. Melatonin antiproliferative effects require active mitochondrial function in embryonal carcinoma cells. *Oncotarget* **2015**, *6*, 17081–17096. [[CrossRef](#)]
100. Cheng, J.Q.; Ruggeri, B.; Klein, W.M.; Sonoda, G.; Altomare, D.A.; Watson, D.K.; Testa, J.R. Amplification of AKT2 in human pancreatic cells and inhibition of AKT2 expression and tumorigenicity by antisense RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 3636–3641. [[CrossRef](#)]
101. Bellacosa, A.; de Feo, D.; Godwin, A.K.; Bell, D.W.; Cheng, J.Q.; Altomare, D.A.; Wan, M.; Dubeau, L.; Scambia, G.; Masciullo, V.; et al. Molecular alterations of the AKT2 oncogene in ovarian and breast carcinomas. *Int. J. Cancer* **1995**, *64*, 280–285. [[CrossRef](#)]
102. Roy, H.K.; Olusola, B.F.; Clemens, D.L.; Karolski, W.J.; Ratashak, A.; Lynch, H.T.; Smyrk, T.C. AKT proto-oncogene overexpression is an early event during sporadic colon carcinogenesis. *Carcinogenesis* **2002**, *23*, 201–205. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
103. Xu, X.; Sakon, M.; Nagano, H.; Hiraoka, N.; Yamamoto, H.; Hayashi, N.; Dono, K.; Nakamori, S.; Umeshita, K.; Ito, Y.; et al. Akt2 expression correlates with prognosis of human hepatocellular carcinoma. *Oncol. Rep.* **2004**, *11*, 25–32. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
104. Zheng, J.I.E. Energy metabolism of cancer: Glycolysis versus oxidative phosphorylation (Review). *Oncol. Lett.* **2012**, *4*, 1151–1157. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
105. Yu, L.; Chen, X.; Sun, X.; Wang, L.; Chen, S. The glycolytic switch in tumors: How many players are involved? *J. Cancer* **2017**, *8*, 3430–3440. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
106. Shimura, T.; Noma, N.; Sano, Y.; Ochiai, Y.; Oikawa, T.; Fukumoto, M.; Kunugita, N. AKT-mediated enhanced aerobic glycolysis causes acquired radioresistance by human tumor cells. *Radiother. Oncol.* **2014**, *112*, 302–307. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
107. Robinson, G.L.; Dinsdale, D.; MacFarlane, M.; Cain, K. Switching from aerobic glycolysis to oxidative phosphorylation modulates the sensitivity of mantle cell lymphoma cells to TRAIL. *Oncogene* **2012**, *31*, 4996. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
108. Lissoni, P.; Meregalli, S.; Nosetto, L.; Barni, S.; Tancini, G.; Fossati, V.; Maestroni, G. Increased survival time in brain glioblastomas by a radioneuroendocrine strategy with radiotherapy plus melatonin compared to radiotherapy alone. *Oncology* **1996**, *53*, 43–46. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
109. Berk, L.; Berkey, B.; Rich, T.; Hrushesky, W.; Blask, D.; Gallagher, M.; Kudrimoti, M.; McGarry, R.C.; Suh, J.; Mehta, M. Randomized phase II trial of high dose melatonin and radiation therapy for RPA class 2 patients with brain metastases (RTOG 0119). *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **2007**, *68*, 852–857. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
110. Ben-David, M.A.; Elkayam, R.; Gelernter, I.; Pfeffer, R.M. Melatonin for prevention of breast radiation dermatitis: A phase II, prospective, double-blind randomized trial. *Isr. Med. Assoc. J.* **2016**, *18*, 188–192.
111. Lissoni, P.; Rovelli, F.; Brivio, F.; Fumagalli, L.; Brera, G. A study of immunoendocrine strategies with pineal indoles and interleukin-2 to prevent radiotherapy-induced lymphocytopenia in cancer patients. *In Vivo* **2008**, *22*, 397–400.
112. Seely, D.; Wu, P.; Fritz, H.; Kennedy, D.A.; Tsui, T.; Seely, A.J.E.; Mills, E. Melatonin as adjuvant cancer care with and without chemotherapy: A systematic review and meta-analysis of randomized trials. *Integr. Cancer Ther.* **2012**, *11*, 293–303. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



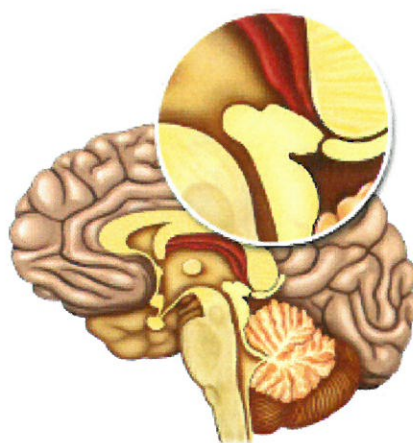


Nova Biomedical



Pineal Gland

*Research Advances and
Clinical Challenges*



Angel Catalá
Editor

ENDOCRINOLOGY RESEARCH AND CLINICAL DEVELOPMENTS

NOVA

ENDOCRINOLOGY RESEARCH AND CLINICAL DEVELOPMENTS

**PINEAL GLAND
RESEARCH ADVANCES
AND CLINICAL CHALLENGES**

**ANGEL CATALÁ
EDITOR**



Copyright © 2017 by Nova Science Publishers, Inc.

All rights reserved. No part of this book may be reproduced, stored in a retrieval system or transmitted in any form or by any means: electronic, electrostatic, magnetic, tape, mechanical photocopying, recording or otherwise without the written permission of the Publisher.

We have partnered with Copyright Clearance Center to make it easy for you to obtain permissions to reuse content from this publication. Simply navigate to this publication's page on Nova's website and locate the "Get Permission" button below the title description. This button is linked directly to the title's permission page on copyright.com. Alternatively, you can visit copyright.com and search by title, ISBN, or ISSN.

For further questions about using the service on copyright.com, please contact:

Copyright Clearance Center

Phone: +1-(978) 750-8400 Fax: +1-(978) 750-4470 E-mail: info@copyright.com

NOTICE TO THE READER

The Publisher has taken reasonable care in the preparation of this book, but makes no expressed or implied warranty of any kind and assumes no responsibility for any errors or omissions. No liability is assumed for incidental or consequential damages in connection with or arising out of information contained in this book. The Publisher shall not be liable for any special, consequential, or exemplary damages resulting, in whole or in part, from the readers' use of, or reliance upon, this material. Any parts of this book based on government reports are so indicated and copyright is claimed for those parts to the extent applicable to compilations of such works.

Independent verification should be sought for any data, advice or recommendations contained in this book. In addition, no responsibility is assumed by the publisher for any injury and/or damage to persons or property arising from any methods, products, instructions, ideas or otherwise contained in this publication.

This publication is designed to provide accurate and authoritative information with regard to the subject matter covered herein. It is sold with the clear understanding that the Publisher is not engaged in rendering legal or any other professional services. If legal or any other expert assistance is required, the services of a competent person should be sought. FROM A DECLARATION OF PARTICIPANTS JOINTLY ADOPTED BY A COMMITTEE OF THE AMERICAN BAR ASSOCIATION AND A COMMITTEE OF PUBLISHERS.

Additional color graphics may be available in the e-book version of this book.

Library of Congress Cataloging-in-Publication Data

Library of Congress Control Number: 2017943032

ISBN: 978-1-53612-147-6 (eBook)

Published by Nova Science Publishers, Inc. † New York

<https://novapublishers.com/shop/pineal-gland-research-advances-and-clinical-challenges/>