

GRADO EN MEDICINA

TRABAJO FIN DE GRADO



Universidad
Zaragoza

“MECANISMOS ANTITUMORALES DE LA MELATONINA EN EL CANCER DE MAMA”

“ANTITUMOR MECHANISMS OF MELATONIN IN BREAST CANCER”

Autor: José Miguel Lizana García

Director: Marcos César Reyes Gonzáles

“La principal prueba de la verdadera grandeza de una persona, reside en la percepción de su pequeñez”.

Arthur Conan Doyle.

AGRADECIMIENTOS:

En primer lugar, quería agradecerle a mi tutor, Marcos Reyes, el haberme puesto en contacto con este tema de investigación, y destacar su labor en la investigación, así como a todo el equipo de Fisiología de la Universidad de Zaragoza, que realiza un trabajo constante día a día para describir novedosas propiedades de una molécula con la cual estamos muy familiarizados y de la que se ha demostrado un papel mucho más importante y polivalente, con numerosas aplicaciones en enfermedades más que prevalentes y que causan un gran daño en nuestra sociedad actual.

Por otro lado, me gustaría dar las gracias a mis compañeros, los cuales me han acompañado a lo largo de estos seis años, en los momentos duros y en los no tan duros, y me gustaría desearles la mejor de las suertes en esta nueva vida que se nos presentará tras acabar la carrera.

A mi novia, Raquel, la cual ha estado en todo momento a mi lado en los momentos más difíciles, levantándose el ánimo en los momentos más duros, y sin la cual nada de esto hubiese sido posible.

Por último, y lo más importante de todo, a mi familia, la cual ha sido mi principal apoyo desde que comencé la carrera en Huesca, los cuales, a pesar de dejar todo por un sueño, y mudarme desde Granada, mi ciudad natal, han sido capaces de mantener mi ilusión en los momentos más duros, pese a la distancia, y es gracias a ellos principalmente por lo que, a día de hoy puedo ayudar a otras personas, que es la principal razón por la que he elegido esta profesión.

RESUMEN	6
OBJETIVOS Y METODOLOGÍA	7
INTRODUCCIÓN	8
• <i>Glándula Pineal: Estructura Funcional</i>	8
• <i>Melatonina: Síntesis, regulación, transporte y metabolismo</i>	9
• <i>Mecanismos de acción</i>	10
• <i>Cáncer de mama</i>	11
FUNCIONES DE LA MELATONINA	13
MECANISMOS ANTITUMORALES DE LA MELATONINA	13
• <i>Agente inhibidor de radicales libres</i>	13
• <i>Radioprotector</i>	14
• <i>Regulación de expresión del receptor de estrógenos y activación</i>	15
• <i>Inhibidor de actividad telomerasa</i>	17
• <i>Efectos Anti-apoptóticos</i>	18
• <i>Efectos Pro-apoptóticos</i>	18
• <i>Detoxificador del tratamiento quimioterápico</i>	20
• <i>Progresión de metástasis</i>	21
• <i>Mejora del sistema inmune</i>	24
• <i>Inhibidor de la angiogénesis</i>	25
MELATONINA Y CÁNCER DE MAMA: ENSAYOS CLÍNICOS Y PERSPECTIVAS FUTURAS	26
• <i>Biomarcador y modulador de la terapia endocrina</i>	26
• <i>Modulación de la terapia con tamoxifeno</i>	29
CONCLUSIONES	30
BIBLIOGRAFÍA	31

ANEXO ABREVIATURAS:

- 1. AA-NAT:** Arilalquilamina -*N*-acetiltransferasa
- 2. AIF:** Factor Inducido por Proteínas
- 3. AJ:** Unión adherente
- 4. AMPc:** Adenosín Monofosfato cíclico
- 5. APAF-1:** Factor activador de la apoptosis de proteasas 1.
- 6. BCL:** Linfoma de Células B-2. Proteína que actúa en la apoptosis.
- 7. bFGF:** Factor de crecimiento de Fibroblastos
- 8. BUN:** Nitrógeno ureico en sangre.
- 9. CAE:** Conducto Auditivo Externo
- 10. C/EBP β :** Proteína codificada en humanos por el gen cebpB.
- 11. CDIS:** Carcinoma Ductal In Situ
- 12. COX-2:** Cicloxigenasa 2.
- 13. ECM:** Matriz Extracelular
- 14. EMT:** Transición de Epitelio Mesénquima
- 15. ERE:** Elemento de respuesta a estrógenos.
- 16. E₂:** 17 β Estradiol
- 17. FDA:** Food and Drug Administration
- 18. GJs:** Unión Gap
- 19. HIF 1:** Subunidad 1 del factor alfa inducible por hipoxia
- 20. HIOMT:** hidroxindol-*O*-metiltrans-ferasa
- 21. HRT:** Terapia de Reemplazo Hormonal.
- 22. HUVECs:** Human umbilical vein endothelial cells
- 23.. IARC:** Agencia Internacional de Investigación del Cáncer
- 24. IGF 1:** Factor de crecimiento insulínico 1
- 25. IL:** Interleucina
- 26. KiSS:** Kisspeptina
- 27. LA:** Ácido Linoleico
- 28. LAN:** Light and Night/Exposición Luz y Oscuridad.
- 29. MCF-7:** Línea celular del adenocarcinoma de mama
- 30. MEC:** Matriz Extracelular
- 31. MLT:** Melatonina
- 32. MME:** Membrana mitocondrial externa.
- 33. MMI:** Membrana mitocondrial interna.
- 34. MMPs:** Matriz de Metaloproteasas
- 35. MT:** Receptor de membrana de la melatonina.
- 36. NF- κ B:** Factor nuclear potenciador de cadenas ligeras kappa de células B activadas.
- 37. NK:** Natural Killer.
- 38. NSQ:** Núcleo supraquiasmático
- 39. OH:** Radical libre hidroxilo.
- 40. ODF:** Factor de diferenciación de osteoclastos.
- 41. PARP:** Inhibidores de la enzima poli ADP ribosa polimerasa.
- 42. PI3K:** Vía de señalización de la fosfatidilinositol 3-kinasa.
- 43. PKA:** Proteín Kinasa A.
- 44. PPT:** Poro de permeabilidad transitoria.
- 45. RAR α :** Receptor del ácido alfa retinoico.
- 46. RHT:** Tracto retino hipotalámico
- 47. ROR:** Retinoic acid orphan receptor (alfa, beta, gamma).
- 48. SEEM:** Modulador selectivo de la enzima de estrógenos.
- 49. SERM:** Modulador selectivo del receptor de estrógenos.
- 50. TJs:** Unión estrecha
- 51. TMX:** Tamoxifeno
- 52. TRP:** Triptófano
- 53. VEGF:** Factor de crecimiento endotelial vascular.
- 54. 2A:** Probable agente carcinogénico humano.
- 55. 5 HTP:** 5 Hidroxitriptófano
- 56. 13-HODE:** 13-hidroxi-octadecadienoico

RESUMEN.

La melatonina es una hormona secretada principalmente por la glándula pineal, a la que clásicamente se ha atribuido la regulación de los ritmos circadianos de luz/oscuridad. Sin embargo, en las últimas décadas, dado principalmente por su escasa toxicidad, numerosos equipos de investigación han realizado ensayos que le han atribuido a esta indolamina numerosas propiedades terapéuticas, en múltiples enfermedades, entre ellas las enfermedades de causa tumoral.

Entre estas últimas, una de las más estudiadas, dada su elevada prevalencia y morbimortalidad, ha sido el cáncer de mama. En esta enfermedad, la melatonina ha tenido numerosas implicaciones en estudios de investigación, en la cual se ha descubierto un efecto positivo de la misma en la calidad de vida, control de toxicidad del tratamiento o incluso disminución de la capacidad invasiva de dicho tumor.

Este trabajo describe los diferentes mecanismos por los cuales la Melatonina ejerce su papel antitumoral, entre las que destacan: (1) Inhibidor de radicales libres, (2) Radioprotector, (3) Regulador de la expresión y activación de estrógenos, (4) Inhibidor de la actividad Telomerasa, (5) Inmunomodulador, entre otros. Posteriormente, acotaremos estas acciones al Cáncer de mama, centrándolo en ensayos clínicos y el uso práctico en el tratamiento de esta patología.

SUMMARY

Melatonin is a hormone secreted principally by the pineal gland, to which the regulation of circadian light / dark rhythms has been classically attributed. However, in recent decades, mainly due to its low toxicity, numerous research teams have conducted trials that have attributed to this indolamine numerous therapeutic properties in multiple diseases, including diseases of tumor origin.

Among the latter, one of the most studied, given its high prevalence and morbidity and mortality, has been breast cancer. In this disease, melatonin has had numerous implications in research studies, in which a positive effect of it has been discovered in the quality of life, control of treatment toxicity or even decrease in the invasive capacity of said tumor.

This work describes the different mechanisms by which Melatonin exerts its antitumor role, among which are: (1) Free radical inhibitor, (2) Radioprotector, (3) Estrogen expression and activation regulator, (4) Inhibitor of Telomerase activity, (5) Immunomodulator, among others. Subsequently, we will limit these actions to breast cancer, focusing on clinical trials and practical use in the treatment of this disease.

OBJETIVOS:

Nuestro principal objetivo es actualizar la información científica reportada respecto al papel oncostático de la melatonina en el desarrollo y tratamiento de tumores hormonodependientes, en concreto del cáncer de mama. Analizaremos también otras propiedades antitumorales de la melatonina, así como su capacidad para regular el desarrollo y la progresión de metástasis.

Por último, abordaremos ensayos clínicos con melatonina en pacientes con cáncer de mama, considerando sus posibles beneficios e inconvenientes, así como la perspectiva de estudio en ensayos futuros.

MÉTODOS:

En este trabajo se han utilizado diversas herramientas como fuentes de información y búsqueda bibliográfica, así, bases de datos como Pubmed, artículos de revistas científicas de alto impacto, como Journal of the National Cancer Institute, Current Medicinal Chemistry, International Journal of Molecular Sciences, Journal of Pharmacy and Pharmacology, Journal of Pineal Research; además, otras como trabajos de fin de grado y doctorado, libros físicos y de soporte digital.

Palabras clave: melatonina, cáncer de mama, apoptosis, vías de señalización de estrógenos, radicales libres, quimioterapia, metástasis y ensayo clínico.

Key words: melatonin, breast cancer, apoptosis, estrogen signaling pathways, free radicals, chemotherapy, metastasis and clinical trial.

INTRODUCCIÓN.

Glándula Pineal: Estructura Funcional.

La melatonina es una hormona sintetizada por la glándula pineal o epífisis. Ésta es una glándula única, esférica, situada en el techo del III ventrículo cerebral. Por sus características anatómicas llamó desde muy temprano la atención de los médicos. Su primera descripción se atribuye a Herófilo de Alejandría (s. III a.C.), quien la vinculó a funciones valvulares reguladoras del “flujo del pensamiento” en el sistema ventricular. Galeno (s. II d.C), describió su anatomía y la llamó “konarium” (cono de piña), denominación que ha perdurado hasta la actualidad con pinea, piña en latín. Además observó que la estructura pineal poseía un parecido estructural mayor con las glándulas que con el sistema nervioso.

En el Renacimiento, Andrés Versalio aportó una descripción anatómica y René Descartes la denomina como el tercer ojo, no por su papel en la regulación del fotoperiodo, aún desconocido para entonces, sino porque afirmaba que ahí era donde residía el alma. Descartes le asignó, además, una función fisiológica: “la glándula pineal se encarga de la percepción del entorno”.

Varios siglos más tarde, en 1905, Studnicka afirma que la pineal deriva filogenéticamente de un órgano fotorreceptor con función desconocida. Posteriormente, en 1943, Bargman postuló la relación de la glándula pineal con la luz, a través del SNC.

La era actual del conocimiento pineal con la publicación de *The Pineal Gland*, de Julian Kitay y Mark Altschule, que atribúan a la glándula tres propiedades: (1) su intervención en el control de la función gonadal, (2) su participación en la respuesta cromática dérmica a los cambios de luz ambiental en vertebrados inferiores y (3) alguna vinculación con la conducta. Fue en ese mismo año cuando **Aaron Lerner** comenzaba su trabajo encaminado al aislamiento del factor pineal responsable del aclaramiento de la piel de anfibios, que condujeron en 1958 a la identificación de la melatonina¹.

A partir de estudios fisiológicos y anatómicos, se constató que la síntesis de melatonina en mamíferos estaba controlada por la luz ambiental a través de una vía neural cuya estación intermedia eran las neuronas simpáticas del ganglio cervical superior, y el pinealocito como estación final.

Por último, en 1965, dos hechos contribuyeron a consolidar el concepto de la glándula pineal como órgano neuroendocrino activo en los mamíferos. Hoffman y Reiter demostraron que la oscuridad, o fotoperíodos cortos, inducía cambios gonadales en el hámster, que podían ser suprimidos por la pinealectomía. En ese mismo año, Axelrod y Wurtman acuñaron la expresión “transductor neuroendocrino” para describir la glándula como un órgano que convierte un estímulo neural proveniente de la retina y originado por la luz ambiental en una respuesta endocrina, la producción de melatonina¹.

La glándula pineal es conocida también como cuerpo pineal, se trata de un órgano endocrino impar y de ubicación medial (Fig 1)². Se encuentra orientada antero posteriormente reposando sobre el surco que separa los colículos superiores con la pared posterior del tercer ventrículo y encontrándose unido a las comisuras habenuar y posterior por una formación pedicular llamada tallo pineal, bañada por líquido cefalorraquídeo y cubierta por piamadre, la cual le forma una cápsula desde la que se proyectan tabiques por los cuales ingresan gran cantidad de vasos sanguíneos. Estos tabiques posteriormente la dividirán en lobulillos incompletos. En el ser humano presenta un peso que oscila entre 100 a 200 mg, mide de 5 a 8 mm de longitud y de 3 a 5 mm de ancho.

La glándula pineal en los mamíferos está inervada por fibras simpáticas originadas en el sistema nervioso central. Siendo la vía de inervación principal de la glándula el ganglio cervical superior de la cadena paravertebral. Este ganglio es, sin duda, la principal aferencia postganglionar que pasa a formar el nervio pineal, el cual se encuentra en el tentorio cerebelar.

En cuanto a su histología (Fig 2)² tiene aspecto característico de una glándula endocrina presentando un núcleo central compuesto por lóbulos (parénquima) y una superficie periférica (estroma). Alrededor del 70 al 80% de esta superficie tiene un revestimiento ependimario, el cual está constituido por una monocapa de células cúbicas de aspecto ciliado².

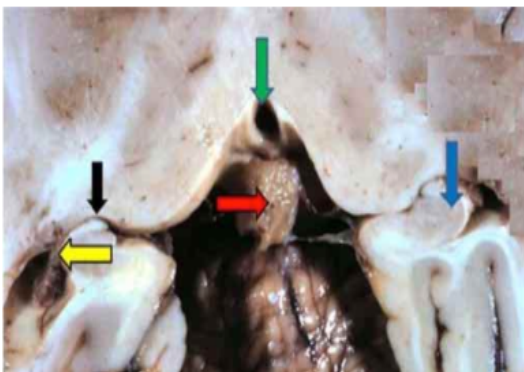


Fig. 1. Glándula pineal humana en relación a las estructuras circundantes. Corte horizontal del cerebro. Flecha roja - glándula pineal con cisterna basal rodeándola; Flecha verde - Tercer ventrículo; Flecha azul - hipocampo (Tan *et al.*, 2010).

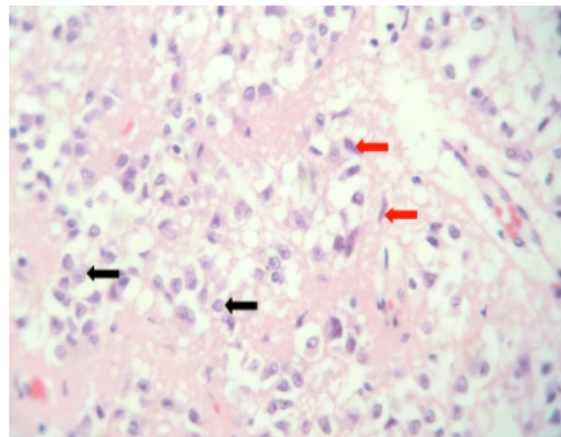


Fig. 2. Histología de la glándula pineal humana H/E 40X. Flechas negras - pinealocitos; Flechas rojas - astrocitos.

Melatonina: síntesis, regulación, transporte y metabolismo.

El primer componente de la vía de inervación de la glándula pineal, es el RHT, formado por células ganglionares pequeñas, el cual se origina desde células del ganglio retinal, ubicadas en el ojo, que se dirigen a través del nervio óptico y quiasma hasta alcanzar el hipotálamo.

La síntesis de melatonina en la glándula pineal está controlada por el NSQ, que está sincronizado con el ciclo luz/oscuridad a través del RHT. Durante la noche, el NSQ envía señales neurales a través de una vía multisináptica simpática, la vía

retino-hipotálamicopineal. Esta vía consta de los núcleos paraventriculares hipotalámicos, las células intermediolaterales y el ganglio cervical superior, que se proyecta sobre la glándula pineal e induce en ella la liberación nocturna de noradrenalina. Su unión de la noradrenalina a sus receptores específicos situados en las membranas de los pinealocitos promueve la activación de la síntesis de melatonina.

La formación de la melatonina comienza con la captación del aminoácido Trp, procedente del torrente circulatorio. El Trp es hidroxilado en la mitocondria por la Trp-hidroxilasa. La mayor parte del 5-HTP resultante se convierte en serotonina en el citosol, gracias a la intervención de una enzima descarboxilasa. Tras ello, la serotonina es acetilada por la AA-NAT y se produce N-acetilserotonina, metabolito que es *O*-metilado por otra enzima, la HIOMT, lo que da lugar a la melatonina¹. Ésta presenta un perfil rítmico de producción proporcional al estímulo noradrenérgico nocturno, con valores mínimos diurnos y máximos nocturnos³.

La melatonina se metaboliza muy deprisa, fundamentalmente en el hígado, eliminándose por la orina. Su principal metabolito en humanos y roedores es la 6-sulfatoximelatonina, que puede encontrarse en sangre y en orina.

Aunque clásicamente se ha pensado que su producción es exclusivamente pineal, también existen otras localizaciones como son el tracto digestivo, células enterocromafines, los linfocitos humanos, la retina o el cerebelo, en las que su producción no deja de ser significativa, cambiando de este modo la concepción puramente hormonal de dicha sustancia, ya que también se produce en órganos no endocrinos¹.

Mecanismos de acción.

La melatonina ejerce su función principal a partir de cuatro receptores. Se une a los receptores de membrana MT₁ y MT₂, pertenecientes a la superfamilia de receptores de 7 dominios transmembrana acoplados a proteínas G. Dada la facilidad con que atraviesa la membrana plasmática, puede interactuar directamente sobre proteínas citoplasmáticas como la calmodulina, la proteína quinasa C y la proteína MT₃, o bien puede actuar sobre radicales libres.

Los primeros estudios que mostraron la existencia de sitios de unión de la melatonina fueron llevados a cabo mediante ensayos con el radioligando 2-yodomelatonina¹. Se descubrió en la mayoría de las especies su afinidad por el sistema nervioso central y la retina. Se han clonado ya tres receptores de membrana de la melatonina: los receptores MT₁, MT₂ y Mel 1c.

La primera interacción de la melatonina con el núcleo se descubrió al encontrarse una gran cantidad de hormona asociada a cromatina. Esta hormona ejerce sus efectos por medio de receptores nucleares de la subfamilia de receptores retinoicos RZR/ROR. Hasta la fecha, los únicos ligandos descritos para estos receptores son la melatonina y compuestos de la familia de las tiazolidindionas, que actúan como análogos de la melatonina. Así, el CGP 52608 actúa como análogo de melatonina, mientras que el CGP 55644 lo hace como

antagonista. Los miembros de la subfamilia tienen un grado de expresión variable entre los tejidos. Las isoformas ROR alfa se expresan en multitud de tejidos. Intervienen en la inhibición de la 5-lipoxigenasa, un mediador antiinflamatorio, y en un aumento de los niveles de IL-2 e IL-6, inducidos por la melatonina.

La expresión de RZR- β es la más restringida, se la detecta casi exclusivamente en estructuras del sistema nervioso central implicadas en el procesamiento de la información sensorial y en el sistema de sincronización circadiano. El ROR gamma presenta una amplia distribución, mientras que su variante ROR gamma-t es específica del sistema inmune¹.

Según parece, la degeración anatómica y funcional asociada al envejecimiento se debe, en parte, al daño producido por los radicales libres, en concreto los radicales de oxígeno. Estos radicales libres inactivan enzimas, dañan el ADN e inician una serie de reacciones en cadena que conducen a la peroxidación (degradación) de los lípidos de las membranas celulares. Para reducir este efecto, tenemos sistemas de defensa, entre los que destaca la melatonina. Los trabajos de Russel J. Reiter, de la Universidad de Texas en San Antonio¹ y otros han demostrado que la melatonina se comporta como un potente antioxidante. En particular, neutraliza el radical hidroxilo (\bullet OH), con una efectividad que multiplica por 5 y por 14 la del glutatión y la del manitol, respectivamente. Además, la hormona se ha mostrado efectiva en la neutralización del peróxido de hidrógeno, el singlete de oxígeno, el anión peroxinitrito y el radical peróxido.

Cáncer de mama.

Es un problema de salud pública por su frecuencia y mortalidad, por lo que ha surgido la necesidad de métodos eficaces para la detección temprana, diagnóstico, estadiaje y evaluación de respuesta al tratamiento, donde los estudios de imagen representan un papel esencial. Continúa siendo la neoplasia más frecuente de la mujer y se diagnostican 1.2 millones de casos por año causando 500,000 muertes por año, en Europa y EEUU. Aunque en los últimos años ha disminuido de forma notable su mortalidad, dado el diagnóstico precoz y por consecuente su tratamiento desde fases tempranas, sigue siendo una de las neoplasias que más preocupan a la sociedad médica actual⁴.

Aproximadamente 75-80% de los cánceres son invasivos o infiltrantes. El tipo histológico más frecuente es el carcinoma ductal invasor que representa el 70 al 80%, el segundo más común es el lobulillar invasor (5-10%), difícil de diagnosticar por su diseminación difusa en vez de formar una masa, además de una alta tasa de multifocalidad y bilateralidad. El CDIS permanece confinado al sistema ductal de la mama sin penetrar la membrana basal, aproximadamente el 30 al 50% de las pacientes con CDIS desarrollara carcinoma ductal en un periodo de 10 años. El cáncer inflamatorio (Enfermedad de Paget) se suele diagnosticar clínicamente con la aparición de edema, eczema y piel de naranja en la mama. Representa tan sólo el 1% de los cánceres y suele afectar al complejo areola-pepón.

Una vez diagnosticado, un comité multidisciplinar evalúa la situación de la paciente, así como el subtipo histológico, el estadiaje del tumor y la presencia o no de mutaciones en los genes BRCA1 y BRCA2, para así ofrecer un tratamiento lo más individualizado posible⁴.

Tanto en el CDIS como en el cáncer de mama invasivo en estadio temprano, se recomienda cirugía para extirpar el tumor. En ocasiones en los que la masa tumoral sea mayor, se suele realizar una terapia sistémica neoadyuvante con quimioterapia o terapia hormonal, con el fin de reducir al máximo la masa tumoral previo a la intervención. Por último, posteriormente a la cirugía, se realiza una terapia adyuvante, (normalmente con radioterapia), u otras opciones terapéuticas (terapia hormonal, quimioterapia, etc). Este tipo de terapia disminuye el riesgo de recurrencia, aunque no lo elimina por completo.

Por lo tanto, las opciones de tratamiento en este tipo de tumor son múltiples, aunque nos vamos a centrar principalmente en la particularidad de este tipo de tumor, que es la de ser un tumor hormonodependiente, por lo general. Es por ello que muchas de las terapias usan hormonas para combatir dicha proliferación, entre las que se encuentran el tamoxifeno y los inhibidores de la aromatasas:

- Tamoxifeno: bloquea el receptor de estrógenos e impide su fijación a las células del cáncer de mama. Resulta eficaz para reducir las recurrencias, además del riesgo de desarrollar cáncer en la otra mama y metástasis a distancia. También está aprobado por la FDA para reducir la incidencia de cáncer de mama en mujeres con riesgo elevado de desarrollar la enfermedad. Es útil tanto en premenopáusicas como postmenopáusicas.
- Inhibidores de la aromatasas: disminuyen los estrógenos producidos por los tejidos ajenos a los ovarios en las mujeres posmenopáusicas, al bloquear la enzima aromatasas, la cual transforma los andrógenos a estrógenos. Destacan el anastrozol (Arimidex®), el exemestano (Aromasin®) y el letrozol (Femara®).
- Análogos de la hormona liberadora de gonadotropina u hormona liberadora de luteinizante (GnRH o LHRH) detienen la producción de estrógeno en los ovarios, ocasionando una menopausia temporal. La goserelina (Zoladex) y la leuprolida (Lupron) son fármacos inyectables que pueden detener la producción de estrógeno en los ovarios durante 1 a 3 meses
- Proteínas específicas del cáncer, limitando así su daño a las células sanas. Después de las terapias hormonales, las segundas terapias dirigidas se basaban en el gen HER2, en los cánceres que expresaban dicho gen. Entre ellos, el más destacado a día de hoy, es el trastuzumab, que se utiliza en combinación con quimioterapia sistémica como tratamiento para el cáncer de mama HER2 + no metastásico⁵.

FUNCIONES DE LA MELATONINA.

Sabemos que la melatonina es un compuesto con múltiples efectos, y no solo su papel como reguladora del ciclo sueño/vigilia. Como ya se ha mencionado, destaca su capacidad para regular el ciclo circadiano en diferentes situaciones, incluso del ciclo circadiano de cortisol libre³. La melatonina guarda relación con la maduración sexual de los humanos y actúa como marcador endocrino estacional para la reproducción de muchas especies estacionales^{6,7}. Posee, además, capacidad antioxidante, constituye un neutralizador directo de radicales libres y potencia el efecto de antioxidantes clásicos y de enzimas antioxidantes. En cuanto a su papel inmunomodulador, ejerce múltiples acciones sobre la morfología y funcionalidad de órganos primarios y secundarios del sistema inmunitario. En este dominio opera vía regulación de citoquinas^{8,9,10}.

Por último, y sobre lo que se va a centrar este trabajo, destacaremos las propiedades de la melatonina como agente oncostático, puesta de manifiesto en modelos tumorales *in vivo* e *in vitro*, sobre todo en aquellos dependientes de hormonas (Cáncer de Mama, sobre el que se centrará nuestro estudio; o de ovario, entre otros). Sin olvidar sus propiedades demostradas como adyuvante en diversas terapias antitumorales.

Se han realizado *in vitro* estudios en la línea celular MCF-7, derivada de carcinoma de mama, y se ha puesto de relieve el efecto antiproliferativo y potenciador de diversos agentes quimioterapéuticos citotóxicos y citostáticos⁹.

Los efectos antiproliferativos de la melatonina se han mostrado también en otras líneas celulares de mama, ovario, coriocarcinoma, próstata, colon, melanoma y neuroblastoma, entre otros. La propia secreción natural de la hormona constituye una señal oncostática, ya que tras la pinealectomía se ha observado una aceleración en el crecimiento tumoral, contrarrestada con la administración de melatonina exógena^{6,11}.

MECANISMOS ANTITUMORALES DE LA MELATONINA

Melatonina como agente inhibidor de radicales libres.

Debido a sus acciones de eliminación de radicales, previene el daño al ADN nuclear que se produce cuando encuentra especies reactivas de oxígeno o nitrógeno. El ADN mutilado por cualquier medio puede sufrir una mutación y desencadenar un tumor. Dicho daño ocurre persistentemente, y si no se repara, continúa acumulándose durante toda la vida y es probable que sea una causa primaria de cáncer a partir de cierta edad^{10,11}.

Se conoce desde 1993 el papel protector de la melatonina como secuestrador de radicales libres ($\bullet\text{OH}$)¹². Esta evidencia se obtuvo tanto en experimentos *in vitro* utilizando 5,5 dimetilpirrolina N-óxido (un reactivo capaz de atrapar radicales), como mediante experimentos en los que se generó $\bullet\text{OH}$ por la fotólisis por radiaciones ultravioleta del H_2O_2 . Sin embargo, aún existe controversia respecto al mecanismo de esta reacción. Por un lado, se ha propuesto una reacción directa entre la hormona y el $\bullet\text{OH}$, y por otro, se ha sugerido que el metoxiindol inhibe la formación del radical por ejemplo, por reacción con agua oxigenada¹³.

Además del radical $\bullet\text{OH}$, la melatonina y sus metabolitos tienen la capacidad de detoxificar el radical superóxido, peróxido de hidrógeno, anión perinitrito y óxido nítrico, así como estimular la expresión de otras enzimas antioxidantes. Los efectos antioxidantes indirectos de la melatonina dependen de su habilidad para inducir la expresión de glutatión peroxidasa y reductasa, superóxido dismutasa y catalasa, cuatro importantes enzimas antioxidantes, así como reducir la actividad de enzimas pro-oxidativas, como por ejemplo, la enzima óxido nítrico sintetasa.

Los efectos anticarcinogénicos de la melatonina se deben, en parte, a su capacidad de aceptor de radicales libres, el cual ha sido demostrado en diferentes modelos experimentales de carcinogénesis inducida por daño antioxidante, en los cuales la melatonina ejercía un efecto protector.

La carcinogénesis hormonal merece especial consideración debido a la relevancia de estos tumores en el amplio campo de las enfermedades tumorales. El 17- β -estradiol (E_2), una hormona clasificada como un carcinogénico natural por la IARC. Los efectos carcinogénicos de E_2 dependen en parte, del papel estimulador de este esteroide en la proliferación celular de diferentes tejidos incluida la glándula mamaria, así como la probabilidad de incrementar la mutación del ADN. Muchos de estos efectos carcinogénicos, sin embargo, han sido relacionados con el estrés oxidativo dependiente de sus metabolitos. Los estrógenos son metabolizados por la citocromo P450 que los hidroxila a productos tales como el 2- y 4-alfa-hidroxiestradiol. Estos son oxidados a semiquinonas, los cuales, en presencia de una molécula de oxígeno, son oxidados a quinonas con la consiguiente formación de anión superóxido y radicales hidroxilo ($\bullet\text{OH}$), responsables de la carcinogénesis inducida por estos esteroides.

Usando un modelo de riñón de hámster para la carcinogénesis inducida por estrógenos, Karbownik et al., demostraron que la melatonina prevenía la potenciación de la oxidación de bases de guanina causada por los estrógenos, además de prevenir el daño en el ADN lo que puede potenciar la supresión del cáncer mediada por estrógenos¹¹.

Radioprotector.

Poco tiempo después de que la melatonina fuera descubierta como depurador de radicales libres (sobre todo $\bullet\text{OH}$), los cuales son responsables del 70% del daño teórico que aparece en células expuestas a radiación de alta energía, se pensó en la posibilidad de que también sirviese como radioprotector y agente

anticancerígeno.

El efecto de la radiación ionizante en el ADN es el de producir roturas simples y dobles en sus cadenas, formar enlaces cruzados ADN-proteína. La idea de que la melatonina protege de la radiación ionizante la propuso Blickenstaff y su equipo, el año después de que se descubriese su efecto como receptor de radicales libres, al demostrar que la mitad de los ratones irradiados con una dosis letal normal de radiación ionizante (950 cGy en todo el cuerpo), la mortalidad se reducía. De forma similar, también se observó que la melatonina aumentaba significativamente la supervivencia en ratones expuestos a 815 cGy de radiación ionizante¹⁴.

En asociación con este estudio, además se descubrió que la melatonina dada de manera preventiva antes de la radiación a todo el cuerpo, protegía también a la médula ósea del daño genómico. Vijayalaxmi y su equipo¹⁴, verificaron que la melatonina actúa como citoprotector de los linfocitos sanguíneos expuestos a 150 cGy de radiación. Finalmente, estos estudios se trasladaron a humanos, demostrando que con el uso de melatonina, la frecuencia de daño cromosómico y formación de células tumorales, se reducía un 60-65% en los linfocitos de individuos que habían sido tratados con melatonina, en comparación de los que no lo habían hecho^{14,15}.

Regulación de la expresión del receptor de estrógenos y activación.

Los efectos oncostáticos de la melatonina son especialmente relevantes en los tumores hormonodependientes, y en especial, aquellos que afectan a la glándula mamaria, prostata y ovarios. De todas estas neoplasias, la más frecuentemente estudiada ha sido la glándula mamaria. Las propiedades antiestrogénicas de la melatonina son la base de su acción oncostática de cáncer hormonodependiente, y las interacciones de la melatonina con la vía de señalización de estrógenos han sido más que estudiadas.

Algunos autores como Cohen¹¹, sugieren que una reducción de la función pineal, sea cual sea la causa, y su consecuente descenso en la secreción de melatonina, podría inducir un estado de relativo hiperestrogenismo, con la temprana exposición del tejido mamario a los estrógenos, contribuyendo esto a la etiología del tumor.

Actualmente, sabemos que la melatonina interacciona con el receptor estrogénico comportándose como un SERM. Sin embargo, de forma distinta a otros SERMs, la melatonina tampoco se une al receptor de estrógenos ni interfiere con la fijación de estrógenos a su receptor, como el tamoxifeno. Las propiedades antiestrogénicas de la melatonina dependen de su habilidad de disminuir la expresión del receptor de estrógenos alfa e inhibir la unión del complejo que se forma al elemento de respuesta estrogénico en el ADN. Todos estos efectos son ejercidos a través de los MT1¹¹.

En la línea de MCF-7, la activación de los receptores MT1, no los MT2, realzan la respuesta de estas células a los efectos antiestrogénicos de la melatonina. Los receptores de membrana MT1 se unen a proteínas G e inhiben la actividad

guanilato ciclasa, lo que hace que descienda la PKA, produciéndose un descenso del cAMP que puede ser uno de los mecanismos implicados en el descenso melatonina-dependiente de la actividad transcripcional del receptor de estrógenos alfa. En conclusión, se demuestra que la melatonina actúa reduciendo la expresión de proteínas dependientes de la actividad transcripcional del receptor de estrógenos α , incluyendo proteínas mitogénicas y BCL antiapoptótico. Por otro lado, la melatonina, en una vía diferente de la proteína G, también modula la transactivación de receptores nucleares de la superfamilia de los esteroides/retinoides, incluyendo receptores de glucocorticoides y el RAR α .

Otro mecanismo implicado en la acción antiestrogénica de la melatonina es su acción en la asociación CaM - complejo E2-ER, que facilita la unión al ERE. Así, CaM actúa como modulador de la actividad transcripcional del ER alfa, aunque no del ER Beta. En este contexto, es importante señalar que la melatonina se une a la CaM e inactiva el complejo Ca²⁺/CaM. Además, la inactivación de la CaM significa que dicha indolamina puede interactuar con la vía de señalización de estrógenos. Esto es interesante, ya que, como se indica, la CaM se une exclusivamente al ER α ¹⁶. Consecuencia de esto, desde que los efectos antiestrogénicos de la melatonina son, en parte, dependientes de su habilidad para la inactivación de CaM, la melatonina puede ser considerada básicamente como un inhibidor específico de E₂ mediado por la actividad transcripcional de ER α , mientras no inhibe la transactivación mediada por ER β . De hecho, la sensibilidad del MCF-7 de las células humanas del cáncer de mama a la melatonina depende del cociente ER α /ER β y es abolido por la sobreexpresión de ER β ¹⁷.

Además de sus propiedades simultáneas tanto como SEEM como SERM, los experimentos han revelado que la melatonina aumenta la sensibilidad de las células MCF-7 a los efectos antiestrogénicos del tamoxifeno, y que el tratamiento previo con melatonina reduce la expresión de la aromatasa y la actividad de células expuestas a aminoglutamida, un fármaco antiesteroideo^{11,18,19}. Esta evidencia apoya la idea de usar melatonina para mejorar los efectos de la terapia convencional con fármacos SEEM y SERM. Además de esto, la melatonina puede también ser útil para reducir o suprimir algunos de los efectos secundarios de los antiestrógenos convencionales.

En esta búsqueda, se ha demostrado, que la melatonina reduce la hepatotoxicidad del inhibidor letrozol de la aromatasa. Una patente reciente de Witt-Enderby et al (2014) ha sido la del ligando híbrido melatonina tamoxifeno como tratamiento para el cáncer de mama²⁰.

Por otro lado, se ha demostrado que la posible asociación de melatonina con inhibidores de la aromatasa podría reducir el riesgo de osteoporosis descrita en el tratamiento con esta familia de fármacos. La melatonina promueve la proliferación de osteoblastos y la síntesis de osteoprotegerina, un miembro de la superfamilia de TNFR. Esta proteína inhibe la diferenciación de osteoclastos previniendo la unión del ODF al receptor RANK. Es por este motivo que podemos concluir que la melatonina es un importante adyuvante en la disminución del riesgo de fracturas de cadera u otras localizaciones, gracias a su reducción del

riesgo de osteoporosis.

Se realizó un meta-análisis de 51 estudios epidemiológicos que comprendían a más de 150.000 mujeres, llevadas por el Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer, que concluyeron que la HRT después de la menopausia estaba asociado a un riesgo elevado de padecer cáncer de mama. La asociación de la melatonina con HRT convencional (estrógenos+progesterona) confirmó la patente (Witt-Enderby et al.) que ya había sido probada en ratones, demostrando de manera firme que la asociación de melatonina con HRT incrementaba de forma significativa la latencia y descendía la incidencia del cáncer de mama²⁰.

Inhibidor de actividad telomerasa.

La activación de la telomerasa desempeña un papel importante en la carcinogénesis, proporcionando un mecanismo para una capacidad ilimitada de división de células neoplásicas. La actividad de la telomerasa elevada ha sido observada en el 85-90% de los cánceres, mientras que está ausente en la mayoría de tejidos diferenciados.

La expresión de hTERT, una subunidad de la telomerasa y un mayor determinante de la actividad de la enzima se correlaciona de forma estrecha con la actividad de la telomerasa y sirve como indicador de su activación¹¹.

En células normales, además de las células del tejido de la mucosa gástrica, la melatonina incrementa la actividad de la telomerasa, probablemente como parte de un mecanismo de retraso del envejecimiento de la mucosa gástrica por inhibición del ciclo replicativo celular de la senectud. Sin embargo, en las células cancerígenas MCF-7 la expresión de hTERT mRNA está inhibida de manera dosis-dependiente por la melatonina, la cual reduce el crecimiento de xenoinjertos en ratón y desciende la actividad de telomerasa de los tumores injertados.

Además, el tratamiento con CGP 52608, un agonista puro del receptor nuclear de melatonina, desciende los niveles de RNA de hTERT, mientras que el agonista del receptor de membrana MT1 S20098M, tiene los efectos contrarios, esto sugiere un mecanismo cruzado entre ambos tipos de receptores de melatonina en la regulación hormonal de la actividad de telomerasa¹¹.

Esta existencia entre un ERE imperfecto en el promotor de hTERT explica la capacidad de los estrógenos para activar la telomerasa, y por qué el estradiol aumenta la expresión de hTERT y la actividad de telomerasa en células MCF-7 (ER α positivo), sin tener efecto en las células ausentes de ER alfa. Estudios *in vitro* mostraron como la melatonina inhibe la expresión de hTERT inducida tanto por E2 y los xenoestrógenos, como por Cadmio, un metal pesado con propiedades estrogénicas y actividad carcinogénica¹¹.

La capacidad de inhibición de la melatonina del aporte extra de estradiol inducido por la vía de la telomerasa hace posible su utilización en el tratamiento de tumores estrogendependientes o carcinogénesis dada la exposición

ambiental u ocupacional a dichos xenoestrógenos¹¹.

Efectos anti-apoptóticos.

La apoptosis es un mecanismo fisiológico primordial para la homeostasis tisular, de manera que una desregulación del proceso apoptótico puede conducir a desórdenes hiperproliferativos por una disminución en la tasa de apoptosis, como por ejemplo el cáncer, o hipoproliferativos por un aumento en la tasa de apoptosis, como son las enfermedades neurodegenerativas y autoinmunes²¹.

Varios estudios realizados por Milles y su equipo, han demostrado el control que ejerce la melatonina sobre la apoptosis de células del sistema inmunológico. Los primeros revelaron que la melatonina reduce la fragmentación del ADN inducida por glucocorticoides en timocitos de cultivo, descritos por Sainz y su equipo, en 1995. Este mecanismo parece estar mediado por la reducción de la expresión del receptor de glucocorticoides^{11,21}. Posteriormente, se descubrió que la melatonina, además de inhibir la fragmentación del ADN, también impide la liberación del citocromo C desde la mitocondria al citoplasma en timocitos de ratón tratados con dexametasona. De hecho, la melatonina es capaz de inhibir la vía mitocondrial de la apoptosis, a través de la regulación de los niveles de proteína apoptótica Bax²¹.

Los mecanismos por los que inhibe la apoptosis parecen estar relacionados con sus propiedades antioxidantes y como agente secuestrador de radicales libres. Por ejemplo, la melatonina atenúa el daño por isquemia/reperfusión disminuyendo el daño oxidativo mitocondrial mediante la activación de la vía de señalización JAK2/STAT3. El reciente descubrimiento por Acuña-Castroviejo y col. (2002)²¹, de que las mitocondrias constituyen una diana para la melatonina ha abierto nuevas perspectivas en relación a los mecanismos de acción de la indolamina. En este sentido, Andrabi y cols. (2004)²¹ sugirieron que los efectos anti-apoptóticos de la melatonina podrían explicarse por una interacción directa de esta indolamina con el PPT de la mitocondria.

Además, estudios más minuciosos han puesto de manifiesto que los efectos inhibitorios de la melatonina sobre el PPT están probablemente relacionados con la habilidad de la indolamina de prevenir la peroxidación de la cardiolipina, un lípido que se encuentra de forma exclusiva en la MMI y cuya oxidación parece desencadenar la permeabilización de la MME, quizá, a través de su interacción con proteínas pro-apoptóticas de la familia Bcl-2²¹.

Efectos pro-apoptóticos.

Durante la primera parte del siglo XX Engel y Bergmann (Engel, 1935; Bergmann y Engel, 1950), así como Hofstätter (1959) realizaron estudios pioneros tanto experimentales como clínicos en Viena abordando la capacidad antineoplásica de la glándula pineal bovina. Vera Lapin en los años setenta los redescubrió, trabajando en el Centro de Investigación del Cáncer de Viena, revisó el tema glándula pineal y cáncer y llevó a cabo importantes estudios experimentales. Además, Lapin, junto con Ebels, en 1981, organizaron el primer trabajo que

relacionaba glándula pineal y cáncer. Allí, a través de los datos procedentes de diferentes autores se pudo concluir que el papel del indol pineal melatonina era muy importante con respecto a la incidencia del desarrollo de tumores. Una conclusión central de los estudios de Lapin fue que la pinealectomía estimula el crecimiento del tumor primario y la formación de metástasis lo que conduce a la reducción de supervivencia¹¹.

Sin embargo, los mecanismos por los que la melatonina inhibe el crecimiento tumoral o induce apoptosis en células tumorales aún no han sido del todo esclarecidos. En células tumorales, la melatonina presenta dos efectos principales: inhibición de la proliferación celular y activación de la apoptosis. Aunque en determinados tipos de cáncer la melatonina puede producir ambos efectos, se asume de manera general que la melatonina, a bajas concentraciones (en el rango nanomolar y normalmente referidas como concentraciones "fisiológicas"), sólo podría ejercer una acción citostática; mientras que los efectos apoptóticos se observan a menudo a concentraciones más elevadas. Así, tumores de próstata tanto sensibles como insensibles a andrógenos no responden a concentraciones de melatonina en el rango nanomolar, pero concentraciones milimolar inducen una significativa inhibición del crecimiento¹¹.

Por otro lado, los efectos antitumorales de la melatonina se han descrito en tumores mamarios que presentan mutado el receptor de estrógenos. De este modo, se ha observado que la melatonina, a concentraciones del rango nanomolar, induce una respuesta apoptótica bifásica en células MCF-7¹¹.

La apoptosis temprana inducida por la indolamina es un proceso independiente de caspasas fundamentalmente activado por el AIF. Por el contrario, la apoptosis tardía (inducida tras 96 horas de tratamiento con melatonina) es el resultado de una vía de señalización más compleja, que implica una desregulación en el ratio Bcl-2/Bax así como la activación de caspasas (-9 y -7) y el consiguiente procesamiento de PARP.

Además, parece ser que la proteína p53 se activa durante la apoptosis temprana inducida por la melatonina, mientras que la proteína p73, el homólogo de p53, está involucrado en la apoptosis tardía dependiente de caspasas. Aparte de esto, investigaciones recientes indican que la indolamina también muestra propiedades pro-apoptóticas en líneas celulares de cáncer de mama insensibles a estrógenos. De hecho, en células MDA-MB-231 (negativas para el receptor de estrógenos), las dosis farmacológicas de melatonina inhiben significativamente la expresión de la COX-2 y la producción de prostaglandina E2, reducen drásticamente la actividad histona acetiltransferasa del cofactor p300 y la acetilación mediada por p300 del factor nuclear NF- κ B y, por tanto, bloquean la unión y reclutamiento de NF- κ B al promotor de COX-2^{11,22}.

Asimismo, la melatonina inhibe marcadamente la fosforilación de las proteínas PI3K, Akt y la glucógeno sintasa quinasa-3 (GSK-3), inactivando de este modo la vía de señalización fosfoinositol 3-quinasa (PI3K)/Akt. En última instancia, la melatonina desencadena la activación de Apaf-1 y la consiguiente cascada de caspasas²².

Detoxificador del tratamiento quimioterápico.

Entre otras de las muchas funciones de la melatonina, una de ellas es su capacidad de reductora de los efectos adversos del tratamiento quimioterápico, por lo que su utilización podría suponer una reducción de la comorbilidad que ya de por sí asocian estos tratamientos. Así, la doxorubicina forma parte de la familia de las antraciclinas, una clase de antibióticos citostáticos que han sido usados con éxito en el tratamiento de varios tipos de tumores sólidos. Su uso, sin embargo, es complicado dada la variedad de efectos secundarios agudos y crónicos. Una de las mayores consecuencias a largo plazo de la doxorubicina es el desarrollo de cardiomiopatía y fallo cardíaco congestivo en último lugar. Los mecanismos moleculares por los que la doxorubicina induce el daño cardíaco han sido al menos en parte identificados por la generación de radicales libres de oxígeno¹².

Los primeros trabajos que testaron la eficacia de la melatonina reduciendo la toxicidad cardíaca de la doxorubicina fueron llevados a cabo por Morishima y su equipo (1998)¹². Desarrollaron estudios de tejido cardíaco de ratas tratadas solo con doxorubicina y en combinación con melatonina.

También compararon los efectos relativos protectores de la melatonina con probucol, un fármaco hipolipemiante que reportaba numerosos beneficios en el tratamiento de doxorubicina en ratas¹². Melatonina y probucol fueron igualmente efectivos en el mantenimiento del peso cardíaco, reduciendo la mortalidad, disminuyendo el volumen de líquido ascítico, aumentando los niveles de presión arterial tanto sistólica como diastólica y revirtiendo el daño estructural cardíaco causado por la doxorubicina. Mientras ambos tratamientos (melatonina y probucol) disminuían la acumulación de productos de peroxidación lipídica en el tejido cardíaco, la melatonina era más efectiva reduciendo los niveles en plasma de los productos de daño lipídico¹². Estudios posteriores realizados por Morishima, revelaron que parte de las acciones beneficiosas de la melatonina en la reducción del daño cardíaco de la doxorubicina se debían a su capacidad para modular la redistribución de zinc, el cual puede actuar por sí mismo como agente antioxidante¹². Además de esto, la melatonina se comparó con un antioxidante clásico, la vitamina E, clasificados como protector. En posteriores análisis se demostró que, para alcanzar las mismas concentraciones de protección cardíaca, la dosis de vitamina E debía de ser 50 veces superior a la de melatonina (Fig. 3)¹².

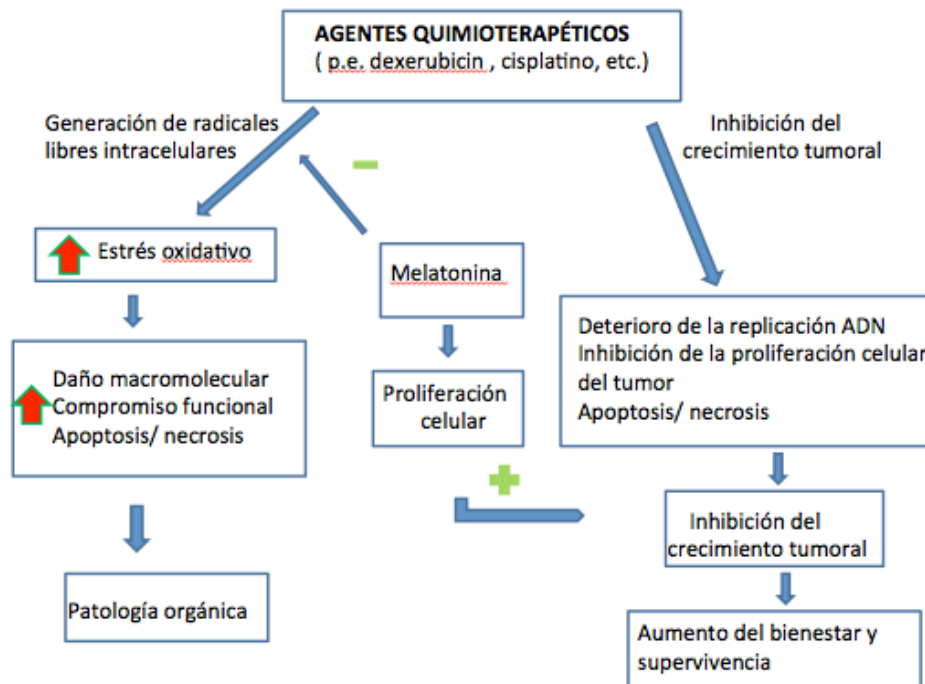


Fig. 3. La doxorubicina y un elevado número de agentes quimioterápicos inhiben el crecimiento tumoral por mecanismos específicos. Sin embargo, generan radicales libres que causan un extenso daño celular o disfunción que puede generar patología orgánica e incluso muerte celular. La capacidad antioxidante de la melatonina puede reducir el daño celular, potenciando la inhibición del tumor debido a su actividad intrínseca de inhibición de la actividad tumoral.

El cisplatino es un agente quimioterápico ampliamente usado, aunque su uso está también limitado por la toxicidad. Los tejidos más frecuentemente dañados son el riñón, nervios periféricos y estructuras del oído interno. Su toxicidad directa es debida a la liberación de radicales libres generados en estos tejidos. La administración exógena de melatonina previno la ototoxicidad del cisplatino en ratas. En este caso la melatonina era administrada de forma subcutánea o administrada en el agua, siendo la medida la emisión de distorsión de producto otoacústico medido por una sonda en el CAE de estas ratas. La administración conjunta de melatonina con el cisplatino, causaba una protección de la audición de todas las frecuencias en el oído de las ratas.

En cuanto al riñón, se realizó un estudio con ratas a las que se administró cisplatino intraperitonealmente (7 mg/kg). El daño renal era aparente a partir del 3º a 5º día. Se midieron los niveles de creatinina plasmática y BUN, los cuales estaban aumentados. Se demostró que la melatonina previno el daño morfológico en el tubulo contorneado proximal, el epitelio renal y, especialmente, en la concentración de cisplatino en sangre¹².

Progresión de metástasis.

Debido al amplio rango de funcionalidad de la melatonina, los esfuerzos por entender el papel oncostático han sido recientemente encaminados hacia el control de las metástasis. Multitud de evidencia han enlazado las acciones de la melatonina a muchos mecanismos celulares compuestos tanto por células cancerígenas como por aquellas que no forman parte del microambiente del

tumor. Estos incluyen la regulación célula-célula y la interacción célula-ECM remodelada por la matriz de MMPs, reorganización del citoesqueleto, transición de EMT y angiogenesis^{11,14}.

Una característica común de las células de tumor diseminadas es su capacidad sustancial de flexibilidad en sus interacciones adhesivas con sus células vecinas o elementos de ECM. Como las células cancerígenas son sometidas a una invasión, la disrupción de las uniones célula-célula permite a estas células separarse de las del tumor primario, y cambiar en la interacción célula-matriz, lo que le permite penetrar en el estroma adyacente. Una gran variedad de estructuras de la composición de la superficie epithelial, tales como TJs, AJs, GJs, desmosomas y hemidesmosomas son responsables de mantener la despolarización celular, preservando de forma colectiva la arquitectura del epitelio celular. De todas estas, se ha demostrado que la melatonina ejerce un efecto inhibitorio en la invasión cancerígena, modulando la expresión de moléculas de adhesión asociadas con TJ y AJ. Un ejemplo claro de esto es que la melatonina ha mostrado una conversión de una línea celular en el cáncer de mama en humanos, MCF-7, el cual reduce el fenotipo invasivo aumentando la expresión de la e-cadherina, un miembro tipo 1 de las clásicas cadherinas encontradas en AJs. La pérdida de las E-Cadherinas en las células cancerígenas está considerada como una alteración contrastada de la unión celular en un paso temprano de la metastasis¹⁴.

Recientemente, en un estudio de la diseminación del cáncer gástrico²³, la acción de la melatonina en la regulación positiva de la E-Cadherina fue probada para controlar la interrupción de la interacción de NF-kB con C/EBP Beta. Se observaron elevados niveles de ocludina, una proteína transmembrana presente en TJs. La ocludina se ha relacionado como reguladora de la activación de localización de membrana de PI3K y como vanguardia de la localización de proteínas de polaridad, aPKC-Par3 y PATJ, que promueven la migración direccional de células epiteliales¹⁴.

La exquisita expresión de genes que condifiquen las moléculas de adhesión involucradas en la interacción de la célula a ECM ha sido relacionada con las acciones de la melatonina en la invasión de células cancerígenas. Además, hay que destacar el receptor de integrina, una glicoproteína de la familia de los heterodímeros que conecta mediante señales el medio extracelular con el aparato intracelular. Se vio que la expresión de alfa-v y β -3 integrina fue nula, mientras que la melatonina ejercía su papel inhibitorio en la invasión de células en el glioma bajo condiciones hipóxicas. La expresión de los niveles de alfa-v integrina no solo se correlacionaba con eso, sino que también actuaba reteniendo un estado altamente invasivo en próstata y células cancerígenas del cáncer de laringe. En contraste con esto, la respuesta migratoria de células de cáncer de mama estuvo suprimida por la melatonina gracias a la inducción de la B1 integrina. Estos resultados reflejaron que la melatonina media una interacción bien coordinada entre la adhesión célula-célula y entre matriz-célula, restringiendo a las células neoplásicas escapar de la masa de tumor primario e invadir el estroma vecino¹⁴.

Añadido a un microambiente que apoye a las células del tumor primario para migrar, las metástasis necesitan un nicho de células pre-metastásicas por las que

circulen células del tumor que presenten y colonicen sitios distales. El mayor componente para esto es la ECM, una estructura altamente dinámica que se presenta en todos los órganos y está siendo constantemente remodelada. Las enzimas más importantes de la remodelación de ECM son las MMPs. La ECM no solo proporciona una estructura para que se unan moléculas de adhesión, sino que también sirve como depósito para el secuestro de varios factores de crecimiento como el bFGF y el VEGF. La degradación de ECM por MMPs libera señales bioquímicas cruciales, las cuales aumentan la diseminación del cáncer inducido por la angiogenesis y la linfangiogénesis. La melatonina se ha demostrado como moduladora de la función de expresión de los niveles de MMPs, y se demostró que la melatonina tiene un representativo-efecto catalítico en la actividad de MMPs a través de la unión al sitio activo en líneas celulares del adenocarcinoma gástrico.

Además de esto, la mediación de la melatonina en la regulación negativa de MMP-9 fue hallada como contribución a un epigenético o regulación no dependiente del estado transcripcional en las investigaciones del cancer oral, metástasis del cancer de riñón, y migración de células del carcinoma nasofaríngeo¹⁴.

En conclusion, todos estos resultados revelaron un papel más que relevante de la melatonina para contrarrestar la metastasis tumoral vía MMP-9 mediada como remodelación de ECM¹⁴.

Otra situación específica del uso de melatonina en la progresión del cáncer, en concreto el cáncer de mama, es el papel de la expresión del gen KISS1 inducida por la melatonina en la inhibición de la capacidad invasiva del cáncer de mama triple negativo²⁴.

El cáncer de mama triple negativo es uno de los más agresivos y asociado a un pobre pronóstico. También este tipo de células son las más invasivas de cara a una futura progresión de metastasis. Sin embargo, la expresión de los niveles de MT1 se han asociado con una mayor supervivencia en mujeres africanas, americanas y caucásicas, sugiriendo que la melatonina pueda tener un papel terapéutico en este tipo de cáncer. A pesar de esto, el efecto de la melatonina en el cáncer de mama triple negativo sigue en gran parte siendo desconocido²⁴.

La kisspeptina, un producto del gen de KiSS1, es conocido por regular el inicio de la pubertad y suprime la progresión de metastasis. La expresión de KiSS1 está aumentado en lesiones primarias de cancer pero reducida en las lesiones metastásicas, sugiriendo que KiSS1 puede tener funciones pleiotrópicas en el desarrollo del cancer de mama y metastasis^{14,24}. La melatonina regula la expresión de KiSS1 en el hipotálamo aunque la asociación entre la melatonina y KiSS1 en el cancer no ha sido del todo definida. Se comprobó que el tratamiento con 1mM de melatonina inhibió las funciones metastásicas, incluyendo la migración e invasion en las células cancerígenas triple negativo MDA-MB-231, la concentración farmacológica de melatonina también reducía la viabilidad celular y causó apoptosis. Concentraciones fisiológicas de melatonina solo reducían la viabilidad de las menos invasivas, las células del cáncer de mama que no eran triple negativo, las cuales podrían tener unos niveles diferentes de la expresión

de MT1, aumentando o disminuyendo la invasividad de las células del cancer de mama^{14,24}.

Por otro lado, está la transcripción de factores de la familia GATA (compuesto por seis miembros ahorradores que fijan la secuencia de ADN; A/T-GATA-A/G) los cuales son decisivos para el destino de la célula. La fijación a la proteína 3 GATA se ha convertido en crucial para el destino de las células luminarias mamarias. El patrón de expresión en el cáncer de mama parece relacionarse con el patrón de expresión de receptores de estrógenos y progesterona.

Además, en el cáncer de mama con receptor hormonal positivo, expresa probablemente altos niveles de GATA3. De manera inversa, pacientes con cancer de mama invasivo triple negativo presentarán bajos niveles de GATA3, lo cual parece que se ve mantenido con el desarrollo de metastasis.

Se trataron pacientes con cáncer de mama con alta capacidad de metástasis triple negativo con melatonina en rango de 1 nM a 10 micromolar²⁴. La melatonina a concentraciones de 100 nM a 10 micromolar inhibían la migración de células sin tener efecto en la proliferación celular. Por otro lado, la expresión de KiSS1 inducida por melatonina prolongaba la inhibición de la capacidad de metástasis.

También se demostró que la melatonina aumentada los niveles y actividad transcripcional de GATA3 para la expresión de KiSS1. Por lo tanto, los resultados de este estudio sugirieron que la melatonina prolonga el efecto inhibitorio de la metastasis activando la expresión KiSS1 mediado por GATA3²⁴.

En conclusión, lo que demuestra este estudio es que la melatonina inhibe la invasividad de los tumores triple negativo sin efecto en la proliferación. Así, KiSS1 parece prolongar el efecto inhibitorio de la melatonina vía activación transcripcional GATA3. La melatonina también ha demostrado que regula el ritmo circadiano inhibiendo la expresión de KiSS1 en el cerebro de roedores. Sin embargo, parece aún por determinar como la melatonina regula la expresión via GATA3 en el resto de células o tejidos del organismo, aunque en el cáncer de mama triple negativo se postula como uno de los principales estudios en el conocimiento del papel de la melatonina en su terapéutica²⁴.

Mejora del sistema inmune.

La melatonina está relacionada con las citoquinas de los T-helper 1, y su administración aumenta los niveles de dichos Th1. Tanto en ratones normales como aquellos con leucemia, la administración de melatonina contribuyó a mejorar de forma cuantitativa los niveles de células natural killer, las cuales tienen un papel fundamental como mediadoras contra las células infectadas por virus y las células cancerígenas⁷.

La melatonina regula la dinámica celular, incluyendo los estados madurativos y proliferativos de todas las células hematopoyéticas y células inmunes implicadas en la defensa del huésped (No solo NK, sino también linfocitos T y B, granulocitos y monocitos) en la médula ósea y los tejidos⁷. En particular, la melatonina es un

poderoso antiapoptótico, que promueve la señal de supervivencia de granulocitos y linfocitos B.

Respecto a la respuesta a citoquinas, la melatonina ha demostrado la estimulación de la producción de IL-2, interferon gamma y IL-6, pero no de la IL-4 por células mononucleares de la sangre periféricas²⁵.

La melatonina también activa a los monocitos humanos para producir IL-1 e IL-12. Fisiológicamente, el pico de melatonina nocturna se ha asociado con una elevación de el cociente IFN-gamma/IL-10, además de relacionarse con la ritmicidad en el cociente Th1/Th2²⁵.

Los efectos de esta hormona han sido explorados también en vivo. La hormona es capaz de recuperar la hematopoyesis en ratones trasplantados con carcinoma de células pulmonares de Lewis y tratados con quimioterapia. Este efecto aparentemente está involucrado en la liberación endógena de factor estimulante de granulocitos/macrofagos del colon, así como citoquinas opioides inducidas por melatonina, los cuales activan a los Linfocitos Th del ganglio linfático y la médula ósea para liberar las citoquinas opioides. Como ya se sabe, su producción se reduce progresivamente con la edad^{11,25}.

Sin embargo, y, en conclusión, no ocurre lo mismo con los Linfomas de células T y leucemias, así como la posibilidad de otros tumores aún no estudiados. De todos modos, la evidencia es más que suficiente para afirmar la capacidad de la melatonina de favorecer el funcionamiento de Th1 y/o activación de NK, así como su posible utilización para el aumento o eficacia de vacunas contra el cáncer en un futuro²⁵.

Inhibidor de la angiogénesis en el cáncer de mama.

La actividad antiangiogénica de la melatonina fue descrita por primera vez en pacientes metastásicos. Cuando la melatonina era dada de forma oral a 20 mg/día durante dos meses, se vio un descenso significativo en la cantidad en la secreción de factor de VEGF²⁶.

El efecto apoptótico y antiproliferativo de la melatonina (testado desde 0.1 nM a 1 mM) fue descrito en las células de la vena umbilical en asociación con la sobre regulación del p53 y la regulación negativa de Bcl-2. El VEGF es liberado por células cancerígenas respondedoras a estrógenos y fijado a estas por el receptor local de membrana adyacente a las células endoteliales. La melatonina, administrada a concentraciones farmacológicas (1 mM) disminuye los niveles de VEGF y la producción de la aromatasa. En cultivos de cáncer de mama (MCF-7) y HUVECs, la melatonina a 1 mM ejerció su potencial antiangiogénico regulando de forma negativa las angiopoyetinas (ANG-1 y ANG-2) y los niveles de VEGF y regulando de forma positiva la expresión de Tie2, que es un receptor de angiopoyetina²⁶. Resultados parecidos fueron encontrados en injertos de modelos de cáncer de mama hormonodependiente (administrando melatonina durante 21 días a 40 mg/kg de peso, 5 días por semana) y en células de cáncer de mama triple negativo (Dosis desde 1 microgramo a 1 mM).

En tumores andrógeno dependientes, la melatonina redujo los niveles de la subunidad alfa del HIF-1 e inhibió la liberación de VEGF. Otra disminución de la angiogénesis fue encontrada en los injertos de ratón de células de cáncer de próstata sensible a andrógenos tratadas con inyecciones de 1 mg/kg durante 41 días.

Por lo tanto, se concluyó que, sobre todo en cáncer de mama y cáncer de próstata, el factor proangiogénico VEGF era regulado de forma negativa por la melatonina²⁶.

MELATONINA Y CANCER DE MAMA: ENSAYOS CLÍNICOS Y PERSPECTIVAS FUTURAS:

Biomarcador y modulación de la terapia endocrina.

Los biomarcadores son sugestivos de dos sucesos: individuos con un riesgo inherente de desarrollar una enfermedad genética, e individuos que tienen una exposición asociada con el inicio o progresión de la enfermedad^{27,28}.

Hay por lo menos tres razones por la cual la deficiencia de melatonina puede ser usada como biomarcador de screening en la salud pública para identificar a los individuos que se pueden beneficiar y ver incrementada su supervivencia con estrategias de prevención de la enfermedad²⁷. Primero, el factor edad, donde la melatonina desciende con la edad, y donde se ha visto que existe una mayor incidencia de ciertos tipos de cáncer a medida que envejece la población^{10,27,29}. Segundo, por el poder antioxidante de la melatonina, y un descenso de la misma que puede conducir a un aumento de radicales libres y, por lo tanto, un desarrollo tumoral por incremento del estrés oxidativo. Por último, la secreción de melatonina está descendida por la privación del sueño, trabajos nocturnos y otras alteraciones de exposición lumínica³ y en varios tipos de cáncer, como el cáncer de mama, parece ocurrir un pico de incidencia en personas que presentan dichas alteraciones del ritmo circadiano.

Aunque varios estudios retrospectivos han demostrado significativamente niveles reducidos de melatonina en pacientes con cáncer de mama, sin embargo, no se ha visto asociación en estudios prospectivos a largo plazo.

Una forma de razonar la observación de estos niveles descendidos de melatonina en pacientes con cáncer es la hipótesis de que la presencia de tumor pueda afectar a los niveles de melatonina. Además, el tamaño, tipo y grado de tumor puede influir en los niveles de melatonina (aumentarlos o disminuirlos), incluso, como hemos mencionado, podrían ser usados como biomarcadores de cáncer, aunque muchos estudios apoyen un papel de la deficiencia de melatonina en el aumento del cáncer.

En una revisión sistemática de ensayos clínicos de melatonina en tumores sólidos de pacientes con un año de supervivencia, se demostró que había un

impacto positivo en el uso de melatonina. Estos ensayos fueron desarrollados por el mismo grupo y en el mismo hospital. Los resultados son difíciles de evaluar, dado que un año de supervivencia es un periodo de tiempo muy corto en el contexto de muchos tumores como el de mama. El hallazgo más significativo fue que la melatonina apenas poseía efectos adversos, y esto parecía ser lo más llamativo de cara a asociarlo al resto de tratamientos quimioterápicos. Esta característica abre un campo de investigación muy amplio para ensayos clínicos durante más tiempo con el uso de melatonina²⁷.

En conclusión, aunque se han involucrado poblaciones cada vez más grandes, últimamente, el beneficio clínico de la melatonina solo ha sido demostrado a través de su adición a un amplio grupo de estudios centrado en tumores específicos en conjugación con tipos específicos de terapia, y principalmente debido a su falta de toxicidad, que la hacen idónea para ensayos de largos periodos de tiempo^{18,27,30}.

La alteración del ritmo circadiano se presenta como una de las causas en el desarrollo del cancer. La cronodisrupción por LAN representa un factor de riesgo que puede ser reducida por la melatonina (Fig. 4)²⁰.

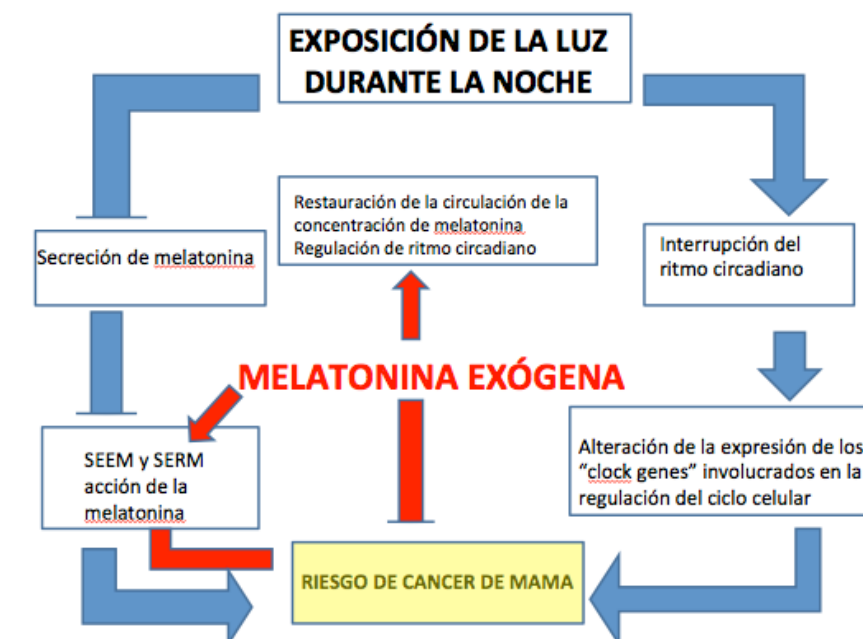


Fig. 4: La administración de melatonina podría reducir el riesgo de cáncer de mama asociado con una cronodisrupción causada por la exposición luz/oscuridad, como ocurre en los trabajadores de turnos nocturnos. La melatonina exógena restaura la disminución de los niveles de melatonina endógena causada por la ausencia de luz, y regula la función de la misma.

Este LAN aumenta el grado de crecimiento de los tumores mamarios, y ha sido firmemente establecido en roedores a los cuales se les indujo tumores de forma química, o xenoinjertos de células cancerígenas. Tal es así, que los ratones propensos a desarrollar tumores mamarios, aumentaron su riesgo de desarrollarlo cuando eran expuestos de forma crónica a unos ciclos de luz

alternantes simulando una jornada de trabajo de turnos cambiados.

Esta asociación entre los cambios horarios incluyen trabajar de noche y el incremento de riesgo de los diferentes tipos de tumores, ya mencionados por otros estudios. Este riesgo añadido de desarrollar cáncer de mama en una jornada alternante de horario de trabajo, se ha estimado en un incremento del 16% a los 10 años. Este porcentaje llevado a la población se ha estimado en una fracción atribuible del 5,7%. Estudios epidemiológicos, aunque con muchas controversias, apoyan la relación entre el cambio de jornada laboral a nocturna y el incremento de riesgo de padecer Ca Mama²⁰.

La IARC clasifica la jornada nocturna que altera el ritmo circadiano como un 2A. Basado en esto, el National Board of Industrial Injuries de Dinamarca ha reconocido el cáncer de mama como una enfermedad ocupacional, en mujeres que han estado desempleado jornadas de trabajo nocturnas los últimos 20 años (enfermeras o azafatas de vuelo, entre otras). De todos modos, es cierto que existen discrepancias entre los numerosos estudios, dado que existe una gran complejidad en el estudio de todas las variables (edad de la mujer, estado reproductivo, subtipo de cáncer, duración de la exposición nocturna a la luz, etc)^{2,19}.

Aunque las recientes publicaciones concluyen a favor de la tendencia al incremento de riesgo de cáncer de mama incluso en personas que han sido sometidas a cambios múltiples nocturnos de jornada laboral, a pesar de que fueran periodos cortos.

Revisando la influencia de una secreción reducida de melatonina, la relación entre la concentración de melatonina en plasma en cáncer de mama, ya fue establecida en mujeres con adenocarcinoma mamario y receptor de estrógenos positivo, que eran notablemente más reducidas que las de las mujeres con cáncer de mama y receptor de estrógenos negativo y el de mujeres sanas^{16,20}. Los autores utilizan la expresión “hiperestrogenismo relativo” para definir la situación hormonal de las mujeres con bajos niveles de secreción de melatonina, sea cual sea la causa. Las mujeres postmenopáusicas que trabajan de noche tienen niveles elevados de estradiol sérico y un descenso significativo de la excreción urinaria de 6-sulfatoximelatonina (aMT6s), un metabolito de la melatonina que sirve como indicador de la secreción de la misma.

El acoplamiento entre el reloj celular y el control celular del ciclo es la clave para explicar la disrupción entre la cronodisrupción y el cáncer. En un reciente estudio, llevado a cabo por modelos de rata con injertos de tumor receptor de estrógenos +, MCF-7, la exposición alternante de horario luz/oscuridad, no solo aumentaba el grado de desarrollo de tumor, sino que también confería resistencia a la terapia con tamoxifeno, además del tratamiento quimioterápico con doxorubicina. Otro estudio demostró la relación entre el cáncer de mama y la susceptibilidad y polimorfismo en genes reguladores CLOCK, BMAL1, BMAL2 y NPAS2.

Como conclusión, la administración de 1-10 mg/día de melatonina a mujeres trabajadoras de turnos de noche se puede ver como una forma de adaptar el

cuerpo al trabajo nocturno, o disminuir el insomnio durante el día. Sin embargo, a pesar de la evidencia de los estudios epidemiológicos que apoyan el hecho del LAN en la carcinogénesis mamaria, el beneficio de la suplementación con melatonina en mujeres trabajadoras en turnos nocturnos no está todavía establecido para ser comprobado²⁰.

Modulación de la terapia con tamoxifeno.

En este ensayo, se evaluaron los efectos biológicos y clínicos de una terapia concomitante de MLT en mujeres con cáncer de mama metastásico, y su progresión respecto a la respuesta solo del TMX^{31,32}. El estudio incluyó a 14 pacientes con metástasis que no respondieron a la terapia sólo con TMX (n=3) o progresaron después de un periodo de enfermedad inicial estable (n=11). Se administró MLT oral a 20 mg-día por la noche. Se alcanzó una respuesta parcial en 4/14 pacientes (28,5%), en la duración de 8 meses. El tratamiento fue bien tolerado en todos los casos sin un aumento de la toxicidad, incluso la mayoría de las pacientes experimentaron un alivio de la ansiedad. Los niveles de IGF-1, un factor de crecimiento para el cáncer de mama, se redujeron significativamente con esta terapia, y este descenso fue significativamente mayor en pacientes con enfermedad estable o progresión. Además de esto, se vió un descenso en los niveles de prolactina que sugirió que la MLT podía amplificar la respuesta del TMX bloqueando la producción de factores importantes del crecimiento tumoral en el cáncer de mama. Sin embargo, hay que añadir que el descenso de IGF-1 pudo ser debido no solo a la MLT, sino también al TMX. En ese caso, la acción de la MLT en la secreción de IGF-1 puede explicar la potencial eficacia de la hormona pineal en pacientes con receptor de estrógenos negativo³². Obviamente, el pequeño número de pacientes incluidos en este estudio no nos permite definir conclusiones sobre el posible uso de MLT modulando la eficacia de la terapia endocrina en cáncer de mama. Sin embargo, la evidencia objetiva de una regression inducida por la terapia concomitante de MLT en contraposición a solo el uso de TMX, podría confirmar las propiedades oncostáticas de la MLT^{12,32}.

CONCLUSIONES:

1º Melatonina realiza acciones oncostáticas en tumores hormonodependientes, principalmente por sus propiedades antiestrogénicas, como su capacidad de modulador selectivo de receptores de estrógenos (SERM),

2º Melatonina posee además acción detoxificante en el tratamiento quimioterápico (cisplatino y doxorrubicina), radioprotector, inhibidor del estrés oxidativo gracias a la captación de radicales libres, mejora del sistema inmune, así como efectos tanto pro-apoptóticos como anti-apoptóticos.

3º Se ha demostrado que la melatonina puede frenar la progresión de las metástasis en líneas celulares del cáncer de mama, gracias a la expresión del gen KiSS1 o su capacidad como inhibidor de la angiogénesis.

4º A pesar de los efectos beneficiosos claramente demostrados de la melatonina, los ensayos clínicos realizados hasta el momento no han resultado del todo concluyentes, dada la escasa valorabilidad de las muestras, dados múltiples factores de confusión (escasa muestra, múltiples variables que interfieren en el resultado, escasa supervivencia de los pacientes, etc) que hacen difícil trasladar los resultados obtenidos *in vitro* o en muestras animales a la población general.

5º Por otro lado, dada la escasa toxicidad y los múltiples efectos beneficiosos que tiene esta molécula, tenemos por delante un extenso campo de investigación, que deja la puerta abierta para numerosos estudios en el futuro, y que prometen resultados muy esperanzadores.

BIBLIOGRAFÍA.

1. Guerrero, J., Carrillo Vico, A. and J. Lardone, P. (2007). La melatonina. *Investigación y Ciencia*, 30-8.
- 2- Ignacio Roa, Mariano del Sol. (2014). Morfología de la Glándula Pineal. *International Journal of Morphology*. 32 (2): 515-21.
3. Cajochen C., Kräuchi K., Wirz-Justice A. (2003). Role of melatonin in the regulation of human circadian rhythms and sleep. *J. Neuroendocrinol.* 15(4):432-7
4. Huicochea Castellanos, D., Gonzalez Balboa, D., Tovar Calderón, D., Olarte Casas, D. and Vazquez Lamadrid, D. (2009). Cancer de mama. *Anales de radiología México*, 1:117-26.
5. Morrow M, Burstein HJ, Harris JR. (2015) Malignant Tumors of the Breast. In: DeVita VT, Lawrence TS, Rosenberg SA, eds. *DeVita, Hellman, and Rosenberg's Cancer: Principles and Practice of Oncology* , 79.
6. Menéndez-Menéndez J, Martínez-Campa C. (2018). Melatonin: An Anti-Tumor Agent in Hormone Dependent Cancers. *International Journal of Endocrinology*; 1-20.
7. Kiefer, T., Ram, P., Yuan, L. and Hill, S. (2002). Melatonin Inhibits Estrogen Receptor Transactivación and cAMP levels in breast cancel cells. *Breast Cancel Research and Treatment*, pp.71:37-45
8. Liu R, Fu A, Hoffman AE, Zhu Y. (2013). Melatonin enhances DNA repair capacity possibly by affecting genes involved in DNA damage responsive pathways. *BMC Cell Biology*. 14: 1-6.
9. Reiter R.J., Tan R.X., Rosales S.A. et al. (2013). The universal nature, unequal distribution and antioxidant functions of melatonin and its derivatives. *Mini-Rev Med Chem*; 13:373-84.
10. Zhang H.M., Zhang Y. Melatonin: a well-documented antioxidant with conditional pro-oxidant actions. *J Pineal Res* 2014; 57:131-46.
11. Mediavilla D., Sánchez Barceló E.J., Tan D.X., Manchester L., Reiter R.J. (2010). Basic mechanism involved in the anti-cancer effects of Melatonin. *Curr. Med. Chem.* 17: 4462-81.
12. Reiter, R., Tan, D., Sainz, R., Mayo, J. and Lopez-Burillo, S. (2002). Melatonin: reducing the toxicity and increasing the efficacy of drugs. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, pp.54:1299-321.

13. Turjanski, Adrián G.. (2003). Interacción de la melatonina con radicales libres. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 14-17
14. Reiter R, Rosales-Corral S, Tan D, Acuna-Castroviejo D, Quin L, Yang S et al. (2017). Melatonin, a Full Service Anti-Cancer Agent: Inhibition of Initiation, Progression and Metastasis. *International journal of Molecular Sciences*.18, 843.
15. Alonso-González C, González A, Martínez-Campa C, Menéndez- Menéndez J, Gómez- Arozamena, García Vidal A, Cos S. (2015). Melatonin enhancement of the radiosensibility of human breast cancer cells is associated with the modulation of protein involved in estrogen biosynthesis. *Cancer Lett*; 370: 145-52.
16. Eva S. Schernhammer, Francine Laden, Frank E. Speizer, Walter C. Willett, David J. Hunter, Ichiro Kawachi, Graham A. Colditz. (2001). Rotating Night Shifts and Risk of Breast Cancer in Women Participating in the Nurses'Health Study. *Journal of the National Cancer Institute*. 93, 20.
17. Del Rio B., García-Pedrero J.M., Martínez-Campa C., Zuazua P., Lazo P.S., Ramos S. (2004). Melatonin: an endogenous specific inhibitor of estrogen receptor α via calmodulin. *J Biol Chem*. 279: 38294-302.
18. Grant, S., Melan, M., J. Latimer, J. and A. Witt-Enderby, P. (2015). Melatonin and breast cancer: cellular mechanisms, clinical studies and future perspectives. *National institute of Health*, p.11.
19. E.J. Sanchez-Barcelo, M.D. Mediavilla, D.X. Tan and R.J. Reiter. (2010). Clinical Uses of Melatonin: Evaluation of Human Trials. *Current Medicin Chemistry*. 2070-95.
20. Alicia González-González, María Dolores Mediavilla and Emilio J. Sánchez Barceló. 6 February, (2018). Melatonin: A molecule for Reducing Breast Cancer Risk. *Molecules*. 23, 336.
21. Strasser A, O'Connor L, Ditsch V.M.(2000). Apoptosis signaling. *Ann Rev Biochem*; 69: 217-45.
22. Bizarri M., Proietti S, Cucina A. et al. (2013) Molecular mechanisms of the pro-apoptotic actions of melatonin in cancer: a review. *Expert Opin Ther Targets*; 17: 1483-96.
23. Wu, S.M.; Lin, W.Y.; Shen, C.C.; Pan, H.C.; Keh-Bin, W.; Chen, Y.C.; Jan, Y.J.; Lai, D.W.; Tang, S.C.; Tien, H.R.; (2016) et al. Melatonin set out to ER stress signaling thwarts epithelial mesenchymal transition and peritoneal dissemination via calpain-mediated C/EBP β and NF- κ B cleavage. *J. Pineal Res.*, 60, 142-54.
24. Kim T, Cho S. (2017) Melatonin-induced KiSS1 expression inhibits triple-negative breast cancer cell invasiveness. *Oncology Letters*;(6434): 368-701.

25. Miller S, Pandi P, Esquifino A, Cardinali D, Maestroni G. (2005) The role of melatonin in immune-enhancement: potential application in cancer. Blackwell Publishing Ltd.;87; 81-7.
26. Jardim-Perassi B.V., Arbab A.S., Ferreira L.C., Borin T.F., Varma N.R., Iskander A.S., Shankar A., Ali M.M., de Campos Zuccari D.A. (2014). Effect of melatonin on tumor growth and angiogenesis in xenograft model of breast cancer. *PLoS One*. 9(1): 85311.
27. Schernhammer E, Globbie-Huerder A, Gantman K, Savole J, Scheib R, Parker L et al. (2012) A randomized controlled trial of oral melatonin supplementation and breast cancer biomarkers. Department of Health and Human Services: 609-16.
28. González-González, A., Dolores Meidavilla, M. and Sánchez- Barceló, E. (2018). Melatonin: A Molecule for Reducing Breast Cancer Risk. *Molecules*, pp.1-21.
29. Reiter RJ, Tan DX, Osuna C, Gitto E. (2000) Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress. *J Biomed Sci*; 7: 444-58.
30. Regelson W, Pierpaoli W. (1987) Melatonin: a rediscovered antitumor hormone? Its relation to surface receptors; sex steroid metabolism, immunologic response, and chronobiologic factors in tumor growth and therapy. *Cancer Invest*;5(4): 379-85.
31. Lissoni P. (2007) Biochemotherapy with standard chemotherapies plus the pineal hormone melatonin in the treatment of advanced solid neoplasms. *Pathol Biol*; 55:201-04
32. P. Lissoni, S. Barni, S. Meregalli, V. Fossati, M. Cazzaniga, D. Esposti and G. Tancini. November, (1995). 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*. 71, 854-56.