

**Universidad de Oviedo**

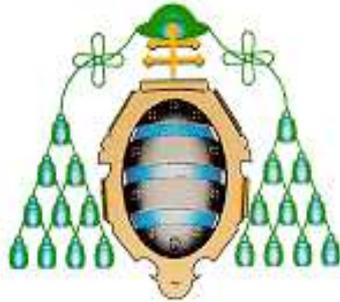
**Instituto Universitario de Oncología del  
Principado de Asturias**

**“Acción citotóxica de la melatonina en tumores  
hematológicos: Caracterización de los  
mecanismos de muerte”**

**Sara Casado Zapico  
16 de diciembre de 2011**

**Tesis Doctoral  
(que opta al grado de Doctor por la Universidad de Oviedo)**





**Universidad de Oviedo**

**Instituto Universitario de Oncología del  
Principado de Asturias**

**“Acción citotóxica de la melatonina en tumores  
hematológicos: Caracterización de los  
mecanismos de muerte”**

**Tesis Doctoral  
(que opta al grado de Doctor por la Universidad de Oviedo)**

Autora

**Sara Casado Zapico**

Directora

**Dr. María del Carmen  
Rodríguez Sánchez**

Director

**Dr. Isaac Antolín  
González**



## ÍNDICE

<b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>3-40</b>
1. TUMORES HEMATOLÓGICOS.....	3
1.1. Definición y aspectos históricos.....	3
1.2. Leucemia Mieloide Aguda.....	5
1.3. Leucemia Mieloide Crónica.....	7
1.4. Leucemia Linfoide Aguda.....	9
1.5. Leucemia Linfoide Crónica.....	11
1.6. Linfoma de Burkitt Humano.....	13
1.7. Tratamiento de Tumores Hematológicos.....	14
1.8. Pronóstico.....	17
2. LA APOPTOSIS.....	18
2.1. Definición.....	18
2.2. Vías de inducción de apoptosis.....	19
2.2.1. Vía extrínseca.....	20
2.2.2. Vía intrínseca.....	21
2.2.3. Vía de la perforina/granzima.....	22
2.2.4. La vía efectora.....	23
2.3. Papel del estrés oxidativo en la señalización apoptótica.....	25
2.4. Apoptosis y Cáncer.....	27
2.4.1. Mecanismos de resistencia relacionados con los receptores de muerte.....	27
2.4.2. Mecanismos de resistencia relacionados con las caspasas regu- ladoras.....	27
2.4.3. Mecanismos de resistencia relacionados con la vía intrínseca de la apoptosis.....	28
2.4.4. Mecanismos de resistencia relacionados con las proteínas regu- ladoras de la apoptosis.....	28
3. LA MELATONINA.....	31
3.1. Introducción.....	31

3.2. Mecanismos de acción.....	32
3.2.1 Mediados por el receptor.....	32
3.2.2. Efectos no mediados por la unión al receptor.....	33
3.3. Capacidad antioxidante de la Melatonina.....	35
3.4. Acción prooxidante de la Melatonina.....	36
3.5. Capacidad inmunomoduladora.....	36
3.6. Acción antitumoral.....	37
3.6.1. Efectos antiproliferativos.....	37
3.6.2. Efectos citotóxicos.....	39
<b>II. OBJETIVOS .....</b>	<b>41-43</b>
<b>III. MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>47-75</b>
1. MATERIALES.....	47
2. CULTIVOS CELULARES.....	48
3. AISLAMIENTO DE CÉLULAS MONONUCLEADAS.....	49
4. TRATAMIENTOS.....	50
5. ENSAYOS DE VIABILIDAD CELULAR.....	51
5.1. Ensayos de reducción de MTT.....	51
5.2. Determinación de la LDH.....	51
6. ENSAYOS MORFOLÓGICOS MEDIANTE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN.....	53
7. ESTUDIOS DE CITOMETRÍA DE FLUJO.....	54
7.1. Determinación de apoptosis: ensayo de adhesión de la anexina V.....	54
7.2. Cuantificación de los niveles de peróxidos intracelulares.....	56
8. MEDIDAS DE ACTIVIDADES CASPASAS.....	59
8.1. Ensayo de la actividad Caspasa-3.....	59
8.2. Ensayo de la actividad Caspasa-8.....	61
8.3. Ensayo de la actividad Caspasa-9.....	62
9. WESTERN BLOT.....	63
9.1. Extracción de proteínas.....	63
9.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) y trans- ferencia de las proteínas.....	64



9.3. Incubación con los anticuerpos.....	65
9.4. Detección de las señales.....	66
9.5. Rehibridación.....	66
10. ESTUDIOS DE EXPRESIÓN GÉNICA.....	66
10.1. Extracción de ARN.....	66
10.2. Síntesis de ADNc (Retrotranscripción).....	67
10.3. PCR a tiempo real.....	68
10.4. RT-MLPA.....	69
11. EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS COMBINADOS DE LOS FÁRMACOS.....	73
12. EXPERIMENTO IN VIVO.....	74
13. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	75
<b>IV. RESULTADOS.....</b>	<b>77-137</b>
1. LA MELATONINA INDUCE MUERTE EN LAS LÍNEAS CELULARES DERIVADAS DE TUMORES HEMATOLÓGI- COS.....	79
1.1. La melatonina produce una disminución en el número de cé- lulas dependiente de concentración y de tiempo.....	79
1.2. La reducción en el número de células es debida a un efecto citotóxico.....	81
1.3. La muerte celular inducida por la melatonina es de tipo apop- tótico.....	83
2. VÍAS APOPTÓTICAS IMPLICADAS EN LA ACCIÓN DE LA MELATONINA EN LAS CÉLULAS DERIVADAS DE TUMO- RES HEMATOLÓGICOS.....	86
2.1. Estudio de la activación de caspasas efectoras.....	86
2.2. Análisis de las vías apoptóticas implicadas en la acción de la melatonina.....	88
3. MECANISMOS DE ACCIÓN DE LA MELATONINA.....	91
3.1. Implicación del estrés oxidativo intracelular en la señalización de la vía extrínseca de la apoptosis.....	91
3.2. La melatonina induce la activación de los receptores de muerte	

y sus ligandos.....	93
3.3. La activación de Akt por la melatonina está relacionada con la regulación de la vía extrínseca de la apoptosis.....	97
3.4. En el efecto proapoptótico de la melatonina está implicada la Glucógeno sintasa 3 quinasa B, una de las dianas de Akt.....	101
4. EFECTO SINÉRGICO DE LA COMBINACIÓN DE MELATONINA Y LOS QUIMIOTERÁPICOS EN LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA.....	106
4.1. La melatonina y los quimioterápicos producen una disminución en el número de células.....	106
4.2. Análisis del efecto combinado de la melatonina y los quimioterápicos sobre la viabilidad celular.....	112
4.3. Análisis de la citotoxicidad inducida por la combinación de Ifosfamida y melatonina.....	117
4.4. Estudio de la actividad Caspasa-3.....	119
4.5. Estudio de las vías apoptóticas implicadas en el efecto sinérgico de la melatonina con la ifosfamida.....	121
4.6. El efecto sinérgico de la melatonina y la ifosfamida se manifiesta en el incremento de expresión de los receptores de muerte y sus ligandos.....	124
5. EXPERIMENTO IN VIVO.....	128
6. EFECTO DE LA MELATONINA EN CÉLULAS DERIVADAS DE PACIENTES.....	131
6.1. La melatonina produce muerte celular en células derivadas de pacientes con tumores hematológicos.....	131
6.2. La melatonina produce un incremento en la expresión de FasR y FasL en las células de pacientes con Leucemia Mieloide Aguda.....	134
6.3. El tratamiento con melatonina produce un aumento en la expresión de genes proapoptóticos en células de pacientes con leucemia mieloide aguda.....	136
<b>V. DISCUSIÓN.....</b>	<b>141-164</b>
<b>VI. SUMMARY.....</b>	<b>165-168</b>



<b>VII. CONCLUSIONS.....</b>	<b>169-171</b>
<b>VIII. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>.173-215</b>
<b>IX. PUBLICACIONES.....</b>	<b>216</b>

# **I. INTRODUCCIÓN**



# 1. TUMORES HEMATOLÓGICOS

## **1.1. DEFINICIÓN Y ASPECTOS HISTÓRICOS**

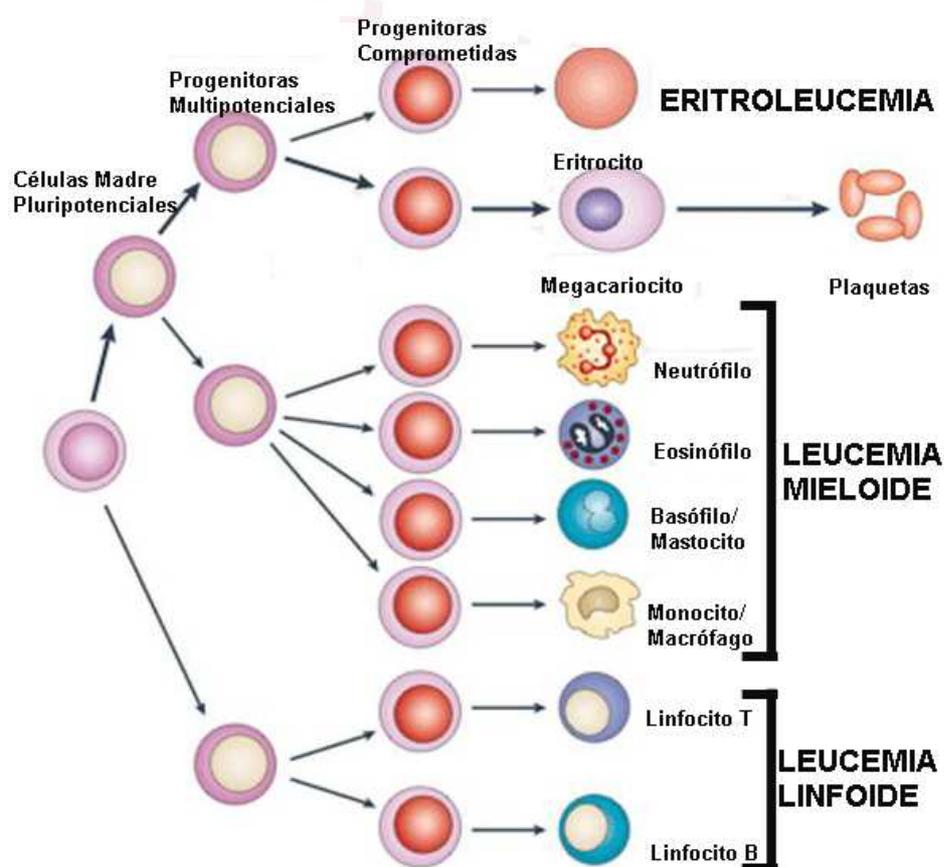
Los tumores hematológicos comprenden un grupo heterogéneo de enfermedades, originadas a partir de las células de la médula ósea y del sistema linfático. La clasificación se basa en una combinación de características clínicas, morfológicas, inmunofenotípicas y genéticas, dividiéndolas inicialmente en leucemia, linfoma y neoplasia de células plasmáticas (Rodríguez Abreu y cols, 2007; Vardiman, 2010).

En 1832, Thomas Hodgkin describió el primer tumor hematológico en la literatura, que treinta y tres años después, fue descrito en los nódulos linfáticos y en el bazo por Samuel Wilks, denominándolo “enfermedad de Hodgkin” (Kaplan HS, 1980). Los primeros casos de leucemia fueron descritos por John Hughes Bennett y Rudolph Virchow en 1845 (Pillar GJ, 1997). Estos autores observaron una acumulación de leucocitos en la sangre, que fue considerado su característica diferencial. La primera descripción del mieloma data de 1844, y fue realizada por los Doctores William Macintyre, Thomas Watson y John Dalrymple. Posteriormente, se describieron las características de estas células tumorales, que se identificaron como células plasmáticas. Más tarde, Henry Bence Jones analizó la orina del paciente, describiendo una reacción de precipitación en la misma e identificando cadenas ligeras monoclonales, conocidas actualmente como proteína de Bence Jones (Kyle, 1994). El término “mieloma múltiple” fue atribuido al patólogo ruso von Rustizky en 1873, basándose en las observaciones de tumores múltiples en la médula ósea y en el hueso. Sin embargo, hasta el descubrimiento de los rayos X por Roentgen no se identificaron las lesiones líticas en los huesos. Posteriormente el desarrollo de técnicas de estudio de proteínas plasmáticas permitiría su asociación con el mieloma (Putnam, 1983).

Durante los 120 años transcurridos entre 1830 y 1950, se describieron y clasificaron los distintos subtipos de tumores hematológicos. Así, la leucemia, según su origen se divide en mieloide y linfoide (Figura 1), y a su vez, según la presentación de la enfermedad se clasifica en aguda o crónica. Aunque los linfomas son más heterogéneos, una primera

clasificación los divide en linfoma del tipo Hodgkin y linfomas no Hodgkin. Sin embargo, la clasificación realizada por la OMS reconoce 3 categorías principales de neoplasias linfoides basándose en la morfología y el linaje celular: neoplasia de células B, neoplasias de células T y células asesinas naturales (Del inglés, NK, natural killer), y linfoma de Hodgkin. Tanto los linfomas como las leucemias linfoides caen bajo esta clasificación porque tanto las fases sólidas como las circulantes se encuentran en muchas neoplasias linfoides y la distinción entre ambos es artificial. Por ejemplo, la leucemia linfocítica crónica de células B y el linfoma linfocítico pequeño de células B no son más que diferentes manifestaciones de la misma neoplasia como lo son los linfomas linfoblásticos y las leucemias linfocíticas agudas. Dentro de las categorías de células B y células T, se reconocen 2 subdivisiones: neoplasias precursoras que corresponden a los estadios más tempranos de diferenciación y neoplasias maduras diferenciadas.

Debido a la gran variedad de tumores hematológicos, en este trabajo se describirán los tipos más comunes encontrados en la clínica.



**Figura 1.** Clasificación de la leucemia según las células progenitoras de las que deriva.



## **1.2. LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA**

### **1.2.1. Descripción y sintomatología**

La Leucemia Mieloide Aguda (LMA), representa un grupo de desórdenes hematopoiéticos en los cuales se produce un fallo en la diferenciación y proliferación incontrolada de los precursores mieloides, induciendo una acumulación de células no funcionales llamadas mieloblastos (Stone y cols, 2004). Debido a este fallo en la médula ósea, los pacientes con esta enfermedad sufren de neutropenia, anemia y trombocitopenia, manifestándose en fatiga, hemorragias o producción de hematomas, fiebre e infecciones (Tallman y cols, 2005; Jabbour y cols, 2006).

### **1.2.2. Epidemiología**

Es una enfermedad principalmente de adultos, afectando a personas con una media de edad de 64 años. Constituye el 30% de las leucemias en adultos, y el 0,6% de todos los cánceres (Rodríguez-Abreu, 2007). Su incidencia es un poco mayor en hombres que en mujeres, siendo también mayor en caucásicos (Deschler y Lübbert, 2006).

### **1.2.3. Factores de riesgo**

Los factores de riesgo de la enfermedad incluyen la edad, antecedentes de otra enfermedad hematológica, desórdenes genéticos, exposiciones a radiaciones, agentes químicos, virus y quimioterapia previa (Pogoda JM y cols, 2002; Pui, 1995; Aquino VM, 2002). También puede ser secundaria a la progresión de desórdenes mielodisplásicos o a desórdenes crónicos de la médula ósea, como la policitemia vera, la leucemia mieloide crónica, trombocitosis primaria. Entre todos estos factores, la adquisición de anomalías cromosómicas clonales, se encuentran entre un 50-80% de los nuevos casos de Leucemia Mieloide Aguda diagnosticados, con un riesgo de incidencia alto en pacientes con leucemia secundaria o edad adulta (Heim S y cols, 1992; Moorman y cols, 2001). Múltiples estudios han demostrado la importancia de estas anormalidades genéticas como un factor de predicción de la mejoría.

### 1.2.4. Clasificación

Existen 8 subtipos de Leucemia Mieloide Aguda según la clasificación Franco-Estadounidense-Británica (FAB), descritos en la Tabla 1. Sin embargo, la Organización Mundial de la Salud (OMS), las clasifica en 5 subtipos (Tabla 2).

<b>Tipo</b>	<b>Características</b>
M0	Leucemia mieloblástica aguda sin diferenciación localizada
M1	Leucemia mieloblástica aguda sin maduración
M2	Leucemia mieloblástica aguda con maduración
M3	Leucemia promielocítica aguda (con translocación t(15;17))
M4	Leucemia mielomonocítica aguda (LMMA)
M4eo	Leucemia mielomonocítica aguda con eosinofilia en médula ósea
M5	Leucemia monocítica aguda (LMoA)
M5a	LMoA sin diferenciación (monoblástica)
M5b	LMoA con diferenciación (monocítica)
M6	Eritroleucemia aguda; precursoras de los glóbulos rojos
M7	Leucemia megacariocítica aguda

**Tabla 1.** Clasificación de la Leucemia Mieloide Aguda según la FAB. LMoA, leucemia monocítica aguda.

<b>Tipo</b>	<b>Características</b>
LMA con anomalías genéticas características	t(8;21); inv(16); t(15;17)
LMA con displasia multilinaje	Síndrome mielodisplásico o mieloproliferativo previo
LMA y SMD asociados al tratamiento	Secundaria a la quimioterapia o radiaciones
LMA no categorizada	Subtipos no incluidos en ninguna clasificación
Leucemias agudas de linaje ambiguo	Fenotipo mixto, con células mieloides y linfoides

**Tabla 2.** Clasificación de la Leucemia Mieloide Aguda según la OMS. LMA, leucemia mieloide aguda; SMD, síndrome mielodisplásico.



### **1.3. LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA**

#### **1.3.1. Descripción y sintomatología**

La Leucemia Mieloide Crónica es un desorden mieloproliferativo clonal de células madre pluripotentes, que fue descrito por primera vez por John Hughes Bennett en 1845 (Abramson y cols, 1977). Fue la primera neoplasia asociada con una anomalía cromosómica, que se denominó cromosoma Philadelphia, que más tarde se definiría como resultado de la translocación cromosómica t(9;22), que implica a los genes ABL1 (Abelson), en el cromosoma 9 y BCR (Del inglés, breakpoint cluster region) en el cromosoma 22. El descubrimiento de la patogénesis molecular de esta enfermedad se dirigió a la investigación de terapias diana contra el producto de esta translocación, convirtiendo el tratamiento de la Leucemia Mieloide Crónica en pionero en este tipo de terapias (Novell y cols, 1960; Rowley, 1973; Bartram y cols, 1983; Groffen y cols, 1984; Goldman y Melo, 2001; Kantarjian y cols, 2002; O'Brien y cols, 2003; Druker y cols, 2006).

La Leucemia Mieloide Crónica se presenta en tres fases: la fase crónica (CP, del inglés, chronic phase), la fase acelerada (AP, del inglés, accelerate phase) y la fase blástica (BP, del inglés, blast phase). Casi el 90% de los pacientes con Leucemia Mieloide Crónica son diagnosticados en la fase crónica, aunque inicialmente tienen un sistema inmune competente y permanecen asintomáticos durante largos periodos de tiempo. Cuando los síntomas aparecen debido a la expansión de las células malignas, los pacientes presentan malestar, pérdida de peso y esplenomegalia (Kantarjian y cols, 1985; Quintás-Cardama y cols, 2006). La leucocitosis es una característica común de la fase crónica, que a veces puede llevar a síntomas como la hiperviscosidad, la hemorragia retinal, el priapismo, accidentes cerebrovasculares, acúfenos, confusión y estupor. Tras una media de 3 a 5 años, los pacientes que no son tratados pasan inevitablemente a la fase acelerada, que se caracteriza por una parada en la maduración. Esta fase dura de 6 a 18 meses, pasando a la fase blástica, una forma agresiva de leucemia aguda, en la que los pacientes experimentan signos y síntomas relacionados con la diseminación del tumor, incluyendo la leucocitosis, fiebre, sudores nocturnos, anorexia, malestar, pérdida de peso, infartos esplénicos debido a la esplenomegalia masiva, dolor óseo e incremento del riesgo de infecciones y

hemorragias. Esta fase es altamente refractaria a la quimioterapia y es rápidamente fatal (Quintás-Cardama y cols, 2006).

### 1.3.2. Epidemiología

La Leucemia Mieloide Crónica es una enfermedad rara. La mayoría de los casos ocurren en adultos con una media de edad de 65 años. Sólo representa el 2-3% de todas las leucemias diagnosticadas en pacientes menores de 20 años, aunque la incidencia se incrementa con la edad. Es más común en hombres y en caucásicos (Jemal A y cols, 2004; Deininger y cols, 2000).

### 1.3.3. Factores de riesgo

No se conoce un componente hereditario, familiar, geográfico, étnico o económico asociado con la Leucemia Mieloide Crónica. En muchos pacientes, el factor responsable de la inducción del cromosoma Philadelphia es desconocido, aunque se ha visto incrementada su frecuencia en individuos expuestos a la bomba atómica en Japón en 1945, en radiólogos, y en pacientes con espondilitis anquilosante tratados con radioterapia (Bizzozero y cols, 1967).

Un diagnóstico definitivo de la Leucemia Mieloide Crónica se basa en la citogenética para la identificación de la translocación  $t(9;22)(q34.1;q11.21)$  y/o el gen híbrido BCR-ABL1, que es patognomónico de esta enfermedad (Novell y cols, 1960; Rowley, 1973). El cromosoma Philadelphia es detectado en 95% de los pacientes con Leucemia Mieloide Crónica y en el 5% de los niños y 15% al 30% de los adultos con leucemia linfoblástica aguda. Además, aproximadamente un 2% de los pacientes con Leucemia Mieloide Aguda pueden presentar esta anomalía citogenética (Kurzrock y cols, 1988). Un 5-10% de los pacientes con características clínicas de Leucemia Mieloide Crónica no expresa el cromosoma Philadelphia, denominándose Leucemia Mieloide Crónica atípica, y cuyo pronóstico y tratamiento es distinto.



## **1.4. LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA**

### **1.4.1. Descripción y sintomatología**

La leucemia linfóide aguda es un grupo heterogéneo de desórdenes linfoides como resultado de una proliferación y expansión monoclonal incontrolada de células linfoides inmaduras en la médula ósea, sangre y otros órganos (Jabbour y cols, 2005). Los síntomas de la enfermedad son debidos a la expansión de las células leucémicas en la médula ósea, sangre periférica, y zonas extramedulares. Estos síntomas son fatiga, falta de energía, disnea, mareo, hemorragia, hematomas e infecciones. El dolor en las extremidades y las articulaciones puede presentarse en niños. El examen físico revela palidez, equimosis o petequias (Faderl y cols, 2003). La linfadenopatía y hepatoesplenomegalia son síntomas raros, que se observan en el 20% de los pacientes, con alta incidencia en los pacientes con los subtipos de células T y de células B maduras (Jabbour y cols, 2005). La afectación del sistema nervioso central (neuropatías craneales, infiltración meníngea) es más común en algunos subtipos como el de células B maduras y se observa en el 5-8% de los pacientes (Cortes, 2001).

### **1.4.2. Epidemiología**

La leucemia linfóide aguda no es común en adultos, en los que representa el 15% de las leucemias, pero es la forma más común de leucemia en personas menores de 20 años, constituyendo el 80% de todas las leucemias agudas y el 30% de todos los cánceres en niños (Rodríguez-Abreu y cols, 2007). Es más común en hombres y en caucásicos (Faderl y cols, 2003).

### **1.4.3. Factores de riesgo**

En muchos pacientes, la causa de la leucemia linfóide aguda es desconocida (Bunin, 2004; Lightfoot y Roman, 2004). Aunque se ha observado que existe una posible predisposición genética. Pacientes con trisomía 21, el síndrome de Klinefelter, y enfermedades hereditarias con fragilidad cromosómica excesiva como anemia de Fanconi, Bloom síndrome, y ataxia-telangiectasia tienen un alto riesgo de desarrollar leucemia linfóide aguda (Metens y cols, 1998; Chessells y cols, 2001; Toledano y Lange, 1980; Shaw y cols, 1992). Se ha observado un incremento de los casos de leucemia linfóide

aguda tras explosiones de bombas atómicas, el accidente de Chernóbil y la exposición a radioterapia terapéutica (Faderl y cols, 2003). En la leucemia pediátrica, datos recientes sugieren que las translocaciones cromosómica y los clones preleucémicos se producen en el útero durante la hematopoyesis fetal, ocurriendo las segundas alteraciones genéticas tras el nacimiento (Greaves, 2005). También se ha asociado el virus linfotrófico de células T humano tipo I con la leucemia de células T adulta, y el virus de Epstein-Barr con la leucemia linfocítica aguda de células, además del virus de inmunodeficiencia humano (VIH) con los desórdenes linfoproliferativos (Greaves y Alexander, 1993; Mahieux y Gessain, 2003; Lombardi y cols, 1987).

El inmunofenotipo es importante en el pronóstico de la enfermedad. Los blastos de leucemia linfocítica aguda se dividen en los siguientes tipos: precursor de células B; células B maduras, y células T (Ben y cols, 1995; Ludwig y cols, 1994). Las anomalías citogenéticas moleculares ocurren en el 80% de los niños y 60-70% de los adultos (Faderl y cols, 1998). El cromosoma Philadelphia, con una frecuencia de 15-30%, es la anomalía citogenética más común en el adulto (Faderl y cols, 1998). Una de las anomalías cromosómicas más comunes en leucemia linfocítica aguda en niños (85%) y un 3-8% en adultos es t(4;11)(q21;23) (Faderl y cols, 2003). Pero la translocación más común en leucemia linfocítica aguda de tipo B es t(12;21)(p13;q22), que da lugar al gen TEL-AML1, esta translocación se ha identificado en un 30% de los niños con LLA (Raynaud S y cols, 1996; Romana y cols, 1995). La expresión de esta proteína está asociada con un pronóstico excelente, con un rango de supervivencia libre de enfermedad del 90%. Además este pronóstico favorable es independiente de la edad y el recuento leucocítico y es consistente en pacientes con distintos protocolos terapéuticos. La expresión de TEL-AML1 se identifica en pacientes con LLA pre-B y pueden ser candidatos a recibir una terapia intensiva menor (Rubnitz y cols, 1997; Rubnitz y cols, 1999).

#### 1.4.4. Clasificación

El diagnóstico de la leucemia linfocítica aguda se basa en la morfología, determinación del inmunofenotipo y la identificación de anomalías citogenéticas-moleculares. Respecto a la morfología, el Grupo Francés-Americano-Británico (FAB, de sus siglas en inglés), describe tres tipos de leucemia linfocítica aguda (L1, L2; L3), que se distinguen por el tamaño celular, la cantidad de citoplasma, la prominencia del nucleolo, el



grado de basofilia del citoplasma y la vacuolización (Tabla 3). Sin embargo, la Organización Mundial de la Salud propone unas nuevas guías diagnósticas para este tipo de enfermedades. También sugiere abandonar la distinción entre L1, L2 y L3, ya que L1 y L2 no predicen el inmunofenotipo, las aberraciones cromosómicas o el comportamiento clínico (Faderl y cols, 2003; Jabbour y cols, 2005; Foa y Vitale, 2002).

Leucemia linfoblástica precursora aguda de células B	En la mayoría de los casos infantiles, las células involucradas tienden a ser precursores de linfocitos B, que en sangre periférica dan origen a células pequeñas denominadas L1
Leucemia linfoblástica precursora aguda de células T	En la mayoría de los casos adultos, las células involucradas tienden a ser precursores de linfocitos T y producen en sangre periférica células relativamente grandes denominadas L2
L3	Linfoblastos idénticos a las células del linforma de Burkitt

**Tabla 3.** Clasificación de la Leucemia Linfoide Aguda.

## **1.5. LEUCEMIA LINFOIDE CRÓNICA**

### **1.5.1. Descripción y sintomatología**

La Leucemia Linfoide Crónica (LLC), es una enfermedad hematológica caracterizada por la acumulación de linfocitos B CD5<sup>+</sup> en sangre periférica, médula ósea, nódulos linfoides y bazo (Ghia y cols, 2007). En un 25% de los pacientes la enfermedad es asintomática, siendo esta fase de duración variable. En las primeras fases de la enfermedad, los pacientes presentan linfocitosis, una ligera linfadenopatía de los nódulos cervicales, supraclaviculares y/o auxiliares y esplenomegalia. También es común en estas primeras fases que entre un 25-50% de los pacientes presenten anemia y trombocitopenia. La invasión cutánea se produce en el 5% de los pacientes en forma de infiltraciones nodulares y difusas en la piel, eritroderma, dermatitis exfoliativa, e infecciones secundarias en la piel. Con la progresión de la enfermedad, se infiltra en los órganos produciendo adenopatía con

esplenomegalia, hiperesplenismo, y citopenias periféricas. Estos pacientes presentan síntomas de tipo B como fiebre, pérdida de peso y sudores nocturnos. La médula ósea tiene una infiltración mayor por las células neoplásicas, produciendo una anemia severa, trombocitopenia y neutropenia debido a que las células normales son sustituidas por células tumorales. Como consecuencia de la trombocitopenia se producen hemorragias, que comprometen la hemostasis. También se ve comprometida la actividad inmunológica. Un 50% de los pacientes presentan hipogammaglobulinemia, lo cual induce una susceptibilidad mayor a las infecciones, encontrándose en el tracto respiratorio, urinario y piel. Se produce enfermedad autoinmune en el 25% de los pacientes (Inamdar y Bueso Ramos, 2007).

### 1.5.2. Epidemiología

La Leucemia Linfocítica Crónica es una enfermedad de adultos, el 90% de los casos ocurren después de los 50 años, con una media de edad de 70 años al diagnóstico. Es la leucemia más común en adultos en países occidentales, no siendo común en Asia. En Estados Unidos es el tipo más común de leucemia en hombres caucásicos adultos (Rodríguez-Abreu y cols, 2007).

### 1.5.3. Factores de riesgo

La enfermedad no se produce debido a factores ambientales como radiación ionizante, componentes químicos, no siendo más frecuente en pacientes inmunodeprimidos. Sin embargo, se ha observado que existe una cierta predisposición genética y familiar, que parece ser relevante en la patogénesis de la enfermedad (Kalil y Cheson, 1999).



## **1.6. LINFOMA DE BURKITT HUMANO**

### **1.6.1. Descripción y sintomatología**

Fue descrito por Dennis Burkitt en 1958. El linfoma de Burkitt es un linfoma no-Hodgkin altamente agresivo, que usualmente se presenta en zonas extranodales o como leucemia aguda (Lukes y cols, 1975). Los síntomas pueden incluir dolor abdominal, náuseas, vómitos, obstrucción intestinal, hemorragias gastrointestinales, o síndromes que mimetizan la apendicitis aguda. Normalmente se ven afectados el intestino o los nódulos linfáticos abdominales, aunque también pueden verse afectados los riñones, el páncreas, el hígado, el bazo, mamas o el ovario. También se observa afectación de la médula ósea y del Sistema Nervioso Central en un 30-38% y 13-17% de los casos de adultos (Blum y cols, 2006).

### **1.6.2. Epidemiología y factores de riesgo**

Se observan tres variantes clínicas distintas de Linfoma de Burkitt: endémica, esporádica e inmunodeficiente. Sin embargo, sus características tanto clínicas como genéticas son similares. La forma endémica se observa en África ecuatorial, asociada al virus de Epstein Barr en la mayoría de los casos, en niños de edades entre 4 a 7 años, con afectación de la mandíbula y los riñones, aunque también se observa en el íleon, ovario y mama. La forma esporádica no tiene una distribución geográfica específica, y representa entre el 1-2% de los linfomas en adultos y hasta el 40% de los linfomas en niños en Estados Unidos y Europa occidental (Blum y cols, 2004). El subtipo inmunodeficiente, se observa en personas con el virus de inmunodeficiencia humana (VIH), pero también en receptores de transplantes e individuos con inmunodeficiencia congénita (Ferry, 2006). Los pacientes adultos con los subtipos esporádicos o inmunodeficiente, típicamente presentan enfermedad extranodal, afectando principalmente al abdomen.

El 80% de los casos de linfoma de Burkitt portan la translocación t(8;14), produciendo la yuxtaposición del gen c-myc en el cromosoma 8 con los elementos potenciadores de IgH en el cromosoma 14, que inducen el mRNA de c-Myc y la producción de proteínas que intervienen en la regulación del ciclo celular, apoptosis, crecimiento celular, adhesión y diferenciación (Hecht y Aster, 2000). En el 20% de los

casos, las translocaciones ocurren entre los cromosomas 2 y 8, o los cromosomas 8 y 22, entre el c-myc y las cadenas ligeras  $\kappa$  o  $\lambda$  (Ferry, 2006).

### **1.7. TRATAMIENTO DE TUMORES HEMATOLÓGICOS**

A pesar de las diferencias entre los distintos tipos de tumores hematológicos, el nexo común entre todos ellos es el abordaje terapéutico, que se divide principalmente en tres fases:

- **Terapia de inducción**, con la cual se intenta eliminar de la médula ósea las células malignas, permitiendo la repoblación de células normales. En el caso de la **leucemia mieloide aguda**, se utiliza la combinación de citarabina con una antraciclina como daunorrubicina o idarrubicina. Para mejorarlo, en ocasiones se combina este tratamiento con etopósido, fludarabina o topotecan. En pacientes con leucemia promielocítica aguda se tratan con ácido all-trans retinóico (ATRA) y una antraciclina. (Dillman y cols, 1990; Yates y cols, 1982; Rowe y cols, 1997; Bishop y cols, 1990; Hann y cols, 1997; Estey y cols, 2001; Stone y cols, 2004). En pacientes con **leucemia linfóide aguda**, se usan tres quimioterápicos vincristina, prednisona/dexametasona más L-aspararginasa con terapia intratecal. Este protocolo induce una remisión completa en más del 95% de los pacientes durante aproximadamente 18 meses. En pacientes con un riesgo mayor de fallo en el tratamiento se pueden tratar con la quimioterapia anterior a mayor intensidad y la adición de una antraciclina. Sin embargo, la mitad de los pacientes pueden morir debido a la toxicidad del tratamiento (Pui y cols, 2006). Una terapia similar se utiliza en pacientes con **linfoma de Burkitt**, usando una combinación de ciclofosfamida, vincristina, metotrexato, doxorubicina y citarabina, que elevado a dos años la supervivencia libre de enfermedad en pacientes pediátricos hasta en un 75-89% de los casos (Murphy y cols, 1986; Patte y cols, 1991; Schwenn y cols, 1991; Bowman y cols, 1996; Reiter y cols, 1992; Magrath y cols, 1996). Sin embargo, si la enfermedad afecta a la médula ósea o al sistema nervioso central, esta combinación es menos efectiva. Muchos estudios sugieren que el tratamiento con quimioterapia intensiva y adecuada profilaxis del sistema nervioso central puede ser curativo en la enfermedad avanzada o en el tipo inmunodeficiente (Blum y cols, 2004). En la **leucemia mieloide crónica**, históricamente se



ha utilizado arsénico, hidroxiurea, esplenectomía y radiación. Sin embargo, estos abordajes se utilizaron para mejorar la calidad de vida, reduciendo la extensión del tumor. El incremento en la supervivencia surgió tras la introducción de agentes alquilantes como el busulfán (Wilkinson y cols, 1947; Wintrobe y cols, 1947; Galton, 1953). La introducción del interferón alfa recombinante humano (rIFN- $\alpha$ ), ha mostrado una acción antitumoral significativa, induciendo la remisión citogenética e incrementando la supervivencia (Talpaz y cols, 1983). Con el desarrollo de pequeñas moléculas que actúan contra el producto de la translocación bcr/abl, como el imatinib, se ha conseguido una mejoría notable en pacientes con este tipo de leucemia (Jabbour y cols, 2006; Druker y cols, 2001). En la **leucemia linfoide crónica**, aunque en un principio se usó un tratamiento basado en un agente alquilante como el clorambucil solo o en combinación con corticosteroides, actualmente se utiliza para el tratamiento paliativo (Robertson y cols, 1994). Aunque se han utilizado tratamientos combinados de quimioterapia, como CHOP (ciclofosfamida, adriamicina, vincristina y prednisona), CAP (ciclofosfamida, doxorubicina y prednisona) y COP (ciclofosfamida, vincristina y prednisona), que muestran una respuesta alta, pero no se traduce en incremento de la supervivencia (Rafael y cols, 1991), por esta causa, este tratamiento no es recomendado. El uso de análogos de purina como agente único como fludarabina ha mostrado una respuesta bastante alta, que se potencia con su combinación con ciclofosfamida, aunque no existen diferencias en la supervivencia. Algunos estudios indican que la combinación de fludarabina, ciclofosfamida y rituximab (un anticuerpo contra CD20) producen remisión completa en muchos casos y también incrementan la supervivencia de los pacientes (Ghia y cols, 2007).

- **Terapia de consolidación.** Cuando se consigue la remisión, se requiere una terapia adicional para reducir las células tumorales que son indetectables. Principalmente, en la **leucemia mieloide aguda** se utiliza citarabina, en bajas dosis o en combinación con antraciclina para conseguir esta consolidación (Lowenberg y cols, 1998; Craig y Schiller, 2008). En el caso de la **leucemia linfoide aguda**, se suelen usar los mismos quimioterápicos que en la terapia de inducción, pero además se utilizan dosis medias o altas de metotrexato, combinaciones de ciclofosfamida, vincristina, doxorubicina y dexametasona, alternando con citarabina y concentraciones altas de L-asparaginasa (Seibel, 2008). El abordaje más efectivo en todos los casos es el trasplante de células madre hematopoiéticas, autólogo o heterólogo (Jabbour y cols, 2005). Sin embargo, en el

caso del trasplante heterólogo, supone un riesgo por la mortalidad de la enfermedad del injerto versus huésped, particularmente importante en pacientes ancianos (Stone y cols, 2004). En el **linfoma de Burkitt**, aunque se ha intentado incorporar a la terapia el trasplante autólogo de células madre, este no ha mejorado los resultados. Además, debido a la quimioterapia muchos pacientes sufren de mielosupresión e infecciones, mucositis, toxicidad cerebelar y trombocitopenia. Para minimizar estos efectos, muchos regímenes incorporan profilaxis infecciosa, y la administración de factores estimuladores de colonias, sin embargo, la eficiencia de estos agentes para el tratamiento es aún desconocida (McMaster y cols, 1991; Bernstein y cols, 1986). Dada la alta toxicidad de los quimioterápicos clásicos, se intentan introducir nuevas terapias moleculares, similares a las anteriormente descritas para otros tipos de tumores hematológicos. En la **leucemia linfocítica crónica**, la terapia de consolidación es similar a la terapia de inducción, sin embargo, en ensayos clínicos se estudia el uso del Alemtuzumab (un anticuerpo monoclonal contra CD52, un antígeno expresado en linfocitos B, T, células NK, monocitos y algunos granulocitos) en combinación con rituximab (Kalil y Cheson, 1999; Abbott, 2006). El trasplante alogénico de células madre produce una remisión completa de la LLC, pero no es la cura definitiva, estando limitado su uso por la avanzada edad del paciente y el riesgo de mortalidad asociado a la terapia (Sutton y cols, 1998; Pavletic y cols, 1998; Doney y cols, 2002; Montserrat, 2004).

- **Terapia de post-remisión**. Se han utilizado varias estrategias para eliminar la enfermedad mínima residual. En la **leucemia mieloide aguda**, se utilizan altas dosis de citarabina, sin embargo, aunque ha resultado ser eficaz en pacientes pediátricos, su utilización en pacientes ancianos es controvertida por los efectos tóxicos de la misma. El tratamiento es diferente para pacientes con **leucemia linfocítica aguda**, en los que generalmente se utilizan dosis diarias de mercaptopurina oral y semanales de metotrexato; en algunos protocolos se usan pulsos de vincristina y corticosteroides. La curación con este abordaje es alta, sugiriendo que el trasplante alogénico es una estrategia más arriesgada y que podría reservarse para recaídas tempranas o una remisión completa secundaria. Sin embargo, este es el tratamiento de elección en pacientes ancianos, sobre todo el trasplante alogénico combinado con agentes alquilantes, como la ifosfamida (Bennett y cols, 1997; Cassileth y cols, 1992; Mayer y cols, 1994; Stone y cols, 2004; Craig y Schiller, 2008).



Esta constituye la fase más larga de la terapia y se continúa después de 2 o 3 años tras la remisión completa.

### **1.8. PRONÓSTICO**

- **Leucemia Mieloide Aguda**. Aproximadamente, entre el 50-75% de los adultos con LMA consiguen una remisión completa. Sin embargo, sólo 20-30% de los pacientes disfrutan de una supervivencia libre de enfermedad durante mucho tiempo. La mayoría de los pacientes mueren por su enfermedad, principalmente por la persistencia o recaída de la misma (Tallman y cols, 2005).

- **Leucemia Linfoide Aguda**. Aproximadamente un 80% de los niños con LLA y un 40% de los adultos muestran un índice de supervivencia libre de enfermedad de cinco años. Si se incluyen los casos de recaídas que responden bien a la terapia de remisión, los índices de curación (definidos como la ausencia de evidencia de enfermedad durante al menos diez años) con el uso de los tratamientos actuales es del 80% en niños y 40% en adultos (Pui y cols, 2004).

- **Linfoma de Burkitt**. La quimioterapia intensiva con tratamientos profilácticos para el sistema nervioso central, obtiene remisiones completas en el 75-90% de los adultos, con supervivencias globales que llegan al 50-70% de los adultos (Blum y cols, 2004).

- **Leucemia Linfoide Crónica**. Las mejoras recientes en los regímenes terapéuticos, han permitido llegar a un alto porcentaje de remisiones completas (entre el 60-70%), aunque muchos pacientes sufren recaídas. Sin embargo, la supervivencia global tiene una media de entre 7.5-10 años, no mejorándose con los nuevos tratamientos (Ghia y cols, 2007).

- **Leucemia Mieloide Crónica**. El tratamiento con Interferon produce una respuesta citogenética completa en más del 50% de los pacientes, con una media de supervivencia de 7 años. El tratamiento con imatinib ha mejorado la respuesta citogenética, encontrando una remisión completa en el 90% de los pacientes, con unos índices de supervivencia a 5 años del 90% (Fausel, 2007; Cotta y Bueso-Ramos, 2007).

## 2. APOPTOSIS

### **2.1. DEFINICIÓN**

El término apoptosis fue propuesto por Kerr y colaboradores en 1972 para describir un patrón morfológico específico de muerte celular observado en células que fueron eliminadas durante el desarrollo embrionario, sin destrucción del tejido y sin inflamación, permitiendo la reutilización de los componentes celulares. Por esta causa, el término apoptosis, que viene del griego y significa “caída”, haciendo referencia a la caída de las hojas de los árboles (Kerr y cols, 1972). El término se refiere a un proceso fisiológico controlado de eliminación de componentes individuales de un organismo sin destrucción o daño.

La apoptosis se caracteriza por un encogimiento celular, haciendo que las células sean más pequeñas en tamaño, el citoplasma más denso y los orgánulos estén más empaquetados. Además se produce la condensación de la cromatina.

El proceso termina con la formación de vesículas y la separación de fragmentos celulares en lo que se denomina cuerpos apoptóticos. Los cuerpos apoptóticos están formados por citoplasma y orgánulos empaquetados con o sin fragmentos nucleares. Estos cuerpos son fagocitados por macrófagos o células parenquimatosas y degradados a través de fagolisosomas. No se produce un proceso inflamatorio porque las células apoptóticas no liberan sus componentes celulares a los tejidos intersticiales; son fagocitadas rápidamente por las células vecinas, previniendo las necrosis secundarias y sin producir citoquinas inflamatorias (Savill y Fado, 2000; Kurosaka y cols, 2003).

### **- Características Bioquímicas**

Las células apoptóticas muestran una serie de características bioquímicas como la ruptura protéica, la degradación del ADN y el reconocimiento fagocítico.

La primera modificación bioquímica, implica a las proteínas iniciadoras y efectoras de la apoptosis, las caspasas. Las caspasas son una familia de cisteín-proteasas que



participan en la muerte celular programada, siendo de especial importancia en el transcurso de la apoptosis. Las caspasas se expresan en forma de proenzima inactiva y cuando son activadas, pueden activar a otras procaspasas por rotura de residuos de ácido aspártico, permitiendo la iniciación de la cascada proteolítica (Hengartner, 2000). Se han identificado diez caspasas y han sido categorizadas en iniciadoras (caspasa-2, 8, 9, 10), efectoras o ejecutoras (caspasa-3, 6, 7) e inflamatorias (caspasas-1, 4, 5) (Cohen, 1997; Rai y cols, 2005).

Uno de los eventos finales de la apoptosis, es la rotura del ADN. Esta rotura es dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  endonucleasas, que producen fragmentos de ADN de 180-200 pares de bases (Bortner y cols, 1995).

Otro de los indicadores bioquímicos de la apoptosis es la expresión en la superficie celular de proteínas que permiten el reconocimiento fagocítico de las células apoptóticas por las células vecinas, induciendo una rápida fagocitosis. Esto se debe principalmente a la exposición de fosfatidilserina al exterior, fosfolípido que se encuentra en la bicapa lipídica (Bratton y cols, 1997). Sin embargo, también otras proteínas se exponen a la superficie celular, como la Anexina I y la calreticulina.

## **2.2. VÍAS DE INDUCCIÓN DE APOPTOSIS**

Existen dos vías apoptóticas principales: la vía extrínseca o de los receptores de muerte y la intrínseca o vía mitocondrial, aunque ambas pueden estar conectadas (Igney y Krammer, 2002). Existe una vía adicional que implica la citotoxicidad mediada por las células T y la muerte dependiente de perforina-granzima. Esta vía puede inducir apoptosis mediante la granzima B o la granzima A. La vía extrínseca, intrínseca y la dependiente de granzima B, convergen en la vía ejecutora. Esta vía es iniciada por la rotura de las caspasas efectoras, produciendo la fragmentación del ADN, la degradación del citoesqueleto y proteínas nucleares, la formación de cuerpos apoptóticos y la expresión de ligandos para los receptores de células fagocíticas y su posterior fagocitosis. La vía de la granzima A activa una vía paralela independiente de caspasa por el daño al ADN (Martinvalet y cols, 2005).

### 2.2.1. Vía extrínseca

La vía extrínseca de la apoptosis implica la acción de los receptores de muerte, que son miembros de la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral (TNF) (Locksley y cols, 2001). Los miembros de esta familia comparten dominios extracelulares ricos en cisteína y dominios citoplasmáticos de 80 aminoácidos llamados “dominio de muerte” (Ashkenazi y Dixit, 1998). Este dominio de muerte juega un papel crítico en la transmisión de las señales de muerte desde la superficie celular. Los receptores de muerte que han sido caracterizados, así como sus ligandos son los siguientes: FasL/FasR, TNF- $\alpha$ /TNFR1, Trail/DR4, Trail/DR5 (Chicheportiche y cols, 1997; Ashkenazi y cols, 1998; Peter y Kramer, 1998; Suliman y cols, 2001; Rubio-Moscardo y cols, 2005).

La secuencia de eventos para desencadenar la apoptosis es similar en todos los tipos de receptores. La unión del ligando al receptor induce la trimerización del mismo, que provoca el reclutamiento de una serie de proteínas que forman un complejo citoplasmático alrededor del receptor, el complejo de señalización de iniciación de la muerte o DISC (Wyllie, 1997). En el caso de FasL/FasR y de TRAIL/DR4-DR5, el dominio de muerte situado en el dominio carboxi-terminal se une a una secuencia similar en el dominio carboxi-terminal de la proteína del dominio de muerte asociada a Fas (FADD). FADD contiene un dominio amino-terminal distinto, denominado dominio efector de muerte, que se une a una región homóloga en el dominio amino-terminal de la procaspasa-8, provocando la autocatálisis y por tanto activación de esta proteína con la consecuente activación de la cascada de las caspasas (Kischkel y cols, 200; Sprick y cols, 2000). En el caso de TNF- $\alpha$ /TNFR1, se produce la unión de la proteína adaptadora TRADD, que permite el reclutamiento de FADD y RIP (del inglés, “Receptor Interacting Protein”) (Hsu y cols, 1995; Grimm y cols, 1996; Wajant, 2002). Cuando la Caspasa-8 es activada, se desencadena la apoptosis de la forma descrita arriba. Esta vía apoptótica es regulada por proteínas inhibitoras que controlan el proceso. De esta forma, la apoptosis puede ser inhibida por una proteína llamada c-FLIP, que puede unirse a FADD y caspasa-8 (Kataoka y cols, 1998; Scaffidi, 1999).

En base a la respuesta a los estímulos proapoptóticos, las células se pueden clasificar en dos grupos: tipo I y tipo II. Las células tipo I, en las que la activación de caspasa-8 es suficiente para desencadenar la apoptosis. Las células Tipo II, que requieren



la activación de la vía intrínseca para amplificar la señal apoptótica (Barnhart y cols, 2003). Para esta amplificación, caspasa-8 puede romper la proteína pro-apoptótica Bcl-2, Bid (Li y cols, 1998; Esposti, 2002), desencadenando la vía mitocondrial.

### 2.2.2. Vía intrínseca

La vía intrínseca es activada por estímulos no mediados por receptor, como por ejemplo la radiación, toxina, hipoxia, hipertermia, infecciones virales y radicales libres. Todos estos estímulos producen cambios en la membrana mitocondrial interna, que inducen la apertura del poro de la permeabilidad transitoria mitocondrial (MPT, del inglés, mitochondrial permeability transition), pérdida del potencial mitocondrial transmembrana y la liberación al citosol de dos grupos principales de proteínas proapoptóticas, que normalmente se encuentran en el espacio intermembrana (Saelens y cols, 2004). Al primer grupo pertenecen el citocromo c, Smac/DIABLO, y la serín proteasa HtrA2/Omi (Cai y cols, 1998; Du y cols, 2000; Loo y cols, 2002; Garrido y cols, 2005). Estas proteínas activan la cascada de las caspasas. Smac/DIABLO y HtrA2/Omi promueven la apoptosis por inhibición de las proteínas inhibidoras de apoptosis (IAP, del inglés, inhibitors of apoptosis proteins). El citocromo c se une y activa Apaf-1 (del inglés, apoptosis protease-activating factor 1), y a la procaspasa-9, formando el apoptosoma, de forma que la caspasa-9 reguladora se activa (Chinnaiyan, 1999; Hill y cols, 2004; Schimmer, 2004).

El segundo grupo de proteínas proapoptóticas liberadas desde la mitocondria son el AIF (del inglés, Apoptosis inducing factor), la endonucleasa G y la CAD (del inglés, caspase-activated DNase), aunque su liberación es un evento tardío. AIF se transloca al núcleo y produce la fragmentación del ADN en 50-300 kb y la condensación de la cromatina nuclear (Joza y cols, 2001). La endonucleasa G también se transloca al núcleo donde rompe la cromatina nuclear para producir fragmentos de ADN oligonucleosomales (Li y cols, 2001). AIF y endonucleasa G actúan de forma independiente de caspasa. CAD es liberada desde la mitocondria y translocada al núcleo, donde, tras la rotura por la caspasa-3, produce fragmentación de ADN oligonucleosomal y un estado más avanzado de condensación de la cromatina (Enari y cols, 1998).

El control y la regulación de estos eventos apoptóticos mitocondriales ocurre a través de los miembros de la familia de proteínas Bcl-2 (Cory y Adams, 2002). Esta

familia regula la permeabilidad de la membrana mitocondrial. Se pueden clasificar en dos grupos: pro-apoptóticas o antiapoptóticas. Algunas de las proteínas anti-apoptóticas incluyen Bcl-2, Bcl-x, Bcl-XL, Bcl-XS, Bcl-w, BAG y algunas de las pro-apoptóticas incluyen Bcl-10, Bax, Bak, Bid, Bad, Bim, Bik, y Blk. El mecanismo de acción principal de estas proteínas es la regulación de la liberación del citocromo c desde la mitocondria mediante la modificación de la permeabilidad de la membrana mitocondrial (Schuler y Green, 2001).

### 2.2.3. Vía de la perforina/granzima

Los linfocitos T citotóxicos son capaces de eliminar células diana utilizando la vía extrínseca de apoptosis y la interacción FasL/FasR (Brunner y cols, 2003). Sin embargo, también son capaces de producir estos efectos citotóxicos en células tumorales y células infectadas por virus, mediante una vía que implica la secreción de la molécula formadora de poro transmembrana denominada perforina con la liberación de gránulos citoplasmáticos a través del poro y en la célula diana (Trapani y Smyth, 2002). Las serín proteasas granzimas A y B son los componentes más importantes de estos gránulos (Pardo y cols, 2004).

Grazima B rompe proteínas en residuos aspartato y activa procaspasa-10 y puede romper factores como ICAD (Del inglés, Inhibitor of CAD, Caspase Activated DNase) (Sakahira y cols, 1998). Algunos estudios indican que la granzima B puede utilizar la vía mitocondrial para la amplificación de la señal de muerte por la rotura específica de Bid e inducción de la liberación del citocromo c (Barry y Bleackley, 2002; Russell and Ley, 2002). Granzima B también puede activar directamente caspasa-3.

Granzima A es importante en la apoptosis inducida por los linfocitos T citotóxicos y activa vías independientes de caspasas. Cuando se encuentra en la célula granzima A activa la rotura del ADN vía DNAsa NM23-H1 (Fan y cols, 2003).



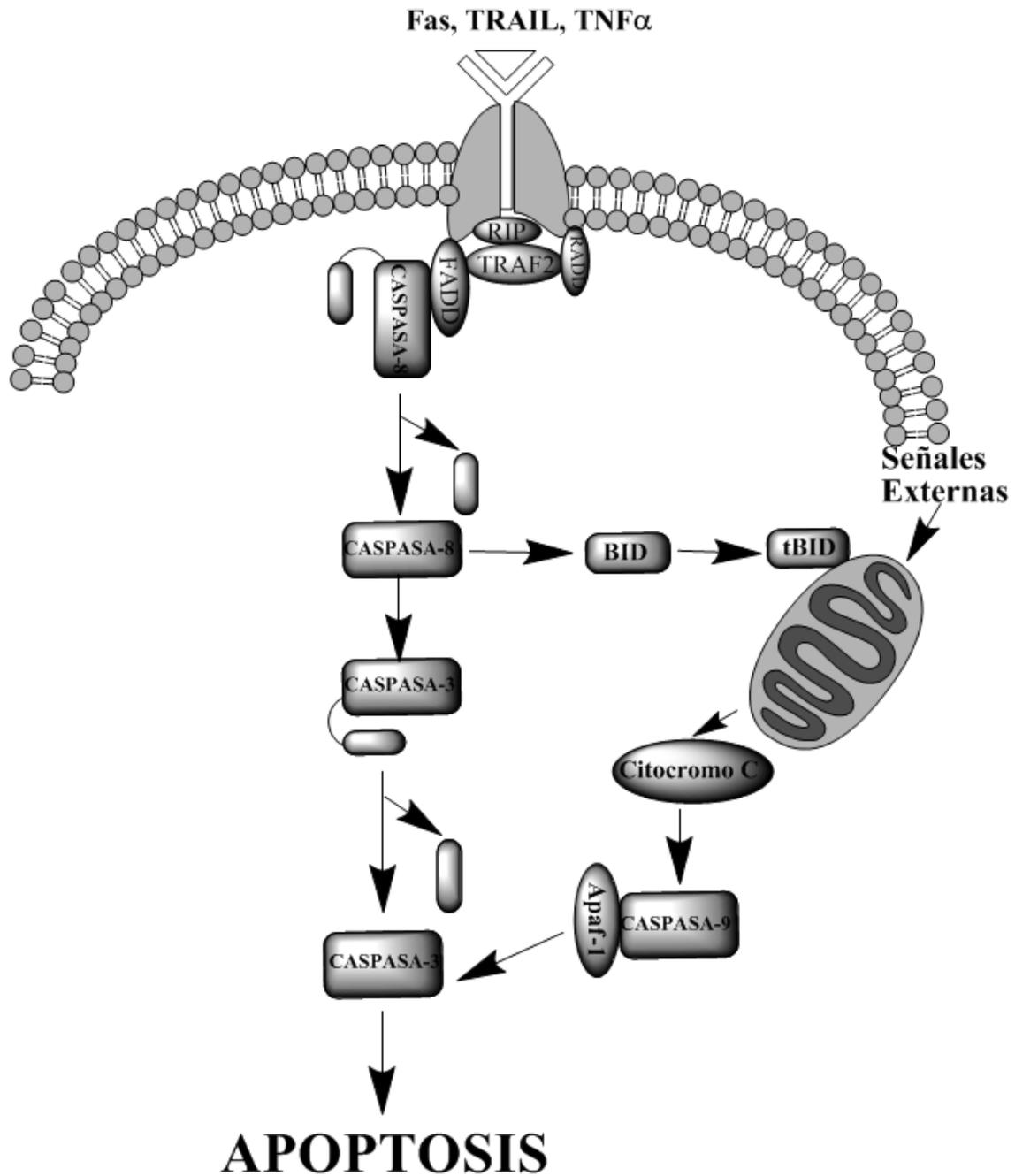
#### 2.2.4. La vía efectora

Las vías extrínseca e intrínseca finalizan con la fase efectora, el final de la apoptosis, desencadenada por la activación de las caspasas efectoras. Estas caspasas activan endonucleasas citoplasmáticas, que degradan el material nuclear, y proteasas, que degradan las proteínas nucleares y citoesqueléticas. Las principales caspasas efectoras son la Caspasa-3, Caspasa-6 y Caspasa-7, que rompen varios sustratos, incluyendo citoqueratinas, PARP (Del inglés, Poly-ADP-Ribose-Polymerase), la proteína citoesquelética de la membrana plasmática alpha fodrina, la proteína nuclear NuMA y otros, que producen los cambios bioquímicos y morfológicos, característicos de las células apoptóticas mencionadas anteriormente (Slee y cols, 2001).

La caspasa-3 es considerada la caspasa efectora más importante, activada por las caspasas iniciadoras (caspasa-8, caspasa-9, o caspasa-10). Caspasa-3 activa específicamente la endonucleasa CAD, que en células proliferativas está formando un complejo junto con su inhibidor ICAD. En células apoptóticas, la caspasa-3 rompe ICAD para liberar CAD (Sakahira y cols, 1998). CAD degrada el ADN cromosómico y produce la condensación de la cromatina. Caspasa-3 también induce reorganización del citoesqueleto y desintegración de las células en cuerpos apoptóticos. Gelsolina, es una proteína de unión a actina y ha sido identificada como uno de los sustratos de la caspasa-3. La caspasa efectora produce la rotura proteolítica de la proteína y sus fragmentos rompen los filamentos de actina de manera independiente de calcio. Esto provoca una disrupción del citoesqueleto, transporte intracelular, división celular y transducción de la señal (Kothakota y cols, 1997).

La fagocitosis es el último paso de la apoptosis. La asimetría fosfolipídica y la externalización de fosfatidilserina en la superficie de las células apoptóticas facilita el reconocimiento fagocítico no inflamatorio (Fadok y cols, 2001). Este proceso es esencial para evitar la liberación de constituyentes celulares.

En la figura 3 se presenta un resumen de la señalización de las dos vías apoptóticas principales, así como su interconexión.



**Figura 3.** Esquema de las dos vías apoptóticas principales, extrínseca e intrínseca.



### **2.3. PAPEL DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN LA SEÑALIZACIÓN APOPTÓTICA**

El estrés oxidativo se origina como consecuencia de un desequilibrio entre la generación de radicales libres y la capacidad de una célula para defenderse de sus efectos nocivos (Harman, 1956; Halliwell y Cross, 1994; Sies, 1997). Un radical libre es cualquier especie química capaz de tener una existencia propia e independiente y que contenga uno o más electrones desapareados (Halliwell y cols, 1985). Esto hace que sean capaces de captar electrones de otras moléculas para completar sus orbitales desapareados, oxidándose así la molécula donadora. Las especies reactivas del oxígeno más comunes son las especies reactivas del oxígeno, que incluyen el anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y el radical hidroxilo ( $\cdot OH$ ). Son altamente reactivos con su entorno y aunque poseen una vida media muy corta, son capaces de reaccionar y dañar el ADN, las proteínas y los lípidos (Maxwell, 1995), que se relaciona con la inducción de procesos neurodegenerativos como el cáncer (Troll y Wiesner, 1985; Feig y cols, 1994). Además de esta acción nociva, se ha visto que las especies reactivas del oxígeno, pueden funcionar como segundos mensajeros en distintas vías de señalización intracelular actuando en último término sobre la regulación de la transcripción (Droge, 2002; Martindale y Holbrook, 2002; Carmody y Cotter, 2001; Chandra y cols, 2000; Curtin y cols, 2002; Le bras y cols, 2005; Ueda y cols, 2002).

Particularmente, las especies reactivas del oxígeno pueden desencadenar la vía apoptótica mitocondrial. Lo hacen mediante interacciones con las proteínas del complejo de permeabilidad mitocondrial, PTP (del inglés, Protein Tyrosine Phosphatase), viz, VDAC (Del inglés, Voltage-dependent anion channel), ANT (Del inglés, Adenine Nucleotide Translocator) y cypD (Del inglés, Cyclophilin D), cuyas modificaciones oxidativas tienen un impacto significativo en el flujo de aniones mitocondriales. Por otro lado, la liberación del citocromo c de la mitocondria desencadena un incremento de las especies reactivas del oxígeno debido a la interrupción de la cadena de transporte de electrones (Tsujimoto y Shimizu, 2007; Madesh y Hajnoczky, 2001; Giron-Calle y cols, 1994; Baines y cols, 2005; Chen y Lesnefsky, 2006).

En lo referente a la vía extrínseca:

1. Se ha demostrado que las especies reactivas del oxígeno son capaces de regular la expresión del receptor FasR (Minana y cols, 2002; Denning y cols, 2002). También se ha observado su papel en la activación de los receptores de muerte (Berg y cols, 2007). A un nivel más avanzado de señalización apoptótica, Fas induce la generación de  $H_2O_2$  y  $O_2^-$  dependiente de NADPH oxidasa, regulando a la baja la proteína antiapoptótica FLIPL a través de su ubiquitinación/degradación proteasomal o a través de la eliminación de NO que previene la S-nitrosación y citoprotección de FLIPL (Wang y cols, 2008).

2. Como sucedía con Fas, la activación de TNF-R1 puede estar mediada por las especies reactivas del oxígeno a través del agrupamiento de los receptores y la interacción con NO (Schneider-Brachert y cols, 2004; Micheau y Tschopp, 2003; Lin y cols, 1999). Durante la señalización de TNFR1, se activa IKK, gracias a alguna de las proteínas adaptadoras como TRADD, TRAF2, y RIP. NF- $\kappa$ B regula enzimas/proteínas antioxidantes por lo tanto puede actuar como un supresor intracelular de la formación de especies reactivas del oxígeno, dirigiendo la señalización de TNF $\alpha$  hacia la supervivencia, mediante la inducción de proteínas antiapoptóticas FLIPL, Bcl-x1, A1/Bfl-1, XIAP y c-IAP 1 y 2 (Delhalle y cols, 2002; Jones y cols, 1997). Además, NF-  $\kappa$ B induce la expresión de los genes XIAP y GADD45 $\beta$ , que producen un efecto inhibitorio en JNK (Tang y cols, 2001; Papa y cols, 2004). La activación de JNK está asociada con la activación de la quinasa 1 reguladora de la señalización apoptótica (ASK1), sensible al estado redox, cuya actividad es inhibida por interacciones con proteínas sensibles al estado redox (Grx, Trx), proteínas del choque térmico y 14-3-3, y es estimulada por proteínas TRAF, AIP1, Daxx, y JASP/JIP2. La activación de JNK provoca la degradación proteasómica de FLIPL, induciendo la apoptosis (Hsu y cols, 1995; Shim y cols, 2005; Zong y cols, 1999; Stehlik y cols, 1998; Micheau y cols, 2001; Chang y cols, 2006; Pantano y cols, 2003).

3. Por último, parece que las especies reactivas del oxígeno también tienen un papel proapoptótico en la inducción de señalización por TRAIL, ya que se produce una acumulación de especies reactivas del oxígeno en células tumorales tratadas con TRAIL y el tratamiento con antioxidantes inhibe la apoptosis inducida por esta molécula (Lee y cols, 2002a; Lee y cols, 2002b). Al igual que sucedía en los casos anteriores, parece que las especies reactivas del oxígeno podrían ejercer este efecto proapoptótico mediante la regulación a la alta de los receptores como DR5 (Jung y cols, 2005).



## **2.4. APOPTOSIS Y CÁNCER**

El cáncer es una enfermedad de etiología multifactorial en la cual se producen una serie de mutaciones genéticas (Burz y cols, 2009). Muchos cánceres, entre ellos los tumores hematológicos, están asociados con defectos en el mecanismo de inducción de muerte celular. Estos defectos son importantes para la supervivencia y la proliferación del clon tumoral y contribuyen al desarrollo de la resistencia de estas células a las terapias antitumorales. La investigación de los defectos en la inducción de la apoptosis en las células tumorales puede llevar al desarrollo de nuevos tratamientos que actúen sobre los mecanismos funcionales apoptóticos, evitando así los aberrantes. Muchos agentes quimioterápicos inducen apoptosis en células tumorales a través de las vías comentadas previamente. La pérdida de sensibilidad a la apoptosis en estas células representan uno de los mecanismos de resistencia a la terapia (Bianco y cols, 2006).

### **2.4.1. Mecanismos de resistencia relacionados con los receptores de muerte**

El descenso en la expresión de los receptores de muerte puede contribuir a la resistencia de las células tumorales a los quimioterápicos. De esta manera, se ha observado un descenso en la expresión del receptor de Fas en hepatomas al compararlo con hepatocitos sanos, y esta regulación a la baja puede contribuir a la evasión del sistema inmune durante la carcinogénesis del hígado (Hiroshige y cols, 2004). Además DR4 y DR5 parece que se expresan en una variedad de células tumorales, pero no en tejido normal. Se han identificado muchos receptores señuelo (del inglés, decoy) de la familia del receptor TNF, siendo el más importante DcR3. Este se encuentra expresado en gran medida en muchos tumores humanos, como colon, pulmón, y estómago. Algunos estudios sugieren que DcR3 puede ser usado para predecir la invasión de nódulos linfáticos en pacientes con tumor gástrico (Wu y cols, 2008). El incremento en los niveles de estos receptores señuelo está relacionado también con la resistencia a TRAIL en leucemia mieloide aguda y crónica (Riccioni y cols, 2005; Bruserud, 2005).

### **2.4.2. Mecanismos de resistencia relacionados con las caspasas reguladoras**

Otro de los mecanismos relacionados con la inhibición de la vía extrínseca se produce a nivel la caspasa reguladora, caspasa 8. Se produce una regulación a la baja de la misma por moléculas específicas como c-FLIP. Así, el ratio entre la caspasa-8 y cFLIP es

crítico para el ensamblaje del DISC y el subsecuente desencadenamiento de la apoptosis. La sobreexpresión de c-FLIP se ha observado en muchos carcinomas, en líneas celulares de tumores hematológicos y tumores primarios, incluyendo el linfoma de Hodgkin, linfoma de células B no-Hodgkin, leucemia linfocítica crónica de células B (Li y cols, 2008; Mathas y cols, 2004; Dutton y cols 2004; Thomas y cols, 2002).

#### 2.4.3. Mecanismos de resistencia relacionados con la vía intrínseca de la apoptosis

La familia BCL2 representa a las proteínas reguladoras clave en la vía apoptótica mitocondrial. El descenso en la sensibilidad a la apoptosis mitocondrial está asociado con la resistencia a la quimioterapia en muchos tumores. El incremento en la expresión de los miembros antiapoptóticos de esta familia confiere resistencia a la apoptosis en células tumorales. La sobreexpresión de Bcl-2 es un distintivo del linfoma folicular, y su desregulación es común en leucemia linfocítica crónica, linfoma difuso de células B, mieloma múltiple y leucemias agudas. El virus de Epstein-Barr, implicado en el desarrollo del linfoma de Burkitt, linfomas relacionados con el VIH, y linfomas que se producen tras el trasplante, codifica un homólogo de Bcl-2, BHRF1. La regulación a la alta de Mcl-1, otra de las proteínas antiapoptóticas pertenecientes a la familia Bcl-2, se observa en mieloma múltiple y leucemia linfocítica crónica (Hockenbery y cols, 1990; Letai, 2005; Derenne y cols, 2002). También se observan mutaciones o regulaciones a la baja de Bax y Bak en algunos tipos de tumores (Kondo y cols, 2000).

#### 2.4.4. Mecanismos de resistencia relacionados con las proteínas reguladoras de la apoptosis

Las proteínas inhibidoras de la apoptosis (del inglés, IAP, inhibitors of apoptosis proteins) se encuentran sobreexpresadas en muchos tumores humanos, y su nivel de expresión ha sido asociado con la resistencia al tratamiento. Por ejemplo, la sobreexpresión de c-IAP1, c-IAP2, NAIP, XIAP y survivina se ha detectado en cáncer de mama. Además c-IAP2 es sobreexpresado en lesiones neoplásicas intraepiteliales pancreáticas de alto y bajo grado y adenocarcinomas pancreáticos ductales. Por tanto, se considera un evento temprano en la progresión del cáncer pancreático. XIAP está sobreexpresado en tejidos de cáncer de esófago comparados con tejidos normales y confiere resistencia a la inducción de



apoptosis por caspasa-3, promoviendo la tumorigénesis (Peng y cols, 2007; Esposito y cols, 2007; Zhang y cols, 2007).

A un nivel superior de regulación, la activación de la vía PI3K-Akt/PKB-mTOR se encuentra en muchos tumores. La activación de varias isoformas de PI3K produce la generación de un segundo mensajero fosfatidilinositol-3,4,5-tris-fosfato (PIP<sub>3</sub>), que recluta a Akt/PKB del citosol a la membrana plasmática, donde Akt es activado por PDK1 (del inglés 3'-phosphoinositide-dependent kinase 1). Fosfo-Akt fosforila (activa o inhibe) una serie de sustratos, incluyendo BAD (lo cual permite su unión a la proteína 14-3-3, que lo secuestra impidiendo su acción proapoptótica), GSK-3 (del inglés, glycogen-synthase kinase-3), óxido nítrico sintasa, mTOR, y el factor de transcripción FOXO, que suprime la transcripción de genes proapoptóticos, incluyendo FAS-L y BIM. Así, la activación de la vía PI3K-Akt produce la inhibición de la apoptosis. PTEN (del inglés, phosphatase and tensin homolog) es una fosfatasa supresora de tumores que ejerce su función por la defosforilación de PIP<sub>3</sub>, impidiendo la cascada de PI3K-Akt. Es frecuente en muchos tipos de tumores que PTEN se pierda por mutación o delección, y como resultado, la vía de Akt está activada constitutivamente (Zivny y cols, 2010).

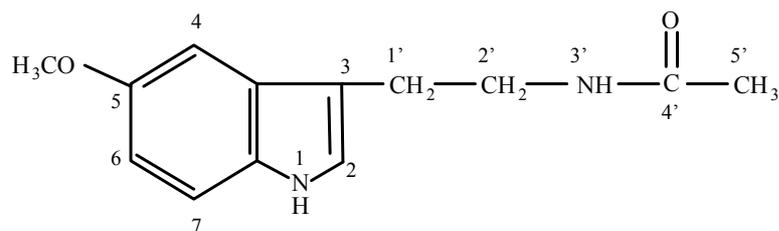
Las MAPKs (del inglés, Mitogen-activated protein kinase) son una familia de serín/treonín quinasas que regulan respuestas celulares de varios estímulos extracelulares e intracelulares, incluyendo citoquinas y factores de crecimiento. MAPKs, regulan principalmente procesos celulares como proliferación celular, supervivencia, diferenciación y apoptosis. Se han identificado tres subfamilias de MAPKs: ERK (del inglés, extracelular signal-regulated kinases), JNK (del inglés, c-Jun N-terminal kinases) y p38-MAPKs. La translocación de MAPKs activadas al núcleo produce la fosforilación de varios factores de transcripción, que consecuentemente pueden alterar la expresión génica en los procesos celulares anteriormente mencionados. La disrupción de la señalización de MAPK juega un papel importante en la patogénesis del cáncer incluyendo los tumores hematológicos (Platanias, 2003). Por ejemplo, se ha detectado la activación constitutiva o la sobreexpresión de ERK quinasa en la mayoría de las leucemias agudas, lo cual provoca que la hematopoyesis se desarrolle de forma independiente de citoquinas (Milella y cols, 2005).

El factor nuclear-kappa B (NF- $\kappa$ B) es importante en tumorigénesis, ya que la pérdida de su regulación normal está asociada a un acelerado crecimiento, la resistencia a la apoptosis y la formación de metástasis. Se ha observado una actividad constitutiva nuclear de NF- $\kappa$ B en un gran número de tumores sólidos y hematológicos, incluyendo mieloma múltiple, linfoma de Hodgkin, leucemia linfoide crónica de células B y subtipos de linfoma no-Hodgkin (Nishikori y cols, 2003; Emmerich y cols, 1999).

## 3. LA MELATONINA

### 3.1. INTRODUCCIÓN

La melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) (Figura 5) fue descrita por primera vez por Lerner y colaboradores en 1958. Es una indolamina conservada a lo largo de la evolución, desde bacterias, algas e invertebrados hasta vertebrados tanto mamíferos como no mamíferos (Handerland, 1999). En vertebrados, es una hormona sintetizada en la glándula pineal a partir de triptófano, pero también se ha observado su síntesis en la retina, en el tracto digestivo y en otros muchos órganos (revisado en Vijayalaxmi y cols, 2002). Dado que es una molécula lipo e hidrosoluble, atraviesa todas las membranas biológicas incluida la barrera hematoencefálica (Poeggeler y cols, 2002). Además, recientemente se ha visto que las células la captan de una forma dependiente de dosis y tiempo, posiblemente a través de un transportador activo (Hevia y cols, 2008). Su síntesis y secreción en la glándula pineal siguen un ritmo circadiano, con un pico de secreción nocturno (Reiter, 1991).



**Melatonina**

**Figura 5.** Estructura molecular de la melatonina

En un primer momento, la melatonina fue estudiada por su papel como mediador de fenómenos dependientes del ritmo luz-oscuridad (Tamarkin y cols, 1976) y como modulador de la conducta reproductiva en animales con reproducción estacional (Reiter y cols, 1976). Más adelante, se descubrió que la melatonina poseía un amplio espectro de

acciones entre las cuales cabe destacar su papel antioxidante (Tan y cols, 1993; Antolín y cols, 1996; Mayo y cols, 2003), inmunomodulador (Maestroni y cols, 1986; Guerrero y Reiter, 1992 y 2002), oncostático (Hill y Blask, 1988; Mediavilla y cols, 1999; Saínz y cols, 2005; Martín y cols, 2006) y citotóxico (Trubiani y cols, 2005; García-Santos y cols, 2005; Bejarano y cols, 2009).

### **3.2. MECANISMOS DE ACCIÓN**

Los posibles mecanismos de acción de la melatonina pueden dividirse en dos grupos:

#### **3.2.1. Mediados por receptor**

Se han descrito tres receptores de membrana para la melatonina. MT1 y MT2, son proteínas con siete dominios transmembrana acoplados a proteínas G (Reppert y cols, 1994 y 1996). El último, MT3, presenta un 95% de homología con la quinona reductasa 2 humana (Nosjean y cols, 2000), un enzima con actividad oxidorreductasa implicada en los mecanismos de detoxificación celular. La vía de transducción de la señal va a depender del tipo de proteína G al que se encuentre acoplado el receptor. La más clásica es la vía de la proteína G inhibidora (Gi), por la cual inhibe la adenilato ciclasa y como consecuencia reduce los niveles de AMP cíclico. Debido a esto, se produce la inhibición de la proteína quinasa A, que a su vez afecta a factores de transcripción implicados en el control del ritmo circadiano, la regulación de enzimas antioxidantes y también en algunos de sus efectos antiproliferativos (Blask y cols, 2002; Rodríguez y cols, 2004). Además, esta transducción de la señal por medio de las proteínas G puede activar fosfolipasa C, que a su vez activa la vía de la proteína quinasa C, estimulando la fosforilación de calmodulina y modificando los niveles de  $Ca^{2+}$  intracelular (Soto-Vega y cols, 2004; Turjanski y cols, 2004; Dai y cols, 2002). La unión de la melatonina a sus receptores de membrana también puede modular la activación de las cascadas de MAPK (Woo y cols, 2001; Chan y cols, 2001). Dado que estas enzimas están implicadas en la regulación de la proliferación y la muerte celular, se sugiere que esta vía podría dirigir las acciones antiproliferativas y diferenciadoras de la melatonina (Woo y cols, 2001).

Existen también trabajos que demuestran que algunas de las acciones de la melatonina podrían estar mediadas por su modulación de la activación a receptores

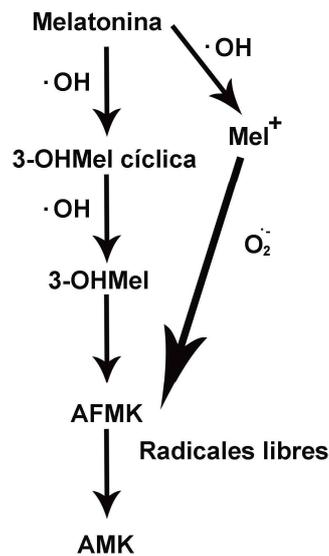


huérfanos nucleares (Steinhilber y cols, 1995; Urata y cols, 1999). ROR $\alpha$ 1 y ROR $\alpha$ 2 parece que están implicados en algunos aspectos de la modulación inmune, mientras que RZR $\beta$  se expresa en el sistema nervioso central, incluyendo la glándula pineal (Weisenberg y cols, 1995; Carlberg, 2000).

### 3.2.2. Efectos no mediados por la unión al receptor

La capacidad antioxidante directa de la melatonina no está mediada por su unión al receptore. La melatonina es una molécula que actúa como un donador de electrones y detoxifica las especies reactivas del oxígeno. Debido a esta reacción, la melatonina se convierte en el radical catión indolil, puesto que tiene un electrón desapareado. La reactividad de este radical es baja, pero puede reaccionar con el oxígeno singlete para producir N-acetil-N-formil-5-metoxikinuramina, que por sí mismo es un potente depurador de radicales libres (Tan y cols, 2001). Si la melatonina reacciona con dos moléculas de radical hidroxilo, se convierte en 3-hidroximelatonina cíclica, que por numerosas reacciones enzimáticas y no-enzimáticas se convierte en AFMK (Pandi-Perumal y cols, 2006). Es importante esta capacidad que muestra la N-acetil-N-formil-5-metoxikinuramina para depurar el oxígeno singlete, ya que en último término reduce la formación de radicales hidroxilo altamente reactivos y de aniones peroxinitrito (Ressmeyer y cols, 2003) (Figura 6).

Gracias a esta acción depuradora de radicales libres, la melatonina media la inhibición de vías de señalización implicadas en la proliferación de ciertas células tumorales, como células de glioma C6, en las cuales la melatonina produce un descenso de los radicales libres que inhiben PKC y Akt así como NF- $\kappa$ B, implicados en la supervivencia y proliferación de estas células tumorales, dando lugar por tanto a una acción oncostática de la indolamina (Martín y cols, 2006 y 2007).



**Figura 6.** Capacidad de la melatonina para eliminar los radicales libres.

Otra de las acciones no mediadas por los receptores de la melatonina es su unión e inhibición del complejo  $\text{Ca}^{2+}$ -Calmodulina (Benítez-King y cols, 1993). Este complejo ejerce su función a través de la regulación de la actividad de una serie de quinasas (denominadas CaM-quinasas), que actúan sobre numerosos procesos celulares, entre ellos la proliferación celular (Rasmussen y Jeans, 1987). De este modo, otro posible mecanismo de acción de la melatonina sería la inhibición tanto de la calmodulina (Benítez-King y cols, 1991 y 1993) como de sus moléculas efectoras, las CaM quinasas (quinasas dependientes de calmodulina) (Benítez-King y cols, 1996). Por esta causa, este antagonismo de la melatonina frente al complejo  $\text{Ca}^{2+}$ -Calmodulina se ha relacionado con los cambios en la reorganización del citoesqueleto (Benítez-King y cols, 1993) y con la inhibición de la proliferación en células MCF-7, de cáncer de mama (Dai y cols, 2002; Del Río y cols, 2004).



### **3.3. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE LA MELATONINA**

Se han realizado diversos estudios tanto *in vitro* como *in vivo* que demuestran la capacidad de la melatonina para depurar distintos radicales. Así, en estudios *in vitro* se ha observado cómo depura las Especies Reactivas del Oxígeno como el radical hidroxilo ( $\text{OH}$ ) (Tan y cols, 1994), el radical superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) (Cagnoli y cols, 1995) y el radical peroxilo ( $\text{ROO}\cdot$ ) (Mayo y cols, 2003). En los estudios realizados *in vivo* se ha demostrado que la melatonina previene el daño oxidativo sobre las proteínas, lípidos de membrana e incluso ADN, inducido por agentes que producen radicales libres tales como el safrol (Tan y cols, 1994), la radiación (Vijayalaxmi y cols, 1995) o el paraquat (Melchorri y cols, 1995).

Además de una acción directa depuradora de radicales libres, también se ha visto que la melatonina estimula los sistemas indirectos de defensa, es decir los enzimas antioxidantes y el glutatión. Los enzimas antioxidantes constituyen la primera línea de defensa en la protección de células frente a las especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno mediante su metabolización a productos inocuos (Dröge, 2002). La primera reacción enzimática relativa al oxígeno implica a la enzima superóxido dismutasa (SOD, del inglés, superoxide dismutase), mediante la cual dos moléculas de  $\text{O}_2^-$  se transforman en  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Esta enzima tiene dos isoformas: CuZnSOD, que se encuentra en el citosol y MnSOD, que se encuentra en la matriz mitocondrial. Estos enzimas poseen metales de transición ( $\text{Cu}^{2+}$  y  $\text{Mn}^{3+}$ ) en sus centros activos, permitiendo el rápido intercambio de electrones entre dos  $\text{O}_2^-$ . Aunque  $\text{H}_2\text{O}_2$  no es un radical por sí mismo, es reactivo y se convierte rápidamente en  $\cdot\text{OH}$  en presencia del ión hierro ( $\text{Fe}^{2+}$ ) mediante la reacción de Fenton. Otros enzimas, como peroxidasas y catalasa (CAT, de sus siglas en inglés), participan en la eliminación de  $\text{H}_2\text{O}_2$  del ambiente celular. La peroxidasa más abundante es la glutatión peroxidasa (GPx, del inglés, glutathione peroxidase), que está presente en el citosol y en la mitocondria. Este enzima porta selenio en su centro activo. Utiliza glutatión reducido como sustrato para transferir electrones a  $\text{H}_2\text{O}_2$  (y otros peróxidos), generando dos moléculas de agua. La catalasa es el segundo enzima que metaboliza  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Se encuentra principalmente en peroxisomas. Tiene una molécula de hierro en su centro activo, y convierte dos moléculas de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en una molécula de agua y oxígeno diatómico (Sies, 1997). La melatonina aumenta la actividad de los principales enzimas antioxidantes

(glutation peroxidasa, superóxido dismutasa y catalasa) (Barlow-Walden y cols, 1995; Reiter, 1995; Okatani y cols, 2000). También aumenta el ARNm de estos enzimas y lo hace tanto en tejidos como en líneas celulares sometidos a estrés oxidativo (Antolín y cols, 1996; Mayo y cols, 1998; Kottler y cols, 1998; Gómez y cols, 2005), como en células en condiciones basales (Mayo y cols, 2002). Inhibe además las enzimas que cuentan con un papel prooxidante como la óxido nítrico sintasa (Pozo y cols, 1994) y la lipooxigenasa (Steinhilber y cols, 1995).

Como resultado de estas acciones, se ha demostrado que presenta un efecto citoprotector en células normales, puesto que previene el daño producido por el estrés oxidativo tanto *in vitro* como en modelos experimentales *in vivo*. Se ha observado que la melatonina inhibe el daño oxidativo inducido por compuestos usados para mimetizar los daños que se producen en enfermedades neurodegenerativas como la 6-OHDA (Mayo y cols, 1998; Rodríguez-Blanco y cols, 2008), el glutamato (Herrera y cols, 2007) y el MPTP (Acuña-Castroviejo y cols, 1997; Ortiz y cols, 2001; Antolín y cols, 2002). Este efecto antioxidante también es responsable de su efecto antiproliferativo (Saíenz y cols, 1993; Martín y cols, 2006).

### **3.4. ACCIÓN PROOXIDANTE DE LA MELATONINA**

Estudios *in vitro* recientes en algunos tipos de células tumorales, describen un incremento en la producción de especies reactivas del oxígeno, un descenso en las defensas antioxidantes y una disminución del glutation reducido intracelular tras el tratamiento con concentraciones elevadas del indol. Esta acción parece estar relacionada con la capacidad citotóxica de esta molécula en dichas células, que es inhibida por otras moléculas antioxidantes, lo cual sugiere que las especies reactivas del oxígeno se requieren para producir este efecto (Osseni y cols, 2000; Wölfler y cols, 2001; Cristofanon y cols, 2009; Bejarano y cols, 2011).



### **3.5. CAPACIDAD INMUNOMODULADORA**

Una de las principales dianas de la melatonina en el organismo es el sistema inmunitario, puesto que parece ejercer un efecto inmunomodulador y potenciador de la respuesta inmunitaria. Se ha observado la producción de cantidades relevantes de melatonina en células mononucleadas sanguíneas humanas, lo cual indicaría un efecto intracrino y paracrino en la regulación del sistema inmune (Carrillo-Vico y cols, 2004). Se ha visto que esta regulación está mediada por los receptores de melatonina tanto nucleares como de membrana observados en linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8 y en células B. A través de estos receptores, la melatonina modula la respuesta proliferativa de linfocitos estimulados e induce la producción de citoquinas en células mononucleares sanguíneas humanas mediado por su receptor nuclear (García-Maurino y cols, 1997; Pozo y cols, 1997; Maestroni, 2001).

También potencia la presentación de antígenos a las células T en macrófagos esplénicos con un incremento en la expresión de MHC de clase II y síntesis de citoquinas proinflamatorias IL-1 y TNF- $\beta$ . Además, la melatonina induce la producción de IL-12 para la diferenciación de células T en el fenotipo Th1. El efecto activador de la melatonina en el sistema inmune está mediado por la regulación de la expresión de citoquinas en el bazo, timo, nódulos linfáticos y médula ósea. Se ha observado un incremento en la expresión de M-CSF, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  y SCF en macrófagos peritoneales, mientras que IL-1 $\beta$ , IF- $\gamma$ , M-CSF, TNF- $\alpha$  y SCF se incrementa en células esplénicas de ratones tratados con melatonina. Gracias a esta estimulación en la producción de citoquinas, la melatonina potencia la fagocitosis e incrementa la actividad de las células Natural Killer (Maestroni y cols, 1986; Angeli y cols, 1987; Pioli y cols, 1993; Lin y cols, 2001). Además, la melatonina dirige la respuesta inmune hacia las células T-helper, produciendo un aumento en la síntesis de citoquinas, principalmente de interleukina-2 e interferón  $\gamma$  y de péptidos opioides (Del Gobbo y cols, 1989; Maestroni y Conti, 1990; Colombo y cols, 1992).

### **3.6. ACCIÓN ANTITUMORAL**

La acción antitumoral de la melatonina es distinta según el tipo de cáncer, por ello se dividen sus efectos en antiproliferativos, es decir impide el crecimiento de las células tumorales y citotóxicos, induce un proceso de muerte en células tumorales.

#### **3.6.1 Efectos antiproliferativos**

Las vías intracelulares implicadas en los efectos citostáticos de la melatonina han sido estudiadas fundamentalmente en tumores endocrinos, y dentro de estos la mayor parte de los estudios se centran en el cáncer de mama. Estos efectos citostáticos se han observado a concentraciones bajas (nanomolares).

Este efecto parece estar relacionado fundamentalmente con su unión a receptores de membrana o al complejo Ca-Calmodulina, o con sus efectos antioxidantes.

Así, en el cáncer de mama, el receptor MT1 induciría una disminución en los niveles de AMP (González y cols, 2007), que inhibiría la expresión génica de promotores específicos de la aromatasas (Martínez-Campa et al, 2009), cuya disminución produciría a su vez inhibición de la síntesis del receptor de estrógenos (Cos y cols, 2006). Además de inhibir la síntesis del receptor de estrógenos, la unión de melatonina a su receptor y consecuente activación de las proteínas Gi está implicada en la inhibición de la transactivación de este receptor (Lai y cols, 2008).

La unión de melatonina al complejo Ca-Calmodulina induce cambios conformacionales en el complejo receptor de estrógenos  $\alpha$ -calmodulina, inhibiendo su unión al ADN y previniendo la transcripción dependiente de estrógenos (Del Río y cols, 2004). Uno de los genes cuya transcripción depende de esta unión es el de la Ciclina D1, cuya inhibición transcripcional induce la parada en el ciclo en G1 (Cini y cols, 2005) descrita previamente por el grupo de Cos (Cos y cols, 1991; Cos y cols, 1995; Cos y cols, 1996).

Las propiedades antioxidantes de la melatonina también están implicadas en este efecto, ya que la melatonina necesita del glutatión para tener un efecto antiproliferativo en el cáncer de mama (Blask y cols, 1997). Esta molécula es un sustrato necesario para la actividad de la enzima glutatión peroxidasa, cuya expresión se ha visto elevada por la



melatonina a concentraciones bajas en otros modelos experimentales (Kotler y cols, 1998; Martín y cols, 2002; Mayo y cols, 2002; Rodríguez y cols, 2004; Gómez y cols, 2005). La implicación de la capacidad antioxidante de la melatonina en sus efectos antitumorales ha sido demostrada por Chiang y cols (2003) y ha sido revisada por Karbownik (2002).

Durante los últimos años también se ha involucrado en los efectos antiproliferativos de la melatonina la inhibición de la captación por las células tumorales de ácidos grasos del plasma, como el linoléico (Blask y cols, 1999; Blask y cols, 2003) y a la inhibición de la actividad telomerasa inducida por estrógenos (Martínez-Campa y cols, 2008). Estos efectos estarían mediados por MT1, al menos en hepatoma (Sauer y cols, 2001; Blask, 2004).

En el cáncer de próstata se ha visto que la activación de MT1 activa PKC y PKA que median la elevación de p27, que será la responsable de la inhibición del ciclo celular. Estas también median la inhibición de la vía de señalización del receptor de estrógenos activado (Tam y cols, 2007; Tam y cols, 2008). La unión a MT1 hace que la melatonina regule el metabolismo celular en el hepatoma, inhibiendo la captación de ácidos grasos del plasma.

Aunque la melatonina presenta efectos citostáticos, en la mayoría de los tumores estudiados, a concentraciones bajas (nanomolares), hay otros tumores resistentes a estas condiciones en los que si se eleva la concentración de melatonina (micromolar) esta también puede inhibir su proliferación. Este es el caso del cáncer de ovario (Saínz y cols, 2003), del cáncer de próstata andrógeno independiente (Saínz y cols, 2005), o del glioma (Martín y cols, 2006). En estos casos el mecanismo de acción es diferente, no estando implicados los receptores de la hormona y estando más en relación con su efecto antioxidante. En el glioma, por ejemplo, la melatonina reduce los niveles basales de oxidantes intracelulares, lo cual impide la activación de la proteína quinasa C con la consecuente inhibición de la activación de AKT y NF kappa B, y a su vez la inhibición de p21, modulando el ciclo celular y en última instancia, induciendo la inhibición de la proliferación (Martín y cols, 2006; Martín y cols, 2007).

### 3.6.2. Efectos citotóxicos

La melatonina también ejerce una acción proapoptótica en algunos tipos de células tumorales. Estos efectos se han observado en linfoma de Burkitt (Trubiani y cols, 2005), en cáncer de colon (Wenzel y cols, 2005), en tumores de la familia del sarcoma de Ewing (García-Santos y cols, 2006), en hepatocarcinoma (Martín-Renedo y cols, 2008), en leucemia mieloide aguda (Rubio y cols, 2007; Bejarano y cols, 2009) y en cáncer de páncreas (Leja-Szpak y cols, 2010).

Además, a estos estudios habría que añadir algunos otros que demuestran que la melatonina aumenta la sensibilidad a la quimioterapia (Wilson y Blask, 1992; Wölfler y cols, 2001; Saínez y cols, 2008; Casado-Zapico y cols, 2010), así como reduce la toxicidad de estos tratamientos en pacientes con distintos tipos de tumores (Lissoni y cols, 1996 y 1999).

Los mecanismos de acción proapoptótica de la melatonina son variados, dependiendo del tipo de tumor. Parece que esta acción está mediada en algunos casos por la vía intrínseca de la apoptosis, ya que se ha observado una regulación a la baja de Bcl-2 y a la alta de Bax, depolarización de la membrana mitocondrial, liberación del citocromo c e inducción de la actividad Caspasa-9, en varios tipos tumorales como el linfoma de Burkitt (Trubiani y cols, 2005) y leucemia mieloide aguda (Rubio y cols, 2007; Bejarano y cols, 2009). En otros tipos tumorales, como el hepatocarcinoma, se ha observado que la acción proapoptótica de la melatonina esta mediada por ambas vías apoptóticas, la intrínseca y la extrínseca, por activación de la caspasa-8. También se ha visto que la melatonina regula a la alta JNK y p38, así como una inducción a la parada en G2/M con un aumento simultáneo de la expresión de p53 y p21 (Martín-Renedo y cols, 2008). Más recientemente, la inducción de apoptosis por la melatonina en células de carcinoma pancreático demuestran que la melatonina ejerce su acción citotóxica a través de la vía intrínseca por estimulación de Bax y Caspasa-9, además en este caso podrían estar implicados los receptores de melatonina Mel-1 A/B (Leja-Szpak y cols, 2010).

## **II. OBJETIVOS**



Actualmente el tratamiento de los tumores hematológicos se aborda principalmente a través de la quimioterapia, los nuevos fármacos antitumorales biológicos y en algunos casos el trasplante tanto autólogo como heterólogo de progenitores hematológicos. Aunque estos tratamientos han aumentado la supervivencia de los pacientes con este tipo de tumores, la mortalidad sigue siendo alta sobre todo en algunos subtipos de leucemia, debido principalmente a la propia enfermedad o a los efectos secundarios derivados del tratamiento. Por este motivo, se requieren nuevas terapias que, a ser posible, no produzcan estos efectos indeseables en el paciente.

La melatonina ha demostrado tener capacidades antiproliferativas y citotóxicas en una amplia variedad de células tumorales, además de su efecto citoprotector sobre células normales. Por estas razones, los objetivos abordados en este trabajo han sido los siguientes:

1. Estudiar el efecto de la melatonina sobre líneas celulares derivadas de tumores hematológicos así como en células de pacientes mediante ensayos *ex vivo*.
2. Analizar las posibles vías intracelulares implicadas en los efectos biológicos de la melatonina sobre estos tumores hematológicos.
3. Estudiar el posible efecto de la combinación de la melatonina con quimioterápicos utilizados habitualmente en el tratamiento de tumores hematológicos.
4. Comprobar los efectos observados en cultivos celulares y en las células de pacientes en un modelo animal *in vivo*.

### **III. MATERIAL Y MÉTODOS**



## 1. MATERIALES

Todos los reactivos utilizados para el cultivo celular fueron suministrados por Sigma (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), excepto el suero fetal bovino (FBS) y el factor de crecimiento rhGM-CSF (Recombinant Human Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor), que fueron adquiridos a GIBCO (Invitrogen Life Technologies, Barcelona, España). Los frascos y las placas de cultivo fueron comprados a Falcon (Becton Dickinson BioScience, Le Pont de Claix, Francia). La melatonina y el resto de los reactivos fueron adquiridos a Sigma, salvo indicación expresa.

## 2. CULTIVOS CELULARES

### **2.1. LÍNEAS CELULARES DE TUMORES HEMATOLÓGICOS**

Para llevar a cabo el estudio se han utilizado seis líneas celulares derivadas de tumores hematológicos. HL-60 (Leucemia Mieloide Aguda, LMA); REH (Leucemia Linfóide Aguda, LLA); CA-46 y RAMOS-1 (Linfoma de Burkitt Humano, LB); RAJI (Linfoma de Burkitt Humano, LB con el virus de Epstein-Barr), que fueron suministradas por la DSMZ (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Braunschweig, Alemania). La línea celular K-562 (Leucemia Mieloide Crónica, LMC) fue cedida por el Dr. Ricardo Sánchez Prieto (Universidad de Albacete, Albacete, España). Las líneas celulares de Leucemia Mieloide Aguda U-937 y MV-4-11, fueron suministradas por la ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA). Las líneas celulares fueron cultivadas en medio Roswell Park Memorial Institute 1640 medium (RPMI), suplementado con 10% de suero fetal bovino (excepto para la línea celular REH, con la que fue usado un 20% de FBS), 100 µg/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomycin y 25 µg/ml de anfotericina B. El cultivo se mantuvo en un Flask T75 y se incubó a 37°C en una atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub>. Las células fueron subcultivadas al menos una vez por semana utilizando una dilución 1:20.

La línea celular HL-60 fue transfectada en el laboratorio del Dr. Malcolm A.S. Moore (Memorial Sloan Kettering Cancer Center, NY, USA) con un vector lentiviral que expresa el gen de fusión proteína fluorescente verde mejorada (eGFP)/luciferasa. Esta línea celular fue cultivada en medio Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) suplementado con 10% de FBS, 100 µg/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomycin y 25 µg/ml de anfotericina B. El cultivo se mantuvo en las mismas condiciones descritas para las anteriores líneas celulares.

En los procesos de subcultivo y recogida así como en los cambios de medio, al ser células en suspensión se centrifugaron a 500xg durante 5 minutos. El sedimento resultante



se utilizó para el mantenimiento del cultivo o para la realización de experimentos. Las líneas celulares fueron sembradas 24 horas antes de realizar los tratamientos, a una densidad constante de 20000 células/ml, excepto para la línea celular REH con la que se usaron 75000 células/ml. Los experimentos se llevaron a cabo entre los subcultivos 4 y 22.

### 3. AISLAMIENTO DE CÉLULAS MONONUCLEADAS

Las muestras de médula ósea y de sangre periférica de pacientes con LMA al diagnóstico y las muestras de sangre periférica de donantes sanos fueron suministradas por el Hospital Universitario Central de Asturias. Las muestras fueron recogidas durante un examen de rutina tras la obtención del consentimiento informado de acuerdo a los protocolos aprobados por el Comité de Ética del Servicio de Salud del Principado de Asturias. Las células mononucleadas fueron aisladas por un gradiente de densidad de Ficoll y fueron cultivadas en medio RPMI suplementado con 10% de FBS, 100 µg/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomycin y 25 µg/ml de anfotericina B y el factor de crecimiento hGM-CSF. Las células fueron mantenidas en un Flask T25 y se incubaron a 37°C en una atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub>.

En los procesos de subcultivo y recogida así como en los cambios de medio, se realizaron los mismos procedimientos que en las líneas celulares.

Para los experimentos, las células fueron sembradas 24 horas antes de realizar los tratamientos, a una densidad constante de 50000 células/ml.

## 4. TRATAMIENTOS

Para realizar los distintos experimentos, las células fueron sembradas a la densidad indicada anteriormente en la placa correspondientes a cada ensayo, siendo los volúmenes de medio de cultivo usados en cada caso ajustados de la siguiente manera:

Tipo de placa	Volumen
Placas de 96 pocillos	100 $\mu$ l
Placas de 24 pocillos	600 $\mu$ l
Placas de 6 pocillos	3 ml
Placas de 60 mm	4,5 ml
Placas de 100 mm	12 ml

### 4.1. FÁRMACOS

Los distintos compuestos se añadieron al medio de cultivo a las concentraciones indicadas en el apartado de “Resultados”, a partir de disoluciones 10X para las placas de 96 y 24 pocillos y 100X para las placas de 6 pocillos y de 60 mm y 100 mm respectivamente. Las soluciones stock de las que se partió para preparar dichas soluciones aparecen en la siguiente tabla:

Fármaco	Solución
Doxorrubicina	5 mM al 100% de DMSO
Etopósido	10 mM al 50% de DMSO
Ifosfamida	100 mM en H <sub>2</sub> O
Melatonina	100 mM al 20% de DMSO
Vincristina	1 mM al 100% de DMSO
Wortmanina	10 mM al 100% de DMSO
Clon ZB4	1 mg/ml en PBS
Clon NOK1	1 mg/ml en PBS
DCFH-DA	10 mM al 100% de DMSO
SB216763	20 mM al 100% de DMSO



En todos los casos se añadió un grupo control con la concentración más alta del solvente, en función del fármaco utilizado.

## 5. ENSAYOS DE VIABILIDAD CELULAR

### **5.1. ENSAYOS DE REDUCCIÓN DE MTT**

Esta técnica está basada en la reacción de reducción por la succinato deshidrogenasa mitocondrial de la sal de tetrazolium bromuro de 3-[4,5-dimetil-2-tiazol-*il*]2,5-difenil tetrazolio (MTT) a MTT formazán. Este compuesto puede ser cuantificado espectrofotométricamente utilizando una longitud de onda de 570 nm. La cantidad de formazán producido es directamente proporcional al número de células metabólicamente activas (Denizot y cols, 1986).

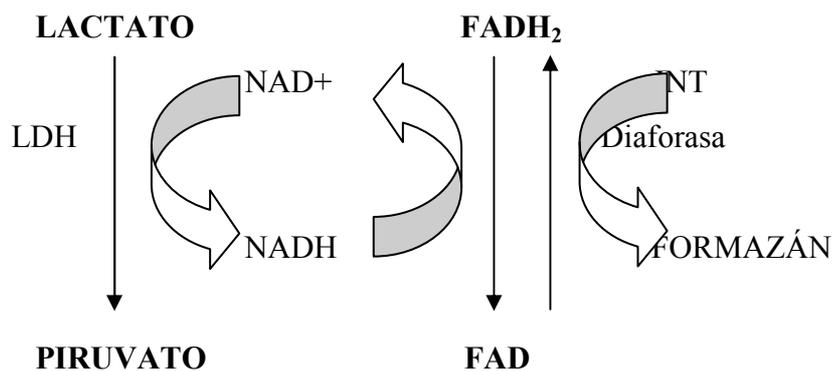
Las células se sembraron en placas de 96 pocillos en el volumen final y la concentración adecuados para cada caso. Por cada experimento se realizaron siete réplicas de cada grupo. Una vez realizados los tratamientos correspondientes con los distintos fármacos, se añadió a cada pocillo 10 µl de una solución de MTT (5 mg/ml en PBS, esterilizada por filtración), incubándose las células durante 4 h a 37°C y en una atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub> en oscuridad. Tras este tiempo, se añadieron 100 µl de una solución de lisis (20% Sodium Dodecil Sulfato y 50% de N-N-dimetilformamida pH4,7), y se incubó toda la noche a 37°C y en oscuridad. Las muestras se midieron a una longitud de onda de 570 nm en un espectrofotómetro de placa µQuant (Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA).

### **5.2. DETERMINACIÓN DE LA LDH**

Este ensayo consiste en la determinación indirecta de la muerte celular mediante la actividad de un enzima citosólico constitutivo, lactato deshidrogenasa (LDH). Este enzima citosólico puede encontrarse en el medio si se produce una rotura de la membrana celular. La medida de la actividad de este enzima en el medio (LDH liberada), es relativizada con respecto a la actividad total presente en el cultivo celular (LDH total); siendo esta última

proporcional al número total de células existentes en el cultivo celular. La relación LDH liberada/LDH total nos permite diferenciar entre procesos de muerte celular (en los que aumenta la LDH liberada al medio, y la LDH total que disminuye) e inhibición de la proliferación celular (donde no aumenta la LDH liberada al medio y la LDH total disminuye).

La reacción catalizada por la lactato deshidrogenasa (Figura 7) es la reacción de oxidación del lactato a piruvato a pH 8,5, empleando el  $\text{NAD}^+$  como aceptor de  $\text{H}^+$ . El NADH resultante actúa como cofactor de otra enzima, la diaforasa, que reduce la sal de tetrazolio, INT (p-Iodonitrotetrazolio violeta, 2-[4-iodofenil]-3-[4-nitrofenil]-5-feniltetrazolio clorhídrico), a INT formazán, que puede ser medido espectrofotométricamente utilizando una longitud de onda de 490 nm (Decker y Lohmann-Matthe, 1988). La medida de reducción de esta sal es directamente proporcional a la cantidad de enzima presente en la muestra.



**Figura 7.** Esquema de las reacciones que tienen lugar en el ensayo de liberación de LDH. LDH, lactato deshidrogenasa;  $\text{NAD}^+$ , nicotinamida-adenina-dinucleótido; NADH, nicotinamida-adenina-dinucleótido reducido; FAD, flavina-adenina-dinucleótido; FADH<sub>2</sub>, flavina-adenina-dinucleótido reducido.

Para los ensayos de actividad LDH, las células se sembraron en placas de 24 pocillos con el volumen final y la concentración apropiados a cada caso. Por cada experimento se realizaron 3 réplicas de cada grupo. Tras el tiempo correspondiente a los distintos tratamientos, se determinó la actividad LDH en el medio de cultivo (LDH liberada) y la actividad total (LDH total) siguiendo las instrucciones del kit comercial *In Vitro Toxicology Assay, LDH based Tox-7*. Se retiraron 100  $\mu\text{l}$  del medio de cultivo de cada pocillo (dos réplicas por muestra) y se pasaron a una placa de 96 pocillos para determinar la LDH liberada por las células. Para determinar la LDH total se lisaron las células, añadiendo al medio de cultivo 40  $\mu\text{l}$  de tampón de lisis (Tris-HCL 50 mM, pH 7,4



y Tritón X-100 10% (v/v)), incubándolas durante 1 h a 37°C. Una vez lisadas las células, se retiraron 100 µl del lisado celular y se pasaron a la placa de 96 pocillos. Para la reacción de detección de la actividad LDH, se preparó una mezcla de reacción Lactato:INT:Diaforasa 1:1:1, en fresco a partir de los stocks:

- 1) Solución de Lactato 36 mg/ml en Tris 10 mM, pH 8,5;
- 2) Solución de INT 2 mg/ml en 10% v/v DMSO en PBS;
- 3) Solución 13,5 U/ml diaforasa, 3% p/v BSA, 1,2% p/v Sacarosa, 3 mg/ml NADH en PBS.

A cada pocillo de la placa de 96 se añadieron 60 µl de la mezcla de reacción y se incubaron 20 minutos en oscuridad a temperatura ambiente y en agitación. Tras este tiempo se realizó la medida espectrofotométrica de las muestras a 490 nm en un espectrofotómetro de placa µQuant (Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA).

## 6. ENSAYOS MORFOLÓGICOS MEDIANTE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN

Para llevar a cabo el análisis morfológico las células HL-60 se sembraron en placas de 100 mm a la densidad adecuada. Una vez finalizados los tratamientos, se recogieron las células y se resuspendieron en 500 µl de medio de cultivo sin suero. Se añadieron 500 µl de glutaraldehído al 3% (volumen/volumen) en tampón fosfato 0,1 M (pH 7,3). Se dejaron fijar las células durante 2 horas a temperatura ambiente. Tras este tiempo, se centrifugaron a 500xg durante 5 minutos, se retiró el sobrenadante y se resuspendieron en 25 µl de tampón fosfato 0,1 M (pH 7,3). Se añadieron 25 µl de agar al 2% (peso/volumen) en PBS, y se sumergió la gota con las células en tetraóxido de osmio durante 15 minutos a 4°C. Finalmente, las células fueron deshidratadas en acetona y sumergidas en resina SPURR (EMS, Fort Washington, PA, USA) y los bloques fueron polimerizados a 70°C durante 48 horas. Se obtuvieron secciones ultrafinas (70-90 nm) con ayuda de un ultramicrotomo (Ultracut-E, Reichert-Jung, Austria). Estas secciones se contrastaron con acetato de uranilo al 2% (peso/volumen) en agua y citrato de plomo según Reynolds (1973), siendo después

observados y fotografiados con un microscopio electrónico de transmisión modelo Jeol EM-1011 (JEOL, Japón) trabajando a 100 KV.

## 7. ESTUDIOS DE CITOMETRÍA DE FLUJO

### **7.1. DETERMINACIÓN DE APOPTOSIS: ENSAYO DE ADHESIÓN DE LA ANEXINA V**

La apoptosis se caracteriza por ciertas características morfológicas, entre ellas la pérdida de la asimetría de la membrana plasmática, siendo este uno de los sucesos acaecidos durante los estadios iniciales del proceso apoptótico. En las células apoptóticas, el fosfolípido de membrana fosfatidilserina, es translocado de la parte interna de la membrana plasmática a la externa.

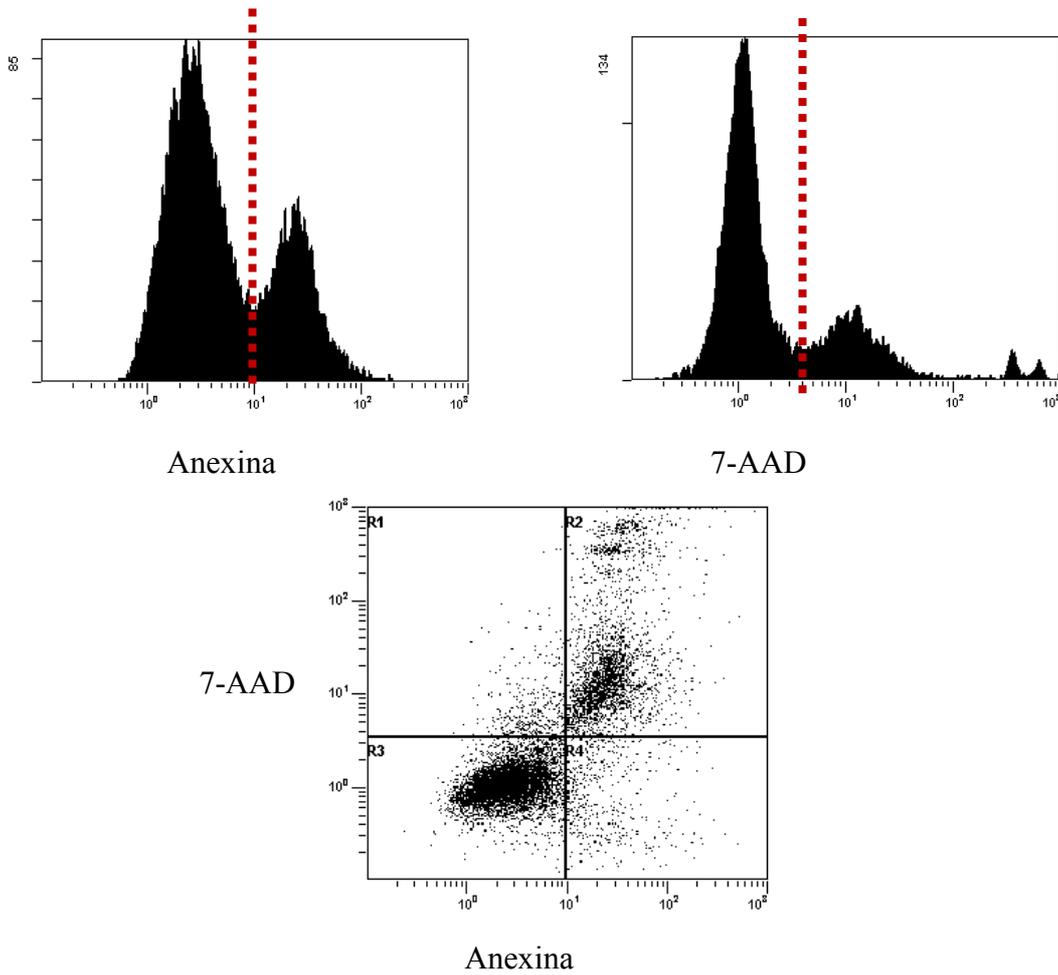
La anexina V es una proteína de entre 35-36 KDa, dependiente de  $Ca^{2+}$ , que se une a fosfolípidos y especialmente tiene una alta afinidad por la fosfatidilserina, uniéndose a las células que la exponen en su superficie (Pigault y cols, 1994).

Para la determinación de los niveles de apoptosis por este método, se utiliza anexina V conjugada con el fluorocromo ficoeritrina (PE) en combinación con 7-Amino-Actinomicina (7-AAD), que nos permite determinar la viabilidad celular, ya que su entrada en la célula indica roturas de membrana y por tanto, pérdida de la viabilidad.

Los resultados se obtienen en forma de gráfico, donde uno de los ejes representa la fluorescencia emitida por la anexina V-PE mientras que el otro representa la fluorescencia emitida por el 7-AAD (Figuras 8 y 9). De esta manera podemos distinguir cuatro poblaciones celulares:

- 1) Células viables: no incorporan 7-AAD ni presentan la unión de anexina-V.
- 2) Células necróticas: Incorporan 7-AAD pero no presentan la unión de anexina-V.
- 3) Células apoptóticas tempranas: No incorporan 7-AAD pero sí presentan unión de anexina-V.

4) Células apoptóticas tardías: Incorporan 7-AAD y presentan unión de anexina-V.



**Figura 8.** Ejemplo de la determinación de cuadrantes para el análisis de la apoptosis medida por citometría de flujo mediante el método de unión de la anexina.

Así, la gráfica quedaría dividida en cuatro cuadrantes correspondientes a estas poblaciones celulares:

<b>FL-3 (7-AAD)</b>	Células Necróticas	Células Apoptóticas tardías
	Células Vivas	Células Apoptóticas tempranas
<b>FL-1 (Anexina-V-PE)</b>		

**Figura 9.** Representación esquemática de las cuatro poblaciones determinadas por los cuadrantes en el análisis de apoptosis medido por el método de unión de anexina.

El protocolo se llevó a cabo siguiendo las especificaciones del *PE Annexin V Apoptosis Detection Kit I* (BD BioSciences). Las células se sembraron en placas de 100 mm a la densidad apropiada. Tras realizar los tratamientos pertinentes, se recogieron las células y se centrifugaron 5 minutos a 500xg y a temperatura ambiente. Una vez retirado el sobrenadante, se lavaron una vez con PBS. Tras el lavado se resuspendieron en el tampón de unión (10 mM HEPES/NaOH, pH 7,4; 140 mM NaCl; 2,5 mM CaCl<sub>2</sub>), a una densidad aproximada de 10<sup>5</sup> células/ml y se tomaron 500 µl de dicha suspensión celular a los que se añadieron 5 µl de anexina y 5 µl de 7-AAD. Se incubaron las células 15 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. Tras este tiempo, las muestras se midieron en un citómetro de flujo FACScalibur (Becton Dickinson, Franklin Lanes, New Jersey, USA) equipado con un láser de argón, a una longitud de onda de 488 nm para la excitación y 585 nm para la emisión en el caso de la anexina (FL2) y 488 nm para la excitación y 670 para la emisión del 7-AAD (FL3). En todos los casos se midieron 10000 células por muestra y tres muestras por grupo experimental. El análisis de los resultados se llevó a cabo con el software FlowJo (TriStar, Ashland, Oregon, USA).

## **7.2. CUANTIFICACIÓN DE LOS NIVELES DE PERÓXIDOS INTRACELULARES**

Este ensayo permite analizar el estado oxidativo intracelular utilizando diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína (DCFH-DA), molécula de bajo peso molecular, no fluorescente y no polar, que difunde libremente a través de la membrana celular. En el citoplasma, esterasas intracelulares catalizan la escisión del grupo diacetato (DA), liberando DCFH (2',7'-diclorofluoresceína), que es un compuesto polar, no fluorescente, incapaz de difundir libremente a través de la membrana celular. Este compuesto puede ser oxidado por radicales libres intracelulares, principalmente peróxidos intracelulares, dando como resultado la molécula fluorescente 2',7'-diclorofluoresceína (DCF). La fluorescencia emitida es indicativa del nivel de peróxidos intracelulares.

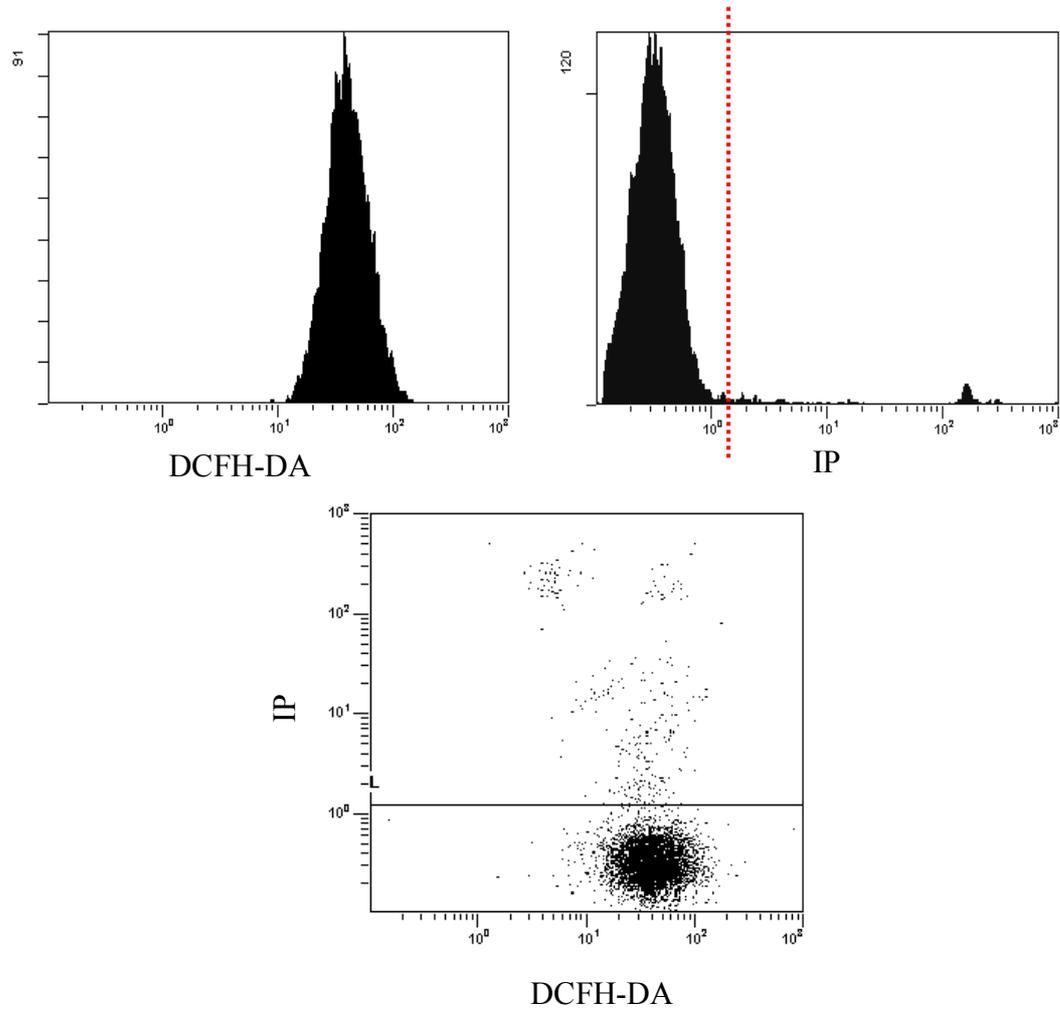
Las células se sembraron en placas de 6 pocillos con el volumen final y la concentración apropiados para cada caso. Por cada experimento se realizaron tres réplicas de cada grupo. Una vez realizados los tratamientos, se recogieron las células y se centrifugaron durante 5 minutos a 500xg. El sedimento resultante fue resuspendido en 500 µl de medio sin suero con 10 µM de DCFH-DA, también se incluyó un grupo sin



fluorocromo. Las células fueron incubadas en esta solución en oscuridad, 20 minutos a 37°C. Tras este tiempo, se centrifugaron durante 5 minutos a 500xg. Se retiró el sobrenadante y el sedimento resultante fue resuspendido en 500 µl de PBS, al que se añadió también 5 µl de Ioduro de propidio (IP) de un stock de 50 µg/ml en PBS (concentración final por muestra 0,5 µg/µl) con la excepción del grupo correspondiente al control de fluorescencia basal. La incorporación de IP a las células es un marcador de muerte celular, y lo utilizamos para descartar las células muertas de la población a analizar.

La fluorescencia de cada muestra celular emitida por la DCF fue medida en un citómetro de flujo Beckman Coulter FC500 equipado con un láser de argón, con un filtro de excitación para 488 nm y otro de emisión para 525 nm. Para detectar el IP incorporado se utilizó un filtro de excitación para 488 nm y otro de emisión para 675 nm.

En todos los casos se determinó la fluorescencia de 10000 células vivas por muestra. Los datos obtenidos fueron analizados con el software Cytomics RXP (Beckman Coulter). Se obtuvo así la mediana de la fluorescencia emitida por la población analizada que posteriormente fue utilizada para el análisis estadístico. Un ejemplo del análisis de datos para la determinación de estos oxidantes intracelulares se muestra en la figura 10, en ella se observa la fluorescencia de la DCF, del IP, y en la última ventana se delimitan las células a analizar, ya que gracias al IP descartamos las células muertas.



**Figura 10.** Representación en forma de histograma de la fluorescencia obtenida para el yoduro de propidio (IP) y la fluorescencia obtenida para la DCF. Representación integrada, en forma de citograma de los niveles de fluorescencia para la DCF (eje de abscisas) y el IP (eje de ordenadas).

## 8. MEDIDAS DE ACTIVIDADES CASPASAS

Las caspasas son una familia de cisteín-proteasas que participan en la muerte celular programada, siendo de especial importancia en el transcurso de la apoptosis. La caspasa-8, es principalmente, la caspasa iniciadora del proceso apoptótico mediado por la vía extrínseca; la caspasa-9, en cambio es la iniciadora cuando la apoptosis ocurre por la vía intrínseca. La caspasa-3 es la caspasa efectora de la apoptosis por las dos vías, y es la más estudiada en mamíferos ya que su activación indica que el proceso de muerte celular por apoptosis es irreversible (Nicholson y cols, 1995).

### **8.1. ENSAYO DE LA ACTIVIDAD CASPASA-3**

Para la determinación de la actividad caspasa-3 se utilizó un kit fluorimétrico (Caspasa-3 assay kit, fluorimetric, Sigma). El ensayo se basa en la hidrólisis del péptido sustrato acetil-Asp-Glu-Val-Asp-7-amido-4-metilcumarina (Ac-DEVD-AMC) por la caspasa-3, dando lugar a un producto fluorescente 7-amino-4-metilcumarina (AMC), siendo las longitudes de onda de excitación y emisión de este compuesto de 360 nm y 460 nm respectivamente (Figura 11).



**Figura 11.** Esquema de la reacción de hidrólisis catalizada por Caspasa-3. **Ac-DEVD-AMC**, acetil-Asp-Glu-Val-Asp-7-amido-4-metilcumarina; **Ac-DEVD**, acetil-Asp-Glu-Val-Asp; **AMC**, 7-amino-4-metilcumarina.

La concentración de AMC que se genera en la reacción es calculada en base a una curva patrón que se obtiene partir de concentraciones conocidas de AMC.

Para determinar la actividad caspasa-3, las células se sembraron en placas de 100 mm a la concentración y el volumen adecuados para cada caso. Tras el tratamiento de las células con los fármacos pertinentes, se recogieron y posteriormente se centrifugaron durante 5 minutos a 500xg y a temperatura ambiente. Se retiró el sobrenadante y el

sedimento celular fue lavado con PBS. Para extraer las proteínas, las células fueron resuspendidas en 100-150  $\mu$ l de solución de lisis (50 mM HEPES, pH 7,4, 5 mM CHAPS, 5 mM DTT), tras lo cual fueron incubadas en hielo durante 20 minutos. Transcurrido este tiempo, las muestras se centrifugaron a 14000xg durante 15 minutos a 4°C, recogándose los sobrenadantes. Estos extractos protéicos obtenidos se almacenaron a -80°C hasta que se realizó la medición de la actividad enzimática.

La medición de la actividad enzimática fue realizada en placas de 96 pocillos. En cada pocillo se añadieron 200  $\mu$ l de la mezcla de reacción (20 mM HEPES ph 7,4, 0,1% p/v CHAPS, 5 mM DTT, 2 mM EDTA, 10 mM Ac-DEVD-AMC) y 5  $\mu$ l del extracto protéico o de las distintas diluciones de AMC para el caso de la curva patrón. Las concentraciones empleadas para realizar la curva patrón fueron 5  $\mu$ M, 2,5  $\mu$ M, 1,25  $\mu$ M, 625 nM, 312,5 nM. Con el fin de comprobar la especificidad de la reacción medida, se llevó a cabo una réplica de todas las muestras a las que se añadieron 2  $\mu$ l/muestra de un inhibidor específico de la actividad caspasa-3 (Ac-DEVD-CHO).

Todas las muestras se incubaron durante 1,30 h en oscuridad y a temperatura ambiente. Las diluciones de AMC para la curva patrón se añadieron justo antes de proceder a la medida de la actividad caspasa en un fluorímetro de placa (FLx800, Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA), a las longitudes de onda previamente mencionadas.

Los resultados obtenidos fueron relativizados respecto a la cantidad de proteínas presentes en cada muestra, la cual fue determinada empleando un reactivo colorimétrico (Protein Assay, Biorad, Hércules, CA, USA) basado en el método descrito por Bradford (1976). Para cada muestra se preparó la siguiente mezcla:

- 795  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O
- 5  $\mu$ l de muestra protéica
- 200  $\mu$ l de reactivo colorimétrico

Las muestras se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente y se midieron espectrofotométricamente a una longitud de onda de 595 nm en un espectrofotómetro de placas ( $\mu$ Quant, Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA). La concentración de

proteínas se calculó a partir de una recta patrón realizada con concentraciones conocidas de albúmina estando estas comprendidas entre 0-20  $\mu\text{g/ml}$ .

Los resultados finales de la actividad caspasa-3 se expresaron como nmol AMC/ $\mu\text{g}$  de proteína.

## **8.2. ENSAYO DE LA ACTIVIDAD CASPASA-8**

Para la determinación de la actividad Caspasa-8 se utilizó un kit fluorimétrico (Caspasa-8 Activity Assay kit, fluorimetric, Calbiochem). El ensayo se basa en la hidrólisis del péptido sustrato acetil-Ile-Glu-Thr-Asp-7-amino-4-trifluorometilcumarina (Ac-IETD-AFC) por la caspasa-8, dando lugar a un producto fluorescente 7-amino-4-trifluorometilcumarina (AFC), siendo las longitudes de onda de excitación y emisión de este compuesto de 400 nm y 505 nm respectivamente (Figura 12).



**Figura 12.** Esquema de la reacción de hidrólisis catalizada por Caspasa-8. **Ac-IETD-AFC**, acetil-Ile-Glu-Thr-Asp-7-amino-4-trifluorometilcumarina; **Ac-IETD**, acetil-Ile-Glu-Thr-Asp; **AFC**, 7-amino-4-trifluorometilcumarina.

En este caso la actividad enzimática se mide como Unidades de Fluorescencia Relativas.

Para determinar la actividad caspasa-8, las células se sembraron en placas de 100 mm a la concentración y el volumen adecuados para cada caso. Tras el tratamiento de las células con los fármacos pertinentes, se recogieron, y posteriormente se centrifugaron durante 5 minutos a 500xg y a temperatura ambiente. Se retiró el sobrenadante y el sedimento celular fue lavado con PBS. Para extraer las proteínas, las células fueron resuspendidas en 50  $\mu\text{l}$  de solución de lisis (50 mM HEPES, pH 7,4, 5 mM CHAPS, 5 mM DTT) por cada  $1 \times 10^6$  células, tras lo cual fueron vortexeadas e incubadas en hielo durante 10 minutos. Transcurrido este tiempo, las muestras se centrifugaron a 14000xg durante 15 minutos a 4°C, recogiendo los sobrenadantes. Los extractos protéicos obtenidos se almacenaron a -80°C hasta que se realizó la medición de la actividad enzimática.

La medición de la actividad enzimática fue realizada en placas de 96 pocillos. En cada pocillo se añadieron 50  $\mu\text{l}$  del tampón de ensayo (20 mM de HEPES, 100 mM NaCl,

10 mM de DTT, 1 mM de EDTA, 0,1% (peso/volumen) CHAPS, 10% sacarosa pH 7,2), 50 µl del extracto protéico y 10 µl del sustrato de la Caspasa-8. Con el fin de comprobar la especificidad de la reacción medida, se llevó a cabo una réplica de todas las muestras a las que se añadieron 1 µl/muestra de un inhibidor específico de la actividad caspasa-8 (Ac-IETD-CHO).

Todas las muestras se incubaron durante 2 h en oscuridad y a temperatura ambiente. Tras este tiempo, se midió la actividad del enzima en un fluorímetro de placa (FLx800, Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA), a las longitudes de onda previamente mencionadas.

### **8.3. ENSAYO DE LA ACTIVIDAD CASPASA-9**

Para la determinación de la actividad Caspasa-9 se utilizó un kit fluorimétrico (HTS Caspasa-9 Activity Assay HTS, fluorimetric, Calbiochem). El ensayo se basa en la hidrólisis del péptido sustrato acetyl-Leu-Glu-His-Asp-7-amino-4-trifluorometilcumarina (Ac-LEHD-AFC) por la caspasa-9, dando lugar a un producto fluorescente 7-amino-4-trifluorometilcumarina (AFC), siendo las longitudes de onda de excitación y emisión de este compuesto de 400 nm y 505 nm respectivamente (Figura 13).



**Figura 13.** Esquema de la reacción de hidrólisis catalizada por Caspasa-9. **Ac-LEHD-AFC**, acetyl-Leu-Glu-His-Asp-7-amino-4-trifluorometilcumarina; **Ac-LEHD**, acetyl-Leu-Glu-His-Asp; **AFC**, 7-amino-4-trifluorometilcumarina.

En este caso la actividad enzimática se mide como Unidades de Fluorescencia Relativas.

Para determinar la actividad caspasa-9, las células se sembraron en placas de 100 mm a la concentración y el volumen adecuados para cada caso. Tras el tratamiento de las células con los fármacos pertinentes, se recogieron, y posteriormente se centrifugaron durante 5 minutos a 500xg y a temperatura ambiente. Se retiró el sobrenadante y el sedimento celular fue lavado con PBS. Para separar las proteínas, las células fueron



resuspendidas en 50  $\mu$ l de solución de lisis (50 mM HEPES, pH 7,4, 5 mM CHAPS, 5 mM DTT) por cada  $1 \times 10^6$  células, tras lo cual fueron vortexeadas e incubadas en hielo durante 10 minutos. Transcurrido este tiempo, las muestras se centrifugaron a 14000xg durante 15 minutos a 4°C, recogiendo los sobrenadantes. Los extractos protéicos obtenidos se almacenaron a -80°C hasta que se realizó la medición de la actividad enzimática.

La medición de la actividad enzimática fue realizada en placas de 96 pocillos. En cada pocillo se añadieron 50  $\mu$ l del tampón de ensayo 20 mM de HEPES, 100 mM NaCl, 10 mM de DTT, 1 mM de EDTA, 0,1% (peso/volumen) CHAPS, 10% sacarosa pH 7,2), 50  $\mu$ l del extracto protéico y 10  $\mu$ l del sustrato de la Caspasa-9. Con el fin de comprobar la especificidad de la reacción medida, se llevó a cabo una réplica de todas las muestras a las que se añadieron 1  $\mu$ l/muestra de un inhibidor específico de la actividad caspasa-9 (Ac-LEHD-CHO).

Todas las muestras se incubaron durante 2 h en oscuridad y a temperatura ambiente. Tras este tiempo, se midió la actividad del enzima en un fluorímetro de placa (FLx800, Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA), a las longitudes de onda previamente mencionadas.

## 9. WESTERN BLOT

### **9.1. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS**

Para realizar el análisis de la expresión protéica, las células se sembraron en placas de 100 mm con el volumen final y la concentración indicados anteriormente. Una vez finalizados los tratamientos, se recogieron las células y se centrifugaron durante 5 minutos a 500xg y a temperatura ambiente. Posteriormente, se realizó un lavado en PBS. Los sedimentos resultantes se resuspendieron en el tampón de lisis (150 mM NaCl, 1 mM de EDTA, 1 mM EGTA, 1% Tritón X-100 v/v, 2,5 mM pirofosfato sódico, 1 mM  $\beta$ -glicerofosfato, 1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 1  $\mu$ g/ml de leupeptina, 2  $\mu$ g/ml de aprotinina, 1  $\mu$ g/ml pepstatina-A, 10 nM NaF, 1 mM PMSF, 20 mM Tris-HCl pH 7,5) y se sonicaron,

manteniendo posteriormente las muestras en hielo durante 20 minutos. El lisado celular se centrifugó a 4°C durante 15 minutos a 14000xg para precipitar los restos celulares, tras lo que se recogió el sobrenadante en el que se encuentran las proteínas. La cantidad de proteínas se cuantificó por el método Bradford (1976), anteriormente descrito, y las muestras se almacenaron a -20°C hasta su uso.

## **9.2. ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE) Y TRANSFERENCIA DE LAS PROTEÍNAS**

Tras la cuantificación, de cada muestra experimental se tomaron 30 µg de proteínas a las que se añadió el volumen adecuado de tampón de carga 4X (Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8, Glicerol 10% v/v, SDS 2% p/v, β-mercaptoetanol 5% v/v, y azul de bromofenol 0,05% p/v). Se incubaron 5 minutos a 95°C, y se cargaron en un gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes, SDS-PAGE (Sodium Dodecil Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis). Este tipo de geles se divide en dos partes: la superior, o gel de empaquetamiento (Tris-HCl 250 mM pH 6,8; SDS 0,1% p/v, Acrilamida y bisacrilamida en proporción 37,5:1 3,6% p/v, PSA 0,06% p/v, TEMED 0,1%), que permite concentrar las proteínas en el mismo punto de partida antes de la separación electroforética; y la inferior, o gel de resolución (Tris-HCl 375 mM pH 8,8, SDS 0,1% p/v, Acrilamida y bisacrilamida en proporción 37,5:1 12% p/v, PSA 0,1% p/v, TEMED 0,2%), que separa las proteínas por su tamaño. Las muestras se corrieron a 100 V durante 1-1,5 h, en una solución de Tris-Glicina pH 8,6 (Tris 5 mM, Glicina 50 mM, SDS 0,1% p/v).

Tras la electroforesis se realizó una electrotransferencia de las proteínas desde el gel de acrilamida a un filtro de fluoruro de polivinilideno (PVDF) (Amershan GE-Healthcare, Buckinghamshire, UK), mediante la aplicación de un voltaje constante de 100 V, 4°C durante un tiempo variable entre 1,5 a 3 horas (dependiendo de la proteína objeto de estudio), con todos los elementos sumergidos en el tampón de transferencia (Tris 2,5 mM, Glicina 25 mM, Metanol 20% v/v, pH 8,6). La correcta transferencia de las proteínas a la membrana de PVDF se comprobó tiñendo la misma con una solución de Rojo Ponceau (Rojo Ponceau 0,1% p/v y acético 1% v/v). El filtro de PVDF se lavó varias veces con TBS-T (Tris-Buffered-Saline-Tween 20, 137 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7,3, 0,05% Tween-20 v/v), para iniciar el proceso de incubación con los anticuerpos.



### **9.3. INCUBACIÓN CON LOS ANTICUERPOS**

Las membranas se bloquearon a temperatura ambiente durante 1 h y en agitación continua con el agente bloqueante comercial Blotto (Sta. Cruz Biotechnologies, Santa Cruz Cruz, CA, USA) al 5% p/v en TBS-T. A partir del bloqueo, las condiciones de incubación con los anticuerpos primarios y secundarios variaron en cuanto a las soluciones en que estos fueron disueltos, así como las concentraciones utilizadas a partir del stock comercial (Tabla 4).

<b>Anticuerpo 1°</b>	<b>Incubación 4°C "overnight"</b>	<b>Anticuerpo 2° (conjugado con peroxidasa)</b>	<b>Incubación RT 2 h</b>
Caspasa-3 (CellSig.)	1:1000 5% BSA TBS-T	Anti-rabbit (Calb.)	1:3000 5% Blotto TBS-T
Caspasa-7 (CellSig.)	1:1000 5% BSA TBS-T	Anti-rabbit (Calb.)	1:3000 5% Blotto TBS-T
Caspasa-8 (Calb.)	1:1000 5% Blotto TBS-T	Anti-mouse (Calb.)	1:3000 5% Blotto TBS-T
Caspasa-9 (CellSig.)	1:1000 5% BSA TBS-T	Anti-rabbit (Calb.)	1:3000 5% Blotto TBS-T
Bid (CellSig.)	1:1000 5% BSA TBS-T	Anti-rabbit (Calb.)	1:3000 5% Blotto TBS-T
p-Akt (CellSig.)	1:1000 5% BSA TBS-T	Anti-rabbit (Calb.)	1:3000 5% Blotto TBS-T
Akt (CellSig.)	1:1000 5% BSA TBS-T	Anti-rabbit (Calb.)	1:3000 5% Blotto TBS-T
p-GSK-3B (CellSig.)	1:1000 5% Blotto TBS-T	Anti-rabbit (Calb.)	1:3000 5% Blotto TBS-T
GSK-3B (CellSig.)	1:1000 5% Blotto TBS-T	Anti-rabbit (Calb.)	1:3000 5% Blotto TBS-T
GAPDH (Sta. Cruz)	1:1000 5% Blotto TBS-T	Anti-rabbit (Calb.)	1:3000 5% Blotto TBS-T

**Tabla 4.** Lista de anticuerpos 1° y 2° utilizados y condiciones experimentales utilizadas. BSA, "bovine serum albumina"; CellSig.: Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA; Calb.: Calbiochem, La Jolla, CA, USA; Sta. Cruz: Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA; RT, room temperature (temperatura ambiente).

Tras la incubación con el anticuerpo primario correspondiente, las membranas se lavaron 3 veces durante 10 minutos con TBS-T 0,05% v/v, en agitación y a temperatura ambiente, con el fin de eliminar el exceso de anticuerpo sobre la superficie del filtro. Después de la fase de incubación con el anticuerpo secundario, se realizaron nuevamente 3 lavados con TBS-T 0,05% en las mismas condiciones anteriormente descritas para eliminar el exceso de anticuerpo antes de proceder a la detección de la señal por bioluminiscencia.

#### **9.4. DETECCIÓN DE LAS SEÑALES**

La detección de las señales se realizó empleando el kit comercial ECL (Amersham GE- Healthcare, Buckinghamshire, UK). Dado que los anticuerpos secundarios usados están ligados a peroxidasa, el kit ECL contiene los sustratos necesarios para que los lugares en los que está unido este enzima emitan luminiscencia. La membrana se incubó en oscuridad durante 1 minuto con las proporciones de sustratos indicadas por el fabricante, tras lo cual se expuso placas fotográficas Kodax BIOMAX (Amersham GE- Healthcare, Buckinghamshire, UK). El tiempo de exposición estuvo comprendido entre 1 y 10 minutos. La densidad óptica de la señal obtenida fue estimada utilizando un escáner Agfa SnapScan Touch y el program de análisis Scion Image Alpha 4.0.3.2 (<http://www.scioncorp.com>).

#### **9.5. REHIBRIDACIÓN**

Después de la detección de la proteína de interés, la membrana se incubó a 50°C durante 20 minutos con solución de lavado (Tris-HCl 62,5 mM pH 6,7,  $\beta$ -mercaptoetanol 100 mM, y SDS 2% p/v) para eliminar la unión de los anticuerpos con las proteínas del filtro. Tras esto, se lavó minuciosamente con TBS-T y se comenzó de nuevo el proceso de hibridación para detectar una nueva proteína.

## 10. ESTUDIOS DE EXPRESIÓN GÉNICA

#### **10.1. EXTRACCIÓN DE ARN**

Para extraer el ARN total, las células fueron sembradas en placas de 60 mm a la concentración y el volumen adecuado en cada caso. Después de realizar los tratamientos pertinentes, se recogieron las células y se lavaron una vez con PBS. La extracción del ARN se llevó a cabo siguiendo las indicaciones del GenElute Mammalian Total RNA Miniprep Kit (Sigma). A cada sedimento celular se añadieron 250  $\mu$ l de la solución de lisis a la que se añadió 10  $\mu$ l/ml de 2-mercaptoetanol para inactivar las RNasas. Vortexeamos la mezcla y la pasamos por la columna de filtración, centrifugando a 14000xg durante 2 minutos,



quedándonos con el lisado filtrado. A este lisado se añaden 250  $\mu\text{l}$  de etanol al 70%, vortexeando para mezclar. Estos 500  $\mu\text{l}$  se añaden a la columna GenElute Binding, centrifugando a 14000xg durante 15 segundos. Se elimina el líquido y a la columna se añaden 500  $\mu\text{l}$  de Solución de Lavado 1, centrifugando a 14000xg 15 segundos. Después, se añaden 500  $\mu\text{l}$  de Solución de Lavado 2, centrifugándose a 14000xg 15 segundos. Se repitió este último paso, centrifugando a 14000xg 2 minutos. Adicionalmente, se centrifugó la columna una vez más a 14000xg 1 minuto para eliminar los restos de etanol que hubieran quedado. Para eluir el ARN, se añadieron 35  $\mu\text{l}$  de la Solución de Elución a la columna, y se centrifugó a 14000xg 1 minuto.

La cuantificación de ARN se realizó utilizando una dilución del mismo 1:50 en agua y midiendo su absorbancia a 260 en un espectrofotómetro de placa  $\mu\text{Quant}$  (Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA). El ARN purificado se mantuvo a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

## **10.2. SÍNTESIS DE ADNc (RETROTRANSCRIPCIÓN)**

Para sintetizar el ADN copia del ARN extraído, utilizamos el kit cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Este kit utiliza random primers y puede sintetizar cADN a partir de 200 ng de ARN. Realizamos la siguiente mezcla de reacción por muestra:

- 2  $\mu\text{l}$  de 10X RT Buffer
- 0,8  $\mu\text{l}$  de 25X dNTP Mix
- 2  $\mu\text{l}$  de 10X RT Random Primers
- 1  $\mu\text{l}$  de la Transcriptasa Reversa MultiScribe
- 4,2  $\mu\text{l}$  de agua libre de nucleasas

A esta mezcla de reacción se añadieron 200 ng de ARN en un volumen final de 10  $\mu\text{l}$ , de forma que el volumen final de la mezcla fue 20  $\mu\text{l}$ . Las condiciones de la reacción de retrotranscripción fueron las siguientes:

- 10 minutos a  $25^{\circ}\text{C}$
- 120 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$
- 5 segundos a  $85^{\circ}\text{C}$

Una vez completada la reacción, las muestras se mantuvieron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

### **10.3. PCR A TIEMPO REAL**

Para el análisis cuantitativo de la expresión de los niveles de ARN mensajero de DR4, DR5, TRAIL, FasR, FasL y GAPDH, se utiliza el método de la PCR a tiempo real basado en SYBR Green (ABI systems, Foster City, CA, USA), en un sistema AB7700 Real Time (ABI systems, Foster City, CA, USA). El incremento en la fluorescencia del SYBR Green durante la PCR cuantitativa, es debido a la unión de este compuesto a la doble cadena de ADN. Las secuencias de los oligos sentido y antisentido se muestran en la Tabla 5.

Gen	Oligo 5'→3'
FAS-R	Sentido: 5'-AGCTTGGTCTAGAGTGAAAA-3'
	Antisentido: 5'-GAGGCAGAATCATGAGATAT-3'
FAS-L	Sentido: 5'-CACTTTGGGATTCTTTCCAT-3'
	Antisentido: 5'-GTGAGTTGAGGAGCTACAGA-3'
DR4	Sentido: 5'-CGATGTGGTCAGAGCTGGTACAGC-3'
	Antisentido: 5'-GGACACGGCAGAGCCTGTGCCATC-3'
DR5	Sentido: 5'-GGGAGCCGCTCATGAGGAAGTTGG-3'
	Antisentido: 5'-GGCAAGTCTCTCTCCAGCGTCTC-3'
TRAIL	Sentido: 5'-CGTGTACTTTACCAACGAGCTGA-3'
	Antisentido: 5'-ACGGAGTTGCCACTTGACTTG-3'
GAPDH	Sentido: 5'-ATGGGGAAGGTGAAGGTCCGG-3'
	Antisentido: 5'-GACGGTGCCATGGAATTTGC-3'

**Tabla 5.** Oligos usados para la PCR a tiempo real.

Para la realizar la PCR cuantitativa utilizamos 1  $\mu\text{l}$  del cADN y se le añadió la siguiente mezcla de reacción:

- 12,5  $\mu\text{l}$  de SYBR Green
- 0,5  $\mu\text{l}$  del cebador sentido (10  $\mu\text{M}$ )
- 0,5  $\mu\text{l}$  del cebador antisentido (10  $\mu\text{M}$ )
- 10,5  $\mu\text{l}$  de Agua estéril

Las condiciones de la reacción de PCR cuantitativa fueron las siguientes:

- Desnaturalización a  $95^{\circ}\text{C}$  durante 15 segundos
- Anillamiento/Extensión  $60^{\circ}\text{C}$  durante 1 minuto

Estas condiciones se repitieron durante 40 ciclos. Se añadió un paso adicional que es la curva de disociación, que indica la correcta y específica amplificación del producto, así como su homogeneidad. Esta curva se construye por el incremento de temperatura de



60°C a 95°C con un rango de transición de temperatura de 0,2°C/s. Cada muestra fue analizada por duplicado y se analizó la expresión relativa de los genes utilizando el método  $2^{-\Delta CT}$ . Para calcular el incremento en los niveles de ARNm, el cambio en el ciclo umbral (CT) de cada gen fue calculado restando su ciclo umbral el ciclo umbral de la GAPDH que actúa como control interno. El  $\Delta CT$  fue calculado restando la media de CT del grupo control del CT de cada grupo experimental. Los cambios en la expresión génica fueron definidos como x-veces de incremento ( $2^{-\Delta CT}$ ) relativizadas al grupo control.

#### **10.4. RT-MLPA**

RT-MLPA (de sus siglas en inglés, Reverse Transcriptase-Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification), es una técnica que se utiliza como alternativa a la PCR cuantitativa y a los microarrays. En nuestro caso hemos utilizado el kit SALSA RT-MLPA KIT R011-C1 Apoptosis mRNA, (MRC Holland, Amsterdam, Holanda), que nos permite realizar un perfil de ARNm de 46 genes implicados en apoptosis (Tabla 6).

Este kit no detecta directamente ARNm, por esta causa se requiere un paso previo de síntesis de cADN mediante una mezcla de oligos para retrotranscripción, cada uno complementario a cada una de las sondas que se utilizarán posteriormente para la PCR múltiple. En este primer paso, se incuban 2,5  $\mu$ l de la muestra de ARN con 1  $\mu$ l del buffer para la retrotranscripción y 1  $\mu$ l de la mezcla de oligos para la retrotranscripción. Esta mezcla, se incuba durante 1 minuto a 80°C y 5 minutos a 45°C. Posteriormente, a la mezcla se añaden 1,5  $\mu$ l de la Transcriptasa Reversa (MMLV Reverse Transcriptase, M1701, Promega Corporation, Madison, Wisconsin, USA), incubándose durante 15 minutos a 37°C. El enzima se inactiva a 98°C durante 2 minutos, y después enfriando las muestras a 25°C.

Tras la reacción de retrotranscripción, se procede a la hibridación de las sondas SALSA, añadiendo 1,5  $\mu$ l de la mezcla de sondas SALSA y 1,5  $\mu$ l del buffer MLPA a la reacción de retrotranscripción. Se incuba durante 1 minuto a 95°C, seguido de la incubación a 60°C durante 16 horas. Cada sonda está compuesta por dos partes que hibridan sobre secuencias diana adyacentes al ADN, por ello se requiere el siguiente paso de ligación.

Al día siguiente, se procede a la ligación de las dos partes de cada sonda, que se lleva a cabo mediante el uso de una ligasa termoestable. Se reduce la temperatura del termociclador a 54°C. A esta temperatura, se añaden 32  $\mu$ l de la mezcla de ligasa-65 y se

mezclan con la muestra. Se incuban durante 15 minutos a 54°C, y posteriormente, se mantienen durante 5 minutos a 98°C.

Longitud	Gen	Posición cromosómica
116	TNFRSF21	06p21.1
130	CDKN1A	06p21.2
136	HTRA2	02p13.1
142	BCL2L2	14q11.2
148	CFLAR	02q33.1
154	BCL2L1	20q11.21
160	PMAIP1	18q21.32
166	BCL2	18q21.33
172	BCL2A1	15q24.3
178	CFLAR	02q33.1
184	MCL1	01q21.3
193	B2M	15q21.1
202	BAD	11q13.2
211	BAX	19q13.33
216	BOK	02q37.3
229	BAK1	06p21.3
238	BCL2L11	02q13
247	BID	22q11.21
256	MIL1	22q11.21
265	BCL2L14	12p13.2
274	HRK	12q24.2
292	BIRC1	05q13.2
298	BIRC2	11q22
310	BIRC3	11q22
321	XIAP	Xq25
328	BIRC5	17q25.3
337	BIRC6	02p23.2
346	BIRC7	20q13.33
355	SERPINB9	06p25.2
362	BBC3	19q13.32
373	PARN	16p13.1
382	AIFM1	Xq25
391	MOAP1	14q32.1
400	GUSB	07q11.21
409	BNIP3L	08p21
418	APAF1	12q23.1
427	GZMB	14q12
435	PRF1	10q22.1
445	BNIP3	10q26.3
454	DIABLO	12q24.31
463	BMF	15q15
474	BIK	22q13.31
480	BCL2L10	15q21.2
489	BIRC2	11q22.1



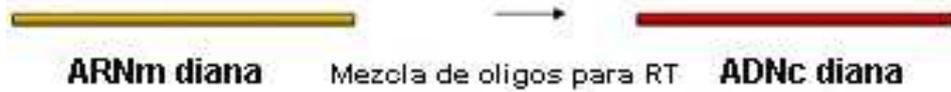
**Tabla 6.** Descripción de las 46 sondas del kit SALSA RT-MLPA KIT R011-C1 Apoptosis mRNA. Longitud de los fragmentos, nombre de los genes y posición cromosómica.

Todos los productos de ligación de las sondas tienen la misma secuencia de terminación y fue amplificada mediante PCR usando un único par de oligos. Para esta reacción, se toman 10  $\mu$ l de la reacción de ligación anterior, con 4  $\mu$ l del buffer para PCR de SALSA y 26  $\mu$ l de agua. Mientras los tubos están en el termociclador a 60°C, se añaden 10  $\mu$ l de la mezcla que contiene los oligos para PCR y la polimerasa. Las condiciones para la PCR son las siguientes: 30 segundos a 95°C; 30 segundos a 60°C; 60 segundos a 72°C durante 35 ciclos. Se finaliza con 20 minutos de incubación a 72°C. Los productos fueron, a continuación analizados en un secuenciador ABI Prism 3100 y con el Peak Scanner Software v1.0 (Applied Biosystems, Warrington, UK).

Para los experimentos de MLPA se utilizó ARN control procedente de sangre de siete sujetos sanos (donantes), ARN procedente de las tres líneas celulares HL-60, CA-46, y K-562 y ARN de los pacientes tratados y sin tratar con melatonina. El ARN fue extraído según los protocolos anteriormente citados. El ARN de los donantes sanos fue usado para calcular los valores de la mediana de referencia y las desviaciones estándar de cada sonda. Para definir la existencia de un incremento o descenso de la expresión de cada uno de los genes de una muestra hay que normalizar los datos obtenidos. Para cada gen, la expresión relativa fue calculada dividiendo el promedio relativo del área del producto de cada gen de la muestra del paciente y/o línea celular entre la mediana relativa del área del producto de cada gen de las muestras de referencia normales. Cuando la relación tumor/control es mayor de 1,3 y la desviación estándar es  $>1$  se interpreta como incremento, si es menor de 0,7 y la desviación estándar es  $<1$  se interpreta como descenso.

Un esquema de la técnica se observa en la figura 14.

## 1. Reacción de la transcriptasa Reversa



## 2. Desnaturalización e hibridación



## 3. Ligación

con endonucleasa sensible a metilación

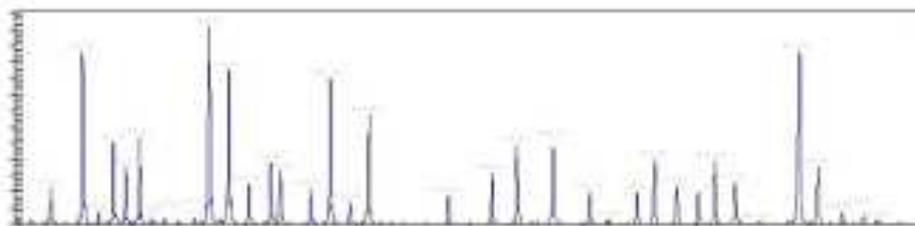


## 4. PCR con oligos universales X e Y

Sólo hibridan las sondas ligadas



## 5. Análisis de fragmentos



**Figura 14.** Esquema de la técnica RT-MLPA. En un primer paso se produce una reacción de retrotranscripción, posteriormente se procede a la hibridación y ligación de las sondas y por último la amplificación por PCR. Los productos obtenidos se analizan mediante un secuenciador, dando lugar a un electroferograma.



## 11. EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS COMBINADOS DE LOS FÁRMACOS

Para evaluar los efectos combinados de la melatonina con los quimioterápicos, los datos de los ensayos MTT fueron analizados de acuerdo con el método de Chou-Talalay (1981, 1984), utilizando el programa CalcuSyn, versión 2.1 (Biosoft, Cambridge, UK). El programa realiza las curvas dosis-respuesta de melatonina y cada quimioterápico y las ajusta a las gráficas Chou-Talalay. Después, la melatonina y los quimioterápicos fueron combinados en diferentes dosis de cada uno. Cada experimento fue repetido al menos tres veces. La curva de la combinación fue ajustada a la gráfica Chou-Talalay, y se aplicó la ecuación del efecto medio para fármacos cuyos efectos fueron mutuamente no excluyentes, es decir que actúan de forma independiente:

$$\frac{(fa)_{1,2}}{(fu)_{1,2}} = \frac{(fa)_1}{(fu)_1} + \frac{(fa)_2}{(fu)_2} + \frac{(fa)_1 + (fa)_2}{(fu)_1 + (fu)_2} = \frac{(D)_1}{(ED_{50})_1} + \frac{(D)_2}{(ED_{50})_2} + \frac{(D)_1 + (D)_2}{(ED_{50})_1 + (ED_{50})_2}$$

siendo  $fa$ , la fracción afectada debido al tratamiento y  $fu$ , la fracción no afectada;  $D$  el efecto producido por el fármaco y  $ED_{50}$ , la concentración del fármaco que se requiere para producir el 50% del efecto. Mediante esta ecuación obtenemos los Índices de Combinación (CIs), que nos indicaron si lo que se produce es un antagonismo, con  $CI > 1$ , aditividad  $CI$  entre 0,9 y 1,1 y sinergia  $CI < 0,9$ .

## 12. EXPERIMENTO IN VIVO

Para analizar la acción directa de la melatonina in vivo, se utilizó un modelo de ratón NOD/SCID (acrónimo de no-obeso-diabético/inmunodeficiencia severa combinada), ya que estos animales tienen una deficiencia severa del sistema inmune, afectando al desarrollo de los linfocitos B y T así como células Natural Killer no funcionales. Los animales fueron adquiridos en Harlan (Harlan laboratories, UK). Se utilizaron machos de 7-8 semanas de vida, mantenidos en el animalario de la Universidad de Oviedo en cajas estériles con filtro para gases, dentro de armarios de aislamiento con presión positiva, con comida estéril. Se mantuvieron en un ciclo de 12 h de luz/ 12 h de oscuridad. Todos los procedimientos realizados con los animales, quirúrgicos o no, se realizaron bajo una campana de flujo laminar tipo II (FASTER srl) y se esperó al menos 1 semana, entre la recepción de los animales y el inicio de los experimentos para que se aclimataran al entorno.

Para realizar este experimento, se utilizaron las células HL-60 que expresaban la proteína de fusión eGFP/luciferasa, que fueron cultivadas en un Flask T75 hasta alcanzar un 70-80% de confluencia. Se recogieron las células y se lavaron con PBS. Se preparó una suspensión de  $20 \times 10^6$  células/ml en 100% de PBS estéril.

Se inyectó 100  $\mu$ l de la suspensión celular en la vena de la cola de cada ratón, introduciendo por tanto,  $2 \times 10^6$  células/ratón. Una semana tras el implante, los ratones se dividieron en dos grupos. El grupo control, no tratado, compuesto por 8 ratones y el grupo melatonina, 11 ratones tratados con melatonina 10 mM disuelta en el agua de bebida, teniendo en cuenta que los ratones beben 5 ml de agua al día los miligramos de melatonina consumidos fueron de 11,6. Se cambió el agua de bebida con la melatonina dos veces por semana.

Para analizar el desarrollo y extensión del tumor, a las cuatro y cinco semanas de la inyección, los ratones fueron anestesiados con una combinación de xilacina (Rompun, Bayer HealthCare, Kiel, Alemania) y ketamina (Imalgene 500, Merial laboratorios,



Barcelona, España) y se les administró D-luciferina (Xenogen, Alameda, CA, USA) a una dosis de 75 mg/kg de peso corporal por inyección retro-orbital. Los ensayos de bioluminiscencia fueron iniciados 2 minutos después de la inyección de luciferina utilizando IVIS y el programa Living Image 3.1 (Xenogen, Hopkinton, MA, USA). Los datos fueron analizados usando el mismo programa y expresados como emisiones de fotones (fotones/segundo/centímetro cuadrado). Además se realizó un seguimiento de la supervivencia de los animales, para evaluar el impacto del tratamiento sobre la mortalidad asociada al tumor.

### 13. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los experimentos fueron realizados al menos por triplicado y los resultados fueron presentados como la media  $\pm$  el error medio estándar de tres experimentos independientes.

Las curvas Kaplan-Meier fueron realizadas utilizando el programa Microsoft Excell 2007 (Microsoft Corporation, 2007).

Los datos fueron analizados usando un análisis de la varianza de una vía (ANOVA), seguido de un test de Student-Newman-Keuls empleando el programa estadístico SigmaStat 3.1 (Systat Software). La representación gráfica de los datos se llevó a cabo con el programa SigmaPlot 9.0 (Systat Software). La significación estadística fue aceptada cuando  $P < 0,001$ .

## **IV. RESULTADOS**



# 1. LA MELATONINA INDUCE MUERTE EN LAS LÍNEAS CELULARES DERIVADAS DE TUMORES HEMATOLÓGICOS

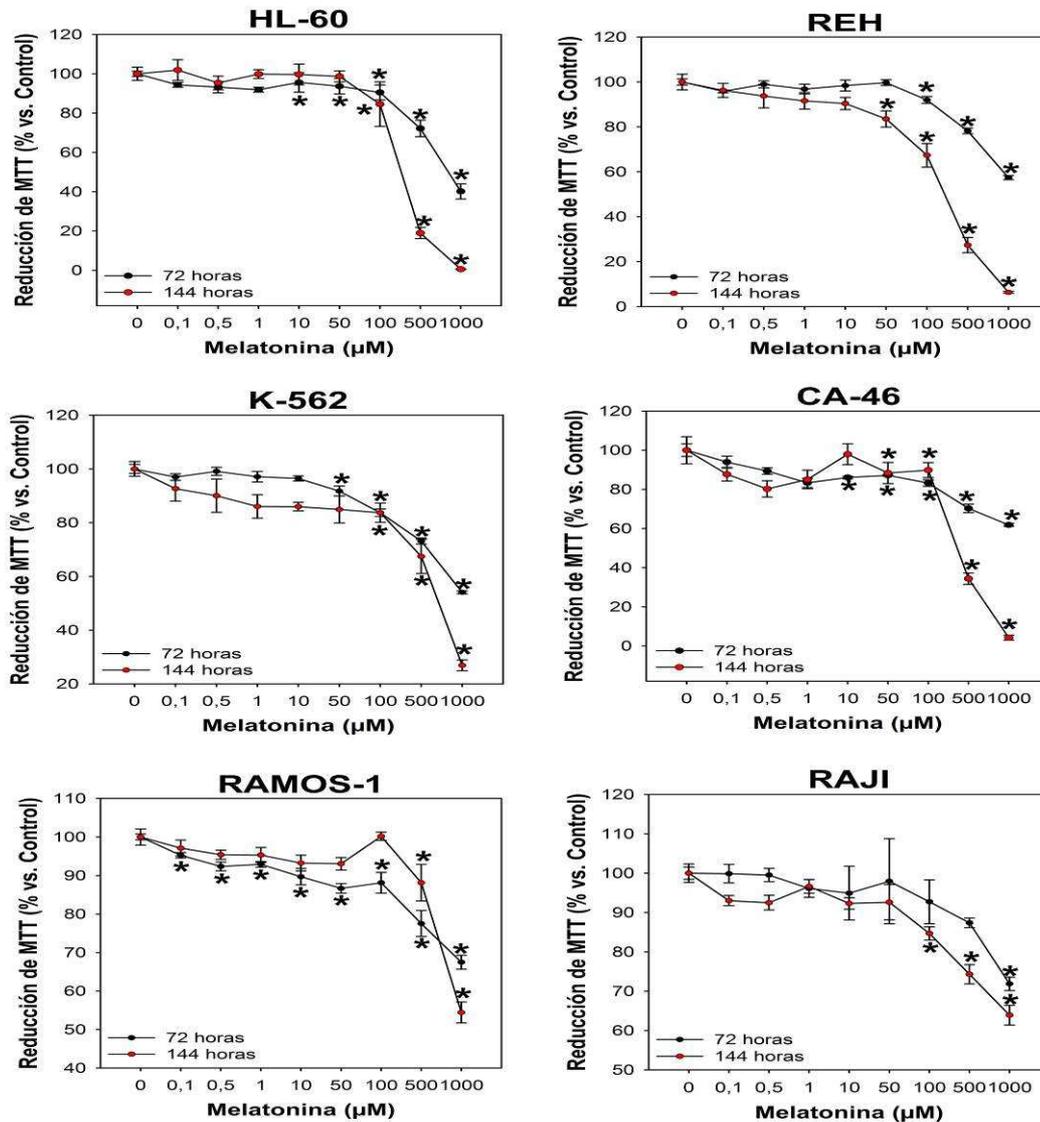
Con el objeto de evaluar la acción de la melatonina en las líneas celulares derivadas de tumores hematológicos, hemos realizado una serie de ensayos para determinar la viabilidad celular tras el tratamiento con concentraciones crecientes de melatonina y durante distintos tiempos de incubación.

## **1.1. LA MELATONINA PRODUCE UNA DISMINUCIÓN EN EL NÚMERO DE CÉLULAS DEPENDIENTE DE CONCENTRACIÓN Y DE TIEMPO**

Se incubaron las distintas líneas celulares derivadas de tumores hematológicos con concentraciones crecientes de melatonina (entre 100 nM y 1 mM) durante 72 y 144 horas (6 días). Tras la realización del ensayo de reducción de MTT, observamos que la indolamina produce una disminución en el número de células metabólicamente activas dependiente de concentración y de tiempo (Figura 15). Aunque la significación es variable entre concentraciones de melatonina de 100 nM a 100  $\mu$ M, el efecto de la misma es patente y significativo con concentraciones superiores a 100  $\mu$ M, pronunciándose dicho efecto al incrementar el tiempo de exposición al compuesto. En el caso de línea celular HL-60, la incubación con 1 mM de melatonina, reduce el número de células, que pasa de un 60% a las 72 horas a casi un 100% a los 6 días. Algo similar ocurre con línea celular REH, en la que la reducción en el número de células pasa de un 43% a las 72 horas a un 94% a los seis días. En línea celular K-562, la reducción es un poco menor, pasando de un 46% a las 72 horas a un 74% a los seis días.

Se observa una reducción menor del número de células en el caso de las dos líneas celulares de linfoma de Burkitt Humano, RAMOS-1 y RAJI. En la primera, la reducción pasa de un 33% a las 72 horas a un 46% a los seis días, mientras que en la línea celular RAJI, la reducción pasa de un 29% a las 72 horas a un 37% a los seis días. Sin embargo, y a pesar de que esto sugiere una cierta resistencia a la acción de la melatonina en las líneas celulares de linfoma de Burkitt Humano, cuando realizamos el ensayo de reducción de

MTT en la línea celular CA-46, también de linfoma de Burkitt Humano, los resultados son similares a los obtenidos con las líneas celulares de leucemia, con una reducción en el número de células que pasa de un 39% a las 72 horas a un 96% a los seis días.



**Figura 15.** La melatonina produce una disminución en el número de células metabólicamente activas, de forma dependiente de concentración y de tiempo, en todas las líneas derivadas de tumores hematológicos estudiadas. El número de células fue determinado mediante el ensayo de reducción de MTT. \* p < 0,001 vs. grupo sin tratamiento (Control).

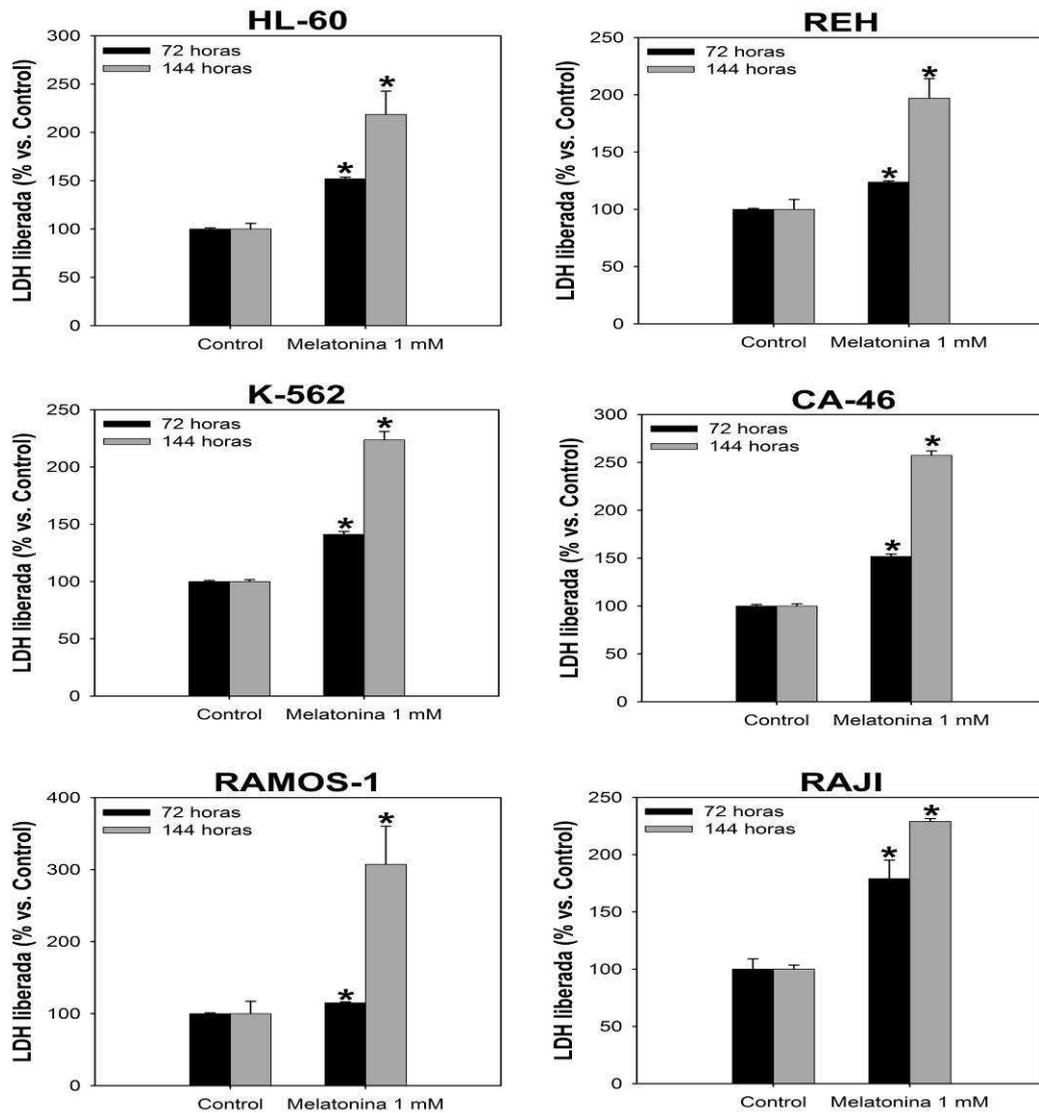


## **1.2. LA REDUCCIÓN EN EL NÚMERO DE CÉLULAS ES DEBIDA A UN EFECTO CITOTÓXICO**

El ensayo de reducción de MTT anteriormente realizado nos indica el número de células viables a través de la medida de su metabolismo celular. Sin embargo, la melatonina podría tanto inhibir la proliferación celular como ejercer un efecto citotóxico o incluso alterar el metabolismo celular. Para dilucidar este hecho y distinguir entre dichos procesos en las líneas celulares derivadas de tumores hematológicos se realizó la determinación de la liberación del enzima Lactato Deshidrogenasa (LDH) al medio, puesto que es un enzima intracelular que sólo se libera al exterior cuando se produce rotura de la membrana plasmática, lo cual nos da una medida del porcentaje de muerte celular.

Se seleccionó la concentración de melatonina más eficaz en los ensayos de reducción de MTT, 1 mM y se observó que la indolamina produce un aumento significativo de la liberación de LDH en las líneas celulares ensayadas, dependiente en este caso del tiempo de tratamiento, siendo mayor su efecto tras seis días de exposición (Figura 16). Al igual que sucedía con el ensayo de reducción de MTT, observamos resultados similares en las líneas celulares HL-60, CA-46 y K-562, en las cuales la liberación de LDH pasa de un 140% a las 72 horas a un 230% aproximadamente a los seis días. Sin embargo, en la línea de leucemia linfoide aguda, REH, la liberación de LDH es menor a las 72 horas, 123% pasando a un 197% a los seis días. De nuevo, encontramos ciertas discrepancias en los resultados obtenidos con las líneas de linfoma de Burkitt humano. En la línea celular RAJI la liberación de LDH pasa de un 179% a las 72 horas a un 230% a los seis días. En la línea celular RAMOS-1, la liberación de LDH a las 72 horas es muy reducida, 115%, incrementándose de manera significativa a los seis días, llegando a un 307%.

Los datos obtenidos mediante este ensayo demuestran que la reducción en el número de células se debe principalmente a un efecto citotóxico y no a una inhibición de la proliferación. También se confirma el efecto diferencial entre las distintas líneas celulares derivadas de tumores hematológicos.



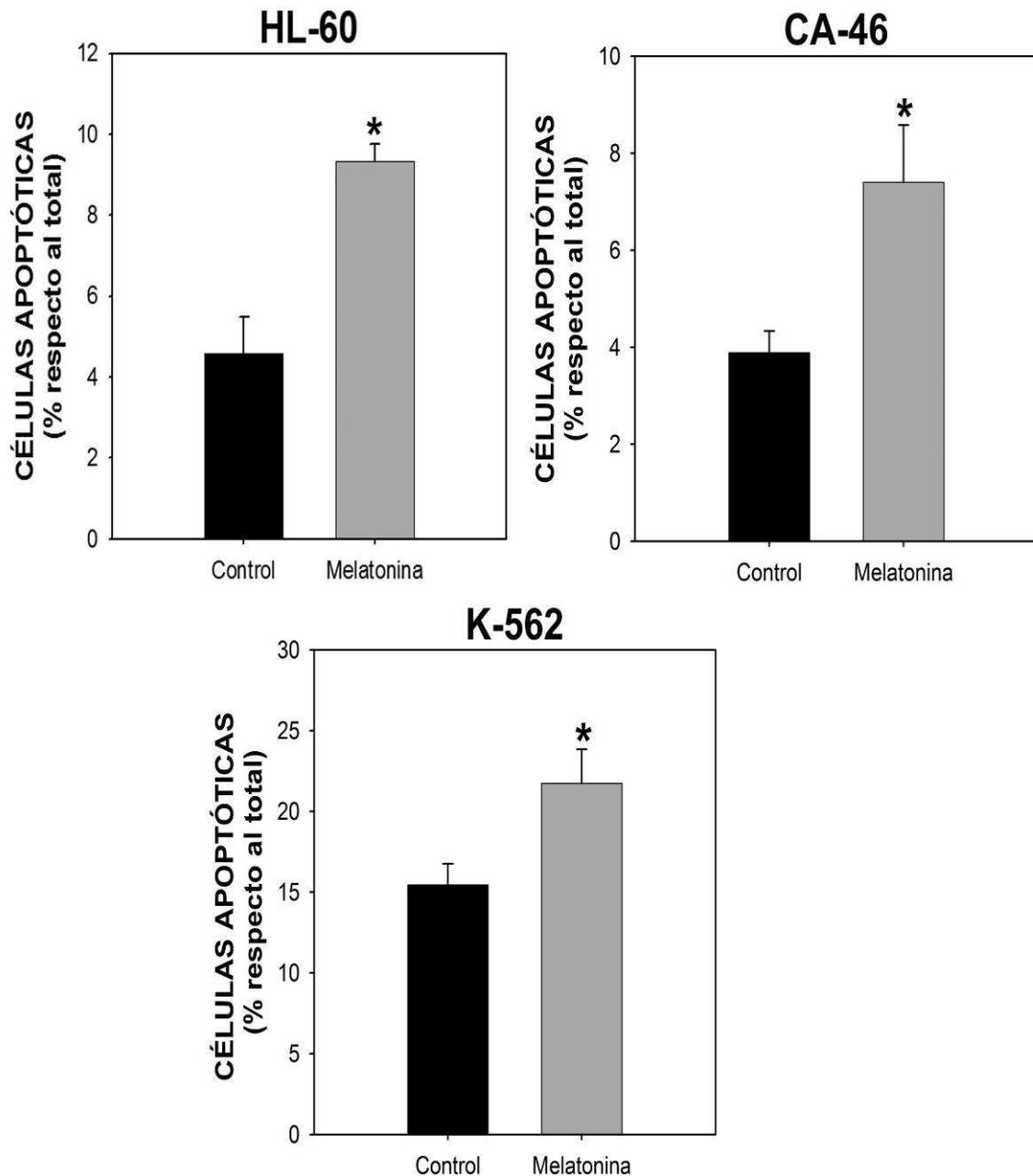
**Figura 16.** La melatonina produce un incremento de la muerte celular en las líneas celulares derivadas de tumores hematológicos. Se ha representado la citotoxicidad de 1 mM de melatonina durante 72 horas y 6 días de tratamiento utilizando el ensayo de LDH liberada. \*  $p < 0,001$  vs. grupo sin tratamiento (Control).



### **1.3. LA MUERTE CELULAR INDUCIDA POR LA MELATONINA ES DE TIPO APOPTÓTICO**

El efecto citotóxico de la melatonina en las líneas celulares derivadas de tumores hematológicos puede implicar distintos mecanismos de muerte celular. De estos mecanismos, los que han sido mejor estudiados y caracterizados son la apoptosis y la necrosis. La necrosis implica un proceso de muerte accidental con daño y desestructuración de las membranas biológicas y pérdida de la función de orgánulos celulares. La apoptosis, en cambio, se refiere a un proceso de muerte celular programada, regulado por la síntesis protéica y donde se mantiene la funcionalidad de los orgánulos celulares hasta el final del proceso (Wyllie, 1997). Para conocer el tipo de muerte celular implicado en el efecto citotóxico de la melatonina, realizamos dos técnicas: la unión de Anexina-V y el análisis morfológico mediante Microscopía Electrónica de Transmisión.

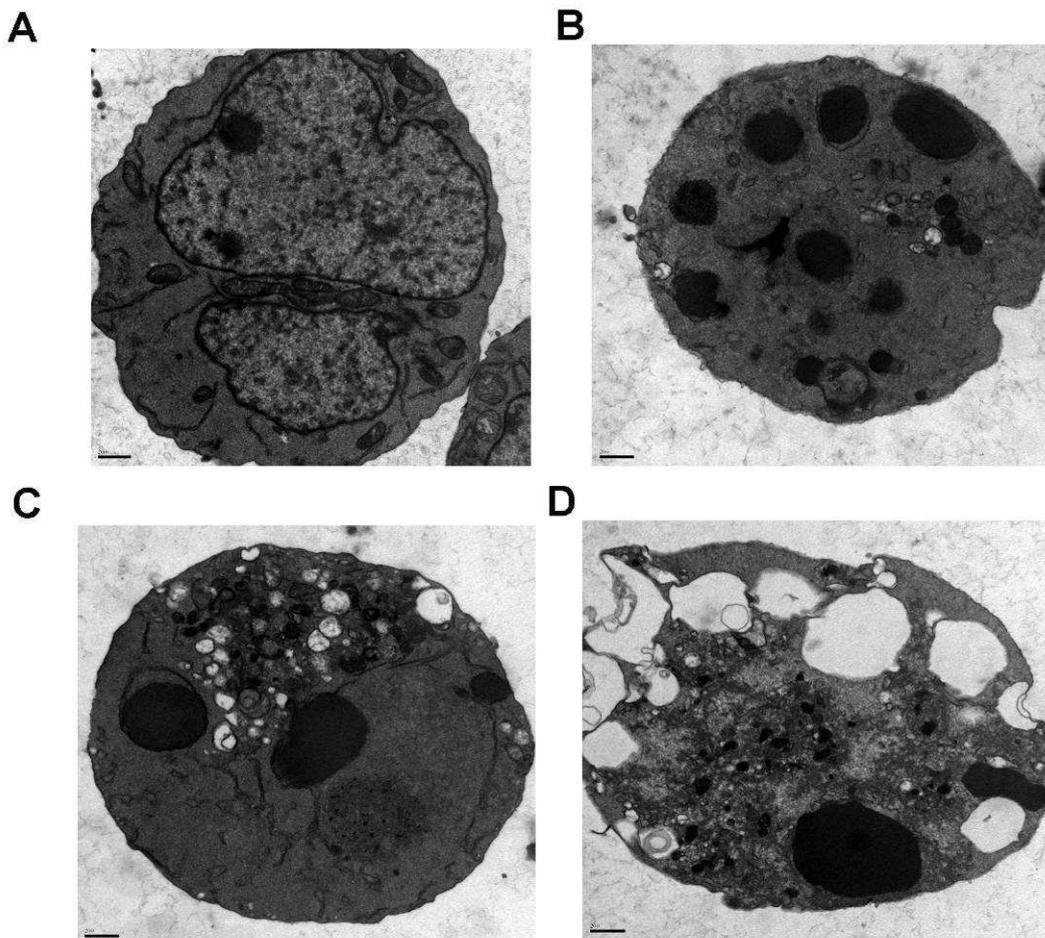
Uno de los procesos que se producen durante la apoptosis es la translocación de la fosfatidilserina de la cara interna a la cara externa de la membrana citoplasmática (Kerr y cols, 1994). Este proceso está mediado por unas proteínas transmembrana denominadas flipasas. Anexina V es una proteína que se une a fosfolípidos, particularmente cuenta con alta afinidad por la fosfatidilserina, pudiendo detectar gracias a esta proteína el proceso apoptótico. Para aplicar esta técnica tratamos las líneas celulares HL-60, CA-46 y K-562 durante 72 horas con 1 mM de melatonina. Seleccionamos estas líneas ya que mostraron los mejores resultados tras el tratamiento con la indolamina en los estudios previos. En las tres líneas celulares se observa un incremento de las células anexina V positivas, siendo, en el caso de las HL-60 y CA-46 incluso el doble que en el control (Figura 17). Estos resultados indican que el proceso citotóxico mediado por la melatonina es de tipo apoptótico.



**Figura 17.** La melatonina produce un incremento de células apoptóticas en las líneas celulares derivadas de tumores hematológicos HL-60, CA-46 y K-562. Se muestra el porcentaje de células apoptóticas tras el tratamiento durante 72 horas de las líneas celulares con 1 mM de melatonina. \*  $p < 0,001$  vs. grupo sin tratamiento (Control).

La muerte de tipo apoptótico fue confirmada mediante el uso de la Microscopía Electrónica de Transmisión, permitiéndonos visualizar los cambios morfológicos ultraestructurales producidos durante el proceso citotóxico mediado por la melatonina, en la línea celular HL-60. Tras el tratamiento durante 48 horas con 1 mM de melatonina

observamos las diferencias respecto a la célula control (Figura 18A). El resto de las figuras muestran los distintos estadios apoptóticos, que se caracterizan por la condensación y marginación progresiva de la cromatina en masas bien definidas que son más pequeñas en estadios iniciales del proceso (Figura 18B) que en estadios más avanzados (Figura 18C), en los que se mantiene la integridad de la membrana plasmática. En las últimas fases, se pierde la integridad de la membrana plasmática debido a necrosis asociada a apoptosis (Figura D).



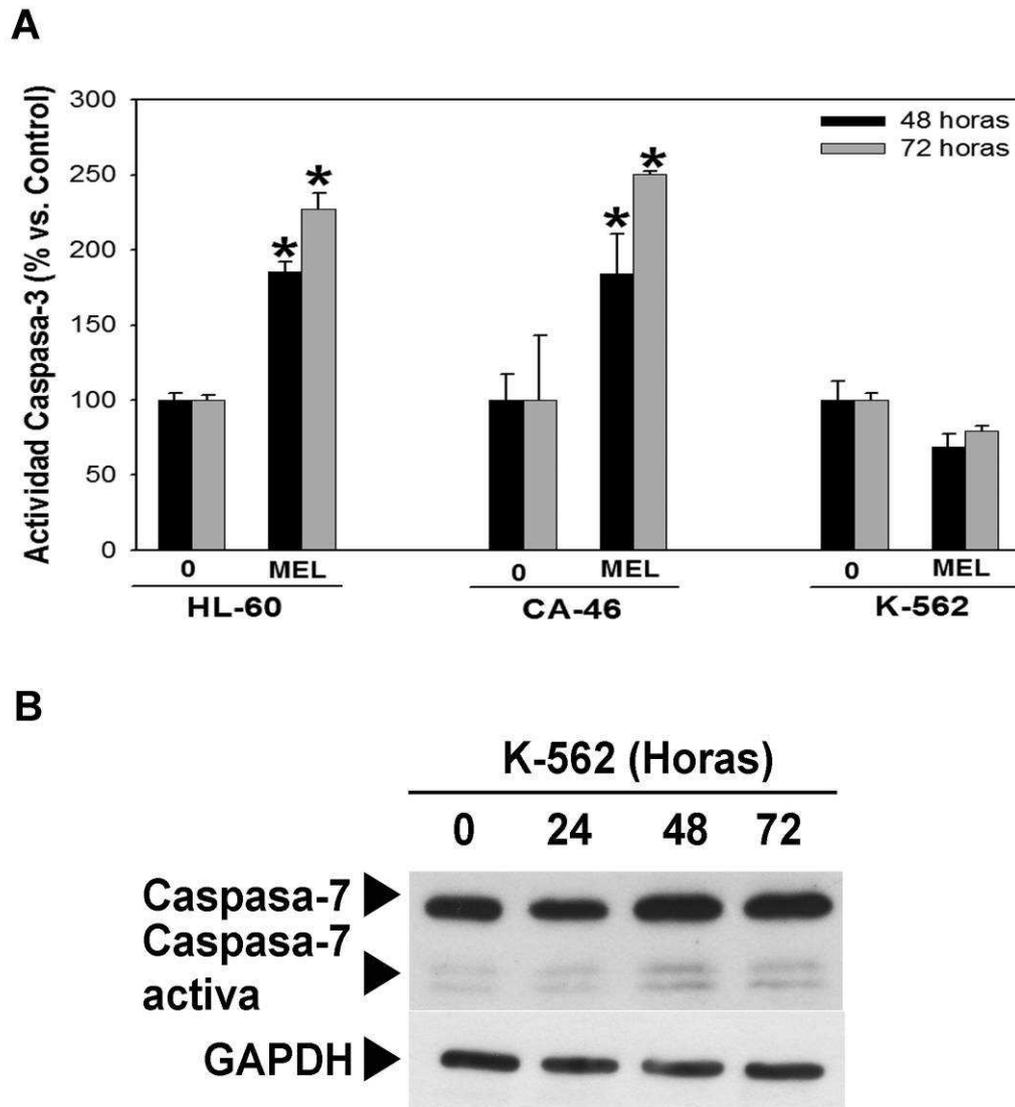
**Figura 18.** Imágenes de microscopía electrónica de la apoptosis inducida por la melatonina 1 mM en células HL-60 tras 48 horas de incubación. A) Célula sin tratamiento (Control). B-E) Estadios progresivos del proceso apoptótico. Barra: 1  $\mu$ M.

## 2. VÍAS APOPTÓTICAS IMPLICADAS EN LA ACCIÓN DE LA MELATONINA EN LAS CÉLULAS DERIVADAS DE TUMORES HEMATOLÓGICOS

### **2.1. ESTUDIO DE LA ACTIVACIÓN DE CASPASAS EFECTORAS**

La apoptosis se asocia clásicamente a la activación de la cascada de cisteína proteasas, denominadas caspasas, entre las que se encuentran las caspasas 3 y 7, caspasas efectoras, puesto que cuando se activan el proceso apoptótico es irreversible.

Una vez comprobado que la melatonina induce apoptosis en las líneas celulares derivadas de tumores hematológicos se analizó la actividad de la caspasa-3 en las tres líneas celulares anteriormente utilizadas, HL-60, CA-46 y K-562. Se trataron las células durante 48 y 72 horas con 1 mM. Tanto en la línea celular HL-60 como en la línea celular CA-46, observamos un incremento de la actividad caspasa-3, de un 185% a las 48 horas a aproximadamente un 230% a las 72 horas (Figura 19A). Sin embargo, la línea celular K-562 no muestra un incremento en la actividad de esta caspasa efectora. Por esta causa, en estas células decidimos analizar la activación mediante análisis Western blot de la caspasa efectora, caspasa-7 tras 24, 48 y 72 horas de incubación con 1 mM de melatonina. Ya a las 48 horas se observa la rotura y por tanto, la activación de esta caspasa efectora, indicando que en estas células la apoptosis se desencadena utilizando la Caspasa-7 (Figura 19B).



**Figura 19.** La melatonina produce un incremento de la actividad caspasa-3 y de la activación de la caspasa-7 en células derivadas de tumores hematológicos. A) Actividad caspasa-3 determinada en células HL-60, CA-46 y K-562 tras 48 y 72 horas de tratamiento con 1 mM de melatonina. \*  $p < 0,001$ . B) Análisis Western blot de la activación de caspasa-7 en las células K-562 tras 24, 48 y 72 horas de incubación con 1 mM de melatonina.

## **2.2. ANÁLISIS DE LAS VÍAS APOPTÓTICAS IMPLICADAS EN LA ACCIÓN DE LA MELATONINA**

Existen dos vías apoptóticas desencadenantes del proceso de muerte celular programada:

- La vía intrínseca o mitocondrial, que responde principalmente a señales no dependientes de receptores de muerte para la activación del proceso apoptótico y cuya caspasa reguladora es la caspasa-9. La señal de muerte celular produce la salida del citocromo c de la mitocondria, que se asocia al complejo procaspasa-9/Apaf 1 para formar el apoptosoma. Su formación induce la rotura proteolítica y por tanto activación de la procaspasa-9. Una vez activada, ésta puede activar a su vez a otros miembros de la familia de las caspasas, como las caspasas 3 o 7, iniciándose con ello el proceso apoptótico.

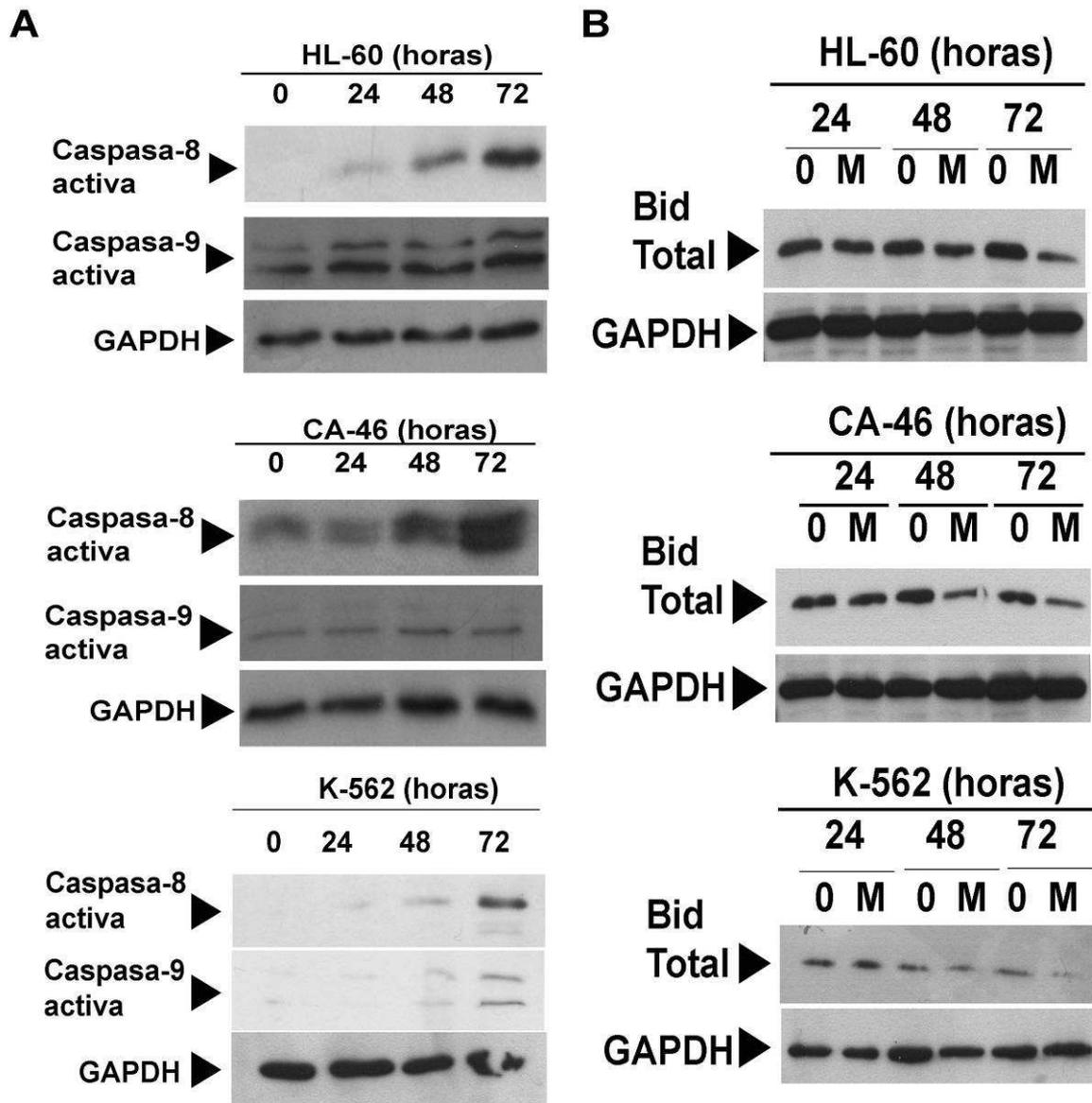
- La vía extrínseca o la vía de los receptores de muerte, puesto que es inducida por señales extracelulares, está principalmente asociada a la unión de un ligando a los receptores de muerte que se encuentran en la superficie celular y que producen la activación de la maquinaria apoptótica, para finalmente inducir la muerte celular. En este caso, la caspasa reguladora que activará a las caspasas efectoras es la caspasa-8.

Ambas vías se interrelacionan a través de la proteína de la familia Bcl-2, Bid. La caspasa-8 puede activar esta proteína mediante proteólisis, produciendo el fragmento activo tBid (Li y cols, 1998; Luo y cols, 1998), que a su vez produce la activación de Bax o Bak (Eskes y cols, 2000; Wei y cols, 2000), que inducen la liberación del citocromo c y la activación de la caspasa-9.

Dado que la melatonina induce un proceso apoptótico en las líneas celulares derivadas de tumores hematológicos, y que se activan las caspasas efectoras de estas vías, la caspasa-3 y la caspasa-7, decidimos estudiar las vías apoptóticas implicadas en este efecto, mediante el análisis Western blot de la activación de las principales proteínas reguladoras de estas vías, las caspasas 8 y 9. Al igual que en experimentos previos, tomamos como modelo las tres líneas celulares HL-60, CA-46 y K-562 y las tratamos durante 24, 48 y 72 horas con 1 mM de melatonina. En los tres casos, observamos la activación de la caspasa-8 ya a las 24 horas de incubación con la indolamina (Figura 20A).



También es patente la activación de la caspasa-9, activándose a distintos tiempos dependiendo de la línea celular. De esta manera, a las 24 horas se observa la activación de la caspasa-9 en la línea celular HL-60, retrasándose a las 48 horas en las líneas celulares CA-46 y K-562 (Figura 20A). Dada la activación de ambas vías, el paso siguiente era analizar la activación de Bid en estas células tras 24, 48 y 72 horas de tratamiento con 1 mM de melatonina. Como se observa en la Figura 20B, se produce un descenso en la expresión de Bid total, lo que sugiere un incremento de la forma truncada y activa tBid, en las tres líneas celulares analizadas. Estos datos indican que la activación de la vía extrínseca de la apoptosis podría amplificar la señal apoptótica mediante la activación de Bid, que subsecuentemente, activaría la vía intrínseca mitocondrial, provocando ambas vías la muerte celular.



**Figura 20.** La melatonina produce la activación de las vías apoptóticas en las líneas celulares derivadas de tumores hematológicos. A) Análisis Western blot de la activación de las caspasas reguladoras de las vías apoptóticas, Caspasa-8 (vía extrínseca) y Caspasa-9 (vía intrínseca) y la expresión de GAPDH tras el tratamiento con 1 mM de melatonina durante los tiempos de incubación indicados. B) Análisis Western blot de la expresión de Bid total y de GAPDH tras el tratamiento con Melatonina 1 mM durante los tiempos de incubación indicados.



### 3. MECANISMOS DE ACCIÓN DE LA MELATONINA

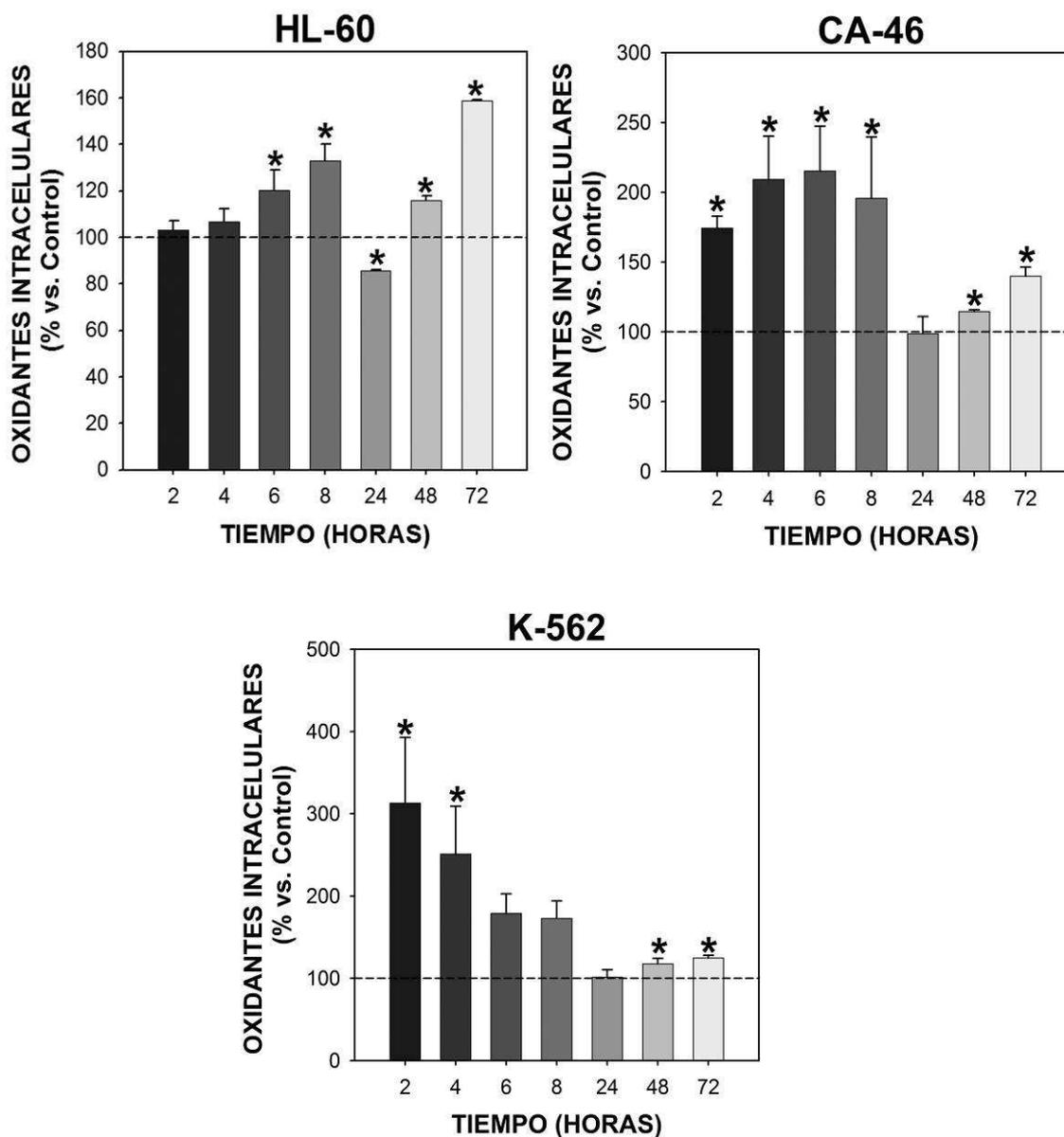
#### **3.1. IMPLICACIÓN DEL ESTRÉS OXIDATIVO INTRACELULAR EN LA SEÑALIZACIÓN DE LA VÍA EXTRÍNSECA DE LA APOPTOSIS**

Uno de los principales efectos descritos para la melatonina es su acción antioxidante, de forma directa o potenciando las defensas antioxidantes intracelulares. En células de cáncer de ovario o de glioma, se ha observado que las propiedades antioxidantes de la melatonina podrían mediar los efectos antitumorales de la misma. Teniendo en cuenta estos estudios y los resultados previos obtenidos en las líneas celulares derivadas de tumores hematológicos, decidimos estudiar el papel del estrés oxidativo intracelular en la inducción de apoptosis en estas células.

Tomando de nuevo como modelo las líneas HL-60, CA-46 y K-562, se trataron durante 2, 4, 6, 8, 24, 48 y 72 horas con melatonina 1 mM. Tras los tiempos de incubación se analizaron los oxidantes intracelulares generados, utilizando el profluorógeno oxidable diacetato de 2', 7'-diclorofluoresceína (DCFH-DA) (Figura 21). En las tres líneas celulares se observaron dos fases de aumento de los radicales libres dependientes del tiempo. Un incremento temprano, que en la línea celular HL-60 aparece entre las 6-8 horas de tratamiento, y un incremento tardío, que empieza a las 48 horas y se continúa a las 72 horas. En el caso de la línea celular CA-46, el incremento temprano se produce ya a las 2 horas, y el tardío nuevamente empieza a las 48 horas. La línea celular K-562, muestra también un incremento entre las 2-4 horas, volviendo a aumentar los radicales libres a partir de las 48 horas.

Estos resultados están en contraposición con los previos observados en otros tipos de células tumorales y con las propiedades clásicas de la melatonina, que es considerada una molécula antioxidante. Sin embargo, estas dos fases de incremento de radicales libres podrían mostrar dos etapas del proceso apoptótico mediado por la indolamina: una etapa temprana en la que se observa un incremento transitorio de oxidantes intracelulares,

relacionándose este probablemente con la señalización de la vía extrínseca de la apoptosis después del ensamblaje del DISC; y una etapa tardía en la que el incremento de radicales libres sería consecuencia del daño celular generado por el propio proceso apoptótico.



**Figura 21.** La melatonina induce un incremento de oxidantes intracelulares en las líneas celulares derivadas de tumores hematológicos. La melatonina 1 mM induce un incremento transitorio de los peróxidos intracelulares entre las 2-8 horas de incubación dependiendo de la línea celular. El segundo aumento se produce tras 48 y 72 horas de incubación. \*  $p < 0,001$  vs. grupo sin tratamiento (Control).

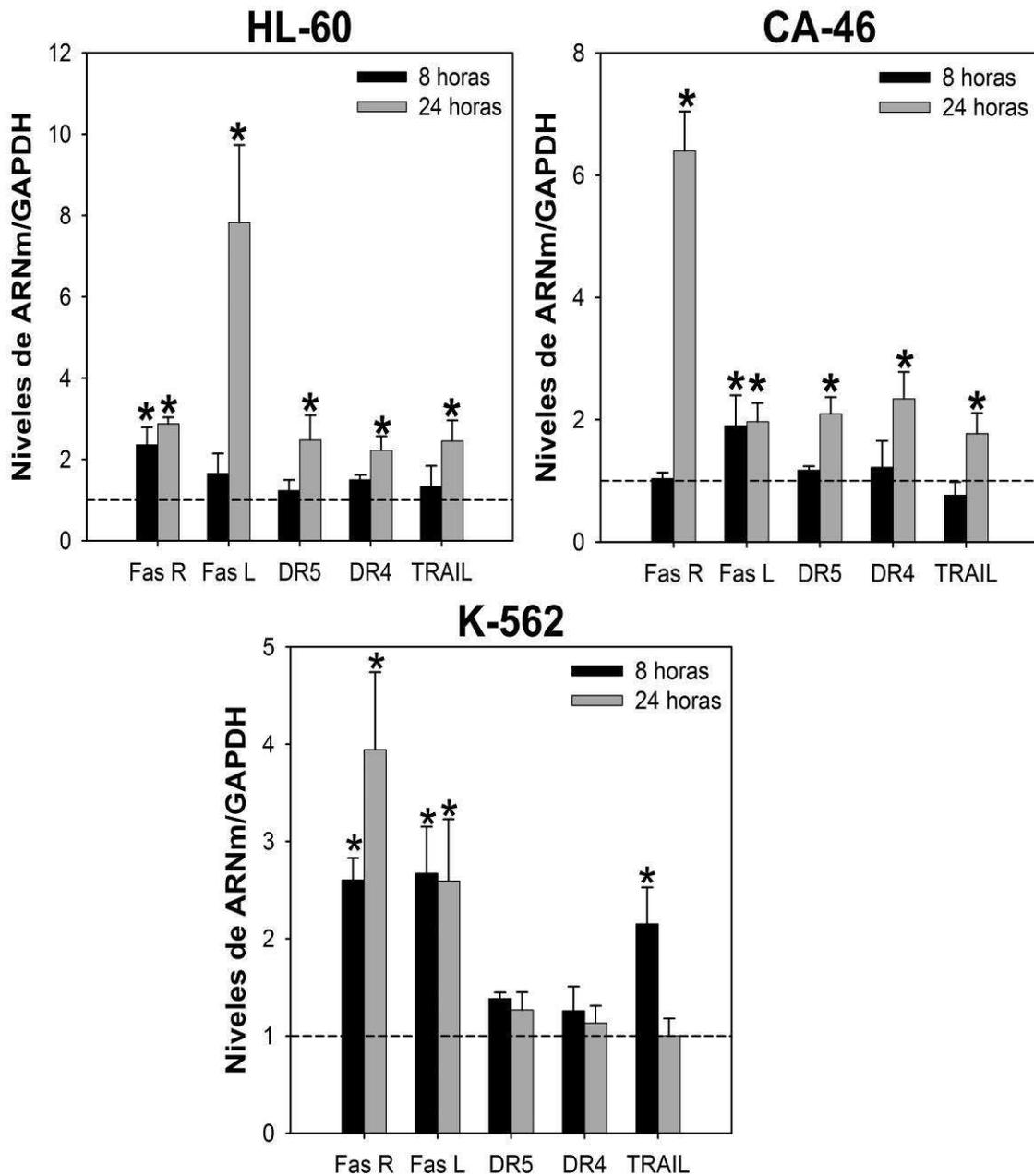


### **3.2. LA MELATONINA INDUCE LA ACTIVACIÓN DE LOS RECEPTORES DE MUERTE Y SUS LIGANDOS**

Para que la vía extrínseca de la apoptosis sea activada, se requiere la unión de los correspondiente ligandos a los receptores de muerte presentes en la membrana celular, entre los que se incluyen el TNFR, Fas/CD95, DR3, DR4 y DR5. Estos receptores de muerte se caracterizan por la presencia de un dominio intracelular único denominado dominio de muerte, crucial para la transducción de la señal apoptótica. Los ligandos para estos receptores de muerte son TNF- $\alpha$ , para TNFR, FasL para Fas/CD95 y TRAIL para DR3, DR4 y DR5.

Puesto que la melatonina, en las líneas celulares derivadas de tumores hematológicos produce la activación de la vía extrínseca de la apoptosis, decidimos analizar si esta activación podría estar relacionada con la acción de los receptores de muerte.

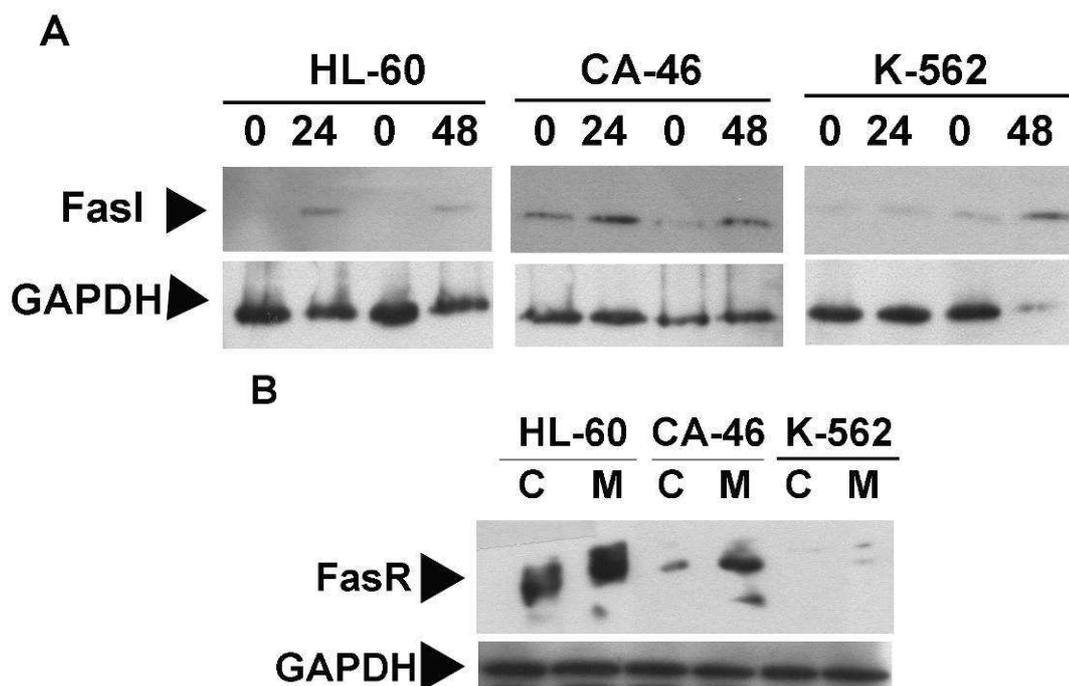
Para tal fin, y tras 8 y 24 horas de tratamiento con 1 mM de la indolamina, analizamos en las tres líneas celulares objeto de estudio, la expresión de Fas, DR4 y DR5 así como sus ligandos FasL y TRAIL, mediante PCR a tiempo real (Figura 22). Encontramos un incremento tanto de los ligandos como de los receptores en las tres líneas estudiadas, aunque con diferencias entre las mismas. En la línea celular HL-60, se observa un incremento a las 24 horas de Fas, FasL, DR4, DR5 y TRAIL. La expresión de FasL aumenta hasta 7 veces más respecto al control. En la línea celular CA-46, en cambio, es FasR el que tiene un aumento más acusado tras 24 horas de incubación (más de seis veces respecto al control), encontrando un incremento más moderado en FasL, TRAIL, DR4 y DR5. En la línea celular K-562, TRAIL aumenta el doble su expresión a las 8 horas de tratamiento. Sin embargo, los que parecen activarse más son FasR y su ligando, que muestran un aumento muy acusado (hasta 4 y 3 veces respectivamente), tras 24 horas de tratamiento.



**Figura 22 .** La muerte celular inducida por la melatonina en las líneas celulares derivadas de tumores hematológicos es mediada por un incremento en la expresión de los receptores de muerte y sus ligandos. Niveles de ARNm de los receptores de muerte Fas, DR5, DR4 y sus ligandos FasL y TRAIL, analizados por PCR a tiempo real tras 8 y 24 horas de tratamiento con 1 mM de melatonina. \*  $p < 0,001$  vs. línea basal (línea discontinua, control no tratado).

Dado que es el tándem FasR/FasL el que modifica su expresión más acusadamente en las tres líneas celulares, decidimos analizar si este incremento en la expresión de ARNm venía acompañado de un incremento en la expresión protéica. Para ello, tratamos las tres líneas celulares durante 24 y 48 horas con 1 mM de melatonina, tras este tiempo recogimos

extractos protéicos y analizamos la activación de FasL mediante análisis Western blot. En las tres líneas celulares, se observa un incremento en la expresión de esta proteína, principalmente tras 24 horas de incubación con la indolamina. Para analizar la expresión de FasR, tratamos las células durante 24 horas con 1 mM de melatonina, observamos igualmente un incremento en la activación de esta proteína (Figura 23).

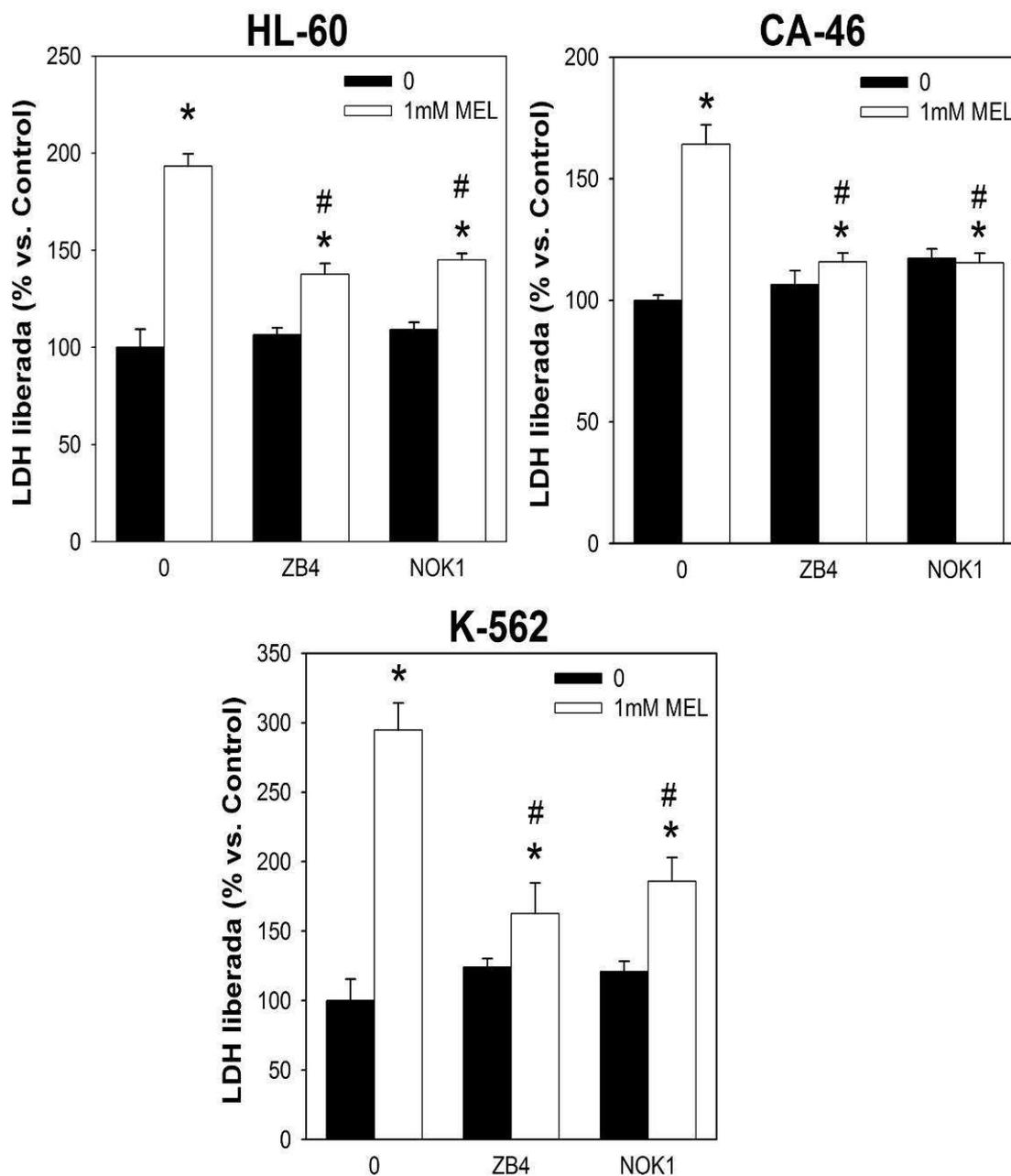


**Figura 23.** Análisis Western blot de la activación de FasL y FasR en las líneas celulares HL-60, CA-46 y K-562 tras el tratamiento con 1 mM de melatonina. A) Análisis Western de la activación de FasL tras 24 y 48 horas de tratamiento. B) Análisis Western de la activación de FasR tras 24 horas de tratamiento.

Para saber si este incremento en la expresión de los receptores de muerte y sus ligandos es la causa principal de la muerte celular inducida por la melatonina en estas células, decidimos bloquear la unión de FasR y de su ligando y analizar mediante el ensayo de liberación de LDH, si la muerte celular inducida por la melatonina se veía afectada.

Para ello, pretratamos las tres líneas celulares con 750 ng/ml de un anticuerpo bloqueante de Fas R, el clon ZB4 y 750 ng/ml de un bloqueante de FasL, el clon NOK1. Después de 2 horas de incubación, tratamos las células con 1 mM de melatonina. A las 72 horas de incubación con los compuestos, observamos en las tres líneas celulares un descenso en la muerte celular inducida por la melatonina tanto con su combinación con

ZB4 como con su combinación con NOK1, indicando que la unión de FasR/FasL es necesaria para el efecto citotóxico de la melatonina (Figura 24).

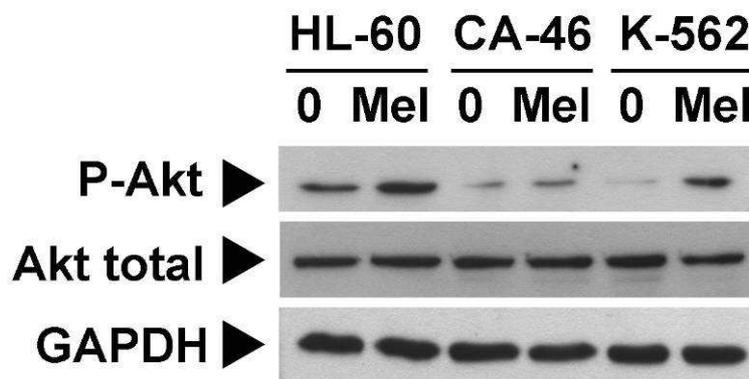


**Figura 24.** La unión FasR/FasL es necesaria para el efecto citotóxico de la melatonina. Las tres líneas celulares fueron preincubadas con un anticuerpo bloqueante de Fas R, el clon ZB4 y un bloqueante de FasL, el clon NOK1. Tras 72 horas de tratamiento con melatonina 1 mM la muerte celular fue determinada por el ensayo de liberación de LDH. \*  $p < 0,001$  vs. grupo control; #  $p < 0,001$  vs. grupo tratado sólo con melatonina.

### **3.3. LA ACTIVACIÓN DE Akt POR LA MELATONINA ESTÁ RELACIONADA CON LA REGULACIÓN DE LA VÍA EXTRÍNSECA DE LA APOPTOSIS**

La proteína Akt, también llamada proteína quinasa B (PKB), es conocida por participar en el proceso de supervivencia celular ya que fosforila e inactiva muchas proteínas implicadas en la cascada de señalización apoptótica o activa vías que inducen la síntesis de moléculas antiapoptóticas. Sin embargo, recientemente se ha observado que la vía PI3K/Akt podría regular la expresión de Fas/FasL (Ivanov y cols, 2002; Lu y cols, 2006). Teniendo en cuenta lo anterior y que la melatonina parece regular la activación de Akt (Martín y cols, 2006), decidimos analizar la posible implicación de Akt en el efecto citotóxico de la melatonina en las líneas celulares derivadas de tumores hematológicos.

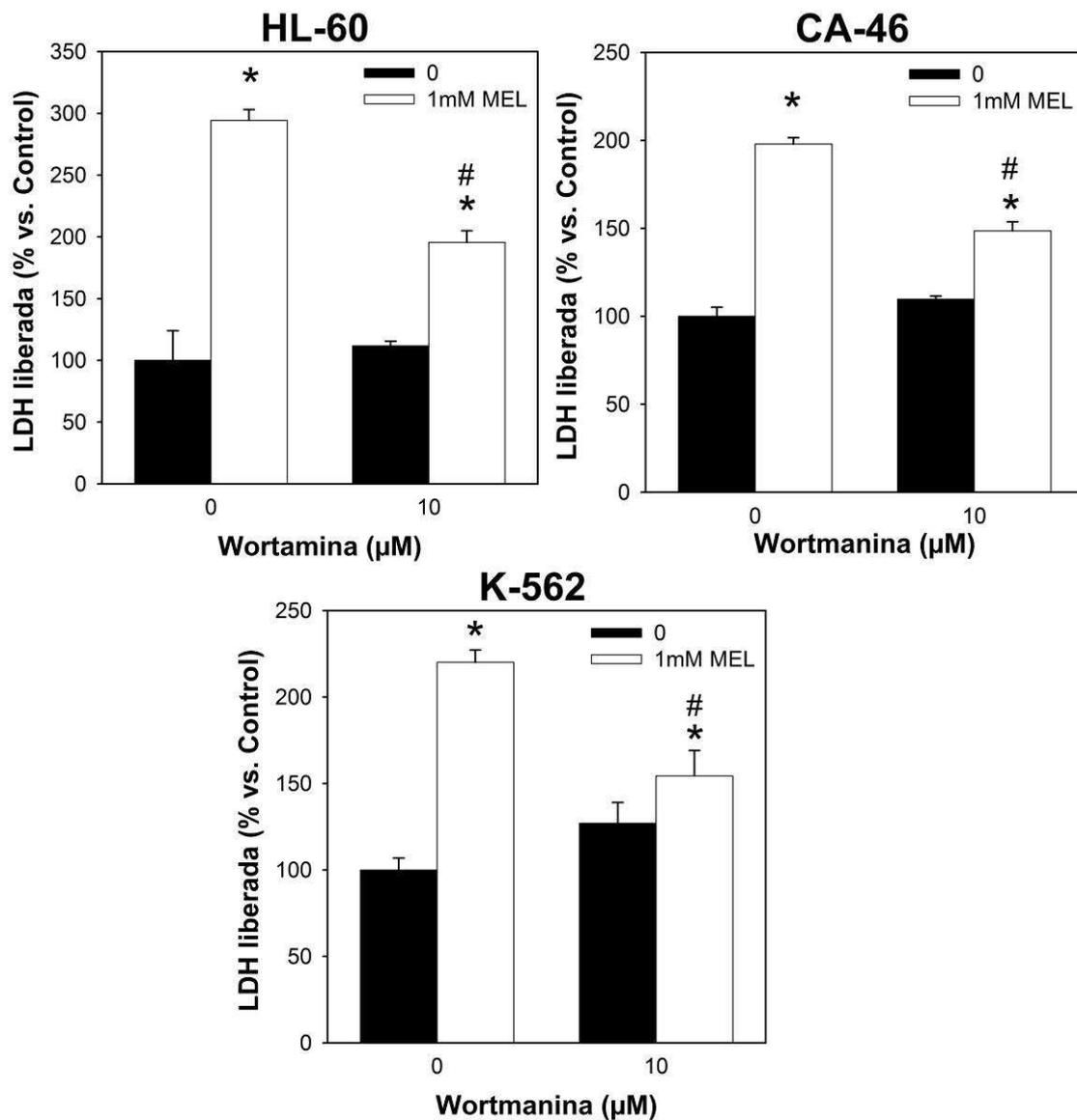
Tras 24 horas de tratamiento con 1 mM de melatonina, mediante análisis Western blot observamos que la fosforilación de Akt, y por tanto su activación, se incrementa en las tres líneas celulares tomadas como modelo para el estudio (Figura 25).



**Figura 25.** La melatonina induce la fosforilación de Akt. Análisis Western blot de la fosforilación de Akt (activación) en HL-60, CA-46 y K-562 tras 24 horas de tratamiento con 1 mM de melatonina, utilizando anticuerpos contra Akt fosforilado y total. La GAPDH fue utilizada como un control de carga de proteína.

Para conocer si esta fosforilación de Akt es determinante en el efecto citotóxico de la melatonina, pretratamos durante dos horas las células con un inhibidor de la vía PI3K/Akt, la wortmanina a una concentración de 10  $\mu$ M. Tras este tiempo, tratamos las células con 1 mM de melatonina durante 72 horas. Analizamos entonces el efecto del inhibidor sobre la citotoxicidad de la melatonina mediante el ensayo de liberación de LDH.

En las tres líneas celulares, la wortmanina previene parcialmente el efecto citotóxico de la melatonina (Figura 26). En el caso de la línea celular HL-60 el porcentaje de liberación de LDH pasa de un 294% al tratar las células con melatonina solamente a un 195% al tratarlas con melatonina y wortmanina. En la línea celular CA-46 pasa de un 197% a un 148%. Obtuvimos resultados similares en la línea celular K-562, pasando de un 220% a un 154%.

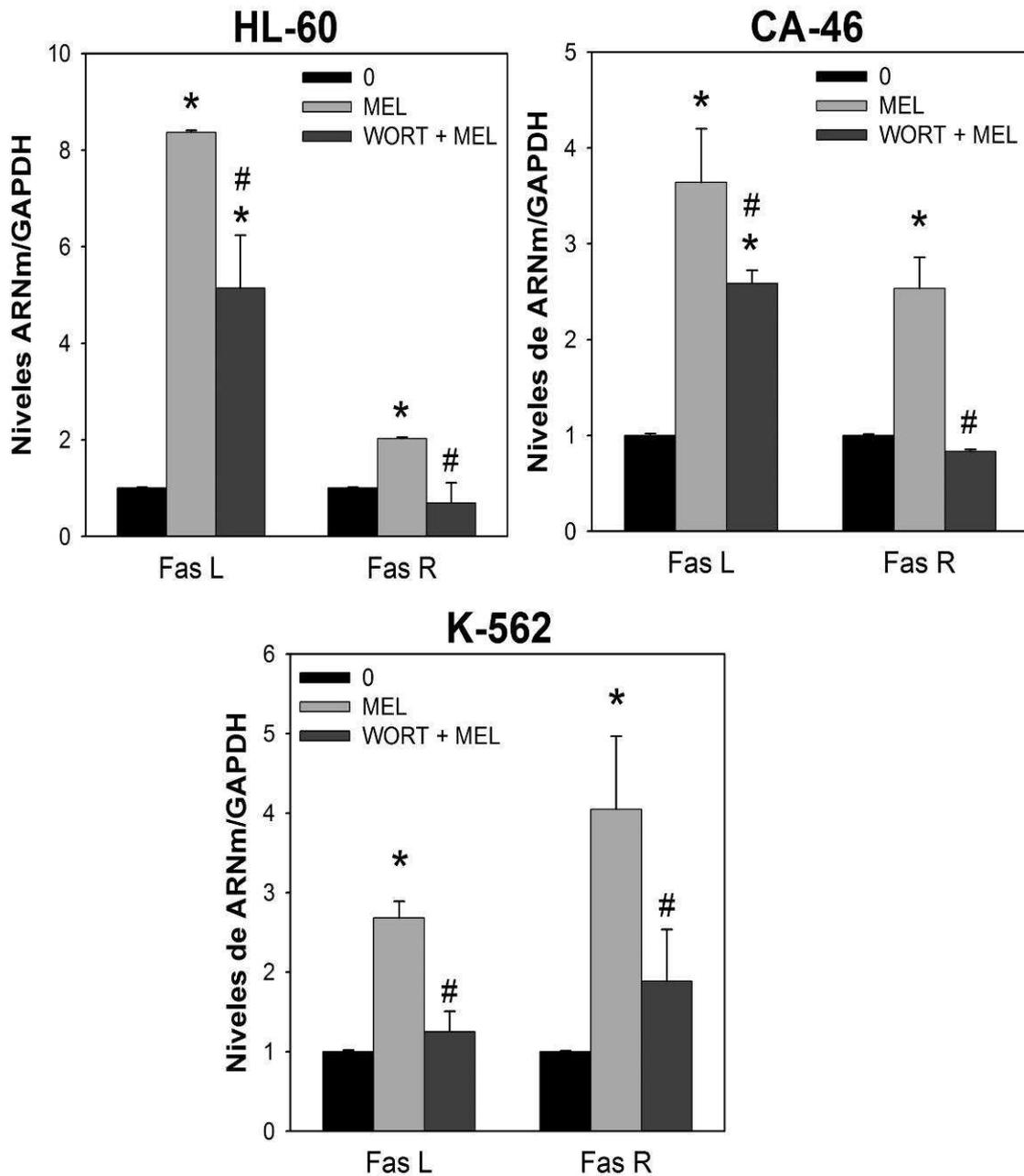


**Figura 26** . La muerte celular inducida por la melatonina en las líneas celulares derivadas de tumores hematológicos está mediada por la activación de Akt. HL-60, CA-46 y K-562 fueron incubadas durante 72 horas con melatonina y co-incubadas con el inhibidor de PI3K, wortmanina en concentración 10 µM. La muerte celular fue determinada mediante el ensayo de liberación de LDH. \*  $p < 0,001$  vs. grupo sin tratamiento (Control); #  $p < 0,001$  vs. grupo tratado con melatonina.



Debido a estos resultados, estudiamos también si la wortmanina podría prevenir el incremento de la expresión del receptor de muerte FasR y su ligando FasL tras el tratamiento con melatonina. De nuevo, pretratamos las células con wortmanina 10  $\mu$ M durante dos horas y posteriormente las incubamos 24 horas con melatonina, analizando mediante PCR a tiempo real la expresión de FasR y FasL. En la figura 27, en las tres líneas celulares observamos que la expresión de FasL es inhibida parcialmente por la wortmanina, pasando los niveles de expresión de un 8,3 con la melatonina solamente a un 5,1 al añadir el inhibidor en la línea celular HL-60. En la línea celular CA-46, la expresión disminuye de un 3,6 a un 2,5. Por último en la línea celular K-562, la expresión de FasL pasa de un 2,6 a un 1,2. No encontramos los mismos resultados al analizar la expresión del receptor, FasR, ya que observamos que tanto en la línea celular HL-60 como en la línea celular CA-46 su expresión es completamente inhibida, pasando de un 2 a un 0,7 y de un 2,5 a un 0,8 respectivamente. En la línea celular K-562, su expresión es parcialmente inhibida, pasando de un 4 a un 1,8 al tratarlas conjuntamente con el inhibidor.

El resultado de estos experimentos indica que la activación de Akt está implicada en el efecto citotóxico de la melatonina y en la activación de la vía extrínseca de la apoptosis.



**Figura 27.** El incremento en la expresión de Fas/FasL inducido por la melatonina en las líneas celulares derivadas de tumores hematológicos está mediado por un incremento en la activación de Akt. Las células fueron tratadas durante 24 horas con melatonina y co-incubadas con wortmanina 10  $\mu$ M, analizando los niveles de expresión del ARNm de FasR y FasL mediante PCR a tiempo real. Los niveles de expresión fueron relativizados respecto al nivel basal (grupo sin tratamiento). \*  $p < 0,001$  vs. grupo sin tratamiento (Control); #  $p < 0,001$  vs. grupo tratado con melatonina.

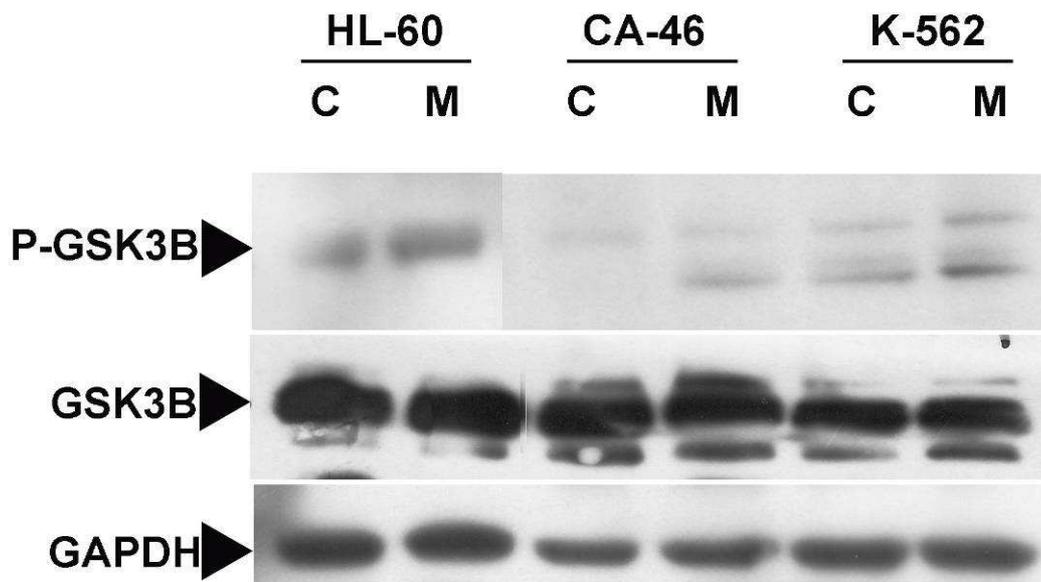


### **3.4. EN EL EFECTO APOPTÓTICO DE LA MELATONINA ESTÁ IMPLICADA LA GLUCOGENO SINTASA 3 QUINASA $\beta$ , UNA DE LAS DIANAS DE Akt**

La Glucógeno Sintasa 3 quinasa (GSK-3, del inglés “glycogen synthase kinase 3”) es una serín/treonín quinasa evolutivamente muy conservada y constitutivamente activa en células no estimuladas, inactivándose mediante fosforilación en la serina 9 (Cohen y Frame, 2001). Principalmente, esta quinasa es fosforilada por Akt. En los mamíferos esta enzima presenta dos isoformas, con gran homología, la GSK-3 $\alpha$  y la GSK-3 $\beta$  (Woodgett, 1990), de las cuales la más estudiada y caracterizada en los procesos biológicos es la GSK-3 $\beta$ . Esta enzima está implicada en diversos procesos esenciales tales como el desarrollo embrionario, la síntesis protéica, proliferación y diferenciación celular, motilidad celular o apoptosis (Frame y Cohen, 2001). De hecho, se ha visto el papel ambivalente de la GSK-3 $\beta$  en la regulación del proceso apoptótico (Beurel y Jope, 2006), configurándose como una pieza central en el delicado balance entre muerte y supervivencia celular ya que entre sus sustratos se encuentran factores de transcripción como NF-ATc, que dependiendo de las señales intracelulares puede inducir la transcripción de factores antiapoptóticos o apoptóticos, como FasL (Remy y Michnick, 2004).

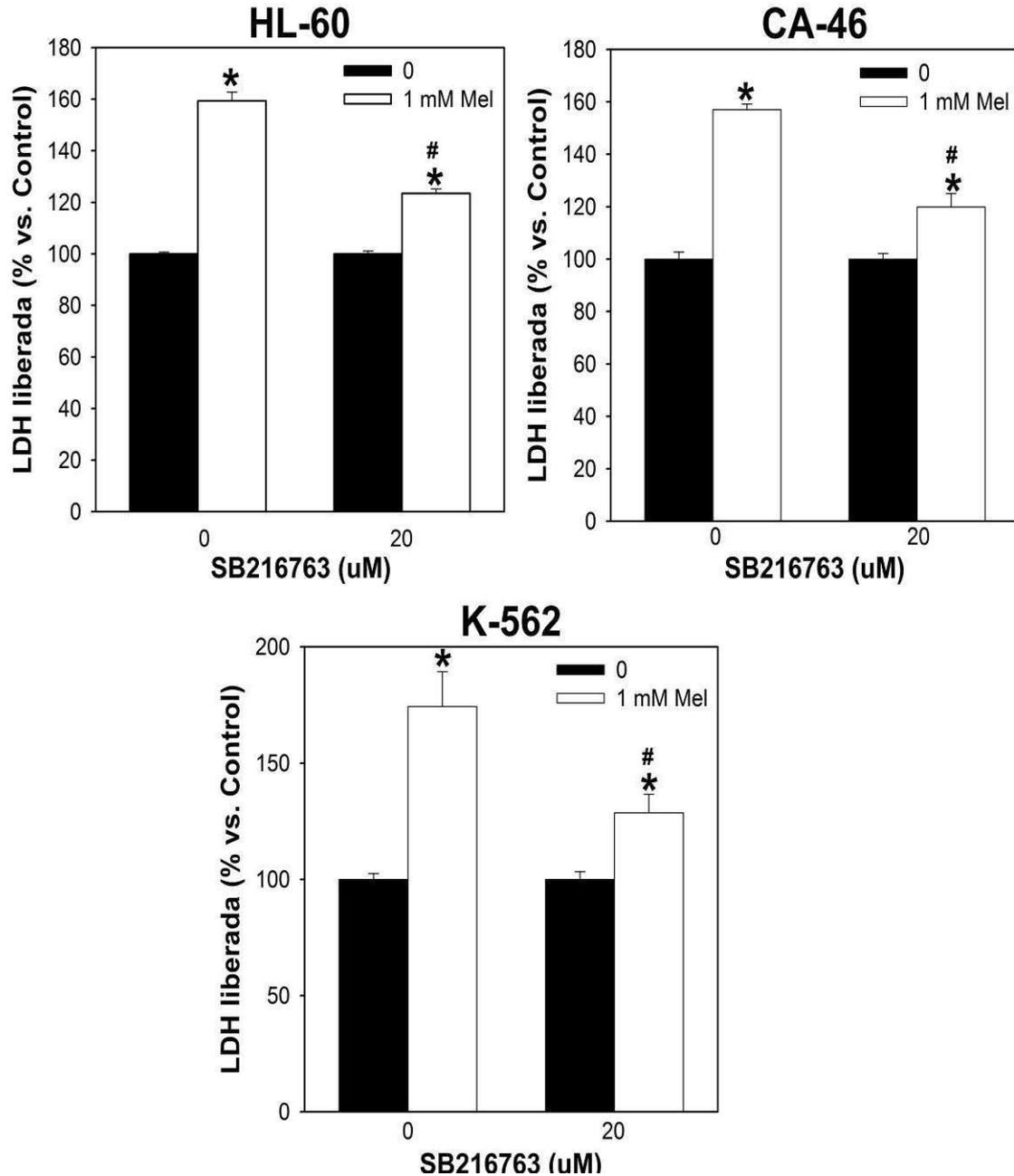
La melatonina induce la activación de Akt mediante su fosforilación y parece ser clave en el efecto proapoptótico. GSK-3 $\beta$  es una de las dianas de Akt, y estudios previos demuestran que está implicada en la regulación del proceso apoptótico. Teniendo en cuenta estos dos puntos, decidimos analizar la fosforilación y por tanto el estado de activación de GSK-3 $\beta$  tras el tratamiento con la indolamina.

Después de 24 horas de tratamiento con 1 mM de melatonina, mediante análisis Western blot observamos que la fosforilación y por tanto desactivación de GSK-3 $\beta$  se incrementa en las tres líneas celulares (Figura 28).



**Figura 28.** La melatonina induce la fosforilación de GSK-3 $\beta$ . Análisis Western blot de la fosforilación de GSK-3 $\beta$  (inactivación) en HL-60, CA-46 y K-562 tras 24 horas de tratamiento con 1 mM de melatonina, utilizando anticuerpos contra GSK-3 $\beta$  fosforilado y total. La GAPDH fue utilizada como un control de carga de proteína.

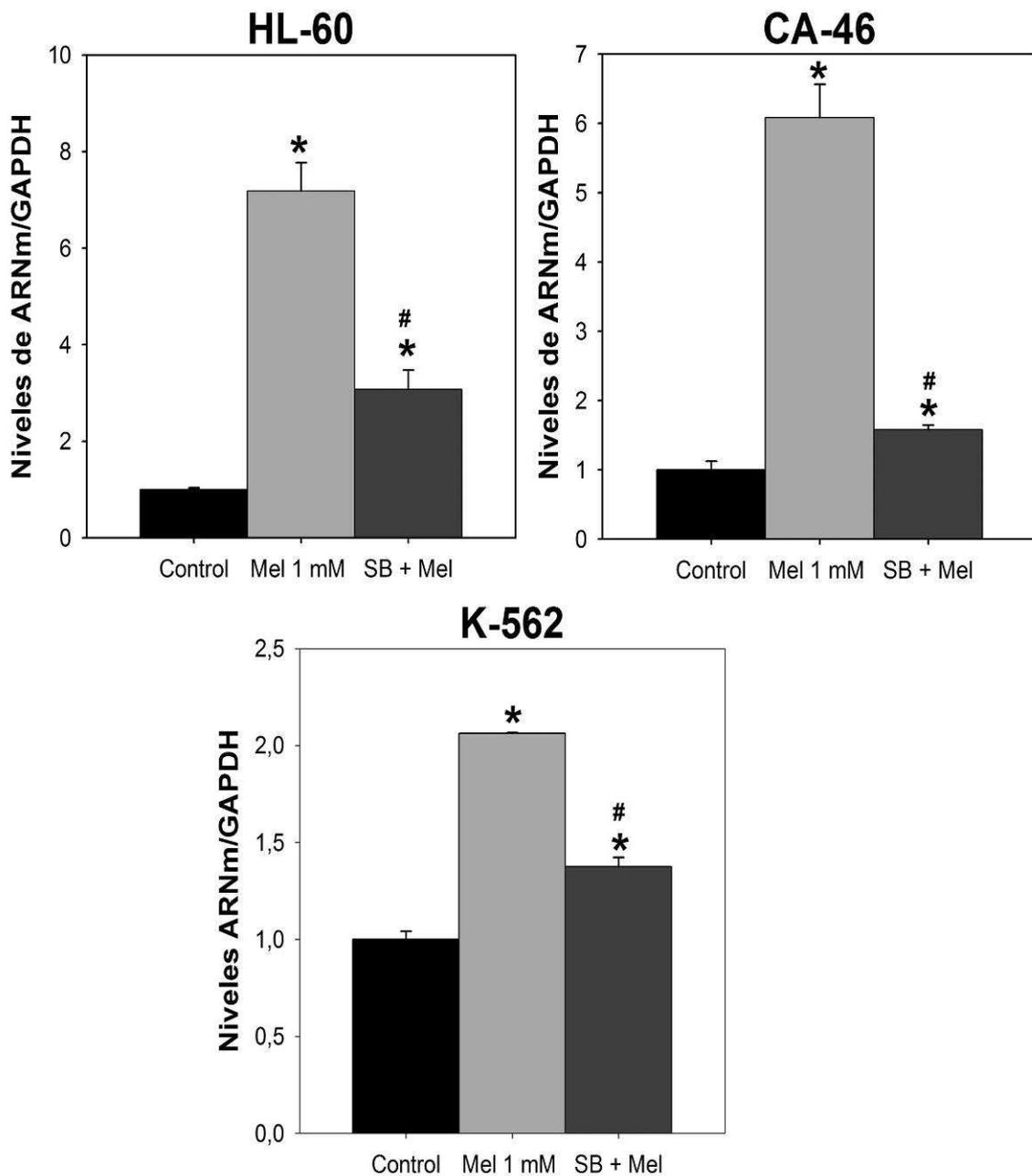
Para conocer si la desactivación de esta proteína es determinante en el efecto proapoptótico de la melatonina, pretratamos durante dos horas las células con 20  $\mu$ M de un inhibidor de la actividad de este enzima, el SB216763. Después de este tiempo, tratamos las células con 1 mM de melatonina durante 72 horas. Analizamos entonces el efecto del inhibidor sobre la citotoxicidad de la melatonina mediante el ensayo de liberación de LDH. En las tres líneas celulares, el inhibidor previene parcialmente el efecto citotóxico de la melatonina (Figura 29). En el caso de la línea celular HL-60, la liberación de LDH pasa de un 159% con la melatonina a un 123% al combinarla con el inhibidor. Resultados similares obtenemos con la línea celular CA-46, que pasa de un 157% a un 119% con el inhibidor. Por último en la línea celular K-562, se pasa de un 174% a un 128% con el inhibidor.



**Figura 29.** La muerte celular inducida por la melatonina en las líneas celulares derivadas de tumores hematológicos está mediada por la desactivación de GSK-3 $\beta$ . HL-60, CA-46 y K-562 fueron incubadas durante 72 horas con melatonina y co-incubadas con el inhibidor de GSK-3 $\beta$ , SB216763 en concentración 20  $\mu$ M. La muerte celular fue determinada mediante el ensayo de liberación de LDH. \*  $p < 0,001$  vs. grupo sin tratamiento (Control); #  $p < 0,001$  vs. grupo tratado con melatonina.

Debido a estos resultados, y a que uno de los factores de transcripción dianas de GSK-3 $\beta$ , cuando es activado puede desencadenar tanto señales proapoptóticas mediante la transcripción de FasL, estudiamos si el inhibidor podría prevenir el incremento de expresión de este ligando tras el tratamiento con melatonina. De nuevo, pretratamos las células con el inhibidor 20  $\mu$ M durante dos horas y posteriormente las incubamos durante 24 horas con melatonina, analizando mediante PCR a tiempo real la expresión de FasL (Figura 30). En las tres líneas celulares observamos que la expresión de FasL es inhibida parcialmente por el inhibidor, pasando de un 7,1 a un 3 en la línea celular HL-60. En la línea celular CA-46, se pasa de un 6 a un 1,5 al añadirle el inhibidor. Por último, en la línea celular K-562, se pasa de un 2 a un 1,3.

Estos resultados indican que la fosforilación y por tanto inactivación de GSK-3 $\beta$  mediante Akt está implicada en el efecto apoptótico de la melatonina y la activación de la vía extrínseca a través del incremento en la transcripción de FasL.



**Figura 30 .** El incremento en la expresión de FasL inducido por la melatonina en las líneas celulares derivadas de tumores hematológicos está mediado por un incremento en la inactivación de GSK-3 $\beta$ . Las células fueron tratadas durante 24 horas con melatonina y co-incubadas con SB216763 20  $\mu$ M, analizando los niveles de expresión del ARNm de FasL mediante PCR a tiempo real. Los niveles de expresión fueron relativizados respecto al nivel basal (grupo sin tratamiento) \*  $p < 0,001$  vs. grupo sin tratamiento (Control); #  $p < 0,001$  vs. grupo tratado con melatonina.

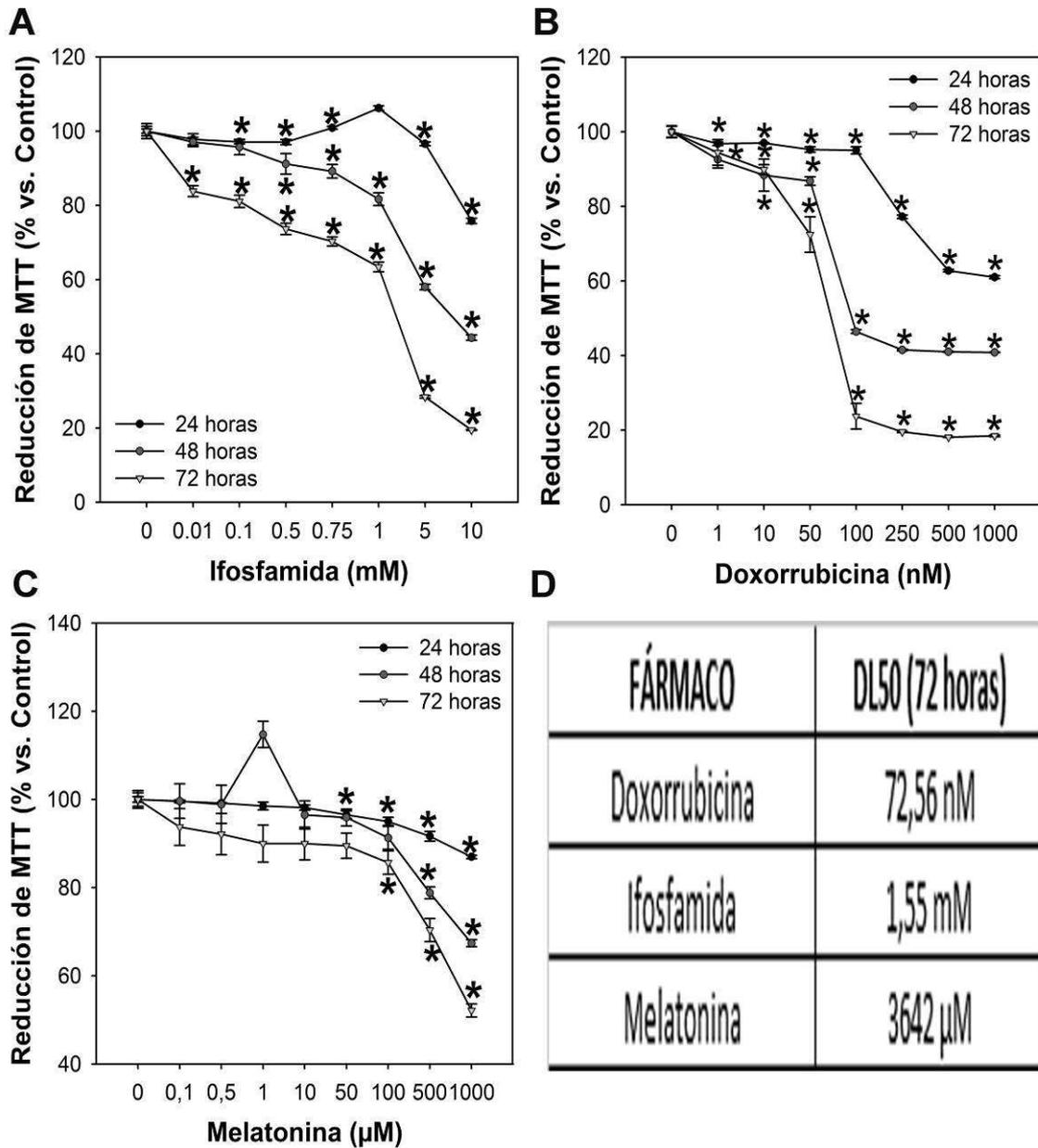
## 4. EFECTO SINÉRGICO DE LA COMBINACIÓN DE MELATONINA Y LOS QUIMIOTERÁPICOS EN LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA

### **4.1. LA MELATONINA Y LOS QUIMIOTERÁPICOS PRODUCEN UNA DISMINUCIÓN EN EL NÚMERO DE CÉLULAS**

Teniendo en cuenta el efecto citotóxico de la melatonina en líneas celulares derivadas de tumores hematológicos, sería interesante averiguar si la melatonina podría usarse como coadyuvante en las terapias habituales para estos tumores. De esta manera, decidimos estudiar si la melatonina y dos quimioterápicos utilizados en el tratamiento de la leucemia mieloide aguda, como son la doxorrubicina y la ifosfamida, producen un efecto sinérgico sobre las líneas celulares HL-60, U-937 y MV-4-11. El primer paso fue analizar el efecto de cada uno de estos fármacos por separado y así seleccionar las concentraciones adecuadas para los estudios de sinergia posteriores. Para tal fin, se utilizó el ensayo de reducción de MTT, de forma que obtuvimos tres curvas dosis-respuesta tras 24, 48 y 72 horas de tratamiento con cada sustancia ensayada. Para realizar estas curvas dosis-respuesta, en el caso de la doxorrubicina, se utilizaron concentraciones entre 1 nM y 1  $\mu$ M; con la ifosfamida, estuvieron entre 0.01 y 10 mM; con la melatonina las concentraciones estuvieron entre 100 nM y 1 mM. Con los tres fármacos y en las tres líneas celulares, se observó una disminución del número de células dependiente de concentración y de tiempo.

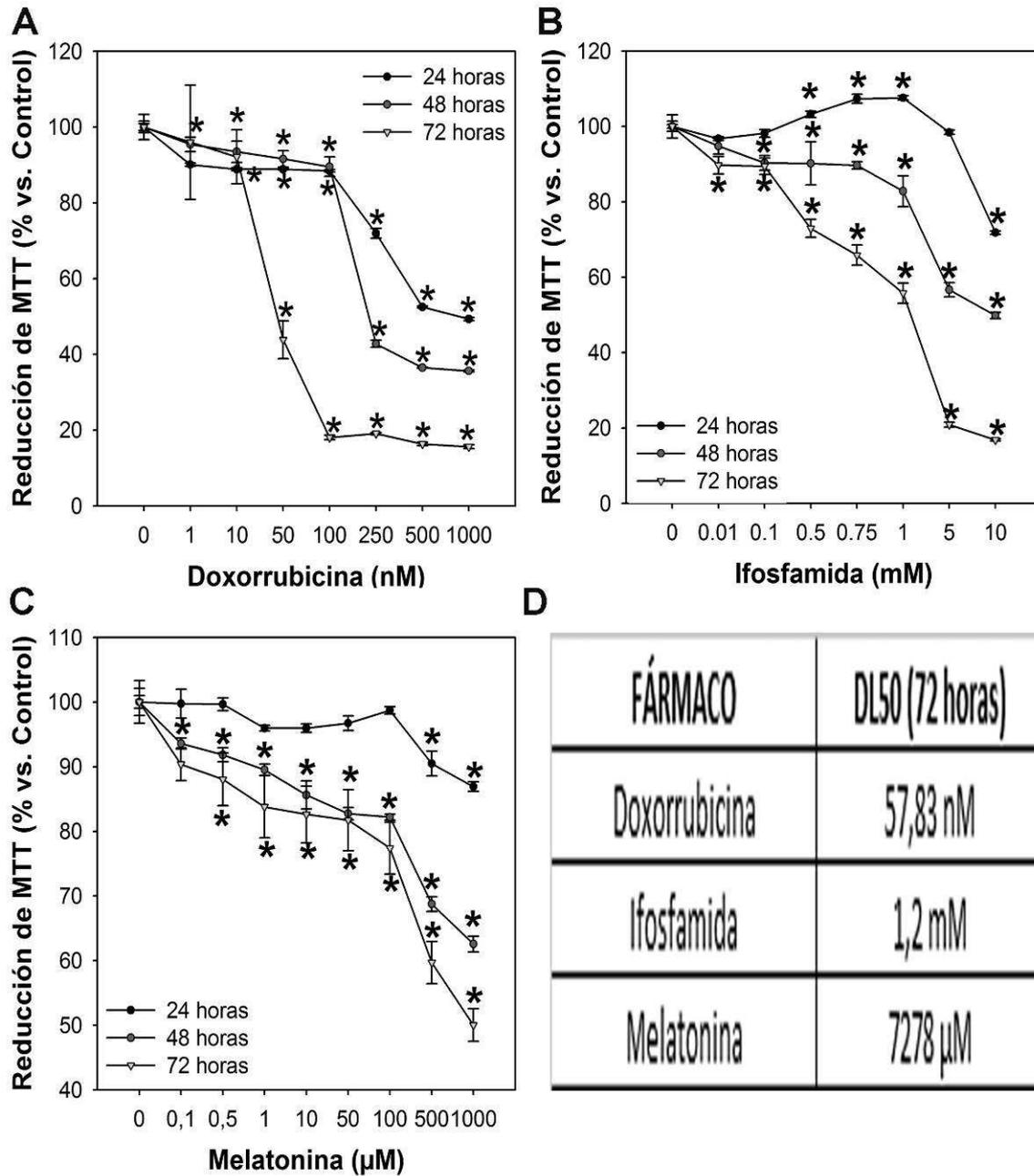
En la línea celular HL-60 (Figura 31), con la doxorrubicina tras 24 horas de incubación se observa una disminución notable en el número de células con una concentración de 250 nM. A las 48 horas, empieza a hacerse patente esta disminución con la concentración de 100 nM, requiriéndose una concentración menor a las 72 horas: 50 nM. La dosis letal 50 en este último tiempo fue de 72,6 nM. Con la ifosfamida, a las 24 horas, la disminución en el número de células se muestra con 5 mM del quimioterápico. A las 48 horas, la disminución empieza a ser notable con 0,75 mM de ifosfamida. A las 72 horas, en cambio, esta disminución se observa a partir de 0,01 mM del quimioterápico, obteniendo una dosis letal 50 de 1,55 mM. Por último, tras 24 horas de incubación con la melatonina,

la disminución en el número de células comienza a observarse con la concentración de 500  $\mu\text{M}$ . A las 48 horas, en cambio, la disminución empieza con 100 nM, al igual que a las 72 horas, con la que empieza a ser significativa pero mayor que tras dos días de incubación. La dosis letal 50 de estas células fue de 3,6 mM.



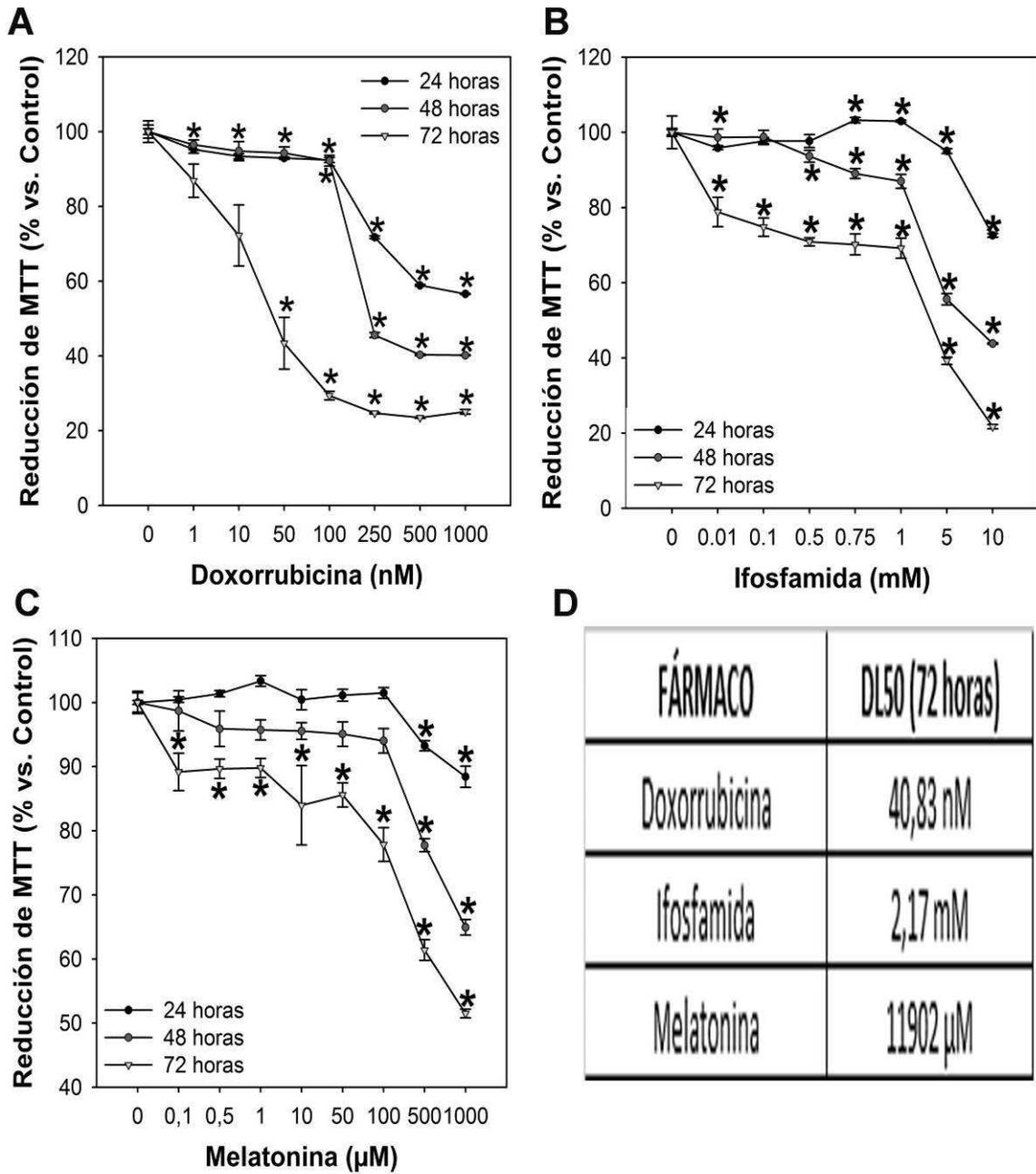
**Figura 31.** Curvas dosis-respuesta de Doxorubicina (A), Ifosfamida (B), Melatonina (C) en las células HL-60 tratadas durante 24, 48 y 72 horas. El número de células fue evaluado mediante el ensayo de reducción de MTT. D) Tabla con las dosis letales 50 de cada fármaco. \*  $p < 0,001$  vs. grupo sin tratamiento. DL50, Dosis Letal 50.

En la línea celular U-937 (Figura 32), tanto a las 24 como a las 48 horas, no existen muchas diferencias con las concentraciones más bajas de doxorubicina, observándose en ambos casos una disminución notable del número de células a partir de 250 nM. A las 72 horas, en cambio, esta disminución empieza a hacerse ver con 50 nM de doxorubicina, siendo la dosis letal 50 a este tiempo de 57,83 nM. Con la ifosfamida, a las 24 horas la disminución en el número de células sucede con la concentración más alta utilizada, 10 mM. Tanto a las 48 como a las 72 horas, la disminución en el número de células comienza con 0,5 mM de ifosfamida, observándose en mayor medida a las 72 horas, encontrándonos en este tiempo una dosis letal 50 de 1,2 mM. Por último, con la melatonina a las 24 horas, la disminución en el número de células comienza con 500  $\mu$ M de la indolamina. Tanto a las 48 como a las 72 horas, esta disminución comienza ya con 100 nM, siendo mayor tras tres días de incubación con la indolamina. Con la melatonina la dosis letal 50 fue 7,2 mM a las 72 horas.



**Figura 32.** Curvas dosis-respuesta de Doxorubicina (A), Ifosfamida (B), Melatonina (C) en las células U-937 tratadas durante 24, 48 y 72 horas. El número de células fue evaluado mediante el ensayo de reducción de MTT. D) Tabla con las dosis letales 50 de cada fármaco. \*  $p < 0,001$  vs. grupo sin tratamiento. DL50, Dosis Letal 50.

En la línea celular MV-4-11 (Figura 33), con la doxorubicina, y al igual que sucedía en la línea celular U-937, tanto a las 24 como a las 48 horas, la disminución en el número de células comienza con 250 nM del quimioterápico. A las 72 horas, se hace patente con 10 nM de doxorubicina, siendo la dosis letal 50 de 40,83 nM. Con la ifosfamida, a las 24 horas la disminución en el número de células comienza con 10 mM de ifosfamida. A las 48 horas, la disminución empieza a observarse con 0,75 mM del quimioterápico, empezando con la concentración más baja utilizada, 0,01 mM a las 72 horas. En este tiempo la dosis letal 50 es de 2,17 mM. Por último, con la melatonina a las 24 horas, la disminución en el número de células comienza con 500  $\mu$ M de la indolamina, siendo mayor esta disminución a la misma concentración tras 48 horas de tratamiento. Por último, a las 72 horas de incubación, la disminución en el número de células comienza ya con 100 nM de la indolamina, siendo la dosis letal 50 de 11,9 mM.



**Figura 33.** Curvas dosis-respuesta de Doxorubicina (A), Ifosfamida (B), Melatonina (C) en las células MV-4-11 tratadas durante 24, 48 y 72 horas. El número de células fue evaluado mediante el ensayo de reducción de MTT. D) Tabla con las dosis letales 50 de cada fármaco. \*  $p < 0,001$  vs. grupo sin tratamiento. DL50, Dosis Letal 50.

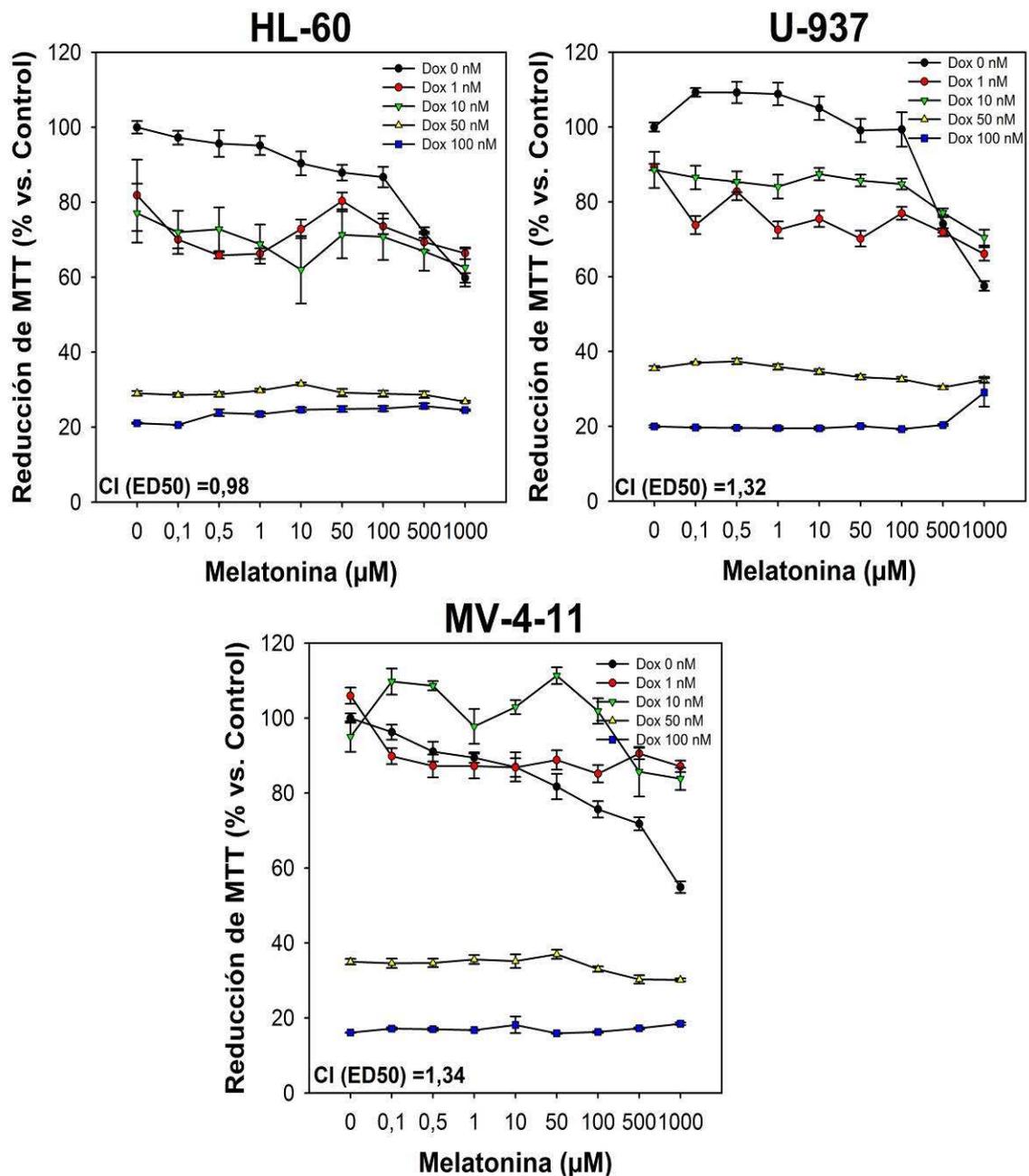
## **4.2. ANÁLISIS DEL EFECTO COMBINADO DE LA MELATONINA Y LOS QUIMIOTERÁPICOS SOBRE LA VIABILIDAD CELULAR**

En el apartado anterior demostramos que la melatonina y los quimioterápicos analizados, disminuyen el número de células HL-60, U-937 y MV-4-11 de forma dependiente de concentración y de tiempo. El siguiente paso, fue analizar si la combinación de melatonina con los quimioterápicos produce algún efecto a nivel farmacológico: antagonista, aditivo o sinérgico. Para ello, y en base a las curvas dosis-respuesta anteriores, se seleccionaron varias concentraciones de melatonina y del quimioterápico y tras 72 horas, se realizaron los correspondientes ensayos de reducción de MTT.

### **4.2.1. La combinación de melatonina y doxorubicina produce un efecto aditivo o antagonista sobre el número de células, dependiendo de la línea celular analizada.**

Para realizar los estudios de interacción entre la melatonina y la doxorubicina, se utilizaron concentraciones de melatonina entre 100 nM y 1 mM. Las concentraciones de doxorubicina utilizadas estuvieron entre 1 y 100 nM. Los ensayos se realizaron a las 72 horas, mostrándose los resultados en las gráficas de la figura 34.

En las tres líneas celulares, el patrón de interacción entre la melatonina y la doxorubicina es el mismo, no se observan diferencias significativas cuando combinamos ambos compuestos. De hecho, no existe una variación importante en la curva de doxorubicina al añadir la melatonina. Al analizar los resultados mediante el programa Calculusyn, en el caso de la línea celular HL-60, el índice de combinación es 0,98, lo cual indicaría aditividad. En el caso de las otras dos líneas celulares, los índices de combinación son de 1,3, lo cual indicaría antagonismo.



**Figura 34.** Efecto de la combinación de la melatonina entre concentraciones de 0,1 y 1000  $\mu\text{M}$  y la doxorubicina entre concentraciones de 1 y 100 nM, evaluado mediante el ensayo de reducción de MTT. Se representa la curva dosis-respuesta de melatonina y la combinación de estas concentraciones de melatonina con las concentraciones de doxorubicina indicadas tras el tratamiento durante 72 horas. \*  $p < 0,001$  vs. melatonina (misma concentración) y doxorubicina (misma concentración). Dox, doxorubicina; CI, índice de combinación (del inglés, Combination Index).

#### 4.2.2. La combinación de melatonina e ifosfamida presenta un efecto sinérgico.

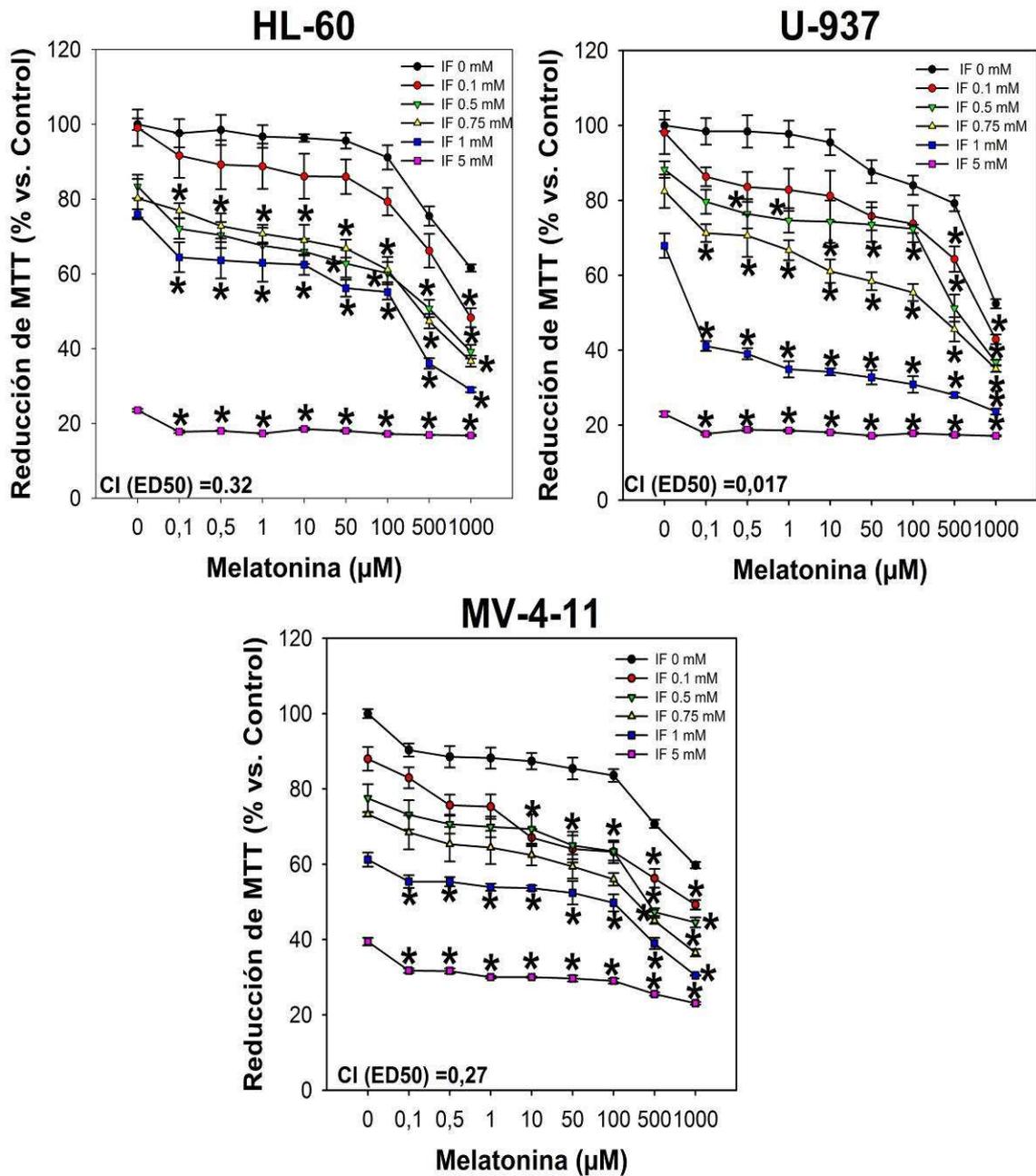
Para estos estudios de interacción, se seleccionaron las concentraciones de melatonina anteriormente indicadas, es decir, entre 100 nM y 1 mM y de ifosfamida, las concentraciones entre 100  $\mu$ M y 5 mM.

Los resultados, se observan en las gráficas de la figura 35. En la línea celular HL-60, las diferencias significativas comienzan con una de las concentraciones más bajas del quimioterápico, 0,5 mM y a partir de las concentraciones intermedias de melatonina, 50  $\mu$ M. Con 0,75 mM de ifosfamida, estas diferencias comienzan a ser significativas con la concentración más baja de melatonina utilizada, 100 nM, observándose una reducción mayor en el número de células con 1 mM de melatonina. Pero las diferencias más notables se observa con 1 mM de ifosfamida, pasando de una reducción del 25% a una reducción del 35% con la primera concentración de melatonina utilizada, 100 nM. Esta reducción en el número de células es mayor conforme vamos incrementando las concentraciones de melatonina, llegando a un 85% con 1 mM de la indolamina. Por último, incluso con la concentración más alta del quimioterápico utilizada, 5 mM de ifosfamida, las diferencias al combinarla con la melatonina son significativas a partir de 100 nM de melatonina. Utilizando el programa Calcsyn, analizamos el efecto de la combinación de ambas sustancias, obteniendo un índice de combinación de 0,32, lo cual indica un efecto sinérgico.

En la línea celular U-937, y a las concentraciones más bajas tanto de la melatonina como de la ifosfamida, como es en este caso 0,5 mM del quimioterápico, empiezan a observarse diferencias significativas. Sin embargo, las diferencias más claras se muestran con concentraciones más altas del quimioterápico. Así, con 1 mM de ifosfamida, la disminución del número de células pasa de un 30% a casi un 60% al combinarlo ya con 100 nM de melatonina. Al incrementar la concentración de melatonina, esta disminución en el número de células es mucho mayor, llegando a casi un 80% con 1 mM de la indolamina. Incluso con la concentración más alta utilizada del quimioterápico, 5 mM de ifosfamida, se observa un efecto significativo al combinarlo con concentraciones crecientes de melatonina, llegando a un 90% de reducción en el número de células con 1 mM de la indolamina. El índice de combinación en este caso fue de 0,017, que indica un sinergismo bastante acusado.



En la línea celular MV-4-11, los resultados son similares a los observados anteriormente. En este caso, las diferencias significativas comienzan con las concentraciones más bajas del quimioterápico, 0,5 mM de ifosfamida, y con concentraciones intermedias de melatonina, a partir de 10  $\mu$ M. Sin embargo, y al igual que en el caso anterior, las diferencias son más notables con 1 mM de ifosfamida, que pasa de una reducción del 35% con el quimioterápico solo, a un 65% con la concentración más alta de melatonina utilizada, 1 mM. A pesar de que la reducción en el número de células es notable con la concentración de ifosfamida más alta utilizada, 5 mM, su combinación con melatonina, también produce diferencias significativas y una reducción aún mayor que la obtenida con cada uno de los compuestos por separado. El índice de combinación fue de 0,27, que implica, al igual que en los casos anteriores un efecto sinérgico.



**Figura 35.** Efecto de la combinación de la melatonina entre concentraciones de 0,1 y 1000  $\mu\text{M}$  y la ifosfamida entre concentraciones de 0,1 y 5 mM, evaluado mediante el ensayo de reducción de MTT. Se representa la curva dosis-respuesta de melatonina y la combinación de estas concentraciones de melatonina con las concentraciones de ifosfamida indicadas tras el tratamiento durante 72 horas de las tres líneas celulares.\*  $p < 0,001$  vs. melatonina (misma concentración) y ifosfamida (misma concentración). IF, ifosfamida; CI, índice de combinación (del inglés, Combination Index).



### **4.3. ANÁLISIS DE LA CITOTOXICIDAD INDUCIDA POR LA COMBINACIÓN DE IFOSFAMIDA Y MELATONINA**

En el apartado anterior, demostramos que la combinación de la melatonina con la ifosfamida producía un efecto sinérgico en la reducción del número de células. Para conocer si este efecto se manifiesta a nivel de citotoxicidad, realizamos el ensayo de liberación de lactato deshidrogenasa. Este ensayo se llevó a cabo con la ifosfamida y la melatonina individualmente y con su combinación después de 48 y 72 horas de incubación.

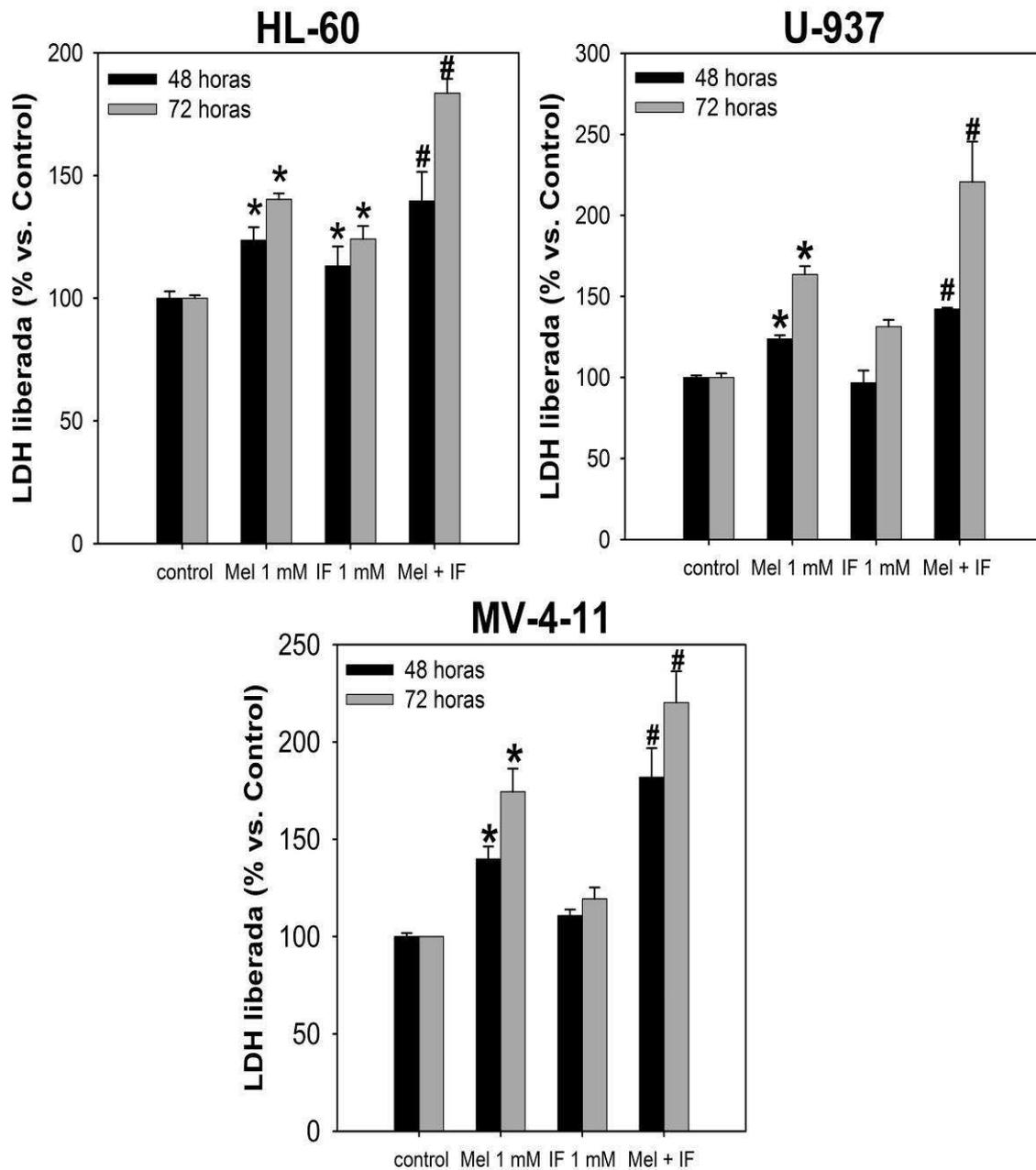
Para la realización de este ensayo, y teniendo en cuenta los experimentos anteriores de reducción de MTT, se seleccionó la concentración de ifosfamida que parecía más efectiva en su combinación con la melatonina, en este caso fue 1 mM. Por la misma razón, se ha utilizado 1 mM de melatonina. Se trataron las células con 1 mM de melatonina, 1 mM de ifosfamida y la combinación durante 48 y 72 horas.

En la figura 36, observamos que en las tres líneas celulares, la melatonina individualmente produce un incremento en la liberación de LDH y por tanto un aumento en la muerte celular, dependiente de tiempo. Sin embargo, el incremento en la muerte celular inducida por el quimioterápico solo, es significativo en la línea celular HL-60 solamente. El efecto combinado de ambos compuestos produce un incremento significativo de la muerte celular, tanto a las 48 como a las 72 horas, siendo este dependiente de tiempo.

En la línea celular HL-60, a las 72 horas la muerte celular pasa de un 140% con la melatonina, y un 125% con la ifosfamida, llegando a un 200% al combinar ambos compuestos.

En la línea celular U-937, a las 72 horas, la muerte celular pasa de un 170% con la melatonina, y un 140% con la ifosfamida, a un 250% al combinar las dos sustancias.

Lo mismo sucede con las MV-4-11, donde la citotoxicidad pasa de un 170% con la melatonina, y un 120% con la ifosfamida, a un 225% de muerte celular con la combinación.



**Figura 36.** Citotoxicidad de 1 mM de melatonina, 1 mM de ifosfamida y la combinación de ambos compuestos después de 48 y 72 horas en la líneas celulares HL-60, U-937 y MV-4-11. \*  $p < 0,001$  vs. grupo control; #  $p < 0,001$  vs. resto de grupos; IF, ifosfamida; Mel, melatonina.



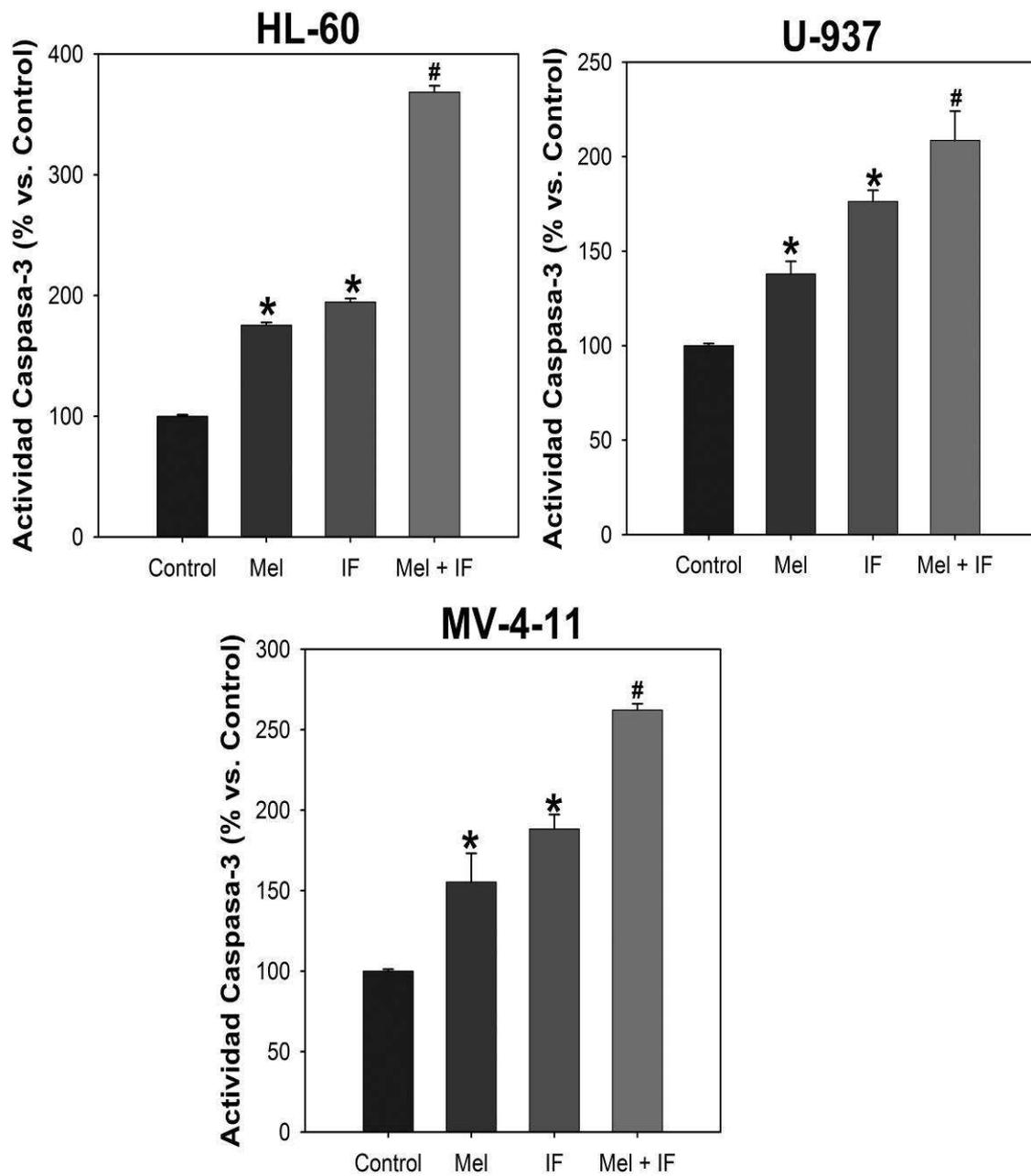
#### **4.4. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD DE LA CASPASA-3**

Tanto la melatonina como la ifosfamida ejercen un efecto citotóxico, individualmente o en combinación, sobre las células de leucemia mieloide aguda. Caspasa-3 es una de las caspasas efectoras en el proceso apoptótico; cuando se activa, este proceso es irreversible. Para conocer si el efecto citotóxico observado por la combinación de melatonina e ifosfamida es de tipo apoptótico, decidimos estudiar la actividad de esta caspasa. Para realizar estos estudios, se trataron las células con 1 mM de ifosfamida, 1 mM de melatonina y su combinación y tras 72 horas de tratamiento se recogieron extractos protéicos que fueron utilizados para analizar la actividad Caspasa-3. Se utilizó un kit fluorimétrico, que mide su capacidad para hidrolizar un sustrato, que da lugar a un producto fluorescente que puede ser cuantificado mediante fluorescencia.

En la figura 37, se observan los resultados obtenidos de este análisis de actividad. En la línea celular HL-60, tanto la melatonina como la ifosfamida individualmente, aumentan la actividad de esta caspasa efectora, de manera significativa, en aproximadamente casi un 200% cada una por separado. Al combinar ambos compuestos, la actividad de esta caspasa se incrementa de manera significativa hasta casi un 400%.

En la línea celular U-937, tanto la melatonina como la ifosfamida individualmente, aumentan la actividad de esta caspasa efectora, de manera significativa, en aproximadamente en un 125% en el caso de la indolamina y un 175% con la ifosfamida. Al combinar ambos compuestos, la actividad de esta caspasa se incrementa de manera significativa hasta casi un 225%.

Por último, en la línea celular MV-4-11, tanto la melatonina como la ifosfamida individualmente, aumentan la actividad de esta caspasa efectora, de manera significativa, en aproximadamente en un 150% en el caso de la indolamina y un 175% con la ifosfamida. Al combinar ambos compuestos, la actividad de esta caspasa se incrementa de manera significativa hasta un 250%.



**Figura 37.** Actividad Caspasa-3 en las líneas celulares HL-60, U-937, MV-4-11, tratadas durante 72 horas con 1 mM de melatonina, 1 mM de ifosfamida y su combinación. \*  $p < 0,001$  vs. control; #  $p < 0,001$  vs. otros grupos: Mel, melatonina; IF, ifosfamida.

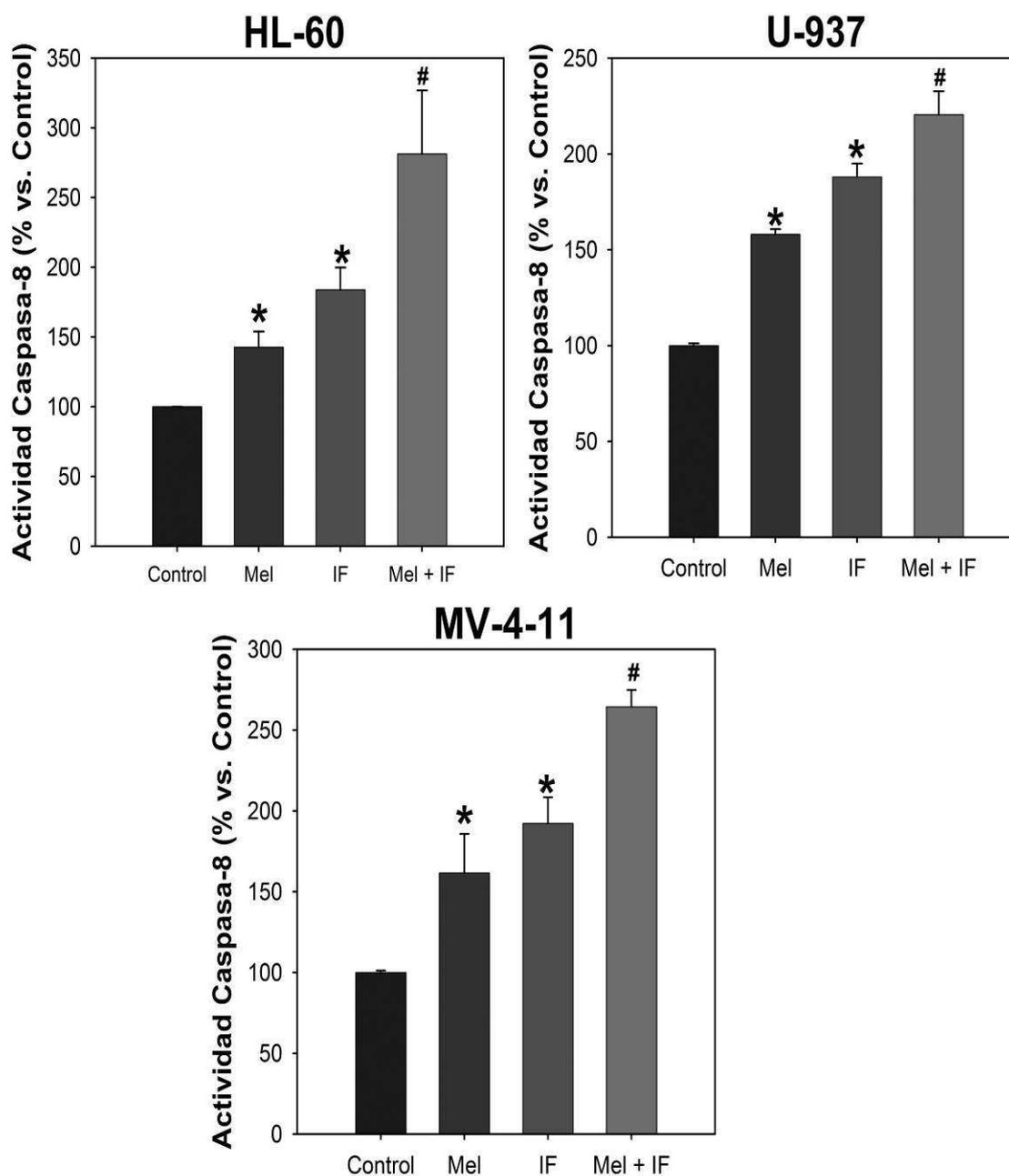


#### **4.5. ESTUDIO DE LAS VÍAS APOPTÓTICAS IMPLICADAS EN EL EFECTO SINÉRGICO DE LA MELATONINA CON LA IFOSFAMIDA**

Una vez que averiguamos que el tipo de muerte celular inducida tanto por la melatonina como por la ifosfamida es de tipo apoptótico y que la combinación de ambos potencia la apoptosis inducida por cada uno individualmente, decidimos estudiar si este efecto se producía a nivel de los dos tipos de vías apoptóticas. Para ello, se analizó la actividad de las caspasas iniciadoras de ambas vías, Caspasa-8, de la vía extrínseca de la apoptosis, y la Caspasa-9, iniciadora de la vía intrínseca. Estas vías se estudiaron mediante análisis de la actividad de las proteínas a las 72 horas.

Se trataron las células HL-60, U-937, MV-4-11 con 1 mM de ifosfamida, 1 mM de melatonina y su combinación durante 72 horas. Tras este tiempo se recogieron extractos protéicos para el análisis mediante fluorimetría de las actividades Caspasa-8 y Caspasa-9.

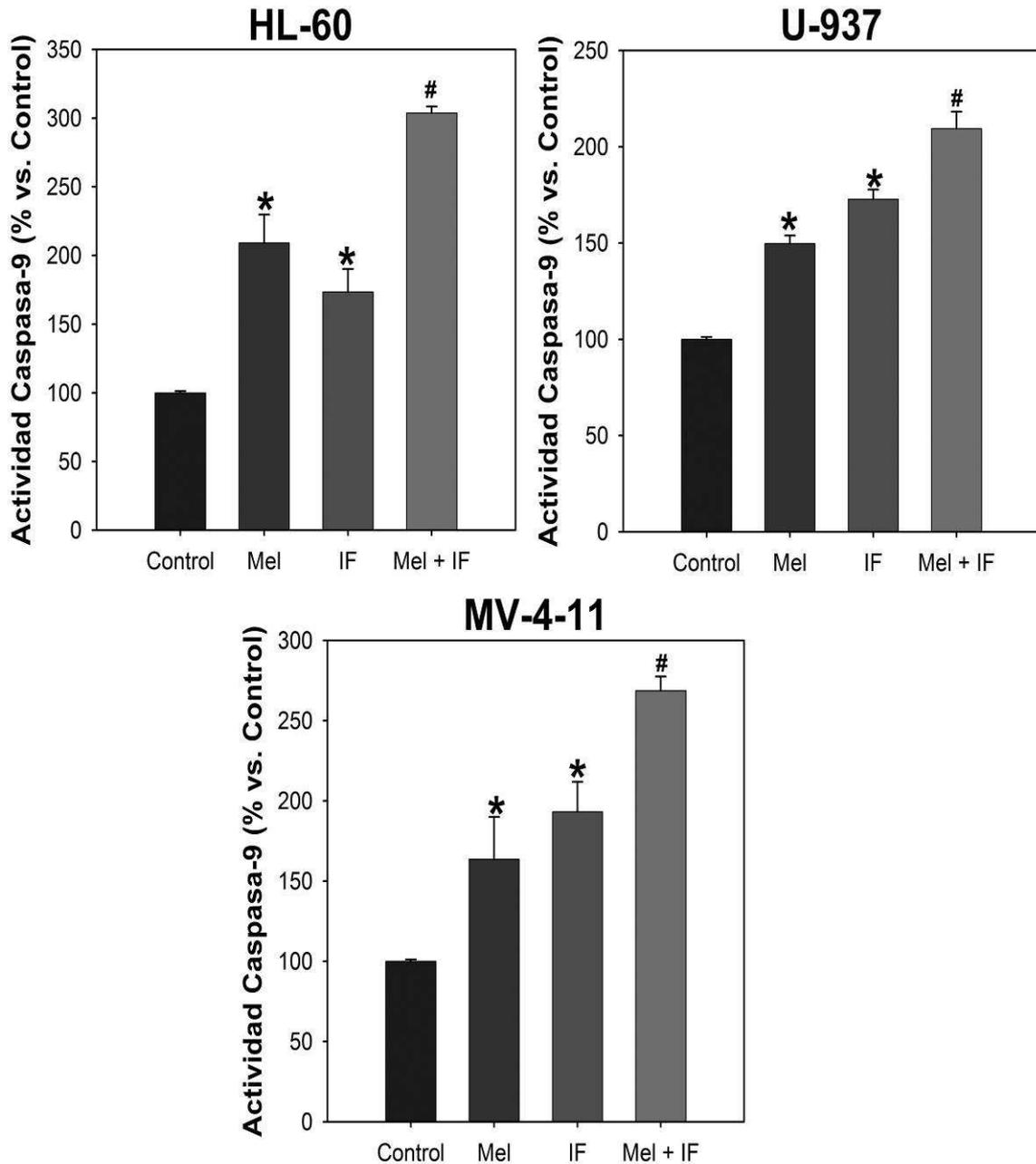
En la figura 38 se observan los resultados relativos a la actividad Caspasa-8. En la línea celular HL-60, se observa un incremento de la actividad Caspasa-8, con la melatonina individualmente, de 150%, con la ifosfamida, de casi un 200%, y mucho mayor cuando combinamos ambos compuestos, llegando a un 275%. Se obtienen resultados similares en el caso de la línea celular U-937, pasando de un 150% con la melatonina y casi un 200% con la ifosfamida a un 275% con la combinación. El incremento en la actividad Caspasa-8 es también mayor en la línea celular MV-4-11, pasando de un 175% con la melatonina y 200% con la ifosfamida individualmente a un 275% con la combinación.



**Figura 38.** La melatonina y la ifosfamida activan la vía extrínseca de la apoptosis. Actividad Caspasa-8 medida mediante un ensayo fluorimétrico en las células HL-60, U-937 y MV-4-11 tras 72 horas de tratamiento con 1 mM de melatonina, 1 mM de ifosfamida y su combinación.

Con respecto a la actividad de la Caspasa-9 (Figura 39), en la línea celular HL-60, tras el tratamiento con melatonina, se observa un incremento en la actividad de esta caspasa de un 200%, siendo menor con la ifosfamida, un 175%. Cuando combinamos estos dos compuestos, el incremento en esta actividad es de un 300%. En la línea celular U-937, la melatonina individualmente produce un incremento en la actividad de un 150%, y la

ifosfamida de un 175%; este incremento es mucho mayor al combinar ambos compuestos 225%. Sucede lo mismo con la línea celular MV-4-11, siendo de un 175% con la melatonina, un 200% con la ifosfamida, y resultando su combinación en un incremento de casi 300% en la actividad.



**Figura 39.** La melatonina y la ifosfamida activan la intrínseca de la apoptosis. Actividad Caspasa-9 medida mediante un ensayo fluorimétrico en las células HL-60, U-937 y MV-4-11 tras 72 horas de tratamiento con 1 mM de melatonina, 1 mM de ifosfamida y su combinación. \*  $p < 0,001$  vs. control; #  $p < 0,001$  vs. otros grupos. Mel, melatonina; IF, ifosfamida; Mel + IF, melatonina + ifosfamida.

A la vista de los resultados obtenidos, la combinación de la melatonina y la ifosfamida activan las dos vías apoptóticas, extrínseca por la activación de Caspasa-8, e intrínseca, por la activación de Caspasa-9.

#### **4.6. EL EFECTO SINÉRGICO DE LA MELATONINA Y LA IFOSFAMIDA SE MANIFIESTA EN EL INCREMENTO DE EXPRESIÓN DE LOS RECEPTORES DE MUERTE Y SUS LIGANDOS**

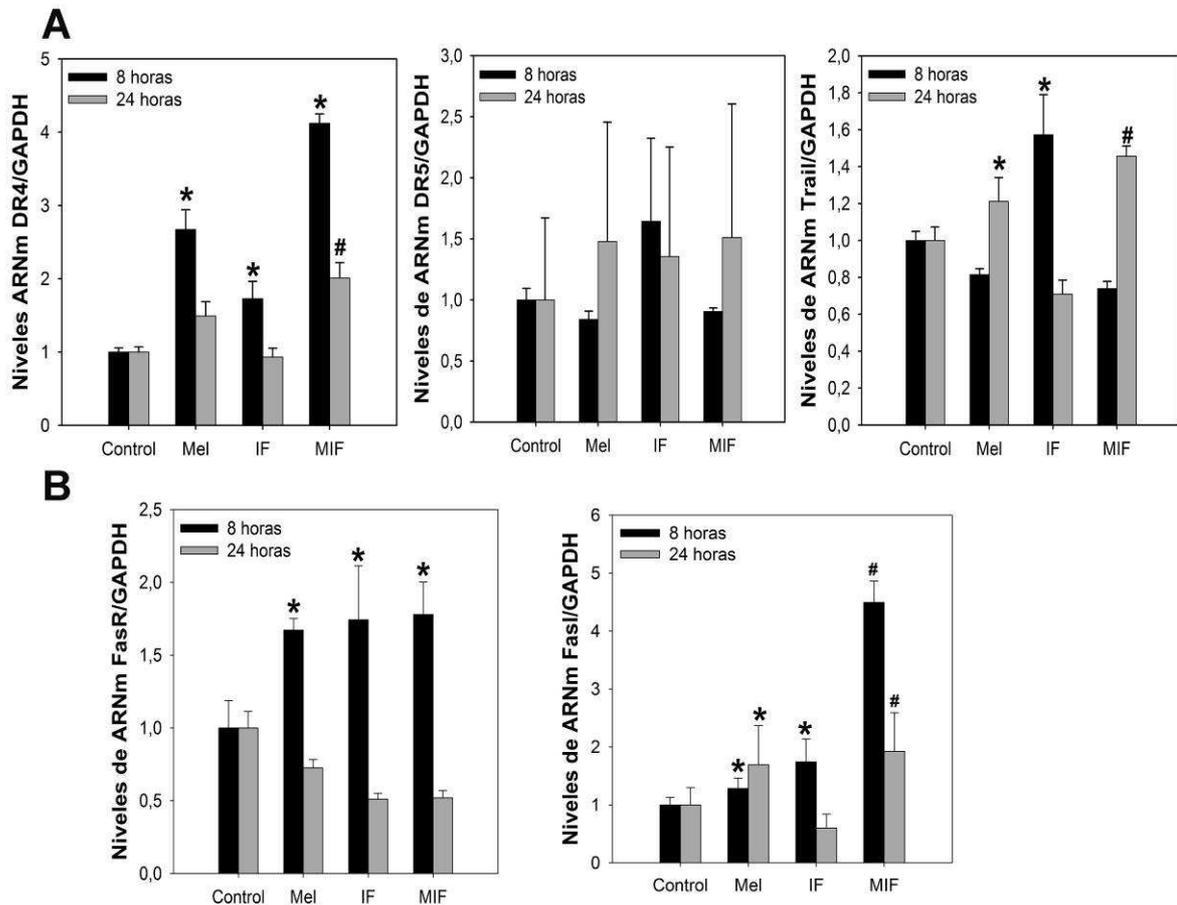
Los resultados previos observados en las líneas celulares derivadas de tumores hematológicos, mostraron la acción de la melatonina sobre la expresión de los receptores de muerte y sus ligandos, siendo el incremento mediado por la misma un factor clave en el efecto apoptótico de la indolamina.

Por esta causa, y dado que la combinación de la melatonina con la ifosfamida produce en las líneas celulares estudiadas un incremento en la activación de la vía extrínseca con respecto a la que se da cuando se administran individualmente, decidimos analizar la expresión de los ligandos y los receptores de muerte también se beneficiaba de la combinación de ambos fármacos.

Para tal fin, y tras 8 y 24 horas de tratamiento con 1 mM de la indolamina, 1 mM de ifosfamida y su combinación, analizamos en las tres líneas celulares objeto de estudio, la expresión de Fas, DR4 y DR5 así como sus ligandos FasL y TRAIL, mediante PCR a tiempo real (Figuras 40, 41, 42). Encontramos un incremento tanto de los ligandos como de los receptores en las tres líneas estudiadas, aunque con diferencias entre las mismas.

En la línea celular HL-60 se observa un incremento a las 8 horas de DR4 con la melatonina, y con la ifosfamida, encontrándose un incremento mucho mayor en la combinación. A las 24 horas la expresión de este receptor con la melatonina sigue siendo alta, pero menor que en tiempo previo, incrementándose con la combinación pero en menor medida que tras 8 horas. El incremento observado en DR5 no es significativo ni a las 8 ni a las 24 horas. El incremento de TRAIL se observa tras 24 horas de tratamiento con Melatonina y tras 8, pero no tras 24 horas de tratamiento con ifosfamida. Con la combinación de ambos fármacos sólo se produce el incremento tras 24 horas de tratamiento. Por último, el incremento en FasR y FasL se observa principalmente a las 8 horas, no mejorando la combinación de ambos fármacos la expresión de FasR con

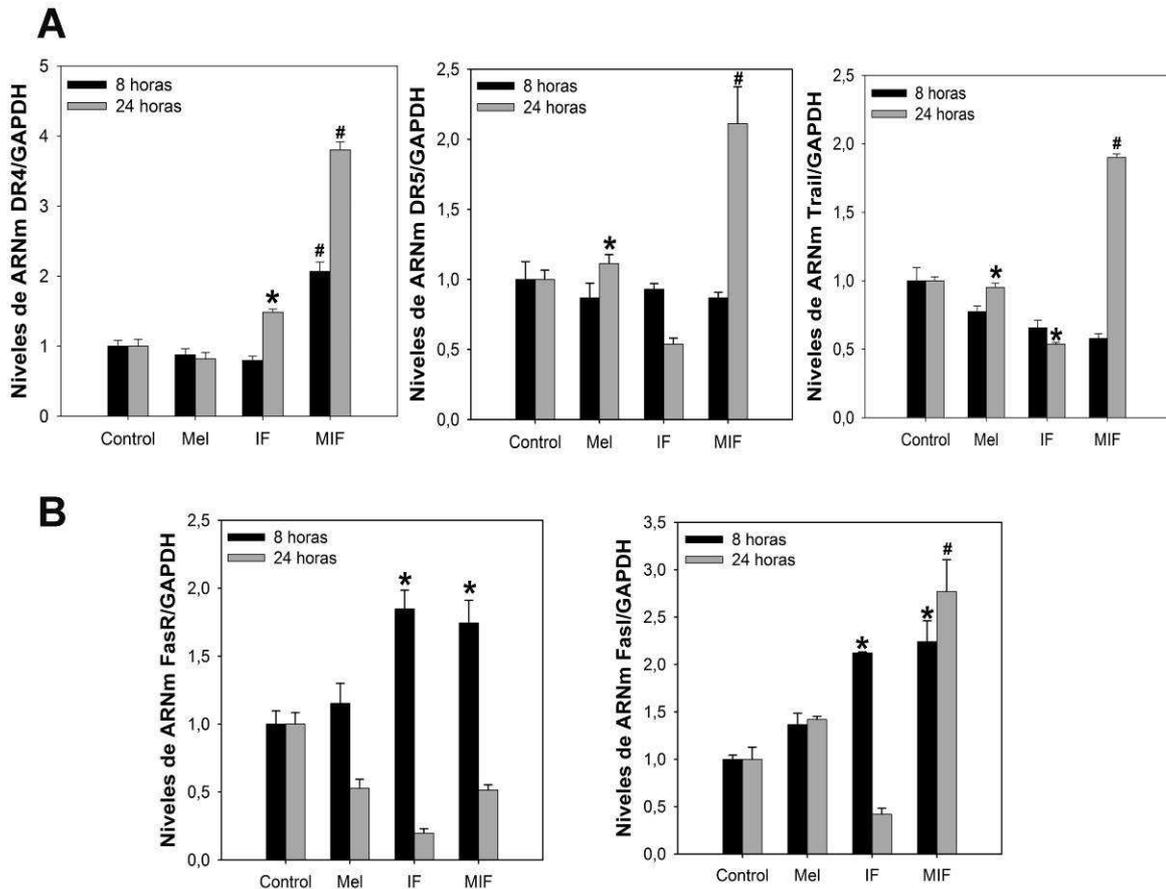
respecto a su administración por separado, pero haciéndolo de forma muy llamativa en el caso de FasL.



**Figura 40.** La melatonina y la ifosfamida producen un incremento en la expresión de los receptores de muerte y sus ligandos en la línea celular HL-60. A) Niveles de ARNm de DR4, DR5 y TRAIL medidos mediante PCR a tiempo real tras 8 y 24 horas de tratamiento con 1 mM de melatonina, 1 mM de ifosfamida y su combinación. B) Niveles de ARNm de FasR y FasL medidos mediante PCR a tiempo real tras 8 y 24 horas de tratamiento con 1 mM de melatonina, 1 mM de ifosfamida y su combinación. \*  $p < 0,001$  vs. control; #  $p < 0,001$  vs. otros grupos. Mel, melatonina; IF, ifosfamida; Mel + IF, melatonina + ifosfamida.

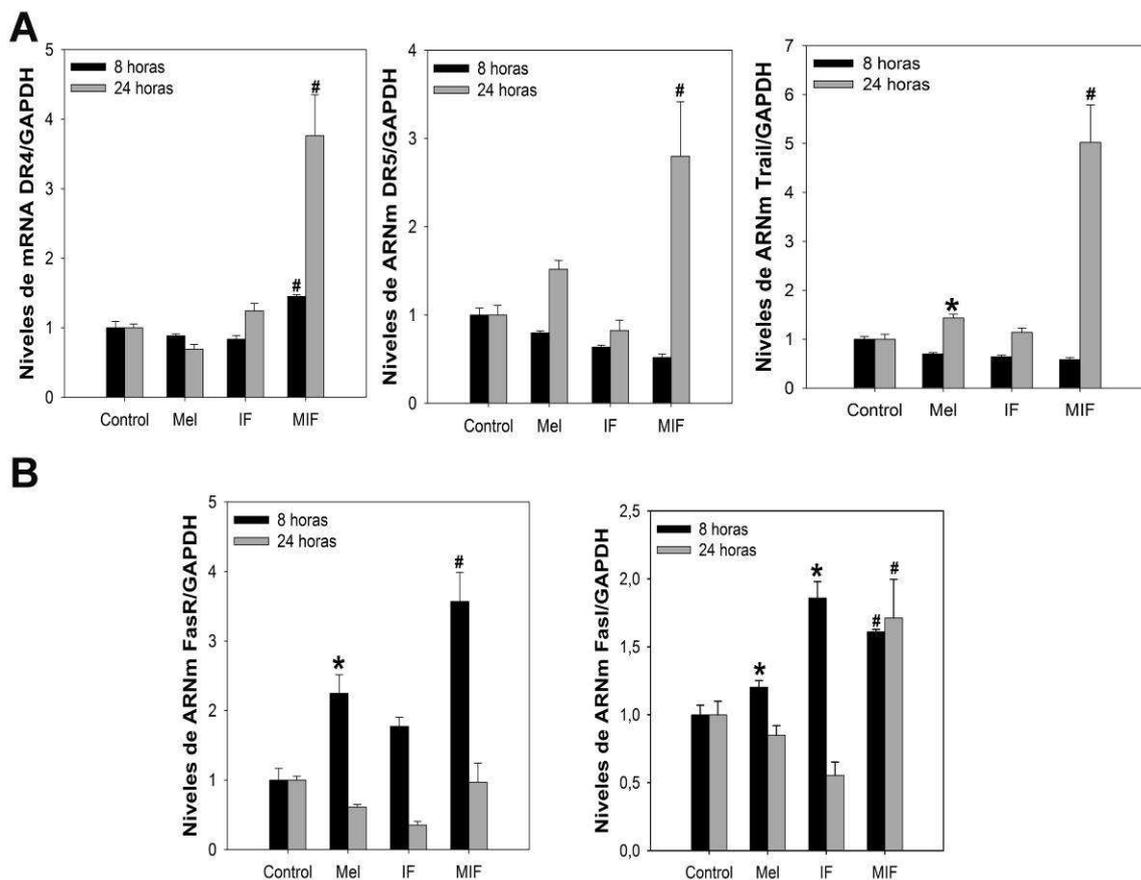
En el caso de la línea celular U-937, no se observa un incremento en la expresión de DR4 con la melatonina individualmente, aunque sí con la ifosfamida tras 24 horas de tratamiento, la combinación de ambas produce un incremento muy importante de su expresión tanto a las 8 como a las 24 horas. DR5, observamos un incremento tras 24 horas con la melatonina individualmente, pero no con la ifosfamida. Este incremento es mucho mayor con la combinación de ambas sustancias tras este tiempo. La expresión de TRAIL se incrementa de manera similar a DR5. Al igual que sucedía con la línea celular

HL-60, la expresión de FasR se ve incrementada tras 8 horas de tratamiento tanto con la melatonina, como con el quimioterápico, la combinación de ambas no mejora la conseguida por los fármacos individualmente. Sin embargo, su ligando, FasL aumenta su expresión tanto a las 8 como a las 24 horas cuando son tratadas con melatonina, y solo a las 8 horas cuando son tratadas con la ifosfamida. Este incremento se ve potenciado tras 24 horas de tratamiento con ambas sustancias.



**Figura 41.** La melatonina y la ifosfamida producen un incremento en la expresión de los receptores de muerte y sus ligandos en la línea celular U-937. A) Niveles de ARNm de DR4, DR5 y TRAIL medidos mediante PCR a tiempo real tras 8 y 24 horas de tratamiento con 1 mM de melatonina, 1 mM de ifosfamida y su combinación. B) Niveles de ARNm de FasR y FasL medidos mediante PCR a tiempo real tras 8 y 24 horas de tratamiento con 1 mM de melatonina, 1 mM de ifosfamida y su combinación. \*  $p < 0,001$  vs. control; #  $p < 0,001$  vs. otros grupos. Mel, melatonina; IF, ifosfamida; Mel + IF, melatonina + ifosfamida.

En la línea celular MV-4-11, los resultados son similares a los obtenidos con la línea U-937. DR4, incrementa su expresión principalmente cuando se combinan la melatonina y el quimioterápico durante 24 horas. DR5, aumenta su expresión ligeramente con la melatonina y de una forma muy importante con la combinación de ambas sustancias tras 24 horas de tratamiento. Lo mismo sucede con TRAIL, en el cual la combinación incrementa casi cinco veces su expresión. La expresión de FasR, se ve incrementada con la melatonina y la combinación de los dos fármacos la aumentan en mayor medida tras 8 horas de tratamiento. FasL, muestra este incremento ligeramente tras el tratamiento con la melatonina y de forma más importante con la ifosfamida. La combinación de las dos sustancias no mejora este rendimiento.



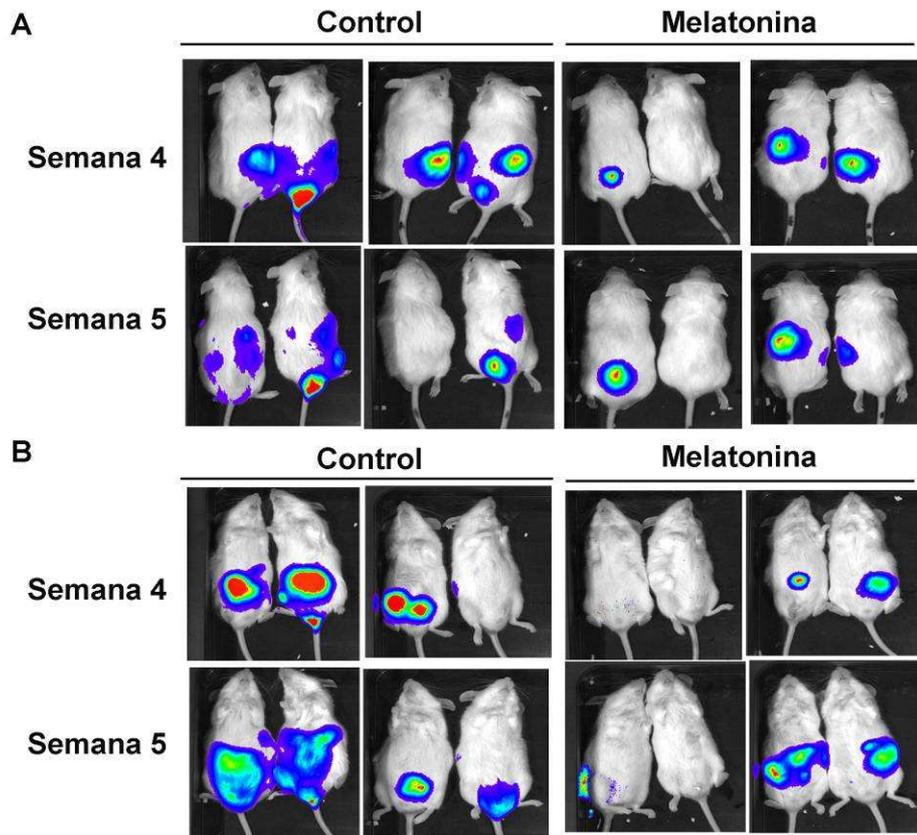
**Figura 42.** La melatonina y la ifosfamida producen un incremento en la expresión de los receptores de muerte y sus ligandos en la línea celular MV-4-11. A) Niveles de ARNm de DR4, DR5 y TRAIL medidos mediante PCR a tiempo real tras 8 y 24 horas de tratamiento con 1 mM de melatonina, 1 mM de ifosfamida y su combinación. B) Niveles de ARNm de FasR y FasL medidos mediante PCR a tiempo real tras 8 y 24 horas de tratamiento con 1 mM de melatonina, 1 mM de ifosfamida y su combinación. \*  $p < 0,001$  vs. control; #  $p < 0,001$  vs. otros grupos. Mel, melatonina; IF, ifosfamida; Mel + IF, melatonina + ifosfamida.

## 5. EXPERIMENTO IN VIVO

En vista de los resultados obtenidos *in vitro*, en cuanto a la inducción del proceso apoptótico en las líneas celulares derivadas de tumores hematológicos, decidimos realizar un estudio *in vivo* sobre un modelo animal de este tipo de tumores. Con el fin de analizar la acción directa *in vivo* de la melatonina sin interferencias del sistema inmune y sobre todo debido a la necesidad de evitar el rechazo de los roedores frente a las células de origen humano, elegimos para desarrollar nuestro modelo tumoral ratones NOD/SCID, que tienen una inmunodeficiencia severa. Esta inmunodeficiencia afecta al desarrollo de los linfocitos B y T, reduciéndose también el número de células NK (del inglés, natural killer), macrófagos y granulocitos.

En 19 ratones NOD/SCID se inyectaron en la vena de la cola,  $2 \times 10^6$  células HL-60 que fueron transfectadas con eGFP/luciferasa. Una semana después de la inyección se dividieron los ratones en dos grupos, 11 ratones que serían tratados con melatonina en el agua de bebida y 8 ratones controles. Se partió de una solución de melatonina en el agua a una concentración de 10 mM, teniendo en cuenta que los ratones beben al día una media de 5 ml, la cantidad de melatonina ingerida fue de 11,61 mg.

Gracias a la luciferasa contenida en las células inyectadas, a partir de la tercera semana de inyección, se monitorizó la evolución del tumor, utilizando el bioimagen, una técnica no invasiva de observación. En la figura 43, se muestran imágenes representativas de las semanas 4 y 5 tras la inyección. Se eligieron estas dos semanas debido a que en ellas la extensión de los tumores era notable, y el número de ratones o era el mismo que inicialmente o ligeramente inferior, empezando a fallecer a partir de la quinta semana. Como se observa en la figura, a nivel visual, existen diferencias entre los grupos controles y melatonina, observando un desarrollo mucho menor de los tumores tras el tratamiento con la indolamina. Parece que al menos en el caso de los ratones tratados, el desarrollo del tumor es mucho menor en el pecho.

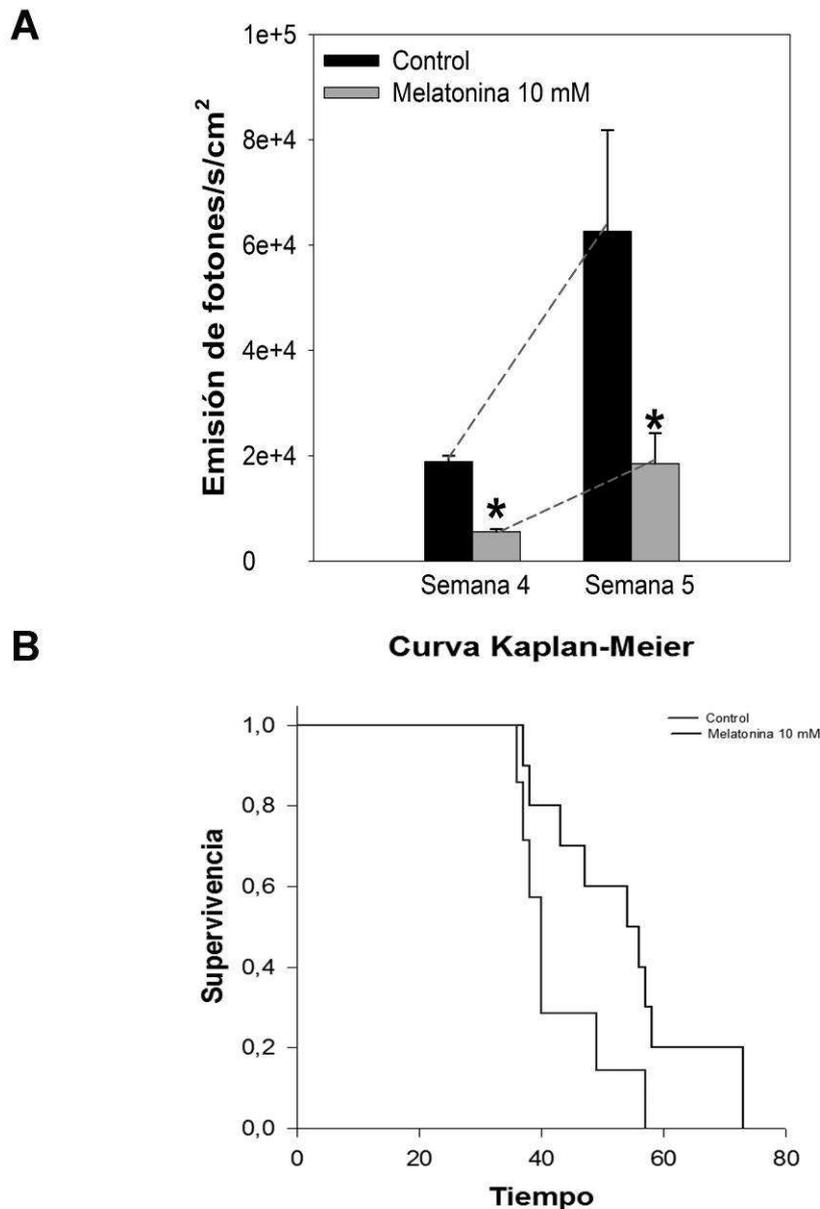


**Figura 43.** Imágenes de Bioluminiscencia de los ratones NOD/SCID en las semanas 4 y 5 tras la inyección de la línea celular HL-60 transfectadas con eGFP/luciferasa. A) Imágenes de Bioluminiscencia del lomo. B) Imágenes de Bioluminiscencia del pecho.

La cuantificación del bioimagen así como su análisis estadístico se observa en la Figura 44A. En ella se muestra cómo la melatonina reduce significativamente la extensión del tumor, expresado aquí en emisión de fotones/s/cm<sup>2</sup>, debido a la cuantificación del bioimagen. Esta reducción en el tumor por la indolamina, se produce en las dos semanas analizadas, aunque parece que en la semana 5 la reducción es mucho mayor con respecto al control. La cuantificación de estos resultados corresponde con las imágenes presentadas en las que observamos que los ratones del grupo control tienen un desarrollo mayor del tumor que los tratados con la melatonina, siendo este desarrollo mayor tras cinco semanas de inyección de las células.

Las diferencias observadas tanto a nivel visual como cuantitativo, se traducen en un aumento en la supervivencia de los ratones tratados con la melatonina. En la figura 44B, se observa la curva de Supervivencia, Kaplan-Meier. Se observa una diferencia de 16

días entre el momento de deceso del último animal del grupo control y el último animal del grupo tratado con melatonina. Tras la aplicación del test Long-Rank, nos encontramos que este incremento en la supervivencia encontrado en el grupo tratado es estadísticamente significativo respecto al grupo no tratado.



**Figura 44.** Resultados del experimento in vivo realizado en ratones NOD/SCID tratados con melatonina en el agua de bebida. A) Análisis estadístico de la emisión de fotones/s/cm<sup>2</sup> tras cuatro y cinco semanas de inyección de las células. B) Curva Kaplan-Meier de supervivencia. \*p<0.05 vs. control.



## 6. EFECTO DE LA MELATONINA EN CÉLULAS DERIVADAS DE PACIENTES

### **6.1. LA MELATONINA PRODUCE MUERTE CELULAR EN CÉLULAS DERIVADAS DE PACIENTES CON TUMORES HEMATOLÓGICOS**

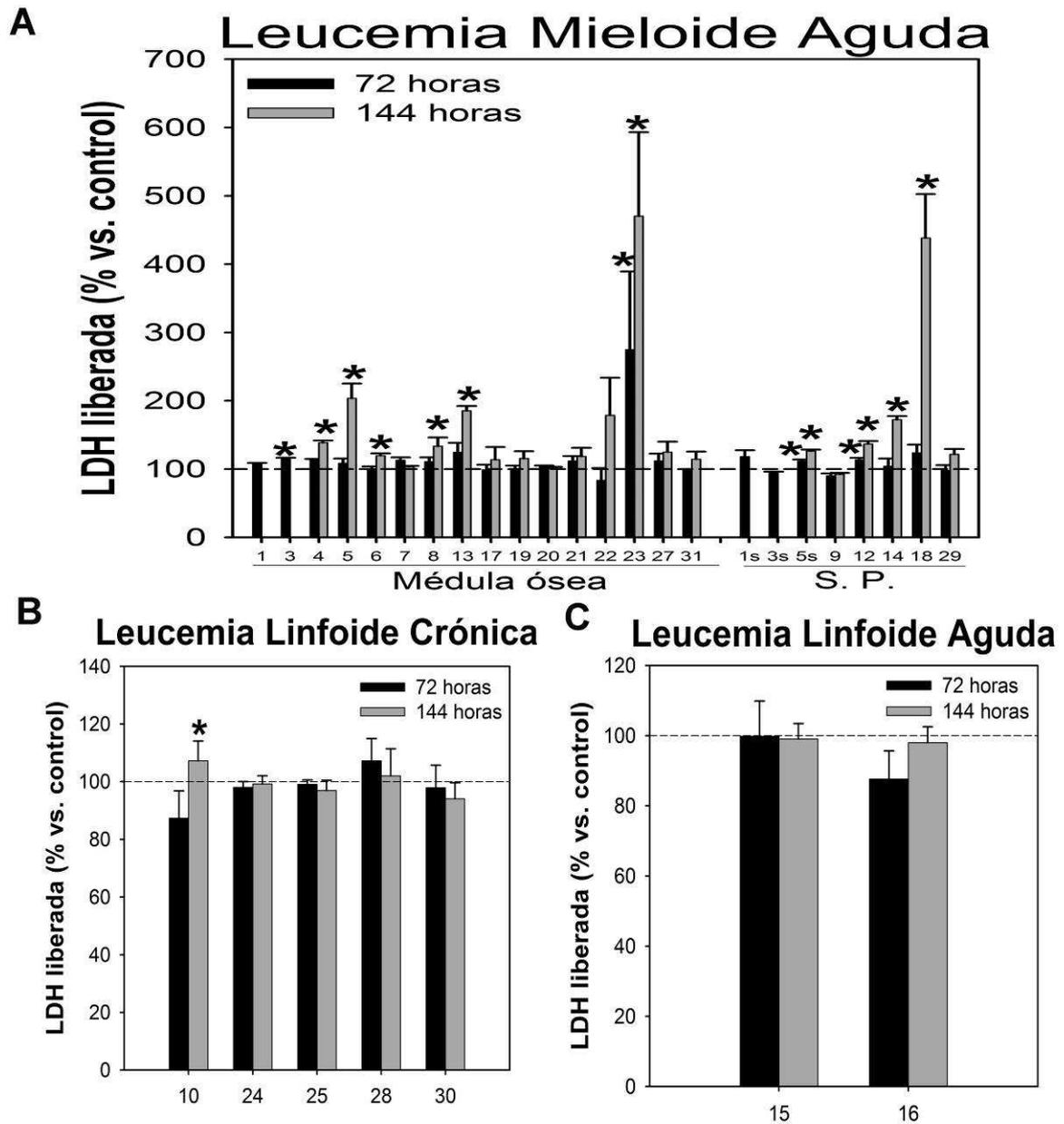
Dados los resultados obtenidos en las líneas celulares derivadas de tumores hematológicos y en el ensayo in vivo, decidimos estudiar si el efecto de la melatonina era extensible a células derivadas de pacientes hematológicos. Para ello, se aislaron blastos de médula ósea o sangre periférica de treinta y un pacientes con tumores hematológicos al diagnóstico. Las características de estos pacientes se muestran en la Tabla 7.

Para analizar el efecto citotóxico de la melatonina en estas células, se trataron durante 72 horas y seis días con 1 mM de melatonina y tras este tiempo se realizó el ensayo de liberación de LDH. Los resultados se muestran en la figura 45. Los resultados más significativos se observan en los pacientes con leucemia mieloide aguda. En cuatro pacientes, ya a las 72 horas es patente el efecto citotóxico de la indolamina, siendo este efecto dependiente de tiempo. La melatonina indujo muerte celular en muestras de sangre periférica de 4 de los 6 pacientes analizados, y en muestras de médula ósea de 6 de los 14 pacientes analizados.

Respecto a los cinco pacientes con leucemia linfóide crónica, sólo uno de ellos fue ligeramente sensible a la melatonina. Por último, los dos pacientes con leucemia linfóide aguda, no fueron sensibles a la indolamina. En estos dos últimos tipos de leucemia no podemos extraer conclusiones definitivas respecto al efecto de la melatonina debido al escaso número de pacientes analizado.

PACIENTE	EDAD	SEXO	MUESTRA	DIAGNÓSTICO
1	20 años	hombre	SP	LMA M4 Eosinofilia
2	27 años	hombre	SP	LLA CÉLULAS B
3	78 años	hombre	SP	LMA M3 Promielocítica
4	75 años	mujer	MO	LMA M2 secundaria
5	57 años	mujer	SP Y MO	LMA M4-Eo
6	88 años	mujer	MO	LMA M2
7	73 años	mujer	MO	LMA M5a secundaria
8	47 años	hombre	MO	LMA M4-Eo
9	54 años	mujer	SP	LMA-M2 con dismega
10	72 años	mujer	SP	LLC
11	18 años	hombre	SP	LLA2-T
12	26 años	mujer	SP	LMA-M2
13	54 años	hombre	MO	LMA-M2 displasia trilineal
14	8 años	hombre	SP	LMA-M5b
15	65 años	mujer	MO	LLA2-T
16	50 años	hombre	SP	LLA2-B
17	29 años	hombre	MO	LMA M4-Eo
18	75 años	hombre	SP	LMA-M2 con displasia trilineal
19	19 años	hombre	MO	LMA-M5a
20	73 años	mujer	MO	LMA-M5a secundaria Recaida
21	76 años	mujer	MO	LMA-M2 Secundaria Recaida
22	39 años	mujer	MO	LMA 5b
23	60 años	hombre	MO	LMA 5a
24	72 años	hombre	SP	LLC
25	75 años	mujer	SP	LLC
26	52 años	mujer	SP	LLC
27	73 años	hombre	MO	LMA-M1
28	84 años	hombre	SP	LLC
29	88 años	mujer	SP	LMA-M1
30	76 años	mujer	SP	SLPc (LLC)
31	77 años	mujer	MO	Crisis blástica

**Tabla 7.** Información clínica de los pacientes con tumores hematológicos. SP, Sangre Periférica; MO, Médula Ósea; LMA, Leucemia Mieloide Aguda; LLC, Leucemia Linfoide Crónica; LLA, Leucemia Linfoide Aguda; LMA M-Eo, Leucemia Mieloide Aguda, con eosinofilia; SLPc, Síndrome Linfoproliferativo.

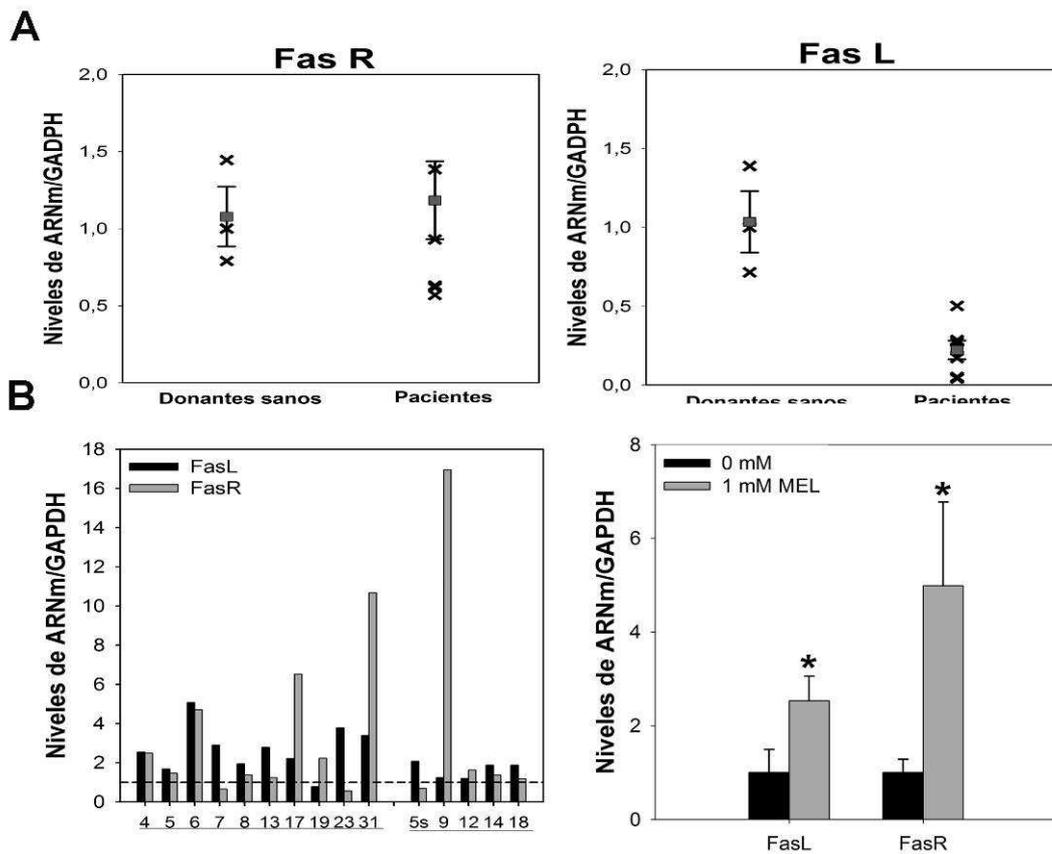


**Figura 45.** La melatonina induce muerte celular en los blastos de pacientes con distintos tipos de tumores hematológicos. Los blastos obtenidos de médula ósea y sangre periférica de pacientes con con tumores hematológicos fueron tratados con 1 mM de melatonina, 72 horas y seis días. La muerte celular fue determinada por el ensayo de liberación de LDH. A) LDH liberada tras 72 horas y seis días de tratamiento con la indolamina en pacientes con leucemia mieloide aguda. B) LDH liberada tras 72 horas y 6 días de tratamiento con melatonina en pacientes con leucemia linfoide crónica. C) LDH liberada tras 72 horas y 6 días de tratamiento con melatonina en pacientes con leucemia linfoide aguda. S.P., Sangre Periférica. \*  $p < 0,001$  vs. control (sin tratamiento, línea discontinúa).

## **6.2. LA MELATONINA PRODUCE UN INCREMENTO EN LA EXPRESIÓN DE FASR Y FASL EN LAS CÉLULAS DE PACIENTES CON LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA**

Los resultados anteriores indican que la melatonina produce muerte celular principalmente en blastos derivados de pacientes con LMA. Cabría esperar, que a nivel de señalización apoptótica, la melatonina en estas células se comportara de manera similar a como se observó en las líneas celulares derivadas de tumores hematológicos. Uno de los eventos clave en esta señalización de dichas células fue el incremento en la expresión del tándem FasR/FasL, determinante en la acción citotóxica de la indolamina. Para analizar el comportamiento de las células de los pacientes a este respecto, primeramente, decidimos analizar los niveles de expresión del ARNm de FasR y FasL en los pacientes con leucemia mieloide aguda, tanto en los que la melatonina ejerce un efecto citotóxico como en los que no produce ningún efecto, y compararlos con su expresión en las células mononucleadas derivadas de la sangre periférica de tres donantes sanos. En la Figura 46A, observamos que los pacientes tienen un descenso en la expresión de FasL cuando son comparados con las células mononucleadas de pacientes sanos. Sin embargo, no se observan diferencias en la expresión del receptor, que a la vista de la dispersión, parece ser debido a que existe una expresión variable de FasR entre los distintos subgrupos de pacientes.

Una vez conocidos los niveles basales de expresión de FasR/FasL en los pacientes analizados, estudiamos la expresión de estas moléculas tras el tratamiento con 1 mM de melatonina durante 24 horas en los blastos de estos pacientes. En la Figura se muestra que la expresión del ligando y del receptor se vio incrementada tras el tratamiento con la indolamina, observando variabilidad entre los pacientes, como sucedía al compararlos con los controles. Al realizar la media de estos resultados, en FasL, se observa un incremento significativo en la expresión de 3 (Figura 46B) y, consecuentemente, un incremento significativo de la expresión del receptor de 4.5. Los resultados aquí presentados parecen confirmar lo observado en las líneas celulares derivadas de tumores hematológicos respecto a la expresión de FasR/FasL.



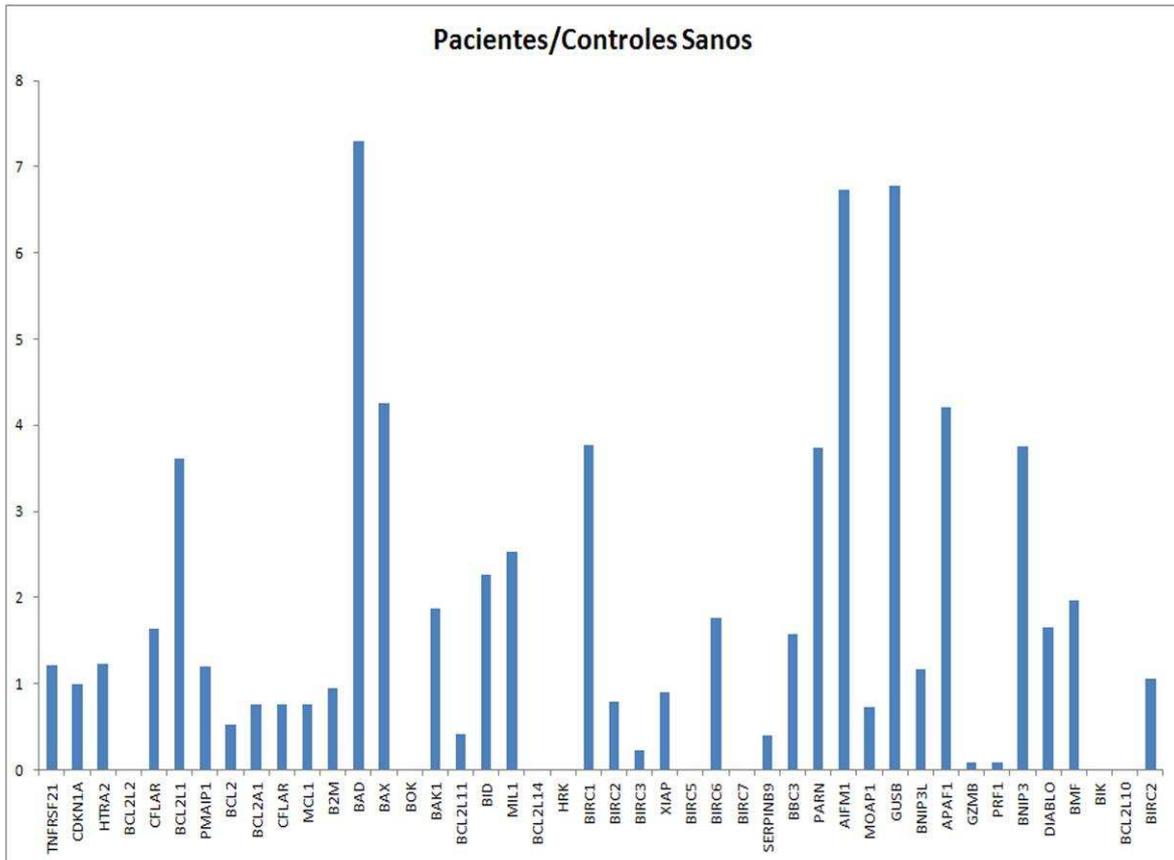
**Figura 46.** La melatonina induce un incremento en la expresión de FasR y FasL en blastos derivados de pacientes con Leucemia Mieloide Aguda (LMA). A) Niveles de expresión de Fas R y Fas L analizados por PCR a tiempo real en células mononucleares de sangre periférica de tres donantes sanos y de los pacientes. La expresión génica fue relativizada respecto al nivel basal (donantes sanos). X, dato individual ; □, media de todos los individuos de cada grupo. B) Los blastos de los pacientes fueron tratados durante 24 horas con melatonina 1 mM, analizándose los niveles de expresión de FasR y FasL por PCR a tiempo real. La expresión génica fue relativizada respecto al nivel basal (sin tratamiento, línea discontinúa). Después, se realizó la media de los niveles de expresión de FasR y FasL de estos pacientes. \*  $p < 0,001$  vs. grupo sin tratamiento (Control).

### **6.3. EL TRATAMIENTO CON MELATONINA PRODUCE UN AUMENTO EN LA EXPRESIÓN DE GENES PROAPOPTÓTICOS EN CÉLULAS DE PACIENTES CON LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA**

La técnica MLPA (del inglés, Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification), es un método que nos permite detectar el cambio en el número de copias de hasta 50 secuencias de ácidos nucleicos en una reacción simple. Particularmente, y en nuestro caso, se usa una variante de esta técnica, RT-MLPA, que se utiliza para cuantificar los niveles de expresión de 46 genes implicados en la señalización apoptótica en una muestra de ARN, obteniendo un perfil de ARNm.

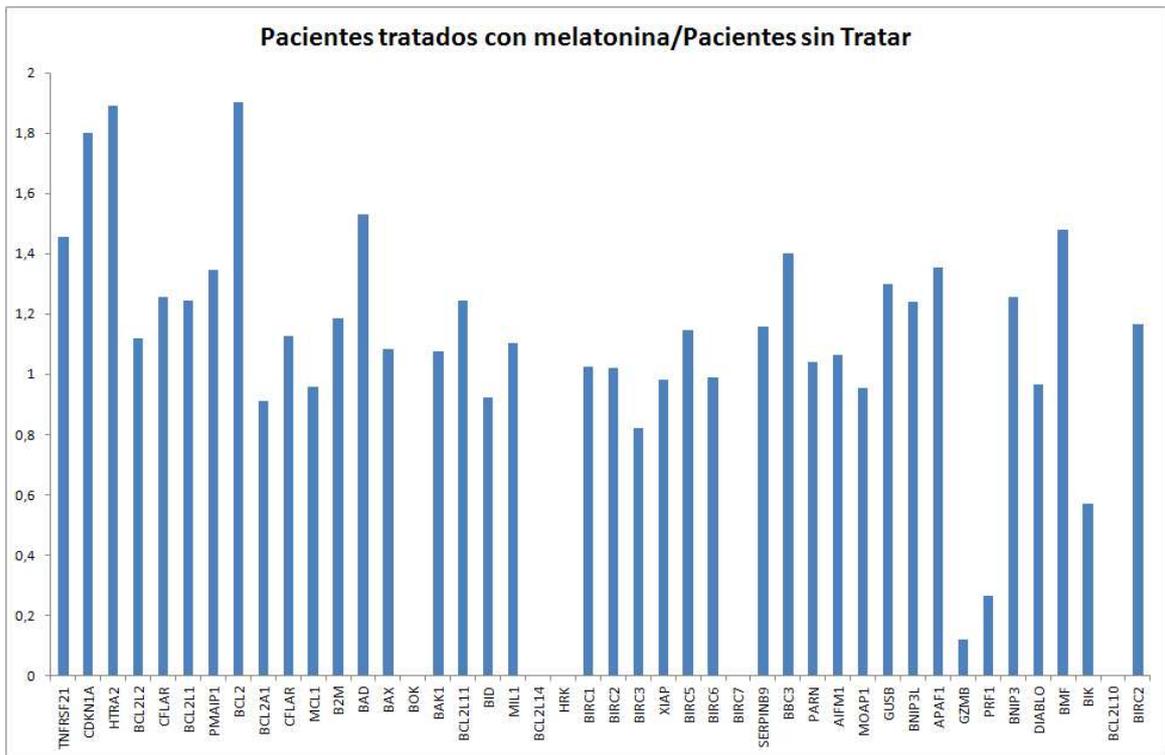
Tratamos los blastos de pacientes diagnosticados de leucemia mieloide aguda durante 24 horas con 1 mM de melatonina. Tras este tiempo extrajimos el ARN en el que se realizó la técnica de RT-MLPA, de acuerdo a lo descrito en el apartado de Material y Métodos. En el análisis de los resultados, se comparó la expresión de los genes apoptóticos de los pacientes sin tratar frente a controles sanos y, posteriormente de los blastos tratados con melatonina frente a su control sin tratar. Se considera una expresión normal los valores de los ratios entre 0,7 y 1,3. Valores por debajo de 0,7 indican una disminución de la expresión, valores por encima de 1,3, indican un incremento de la misma.

Los resultados se muestran en las figura 47, en la que se observa la comparación de la expresión de los pacientes frente a los controles sanos, que muestra un incremento en la expresión de los genes proapoptóticos BAD, BAX, BAK1, MIL1, AIFM1, APAF1, BBC3, BNIP3, DIABLO, BMF. Pero también, es importante destacar que se produce un incremento en genes anti-apoptóticos, CFLAR, BCL2L1, BID, BIRC1, BIRC6. Se produce un descenso en los genes pro-apoptóticos BCL2L11, Granzima y perforina, pero también en anti-apoptóticos como BCL2, BIRC3 y Serpina-9. La expresión del resto de los genes se encuentra dentro de los valores normales.



**Figura 47.** Perfil de ARNm de los pacientes frente a los controles sanos, analizado mediante la técnica de RT-MLPA.

En la figura 48, se muestra el cambio en la expresión de los genes en pacientes tras el tratamiento con la indolamina. Se produce un aumento en la expresión de los genes proapoptóticos TNFRSF21, CDKN1A, HTRA2, PMAIP1, BAD, BBC3, APAF1 y BMF, aunque también un descenso de GMZB, PRF1 y BIK. El resto de los genes, incluidos los antiapoptóticos no muestran cambios en su expresión, encontrándose entre los valores de normalidad 0,7-1,3.



**Figura 48.** La melatonina induce un incremento en la expresión de los genes proapoptóticos. Perfil de ARNm de los pacientes frente a su control no tratado, analizado mediante la técnica de RT-MLPA.

## **V. DISCUSIÓN**



Los resultados obtenidos en el presente trabajo demuestran la capacidad de la melatonina para inducir muerte celular de tipo apoptótico en líneas celulares derivadas de tumores hematológicos mediante la activación de la vía extrínseca de la apoptosis. Además, mostramos la capacidad de la melatonina para potenciar el efecto de quimioterápicos utilizados en el tratamiento de la leucemia mieloide aguda al encontrar un efecto sinérgico en combinación con la ifosfamida. Tanto en los estudios *in vivo*, en ratones NOD/SCID, como *ex vivo*, en células de pacientes, conseguimos resultados paralelos a los obtenidos en las líneas celulares. La melatonina disminuye el crecimiento del tumor en estos ratones y ejerce un efecto citotóxico en células de pacientes, acompañado de un incremento en la expresión de Fas/FasL, así como de otros genes implicados en la señalización proapoptótica.

A lo largo de este estudio hemos demostrado que la melatonina posee la capacidad de inducir muerte en células derivadas de tumores hematológicos. Existe un amplio número de publicaciones que documentan la capacidad de la melatonina para inhibir la proliferación de células tumorales a concentraciones fisiológicas, especialmente en tumores neuroendocrinos, como el cáncer de mama (Hill y Blask, 1988; Sánchez-Barceló, 2003); ovario (Futagami y cols, 2001); endometrio (Kanishi y cols, 2000) o en otros tumores como el neuroblastoma (Cos y cols, 1996). También se ha observado que concentraciones farmacológicas de esta indolamina tienen un efecto antiproliferativo en otros tipos de células tumorales resistentes a las concentraciones fisiológicas como cáncer de colon (García-Navarro y cols, 2007); glioma (Martín y cols, 2006) o cáncer de próstata andrógeno independiente (Saínz y cols, 2005; Saínz y cols, 2008). La inducción de muerte celular a concentraciones altas de la melatonina se ha descrito en la literatura solo en algunos tipos de células tumorales como el cáncer de colon (Winczyk y cols, 2002); hepatocarcinoma (Osseni y cols, 2000; Martín-Renedo y cols, 2008); Sarcoma de Ewing (García-Santos y cols, 2006) y tumores hematológicos como la Leucemia Mieloide Aguda (Rubio y cols, 2007; Bejarano y cols, 2009) o el Linfoma de Burkitt (Trubiani y cols, 2005). Los resultados obtenidos en el presente trabajo demuestran que la melatonina administrada a concentraciones altas presenta un efecto citotóxico en todos los tipos de tumores hematológicos analizados, concretamente Leucemia Linfoide Aguda; Leucemia Mieloide Aguda, Leucemia Mieloide Crónica y Linfoma de Burkitt.

La muerte celular es por apoptosis, que aparece de una forma tardía a partir de las 72 horas de tratamiento. En los estudios previos en los que se había analizado el tipo de muerte inducida por esta indolamina, se había descrito que dicha muerte era de tipo apoptótico (Osseni y cols, 2000; Winczyk y cols, 2002). Estudios realizados por nuestro grupo han demostrado también el efecto citotóxico de la indolamina en células derivadas de Sarcoma de Ewing (García-Santos y cols, 2006). Con respecto a los tumores hematológicos, los datos en la literatura indican que la inducción de apoptosis temprana es en linfoma de Burkitt (Trubiani y cols, 2005) y tardía en Leucemia Mieloide Aguda (Rubio y cols, 2007). Las discrepancias con el trabajo de Linfoma de Burkitt pueden deberse a que en ese caso se utilizó el doble de concentración de indolamina de la que se usó en nuestros estudios.

Existen principalmente dos vías de señalización intracelular en la inducción de apoptosis, la vía extrínseca y la vía intrínseca. La razón para que se induzca una u otra radica en las señales de activación. La vía extrínseca está mediada por la interacción entre una señal externa de muerte celular y una serie de receptores de la membrana citoplasmática pertenecientes a la familia de receptores del TNF o receptores de muerte celular (DR, del inglés “death receptors”). La vía intrínseca o mitocondrial se activa en respuesta a estímulos de muerte independientes del receptor, tales como radiación, estrés celular, etc (Newmeyer y Ferguson-Miller, 2003). A pesar de estas diferencias entre las dos vías, ambas convergen en las caspasas efectoras, Caspasa-3 y Caspasa-7, que desencadenan el proceso apoptótico. En nuestro estudio, la Caspasa-3 es la caspasa efectora en el proceso apoptótico inducido por la melatonina en Leucemia Mieloide Aguda y Linfoma de Burkitt, coincidiendo con lo observado previamente en la literatura en líneas celulares derivadas de este tipo de tumores (Trubiani y cols, 2005; Rubio y cols, 2007; Bejarano y cols, 2009). La Caspasa-7 es la caspasa efectora en la inducción del proceso apoptótico en Leucemia Mieloide Crónica. No se ha descrito en la literatura previamente la actuación de esta caspasa en la inducción de apoptosis por la melatonina. Sin embargo, la inducción de apoptosis en la línea celular de Leucemia Mieloide Crónica (K-562) por quimioterápicos utilizados clásicamente para el tratamiento de esta enfermedad, indican que ambas caspasas pueden participar en este proceso (Miyoshi y cols, 2007; O’Hara y cols, 2010; Yoshida y cols, 2011). La activación exclusiva de la Caspasa-7 en nuestro



modelo puede deberse a las diferentes líneas clonales de K-562 y a las condiciones de cultivo. Estas circunstancias podrían dar lugar a las diferencias observadas en los estudios realizados previamente en esta línea celular así como en los trabajos previos relativos al efecto proapoptótico de la melatonina, cuya caspasa efectora clásica es la Caspasa-3.

La activación de la vía intrínseca de la apoptosis parece estar implicada en el efecto apoptótico de la melatonina en las células derivadas de tumores hematológicos, como nos indica la activación de la Caspasa-9, principal caspasa reguladora de esta vía. Estos resultados están en concordancia con los descritos previamente en la literatura en células derivadas de Sarcoma de Ewing (Casado-Zapico y cols, 2010), hepatocarcinoma (Martín-Renedo y cols, 2008) y más concretamente, en líneas celulares derivadas de linfoma de Burkitt (Trubiani y cols, 2005) y Leucemia Mieloide Aguda (Rubio y cols, 2007; Bejarano y cols, 2009). En nuestro modelo experimental observamos también la implicación de la vía extrínseca de apoptosis, con la activación de la caspasa reguladora de esta vía, la Caspasa-8. La implicación de esta caspasa en el proceso apoptótico desencadenado por melatonina, solo se ha descrito previamente en el caso del Sarcoma de Ewing y del hepatocarcinoma. Particularmente, en el caso del hepatocarcinoma, dicha activación conlleva a la activación de la Caspasa-8, que no se acompaña de un incremento en la expresión del ligando de Fas (Martín-Renedo y cols, 2008), mientras que no se analizaron ninguno de los receptores de muerte. En los estudios previos relativos a tumores hematológicos, solamente se analizó la Caspasa-8 en Leucemia Mieloide Aguda, no obteniéndose diferencias en la activación de la misma (Rubio y cols, 2007). Esto podría deberse a las diferencias en el clon de células utilizado en nuestro estudio. En nuestro trabajo se observa el incremento en la activación de esta caspasa en todas las líneas celulares analizadas, indicándonos que este es uno de los mecanismos clave por los cuales la melatonina ejercería su acción apoptótica. El descenso en la expresión de Bid total nos indica su activación, inducida por la Caspasa-8. Bid es el nexo entre la vía extrínseca y la intrínseca, ya que cuando la vía extrínseca es activada, la Caspasa-8 puede activar Bid, que a su vez activa la vía intrínseca, potenciando la apoptosis. Los resultados aquí presentados sugieren que la melatonina ejercería su acción apoptótica a través de la vía extrínseca, potenciando la apoptosis por la activación de la vía intrínseca mediante la activación de Bid. Estos resultados son similares a los descritos previamente en Sarcoma de Ewing (Casado-Zapico y cols, 2010).

En el efecto citostático de la melatonina están implicados mecanismos mediados y no mediados por receptor. Uno de los objetivos principales de este trabajo ha sido tratar de dilucidar las vías intracelulares de señalización a través de las cuales la melatonina induce apoptosis en las células derivadas de tumores hematológicos. La melatonina es conocida como un potente antioxidante, efecto que está implicado en su capacidad antiproliferativa cuando se utiliza a concentraciones altas en algunos tumores (Saínz y cols, 2005; Martín y cols, 2006). Sin embargo, en nuestro modelo experimental, hemos observado que la melatonina, lejos de ejercer una acción antioxidante en las líneas celulares estudiadas, induce un aumento de los oxidantes intracelulares. Aunque en principio puede parecer sorprendente que un compuesto que químicamente se comporta como depurador de radicales libres y que se ha comprobado que ejerce un efecto potenciador de las defensas antioxidantes induzca un aumento del estrés oxidativo, este mismo efecto ha sido descrito con anterioridad en líneas celulares derivadas de tumores hematológicos (Wolfler y cols, 2001; Buyukavci y cols, 2006) y de hepatoma (Osseni y cols, 2000), dos de los tipos celulares donde esta indolamina presenta igualmente una acción citotóxica. Estudios recientes de nuestro grupo han demostrado que en las líneas celulares en las que las concentraciones altas de melatonina inducen inhibición de la proliferación celular, esta molécula disminuye los oxidantes intracelulares, mientras que en las líneas celulares en las que induce citotoxicidad, aumenta los oxidantes intracelulares (Sánchez-Sánchez y cols, 2011).

El efecto prooxidante de la melatonina en las líneas celulares estudiadas en el presente trabajo se presenta en dos fases, que marcarían dos momentos temporales distintos del proceso apoptótico. El primer incremento se produce durante las primeras 2-8 horas de tratamiento. Este aumento de radicales libres podría ser parte de la vía de la inducción de la apoptosis. Se ha visto que la activación de los receptores de muerte produce un aumento de oxidantes intracelulares (Chandra y cols, 2000; Shen y cols, 2006). De hecho, se ha demostrado la implicación de los radicales libres en la apoptosis inducida por TNF $\alpha$ . Así, en estudios en los que se estimularon las células con este ligando se indujo un incremento rápido de los niveles de oxidantes intracelulares (Larrick y Wright, 1990). También se ha observado la implicación de los radicales libres en la señalización inducida por TRAIL, en la que se produce una acumulación de oxidantes intracelulares tras el tratamiento de las células tumorales con este ligando, mientras que la adición de un



antioxidante es capaz de inhibir su acción (Lee y cols, 2002). Resultados similares se han observado con el receptor de Fas (CD95); su activación mediante la unión de su ligando promueve la producción de oxidantes intracelulares y varios antioxidantes como N-acetil-L-cisteína (NAC), bloquean la inducción de la apoptosis (Devadas y cols, 2003; Sato y cols, 2004). Se ha intentado dilucidar el papel de los oxidantes intracelulares en la muerte celular inducida por Fas. Diversos estudios indican que los radicales libres son capaces de regular a la alta la expresión de Fas (Minana y cols 2002; Denning y cols, 2002). Relacionado con estos trabajos, se demostró previamente que la melatonina potencia tanto el aumento de oxidantes intracelulares como la apoptosis inducida por la activación de Fas (Wölfler y cols, 2001). Estos estudios nos sugieren que el incremento transitorio de oxidantes intracelulares observado en las líneas celulares derivadas de tumores hematológicos podría jugar un papel importante en la activación de la vía extrínseca de la apoptosis.

Además de este incremento transitorio de radicales libres, observamos un nuevo incremento tardío de estos oxidantes intracelulares entre las 24-72 horas de tratamiento. En este caso y teniendo en cuenta el hecho de que a la vez que aumentan los radicales libres aumenta también la activación de la Caspasa-3 y la Caspasa-7, y puesto que la mitocondria es el orgánulo que genera una mayor cantidad de dichos oxidantes, podemos pensar que este aumento de oxidantes intracelulares puede ser una consecuencia del desarrollo del propio proceso de apoptosis durante el desacoplamiento de la cadena de transporte de electrones mitocondrial. Estos resultados coinciden con los descritos previamente en la literatura en tumores hematológicos (Büyükcavci y cols, 2006) y los estudios desarrollados por nuestro grupo en Sarcoma de Ewing (Casado-Zapico y cols, 2010) y en distintas líneas celulares tumorales, en los que la melatonina produce efectos antiproliferativos o citotóxicos (Sánchez-Sánchez y cols, 2001), relacionándose este incremento tardío de radicales libres con el efecto citotóxico de la indolamina.

La activación de la vía extrínseca por los receptores de muerte (DR4, DR5, Fas) y sus ligandos (TRAIL y FasL) fue observada en las líneas celulares estudiadas, confirmando los resultados anteriores relativos a la implicación de la vía extrínseca en el efecto apoptótico de la melatonina. Particularmente, hemos encontrado un incremento en la expresión de Fas y su ligando, FasL, que junto con el uso de bloqueantes para estas

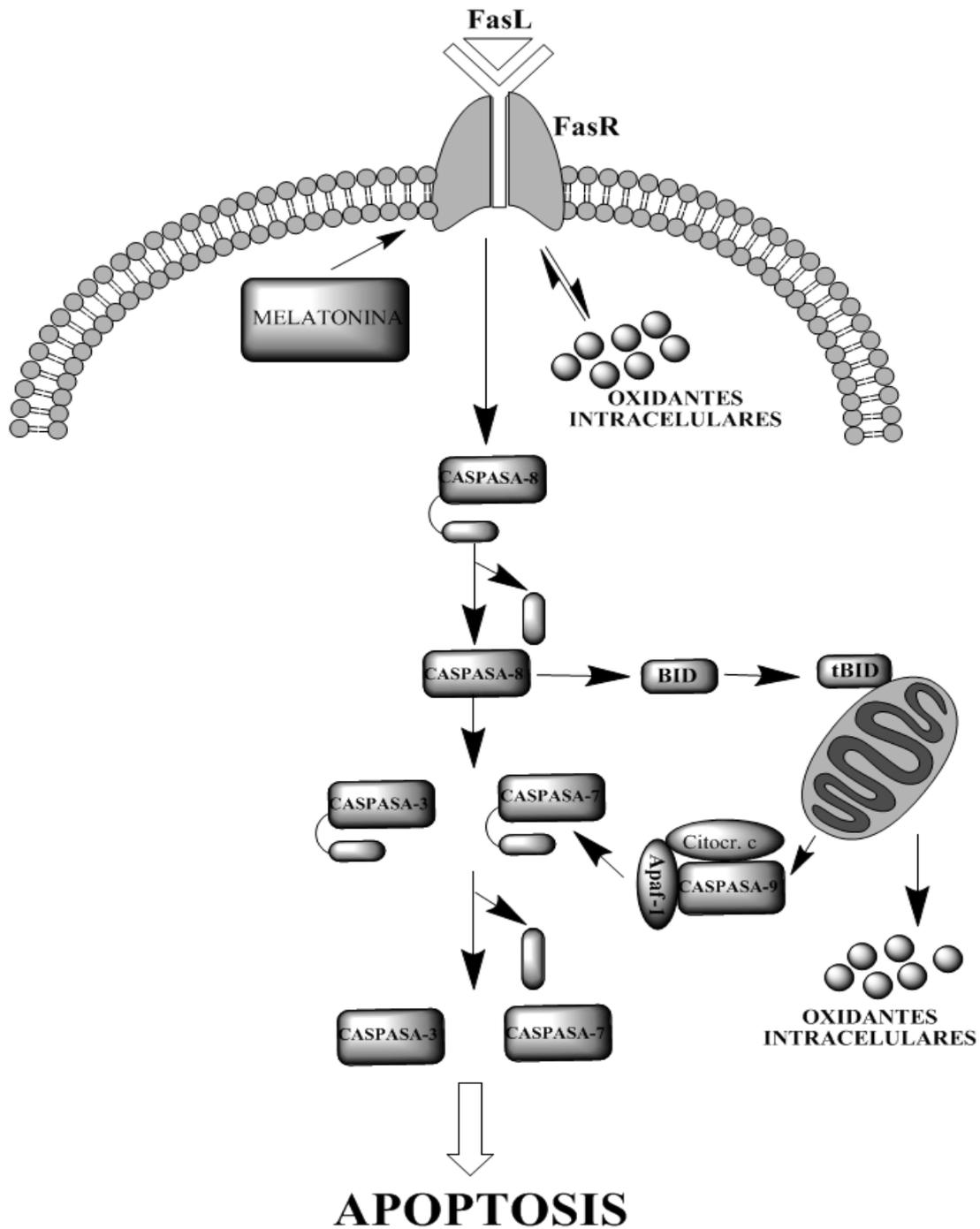
moléculas nos permite confirmar el papel clave de estas moléculas en la acción apoptótica de esta indolamina. El papel tanto de Fas como de su ligando en la apoptosis inducida por quimioterápicos en diversos tumores ha sido ampliamente estudiado en la literatura. Así, se ha observado que los quimioterápicos clásicos tales como cisplatino, doxorubicina, mitomicina C, fluoruracilo y camptotecina, incrementan la expresión de Fas en células HT-29, de carcinoma de colon. También se ha visto este incremento de expresión tras el tratamiento con cisplatino en otras líneas celulares de carcinoma de colon y en células leucémicas U-937, induciéndose citotoxicidad en las mismas (Micheau y cols, 1997). En otros tipos celulares como en células de glioma y meduloblastoma, se observó que tanto la quimioterapia (doxorubicina y/o cisplatino) como la radiación  $\gamma$ , inducen apoptosis, demostrándose la implicación igualmente del receptor de Fas y su ligando (Fulda y cols, 1998). Del mismo modo, en células de Leucemia Mieloide Aguda (HL-60) tratadas con apicidina, un inhibidor de histona deacetilasa, se produce un incremento transitorio en la expresión de Fas y su ligando. Al igual que en nuestro estudio, la inhibición de esta interacción mediante un bloqueante interfiere en la señalización apoptótica mediada por la apicidina, inhibiendo la liberación del citocromo c, la activación de la caspasa-3 y la fragmentación del ADN (Kwon y cols, 2002). También, en células U-937, de Leucemia Mieloide Aguda, el ácido araquidónico induce una regulación a la alta del receptor de Fas y su ligando, mediado por la activación de p38 y la supresión de ERK (Liu WH y cols, 2009).

Además de la implicación de Fas y FasL en la apoptosis inducida en células tumorales, se ha observado el efecto sinérgico del ligando de Fas y TRAIL en la inducción de apoptosis en células de leucemia mieloide crónica (Dicker y cols, 2005). Este último estudio concuerda con los resultados obtenidos en este trabajo, en los que se ha observado no sólo el incremento en la expresión de FasL si no también de TRAIL, pudiendo estar implicados ambos en el efecto proapoptótico de la melatonina. De hecho, en cuanto a los receptores DR4, DR5 y TRAIL, cabe destacar un incremento acusado de la expresión de TRAIL en el linfoma de Burkitt, la expresión de estos receptores y su ligando aumenta significativamente, aunque no de forma tan marcada como en el caso de Fas y FasL. Los resultados obtenidos en DR4, DR5 y TRAIL, están en concordancia con resultados previos del grupo, en los que la melatonina sensibiliza las células de glioma a TRAIL e incrementa la expresión del receptor de muerte DR4 (Martín y cols, 2010). Además, se ha visto que



TRAIL soluble recombinante induce apoptosis en un gran número de células tumorales, incluidas las derivadas de tumores hematológicos, tanto como agente terapéutico único (Plasilova y cols, 2002; Clodi y cols, 2000; Gazitt, 1999; Mitsiades y cols, 2001; Snell y cols, 1997) o como en combinación con otras terapias (Liu Q y cols, 2001; Chen y cols, 2001; Nimmanapalli y cols, 2001). También lo hace in vivo en modelos xenografts de cánceres humanos (Walczak y cols, 1999). Estos estudios manifiestan la importancia de TRAIL en la inducción de apoptosis en este tipo de tumores.

El resumen del mecanismo de acción apoptótico de la melatonina se muestra en la figura 48.

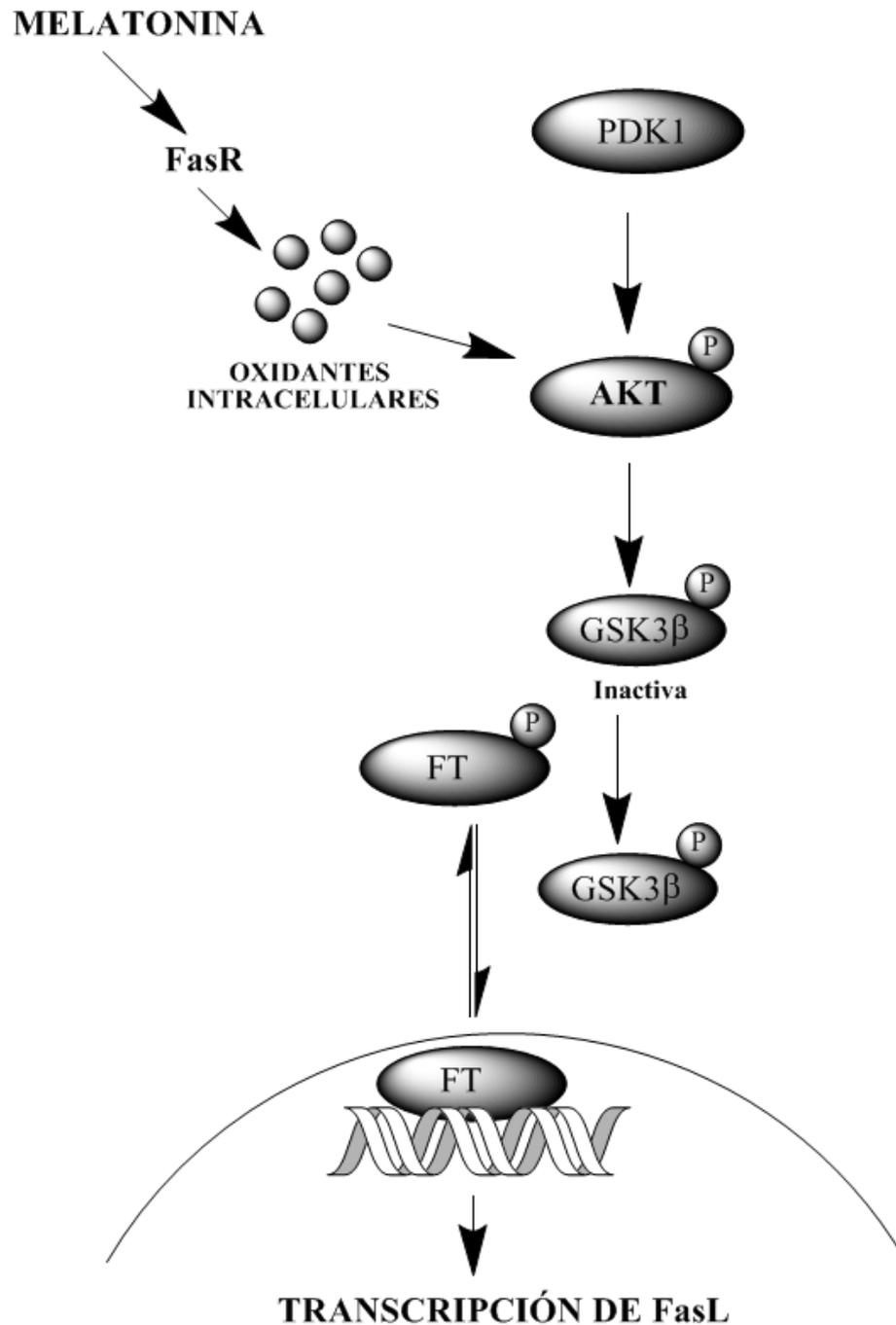


**Figura 48.** Mecanismo de acción en la apoptosis inducida por la melatonina en células derivadas de tumores hematológicos. La melatonina induce un incremento en la expresión de FasR y su ligando, desencadenando la cascada apoptótica de activación de las caspasas efectoras, 3 (HL-60 y CA-46) y 7 (K-562). Durante el proceso se generan radicales libres.



Numerosas vías intracelulares regulan la apoptosis por la vía extrínseca. Entre ellas, PI3K/Akt juega un papel clave en la supervivencia celular. Se ha observado que los inhibidores de esta vía, como la perifosina, inducen apoptosis en leucemias linfoides (Nyakern y cols, 2006), aunque otro de los inhibidores de Akt, GSK690693, no la induce en líneas celulares derivadas de la estirpe mieloide (Levy y cols, 2009). Los resultados obtenidos en las líneas celulares derivadas de tumores hematológicos estudiadas, indican una clara relación entre la activación de Akt y la apoptosis inducida por la melatonina. El bloqueo de la activación de Akt inducida por la melatonina previene parcialmente la muerte producida por esta indolamina, así como el aumento de expresión tanto de Fas como de FasL, claves en la citotoxicidad de esta molécula. Aunque no es un mecanismo muy común, se ha descrito previamente el efecto proapoptótico de Akt tras la activación de FasL en otros tipos celulares (Lu y cols, 2006), así como la inducción de un incremento en la expresión de Fas tras la activación de Akt (Ivanov y cols, 2002; Lu y cols, 2006). La activación de Akt observada en las líneas celulares derivadas de tumores hematológicos estudiadas en el presente trabajo, produce la fosforilación, y por tanto desactivación de una de sus dianas, GSK-3 $\beta$ . La inhibición de esta proteína igualmente produce un descenso en la citotoxicidad inducida por la indolamina así como un descenso en la expresión de FasL. Entre las muchas dianas de fosforilación de GSK-3 $\beta$  se encuentran factores de transcripción que pueden dar lugar a producción de factores antiapoptóticos (como interleuquina-2 (IL-2)) y proapoptóticos (como el ligando de Fas), dependiendo de la homeostasis celular. Cuando GSK-3 $\beta$  fosforila a estos factores de transcripción, no se pueden unir a su promotor, bloqueándose por tanto la transcripción de estos genes. La activación de Akt fosforila y por tanto desactiva GSK-3 $\beta$ , inhibiendo de esta manera la fosforilación de los factores de transcripción y permitiendo la transcripción de genes como FasL. Existen pocos trabajos en la literatura que describan esta relación entre GSK-3 $\beta$  y Fas/FasL (Badorff y cols, 2002; Remy y Michnick, 2004). En el trabajo descrito por Remy y Michnik se indica que las propias proteínas reguladoras de Akt podrían inducir esta vía apoptótica, potenciando su fosforilación. Nuestro estudio confirma estos resultados, ya que demostramos la relación entre la activación de Akt, la consecuente desactivación de GSK-3 $\beta$  y la inducción de apoptosis mediada por la melatonina a través de Fas/FasL.

En nuestro grupo habíamos descrito previamente la desactivación de Akt tras el tratamiento con melatonina de células de glioma (Martín y cols, 2006). Las discrepancias con estos resultados podrían estar relacionadas con el estado oxidativo celular. Uno de los eventos clave en la acción antiproliferativa de la melatonina en las células de glioma es la inhibición de Akt, que está mediado por el descenso en los oxidantes intracelulares (Martín y cols, 2006). Sin embargo, en las líneas celulares descritas en este trabajo, la melatonina ejerce una acción proapoptótica e incrementa el estrés oxidativo intracelular de manera transitoria, en las primeras horas de tratamiento, que coincide con la activación de la vía extrínseca de la apoptosis ya descrita previamente (Shen y Pervaiz, 2006). Estos resultados están en concordancia con los descritos por Lu y cols, que demuestran la existencia de un incremento de oxidantes intracelulares previo a la activación de Akt, que desencadenaría la cascada de señalización descrita previamente e implicaría GSK-3 $\beta$ . Nuestros resultados indican que Akt tiene un importante papel en la apoptosis inducida por la melatonina en líneas celulares de tumores hematológicos. Un posible mecanismo para la implicación de Akt en la apoptosis inducida por la melatonina se muestra en la figura 49.



**Figura 49.** Posible implicación de Akt en la apoptosis inducida por la melatonina. El incremento en la expresión de FasR y su ligando por la melatonina incrementaría los radicales libres que activarían la vía PI3K/Akt, potenciando en este caso la señalización apoptótica por un aumento en la transcripción de FasL. FT, Factor de Transcripción.

La Leucemia Mieloide Aguda constituye el 30% de las leucemias en adultos y el 0,6% de todos los cánceres (Rodríguez-Abreu, 2007). Entre el 50-75% de los pacientes con esta enfermedad consiguen una remisión completa. Sin embargo, sólo un 20-30% de los pacientes disfrutan de una supervivencia libre de enfermedad durante mucho tiempo. La mayoría mueren por su enfermedad, principalmente por la resistencia o recaída de la misma (Tallman y cols, 2005). Se requieren por tanto nuevas terapias, que además no produzcan efectos secundarios indeseables para los pacientes. La combinación de melatonina y doxorubicina presenta un efecto antagonista en dos de las líneas celulares de Leucemia Mieloide Aguda utilizadas en nuestro estudio, a pesar de que cada uno de estos fármacos por separado induce un descenso en el número de células tumorales. En cambio, en la línea celular HL-60 (Leucemia Mieloide Aguda), esta combinación tiene un efecto aditivo. Esta disparidad de resultados puede deberse al distinto estado de maduración de las líneas celulares. Así, las dos líneas en las que la combinación tiene un efecto antagonista, están más diferenciadas (Leucemia Mielomonocítica Aguda), que esta última (Leucemia Promielocítica Aguda). Los efectos de la combinación de dos fármacos no dependen sólo del tipo de compuesto que se combina sino de las células tumorales de las que se trata. En un estudio realizado por Fan y cols (2010), se combinaron concentraciones de melatonina y doxorubicina en carcinoma hepatocelular, obteniendo un efecto sinérgico muy acusado en las concentraciones micromolares. Otros autores describieron que la melatonina sensibiliza células de leucemia de ratón a los efectos de la doxorubicina (Granzotto y cols, 2001).

La ifosfamida es un agente alquilante cuyo mecanismo de acción consiste en alquilar el ADN mediante el ataque de la posición N-7 de la guanina, induciendo cruzamientos intra e interhebra, produciendo citotoxicidad y muerte celular (Zalupski y cols, 1988). La combinación de melatonina e ifosfamida presenta un efecto sinérgico en la reducción del número de células en las tres líneas celulares utilizadas. El nivel de sinergismo varía de una línea celular a otra y es dependiente de concentración y de tiempo, existiendo diferencias significativas ya a las concentraciones más bajas utilizadas tanto del quimioterápico como de la melatonina. El efecto sinérgico de la melatonina y la ifosfamida ya había sido observado previamente por nuestro grupo en la línea celular de Sarcoma de Ewing, SK-N-MC (Casado-Zapico y cols, 2010). De hecho, este trabajo es hasta ahora el único en la literatura que refiere un efecto sinérgico entre la ifosfamida y la melatonina en líneas celulares tumorales. Los resultados aquí presentados indican que esta sinergia



también se produce en líneas celulares derivadas de tumores hematológicos, pero con diferencias respecto al Sarcoma de Ewing, probablemente debidas al hecho de ser distintas líneas celulares. Así, se requiere una concentración mayor de ifosfamida y más tiempo de incubación para conseguir un efecto similar al obtenido en el Sarcoma de Ewing.

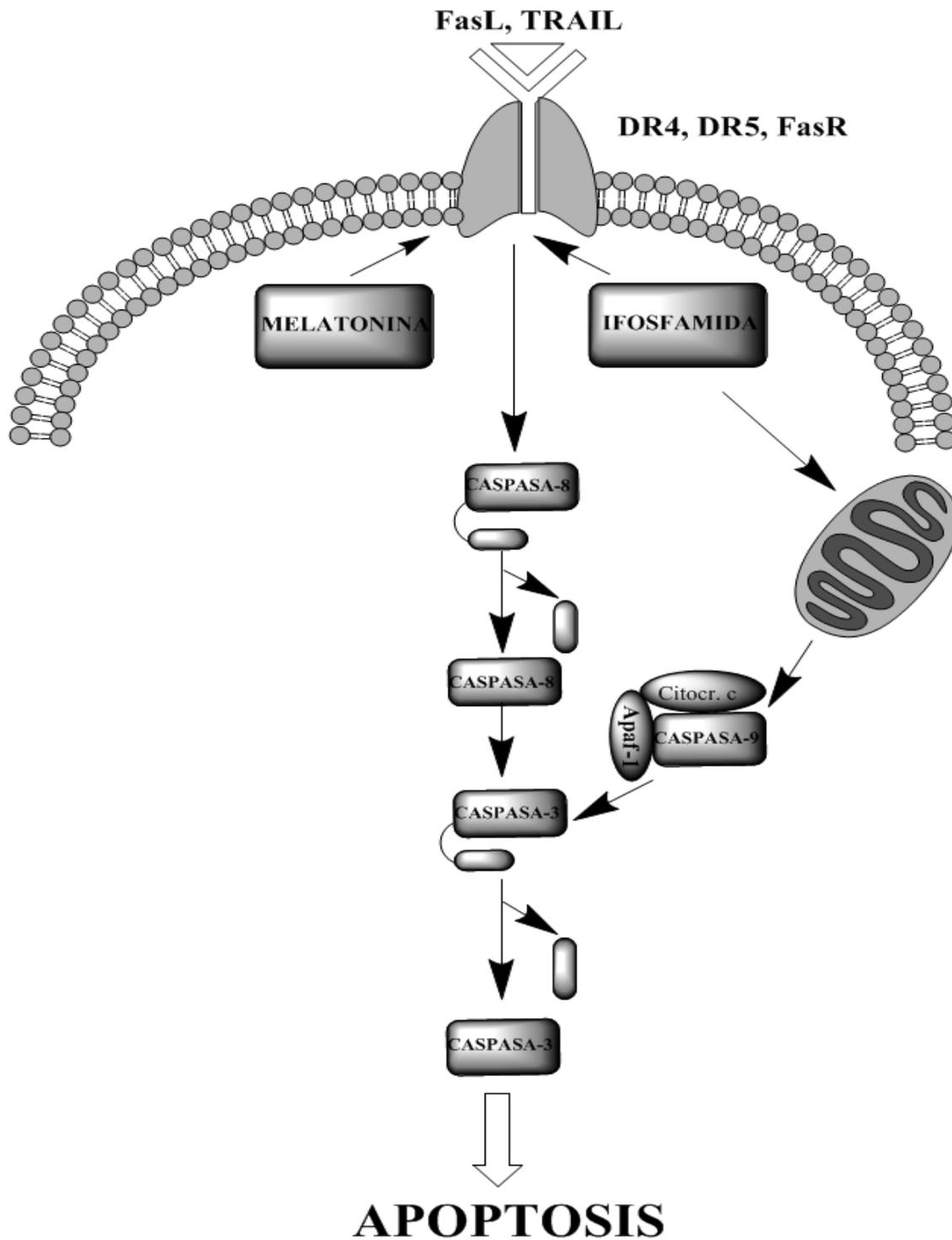
La sinergia entre estos dos fármacos disminuyendo el número de células es debida a una potenciación de la apoptosis inducida por cada uno individualmente, como indica la actividad de la caspasa efectora, Caspasa-3, que se magnifica cuando se combinan ambos compuestos. Previamente, habíamos comentado la implicación de esta caspasa en la muerte celular inducida por la melatonina en las líneas celulares estudiadas. Diversos trabajos han puesto de manifiesto la implicación de la apoptosis en la muerte inducida por quimioterápicos en células derivadas de tumores hematológicos (Wen y cols, 2000; Canestrato y cols, 2010). Sin embargo, y en algunos casos las caspasas efectoras sólo se activan cuando se combinan dos quimioterápicos (Zhang y cols, 2009; Maiso y cols, 2009). En las tres líneas celulares estudiadas en este trabajo, observamos que, al igual que en el Sarcoma de Ewing (Casado-Zapico y cols, 2010) y en las células de carcinoma hepático (Fan y cols, 2010), la activación de la caspasa-3 se produce tras el tratamiento con los fármacos individualmente aumentando de forma llamativa en combinación de estos.

Las dos caspasas reguladoras de las vías apoptóticas, la Caspasa-8, principal caspasa reguladora de la vía extrínseca, y la Caspasa-9, principal reguladora de la intrínseca, también incrementa su actividad al combinar ambos compuestos. Estos resultados se corresponden con los observados en la literatura, en cuanto a que la combinación de diversos quimioterápicos induce apoptosis en líneas celulares tumorales activando ambas vías (Canestrato y cols, 2010; Zhang y cols, 2009; Maiso y cols, 2009; Casado-Zapico y cols, 2010).

La combinación de ifosfamida y melatonina también induce un incremento en la expresión de los receptores de muerte y sus ligandos en relación al inducido por cada fármaco individualmente. Fas/FasL, pero sobre todo FasL muestra un incremento bastante acusado al combinar ambos fármacos. En este trabajo habíamos descrito previamente la implicación de Fas/FasL en la citotoxicidad inducida por la melatonina. En la literatura, distintos trabajos demuestran la implicación tanto de Fas como de FasL en la inducción de apoptosis mediada por la ifosfamida individualmente o en combinación con otros agentes (Duan y cols, 2004; Duan y cols, 2006). Aunque clásicamente se ha visto que la ifosfamida

induce apoptosis por medio de la vía intrínseca, propiciando la liberación del citocromo c de la mitocondria, en nuestro trabajo y como se ha publicado previamente con otros quimioterápicos (Micheau y cols, 1997), se ha observado que también ejerce su acción a través de la vía extrínseca de la apoptosis. Además del incremento en la expresión de Fas/FasL, se produce un incremento de DR4, DR5 y TRAIL. En nuestro grupo habíamos observado previamente que el tratamiento con melatonina sensibiliza a las células de glioma frente a TRAIL (Martín y cols, 2010). En la literatura también se describe que el uso de quimioterápicos antileucémicos, sensibiliza a líneas celulares derivadas de leucemia mieloide aguda a este ligando (Wen y cols, 2000). La combinación de melatonina e ifosfamida incrementa el efecto apoptótico observado con cada agente individualmente, potenciando tanto la vía intrínseca, como la extrínseca, particularmente por la activación de los receptores de muerte.

El mecanismo de acción de la combinación se observa en la figura 50.



**Figura 50.** Mecanismo de acción apoptótico de la combinación de melatonina e ifosfamida. Ambos compuestos incrementan la expresión de los receptores de muerte y sus ligandos, desencadenando la apoptosis.

El efecto antitumoral de la melatonina en tumores hematológicos fue confirmado en un modelo experimental in vivo de Leucemia Mieloide Aguda. El tratamiento de los animales con melatonina en el agua de bebida se mostró capaz de reducir de manera significativa la extensión del tumor. En la literatura encontramos pocos estudios que muestran la acción antitumoral de la melatonina in vivo, (Cini y cols, 1998; Blak y cols, 1999; León-Blanco y cols, 2003; Melancon y cols, 2005; Saez y cols, 2005; Martín y cols, 2006; Jung-Hynes y cols, 2011). Estos estudios se han centrado en el efecto de la melatonina in vivo para el tratamiento de hepatoma (Cini y cols, 1998; Blask y cols, 1999); próstata (Jung-Hynes y cols, 2011); glioma (Martín y cols, 2006); y cáncer de mama, en el que se ha estudiado la indolamina como agente preventivo de estos tumores (Sáez y cols, 2005), como tratamiento único (León-Blanco y cols, 2003) o en combinación con quimioterápicos (Melancon y cols, 2005). El trabajo aquí presentado es el primero en el que se analiza el efecto de la melatonina en un modelo experimental in vivo de Leucemia Mieloide Aguda. Los resultados obtenidos fueron similares a los estudios previos en otros tipos de tumores: la melatonina disminuye el crecimiento y la extensión del tumor. El mecanismo de acción de la melatonina no se ha estudiado en este modelo experimental. Deberíamos tener en cuenta que las propiedades inmunomoduladoras de la melatonina (Maestroni y cols, 1986; Lin y cols, 2001) pueden estar colaborando en su efecto antitumoral in vivo. Los ratones utilizados para este ensayo fueron ratones NOD/SCID, que tienen una inmunodeficiencia severa. Esta inmunodeficiencia afecta al desarrollo de linfocitos B y T, reduciéndose el número de células NK, macrófagos y granulocitos. La melatonina podría estar potenciando el poco sistema inmune que poseen. También, los resultados obtenidos in vitro nos inducen a pensar que es la propia molécula la ejerce citotoxicidad en las células tumorales y las pocas células que puedan quedar tardarían más en desarrollar el tumor.

Para cuantificar el desarrollo del tumor, se utilizó la técnica del bioimagen, una técnica no invasiva que permite analizar el efecto del fármaco sin riesgo de dañar al ratón. El uso de esta técnica permitió igualmente analizar la supervivencia de los ratones. Pocos estudios han podido analizar la supervivencia de los roedores tratados con la indolamina (Cini y cols, 1998), ya que normalmente se sacrifican para analizar otros parámetros moleculares. En nuestro estudio, además de un descenso en el crecimiento del tumor, observamos un incremento en la supervivencia de los ratones tratados con melatonina.



Nuestro estudio coincide con el realizado en hepatoma, en el que también se observó que la melatonina aumentaba la supervivencia (Cini y cols, 1998). Este incremento en la supervivencia probablemente se deba al enlentecimiento en el desarrollo del tumor.

Los ensayos *ex vivo*, realizados en células de pacientes con tumores hematológicos confirmaron la acción citotóxica de la indolamina que habíamos observado en las líneas celulares establecidas. Existe en los resultados variabilidad entre las distintas muestras, probablemente debida a las propias características individuales de los pacientes, entre ellas el tipo de tumor hematológico, siendo principalmente, las muestras de Leucemia Mieloide Aguda en las que se observa un efecto más acusado de la melatonina.

La expresión basal de FasL en los pacientes es muy baja cuando se compara con la expresión de esta molécula en controles sanos. La expresión de Fas, en cambio es variable. En la literatura se han descrito mutaciones de Fas en una gran variedad de tumores hematológicos y no hematológicos, como leucemia linfocítica aguda infantil, enfermedad de Hodgkin, linfoma no-Hodgkin y leucemia aguda (Sibley y cols, 2003). Por otra parte, debido a un *splicing* alternativo del gen de Fas, se producen isoformas solubles, que pierden el dominio transmembrana, impidiendo la trimerización del receptor y su unión al ligando. Se ha descrito que el incremento de los niveles en el suero de Fas soluble están asociados con una menor supervivencia y remisión en adultos con leucemia de células T (Debatin y cols, 2003; Fulda, 2009). También se ha observado una peor supervivencia en pacientes con Fas soluble alto en suero antes del tratamiento, siendo este un importante mecanismo de resistencia a los quimioterápicos (Pichon y cols, 2006).

Nuestros resultados concuerdan con los estudios realizados por Li y cols (2000), en los que al igual que sucede en nuestro estudio, encontraron niveles de Fas variables en pacientes con leucemia mieloide aguda, leucemia linfocítica aguda y leucemia mixta. Otros estudios describen la correlación entre la expresión baja de Fas y un peor pronóstico en pacientes con leucemia mieloide aguda y leucemia linfocítica aguda (Suminoe y cols, 2004; Mata y cols, 2010). Además, en leucemia linfocítica aguda infantil, los niños recién diagnosticados que presentan un alta expresión de FasL muestran una menor incidencia en la recidiva y una supervivencia mayor (Volm y cols, 1999). También la mayor supervivencia y la menor incidencia de recaída se correlaciona con la expresión en las células de pacientes con leucemia mieloide aguda de DR4, DR5 y Fas (Min y cols, 2004),

induciendo la expresión de varios receptores de muerte un efecto sinérgico en la apoptosis de células leucémicas.

En este trabajo hemos observado un aumento en la expresión de Fas y FasL tras el tratamiento con melatonina en células de pacientes con leucemia mieloide aguda. Teniendo en cuenta que la melatonina induce citotoxicidad en estas células, el incremento en el receptor y el ligando tras el tratamiento con la indolamina, confirma igualmente los resultados obtenidos en las líneas celulares derivadas de tumores hematológicos. La citotoxicidad inducida por la melatonina podría estar mediada por el incremento de Fas y su ligando. Estos resultados estarían en concordancia con las publicaciones previas descritas que indican que el incremento de Fas y su ligando en los pacientes se correlaciona con un mejor pronóstico, menor incidencia de recaída y mayor supervivencia (Volm y cols, 1999; Suminoe y cols, 2004; Min y cols, 2004; Mata y cols, 2010). De hecho, se ha correlacionado la expresión de Fas con la respuesta a la quimioterapia (Min y cols, 1996; Iijima y cols, 1997), observándose que la expresión baja del receptor se asocia a un bajo índice de remisión completa tras la quimioterapia en leucemia mieloide aguda. Esta capacidad de la melatonina para inducir citotoxicidad en células de pacientes con leucemia mieloide aguda y el incremento en Fas y FasL, haría de esta molécula un importante agente a considerar en la terapia de este tipo de tumores en combinación con otros quimioterápicos

Cuando se realizaron los estudios de expresión génica, se observó que las células de pacientes con leucemia mieloide aguda muestran un patrón diferencial de expresión de genes relacionados con la apoptosis respecto a los controles sanos. Los pacientes tienen un incremento en la expresión de varios genes proapoptóticos. En primer lugar, se observa un incremento en la expresión de genes proapoptóticos de la familia Bcl-2 como *BAD*, *BAX*, *BAK1*, *MIL1*, *BBC3*, *BNIP3* y *BMF*.

*BAD* (del inglés, Bcl-2 associated death promoter) induce muerte celular interfiriendo en la unión de *BAX* a Bcl-2 y Bcl-XL. La fosforilación de *BAD* está mediada por Akt, evitando su acción apoptótica (Zha y cols, 1996).

También se observa un incremento de *BAX* (del inglés, Bcl-2 associated X protein) y *BAK1* (del inglés, Bcl-2 homologous antagonist killer), cuya función es similar,



incrementando la permeabilidad de la membrana plasmática y permitiendo así la liberación del citocromo c.

**MIL1**, también llamado BCL2L13 (del inglés, Bcl-2 like protein L13), Bcl-rambo, es un facilitador de la apoptosis, su sobreexpresión induce apoptosis que es bloqueada por inhibidores de caspasa (Kataoka y cols, 2001).

**BBC3** (del inglés, Bcl-2 binding component 3), codifica para PUMA (del inglés, p53 upregulated modulator of apoptosis). Este gen es inducible por p53, propiciando que PUMA libere a BAX y desencadene la apoptosis (Misuhashi, 2008).

**BNIP3** (del inglés, Bcl-2/adenovirus E1B 19 kd interacting protein) desencadena la muerte celular por incremento en la permeabilidad de la membrana mitocondrial. Esta acción induce una pérdida de potencial de membrana, y un incremento en la producción de especies reactivas del oxígeno (Murai y cols, 2005). Su baja expresión parece estar relacionada con la resistencia al tratamiento con busulfán en líneas celulares de leucemia mieloide aguda (Valdez y cols, 2008). Esta baja expresión está asociada a una metilación aberrante del gen en este tipo de tumores (Murai y cols, 2005).

El gen **BMF** (del inglés, Bcl-2 modifying factor), tiene también función proapoptótica (Putalah y cols, 2001). Se ha visto incrementada su expresión en leucemia linfocítica crónica tras el tratamiento con citoquinas como TGF- $\beta$  (Romano y cols, 2008).

Varios genes proapoptóticos no pertenecientes a la familia Bcl-2 se ven incrementados en los pacientes respecto a los controles sanos. Estos genes son AIFM1, APAF1 y Smac/DIABLO.

**AIFM1**, (del inglés, apoptosis inducing factor 1 mitochondrial), se encuentra en el espacio intermembrana de la mitocondria. Cuando se induce la apoptosis, esta proteína se transloca al núcleo, en donde juega un papel importante en la condensación de la cromatina y en la fragmentación. Además, induce la liberación del citocromo c y la Caspasa-9. El incremento en su expresión ha sido correlacionado con un mejor pronóstico en leucemia mieloide aguda (Bradoudaki y cols, 2011).

**APAF1**, (del inglés, apoptotic protease activating factor 1), juega un papel importante en la activación de la vía intrínseca de la apoptosis, ya que forma un complejo con Caspasa-9, propiciando su activación, y por tanto, la subsecuente rotura de la Caspasa-3. Su baja expresión se ha asociado a una peor respuesta a la quimioterapia en pacientes con leucemia mieloide aguda (Benites y cols, 2008).

**Smac/DIABLO** (del inglés, Second mitochondria-derived activator of caspase/diablo homolog (*Drosophila*)), se une a las proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAPs, de sus siglas en inglés), impidiendo la unión de estas proteínas con las caspasas, propiciando la apoptosis (Du y cols, 2000). Uno de los intentos en la terapia contra la leucemia es la producción de moléculas similares a DIABLO, que se unan e inhiban IAPs (Guo y cols, 2002; Arnt y cols, 2002; Fulda y cols, 2002).

Algunos genes antiapoptóticos también se ven incrementados en los pacientes respecto a los controles sanos. Se observa así un incremento en los genes antiapoptóticos de la familia Bcl-2, BCL2L1 y BID.

**BCL2L1**, (del inglés, Bcl-2-like protein 1), codifica para la forma larga de la proteína Bcl-XL (del inglés, B cell lymphoma/leukemia X long fragment). Esta proteína inhibe la apoptosis impidiendo la translocación de BAX a la membrana mitocondrial. El incremento de su expresión frente a los controles sanos concuerda con lo observado en la literatura en pacientes con leucemia linfocítica aguda (Huang y cols, 2010). Se ha visto que el incremento en la expresión de Bcl-XL está relacionado con un peor pronóstico en pacientes con leucemia mieloide aguda y confiere resistencia a la quimioterapia tanto en líneas celulares como en tumores hematológicos (Shangary y Johnson, 2003).

**BID** se localiza en el citosol como un precursor inactivo. Su forma activa se genera por su rotura proteolítica inducida por la Caspasa-8 en la señalización extrínseca de la apoptosis. Cuando es activado, se transloca a la mitocondria, induciendo la liberación del citocromo c. BID es el nexo de unión entre las dos vías apoptóticas, su activación incrementa la señal apoptótica iniciada por la vía extrínseca. En este caso, lo hemos encuadrado dentro de los genes antiapoptóticos debido a que la expresión analizada es la de la forma total, estado en el cual permanecería inactivo en el citosol.

Algunos genes antiapoptóticos, no pertenecientes a la familia Bcl-2, también se ven incrementados en pacientes. Estos genes codifican para proteínas inhibidoras de la apoptosis y son CFLAR, BIRC1 y BIRC6.

**CFLAR**, (del inglés, Caspase-8 and FADD like apoptosis regulator), codifica para la proteína inhibidora FLIP (del inglés, FLICE inhibitory protein), que se une al DISC (del inglés, death-inducing signalling complex) e interfiere en la inducción de apoptosis. El incremento en la expresión de FLIP se ha visto relacionado con un peor pronóstico en linfoma de Burkitt, disminuyendo la supervivencia y la remisión completa (Valnet-Rabier



y cols, 2005), ocurriendo lo mismo en una gran variedad de malignidades de tipo B, algunas leucemias mieloides agudas, y leucemias linfoides crónicas (Tschopp y cols, 1999; Tschopp y cols, 1999).

Otros dos genes inhibidores de la apoptosis se ven incrementados en los pacientes respecto a los controles sanos: **BIRC1** (del inglés, baculoviral IAP repeat containing protein 1), también conocido como NAIP (del inglés, neuronal apoptosis inhibitory protein) y **BIRC6** (del inglés, baculoviral IAP repeat containing protein 6), también llamado Apollon. Nuestros resultados no son concordantes con el estudio realizado por Tamm y cols, en el 2000. En este estudio se analizó la expresión en 60 líneas celulares tumorales de los genes inhibidores NAIP, XIAP, cIAP1, cIAP2 y survivina. Se observó un incremento en la expresión de XIAP y cIAP1, en cambio NAIP no fue detectable. En nuestro caso, XIAP se encuentra dentro de los valores normales y survivina no es detectable. La discrepancia de nuestros resultados con este estudio puede deberse a que en nuestro caso se analizó en células de pacientes hematológicos, no en líneas celulares, lo cual implica una variabilidad debida a las características individuales de los pacientes.

Por otro lado, también se observa en los pacientes el descenso de algunos genes proapoptóticos respecto a los controles sanos. Estos genes son BCL2L11, GZMB y PRF1.

**BCL2L11**, (del inglés, bcl-2-like protein 11), también llamado BIM, es un activador de la apoptosis que interacciona con BCL2L1/BCL-X(L), y es importante en la inducción de apoptosis en linfocitos (Hsu y cols, 2008). También, dos genes claves en la vía de la Granzima/perforina se muestran regulados a la baja, GMZB y PRF1. **GRMZB** (granzima B) se expresa en la superficie de linfocitos T citotóxicos y células Natural Killer y su expresión es crucial en la inducción de apoptosis por estas células en la respuesta inmune. **PRF1** (perforina) también está implicada en la respuesta inmune. Es una proteína citolítica que se inserta en la membrana plasmática de la célula diana, formando un poro y propiciando su muerte.

Finalmente, algunos genes antiapoptóticos ven su expresión disminuida en pacientes. Estos genes son Bcl-2, BIRC3 y SERPINB9.

**Bcl-2**, (del inglés, B cell lymphoma/leukemia 2 gene), está implicado en la regulación de la homeostasis del calcio y el flujo de protones en la mitocondria (Zhu y cols, 1999) y como consecuencia, inhibe la liberación del citocromo c (Murphy y cols, 2000). En la literatura se describe que este gen está regulado a la alta en muchos tipos de

tumores hematológicos como linfomas foliculares no-Hogkin de bajo grado, linfomas difusos, leucemia linfoide crónica y leucemia mieloide aguda, relacionándose esta alta expresión con una menor supervivencia de los pacientes (Mounier y cols, 2003; Kitada y cols, 2002; Andreef y cols, 2002; Campos y cols, 1998; Banker y cols, 1998). Las discrepancias con estos estudios pueden ser debidas a las propias características individuales de los pacientes.

**BIRC3**, (del inglés, baculoviral IAP repeat containing protein 3), es miembro de la familia de inhibidores de apoptosis e interfiere con la activación de las caspasas. Este gen se muestra regulado a la baja, pese a que otros dos genes de la misma familia se encuentran sobreexpresados respecto a los controles sanos. También se encuentra regulado a la baja un gen implicado en la vía de la Granzima/Perforina, SERPINB9, que codifica para Serpina 9, un inhibidor de serín proteasas. Mediante esta función es capaz de inhibir la vía de Granzima B.

Tras el tratamiento de las células de pacientes con melatonina, la expresión de algunos genes antiapoptóticos disminuye en relación a la presentada en células no tratadas, llegando a los rangos que la técnica considera normales. La melatonina, al inducir un efecto citotóxico en estas células, podría reducir los niveles de los genes antiapoptóticos anteriormente sobreexpresados, permitiendo el correcto desarrollo de la apoptosis.

El tratamiento con melatonina incrementa la expresión de la mayoría de los genes proapoptóticos analizados: TNFRSF21, CDKNA, HTRA2, PMAIP1, BAD, APAF1 y BMF. Previamente hemos descrito las funciones clave de BAD, APAF1 y BMF en la inducción de apoptosis, por lo tanto no es extraño que estos genes se vean incrementados tras un tratamiento que induciría muerte celular.

**TNFRSF21**, codifica para el receptor de muerte DR6. Su expresión se ha visto incrementada en algunas líneas celulares tumorales de carcinoma cervical, adenocarcinoma colorrectal, carcinoma de pulmón y cáncer de próstata. En líneas celulares derivadas de tumores hematológicos su expresión es baja (Pan y cols, 1998; Klima y cols, 2009). En células hematológicas, diversos estudios han puesto de manifiesto que los linfocitos B y T CD4+ deficientes en este receptor, muestran una hiperproliferación (Liu y cols, 2001; Zhao y cols, 2001; Schmidt y cols, 2003). Teniendo en cuenta lo anterior, y el efecto citotóxico de la melatonina en las células de pacientes, podríamos pensar que la expresión del receptor se incrementaría para inducir la muerte celular.



Otro de los genes que se incrementa tras el tratamiento es **CDKN1A**, (del inglés, cyclin-dependent kinase inhibitor 1A), que codifica para la proteína p21, regulador del ciclo celular y cuya expresión está controlada por el supresor tumoral p53, y se ha asociado con el proceso apoptótico (Marone y cols, 2003). La melatonina, en su acción antiproliferativa, altera la expresión de proteínas implicadas en la regulación del ciclo celular como p21 (Mediavilla y cols, 1999; She y cols, 2004), por lo que no es extraño que esta proteína se sobreexpresara tras el tratamiento con la indolamina.

**HTRA2**, (del inglés, high temperatura requirement protein A2), también llamado Omi, es una serín proteasa que se localiza principalmente en la mitocondria. Cuando se induce la apoptosis, esta enzima se libera al citosol, en donde mimetiza a las caspasas de forma que pueda unirse a los inhibidores de las mismas, IAP, inhibiéndolos y favoreciendo el desarrollo de la apoptosis. También ejerce su acción proapoptótica por su actividad proteasa, independiente de IAP y de caspasa. El incremento de esta molécula como resultado de un tratamiento inductor de apoptosis ya se ha observado previamente en líneas celulares de leucemia mieloide aguda (Amrán y cols, 2007; Sánchez y cols, 2008). En estos trabajos, su incremento viene acompañado de un descenso en el inhibidor XIAP, que en nuestro estudio se mantiene dentro de los valores normales, antes y después del tratamiento con la indolamina.

**PMAIP1**, (del inglés, phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1), que codifica para NOXA, pertenece a la familia Bcl-2, y su función es la inactivación de proteínas Bcl-2 proapoptóticas específicas. Los resultados aquí obtenidos son concordantes con los observados previamente en la literatura, en los cuales tras un tratamiento inductor de apoptosis, se induce la expresión de este gen (Gómez-Bougie, 2007; Krige y cols, 2008; Hagenbuchner y cols, 2009; Obexer y cols, 2009). La sobreexpresión de estos dos genes, HTRA2 y PMAIP1, podría ser la explicación de que los genes antiapoptóticos que estaban regulados a la alta antes del tratamiento, desciendan hasta valores normales, permitiendo la inducción de apoptosis por la melatonina.

Sin embargo, se observa un descenso de genes proapoptóticos, GMZB, PRF1 y BIK. **BIK**, (del inglés, Bcl-2 interacting killer), interacciona con proteínas como Bcl-2 para incrementar la señal apoptótica. La expresión de **GMZB** y **PRF1** ya estaba disminuida respecto a los controles sanos. Si tenemos en cuenta los resultados obtenidos en las líneas celulares, la melatonina induce apoptosis por la vía extrínseca, activando la intrínseca

mediante BID, es de esperar por tanto que la vía de la Granzima/Perforina no se vea modificada ya que no actúa sobre ella.

Aunque existe cierta variabilidad en las expresiones de los genes relacionados con la apoptosis, la melatonina parece que incrementa la expresión de los genes proapoptóticos, manteniendo algunos de los genes inhibidores de la apoptosis dentro de los rangos de normalidad o incluso disminuyendo su expresión.

En conclusión, los datos presentados en este trabajo demuestran la capacidad citotóxica de la melatonina en células derivadas de tumores hematológicos, su efecto sinérgico con quimioterápicos utilizados en el tratamiento de este tipo de tumores y la extrapolación de este efecto a los estudios *in vivo*, y a la clínica, mediante los estudios *ex vivo* con células de pacientes. Todos estos resultados sugieren que la melatonina podría ser un fármaco a tener en cuenta en la terapia de este tipo de tumores, ya sea como coadyuvante de los tratamientos quimioterápicos actuales o como agente principal.

## **VI. SUMMARY**



Haematological malignancies comprise a heterogeneous group of neoplasias. Survival and affectation differ depending on the tumor type. Currently the treatment approaches imply chemotherapeutic drugs, new biological antitumoral compounds, and autologous or heterologous stem cell transplantation. Despite the advance of these treatments and the increase in the patient's survival, mortality still remains high, specially in some subtypes of tumours, due to the disease itself or the side effects of the treatment. For this reason, new and safe therapies for patients are required.

Based on the antitumoral properties of melatonin, we decided to study in this doctoral thesis the possible effects of this compound in human cell lines derived from different haematological malignancies and patient cells. First of all, we tested the effect of melatonin in human cell lines derived from acute myeloid leukemia (AML), acute lymphoid leukemia (ALL), chronic myeloid leukemia (CML) and Burkitt's lymphoma (BL). We found that melatonin induced apoptotic cell death in cell lines studied by the activation of the extrinsic apoptotic pathway. Such activation is mediated by the activation of the members of the death receptors family Fas/FasL. Our data also indicate that oxidative stress, Akt and one of its targets, GSK-3 $\beta$ , play a key role in the activation of this pathway by regulating the expression of Fas receptor, triggering the apoptotic effect of melatonin.

Our data in acute myeloid leukemia also demonstrate that melatonin not only exert a cytotoxic effect by itself but also exert a synergistic effect in combination with ifosmamide (a chemotherapeutic drug used in the treatment of this disease) while we found either an antagonist or an additive effect in combination with doxorubicin depending on the cell line studied. This synergistic effect was apoptotic with the implication of the extrinsic pathway through death receptors.

An *in vivo* experiment was developed using NOD/SCID mice injected with acute myeloid leukemia cells transfected with eGFP/luciferase. Mice were treated with melatonin in drinking water, which induces a decrease in the tumour burden respect control group, measured by bioluminescence assay. Moreover, survival of treated mice was higher than the control group.

We finally developed an *ex vivo* experiment using cells from haematological malignancies of patients to test the effect of melatonin. Melatonin induced a cytotoxic effect in these cells, mediated by Fas/FasL activation similar to the one we found in cell

lines, mainly in patients with acute myeloid leukemia. Moreover when we analyzed the expression of apoptotic genes we found an increase in proapoptotic genes and a decrease in the expression of antiapoptotic genes after melatonin treatment.

In summary, in this work we demonstrated the apoptotic effect of melatonin in haematological tumours. These results suggest that melatonin could be a drug to take into account in the treatment of these tumours, as a main agent or in combination with the current chemotherapeutic drugs.

## **VII. CONCLUSIONS**



Results presented in this work allow us to obtain the following conclusions:

1. Melatonin induces an apoptotic process in cell lines derived from acute myeloid leukemia, chronic myeloid leukemia, acute lymphoid leukemia, and Burkitt lymphoma. This cytotoxic process is triggered by the extrinsic pathway of apoptosis, by a mechanism that mainly implicates Fas receptor activation by its ligand, intracellular peroxides induction and activation of PI3K/Akt pathway.
2. The cytotoxic action of melatonin is also found in haematological malignancies of patient cells, mainly with acute myeloid leukaemia, being this effect variable between patients and also mediated by an increase in FasR and FasL expression.
3. The combination of melatonin and ifosfamide presents a cytotoxic synergistic effect in acute myeloid leukemia cell lines. This effect is mediated by the extrinsic pathway of apoptosis with the implication of the death receptors FasR, DR4, DR5 and its ligands. On the contrary, the combination of melatonin and doxorubicin induces either an antagonist or additive effect depending on the cell line.
4. Antitumoral effect of melatonin is also demonstrated in an *in vivo* experiment in NOD/SCID mice injected with acute myeloid leukemia cells, with a decrease in tumor burden and an increase in animal survival.

## **VIII. BIBLIOGRAFÍA**



- Abbott BL. "Chronic Lymphocytic Leukemia: Recent Advances in Diagnosis and Treatment". *The Oncologist*. 2006; 11:21-30.
- Abelson HT, Rabstein LS. "Lymphosarcoma: virus-induced thymic-independent disease in mice". *Cancer Res*. 1970; 30:2213-2222.
- Abramson S, Miller RG, Phillips RA. "The identification in adult bone marrow of pluripotent and restricted stem cells of the myeloid and lymphoid systems". *J Exp Med*. 1977; 145:1567-1579.
- Acuña-Castroviejo D, Coto-Montes A, Gaia Monti M, Ortiz GG, Reiter RJ. "Melatonin is protective against MPTP-induced striatal and hippocampal lesions". *Life Sci*. 1997; 60:23-29.
- Amrán D, Sánchez Y, Fernández C, et al. "Arsenic trioxide sensitizes promonocytic leukemia cells to TNF $\alpha$ -induced apoptosis via p38-MAPK-regulated activation of both receptor-mediated and mitochondrial pathways". *Biochim Biophys Acta*. 2007; 1773:1653-1663.
- Andreef M, Konopleva M. "Mechanisms of drug resistance in AML". *Cancer Treat Res* 2002; 112:237-262.
- Angeli A, Gatti G, Sartori ML. "Effect of exogenous melatonin on human natural killer (NK) cell activity. An approach to the immunomodulatory role of the pineal gland". *Neuroendocrin Lett*. 1987; 9:286.
- Antolín I, Mayo JC, Sainz RM, del Brío M de L, Herrera F, Martín V, Rodríguez C. "Protective effect of melatonin in a chronic experimental model of Parkinson's disease". *Brain Res*. 2002; 943:163-173.
- Antolín I, Rodríguez C, Saínez RM, Mayo JC, Uría H, Kotler ML, Rodríguez-Colunga MJ, Tolivia D, Menéndez-Peláez A. "Neurohormone melatonin prevents cell damage: effect on gene expression for antioxidant enzymes". *FASEB J*. 1996; 10:882-90.
- Aquino VM. "Acute myelogenous leukemia". *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care*. 2002; 32:50-58.
- Arnt CR, Chiorean MV, Heldebrant MP, Gores GJ, Kaufmann SH. "Synthetic Smac/DIABLO peptides enhance the effects of chemotherapeutic agents by binding XIAP and cIAP1 in situ". *J Biol Chem*. 2002; 277:44236-44243.
- Ashkenazi A, Dixit VM. "Death receptors: signalling and modulations". *Science*. 1998; 281:1305-8.

- Baccarini M, Saglio G, Goldman J, et al. "Evolving concepts in the management of chronic myeloid leukaemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet". *Blood*. 2006; 108:1809-1820.
- Badorff C, Ruetten H, Mueller S, et al. "Fas receptor signalling inhibits glycogen synthase kinase 3 $\beta$  and induces cardiac hypertrophy following pressure overload". *J Clin Invest*. 2002; 109:373-381.
- Baines CP, Kaiser RA, Purcell NH, et al. "Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death". *Nature*. 2005; 434:658-662.
- Banhart BC, Alappat EC, Peter ME. "The CD95 type I/type II model". *Semin Immunol*. 2003; 15:185-193.
- Banker DE, Radich J, Becker E. "The t(8;21) translocation is not consistently associated with high Bcl-2 expression in de novo acute myeloid leukemias of adults". *Clin Cancer Res*. 1998; 4:3051-3062.
- Barry M, Bleackley RC. "Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death". *Nat Rev Immunol*. 2002; 2:401-9.
- Bartram CR, de Klein A, Hagemeijer A, et al. "Translocation of c-abl oncogene correlatos with the presence of a Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukaemia". *Nature*. 1983; 306:277-280.
- Bejarano I, Espino J, Marchena AM, et al. "Melatonin enhances hydrogen peroxide-induced apoptosis in human promyelocytic leukaemia HL-60 cells". *Mol Cell Biochem*. 2011; 353:167-176.
- Bejarano I, Redondo PC, Espino J, et al. "Melatonin induces mitochondrial-mediated apoptosis in human myeloid HL-60 cells". *J Pineal Res*. 2009; 46:392-400.
- Bene MC, Castoldi G, Knapp W, et al. "Proposals for the immunological classification of acute leukemias". *Leukemia*. 1995; 9:1783-1786.
- Benites BD, Fattori A, Hackel C, et al. "Low expression of APAF-1XL in acute myeloid leukemia may be associated with the failure of remission induction therapy". *Braz J Med Biol Res*. 2008; 41:571-578.
- Benítez-King G, Antón-Tay F. "Calmodulin mediates melatonin cytoskeletal effects". *Experientia*. 1993; 49:635-641.
- Benítez-King G, Huerto-Delgadillo L, Antón-Tay F. "Binding of 3H-melatonin to calmodulin." *Life Sci*. 1993; 53:201-207.



- Benítez-King G, Huerto-Delgadillo L, Antón-Tay F. “Melatonin modifies calmodulin cell levels in MDCK and N1E-115 cell lines and inhibits phosphodiesterase activity in vitro”. *Brain Res.* 1991; 557:289-292.
- Benítez-King G, Ríos A, Martínez A, Antón-Tay F. “In vitro inhibition of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent kinase II activity by melatonin”. *Biochim Biophys Acta.* 1996;1290:191-196.
- Benschop R, Wei T, Na S. “Tumor necrosis factor receptor superfamily member 21: TNFR-related death receptor-6, DR6”. *Adv Exp Med Biol.* 2009; 647:186-194.
- Berg D, Lehne M, Muller N, et al. “Enforced covalent trimerization increases the activity of the TNF ligand family members TRAIL and CD95L”. *Cell Death Differ.* 2007; 14:2021-2034.
- Bernards A, Rubin CM, Westbrook Ca, et al. “The first intron in the human c-abl gene is at least 200 kilobases long and is a target for translocations in chronic myelogenous leukaemia”. *Mol Cell Biol.* 1987; 7:3231-3236.
- Bernstein J, Coleman C, Strikler J, et al. “Combined modality therapy for adults with small noncleaved cell lymphoma (Burkitt’s and non-Burkitt’s types)” *J Clin Oncol.* 1986; 4:847-858.
- Beurel E y Jope RS. “The paradoxical pro- and anti-apoptotic actions of GSK3 in the intrinsic and extrinsic apoptosis signaling pathways”. *Prog. Neurobiol.* 2006; 79: 173-189.
- Bianco R, Melisi D, Ciardiello F, Tortora G. “Key cancer cell signal transduction pathways as therapeutic targets” *Eur J Cancer* 2006; 42:290-294.
- Bizzozero OJ Jr, Johnson KG, Ciocco A, et al. “Radiation-related leukaemia in Hiroshima and Nagasaki 1946-1964”. II. *Ann Intern Med.* 1967; 66:522-530.
- Blask DE, Dauchy RT, Sauer LA, et al. “Growth and fatty acid metabolism of human breast cancer (MCF-7) xenografts in nude rats: impact of constant light-induced nocturnal melatonin supresión”. *Breast Cancer Res Treat.* 2003; 79:313-320.
- Blask DE, Dauchy RT, Sauer LA, et al. “Melatonin uptake and growth prevention in rat hepatoma 7288CTC in response to dietary melatonin: melatonin receptor-mediated inhibition of tumor linoleic acid metabolism to the growth signalling molecule 13-hydroxyoctadecadienoic acid and the potential role of phytemelatonin”. *Carcinogenesis.* 2004; 25:951-960.

- Blask DE, Sauer LA, Dauchy RT. "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.* 2002; 2:113-132.
- Blask DE, Sauer LA, Dauchy RT. "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.* 2002; 2:113-132.
- Blask DE, Wilson ST, Zalatan F. "Physiological melatonin inhibition of human breast cancer cell growth in vitro: evidence for a glutathione-mediated pathway". *Cancer Res.* 1997; 57:1909-1914.
- Blum KA, Lozanski G, Byrd JC. "Adult Burkitt leukaemia and lymphoma". *Blood.* 2004; 104:3009-3020.
- Bortner CD, Oldenburg NB, Cidlowski JA. "The role of DNA fragmentation in apoptosis". *Trends Cell Biol.* 1995; 5:21-6.
- Bowman W, Shuster J, Cook B, et al. "Improved survival for children with B-cell acute lymphoblastic leukaemia and stage IV small noncleaved-cell lymphoma: a Pediatric Oncology Group study". *J Clin Oncol.* 1996; 14:1252-1261.
- Bradoudaki M, Tzortzatou-Stathopoulou F, Anagnostopoulos AK, et al. "Proteomic analysis of childhood de novo acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome/AML: correlation to molecular and cytogenetic analyses". *Amino Acids.* 2011; 40:943-951.
- Branford S, Rduzki Z, Walsh S, et al. "Detection of BCR-ABL mutations in patients with CML treated with imatinib is virtually always accompanied by clinical resistance, and mutations in the ATP phosphate-binding loop (P-loop) are associated with a poor prognosis". *Blood.* 2003; 102:276-283.
- Bratton DL, Fadok VA, Richter DA, et al. "Appearance of phosphatidylserine on apoptotic cells requires calcium-mediated non-specific flip-flop and is enhanced by loss of the aminophospholipid translocase". *J Biol Chem.* 1997; 272:26159-65.
- Brueggemann SK, Schlenke P, Klich S, et al. "Stem cell toxicity of oxazaphosphorine metabolites in comparison to their antileukemic activity". *Biochem Pharmacol.* 2002; 63:1337-41.



- Brunner T, Wasem C, Torgler R, et al. "Fas (CD95/Apo-1) ligand regulation in T cell homeostasis, cell mediated cytotoxicity and immune pathology". *Semin Immunol.* 2003; 15:167-76.
- Bruserud O. "TRAIL decoy receptors mediate resistance of acute myeloid leukemia cells to TRAIL". *Haematologica* 2005; 90:579.
- Bunin GR. "Nongenetic causes of childhood cancers: evidence from international variation, time trends, and risk factor studies". *Toxicol Appl Pharmacol.* 2004; 199:91-103.
- Burz C, Berindan-Neagoe I, Balacescu O, et al. "Apoptosis in cancer: Key molecular signaling pathways and therapy targets". *Acta Oncologica.* 2009;48:811-821.
- Büyükavci M, Özdemir O, Buck S, et al. "Melatonin cytotoxicity in human leukemia cells: relation with its pro-oxidant effect". *Fundamental and Clinical Pharmacology.* 2006; 20:73-79.
- Cagnoli CM, Atabay C, Kharlamova E, Manev H. "Melatonin protects neurons from singlet oxygen-induced apoptosis". *J Pineal Res.* 1995;18:222-226.
- Campos I, Roualt JP, Sabido O. "High expression of bcl-2 protein in acute myeloid leukemia cells is associated with poor response to chemotherapy". *Blood* 1993; 81:3091-3096.
- Canestraro M, Galimberti S, Savli H, et al. "Synergistic antiproliferative effect of arsenic trioxide combined with bortezomib in HL60 cell line and primary blasts from patients affected by myeloproliferative disorders". *Cancer Genet Cytogenet.* 2010; 199: 110-120.
- Carlberg C. "Gene regulation by melatonin". *Ann NY Acad Sci.* 2000; 917:387-396.
- Carmody RJ and Cotter TG. "Signalling apoptosis: a radical approach". *Redox Rep.* 2001; 6:77-90.
- Carrillo-Vico A, Calvo JR, Abreu P, et al. "Evidence of melatonin synthesis by human lymphocytes and its physiological significance, posible role as intracrien, autocrine and paracrine substance". *FASEB J.* 2004; 18:537-539.
- Casado-Zapico S, Rodríguez-Blanco J, García-Santos G, Martín V, Sánchez-Sánchez AM, Antolín I and Rodríguez C. "Synergistic antitumor effect of melatonin with several chemotherapeutic drugs on human Ewing Sarcoma

- cancer cells: potentiation of the extrinsic apoptotic pathway". *J Pineal Res.* 2010; 48:72-80.
- Chan AS, Lai FP, Lo RK, Voyno-yasenetskaya TA, Stanbridge EJ, Y Wong YH. "Melatonin mt1 y mt2 receptors stimulate c-jun n-terminal kinase via pertussis toxin-sensitive and -insensitive G proteins". *Cell Signal.* 2002; 14:249-257.
  - Chandra J, Samali A, Orrenius S. "Triggering and modulation apoptosis by oxidative stress". *Free Radic Biol Med.* 2000; 29(3-4):323-33.
  - Chandra J, Samali A, Orrenius S. "Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress". *Free Radic. Biol. Med.* 2000; 29:323-333.
  - Chang HY, Nishitoh H, Yang X, et al. "Activation of apoptosis signal-regulating kinase I (ASK1) by the adapter protein Daxx". *Science.* 1998; 281:1860-1863.
  - Chang L, Kamata H, Solinas G, et al. "The E3 ubiquitin ligase itch couples JNK activation to TNFalpha-induced cell death by inducing c-FLIP(L) turnover". *Cell.* 2006; 124:601-613.
  - Chen G, Wang Y, Huang H, et al. "Combination of DNA methylation inhibitor 5-azacytidine and arsenic trioxide has synergistic activity in myeloma". *Eur J Haematol.* 2009; 82:176-183.
  - Chen Q, Gong B, Mahmoud-Ahmed AS et al. "Apo2L/TRAIL and Bcl-2-related proteins regulate type I interferon-induced apoptosis in multiple myeloma". *Blood.* 2001; 98:2183-2192.
  - Chen Q, Lesnefsky Ej. "Depletion of cardiolipin and cytochrome c during ischemia increases hydrogen peroxide production from the electron transport chain". *Free Radic Biol Med.* 2006; 40:976-98
  - Cheson BD, Bennett JM, Kopecky KJ et al. "Revised recommendations of the International Working Group for Diagnosis, Standardization of Response Criteria, Treatment Outcomes, and Reporting Standards for Therapeutic Trials in Acute Myeloid Leukemia". *J Clin Oncol.* 2003; 21:4642-4649.
  - Chessells JM, Harrison G, Richards SM, et al. "Down's syndrome and acute lymphoblastic leukaemia: clinical features and response to treatment". *Arch Dis Child.* 2001; 85:321-325.
  - Chicheportiche Y, Bourdon PR, Xu H, et al. "TWEAK, a new secreted ligand in the tumor necrosis factor family that weakly induces apoptosis". *J Biol Chem.* 1997; 272:32401-10.



- Chinnaiyan AM. "The apoptosome: heart and soul of the cell death machine". *Neoplasia*. 1999 ;1:5-15.
- Chou TC, Talalay P. "Generalized equations for the analysis of inhibitions of Michaelis-Menten and higher-order kinetic systems with two or more mutually exclusive and nonexclusive inhibitors". *Eur J Biochem*. 1981; 115:207-216.
- Chou TC, Talalay P. "Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combine effects of multiple drugs or enzyme inhibitors". *Adv Enzyme Regul*. 1984; 22:27-55.
- Cini G, Coronello M, Mini E, et al. "Melatonin's growth-inhibitory effect on hepatoma AH 130 in the rat". *Cancer Letters*. 1998; 125:51-59.
- Cini G, Neri B, Pacini A, et al. "Antiproliferative activity of melatonin by transcriptional inhibition of cyclin D1 expression: a molecular basis for melatonin-induced oncostatic effects". *J Pineal Res*. 2005; 39:12-20.
- Clodi K, Wimmer D, Li Y, et al. "Expresión of tumour necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) receptors and sensitivity to TRAIL-induced apoptosis in primary B-cell acute lymphoblastic leukaemia cells". *Br J Haematol*. 2000; 111:580-586.
- Cohen JJ. "Programmed cell death in the immune system". *Adv Immunol*. 1991; 50:55-85.
- Collins A, Yuan L, Kiefer TL, et al. "Overexpression of the MT1 melatonin receptor in MCF-7 human breast cancer cells inhibits mammary tumor formation in nude mice". *Cancer Lett*. 2003; 189:49-57.
- Colombo LL, Chen GJ, Lopez MC, Watson RR. "Melatonin induced increase in gamma-interferon production by murine splenocytes". *Immunol Lett*. 1992; 33:123-126.
- Cortes J. "Central nervous system involvement in adult acute lymphocytic leukaemia". *Hematol Oncol Clin North Am*. 2001; 15:145-162.
- Cory AH, Owen TC, Barltrop JA, et al. "Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture". *Cancer Commun*. 1991; 3(7):207-12.
- Cory S, Adams JM. "The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch". *Nat Rev Cancer*. 2002; 2:647-56.

- Cos S, Blask DE, Lemus-Wilson A, et al. "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.
- Cos S, Garcia-Bolado A, Sánchez-Barceló EJ. "Direct antiproliferative effects of melatonin on two metastatic cell sublines of mouse melanoma (B16BL6 and PG19)". *Melanoma Res.* 2001; 11:197-201.
- Cos S, García-Bolado A, Sánchez-Barceló EJ. "Direct antiproliferative effects of melatonin on two metastatic cell sublines of mouse melanoma (B16BL6 and PG19). *Melanoma Res.* 2001; 11:197-201.
- Cos S, Martínez-Campa C, Mediavilla MD, et al. "Melatonin modulates aromatase activity in MCF-7 human breast cancer cells". *J Pineal Res.* 2005; 38:136-142.
- Cos S, Recio J, Sánchez-Barceló EJ. "Modulation of the length of the cell cycle time of MCF-7 human breast cancer cells by melatonin". *Life Sci.* 1996; 58:811-816.
- Cos S, Sánchez-Barceló EJ. "Melatonin inhibition of MCF-7 human breast-cancer cells growth: influence of cell proliferation rate". *Cancer Lett.* 1995; 93:207-212.
- Cos S, Verduga R, Fernández-Viadero C, et al. "Effects of melatonin on the proliferation and differentiation of human neuroblastoma cells in culture". *Neurosci Lett.* 1996; 216:113-116.
- Cos S, Verduga R, Fernández-Viadero C, Megías M, Crespo D. Effects of melatonin on the proliferation and differentiation of human neuroblastoma cells in culture. *Neurosci Lett.* 1996; 216:113-116.
- Cotta CV, Bueso-Ramos CE. "New insights into the pathobiology and treatment of chronic myelogenous leukaemia". *Ann of Diagn Pathol.* 2007; 11:68-78.
- Craig CM, Schiller GJ. "Acute myeloid leukemia in the elderly: Conventional and novel treatment approaches". *Blood reviews.* 2008; 22:221-234.
- Cristofanon S, Uguccioni F, Cerella C, et al. "Intracellular prooxidant activity of melatonin induces a survival pathway involving NF- $\kappa$ B activation". *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2009; 1171:472-478.
- Curtin JF, Donovan M and Cotter TG. "Regulations and measurement of oxidative stress in apoptosis". *J. Immunol Methods.* 2002; 265:49-72.



- Dai J, Inscho EW, Yuan L, et al. "Modulation of intracellular calcium and calmodulin by melatonin in MCF-7 human breast cancer cells". *J Pineal Res.* 2002; 32:112-119.
- Dai J, Inscho EW, Yuan L, Hill SM. "Modulation of intracellular calcium and calmodulin by melatonin in MCF-7 human breast cancer cells". *J Pineal Res.* 2002; 32:112-119.
- Daley GQ, van Etten RA, Baltimore D. "Induction of chronic myelogenous leukaemia in mice by the P210bcr/abl gene of the Philadelphia chromosome". *Science.* 1990; 247:824-830.
- Dauchy RT, Blask DE, Dauchy EM, et al. "Antineoplastic effects of melatonin on rare malignancy of mesenchymal origin: melatonin receptor-mediated inhibition of signal transduction, linoleic acid metabolism and growth in tissue-isolated human leiomyosarcoma xenografts". *J Pineal Res.* 2009; 47:32-42.
- Day TW, Najafi F, Wu CH, et al. "Cellular FLICE-like inhibitory protein (c-FLIP): A novel target for Taxol-induced apoptosis". *Biochem Pharmacol.* 2006; 71: 1551-1561.
- Debatin KM, Stahnke K, Fulda S. "Apoptosis in haematological disorders". *Semin Cancer Biol.* 2003; 13:149-158.
- Debnath J, Baehrecke EH, Kroemer G. "Does autophagy contribute to cell death? " *Autophagy.* 2005; 1:66-74.
- Deininger MW, Goldman JM, Melo JV. "The molecular biology of chronic myeloid leukaemia". *Blood.* 2000; 96:3343-3356.
- Del Gobbo V, Libri V, Villani N, Calìò R, Nisticò G. "Pinealectomy inhibits interleukin-2 production and natural killer activity in mice". *Int J Immunopharmacol.* 1989; 11:567-573.
- Del Río B, García Pedrero JM, Martínez-Campa C, Zuazua P, Lazo PS, Ramos S. "Melatonin, an endogenous-specific inhibitor of estrogen receptor alpha via calmodulin". *J Biol Chem.* 2004; 279:38294-38302.
- Delhalle S, Deregowski V, Benoit V, et al. "NF-kappaB-dependent MnSOD expression protects adenocarcinoma cells from TNF-alpha-induced apoptosis". *Oncogene.* 2002; 21:3917-3924.
- Denecker G, Vercaemmen D, Declercq W et al. "Apoptotic and necrotic cell death induced by death domain receptors". *Cell Mol Life Sci.* 2001; 58:356-70.

- Deng Y, Ren X, Yang L, et al. "A JNK-dependent pathway is required for TNFalpha-induced apoptosis". *Cell*. 2003; 115:61-70.
- Denizot F, Lang R. "Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability". *J Immunol Methods*. 1986; 22;89(2):271-7.
- Denning TL, Takaishi H, Crowe SE, et al. "Oxidative stress induces the expression of Fas and Fas ligand and apoptosis in murine intestinal epithelial cells". *Free Radic Biol Med*. 2002; 33:1641-1650.
- Derenne S, Monia B, Dean NM, et al. "Antisense strategy shows that Mcl-1 rather than Bcl-2 or Bcl-x(L) is an essential survival protein of human myeloma cells". *Blood*. 2002; 100:194-199.
- Deschler B, Lübbert M. "Acute Myeloid Leukemia: Epidemiology and Etiology". *Cancer*. 2006; 107: 9: 2099-2107.
- Devadas S, Hinshaw JA, Zaritskaya L, et al. "Fas-stimulated generation of reactive oxygen species or exogenous oxidative stress sensitize cells to Fas-mediated apoptosis". *Free Radic Biol Med*. 2003; 35:648-661.
- Dicker F, Kater AP, Fukuda T, et al. "Fas-ligand (CD178) and TRAIL synergistically induce apoptosis of CD40-activated chronic lymphocytic leukaemia B cells". *Blood*. 2005; 105:3193-3198.
- Doney KC, Chauncey T, Appelbaum FR. "Allogeneic related donor hematopoietic stem cell transplantation for treatment of chronic lymphocytic leukemia". *Bone Marrow Transplant*. 2002; 29:817-823.
- Droge W. "Free radicals in the physiological control of cell function". *Physiol Rev*. 2002; 82:47-95.
- Dröge W. "Free radicals in the physiological control of cell function". *Physiol Rev*. 2002; 82:47-95.
- Druker BJ, Guilhot F, O'Brien SG, et al. "Five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia". *N Engl J Med*. 2006; 355: 2408-2417.
- Druker BJ, Sawyers CL, Kantarjian H, et al. "Activity of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in the blast crisis of chronic myeloid leukaemia and acute lymphoblastic leukaemia with the Philadelphia chromosome". *N Engl J Med*. 2001; 344:1038-1042.



- Du C, Fang M, Li Y, et al. "Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition". *Cell*. 2000; 102:33-42.
- Duan X, Jia SF, Koshkina N, et al. "Intranasal interleukin-12 gene therapy enhanced the activity of isofamide against osteosarcoma lung metastases". *Cancer*. 2006. 106: 1382-1388.
- Duan X, Zhou Z, Jia SF et al. "Interleukin-12 enhances the sensitivity of human osteosarcoma cells to 4-hydroperoxycyclophosphamide by a mechanism involving the Fas/Fas-ligand pathway". *Clin Cancer Res*. 2004; 10:777-783.
- Dutton A, O'Neil JD, Milner AE, et al. "Expression of the cellular FLICE-inhibitory protein (c-FLIP) protects Hodgkin's lymphoma cells from autonomous Fas-mediated death". *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004; 101:6611-6616.
- Eck KM, Yuan L, Duffy L, et al. "A sequential treatment regimen with melatonin and all-trans retinoic acid induces apoptosis in MCF-7 tumour cells". *Br J Cancer*. 1998; 77: 2129-37.
- Eck-Enriquez K, Kiefer TL, Spriggs LL, et al. "Pathways through which a regimen of melatonin and retinoic acid induces apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells". *Breast Cancer Res Treat*. 2000; 61: 229-39.
- Eldering E, Spek CA, Aberson HL, et al. "Expression profiling via novel multiplex assay allows rapid assessment of gene regulation in defined signaling pathways". *Nucleic Acids Res*. 2003; 31:1-9.
- Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, et al. "A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD". *Nature*. 1998; 391:43-50.
- Esposito I, Kleeff J, Abiatari I, et al. "Overexpression of cellular inhibitor of apoptosis protein 2 is an early event in the progression of pancreatic cancer". *J Clin Pathol*. 2007; 60:885-895.
- Esposti MD. "The roles of Bid". *Apoptosis*. 2002; 7:433-40.
- Faderl S, Jeha S, Kantarjian HM. "The Biology and Therapy of Adult Acute Lymphoblastic Leukemia". *Cancer*. 2003; 98: 1337-1354.
- Faderl S, Kantarjian HM, Talpaz M, et al. "Clinical significance of cytogenetic abnormalities in adult acute lymphoblastic leukaemia". *Blood*. 1998; 91:3995-4019.

- Fadok VA, de Cathelineau A, Daleke DL, et al. "Loss of phospholipids asymmetry and surface exposure of phosphatidylserine is required for phagocytosis of apoptotic cells by macrophages and fibroblasts". *J Biol Chem* 2001; 276:1071-7.
- Fan L-L, Sun GP, Wei W, et al. "Melatonin and doxorubicin synergistically induces cell apoptosis in human hepatoma cell line". *World Journal of Gastroenterology*. 2010; 28:1473-1481.
- Fan Z, Beresford PJ, Oh DY, et al. "Tumor suppressor NM23-H1 is a granzyme A-activated DNase during CTL-mediated apoptosis, and the nucleosome assembly protein SET is its inhibitor". *Cell*. 2003; 112:659-72.
- Farriol M, Venereo Y, Orta X, Castellanos JM, Segovia-Silvestre T. "In vitro effects of melatonin on cell proliferation in a colon adenocarcinoma line". *J Appl Toxicol*. 2000; 20:21-24.
- Fausel C. "Targeted Chronic Myeloid Leucemia Therapy: Seeking a Cure". *JMCP*. 2007; 13:S8-S12.
- Ferry JA. "Burkitt's lymphoma: Clinicopathologic features and differential diagnosis". *The Oncologist*. 2006; 11:375-383.
- Fink SL, Cookson BT. "Apoptosis, Pyroptosis, and Necrosis: mechanistic description of Dead and dying eukaryotic cells". *Infect Immun*. 2005; 73:1907-1916.
- Foa R, Vitale A. "Towards an integrated classification of adult acute lymphoblastic leukaemia". *Rev Clin Exp Hematol*. 2002; 6:181-199.
- Frame S y Cohen P. "GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery". *Biochem J*. 2001; 359: 1-16.
- Fulda S, Scaffidi C, Pietsch T, et al. "Activation of the CD95 (APO-1/Fas) pathway in drug- and  $\gamma$ -irradiation-induced apoptosis of brain tumor cells". *Cell Death Differ*. 1998; 5: 884-893.
- Fulda S, Wick W, Eller M, et al. "Smac agonists sensitize for Apo2L/TRAIL- or anticancer drug-induced apoptosis and induce regression of malignant glioma in vivo". *Nat Med*. 2002; 8:808-815.
- Fulda S. "Cell death in haematological tumors". *Apoptosis*. 2009; 14:409-423.
- Futagami M, Sato S, Sakamoto T, et al. "Effects of melatonin on the proliferation and cis-diamminedichloroplatinum (CDDP) sensitivity of cultured human ovarian cancer cells". *Gynecol Oncol*. 2001; 82:544-9.



- Futagami M, Sato S, Sakamoto T, et al. "Effects of melatonin on the proliferation and cis-diamminedichloroplatinum (CDDP) sensitivity of cultured human ovarian cancer cells". *Gynecol Oncol.* 2001; 82:544-549.
- Futagami M, Sato S, Sakamoto T, Yokoyama Y, Saito Y. "Effects of melatonin on the proliferation and cis-diamminedichloroplatinum (CDDP) sensitivity of cultured human ovarian cancer cells". *Gynecol Oncol.* 2001; 82:544-549.
- Galton DAG. "The use of myleran in chronic myeloid leukaemia". *Lancet.* 1953; 1:208-213.
- García-Maurino S, Gonzales-Haba MG, Calvo JR. "Melatonin enhances IL-2, IL-6 and IFN- $\gamma$  production by human circulating CD4<sup>+</sup> cells". *J Immunol.* 1997; 159: 574-581.
- García-Navarro A, González-Puga C, Escames G, et al. "Cellular mechanisms involved in the melatonin inhibition of HT-29 human colon cancer cell proliferation in cultura". *J Pineal Res.* 2007; 43:195-205.
- García-Santos G, Antolín I, Herrera F, Martín V, Rodríguez-Blanco J, del Pilar Carrera M, Rodríguez C. "Melatonin induces apoptosis in human neuroblastoma cancer cells". *J Pineal Res.* 2006; 41:130-135.
- Garrido C, Galluzzi L, Brunet M, et al. "Mecanismos of cytochrome c release from mitochondria". *Cell Death Differ* 2006; 13:1423-33.
- Gazitt Y. "TRAIL is a potent inducer of apoptosis in myeloma cells derived from multiple myeloma patients and is not cytotoxic to hematopoietic stem cells". *Leukemia.* 1999; 13:1817-1824.
- Ghia P, Ferreri AJM, Caligaris-Cappio F. "Chronic lymphocytic leukemia". *Critical Reviews in Oncology/Hematology.* 2007; 64:234-246.
- Giron-Calle J, Zwizinski CW, Schmid HH. "Peroxidative damage to cardiac mitochondria. II. Immunological analysis of modified adenine nucleotide translocase". *Arch Biochem Biophys.* 1994; 315:1-7.
- Godlman JM, Melo JV. "Chronic myeloid leukaemia-advances in biology and new approaches to treatment". *N Engl J Med.* 2003; 349:1451-1464.
- Goldman JM, Melo JV. "Targeting the BCR-ABL tyrosine kinase in chorin myeloid leukemia". *N Engl J Med.* 2001; 344:1084-1086.
- Gómez M, Esparza JL, Nogués MR, et al. "Pro-oxidant activity of aluminum in the rat hippocampus: gene expresión of antioxidant enzymes after melatonin administration". *Free Radic Biol Med.* 2005; 38:104-111.

- Gómez-Bougie P, Wuillème-Toumi S, Ménoret E et al. "Noxa up-regulation and mcl-1 cleavage are associated to apoptosis induction by bortezomib in multiple myeloma". *Cancer Res* 2007; 67:5418-5424.
- González A, Martínez-Campa C, Mediavilla MD, et al. "Effects of MT1 melatonin receptor overexpression on the aromatase-suppressive effect of melatonin in MCF-7 human breast cancer cells". *Oncol Rep.* 2007; 17:947-953.
- Gozuacik D, Kimchi A. "Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism". *Oncogene.* 2004; 23:2891-906.
- Granzotto M, Rapozzi V, Decorti G, et al. "Effects of melatonin on doxorubicin cytotoxicity in sensitive and pleiotropically resistant tumor cells". *J Pineal Res.* 2001; 31:206-213.
- Granzotto M, Rapozzi V, Decorti G, et al. "Effects of melatonin on doxorubicin cytotoxicity in sensitive and pleiotropically resistant tumor cells". *J Pineal Res.* 2001; 31:206-213.
- Greaves M. "In utero origins of childhood leukaemia". *Early Hum Dev.* 2005; 81:123-129.
- Greaves MF, Alexander FE. "An infectious etiology for common acute lymphoblastic leukaemia in childhood". *Leukemia.* 1993; 7:349-360.
- Grimwade D, Walker H, Harrison G, et al. "The predictive value of hierarchical cytogenetic classification in older adults with acute myeloid leukemia (AML): analysis of 1065 patients entered into the United Kingdom Medical Research Council AML11 trial". *Blood.* 2001; 98:1312-1320.
- Groffen J, Sepsenson JR, Heisterkamp N, et al. "Philadelphia chromosomal breakpoints are clustered within a limited region, bcr, on chromosome 22". *Cell.* 1984; 36:93-99.
- Guerrero JM, Reiter RJ. "A brief survey of pineal gland-immune system interrelationships". *Endocr Res.* 1992; 18:91-113.
- Guerrero JM, Reiter RJ. "Melatonin-immune system relationships". *Curr Top Med Chem.* 2002; 2:167-179.
- Guo F, Nimmanapalli R, Paranawithana S et al. "Ectopic overexpression of second mitochondria-derived activator of caspases (Smac/DIABLO) or cotreatment with N-terminus of Smac/DIABLO peptide potentiates epothilone B derivative-(BMS 257550) and Apo-2L/TRAIL-induced apoptosis". *Blood* 2002; 99:3419-3426.



- Hagenbuchner J, Ausserlechner MJ, Porto V, et al. "The anti-apoptotic protein BCL2L1/Bcl-Xl is neutralized by pro-apoptotic PMAIP1/Noxa in Neuroblastoma, thereby determining bortezomib sensitivity independent of prosurvival MCL1 expression". *J Biol Chem.* 2010; 285:6904-6912.
- Halliwell B and Cross CE. "Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress". *Environ. Health Perspect.* 1994; 102:5-12. 1994.
- Hara M, Yoshida M, Nishijima H, et al. "Melatonin, a pineal secretory product with antioxidant properties, protects against cisplatin-induced nephrotoxicity in rats". *J Pineal Res.* 2001; 30: 129-138.
- Hardeland R. "Melatonin and 5-methoxytryptamine in non-metazoans". *Reprod Nutr Dev.* 1999;39:399-408.
- Hayden MS and Ghosh S. "Signaling to NF- kappaB". *Genes Dev.* 2004; 18: 2195-2224.
- Heaney NB, Pellicano F, Zhang B, et al. "Bortezomib induces apoptosis in primitive chronic myeloid leukaemia cells including LTC-IC and NOD/SCID repopulating cells". *Blood.* 2010; 115:2241-2250.
- Hecht J, Aster J. "Molecular biology of Burkitt's lymphoma". *J Clin Oncol.* 2000; 18:3703-3721.
- Hehlmann R, Hochhaus A, Baccarani M. Chronic myeloid leukaemia. *Lancet* 370:342-350, 2007.
- Heim S, Mitelman F. "Cytogenetic analysis in the diagnosis of acute leukemia". *Cancer.* 1992; 70:1701-1709.
- Heisterkamp N, Groffen J, Stephenson JR, et al. "Chromosomal localization of human cellular homologues of two viral oncogenes". *Nature.* 1982; 299:747-749.
- Heisterkamp N, Jenster G, ten Hoeve J, et al. "Acute leukaemia in bcr/abl transgenic mice". *Nature.* 1990; 344:251-253.
- Hermeking H. "The 14-3-3 cancer connection". *Nature Reviews.* 2003; 3: 931-943.
- Herrera F, Martín V, García-Santos G, et al. "Melatonin prevents glutamate-induced oxytosis in the HT22 mouse hippocampal cell line through an antioxidant effect specifically targeting mitochondria". *J Neurochem.* 2007; 100:736-746.

- Hill MM, Adrain C, Duriez PJ, et al. "Analysis of the composition, assembly kinetics and activity of native Apaf-1 apoptosomes". *Embo J.* 2004; 23:2134-45.
- Hill SM, Blask DE. "Effects of the pineal hormone melatonin on the proliferation and morphological characteristics of human breast cancer cells (MCF-7) in culture". *Cancer Res.* 1988; 48:6121-6126.
- Hiroshige N, Mitsuo N. "The alteration of Fas receptor and ligand system in hepatocellular carcinoma – How do hepatoma cells scape from the host immune surveillance in vivo?". *AINO J.* 2004; 3:61-66.
- Hockenbery D, Nunez G, Milliman C, et al. "Bcl-2 is an inner mitochondrial-membrane protein that blocks programmed cell-death". *Nature.* 1990; 348: 334-336.
- Hsu H, Xiong J, Goeddel DV. "The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation". *Cell.* 1995; 81:495-504.
- Hsu SY, Lin P, Hsueh AJ. "BOD (Bcl-2-related ovarian death gene) is an ovarian BH3 domain-containing proapoptotic Bcl-2 protein capable of dimerization with diverse antiapoptotic Bcl-2 members". *Mol Endocrinol.* 1998; 12: 1432-1440
- Huang WP, Klionsky DJ. "Autophagy in yeast: a review of the molecular machinery". *Cell Struct Funct.* 2002; 27:409-420.
- Huang X, Chen S, Shen Q, et al. "Analysis of the expression pattern of the BCL11B gene and its relatives in patients with T-cell acute lymphoblastic leukemia". *J Hematol Oncol.* 2010; 44: 1-7.
- Iijima N, Miyamura K, Ito T, et al. "Functional expression of Fas (CD95) in acute myeloid leukemia cells in the context of CD34 and CD38 expression: possible correlation with sensitivity to chemotherapy". *Blood.* 1997; 90:4901-
- Inamdar KV, Bueso-Ramos CE. "Pathology of chronic lymphocytic leukemia: an update". *Annals of Diagnostic Pathology.* 2007; 11:363-389.
- Ivanov VN, Krasilnikov M., Ronai Z. "Regulation of Fas expression by STAT3 and c-jun is mediated by phosphatidyl-inositol 3-kinasa-AKT signalling". *J Biol Chem.* 2002; 277:4932-4944.
- Jabbour E, Cortes J, Kantarjian H. "Novel tyrosine kinase inhibitors in chronic myelogenous leucemia". *Curr Opin Oncol.* 2006; 18:578-583.
- Jabbour EJ, Estey E, Kantarjian HM. "Adult Acute myeloid leukemia". *Mayo Clin Proc.* 2006; 81:247-260.



- Jabbour EJ, Faderl S, Kantarjian HM. "Adult Acute lymphoblastic leukaemia". *Mayo Clin Proc.* Nov 2005; 80:1517-1527.
- Jemal A, Tiwari RC, Murray T, et al. "Cancer statistics, 2004". *CA Cancer J Clin.* 2004; 54:8-29.
- Jones PL, Ping D, Boss JM. "Tumor necrosis factor alpha and interleukin-1beta regulate the murine manganese superoxide dismutase gene through a complex intronic enhancer involving C/EBP-beta and NF-kappaB". *Mol. Cell. Biol.* 1997; 17:6970-6981.
- Joza N, Susin SA, Daugas E, et al. "Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death". *Nature.* 2001; 410:549-54.
- Jung EM, Lim JH, Lee TJ, et al. "Curcumin sensitizes tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis through reactive oxygen species-mediated up-regulation of death receptor 5 (DR5)". *Carcinogenesis* 2005; 26:1905-1913.
- Jung-Hynes B, Schmit TL, Reagan-Shaw SR, et al. "Melatonin, a novel Sirt1 inhibitor, imparts antiproliferative effects against prostate cancer in vitro in culture and in vivo in TRAMP model". *J Pineal Res.* 2011; 50:140-149.
- Kalil N, Cheson BD. "Chronic Lymphocytic Leukemia". *The Oncologist.* 1999;4:352-369.
- Kanishi Y, Kobayashi Y, Noda S, et al. "Differential growth inhibitory effect of melatonin on two endometrial cancer cell lines". *J Pineal Res.* 2000; 28:227-233.
- Kantarjian H, Sawyers C, Hochhaus A, et al. "Hematologic and cytogenetic response to imatinib mesylate in chronic myelogenous leukemia". *N Engl J Med.* 2002; 346:645-652.
- Kantarjian HM, Smith TL, McCredie KB, et al. "Chronic myelogenous leukaemia: a multivariate analysis of the associations of patient characteristics and therapy with survival". *Blood.* 1985; 66:1326-1335.
- Kantarjian HM, Smith TL, O'Brien S, et al. "The Leukemia Service. Prolonged survival in chronic myelogenous leukaemia after cytogenetic response to interferon-alpha therapy". *Ann Intern Med.* 1995; 122:254-261.
- Kaplan HS. "Historical aspects". En Kaplan HS. *Hodgkin's disease.* Second Edition. Cambridge, MA: Harvard University Press, 1980: 1-15.

- Karbownik M. "Potential anticarcinogenic action of melatonin and other antioxidants mediated by antioxidative mechanisms". *Neuro Endocrinol Lett.* 2002; 23:39-44.
- Karin M. "The beginning of the end: IkappaB kinase (IKK) and NF-kappaB activation". *J Biol Chem.* 1999. 274; 27339-27342.
- Kataoka T, Holler N, Micheau O, et al. "Bcl-rambo, a novel Bcl-2 homologue that induces apoptosis via its unique C-terminal extension". *J. Biol. Chem.* 2001; 276: 19548–19554.
- Kataoka T, Schroter M, Hahne M, et al. "FLIP prevents apoptosis induced by death receptors but not by perforin/granzyme B, chemotherapeutic drugs, and gamma irradiation". *J Immunol.* 1998; 161:3936-42.
- Kerr JF, Willy AH, Currie AR. "Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics". *Br. J. Cancer.* 1972; 26:239-257.
- Kischkel FC, Lawrence DA, Chuntharapai A, et al. "Apo2l/TRAIL-dependent recruitment of endogenous FADD and caspase-8 to death receptors 4 and 5". *Immunity.* 2000; 12:611-620.
- Klima M, Zájedova J, Doubravská L, et al. "Functional analysis of the posttranslational modifications of the death receptor 6". *Biochimica et Biophysica Acta.* 2009; 1793:1579-1587.
- Klionsky DJ, Emr SD. "Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation". *Science.* 2000; 290:1717-21.
- Kondo S, Shinomura Y, Miyazaki Y, et al. "Mutation of the bax gene in human gastric and colorectal cancers". *Cancer Res.* 2000; 60:4328-4330.
- Kostrzewa-Nowak D, Paine MJ, Wolf CR et al. "The role of bioreductive activation of doxorubicin in cytotoxic activity against leukaemia HL-60-sensitive cell line and its multidrug-resistant sublines". *Br J Cancer.* 2005; 93: 89-97.
- Kothakota S, Azuma T, Reinhard C, et al. "Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis". *Science.* 1997; 278:294-8.
- Kotler M, Rodríguez C, Saínz RM, et al. "Melatonin increases gene expression for antioxidant enzymes in rat brain cortex". *J Pineal Res.* 1998; 24:83-89.
- Krause DS, van Etten RA. "Tyrosine kinases as targets for cancer therapy". *N Engl J Med.* 353:172-187, 2005.



- Krige D, Needham LA, Bawden LJ, et al. "CHR-2797: An Antiproliferative aminopeptidase inhibitor that leads to amino acid deprivation in human leukemic cells". *Cancer Res* 2008; 68:6669-6679.
- Kurosaka K, Takahashi M, Watanabe N, et al. "Silent cleanup of very early apoptotic cells by macrophages". *J Immunol.* 2003; 171:4672-4679.
- Kurzrock R, Gutterman JU, Talpaz M. "The molecular genetics of Philadelphia chromosome-positive leukemias". *N Engl J Med.* 1988; 319:990-998.
- Kurzrock R, Kantarjian HM, Shtalrid M, et al. "Philadelphia chromosome-negative chronic myelogenous leukaemia without breakpoint cluster region rearrangement: a chronic myeloid leukaemia with a distinct clinical course". *Blood.* 1990; 75:445-452.
- Kwon SH, Ahn SH, Kim YK, et al. "Apicidin, a Histone Deacetylase inhibitor, induces apoptosis and Fas/Fas ligand expression in human acute promyelocytic leukaemia cells". *J Biol Chem.* 2002; 277:2073-2080.
- Kyle RA. "Multiple myeloma: How did it begin?" *Mayo Clin Proc.* 1994; 69: 680-683.
- Lai L, Yuan L, Chen Q, et al. "The Galphai and Galphaq proteins mediate the effects of melatonin on steroid/thyroid hormone receptor transcriptional activity and breast cancer cell proliferation". *J Pineal Res.* 2008; 45:476-488.
- Laneuville P. "Abl tyrosine protein kinase". *Semin Immunol.* 1995;7: 255-266.
- Larrick JW, Wright SC. "Cytotoxic mechanism of tumor necrosis factor-alpha". *FASEB J,* 1990; 4: 3215-3223.
- Le Bras M, Clement MV, Pervaiz S et al. "Reactive oxygen species and the mitochondrial signalling pathway of cell death". *Histol. Histopathol.* 2005; 20:205-219.
- Lee MW, Park SC, Kim JH, et al. "The involvement of oxidative stress in tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis in HeLa cells". *Cancer Lett.* 2002; 182:75-82.
- Lee MW, Park SC, Yang YG, et al. "The involvement of ROS (ROS) and p38 mitogen-activated protein (MAP) kinase in TRAIL/Apo2L-induced apoptosis". *FEBS Lett.* 2002; 512:313-318.
- Leist M, Single B, Castoldi AF, et al. "Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis". *J Exp Med.* 1997; 185:1481-6.

- Leja-Szpak A, Jaworek J, Pierzchalski P, et al. "Melatonin induces pro-apoptotic signaling pathway in human pancreatic carcinoma cells (PANC-1)". *J Pineal Res.* 2010; 49:248-255.
- León-Blanco MM, Guerrero JM, Reiter RJ, et al. "Melatonin inhibits telomerase activity in the MCF-7 tumor cell line both in vivo and in vitro". *J Pineal Res.* 2003; 35:204-211.
- Lerner AB, Case JD, Takahashi Y. "Isolation of melatonin and 5-methoxyindole-3-acetic acid from bovine pineal glands". *J Biol Chem.* 1960; 235: 1992-1997.
- Letai A. "Pharmacological manipulation of Bcl-2 family members to control cell death". *J Clin Invest.* 2005; 115: 2648-2655.
- Levy DS, Kahana JA, Kumar R. "Akt inhibitor GSK690693 induces growth inhibition and apoptosis in acute lymphoblastic leukaemia cell lines". *Blood.* 2009; 113:1723-1729.
- Li H, Zhu H, Xu CJ, et al. "Cleavage of BID by caspase-8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis". *Cell.* 1998; 94:491-501.
- Li LY, Luo X, Wang X. "Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria". *Nature.* 2001; 412:95-99.
- Li Q, Tsuruda K, Sugahara K, Dateki N et al. "Qualitative and quantitative characterization of Fas (CD95) expresión and its role in primary human acute leucemia cells". *Leuk Res.* 2000; 24: 437-444.
- Li X, Pan X, Zhan H, et al. "Overexpression of cFLIP in head and neck squamous cell carcinoma and its clinicopathologic correlations". *J Cancer Res Clin Oncol.* 2008; 134:609-615.
- Lightfoot TJ, Roman E. "Causes of childhood leukaemia and lymphoma". *Toxicol Appl Pharmacol.* 2004; 199:104-117.
- Lin F, Ng TB, Fung MC. "Pineal indoles stimulate the gene expression of immunomodulating cytokines". *J Neural Transm.* 2001; 108:397-405.
- Lin Y, Devin A, Rodriguez Y, et al. "Cleavage of the death domain kinase RIP by caspase-8 prompts TNF-induced apoptosis". *Genes Dev.* 1999; 13:2514-2526.
- Lissoni P. "Is there a role for melatonin in supportive care?". *Support Care Cancer.* 2002;10:110-116.



- Liu J, Na S, Glasebrook A, et al. Enhanced CD4+ T cell proliferation and Th2 cytokine production in DR6-deficient mice. *Immunity*. 2001; 15:23-34.
- Liu H, Lo CR, Czaja MJ. "NF-kappaB inhibition sensitizes hepatocytes to TNF-induced apoptosis through a sustained activation of JNK and c-Jun". *Hepatology* 2002; 35:772-778.
- Liu Q, El-Deiry WS, Gazitt Y. "Additive effect of Apo2L/TRAIL and Adenovp53 in the induction of apoptosis in myeloma cell lines". *Exp Hematol*. 2001; 29:962-970.
- Liu WH, Chang LS. "Arachidonic acid induces Fas and FasL upregulation in human leukaemia U-937 CELLS VIA Ca2+/ROS-mediated suppression of ERK/c-Fos pathway and activation of p38 MAPK/ATF-2 pathway". *Toxicol Lett*. 2009; 191:140-148.
- Lombardi L, Newcomb EW, Dalla-Favera R. "Pathogenesis of Burkitt lymphoma: expression of an activated c-myc oncogene causes the tumorigenic conversion of EBV-infected human B lymphoblasts". *Cell*. 1987; 49:161-170.
- Lowenberg B, Suci S, Archimbaud E et al. "Mitoxantrone versus daunorubicin in induction-consolidation chemotherapy-the value of low-dose cytarabine for maintenance of remission, and an assessment of prognostic factors in acute myeloid leukemia in the elderly: final report. European Organization for the Research and Treatment of Cancer and the Dutch-Belgian hemato-Oncology Cooperative Hovon Group". *J Clin Oncol*. 1998; 16:872-81.
- Lu B, Wang L, Stehlik C et al. "Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt positively regulates Fas (CD95)-mediated apoptosis in epidermal C141 cells". *J Immunol*. 2006; 176:6785-6793.
- Lu B, Wang L, Stehlik C et al. "Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt positively regulates Fas (CD95)-mediated apoptosis in epidermal C141 cell". *J Immunol*. 2006; 176:6785-6793.
- Lukes R, Collins, R. "New approaches to the classification of the lymphoma". *Br J Cancer*. 1975; 31:1-28.
- Luo X, Budihardjo I, Zou H, et al. "Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors" *Cell*. 1998; 94: 481-90.

- Madesh M, Hajnoczky G. "VDAC-dependent permeabilization of the outer mitochondrial membrane by superoxide induces rapid and massive cytochrome c release". *J Cell Biol.* 2001; 155:1003-1015.
- Maestroni GJ, Conti A, Pierpaoli W. "Role of the pineal gland in immunity. Circadian synthesis and release of melatonin modulates the antibody response and antagonizes the immunosuppressive effect of corticosterone". *J Neuroimmunol.* 1986; 13:19-30.
- Maestroni GJ, Conti A. "The pineal neurohormone melatonin stimulates activated CD4+, THY-1+ cells to release opioid agonist(s) with immunoenhancing and anti-stress properties". *J Neuroimmunol.* 1990; 28:167-176.
- Maestroni GJM, Conti A, Pierpaoli W. "Role of pineal gland in immunity. Circadian synthesis and release of melatonin modulates the antibody response and antagonizes the immunosuppressive effect of corticosterone". *J Neuroimmunol.* 1986; 13:19-30.
- Maestroni GJM. "The immunotherapeutic potential of melatonin". *Exp Opin Invest Drugs.* 2001; 10:467-476.
- Magrath I, Adde M, Shad A, et al. "Adults and children with small non-cleaved cell lymphoma have a similar excellent outcome when treated with the same chemotherapy regimen". *J Clin Oncol.* 1996; 14:925-934.
- Mahieux R, Gessain A. "HTLV-1 and associated adult T-cell leukaemia/lymphoma". *Rev Clin Exp Hematol.* 2003;7:336-361.
- Maiso P, Colado E, Ocio EM, et al. "The synergy of panobinostat plus doxorubicin in acute myeloid leucemia suggests a role for HDAC inhibitors in the control of DNA repair". *Leukemia.* 200; 23:2265-2274.
- Majno G, Joris I. "Apoptosis, oncosis and necrosis. An overview of cell death". *Am J Pathol* 1995; 146:3-15.
- Marelli MM, Limonta P, Maggi R, et al. "Growth-inhibitory activity of melatonin on human androgen-independent DU 145 prostate cancer cells". *Prostate.* 2000; 45:238-244.
- Martin V, Herrera F, Carrera-González P et al. "Intracellular signalling pathways involved in the cell growth inhibition of glioma cells by melatonin". *Cancer Res.* 2006; 66:1-8.



- Martín V, Herrera F, García-Santos G, Antolín I, Rodríguez-Blanco J, Medina M, Rodríguez C. "Involvement of protein kinase C in melatonin's oncostatic effect in C6 glioma cells". *J Pineal Res.* 2007; 43:239-244.
- Martín V, Saínz RM, Antolín I, et al. "Several antioxidant pathways are involved in astrocyte protection by melatonin". *J Pineal Res.* 2002; 33:204-212.
- Martindale JL and Holbrook NJ. "Cellular response to oxidative stress: signalling for suicide and survival". *J. Cell Physiol.* 2002; 192:1-15.
- Martínez-Campa C, González A, Mediavilla MD, et al. "Melatonin inhibits aromatase promoter expresión by regulating cyclooxygenases expresión and activity in breast cancer cells". *Br J Cancer.* 2009; 101:1613-1619.
- Martínez-Campa CM, Alonso-González C, Mediavilla MD, et al. "Melatonin down-regulates hTERT expresión induced by Esther natural estrogens (17beta-estradiol) or metalloestrogens (cadmium) in MCF-7 human breast cancer cells". *Cancer Lett.* 2008; 268:272-277.
- Martín-Renedo J, Mauriz JL, Jorquera F, et al. "Melatonin induces cell cycle arrest and apoptosis in hepatocarcinoma HepG2 cell line" *J Pineal Res.* 2008; 45:532-540.
- Martinvalet D, Zhu P, Lieberman J. "Granzyme A induces caspase-independent mitochondrial damage, a required first step for apoptosis". *Immunity.* 2005; 22:355-70.
- Mata JF, Silveira VS, Mateo EC, et al. "Low mRNA expresión of the apoptosis-related genes CASP3, CASP8 and FAS is associated with low induction treatment response in childhood acute lymphoblastic leukaemia (ALL)". *Pediatr Blood Cancer.* 2010; 55:100-107.
- Mathas S, Lietz A, Anagnostopoulos I, et al. "c-FLIP mediates resistance of Hodgkin/Reed-Sternberg cells to death receptor-induced apoptosis". *J Exp Med* 2004; 199:1041-1052.
- Matsuura H, Nishitoh H, Takeda K, et al. "Phosphorylation-dependent scaffolding role of JSAP1(JIP3 in the ASK1-JNK signalling pathway. A new mode of regulation of the MAP kinase cascade". *J Biol Chem.* 2002; 277:40703-40709.
- Mauz-Körholz C, Dietzsch S, Banning U, et al. "Heat- and 4-hydroperoxy- ifosfamide-induced apoptosis in B cell precursors leukaemias". *Int J Hyperthermia.* 2003; 19:444-460.

- Mayo JC, Sainz RM, Antolín I, et al. "Melatonin regulation of antioxidant enzyme gene expression". *Cell Mol Life Sci.* 2002; 59:1706-1713.
- Mayo JC, Sainz RM, Uria H, Antolin I, Esteban MM, Rodriguez C. "Melatonin prevents apoptosis induced by 6-hydroxydopamine in neuronal cells: implications for Parkinson's disease". *J Pineal Res.* 1998; 24:179-192.
- Mayo JC, Sainz RM, Uría H, Antolín I, Estéban MM, Rodríguez C." Inhibition of cell proliferation: a mechanism likely to mediate the prevention of neuronal cell death by melatonin". *J Pineal Res.* 1998; 25:12-18.
- Mayo JC, Tan DX, Sainz RM, Lopez-Burillo S, Reiter RJ. "Oxidative damage to catalase induced by peroxy radicals: functional protection by melatonin and other antioxidants". *Free Radic Res.* 2003; 37:543-553.
- Mayo JC, Tan DX, Sainz RM, Lopez-Burillo S, Reiter RJ. "Oxidative damage to catalase induced by peroxy radicals: functional protection by melatonin and other antioxidants". *Free Radic Res.* 2003; 37:543-553.
- Mayo JC, Tan DX, Sainz RM, Natarajan M, Lopez-Burillo S, Reiter RJ. "Protection against oxidative protein damage induced by metal-catalyzed reaction or alkylperoxy radicals: comparative effects of melatonin and other antioxidants". *Biochim Biophys Acta.* 2003; 1620:139-150.
- Mayo JC, Tan DX, Sainz RM, Natarajan M, Lopez-Burillo S, Reiter RJ. "Protection against oxidative protein damage induced by metal-catalyzed reaction or alkylperoxy radicals: comparative effects of melatonin and other antioxidants". *Biochim Biophys Acta.* 2003; 1620:139-150.
- McMaster M, Greer J, Greco A, et al. "Effective treatment of small-non-cleaved-cell lymphoma with high-intensity, brief-duration chemotherapy". *J Clin Oncol.* 1991; 9:941-946.
- Mediavilla MD, Cos S, Sánchez-Barceló EJ. "Melatonin increases p53 and p21WAF1 expression in MCF-7 human breast cancer cells in vitro". *Life Sci.* 1999; 65: 415-420.
- Melacon K, Cheng Q, Kiefer TL, et al. "Regression of NMU-induced mammary tumors with the combination of melatonin and 9-cis-retinoic acid". *Cancer Letters.* 2005; 227:39-48.
- Melchiorri D, Reiter RJ, Attia AM, Hara M, Burgos A, Nistico G. "Potent protective effect of melatonin on in vivo paraquat-induced oxidative damage in rats". *Life Sci.* 1995; 56:83-89.



- Mertens AC, Wen W, Davies SM, et al. "Congenital abnormalities in children with acute leukaemia; a report from the Children's Cancer Group". *J Pediatr.* 1998; 133:617-623.
- Mhaweck P, Benz A, Cerato C, et al. "Downregulation of 14-3-3sigma in ovary, prostate and endometrial carcinomas is associated with CpG island methylation" *Mod Pathol.* 2005; 18:340-348.
- Mhaweck P. "14-3-3 proteins-an update". *Cell Res.* 2005; 15:228-236.
- Micheau O, Lens S, Gaide O, et al. "NF-kappaB signals induce the expression of c-FLIP". *Mol Cell Biol.* 2001; 21:5299-5305.
- Micheau O, Solary E, Hammann A, et al. "Sensitization of Cancer cells treated with cytotoxic drugs to Fas-mediated cytotoxicity". *J Natl Cancer Inst.* 1997; 89:783-9.
- Micheau O, Tschopp J. "Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signalling complexes". *Cell.* 2003; 114:181-190.
- Milella M, Precupanu CM, Gregorj C, et al. "Beyond single pathway inhibition: MEK inhibitors as a platform for the development of pharmacological combinations with synergistic anti-leukemic effects". *Curr Pharm Des.* 2005; 11:2779-2795.
- Min YJ, Lee JH, Choi SJ et al. "Prognostic significance of Fas (CD95) and TRAIL receptors (DR4/DR5) expression in acute myelogenous leukaemia". *Leuk Res.* 2004; 28:359-365.
- Min YH, Lee S, Lee JW, et al. "Expression of Fas antigen in acute myeloid leukaemia is associated with therapeutic response to chemotherapy". *Br J Haematol* 1996; 93:928.
- Minana JB, Gomez-Cambronero L, Lloret A, et al. "Mitochondrial oxidative stress and CD95 ligand: a dual mechanism for hepatocyte apoptosis in chronic alcoholism". *Hepatology.* 2002; 35:1205-1214.
- Mitsiades CS, Treon SP, Mitsiades N, et al. "TRAIL/Apo2L ligand selectively induces apoptosis and overcomes drug resistance in multiple myeloma: therapeutic applications". *Blood.* 2001; 98:795-804.
- Mitsuhashi M, Endo K, Obara K, et al. "Ex vivo simulation of the action of antileukemia drugs by measuring apoptosis-related mRNA in blood". *Clin Chem.* 2008; 54:673-681.

- Miyoshi T, Nagai T, Kikuchi S, et al. "Cloning and characterization of a human BCR/ABL-positive cell line, K-562/RR, resistant to the farnesyltransferase inhibition by tipifarnib". *Exp Hematol.* 2007; 35:1358-1365.
- Montilla P, Túnez I, Muñoz MC, et al. "Hyperlipidemic nephropathy induced by adriamycin: effect of melatonin administration". *Nephron.* 1997; 76:345-350.
- Montserrat E. "Role of auto- and allotransplantation in B-cell chronic lymphocytic leukemia". *Hematol Oncol Clin North Am.* 2004; 18:915-926.
- Moorman AV, Roman E, Willett EV, et al. "Karyotype and age in acute myeloid leukemia. Are they linked?" *Cancer Genet Cytogenet.* 2001; 126:155-161.
- Moretti RM, Marelli MM, Maggi R, Dondi D, Motta M, Limonta P. "Antiproliferative action of melatonin on human prostate cancer LNCAP cells". *Oncol Rep.* 2000; 7:347-351.
- Moretti RM, Marelli MM, Maggi R, et al. "Antiproliferative action of melatonin on human prostate cancer LNCaP cells". *Oncol Rep.* 2000; 7:347-351.
- Murai M, Toyota M, Satoh A, et al. "Aberrant DNA methylation associated with silencing BNIP3 gene expression in haematopoietic tumours". *Br J Cancer.* 2005; 92:1165-1172.
- Murphy KM, Ranganathan V, Farnsworth ML, et al. "Bcl-2 inhibits Bax translocation from cytosol to mitochondria during drug-induced apoptosis in human tumor cells". *Cell Death Differ.* 2000; 7:102-111.
- Murphy S, Bownan W, Abromowitch M, et al. "Results of treatment of advanced-stage Burkitt's lymphoma and B cell (S Ig+) acute lymphoblastic leukaemia with high-dose fractionated cyclophosphamide and coordinated high-dose methotrexato and cytarabine". *J Clin Oncol.* 1986; 4:1732-1739.
- Navid F, Santana VM, Billups CA, et al. "Concomitant administration of vincristine, doxorubicin, cyclophosphamide, ifosfamide, and etoposide for high-risk sarcomas: the St. Jude Children's Research Hospital experience". *Cancer.* 2006; 106:1846-1856.
- Newmeyer DD, Ferguson-Miller S. "Mitochondria: releasing power for life and unleashing the machineries of death". *Cell.* 2003; 112:481-490.
- Nicholson DW, Ali A, Thornberry NA, et al. "Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis". *Nature.* 1995; 376:37-43.



- Nimmanapalli R, Porosnicu M, Nguyen D, et al. "Cotreatment with STI-571 enhances tumor necrosis factor  $\alpha$ -related apoptosis-inducing ligand (TRAIL or Apo-2L)-induced apoptosis of Bcr-Abl-positive human acute leukaemia cells". *Clin Cancer Res.* 2001; 7:350-357.
- Nosjean O, Ferro M, Coge F, Beauverger P, Henlin JM, Lefoulon F, Faucher JL, Delagrande P, Canet E, Boutin JA. "Identification of the melatonin-binding site MT3 as the quinone reductase 2". *J Biol Chem.* 2000; 275:31311-31317.
- Nowell PC, Hungerford DA. "A minute chromosome in human chronic granulocytic leukaemia". *Science.* 1960; 132:1497.
- Nowfar S, Teplitzky SR, Melancon K, 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 Res Treat.* 2002; 72:33-43.
- Nyakern M, Cappellini A, Mantovani I, Martelli AM. "Synergistic induction of apoptosis in human leukaemia T cells by the Akt inhibitor perifosine and etoposide through activation of intrinsic and Fas-mediated extrinsic cell death pathways". *Mol Cancer Ther.* 2006; 5:1559-1570.
- O'Brien SG, Guilhot F, Larson RA, et al. "Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia". *N Engl J Med.* 2003; 348:994-1004.
- O'Hara KA, Dmitrienko GI, Hasinoff BB. "Kinamycin F downregulates cyclin D3 in human leukemia K562 cells". *Chem Biol Interact.* 2010; 184:396-402.
- Obexer P, Hagenbuchner J, Rupp M, et al. "p16<sup>INK4A</sup> sensitizes human leukemia cells to FAS- and glucocorticoid-induced apoptosis via induction of BBC3/Puma and Repression of MCL1 and BCL2". *J Biol Chem.* 2009; 284:30933-30940.
- Ocio EM, Vilanova D, Atadja P, et al. "In vitro and in vivo rationale for the triple combination of panobinostat (LBH589) and dexamethasone with either bortezomib or lenalidomide in multiple myeloma". *Haematologica.* 2010; 95: 794-803.
- Ohsumi Y. "Molecular dissection of autophagy: two ubiquitin-like systems". *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001; 2:211-6.
- Osseni RA, Rat P, Bogdan A, et al. "Evidence of prooxidant and antioxidant action of melatonin on human liver cell line HepG2". *Life Sci.* 2000; 15: 387-399.

- Osseni RA, Rat P, Bogdan A, Warnet JM, Touitou Y. "Evidence of prooxidant and antioxidant action of melatonin on human liver cell line HepG2." *Life Sci.* 2000; 68:387-399.
- Otálora BB, Madrid JA, Alvarez N, et al. "Effect of exogenous melatonin and circadian synchronization on tumor progression in melanoma-bearing C57BL6 mice". *J Pineal Res.* 2008; 44:307-315.
- Pan G, Bauer JH, Haridas V, et al. "Identification and functional characterization of DR6, a novel death domain-containing TNF receptor". *FEBS Lett.* 1998; 431:351-356.
- Pandi-Perumal SR, Srinivasan V, Maestroni GJM, et al. "Melatonin nature's most versatile biological signal?" *FEBS J.* 2006; 273:2813-2838.
- Pantano C, Shrivastava P, McElhinney B, Janssen-Heininger Y. Hydrogen peroxide signalling through tumor necrosis factor receptor 1 leads to selective activation of c-Jun-n-terminal kinase. *J Biol Chem* 2003; 278:44091-44096.
- Papa S, Zazzeroni F, Bubici C, Jayawardena S, Alvarez K, Matsuda S, Nguyen DU, Pham CG, Nelsbach AH, Melis T, De Smaele E, Tang WJ, D'Adamio L, and Franzoso G. Gadd45 beta mediates the NF-kappa B suppression of JNK signalling by targeting MKK7/JNKK2. *Nat Cell Biol* 2004; 6:146-153.
- Patte C, Phillip T, Rodary C, et al. High survival rate in advanced-stage B-cell lymphomas and leukemias without CNS involvement with a short intensive polychemotherapy: results from the French Pediatric Oncology Society of a randomized trial of 216 children". *J Clin Oncol.* 9:123-132, 1991.
- Pavletic ZS, Bierman PJ, Vose JM, et al. "High incidence of relapse after autologous stem-cell transplantation for B-cell chronic lymphocytic leukemia or small lymphocytic lymphoma". *Ann Oncol.* 1998; 9:1023-1026.
- Peng XH, Karna P, O'Regan RM, et al. "Down-regulation of inhibitor of apoptosis proteins by deguelin selectively induces apoptosis in breast cancer cells". *Mol Pharmacol* 2007; 71:101-111.
- Peter ME, Krammer PH. "Mechanisms of CD95 (APO-1/Fas)- mediated apoptosis". *Curr Opin Immunol.* 1998; 10:545-51.
- Pichon MF, Labroquère M, Rezaï K, et al. "Variations of soluble Fas and cytokeratin 18-Asp 396 neo-epitope in different cancers during chemotherapy". *Anticancer Res.* 2006; 26:2387-2392.



- Pigault C, Follenius-Wund A, Schmutz M, et al. "Formation of two-dimensional arrays of annexin V on phosphatidylserine-containing liposomes". *J Mol Biol.* 1994; 236:199-208.
- Pillar GJ. "John Hughes Bennett and the Discovery of Leukaemia". *Proc R Coll Physicians.* 1997; 27: 1-49.
- Pioli C, Caroleo MC, Nistico G. "Melatonin increases antigen presentation and amplifies specific and non specific signals for T-cell proliferation". *Int J Immunopharmacol.* 1993; 15:463-468.
- Plasilova M, Zivny J, Jelinek J, et al. "TRAIL (Apo2L) suppresses growth of primary human leukaemia and myelodysplasia progenitors". *Leukemia.* 2002; 16:67-73.
- Plataniias LC. "Map kinase signaling pathways and hematologic malignancies". *Blood* 2003; 101:4667-4679.
- Poeggeler B, Thuermann S, Dose A, et al. "Melatonin's unique radical scavenging properties-Roles of its functional substituents as revealed by a comparison with its structural analogs". *J Pineal Res.* 2002; 33:20-30.
- Pogoda JM, Preston-Martin S, Nichols PW, et al. "Smoking and risk of acute myeloid leukemia: results from Los Angeles County case-control study". *Am J Epidemiol.* 2002; 155:546-553.
- Pozo D, Delgado M, Fernández-Santos JM, et al. "Expression of melatonin receptor mRNA in T and B subsets of lymphocytes from rat thymus and spleen". *FASEB J.* 1997; 11:466-473.
- Pui CH, Relling MV, Downing JR. "Acute Lymphoblastic Leukemia". *N Engl J Med.* 2004;350:1535-1548.
- Pui CH. "Childhood leukemias". *N Engl J Med.* 1995; 332:1618-1630.
- Puthalakath H, Villunger A, O'Reilly LA, et al. "Bmf: a proapoptotic BH3-only protein regulated by interaction with the myosin V actin motor complex, activated by anoikis". *Science.* 2001; 293: 1829–1832.
- Putnam FW. "From the first to the last of the immunoglobulins. Perspectives and prospects". *Clin Physiol Biochem.* 1983; 1: 63-91.
- Quintás-Cardam A, Cortes JE. "Chronic Myeloid Leukemia: Diagnosis and Treatment". *Mayo Clin Proc.* 2006; 81:973-988.
- Rai NK, Tripathi K, Sharma D, et al. "Apoptosis: a basic physiologic process in wound healing". *Int J Low Extrem Wounds.* 2005; 4:138-144.

- Ram PT, Dai J, Yuan L, Dong C, Kiefer TL, Lai L, Hill SM. "Involvement of the mt1 melatonin receptor in human breast cancer". *Cancer Lett.* 2002; 179:141-150.
- Raphael B, Andersen JW, Silber R, et al. "Comparison of chlorambucil and prednisone versus cyclophosphamide, vincristine, and prednisone as initial treatment for chronic lymphocytic leukemia: long-term follow-up of an Eastern Cooperative Oncology Group randomized clinical trial". *J Clin Oncol.* 1991; 9:770-776.
- Rasmussen CD, Means AR. "Calmodulin is involved in regulation of cell proliferation". *Embo J.* 1987; 6:3961-3968.
- Rato AG, Pedrero JG, Martinez MA, del Rio B, Lazo PS, Ramos S. "Melatonin blocks the activation of estrogen receptor for DNA binding". *FASEB J.* 1999; 13:857-868.
- Raynaud S, Mauvieux L, Cayuela JM, et al. "TEL/AML1 fusion gene is a rare event in adult acute lymphoblastic leukaemia". *Leukemia.* 1996; 10:1529-1530.
- Reiter A, Schrappe M, Ludwig W-D, et al. "Favorable outcome of B-cell acute lymphoblastic leukaemia in childhood: a report of three consecutive studies of the BFM group". *Blood.* 1992; 90:2471-2478.
- Reiter RJ, Blask DE, Johnson LY, Rudeen PK, Vaughan MK, Waring PJ. "Melatonin inhibition of reproduction in the male hamster: its dependency on time of day of administration and on an intact and sympathetically innervated pineal gland". *Neuroendocrinology.* 1976; 22:107-116.
- Remy I and Michnick SW. "Regulation of apoptosis by the Ft1 protein, a new modulator of protein kinase B/Akt". *Mol Cell Biol.* 2004; 24:1493-1504.
- Ren R. "Mechanisms of BCR-ABL in the pathogenesis of chronic myelogenous leukaemia". *Nat Rev Cancer.* 2005; 5:172-183.
- Reppert SM, Weaver DR, Ebisawa T, Mahle CD, Kolakowski KF. "Cloning of a melatonin-related receptor from human pituitary". *FEBS Lett.* 1996; 386:219-224.
- Reppert SM, Weaver DR, Ebisawa T. "Cloning and characterization of a mammalian melatonin receptor that mediates reproductive and circadian responses". *Neuron* 1994; 13:1177-1185.
- Ressmeyer AR, Mayo JC, Zelosko V, Sáinz RM, Tan DX, Poeggeler B, Antolín I, Zsizsik BK, Reiter RJ, Hardeland R. "Antioxidant properties of the melatonin



- metabolite N1-acetyl-5-methoxykynuramine (AMK): scavenging of free radicals and prevention of protein destruction”. *Redox Rep.* 2003; 8:205-213.
- Riccioni R, Pasquini L, Mariani G, et al. “TRAIL decoy receptors mediate resistance of acute myeloid leukemia cells to TRAIL”. *Haematologica* 2005; 90:612-624.
  - Robertson LE, Estey E, Kantarjian H, et al. “Therapy related leucemia and myelodysplastic síndrome in chronic lymphocytic leucemia”. *Leukemia* 1994; 8:2047-2051.
  - Robin M, Guadiola P, Devergie A, et al. “A 10-year median follow-up study after allogeneic ítem cell transplantation for chronic myeloid leucemia in chronic phase from HLA identical sibling donors”. *Leukemia*. 2005; 19:1613-1620.
  - Rodríguez C, Mayo JC, Saínz RM, Antóin I, Herrera F, Martín V, Reiter RJ. “Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin”. *J Pineal Res.* 2004; 36:1-9.
  - Rodríguez-Abreu D, Bordoni A, Zucca E. “Epidemiology of hematological malignancies”. *Ann Oncol.* 2007; 18: i3-i8.
  - Rodríguez-Blanco J, Martín V, Herrera F, García-Santos G, Antolín I, Rodríguez C. “Intracellular signaling pathways involved in post-mitotic dopaminergic PC12 cell death induced by 6-hydroxydopamine”. *J Neurochem.* 2008; 107:127-140.
  - Romana SP; Mauchauffee M, Le Coniat M, et al. “The t(12;21) of acute lymphoblastic leucemia results in TEL-AML1 gene fusion”. *Blood.* 1995; 85:3662-3670.
  - Romano S, Mallardo M, Chiurazzi F, et al. “The effect of FK506 on transforming growth factor  $\beta$  signaling and apoptosis in chronic lymphocytic leukemia B cells”. *Haematologica.* 2008; 93:1039-1048.
  - Rowley JD. “Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining”. *Nature.* 1973; 243:290-293.
  - Rubio S, Estévez F, Cabrera J, et al. “Inhibition of proliferation and induction of apoptosis by melatonin in human myeloid HL-60 cells”. *J Pineal Res.* 2007; 42:131-138.

- Rubio-Moscardo F, Blesa D, et al. "Characterization of 8p21.3 chromosomal deletions in B-cell lymphoma; TRAIL-R1 and TRAIL-R2 as candidate dosage-dependent tumor suppressor genes". *Blood*. 2005; 106:3214-22.
- Rubnitz JE, Behm FG, Pui CH, et al. "Genetic studies of childhood acute lymphoblastic leukaemia with emphasis on p16, MLL, and ETV6 gene abnormalities: results of ST. Jude Total Therapy Study XII". *Leukemia*. 1997; 11:1201-1206.
- Rubnitz JE, Downing JR, Pui CH, et al. "TEL gene rearrangement in acute lymphoblastic leukaemia: A new genetic marker with prognostic significance" *J Clin Oncol*. 1997; 15:1150-1157.
- Rubnitz JE, Pui CH, Downing JR. "The role of TEL fusion genes in pediatric leukemias". *Leukemia*. 1999; 13:6-13.
- Russell JH, Ley TJ. "Lymphocyte-mediated cytotoxicity". *Annu Rev Immunol*. 2002; 20:323-70.
- Saelens X, Festjens N, Vande Walle L, et al. "Toxic proteins released from mitochondria in cell death". *Oncogene*. 2004; 23:2861-74.
- Saínz RM, Mayo JC, Tan DX, et al. "Melatonin reduces prostate cancer cell growth leading to neuroendocrine differentiation via a receptor and PKA independent mechanism". *Prostate*, 2005; 63:29-43.
- Sainz RM, Mayo JC, Tan DX, León J, Manchester L, Reiter RJ. "Melatonin reduces prostate cancer cell growth leading to neuroendocrine differentiation via a receptor and PKA independent mechanism". *Prostate*. 2005; 63:29-43.
- Sainz RM, Mayo JC, Tan DX, Lopez-Burillo S, Natarajan M, Reiter RJ. "Antioxidant activity of melatonin in Chinese hamster ovarian cells: changes in cellular proliferation and differentiation". *Biochem Biophys Res Commun*. 2003; 302:625-634.
- Sainz RM, Reiter RJ, Tan DX, et al. "Critical role of glutathione in melatonin enhancement of tumor necrosis factor and ionizing radiation-induced apoptosis in prostate cancer cells in vitro". *J Pineal Res*. 2008; 45:258-270.
- Saínz RM, Reiter RJ, Tan Dx, et al. "Critical role of glutathione in melatonin enhancement of tumor necrosis factor and ionizing radiation-induced apoptosis in prostate cancer cells in vitro". *J Pineal Res*. 2008; 45:258-270.
- Sainz RM, Reiter RJ, Tan DX, Roldan F, Natarajan M, Quiros I, Hevia D, Rodriguez C, Mayo JC. "Critical role of glutathione in melatonin enhancement



- of tumor necrosis factor and ionizing radiation-induced apoptosis in prostate cancer cells in vitro". *J Pineal Res.* 2008; 45:258-270.
- Saitoh M, Nishitoh H, Fujii M, et al. "Mammalian thioredoxin is a direct inhibitor of apoptosis signal-regulating kinase (ASK) 1". *Embo J.* 1998; 17:2596-2606.
  - Sakahira H, Enari M, Nagata S. "Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis". *Nature.* 1998; 391:96-9.
  - Sánchez Y, Amrán D, Fernández C, et al. "Genistein selectively potentiates arsenic trioxide-induced apoptosis in human leukemia cells via reactive oxygen species generation and activation of reactive oxygen species-inducible protein kinases (p38-MAPK, AMPK)". *Int J Cancer.* 2008; 123:1205-1214.
  - Sánchez-Barceló EJ, Cos S, et al. "Melatonin and mammary cancer: a short review". *Endocrine-Related Cancer.* 2003; 10:153-159.
  - Sato T, Machida T, Takahashi S, et al. "Fas-mediated apoptosome formation is dependent on reactive oxygen species derived from mitochondrial permeability transition in Jurkat cells". *J Immunol.* 2004; 173:285-296.
  - Sauer LA, Dauchy RT, Blask DE. "Melatonin inhibits fatty acid transport in inguinal fat pads of hepatoma 7288 CTC-bearing and normal Buffalo rats via receptor-mediated signal transduction". *Life Sci.* 2001; 68:2835-2844.
  - Savill J, Fadok V. "Corpse clearance defines the meaning of cell death". *Nature.* 2000; 407:784-8.
  - Scaffidi C, Schmitz I, Krammer PH, et al. "The role of c-FLIP in modulation of CD95-induced apoptosis". *J Biol Chem.* 1999; 274:1541-8.
  - Schimmer AD. "Inhibitor of apoptosis proteins: translating basic knowledge into clinical practice". *Cancer Res.* 2004; 64:7183-90.
  - Schmidt CS, Liu J, Zhang T, et al. Enhanced B cell expansion, survival, and humoral responses by targeting death receptor. *J Exp Med.* 2003; 197:51-62.
  - Schneider-Brachert W, Tchikov V, Neumeyer J, et al. "Compartmentalization of TNF receptor 1 signaling: internalized TNF receptors as death signalling vesicles". *Immunity.* 2004; 21:415-428.
  - Schuler M, Green DR. "Mechanisms of p53-dependent apoptosis". *Biochem Soc Trans.* 2001; 29:684-8.

- Schult C, Dahlhaus M, Ruck S, et al. "The multikinase inhibitor Sorafenib displays significant antiproliferative effects and induces apoptosis via caspase 3, 7 and PARP in B and T-lymphoblastic cells". *BMC Cancer*. 2010; 10:560-571.
- Schwartz LM, Smith SW, Jones ME, et al. "Do all programmed cell deaths occur via apoptosis?" *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993; 90:980-4.
- Schwenn M, Blattner S, Lynch E, et al. "HiC-COM: a 2 month intensive chemotherapy regimen for children with stage III and IV Burkitt's lymphoma and B-cell acute lymphoblastic leukaemia". *J Clin Oncol*. 1991; 9:133-138.
- Shangary S, Johnson DE. "Recent advances in the development of anticancer agents targeting cell death inhibitors in the Bcl-2 protein family". *Leukemia*. 2003; 17:1470-1481.
- Shaoying Li, Mei Wan, Xu Cao, et al. "Expression of AIF and HtrA2/Omi in Small Lymphocytic Lymphoma and Diffuse Large B-Cell Lymphoma". *Arch Pathol Lab Med*. 2011; 135:903-908.
- Shaw MP, Eden OB, Grace E, et al. "Acute lymphoblastic leukaemia and Klinefelter's syndrome". *Pediatr Hematol Oncol*. 1992; 9:81-85.
- She MH, Chen BB, Wang XM, He SS. "p53-dependent antiproliferation and apoptosis of H22 cell induced by melatonin". *Ai Zheng* 2004; 23:803-807.
- Shen HM, Pervaiz S. "TNF receptor superfamily-induced cell death: redox-dependent execution". *FASEB J*. 2006; 20:1589-1598.
- Shen HM, Pevaiz S. "TNF receptor superfamily-induced cell death: redox-dependent execution". *FASEB J*. 2006; 20:1589-1598.
- Shim JH, Xiao C, Paschal AE, et al. "TAK1, but not TAB1 or TAB2, plays an essential role in multiple signalling pathways in vivo". *Genes Dev*. 2005; 19:2668-2681.
- Shiu SY, Li L, Xu JN, Pang CS, Wong JT, Pang SF. "Melatonin-induced inhibition of proliferation and G1/S cell cycle transition delay of human choriocarcinoma jar cells: possible involvement of mt2 (mel1b) receptor". *J Pineal Res*. 1999; 27:183-192.
- Sibley K, Rollinson S, Allan JM, et al. "Functional FAS promoter polymorphisms are associated with increased risk of acute myeloid leukaemia". *Cancer Res*. 2003; 63:4327-4330.
- Sies H. "Oxidative stress: Oxidants and antioxidants". *Exp Physiol*. 1997; 82: 291-295.



- Sies H. "Oxidative stress: oxidants and antioxidants". *Exp. Physiol.* 1997; 82:291-295.
- Simonsson B, Overg G, Bjoreman M, et al. "Intensive treatment and stem cell transplantation in chronic myelogenous leukaemia: long-term follow-up". *Acta Haematol.* 2005; 113:155-62.
- Slee EA, Adrain C, Martin SJ. "Executioner caspas-3, 6, and 7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis". *J Biol Chem.* 2001; 276:7320-6.
- Snell V, Clodi K, Zhao S, et al. "Activity of TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) in haematological malignancies". *Br J Haematol.* 1997; 99:618-624.
- Song D, Gao Y, Wang R, et al. "Downregulation of c-FLIP, XIAP and Mcl-1 protein as well as depletion of reduced glutathione contribute to the apoptosis induction of glycyrrhetic acid derivatives in leukemia cells". *Cancer Biol Ther.* 2010; 9:96-108.
- Song JJ, Rhee JG, Suntharalingam M, et al. "Role of glutaredoxin in metabolic oxidative stress. Glutaredoxin as a sensor of oxidative stress mediated by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>". *J Biol Chem.* 2002; 277:46566-46575.
- Soto-Vega E, Meza I, Ramírez-Rodríguez, et al. "Melatonin stimulates calmodulin phosphorylation by protein kinase C". *J Pineal Res.* 2004; 37:98-106.
- Sprick MR, Weigand MA, Rieser E, et al. "FADD/MORT1 and caspase-8 are recruited to TRAIL receptors 1 and 2 and are essential for apoptosis mediated by TRAIL receptor 2". *Immunity* 2000; 12:599-609.
- Stehlik C, de Martin R, Kumabashiri I, et al. "Nuclear factor (NF)-kappaB-regulated X-chromosome-linked iap gene expression protects endothelial cells from tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis". *J Exp Med.* 1998; 188:211-216.
- Steinhilber D, Brungs M, Werz O, Wiesenberg I, Danielsson C, Kahlen JP, Nayeri S, Schröder M, Carlberg C. "The nuclear receptor for melatonin represses 5-lipoxygenase gene expression in human B lymphocytes". *J Biol Chem.* 1995; 270:7037-7040.
- Stone RM, O'Donnell MR, Sekeres MA. "Acute Myeloid Leukemia". *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2004; 98-117.

- Suliman A, Lam A, Datta R, et al. "Intracellular mechanisms of TRAIL: apoptosis through mitochondrial-dependent and -independent pathways". *Oncogene* 2001; 20:2122-33.
- Suminoe A, Matsuzaki A, Hattori H, et al. "mRNA expression of apoptosis-associated genes in infant acute lymphoblastic leukaemia: low Fas expression is an independent predictor for poor prognosis". *Leukemia*. 2004; 18:365-368.
- Sutton L, Maloum K, González H, et al. "Autologous hematopoietic stem cell transplantation as salvage treatment for advanced B cell chronic lymphocytic leukemia". *Leukemia*. 1998; 12:1699-1707.
- Tallman MS, Gilliland DG y Rowe JM. "Drug therapy for acute myeloid leukemia". *Blood*. 2005; 106:1154-1163.
- Talpaz M, McCredie KB, Mavligit GM, et al. "Leukocyte interferon-induced myeloid cyto-reduction in chronic myelogenous leukemia". *Blood* 62:689-692, 1983.
- Tam CW, Chan KW, Liu VW, et al. "Melatonin as a negative mitogenic hormonal regulator of human prostate epithelial cell growth: potential mechanisms and clinical significance". *J Pineal Res*. 2008; 45:403-412.
- Tam CW, Mo CW, Yao KM, et al. "Signaling mechanism of melatonin in antiproliferation of hormone-refractory 22Rv1 human prostate cancer cells: implications for prostate cancer chemoprevention". *J Pineal Res*. 2007; 42:191-202.
- Tamarkin L, Westrom WK, Hamill AI, Goldman BD. "Effect of melatonin on the reproductive systems of male and female Syrian hamsters: a diurnal rhythm in sensitivity to melatonin". *Endocrinology*. 1976; 99:1534-1541.
- Tamm I, Kornblau SM, Segall H, et al. "Expression and prognostic significance of IAP-family genes in human cancers and myeloid leukemias". *Clin Cancer Res*. 2000; 6:1796-1803.
- Tan DX, Manchester LC, Burkhardt S, Saínz RM, Mayo JC, Kohen R, Shohami E, Huo YS, Hardeland R, Reiter RJ. "N1-acetyl-n2-formyl-5-methoxykynuramine, a biogenic amine and melatonin metabolite, functions as a potent antioxidant". *Faseb J*. 2001; 15:2294-2296.
- Tan DX, Manchester LC, Reiter RJ, Plummer BF, Limson J, Wintraub ST, Qi W. "Melatonin directly scavenges hydrogen peroxide: a potentially new



- metabolic pathway of melatonin biotransformation". *Free Radic Biol Med.* 2000; 29:1177-1185.
- Tan DX, Pöeggeler B, Reiter RJ, Chen LD, Chen S, Manchester LC, Barlow-Walden LR. "The pineal hormone melatonin inhibits DNA-adduct formation induced by the chemical carcinogen safrole in vivo". *Cancer Lett.* 1993; 70:65-71.
  - Tan DX, Pöeggeler B, Reiter RJ, Chen LD, Chen S, Manchester LC, Barlow-Walden LR. "The pineal hormone melatonin inhibits DNA-adduct formation induced by the chemical carcinogen safrole in vivo". *Cancer Lett.* 1993; 70:65-71.
  - Tang G, Minemoto Y, Dibling B, et al. "Inhibition of JNK activation through NF-kappaB target genes". *Nature.* 2001; 414:313-317.
  - Teachey DT, Sheen C, Hall J, et al. "mTOR inhibitors are synergistic with methotrexate: an effective combination to treat acute lymphoblastic leukaemia". *Blood.* 2008; 112: 2020-2023.
  - Thomas RK, Kallenborn A, Wickenhauser C, et al. "Constitutive expression of c-FLIP in Hodgkin and Reed-Stenberg cells". *Am J Pathol.* 2002; 160:1521-1528.
  - Toledano SR, Lange BJ. "Ataxia-telangiectasia and acute lymphoblastic leukaemia". *Cancer.* 1980; 45:1675-1678.
  - Trapani JA, Smyth MJ. "Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway". *Nat Rev Immunol.* 2002; 2:735-47.
  - Trubiani O, Recchioni R, Moroni F, et al. "Melatonin provokes cell death in human B-lymphoma cells by mitochondrial dependent apoptotic pathway action". *J Pineal Res.* 2005; 39:425-431.
  - Trubiani O, Recchioni R, Moroni F, Pizzicannella J, Caputi S, Di Primio R. "Melatonin provokes cell death in human B-lymphoma cells by mitochondrial-dependent apoptotic pathway activation". *J Pineal Res.* 2005; 39:425-431.
  - Trump BF, Berezsky IK, Chang SH, Phelps PC. The pathways of cell death: oncosis, apoptosis and necrosis. *Toxicol Pathol* 1997;25:82-8.
  - Tschopp J, Imler M, Thome M. "Inhibition of Fas death signals by FLIPs". *Curr Opin Immunol.* 1998; 10:552-558.
  - Tschopp J, Martinon F, Hofmann K. "Apoptosis: silencing the death receptors". *Curr Biol.* 1999; 9:R381-R384.

- Tsujimoto Y, Shimizu S. "Role of the mitochondrial membrane permeability transition in cell death". *Apoptosis*. 2007; 12:835-840.
- Turjanski A, Estrin DA, Rosenstein RE, et al. "NMR and molecular dynamics studies of the interaction of melatonin with calmodulin". *Protein Science*. 2004; 13: 2925-2938.
- Ueda S, Masutami H, Nakamura H, et al. "Redox Control of cell death. Antioxid". *Redox Signal*. 2002; 4:405-414.
- Urata Y, Honma S, Goto S, Todoroki S, Iida T, Cho S, Honma K, Kondo T. "Melatonin induces gamma-glutamylcysteine synthetase mediated by activator protein-1 in human vascular endothelial cells". *Free Radic Biol Med*. 1999; 27:838-847.
- Valdez BC, Murray D, Ramdas L, et al. "Altered gene expression in busulfan-resistant human myeloid leukemia". *Leuk Res*. 2008; 32:1684-1697.
- Valnet-Rabier MB, Challier B, Thiebault S, et al. "c-FLIP protein expression in Burkitt's lymphomas is associated with a poor clinical outcome". *Br J Haematol*. 2005; 128: 767-773.
- Vardiman JW. "The World Health Organization (WHO) classification of tumors of the hematopoietic and lymphoid tissues: An overview with emphasis on the myeloid neoplasms". *Chemico-Biological Interactions*. 2010; 184: 16-20.
- Vijayalaxmi , Reiter RJ, Sewerynek E, Poeggeler B, Leal BZ, Meltz ML. "Marked reduction of radiation-induced micronuclei in human blood lymphocytes pretreated with melatonin". *Radiat Res*. 1995 Jul;143(1):102-6.
- Vijayalaxmi, Reiter RJ, Meltz ML. "Melatonin protects human blood lymphocytes from radiation-induced chromosome damage". *Mutat Res*. 1995; 346:23-31.
- Volm M, Zinti F, Sauerbrey A, et al. "Expression of Fas ligand in newly diagnosed childhood acute lymphoblastic leukaemia". *Anticancer Res*. 1999; 19:3399-3402.
- Wajant H. "The Fas signalling pathway: more than a paradigm". *Science*. 2002; 296:1635-6.
- Walczak H, Miller RE, Ariail K, et al. "Tumoricidal activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vivo". *Nat Med*. 1999; 5:157-163.



- Wang L, Azad N, Kongkaneramt L, et al. "The Fas Death Signaling pathway connecting Reactive Oxygen Species Generation and FLICE inhibitory protein down-regulation". *J Immunol.* 2008; 180:3072-3080.
- Wei Mc, Lindsten T, Mootha VK, et al. "tBID, a membrane-targeted death ligand, oligomerizes BAK to release cytochrome c" *Genes Dev.* 2000; 14: 2060-2071.
- Wen J, Ramadevi N, Nguyen D, et al. "Antileukemic drugs increase death receptor 5 levels and enhance Apo-2L-induced apoptosis of human acute leukemia cells". *Blood.* 2000; 96:3900-3906.
- Wenzel U, Nickel A, Daniel H. "Melatonin potentiates flavone-induced apoptosis in human colon cancer cells by increasing the level of glycolytic end products". *Int J Cancer.* 2005;116:236-242.
- Wiesenberg I, Missbach M, Kahlen JP, et al. "Transcriptional activation of the nuclear receptor RZR alpha by the pineal gland hormone melatonin and identification of CGP 52608 as a synthetic ligand". *Nucleic Acids Res.* 1995; 23:327-333.
- Wilkinson JF, Fletcher F. "Effect of alpha-chloroethylamine hydrochloride in leukaemia, Hodgkin's disease and polycythemia vera: report of 8 cases". *Lancet.* 1947; 2:540-545.
- Wilson ST, Blask DE, Lemus-Wilson AM. "Melatonin augments the sensitivity of MCF-7 human breast cancer cells to tamoxifen in vitro". *J Clin Endocrinol Metab.* 1992; 75:669-70.
- Wilson ST, Blask DE, Lemus-Wilson AM. "Melatonin augments the sensitivity of MCF-7 human breast cancer cells to tamoxifen in vitro". *J Clin Endocrinol Metab.* 1992; 75:669-670.
- Winczyk K, Pawlikowski M, Lawnicka H, Kunert-Radek J, Spadoni G, Tarzia G, Karasek M. "Effects of melatonin and melatonin receptors ligand n-[(4-methoxy-1H-indol-2-yl)methyl]propanamide on murine Colon 38 cancer growth in vitro and in vivo". *Neuro Endocrinol Lett.* 2002; 23:50-54.
- Wintrobe MM, Huguley CM, McLennan MT. "Nitrogen Mustard as a therapeutic agent for Hodgkin's disease, lymphosarcoma and leukaemia". *Ann Intern Med.* 1947; 27:529-539.

- Wölfler A, Caluba HC, Abuja PM, Dohr G, Schauenstein K, Liebmann PM. "Prooxidant activity of melatonin promotes fas-induced cell death in human leukemic Jurkat cells". FEBS Lett. 2001; 502:127-131.
- Wölfler A, Caluba HC, Abuja PM, et al. "Prooxidant activity of melatonin promotes fas-induced cell death in human leukemic Jurkat cells". FEBS Lett. 2001; 502: 127-131.
- Woo MM, Tai CJ, Kang SK, Nathwani PS, Pang SF, Leung PC. "Direct action of melatonin in human granulosa-luteal cells". J Clin Endocrinol Metab. 2001; 86:4789-4797.
- Woodgett JR. "Molecular cloning and expression of glycogen synthase kinase-3/factor A" EMBO J. 1990; 9:2431-2438.
- Wu Y, Guo E, Yu J, Xie Q. "High DcR3 expression predicts stage pN2-3 in gastric cancer". Am J Clin Oncol. 2008; 31: 79-83.
- Wyllie AH. "Apoptosis: an overview". Br Med Bull. 1997; 53: 451-465.
- Xi SC, Siu SE, Fong SW, Shiu SY. "Inhibition of androgen-sensitive LNCAP prostate cancer growth in vivo by melatonin: association of antiproliferative action of the pineal hormone with mt1 receptor protein expression". Prostate 2001; 46: 52-61.
- Yoshida K, Nagai T, Ohmine K, et al. "Vincristine potentiates the antiproliferative effect of an aurora kinase inhibitor, VE-465, in myeloid leukemia cells". Biochem Pharmacol. 2011; 82:1884-1890.
- Zalupski M, Baker LH. "Ifosfamide". J Natl Cancer Inst. 1988; 80:556-566.
- Zeiss CJ. "The apoptosis-necrosis continuum; insights from genetically altered mice". Vet Pathol. 2003; 40:481-95.
- Zha J, Harada H, Yang E, et al. "Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L)". Cell. 1996; 87:619-628.
- Zhang H, Zhang R, Luo Y, et al. "AIP1/DAB2IP, a novel member of the Ras-GAP family, transduces TRAF2-induced ASK1-JNK activation". J Biol Chem 2004; 279:44955-44965.
- Zhang L, Chen J, Fu H. "Suppression of apoptosis signal-regulating kinase 1-induced cell death by 14-3-3 proteins". Proc Natl Acad Sci USA. 1999; 96:8511-8515.



- Zhang Q-L, Wang L, Zhang Y-W, et al. "The proteasome inhibitor bortezomib interacts synergistically with the histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid to induce T-leukemia/lymphoma cells apoptosis". *Leukemia*. 2009; 23:1507-1514.
- Zhang S, Ding F, Luo A, et al. "XIAP is highly expressed in esophagean cancer and its downregulation by RNAi sensitizes esophageal carcinoma cell lines to chemotherapeutics". *Cancer Biol Ther*. 2007; 6: 973-980.
- Zhao H, Yan M, Wang H, et al. "Impaired c-Jun amino terminal kinase activity and T cell differentiation in death receptor 6-deficient mice". *J Exp Med*. 2001; 194: 1441-1448.
- Zhou M, Gu L, Yeager AM, et al. "Incidence and clinical significance of CDKN2/MTS1/P16ink4A and MTS2/P15ink4B gene deletions in childhood acute lymphoblastic leukaemia". *Pediatr Hematol Oncol*. 1997; 14:141-150.
- Zhu L, Ling S, Yu XD, Venkatesh LK, et al. "Modulation of mitochondrial Ca(2+) homeostasis by Bcl-2". *J Biol Chem*. 1999; 274:33267-33273.
- Zivny J, Klener P, Pytlik R, Andera L. "The role of apoptosis in cancer development and treatment: Focusing on the development and treatment of hematologic malignancies". *Current Pharmaceutical Design*. 2010;16:11-33.
- Zong WX, Edelstein LC, Chen C, et al. "The prosurvival Bcl-2 homolog Bfl-1/A1 is a direct transcriptional target of NF- kappaB that blocks TNFalpha-induced apoptosis". *Genes Dev*. 1999; 13:382-387.

## **IX.PUBLICACIONES**

# Regulation of the expression of death receptors and their ligands by melatonin in haematological cancer cell lines and in leukaemia cells from patients

**Abstract:** Incorporation of new therapeutic agents remains as a major challenge for treatment of patients with malignant haematological disorders. Melatonin is an indolamine without relevant side effects. It has been shown previously to exhibit synergism with several chemotherapeutic drugs in Ewing sarcoma cells by potentiating the extrinsic pathway of apoptosis. It also sensitizes human glioma cells against TRAIL by increasing DR5 expression. Here, we report the induction of cell death by melatonin in several human malignant haematological cell lines through the activation of the extrinsic pathway of apoptosis. Such activation was mediated by the increase in the expression of the death receptors Fas, DR4 and DR5 and their ligands Fas L and TRAIL, with a remarkable rise in the expression of Fas and Fas L. The cytotoxic effect and the increase in Fas and Fas L were dependent on Akt activation. Results were corroborated in blasts from bone marrow and peripheral blood of acute myeloid leukaemia patients, where melatonin induced cell death and increased both Fas and Fas L expressions. We conclude that melatonin may be considered as a potential antileukaemic agent and its therapeutic use, either alone or in combination with current chemotherapeutic drugs, should be taken into consideration for further research.

**Sara Casado-Zapico<sup>1,2</sup>, Vanesa Martín<sup>1,2</sup>, Guillermo García-Santos<sup>1,2</sup>, Jezabel Rodríguez-Blanco<sup>1</sup>, Ana M. Sánchez-Sánchez<sup>1,2</sup>, Elisa Luño<sup>3</sup>, Carlos Suárez<sup>2,4</sup>, Juana M. García-Pedrero<sup>2,4</sup>, Sofía T. Menendez<sup>2,4</sup>, Isaac Antolín<sup>1</sup> and Carmen Rodríguez<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup>Departamento de Morfología y Biología Celular, Facultad de Medicina, Universidad de Oviedo, Oviedo, Spain; <sup>2</sup>Instituto Universitario de Oncología del Principado de Asturias (IUOPA), Oviedo, Spain; <sup>3</sup>Servicio de Hematología, Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo, Spain; <sup>4</sup>Servicio de Otorrinolaringología, Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo, Spain

**Key words:** apoptosis, death receptors, extrinsic pathway, leukaemia, melatonin, patients

Address reprint requests to Carmen Rodríguez, Departamento de Morfología y Biología Celular, Facultad de Medicina, c/Julian Clavería, 33006 Oviedo, Spain.  
E-mail: carro@uniovi.es.

Received October 5, 2010;  
accepted December 6, 2010.

## Introduction

Advances in chemotherapy have improved the quality and life expectancy of cancer patients in general and for malignant haematological disorders in particular. Also, increased knowledge on the pathogenesis of leukaemias has provided the base for the development of new targeted therapies, but research for the incorporation of new therapeutic agents still remains a major challenge.

Apoptosis is a type of cell death that protects multicellular organisms against cells that might become malignant. Defects in this process can result in the spread of those cells and the development of cancer. When abnormal cells appear, cytotoxic T cells and natural killer cells attack them and activate the extrinsic pathway of apoptosis soon after the activation of death receptors Fas -APO-1/CD95-, TNFR, DR4, DR5 by binding of their ligands (Fas L in the case of Fas; TNF and TRAIL). Resistance to the antitumoural properties of cytotoxic cells results in cancer

development. This resistance may be the result of several mechanisms: death receptor down-regulation, decoy receptor expression and overexpression of proteins that block death receptor-induced apoptosis. Down-regulation of Fas expression with decreased Fas signalling has been reported in tumour progression [1], and disruption of the extrinsic pathway of apoptosis has been shown in several types of cancer including haematological malignancies [2]. For this reason, the modulation of the Fas/Fas ligand system has been a strategy proposed against cancer [3, 4].

The antitumoural properties of melatonin have been studied for several years, often related to its antiproliferative effects in several types of tumours [5–8]. Additionally, induction of apoptosis by melatonin has recently been reported in several types of cancer [9, 10], including some haematological cancer cell lines [11–14]. Moreover, synergy between melatonin and several chemotherapeutic drugs in the induction of apoptosis has also been published in a cell line of the Ewing sarcoma family of tumours [15], a tumour

type where melatonin was previously reported to induce apoptosis [9]. The type of apoptosis enhanced by the combination of drugs was the extrinsic apoptosis pathway as well as the mitochondrial pathway through Bid activation. Martin et al. [16] recently reported that melatonin sensitizes glioma cells to TRAIL cytotoxic effect by increasing death receptor DR5 expression. Although there is one report that states that cell death induced by melatonin in a leukaemia cell line is mediated by the intrinsic pathway of apoptosis [14], no studies of the extrinsic pathway were actually performed.

Melatonin has been previously reported to synergize the cytotoxic effect of several drugs on cancer cells by potentiating caspase-8 activation and to sensitize cancer cells to TRAIL cytotoxic effect by increasing a death receptor expression. Our hypothesis is that melatonin could also use the same mechanism to induce its own cytotoxic effects in melatonin-sensitive cells. In this report, we present data on cell death induced by melatonin in haematological cancer cells as well as the type of cell death induced and the involvement of Fas and Fas-L expression regulation. Results were corroborated in blasts from bone marrow and peripheral blood of patients with acute myeloid leukaemia (AML).

## Material and methods

### Cell culture and reagents

Human HL-60 (AML), REH [acute lymphoid leukaemia (ALL)], and CA-46, RAMOS-1 and RAJI (Burkitt lymphoma) cell lines were purchased from DSMZ (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Braunschweig, Germany). Human K-562 (chronic myeloid leukaemia: CML) cell line was kindly donated by Dr. Ricardo Sánchez Prieto (University of Albacete). All cell lines were cultured in RPMI medium supplemented with 10% foetal bovine serum (FBS) (except for REH cell line, where 20% FBS was used) plus 1% antibiotic-antimycotic mixture containing 10,000 U penicillin, 10 mg streptomycin and 25 µg amphotericin. Cells were maintained at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. Cell culture reagents were purchased from Sigma (St Louis, MO, USA) except for FBS, which was from Gibco (Invitrogen Life Technologies, Barcelona, Spain). Culture flask and dishes were from Falcon (Becton Dickinson BioScience, Le Pont de Claix, France). Melatonin and all other reagents were purchased from Sigma, unless otherwise indicated.

### Isolation of leukaemic and normal cells

Bone marrow and peripheral blood samples from 12 patients with AML at diagnosis and peripheral blood samples from three healthy donors were obtained from Hospital Universitario Central de Asturias. All samples were collected during routine examination after obtaining informed patient consent according to protocols approved by the Institution. Research was approved by the Clinic Research Ethics Committee of the Health Institute of the Principality of Asturias. Mononuclear cells were isolated by Ficoll density-gradient centrifugation. Mononuclear leu-

kaemic cells from patients were cultured in RPMI medium supplemented with 10% FBS plus 1% antibiotic-antimycotic mixture containing 10,000 U penicillin, 10 mg streptomycin and 25 µg amphotericin. Cells were maintained at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. The experiments were conducted as described previously with a density of  $5 \times 10^4$  cells/mL.

### Evaluation of cell number and cell death

Methyl thiazol tetrazolium bromide (MTT) assay was used for the evaluation of the number of viable cells whilst the lactate dehydrogenase (LDH) assay was used to distinguish between a decrease in cell proliferation and induction of cell death. Both assays were performed as described previously [15].

### Caspase-3 activity

This assay was carried out as previously reported [15].

### Western blot

This was performed as previously reported [15]. Antibody sources and dilutions are listed in Table 1.

### Real-Time Quantitative PCR (Q-RT-PCR)

Assay was carried out as described previously [16]. The sequences of the sense and antisense primers for human DR4, DR5, TRAIL, FasR, FasL and GAPDH (as loading control) are showed in the Table 2.

### Flow cytometry analysis of intracellular free radicals

This was performed as previously reported [15].

### Statistical analysis

Experiments were repeated at least three times, and data were calculated as mean values  $\pm$  SE. Statistical analysis were carried out using one-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls test. Statistical significance was accepted when  $P < 0.001$ .

## Results

To determine whether melatonin decreases cell viability in leukaemia cells, HL-60 (AML), K-562 (CML), REH (ALL) and CA-46, RAMOS-1 and RAJI cells (Burkitt lymphoma) were treated with increasing concentrations of melatonin for 2, 3 and 6 days and viable cells were evaluated by MTT assays. Melatonin induces a dose-dependent decrease in the number of cells in all the six cell lines (Fig. 1A). To test whether the decreased cell number was attributed to cell death induction, we next measured LDH release after treatment with 1 mM melatonin for 2, 3 and 6 days. Released versus total LDH ratio showed a 50% increase after 3 days rising to near 125% after 6 days in the myeloid leukaemia cell lines; it reached 100% in the lymphoid leukaemia cell line after 6 days of treatment; and 150–200%

Table 1. Antibodies and dilutions used for Western blot

Primary antibodies	4°C 'overnight'	Secondary antibodies (peroxidase-conjugated)	RT 2 hr
Caspase-3 (CellSig.)	1:1000 5% <i>Blotto</i> TBS-T	Anti-rabbit (Calb.)	1:3000 5% <i>Blotto</i> TBS-T
Caspase-7 (CellSig.)	1:1000 5% <i>Blotto</i> TBS-T	Anti-rabbit (Calb.)	1:3000 5% <i>Blotto</i> TBS-T
Caspase-8 (Ab-3) (Calb.)	1:1000 5% <i>Blotto</i> TBS-T	Anti-mouse (Calb.)	1:3000 5% <i>Blotto</i> TBS-T
Caspase-9 (CellSig.)	1:1000 5% <i>Blotto</i> TBS-T	Anti-rabbit (Calb.)	1:3000 5% <i>Blotto</i> TBS-T
Bid (CellSig.)	1:1000 5% <i>Blotto</i> TBS-T	Anti-rabbit (Calb.)	1:3000 5% <i>Blotto</i> TBS-T
tAkt (CellSig.)	1:1000 5% <i>Blotto</i> TBS-T	Anti-rabbit (Calb.)	1:3000 5% <i>Blotto</i> TBS-T
pAkt (CellSig.)	1:1000 5% <i>Blotto</i> TBS-T	Anti-rabbit (Calb.)	1:3000 5% <i>Blotto</i> TBS-T
GAPDH (FL-335) (Sta. Cruz)	1:1000 5% <i>Blotto</i> TBS-T	Anti-mouse (Calb.)	1:3000 5% <i>Blotto</i> TBS-T

Calb.: Calbiochem, La Jolla, CA, USA; CellSig.: Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA; Sta.: Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA; RT: room temperature; TBS-T: Tris-buffered saline-Tween 20.

Table 2. Primers used for quantitative RT-PCR

Primers name	Sequence 5' → 3'
FAS-R forward	5'-AGCTTGGTCTAGAGTGAAAA-3'
FAS-R reverse	5'-GAGGCAGAATCATGAGATAT-3'
FAS-L forward	5'-CACTTTGGGATTCTTTCCAT-3'
FAS-L reverse	5'-GTGAGTTGAGGAGCTACAGA-3'
DR4 forward	5'-CGATGTGGTCAGAGCTG-GTACAGC-3'
DR4 reverse	5'-GGACACGGCAGAGCCTGTGCCATC-3'
DR5 forward	5'-GGGAGCCGCTCATGAGGAAGTTGG-3'
DR5 reverse	5'-GGCAAGTCTCTCTCCCAGCGTCTC-3'
TRAIL forward	5'-CGTGTACTTTACCAACGAGCTGA-3'
TRAIL reverse	5'-ACGGAGTTGCCACTTGACTTG-3'
GAPDH forward	5'-ATGGGGAAGGTGAAGGTCCG-3'
GAPDH reverse	5'-GACGGTGCCATGGAATTTGC-3'

after 6 days of treatment in the Burkitt cell lines (Fig. 1B). Images from light microscopy also show a reduced cell number and increased number of dead cells and cellular debris after melatonin treatment in the cell lines studied (HL-60, CA-46 and K-562) (data not shown).

Our previous results showed that melatonin induced cell death in SK-N-MC cancer cells through activation of caspases [9]. We thus evaluated the activation of caspases by 1 mM melatonin in the HL-60, CA-46 and K-562 haematological cancer cell lines. We first measured the activity of the main executor caspase, caspase 3, and we found a rise of activity in HL-60 – 185% after 48 hr; 225% after 72 hr- and CA-46 cells – 185% after 48 hr; 250% after 72 hr (Fig. 2A). K-562 cells did not present such increase; they did, however, show activation of another executor caspase, caspase 7, as evaluated by Western blot after 48 and 72 hr (Fig. 2A).

To ascertain which particular apoptotic pathway was activated by melatonin, we studied by Western blot the activation of caspase 8 and caspase 9 in the same cell lines following 24, 48 and 72 hr of melatonin treatment. Caspase 8 was active after 24 hr of treatment in all the three cell lines (Fig. 2B). Caspase 9 was also activated in all the three cell lines (Fig. 2B). As activation of caspase 9 could be mediated by the activation of the Bcl-2 family protein Bid as result of the activation of the extrinsic apoptotic pathway, activation of this protein was also evaluated by Western blot. We found a decrease in total Bid after 48 and 72 hr of treatment – supposedly because of an increase in the active form – in all the three cell lines (Fig. 2C).

Early production of reactive oxygen species (ROS) has been reported in the extrinsic apoptotic signalling pathway, and it was involved in cell death signalling after assembly of the death inducing signalling complex (DISC) [17]. To confirm that ROS are also implicated in the extrinsic pathway of apoptosis initiated in these cells after treatment with melatonin, we measured the intracellular production of peroxides by flow cytometry and an increase in ROS was found after 2–8 hr of treatment with melatonin, depending on the cell line (Fig. 2D).

To elucidate how melatonin activates the extrinsic pathway of apoptosis, we first analysed the expression of Fas, DR4 and DR5 receptors as well as their ligands (Fas-L and TRAIL) by quantitative PCR. We found an increase in all of them in all the three cell lines studied (Fig. 3A). HL-60 cells showed more than sevenfold increase in Fas-L after 24 hr of melatonin treatment, whilst they had a moderate increase in Fas, DR4, DR5 and TRAIL. Fas sixfolded in CA-46 cells after 24 hr of treatment whilst also presenting a moderate increase in Fas-L, DR4, DR5 and TRAIL. Finally, K-562 cells presented a fourfold increase in Fas and a moderate increase in Fas L and TRAIL.

To know whether the increase in death receptors and ligands was the main cause of cell death induced by melatonin in these cells, we treated all the three cell lines with the Fas neutralizing antibody clone ZB4 and the Fas L blocker clone NOK1. We found that decrease in cell death caused by melatonin was prevented by blocking Fas or Fas L in all the three cell lines (Fig. 3B).

Given that the PI3K/Akt pathway regulation has been reported to regulate Fas/Fas L expression [18, 19] and that

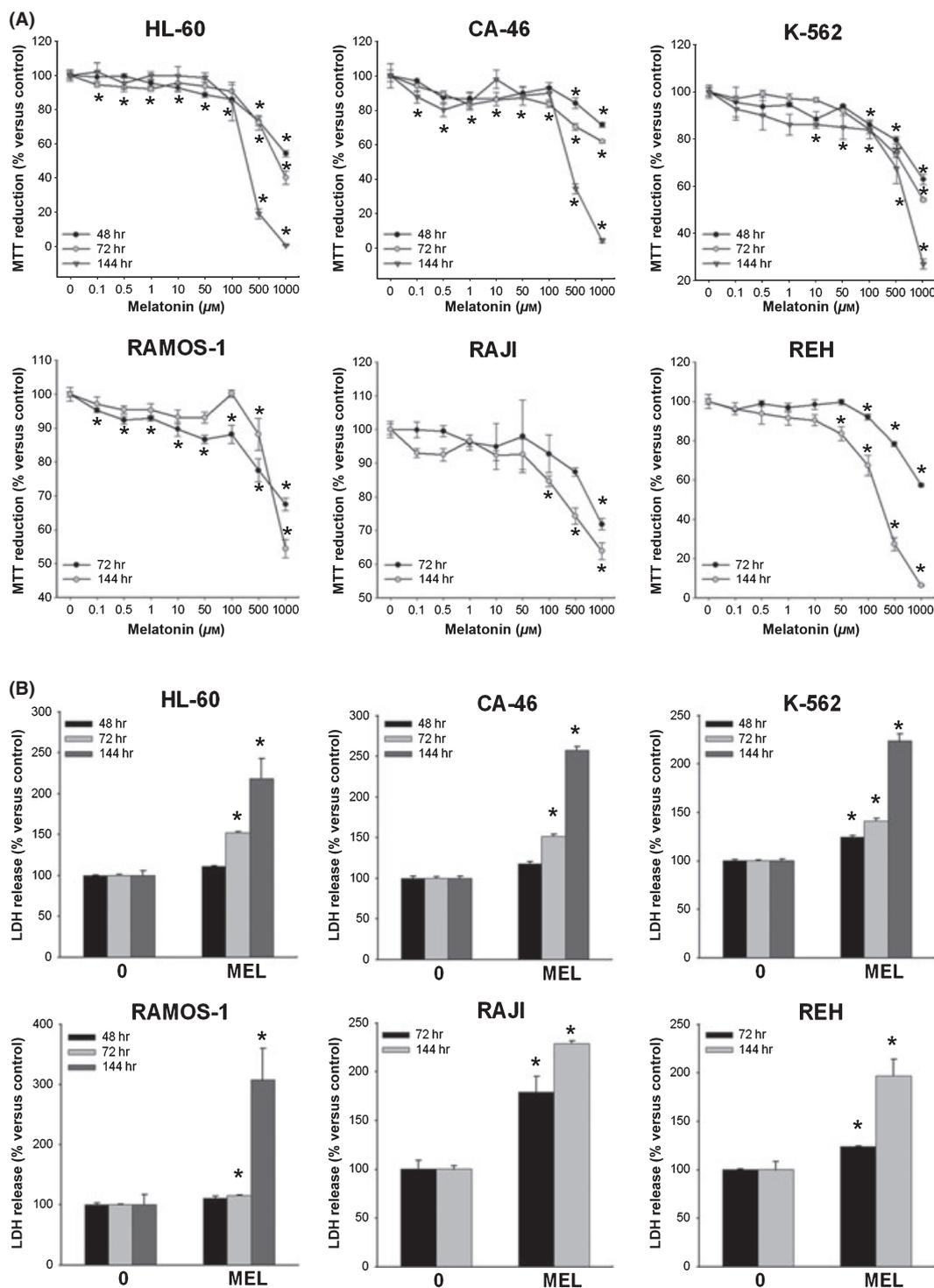


Fig. 1. Melatonin induces cell death in haematological malignant cell lines. (A) HL-60 (acute myeloid leukaemia), CA-46 (Burkitt lymphoma), K-562 (chronic myeloid leukaemia), RAMOS-1 and RAJI (Burkitt lymphoma), and REH (acute lymphoid leukaemia: ALL) cells were treated for 48, 72 or 144 hr with the indicated concentrations of melatonin. Cell number was determined by methyl thiazol tetrazolium bromide assay. Data are expressed as the per cent of control (vehicle-treated cells) values. \**P* < 0.001 versus control. (B) Cell death was determined by lactate dehydrogenase (LDH) assay in the same cell lines treated with or without 1 mM melatonin for 48, 72 or 144 hr. Cell death was calculated as the ratio between released and total LDH activity on each experimental group. Data are expressed as the per cent of control (vehicle-treated cells) values. \**P* < 0.001 versus control.

melatonin has been previously shown to regulate Akt activation [7], we studied the possible implication of this protein in the cytotoxic effect of melatonin in haematological

cancer cell lines. After 24 hr of treatment with this molecule, phosphorylated Akt – meaning Akt activation – increased in all the three cell lines studied (Fig. 4A).

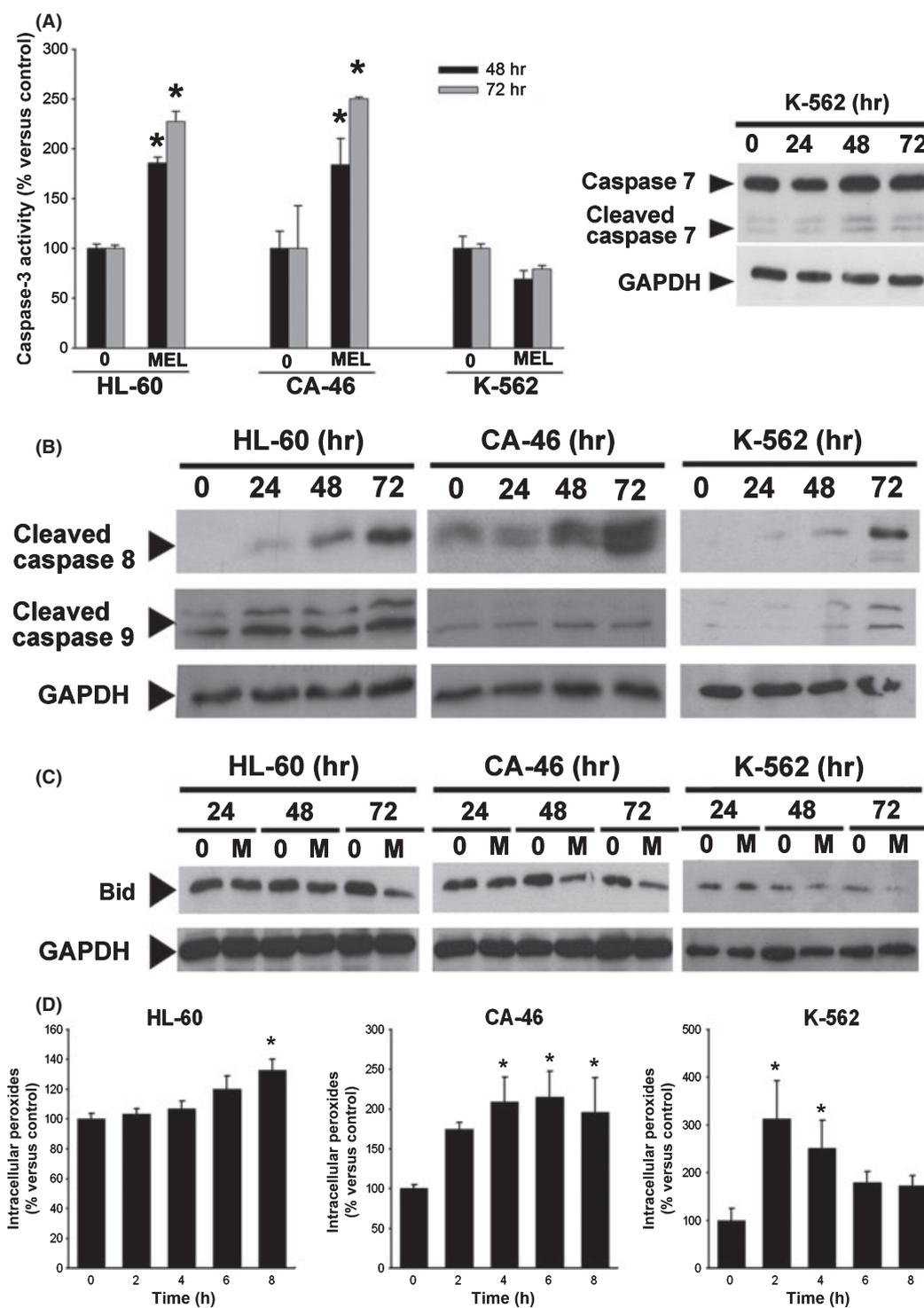
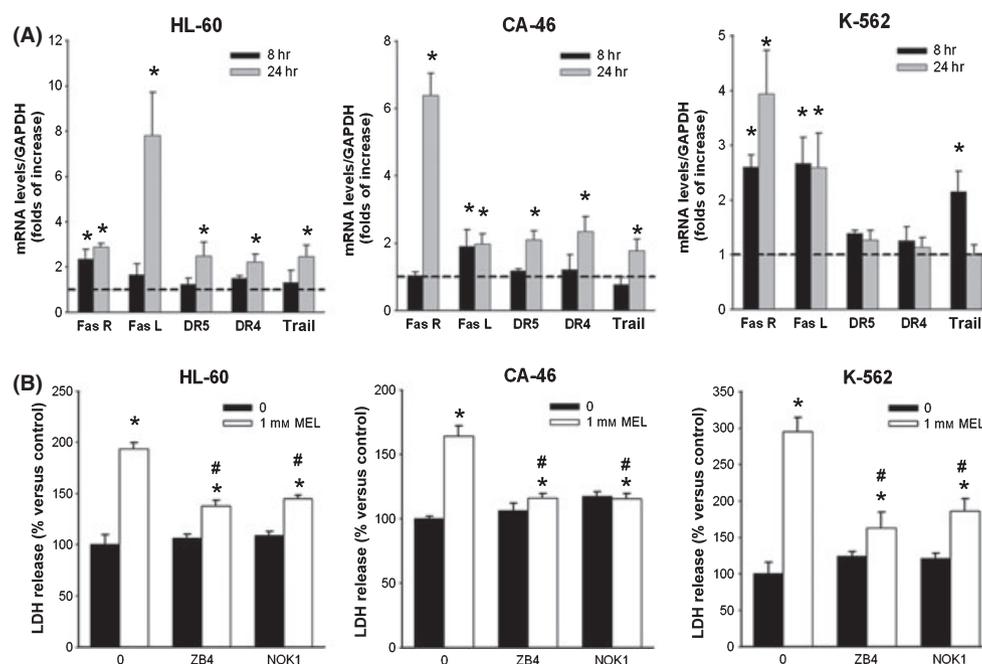


Fig. 2. Cell death induced by melatonin in haematological malignant cell lines is associated with caspases activation and reactive oxygen species increase. (A) Caspase 3 activity was measured in HL-60, CA-46 and K-562 cells treated with or without 1 mM melatonin for 48 and 72 hr. Results are represented as per cent values of the control (left panel).  $*P < 0.001$  versus control. A representative blot showing an increase in cleaved caspase 7 in K-562 cells analysed by Western blot after treatment with or without 1 mM melatonin for 24, 48 and 72 hr is showed at the right panel. GAPDH was used as loading control. (B) Activation of caspase 8 and caspase 9 was analysed by Western blot in HL-60, CA-46 and K-562 cells after treatment with or without 1 mM melatonin for 24, 48 or 72 hr. A representative blot is showed. GAPDH was used as loading control. (C) Shows a representative blot of Bid expression analysed by Western blot as indicated in the Material and Methods section in HL-60, CA-46 and K-562 cell lines after treatment with or without 1 mM melatonin for 24, 48 or 72 hr. GAPDH was used as loading control. (D) Cells were incubated with or without melatonin 1 mM for the indicated times. Intracellular oxidants were measured using the fluorescent probe DCFH-DA. Fluorescence was measured in a Beckman Coulter FC500 flow cytometer. Data are expressed as percentage versus control (nontreated cells).  $*P < 0.001$  versus control.



**Fig. 3.** Cell death induced by melatonin in haematological malignant cell lines is mediated by an increase in the expression of death receptors and their ligands. (A) HL-60, CA-46 and K-562 cells were treated with 1 mM melatonin for 8 or 24 hr. mRNA expression levels of death receptors Fas, DR5 and DR4 and their ligands Fas L and TRAIL were analysed by quantitative PCR. GAPDH was used as a house keeping gene. Relative gene expression is represented as the fold increase compared to basal (untreated: dotted line). \* $P < 0.001$  versus basal level. (B) HL-60, CA-46 and K-562 cells were cultured in the presence or absence of melatonin 1 mM with or without co-incubation with the Fas neutralizing antibody clone ZB4 or with the Fas L blocker clone NOK 1. Cell death was determined by lactate dehydrogenase (LDH) assay. Cell death was calculated by the ratio between released and total LDH activity on each experimental group. Results are expressed as the per cent of control (vehicle-treated cells) values. \* $P < 0.001$  versus control. # $P < 0.001$  versus group only treated with melatonin.

Co-treatment with the inhibitor of the PI3K/Akt pathway, wortmanin, could partially prevent cell death induced by melatonin in the three cell lines (Fig. 4B). Moreover, Fas L expression increase was also partially prevented by wortmanin in the three cell lines, whilst this molecule totally prevented the increase in Fas expression in both HL-60 and CA-46 cells. Fas expression rise in K-562 cells was prevented partially by wortmanin (Fig. 4C).

Bone marrow blasts from six patients with AML and peripheral blood blasts from another four patients with AML (Table 3) were assayed to discern whether treatment with melatonin might be also cytotoxic for patient leukaemia cells. Five of the six patients whose bone marrow was analysed were sensitive to melatonin. This molecule proved to be able to induce cell death in bone marrow cells showing an increase in released versus total LDH of between 20% and 100% after 6 days of treatment (Fig. 5A). Three of four patients whose peripheral blood was studied were also sensitive to melatonin. Released versus total LDH increased between 30% and 70% after 6 days of treatment (Fig. 5A). One patient (no. 5) was common in both types of samples analysed.

Expression of death receptors and their ligands was analysed by quantitative PCR in bone marrow from four patients, in peripheral blood from three patients and in peripheral blood from three healthy donors. We first found that blasts from peripheral blood of patients showed decreased expression of Fas L when compared to healthy

donors peripheral blood mononuclear cells (PBMC) (Fig. 5B). Although no differences were found in Fas expression (Fig. 5B), it has to be noted that Fas expression is variable and several subgroups of patients might be made considering such data. Both Fas and Fas L expressions were increased after treatment with melatonin in both bone marrow and peripheral blood blasts (Fig. 5C, left panel). Taking together all samples, a twofold increase in Fas L and a 1.4-fold increase in Fas appeared after melatonin treatment (Fig. 5C, right panel).

## Discussion

Data reported here demonstrate the cytotoxic activity of melatonin against a panel of haematological cancer cell lines. Melatonin's cytotoxic effects were attributed to the activation of the extrinsic pathway of apoptosis, which was dependent on the regulation of death receptors and the expression of their ligands by the indole. Melatonin also induced cell death in haematological cancer cells obtained from the peripheral blood and bone marrow of patients with AML. Blasts from patients with AML showed decreased expression of Fas L and variable expression of Fas when compared to PBMC from healthy donors. Cytotoxic effect of melatonin in patient cells was also accompanied by an increase in Fas and Fas L expression.

Haematological malignancies frequently show defective apoptosis and down-regulation of death receptors [20–22].

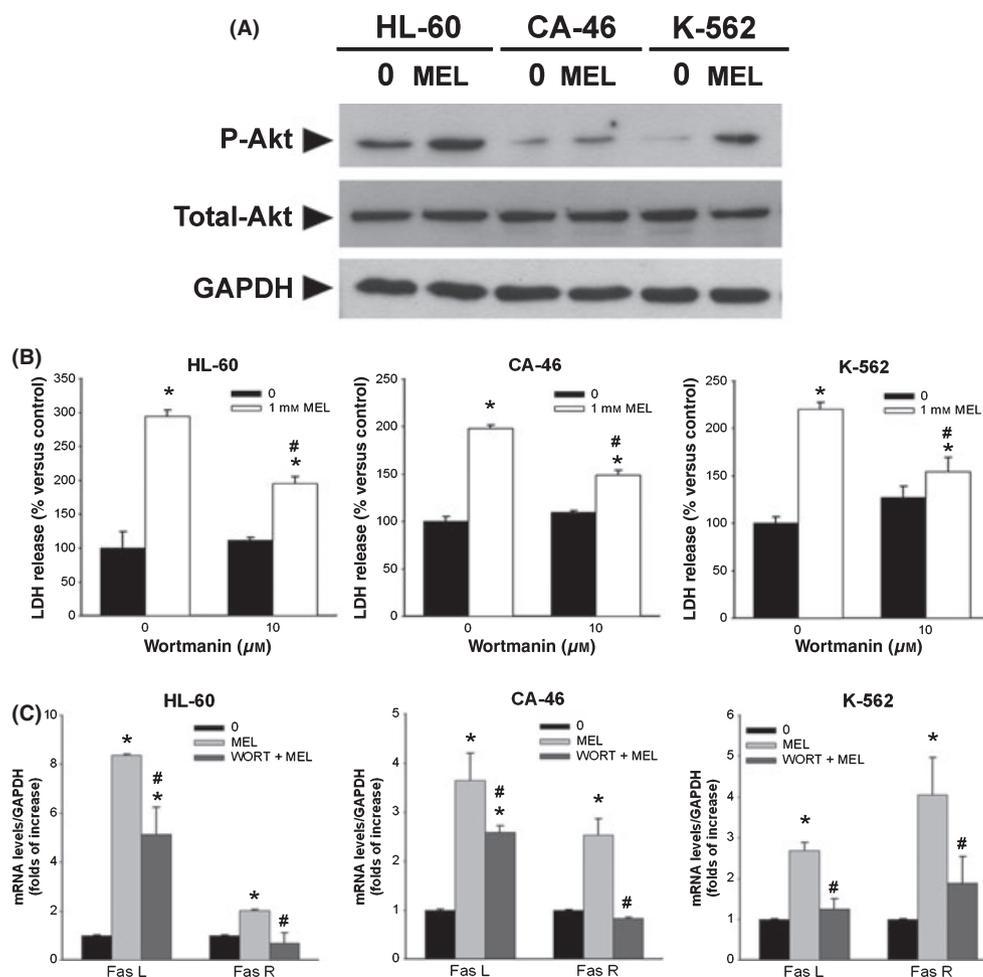


Fig. 4. Cell death and Fas/Fas L increase induced by melatonin in haematological malignant cell lines are mediated by an increase in Akt activation. (A) Akt phosphorylation (meaning activation) was analysed by Western blot in HL-60, CA-46 and K-562 cells after treatment with 1 mM melatonin for 24 hr using antibodies against both phosphorylated and total Akt. GAPDH was used as a loading control protein. (B) The same cell lines were cultured during 72 hr in the presence or absence of 1 mM melatonin with or without co-incubation with the inhibitor of PI3K Wortmanin (10 μM). Cell death was determined by lactate dehydrogenase assay. \**P* < 0.001 versus control. #*P* < 0.001 versus group only treated with melatonin. (C) Cells were cultured for 24 hr in the presence or absence of melatonin with or without co-incubation with wortmanin 10 μM. Fas and Fas L mRNA expression levels were analysed by quantitative PCR. Relative gene expression is represented as the fold increase compared to basal level (untreated: black bar). \**P* < 0.001 versus control. #*P* < 0.001 versus group only treated with melatonin.

Table 3. Clinical information about patients with acute myeloid leukaemia

Patient no.	Sex	Age	Sample	Type
4	Female	75	BM	M2
5	Female	57	PB and BM	M5
6	Female	88	BM	M2
7	Female	73	BM	
8	Male	47	BM	M4
10	Female	54	PB	
12	Female	26	PB	
13	Male	54	BM	
14	Male	8	PB	

PB, peripheral blood; BM, bone marrow.

The extrinsic pathway of apoptosis is involved in cell death induced by several cytotoxic drugs used in chemotherapy in different types of cancer including haematological tumours.

Several anticancer drugs with different intracellular targets, such as doxorubicin, etoposide or cisplatin, have been shown to increase the expression of the Fas/FasL system that activates the death receptor pathway [23–25]. According to this, disruption of apoptotic death receptor signalling pathway has been shown to lead to lymphoproliferative disorders [26] and to predict resistance to chemotherapy in patients with AML [21]. Targeting death receptor pathway of apoptosis in cancer cells was an attractive strategy proposed by Ashkenazi [27]; however, toxicity of Fas L or TNF α administration made it impractical [4]. Different approaches to targeting the Fas/Fas L system have been investigated since then. It has been shown that apicidin – a histone deacetylase inhibitor – could increase Fas/Fas L expression and induce apoptosis in AML cells [28]; and also arachidonic acid upregulates Fas and Fas L in the U937 leukaemia cell line, being also cytotoxic [29]. Inhibitors of the PI3K/Akt pathway have been found to increase Fas-

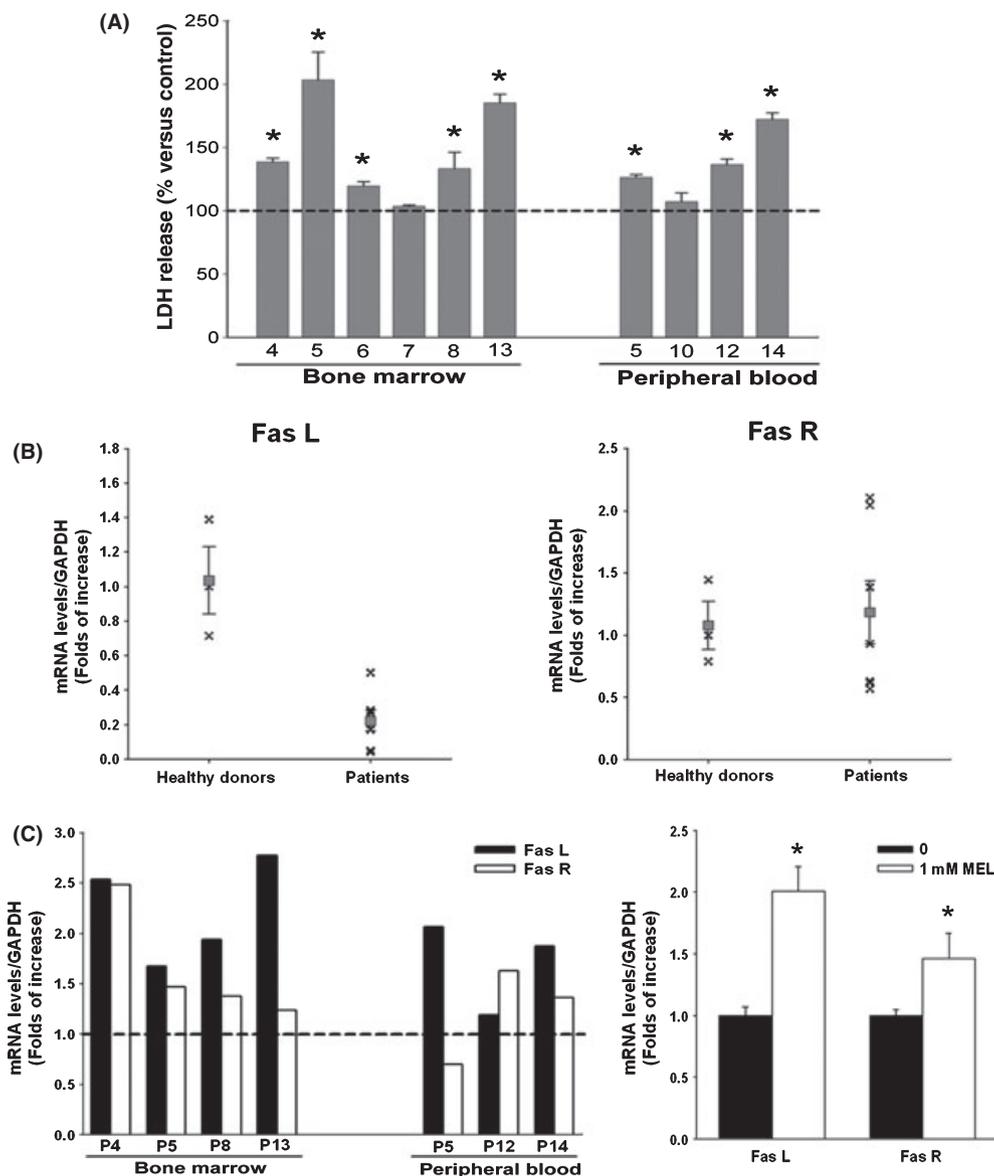


Fig. 5. Melatonin induces cell death and increase in Fas and Fas L expression in blasts from patients with acute myeloid leukaemia (AML). (A) Blasts obtained from bone marrow and peripheral blood of patients with AML were treated with 1 mM melatonin for 6 days. Cell death was determined by lactate dehydrogenase (LDH) assay and calculated as the ratio between released and total LDH activity on each experimental group. Data are expressed as the per cent of control (nontreated cells) values. \* $P < 0.001$  versus control (vehicle-treated cells; dotted line). (B) Fas and Fas L mRNA expression levels were analysed by quantitative PCR in peripheral blood mononuclear cells from three healthy donors and seven patients. Relative gene expression is represented as the fold increase compared to basal level (healthy donors). X: individual data; : media of all individual on each group. (C) Blasts from bone marrow and peripheral blood of patients with AML were treated with or without melatonin 1 mM for 24 hr and Fas and Fas L mRNA expression levels were analysed by quantitative PCR. Relative gene expression (left panel) is represented as the fold increase compared to basal level (untreated; dotted line). \* $P < 0.001$  versus basal level. The mean values of all samples were calculated for mRNA expression levels of both Fas and Fas L. Results are showed in the right panel.

Fas L induced apoptosis in ALL [30]. Melatonin has been studied for a long time because of its cytostatic properties in a wide spectrum of tumours. This indole, however, has never been found to induce cell death or toxicity either in normal or in most of the cancer cells studied, with a rare exception on tumours from the Ewing sarcoma family of tumours and on some leukaemia cell lines [11–14]. Therefore, its lack of toxicity for normal cells makes this molecule potentially useful in the treatment of sensitive tumours.

In this work, we describe how melatonin induces apoptosis through the extrinsic pathway in several haematological cancer cell lines. The intrinsic pathway of apoptosis is also activated, although to a lesser extent and likely due to the activation of the Bcl-2 family protein Bid found after the activation of the extrinsic pathway. We had previously shown that melatonin exhibited synergism with several chemotherapeutic drugs in a cell line of the Ewing sarcoma family of tumours [15]. This report showed that

such synergism was the result of the potentiation of the extrinsic pathway of apoptosis. On the other hand, melatonin sensitizes human glioma cells to TRAIL and also increases the expression of the death receptor DR4 [16]. In the present paper, we report the ability of melatonin to regulate death receptors and their ligands in several haematological cancer cell lines. Melatonin increased the death receptors (Fas, DR4 and DR5) and their ligands (Fas L and TRAIL) when analysed in all of the three cell lines studied, although a greater increase in Fas L was found in HL-60 cells and a higher elevation of Fas was found in K-562 cells. This is in agreement with results of Dicker et al. [31], who showed a synergistic effect of the expression of Fas and DR5 receptors inducing apoptosis in chronic lymphoid leukaemia (CLL). Death receptor and ligand regulation is a key mechanism for apoptosis induced by melatonin in leukaemia cells, because treatment with blocking antibodies prevents such cell death.

Activation of the PI3K/Akt pathway has been shown to play an important role in haematological malignancies of both myeloid [32] and lymphoid [33] type. Although inhibitors of this pathway such as perifosine have been shown to induce apoptosis in lymphoid leukaemias [34], the Akt inhibitor GSK 690693 was not effective inducing apoptosis in myeloid cell lines [35], suggesting that different cellular signalling may be involved. Antiproliferative effects of melatonin showed in glioma cells were mediated by a decrease in Akt phosphorylation [7]. Nevertheless, results showed here reveal an increase in Akt activation in the cell lines studied. This increase was important for both melatonin-induced cytotoxicity and Fas/Fas L expression regulation. The pro-apoptotic role of Akt has been previously reported in other cell types after Fas activation [19], whilst Akt activation has been shown to increase Fas expression [18, 19]. Our results show an important role for Akt activation in apoptosis induced by melatonin in haematological malignant cell lines and are in support of an alternative pro-apoptotic role for Akt depending on the cell type. Discrepancies with the results reported in glioma cells for melatonin may be related to the oxidative status of the cells. Melatonin has been shown to possess antioxidant properties [36–38]. Inhibition of Akt by this indolamine in glioma cells was mediated by the decrease in intracellular ROS [7], whilst we found that the cell lines studied here show a transitional increase in ROS after melatonin treatment consistent with the induction of the extrinsic pathway of apoptosis already reported by others [17]. These data are in agreement with that reported by Lu et al. [19], who also found an increase in ROS prior to the activation of Akt whilst antioxidants inhibited Akt signalling.

Fas expression is decreased in ALL and variable in CLL and AML blasts from bone marrow and peripheral blood of patients [39–41]. In support of the importance of such data, it has been shown that (i) low Fas expression is a predictor for poor prognosis in both AML and ALL [22, 42], (ii) children with newly diagnosed ALL who present Fas L expression show higher relapse-free and overall survival than those who were Fas L negative [43], (iii) relapse-free survival also correlates with Fas, DR4- and DR5-positive cells in patients with AML [44], and (iv)

expression of several death receptors, such as Fas and DR5, have synergistic effect inducing apoptosis in leukaemia cells [31]. Indeed, altered Fas gene expression because of variation in the Fas gene promoter modulates apoptosis signalling and increases the risk of AML [45]. Our results in haematological cancer cell lines were corroborated in peripheral blood and bone marrow of patients with AML. Melatonin also induces cell death in haematological cancer cells obtained from both samples of these patients. Such blasts showed decreased levels of Fas L and variable levels of Fas when compared with PBMC from healthy donors in agreement to previous reports by Li et al. [39]. Melatonin also increases Fas and Fas L expression in these haematological cancer cells.

Given that melatonin has the ability to increase both Fas and Fas L in haematological cancer cells and considering that this increase is an important factor in the induction of its cytotoxic effect, we conclude that this molecule deserves further assessment to determine the relevance of its effects *in vivo* and in human patients. These studies must consider both the effects of melatonin alone or in combination with other drugs, standard or investigational, because its synergism with other chemotherapeutic drugs by activating the extrinsic pathway of apoptosis has been previously shown in other cancer types. Finally, its use as a strategy to reveal differences between tumours in the regulation of Fas and Fas L expression would pave the way to finding new therapeutic targets. Certainly, the fact that melatonin does not induce cell death but inhibition of cancer cell growth in most of the tumours, makes it strategically important to study the difference between melatonin-sensitive and melatonin-resistant cancer cells.

## Acknowledgements

We thank Marina Gómez Lobo for her excellent technical assistance. Authors acknowledge Dr. Hans G Drexler from the Bereichsleiter Menschliche und Tierische Zellkulturen DSMZ for his helpful comments on particular requirements for cell culture of some cell types. This work was supported by a MEC (SAF2007-64726) and a FIS (PI061803) grants to C. R.; and by the Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) (RD06/0020/1042 and RD06/0020/0034 – Red Temática de Investigación Cooperativa en Cáncer- grants to C.R. and C.S.). S.C.-Z. was supported by a FIS fellowship (FI07-00094); J.R.-B. was supported by a FICYT fellowship (BP06-161); G.G.-S. was supported by IUOPA; A.S.-S. acknowledges a fellowship from the University of Oviedo and previous support by FICYT (COF08-35 and COF08-39); S.T.M. is the recipient of a fellowship from FICYT (BP08-007); V.M. acknowledges support by Juan de la Cierva Program from the Minister of Science and Education (MEC).

## References

1. OWEN-SCHAUB L. Soluble Fas and Cancer. *Clin Cancer Res* 2001; 7:1108–1109.
2. DEBATIN KM, STANNHKE K, FULDA S. Apoptosis in haematological disorders. *Semin Cancer Biol* 2003; 13:149–158.

3. O'BRIEN DI, NALLY K, KELLY RG et al. Targeting the Fas/Fas ligand pathway in cancer. *Expert Opin Ther Targets* 2005; **9**:1031–1044.
4. FULDA S, DEBATIN KM. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathway in anticancer chemotherapy. *Oncogene* 2006; **25**:4798–4811.
5. HILL SM, BLASK DE. Effects of the pineal hormone melatonin on the proliferation and morphological characteristics of human breast cancer cells (MCF-7) in culture. *Cancer Res* 1988; **48**:6121–6126.
6. BLASK DE, SAUER LA, DAUCHY RT et al. Melatonin inhibition of cancer growth in vivo involves suppression of tumor fatty acid metabolism via melatonin receptor-mediated signal transduction events. *Cancer Res* 1999; **59**:4693–4701.
7. MARTIN V, HERRERA F, CARRERA-GONZALEZ P et al. Intracellular signalling pathways involved in the cell growth inhibition of glioma cells by melatonin. *Cancer Res* 2006; **66**:1–8.
8. SHIU SY, PANG B, TAM CW, YAO KM. Signal transduction of receptor-mediated antiproliferative action of melatonin on human prostate epithelial cells involves dual activation of G $\alpha$ (s) and G $\alpha$ (q) proteins. *J Pineal Res* 2010; **49**:301–311.
9. GARCÍA-SANTOS G, ANTOLIN I, HERRERA F et al. Melatonin induces apoptosis in human neuroblastoma cancer cells. *J Pineal Res* 2006; **41**:130–135.
10. LEJA-SZPAK A, JAWOREK J, PIERZCHALSKI P, REITER RJ. Melatonin induces pro-apoptotic signaling pathway in human pancreatic carcinoma cells (PANC-1). *J Pineal Res* 2010; **49**:248–255.
11. TRUBIANI O, RECCHIONI R, MORONI F et al. Melatonin provokes cell death in human B-lymphoma cells by mitochondrial-dependent apoptotic pathway activation. *J Pineal Res* 2005; **39**:425–431.
12. BUYUKAVCI M, OZDEMIR O, BACK S et al. Melatonin cytotoxicity in human leukemia cells: relation with its pro-oxidant effect. *Fundam Clin Pharmacol* 2005; **20**:73–79.
13. RUBIO S, ESTÉVEZ F, CABRERA J et al. Inhibition of proliferation and induction of apoptosis by melatonin in human myeloid HL-60 cells. *J Pineal Res* 2007; **42**:131–138.
14. BEJARANO I, REDONDO PC, ESPINO J et al. Melatonin induces mitochondrial-mediated apoptosis in human myeloid HL-60 cells. *J Pineal Res* 2009; **46**:392–400.
15. CASADO-ZAPICO S, RODRIGUEZ-BLANCO J, GARCÍA-SANTOS G et al. Synergistic antitumor effect of melatonin with several chemotherapeutic drugs on human Ewing sarcoma cancer cells: potentiation of the extrinsic apoptotic pathway. *J Pineal Res* 2010; **48**:72–80.
16. MARTIN V, GARCÍA-SANTOS G, RODRIGUEZ-BLANCO J et al. Melatonin sensitizes human malignant glioma cells against TRAIL-induced cell death. *Cancer Lett* 2010; **287**:216–223.
17. SHEN HM, PERVAIZ S. TNF receptor superfamily-induced cell death: redox-dependent execution. *FASEB J* 2006; **20**:1589–1598.
18. IVANOV VN, KRASILNIKOV M, RONAI Z. Regulation of Fas expression by STAT3 and c-jun is mediated by phosphatidylinositol 3-kinase-AKT signaling. *J Biol Chem* 2002; **277**:4932–4944.
19. LU B, WANG L, STEHLIK C et al. Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt positively regulates Fas (CD95)-mediated apoptosis in epidermal C141 cells. *J Immunol* 2006; **176**:6785–6793.
20. FRIESEN C, FULDA S, DEBATIN KM. Deficient activation of the CD95 (APO-1/Fas) system in drug-resistant cells. *Leukemia* 1997; **11**:1833–1841.
21. TOURNEUR L, DELLUC S, LEVY V et al. Absence or low expression of fas-associated protein with death domain in acute myeloid leukaemia cells predicts resistance to chemotherapy and poor outcome. *Cancer Res* 2004; **64**:8101–8108.
22. SUMINOE A, MATSUZAKI A, HATTORI H et al. mRNA expression of apoptosis-associated genes in infant acute lymphoblastic leukaemia: low Fas expression is an independent predictor for poor prognosis. *Leukemia* 2004; **18**:365–368.
23. FRIESEN C, HERR I, KRAMMER PH, DEBATIN KM. Involvement of the CD95 (APO-1/FAS) receptor/ligand system in drug-induced apoptosis in leukaemia cells. *Nat Med* 1996; **2**:574–577.
24. MICHEAU O, SOLARY E, HAMMANN A et al. Sensitization of cancer cells treated with cytotoxic drugs to Fas-mediated cytotoxicity. *J Nat Cancer Inst* 1997; **89**:783–789.
25. FULDA S, SCAFFIDI C, PIETSCH T et al. Activation of the CD95 (APO-1/Fas) pathway in drug- and gamma-irradiation-induced apoptosis of brain tumor cells. *Cell Death Differ* 1998; **5**:884–893.
26. TAKAHASHI T, TANAKA M, BRANNAN CI et al. Generalized lymphoproliferative disease in mice, caused by a point mutation in the Fas ligand. *Cell* 1994; **76**:969–976.
27. ASHKENAZI A. Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily. *Nat Rev Cancer* 2002; **2**:420–430.
28. KWON SH, AHN SH, KIM YK et al. Apicidin, a histone deacetylase inhibitor, induces apoptosis and Fas/Fas L expression in human acute promyelocytic leukaemia cells. *J Biol Chem* 2002; **277**:2073–2080.
29. LIU WH, CHANG LS. Arachidonic acid induces Fas and Fas L upregulation in human leukaemia U937 cells via Ca<sup>2+</sup>/ROS-mediated suppression of ERK/c-Fos pathway and activation of p38MAPK/ATF-2 pathway. *Toxicol Lett* 2009; **191**:140–148.
30. CHIARINI F, DEL SOLE M, MONGIORGI S et al. The novel Akt inhibitor, perifosine, induces caspase-dependent apoptosis and downregulates P-glycoprotein expression in multidrug-resistant human T-acute leukaemia cells by a JNK-dependent mechanism. *Leukemia* 2008; **22**:1106–1116.
31. DICKER F, KATER AP, FUKUDA T, KIPPS TJ. Fas-ligand (CD178) and TRAIL synergistically induce apoptosis of CD40-activated chronic lymphocytic leukaemia B cells. *Blood* 2005; **105**:3193–3198.
32. XU Q, SIMPSON SE, SCIALLA TJ et al. Survival of acute myeloid leukaemia cells requires PI3 kinase activation. *Blood* 2003; **102**:972–980.
33. PALOMERO T, SULIS ML, CORTINA M et al. Mutational loss of PTEN induces resistance to NOTCH1 inhibition in T-cell leukaemia. *Nat Med* 2007; **13**:1203–1210.
34. NYAKERN M, CAPPELLINI A, MANTOVANI I, MARTELLI AM. Synergistic induction of apoptosis in human leukaemia T cells by the Akt inhibitor perifosine and etoposide through activation of intrinsic and Fas-mediated extrinsic cell death pathways. *Mol Cancer Ther* 2006; **5**:1559–1570.
35. LEVY DS, KAHANA JA, KUMAR R. Akt inhibitor GSK690693 induces growth inhibition and apoptosis in acute lymphoblastic leukaemia cell lines. *Blood* 2009; **113**:1723–1729.
36. REITER RJ. Oxidative damage in the central nervous system: protection by melatonin. *Prog Neurobiol* 1998; **56**:359–384.
37. TAN DX, CHEN LD, POEGGELER B et al. Melatonin: a potent hydroxyl radical scavenger. *Endocrine J* 1993; **1**:57–60.

38. GITTO E, PELLEGRINO S, GITTO P et al. Oxidative stress of the newborn in the pre- and postnatal period and the clinical utility of melatonin. *J Pineal Res* 2009; **46**:128–139.
39. LI Q, TSURUDA K, SUGAHARA K et al. Qualitative and quantitative characterization of Fas (CD95) expression and its role in primary human acute leukaemia cells. *Leuk Res* 2000; **24**:437–444.
40. ROUE G, LANCY L, DUQUESNE F et al. Upstream mediators of the Fas apoptotic transduction pathway are defective in B-chronic lymphocytic leukaemia. *Leuk Res* 2001; **25**:967–980.
41. WOOD CM, GOODMAN PA, VASSILEV AO, UCKUN FM. CD95 (APO-1/FAS) deficiency in infant acute lymphoblastic leukaemia: detection of novel soluble Fas splice variants. *Eur J Haematol* 2003; **70**:156–171.
42. MATA JF, SILVEIRA VS, MATEO EC et al. Low mRNA expression of the apoptosis-related genes CASP3, CASP8 and FAS is associated with low induction treatment response in childhood acute lymphoblastic leukaemia (ALL). *Pediatr Blood Cancer* 2010; **55**:100–107.
43. VOLM M, ZINTI F, SAUERBREY A, KOOMAGI R. Expression of Fas ligand in newly diagnosed childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Anticancer Res* 1999; **19**:3399–3402.
44. MIN YJ, LEE JH, CHOI SJ et al. Prognostic significance of Fas (CD95) and TRAIL receptors (DR4/DR5) expression in acute myelogenous leukaemia. *Leuk Res* 2004; **28**:359–365.
45. SIBLEY K, ROLLINSON S, ALLAN JM et al. Functional FAS promoter polymorphisms are associated with increased risk of acute myeloid leukaemia. *Cancer Res* 2003; **63**:4327–4330.

## Synergistic antitumor effect of melatonin with several chemotherapeutic drugs on human Ewing sarcoma cancer cells: potentiation of the extrinsic apoptotic pathway

**Abstract:** Ewing sarcoma, the second most frequent bone cancer type, affects mainly adolescents, who have a survival of 50% 5 yr after diagnosis. Current treatments include a combination of surgery, radiotherapy and chemotherapy, which present potential serious side effects. Melatonin, a natural molecule without relevant side effects, has been previously shown to induce cytotoxicity in SK-N-MC cells, a Ewing sarcoma cell line. Here, we found that there is a synergy in the antitumor effect when melatonin (50  $\mu\text{M}$ –1 mM) is combined with vincristine at the concentration of 5–10 nM or with ifosfamide at the range of 100  $\mu\text{M}$ –1 mM. This synergism is due to the potentiation of cell death, particularly to the potentiation of apoptosis, i.e., mainly the extrinsic apoptotic pathway. There is a significant increase in the activation of caspase-3, -8, -9 and Bid when melatonin is combined with vincristine or ifosfamide compared to the individual treatments. Finally, there is also a potentiation of the early free radical production, likely dependent on the extrinsic apoptosis pathway activation, when the drugs are combined with melatonin. Other proteins which are related to this pathway including mitogen-activated protein kinase or protein kinase B/Akt are not involved in apoptosis induced by these agents separately or when combined. The results shown here together with the facts that: (i) no relevant side effects have been reported for melatonin and (ii) melatonin has a cytoprotective effect on noncancer cells, opens the door for a new approach in the treatment of the Ewing sarcoma family of tumors.

**Sara Casado-Zapico<sup>1,2</sup>, Jezabel Rodríguez-Blanco<sup>2</sup>, Guillermo García-Santos<sup>1,2</sup>, Vanesa Martín<sup>1,2</sup>, Ana M. Sánchez-Sánchez<sup>2</sup>, Isaac Antolín<sup>2</sup> and Carmen Rodríguez<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup>Instituto Universitario de Oncología del Principado de Asturias (IUOPA), c/Julian Clavería, Oviedo, Spain; <sup>2</sup>Departamento de Morfología y Biología Celular, Facultad de Medicina, c/Julian Clavería, Oviedo, Spain

**Key words:** apoptosis, chemotherapy, Ewing sarcoma, melatonin

Address reprint requests to Carmen Rodríguez, Departamento de Morfología y Biología Celular, Facultad de Medicina, c/Julian Clavería, 33006 Oviedo, Spain.  
E-mail: carro@uniovi.es

Received August 19, 2009;  
accepted October 23, 2009.

### Introduction

The Ewing sarcoma family of tumors (ESFT) consists of a group of neoplasias with different degrees of differentiation and multiple phenotypic expressions, which have in common the shared expression of a chimeric protein product of the gene fusion EWS-FLI1 (or other FLI1 closely related genes of the ETS family) [1]. They include Ewing sarcoma, primitive neuroectodermal tumors or Askin tumor among others. Ewing sarcoma is the second most prevalent bone cancer type, with near 300 new cases diagnosed per year in the United States [2]. It appears mainly in childhood and adolescence with a 50% survival 5 yr after diagnosis. Current management of these tumors includes a combination of surgery, radiotherapy and chemotherapy. Protocols in the United States generally alternate courses of vincristine, cyclophosphamide, and doxorubicin with courses of ifosfamide and etoposide [3], while European protocols generally combine vincristine, doxorubicin and an alkylating agent with or without etoposide in a single treatment cycle [4]. These agents have potentially serious side effects

including neurotoxicity in the case of vincristine [5], hematological side effects in the case of ifosfamide or etoposide [6, 7], or cardiotoxicity in the case of doxorubicin [8]. One approach to overcome these limitations is the use of other combinations of agents to achieve a synergistic antitumoral action greater than the administration of the single agents alone.

We have reported some years ago that melatonin induces apoptosis in the SK-N-MC cancer cell line [9]. This line is currently considered to be an ESFT tumor cell line as it shows the gene fusion EWS/FLI1. Melatonin induces apoptosis in these and other ESFT cancer cells through the extrinsic apoptotic pathway, inducing the activation of Jun kinase (JNK), extracellular signal-regulated kinase (ERK) and the transcription factor NF $\kappa$ B (García-Santos G, Rodríguez-Blanco J, Herrera F, Antolín I, Martín V, Casado-Zapico S, Rodríguez C, unpublished observations). Melatonin is a natural compound that is produced in the pineal gland [10]. It was first known to regulate circadian rhythms, although its presence in every living organisms studied – including the unicells [11] – may explain the

discovery during the last 20 yr of several additional effects [12, 13]. One of the most remarkable findings is the antitumoral action of melatonin usually described as its antiproliferative effects [14, 15]. There are however a several publications reporting the proapoptotic effect of melatonin in some particular cancer cell lines mainly of Ewing sarcoma [9] and hematological cancers [16]. On the other hand, melatonin has been shown to protect normal cells from a variety of insults [17–19], in particular it is highly effective as a neuroprotector against toxin exposure [20, 21]. Melatonin has few relevant side effects even when high concentrations of this molecule are given to animals or humans [22, 23]. On the contrary, many studies have described melatonin's ability to reduce the side effects of chemotherapeutic drugs in animals and patients [13, 24].

Our hypothesis was that the combination of melatonin with cytotoxic drugs used in the treatment would synergistically kill Ewing sarcoma cancer cells, therefore allowing the use of lower doses of the cytotoxic drug. This reduction, together with the reported cytoprotective effects of melatonin in normal cells, would minimize the side effects of the protocols currently used in the treatment of this cancer.

## Material and methods

### Cell culture and reagents

Ewing Sarcoma cell line (SK-N-MC) (from the European Collection of Cell Cultures – EACC – Salisbury, United Kingdom) was cultured in Eagle's minimal essential medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) plus 110  $\mu\text{g}/\text{mL}$  piruvate and 1% antibiotic–antimycotic mixture containing 10,000 U penicillin, 10 mg streptomycin and 25  $\mu\text{g}$  amphotericin. Cells were maintained at 37°C in a 5%  $\text{CO}_2$  atmosphere. Cell culture reagents were from Sigma (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA), except for FBS, which was purchased from GIBCO (Invitrogen Life Technologies, Barcelona, Spain). Culture flasks and dishes were acquired from Falcon (Becton Dickinson BioScience, Le Pont de Claix, France). Melatonin, vincristine, ifosfamide and etoposide were from Aldrich (Sigma Aldrich, Milwaukee, WI, USA). All other reagents were purchased from Sigma (Sigma Chemical Co.), unless otherwise indicated.

### MTT assay

3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) is converted to formazan in living cells. To carry out the MTT assay, the method described by Denizot was followed [25]. Basically, cells were plated on 96-well plates at a density of  $2 \times 10^5$  cells/mL in a final volume of 100  $\mu\text{L}$  of complete medium. Once the treatments were completed, 10  $\mu\text{L}$  of a MTT solution in phosphate buffered saline (PBS; 5 mg/mL) was added. After 4 hr of incubation at 37°C, one volume of the lysis solution [sodium dodecyl sulfate (SDS) 20% and dimethylformamide pH 4.7, 50%] was added. The mixture was incubated at 37°C overnight and the samples were measured in an automatic microplate reader ( $\mu\text{Quant}$ ; Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA) at the wavelength of 570 nm.

### Lactate dehydrogenase release assay

Lactate dehydrogenase (LDH) is released into the incubation medium when cellular membranes are damaged. For LDH release assay, cells were plated on 24-well plates at a density of  $2 \times 10^5$  cells/mL in a final volume of 600  $\mu\text{L}$  of complete medium. After treatments, determination of total and released LDH activity was undertaken following specifications of In Vitro Toxicology Assay Kit LDH based Tox-7 (Sigma-Aldrich Co.). Absorbance at 490 nm was determined in an automatic microplate reader ( $\mu\text{Quant}$ ; Bio-Tek Instruments, Inc.). Cell viability is represented by ratio between released and total LDH activity on each experimental group and cell number is represented by percentage of total LDH activity versus the control group.

### Evaluation of combined drug effect

For evaluating the effects of melatonin plus chemotherapeutic drugs combinations, data from MTT assays were analyzed according to the Chou–Talalay method [26, 27]. Dose–response curves were performed for melatonin and each of the chemotherapeutic drugs (vincristine, ifosfamide and etoposide) and fitted to Chou–Talalay lines. IC50 values (dose that causes 50% of the cells to be affected, i.e., 50% survival) were calculated for each drug. Then, chemotherapy agents and melatonin were added in combinations, with each dose in each experiment plated administered at least in triplicate, and each experiment performed three times. After fitting the combined dose–response curve from a single representative experiment to a Chou–Talalay line, Chou–Talalay combination indices (CIs) were calculated. Levels of interaction are defined as follows: CI > 1.1 indicates antagonism, CI between 0.9 and 1.1 indicates additivity, and CI < 0.9 indicates synergy.

### Caspase-3 activity

Cells were seeded in 60-mm plates at a density of  $2 \times 10^5$  cells/mL in a final volume of 4 mL of complete medium. After treatment, the cells were by trypsinization. To measure the activation of caspase-3, the fluorometric caspase-3 assay kit (Sigma Chemical Co.) was used following the recommendations of the manufacturer. After 2-hr incubation of the reaction mixture at room temperature in darkness, samples were analyzed in a microplate fluorimeter FLX-800 (Bio-Tek Instruments, Inc.) at an excitation wavelength of 360 nm and an emission wavelength of 460 nm.

### Flow cytometry analysis of intracellular peroxides

Intracellular production of peroxides was evaluated by using the fluorescent probe 6-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) following a modification of the method described by Bass et al. [28]. When it enters cells, this molecule leads to the fluorescence compound 2',7'-dichlorodihydrofluorescein upon oxidation by peroxides. Cells were seeded in 6-well plates at a density of  $2 \times 10^5$  cells/mL in a final volume of 3 mL of complete medium. Once the treatments were completed, cells were

incubated with 10  $\mu\text{M}$  DCFH-DA in serum free medium during 20 min at 37°C in the dark. Afterwards, pellets were resuspended in 500  $\mu\text{L}$  of PBS and 10  $\mu\text{L}$  of a 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  propidium iodide solution was added to each tube and incubated 10 min at room temperature in the dark. After shaking, DCF fluorescence of 10,000 alive cells per group (cells without propidium iodide uptake) was measured in a Beckman Coulter FC500 flow cytometer (Beckton Dickinson).

**Western blot**

For protein expression analysis, cells were seeded on 100-mm plates at a density of  $2 \times 10^5$  cells/mL in a final volume of 10 mL of complete medium. After treatments, cells were lysed with ice-cold lysis buffer (150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1%v/v Triton X-100, 2.5 mM sodium pyrophosphate, 1 mM  $\beta$ -glycerophosphate, 1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  leupeptin, 10 nM NaF, 1 mM PMSF, 20 mM Tris-HCl pH 7.5). Thirty micrograms of total proteins were separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to polyvinylidene difluoride membranes (Amersham GE-Healthcare, Buckinghamshire, UK). Blots were incubated with appropriate antibodies raised against cleaved caspase-3 (1:1000, Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA), caspase-8 (1:1000, Cell Signaling Technology) that recognized both full and cleaved forms, caspase-9 (1:1000, Cell Signaling Technology) that recognized both full and cleaved forms, Bid (1:1000, Cell Signaling Technology) that recognized both full and cleaved forms, as well as either the phosphorylated

forms of ERK (anti-phospho p42/44 1:1000, Cell Signalling Technology), JNK (anti-phospho JNK 1:1000, Cell Signalling Technology), p38 (anti-phospho p38 1:1000, Cell Signalling Technology), Akt (anti-phospho Akt 1:1000, Cell Signalling Technology) and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) – as loading control (anti-GAPDH 1:1000, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). Immunoreactive polypeptide was visualized using horseradish peroxidase conjugated secondary antibodies (anti-rabbit IgG peroxidase conjugated and anti-mouse IgG peroxidase 1:2000; Calbiochem, San Diego, CA, USA) and enhanced-chemiluminescence detection reagents (Amersham Bioscience) following manufacturer-supplied protocols. Immunoblots were analyzed by Scion Image (<http://www.scioncorp.com>) to provide quantitative values for relative expression of each protein (all normalized to its own loading control).

**Data analysis**

Experiments were repeated at least three times, and data were calculated as mean values  $\pm$  S.E. Statistical comparisons were carried out using one-way ANOVA followed by a Student–Newman–Keuls multiple range test. Statistical significance was accepted when  $P < 0.01$ .

**Results**

To determine the potential synergistic effect of melatonin and each chemotherapeutic drug used against the ESFT, we determined initially the sensitivity of SK-N-MC cells to the

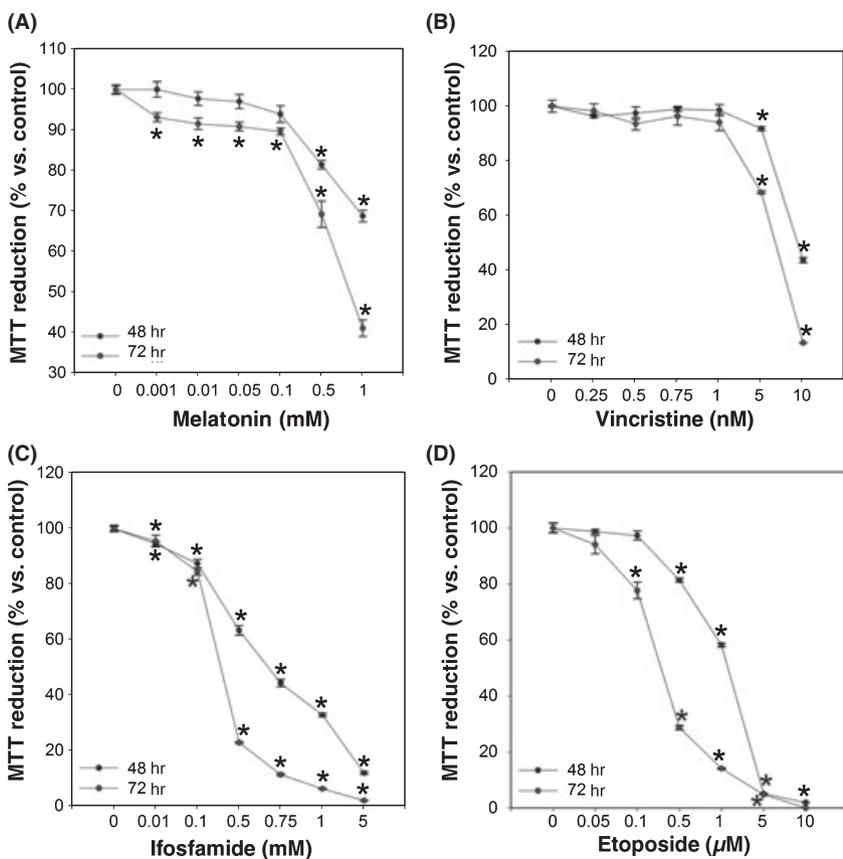


Fig. 1. Dose–response study of the anti-tumor effect of melatonin (A), vincristine (B), ifosfamide (C) and etoposide (D) in SK-N-MC cells. Cell viability was assessed by the MTT reduction assay as described in the Material and Methods section after treatment of the cells during 48 and 72 hr with the indicated concentrations of the drugs. Seven samples per group were analyzed. Experiments were performed at least three times. \* $P < 0.001$  versus nontreated cells.

drugs used. Cells were incubated for 48 or 72 hr with rising concentrations of melatonin, vincristine, ifosfamide or etoposide and cell viability was calculated by the MTT reduction assay. We found that SK-N-MC cells are sensitive to melatonin with an IC<sub>50</sub> value around 1 mM after 48 hr of treatment and 0.5–1 mM after 72 hr. They are also sensitive to vincristine, ifosfamide and etoposide with IC<sub>50</sub> values around 10 nM, 0.5–0.75 mM, and 1 μM, respectively, after 48 hr and 5–10 nM, 0.1–0.5 mM and 0.1–0.5 μM, respectively, after 72 hr of treatment (Fig. 1A–D). Thereafter, we selected four concentrations of each of the compounds and cells were exposed for 48 hr to the chosen concentrations either separately or in every possible combination with melatonin and assessed for synergy. Figure 2 shows the decrease in cell viability when the selected concentrations of melatonin were combined with vincristine (Fig. 2A), ifosfamide (Fig. 2B) or etoposide (Fig. 2C). Exposure to a combination of melatonin with

vincristine or ifosfamide resulted in a clear synergy as analyzed according to the method of Chou and Talay [27]. CI was lower than 0.9 (which, as indicated in the Material and Methods section, indicates synergy) with the combination of vincristine in the range of 5–10 nM plus melatonin; and with the combination of ifosfamide in the range of 100 μM–1 mM plus melatonin, as showed in Fig. 2(D). The combination of melatonin with etoposide could not be analyzed due to the lack of parallelism between the regression lines (Fig. 2D).

The next step was to test whether the synergy between melatonin and the chemotherapeutic drugs is due to a potentiation in the induction of cell death. For this purpose, the most efficient concentration of each compound was selected and induction of cell death by all the agents individually and in combination was measured by the LDH assay. Although each of the agents individually induced cell death, combination of vincristine or ifosfamide with

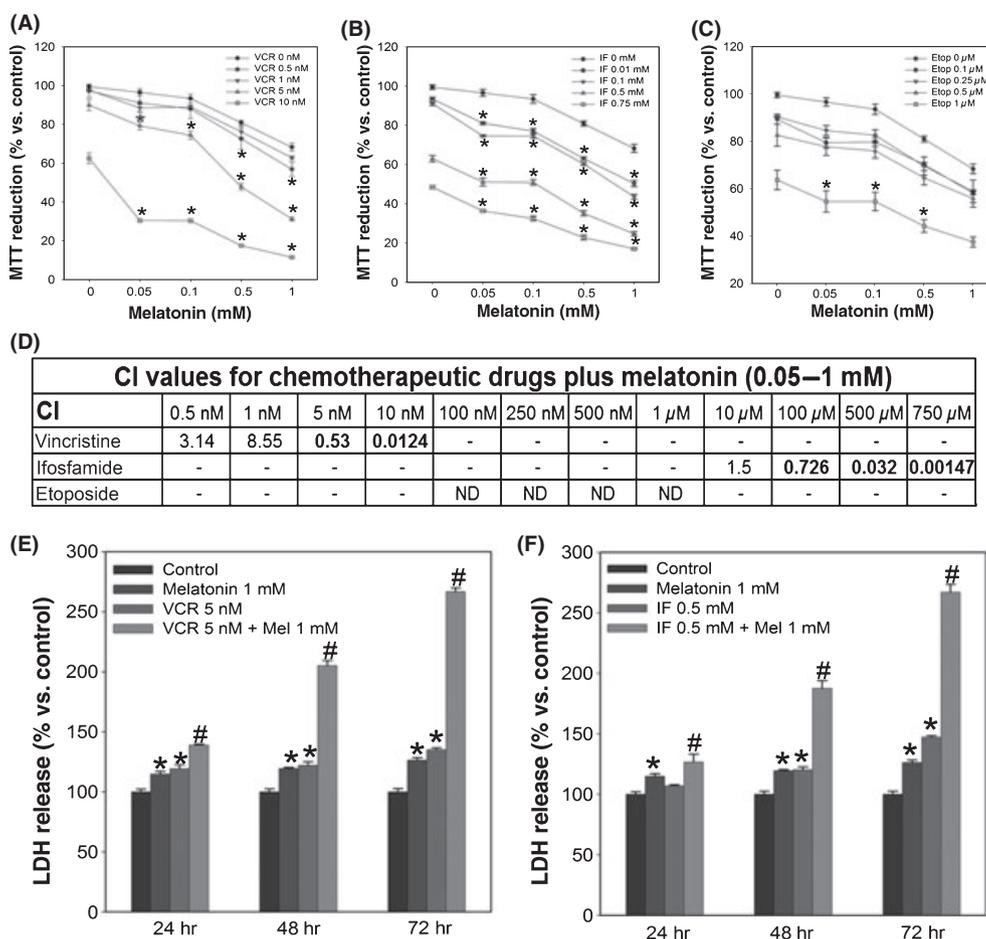


Fig. 2. Effect of the combination of melatonin with vincristine (A), ifosfamide (B) or etoposide (C) in the Ewing sarcoma family of tumors SK-N-MC cell line. Cells were treated during 48 hr with the indicated concentrations of the used molecules. Data are expressed as percent viable cells versus control measured by the MTT reduction assay. Seven samples per group were analyzed, and the experiments were performed at least three times. \**P* < 0.001 versus same concentration of melatonin and same concentration of the corresponding chemotherapeutic drug. CI values were calculated according to Chou and Talalay [27]. Synergism is showed for melatonin combined with vincristine or ifosfamide but not with etoposide (ND, not determined) as it is depicted in the table (D). Induction of cell death by the agents separately or combined after 24, 48 and 72 hr of treatment were measured by the lactate dehydrogenase (LDH) release to the culture media (E,F) as it is explained in the Material and Methods section. Results are expressed as the percent of control values. Experiments were performed at least three times. \**P* < 0.001 versus control group. #*P* < 0.001 versus all other groups.

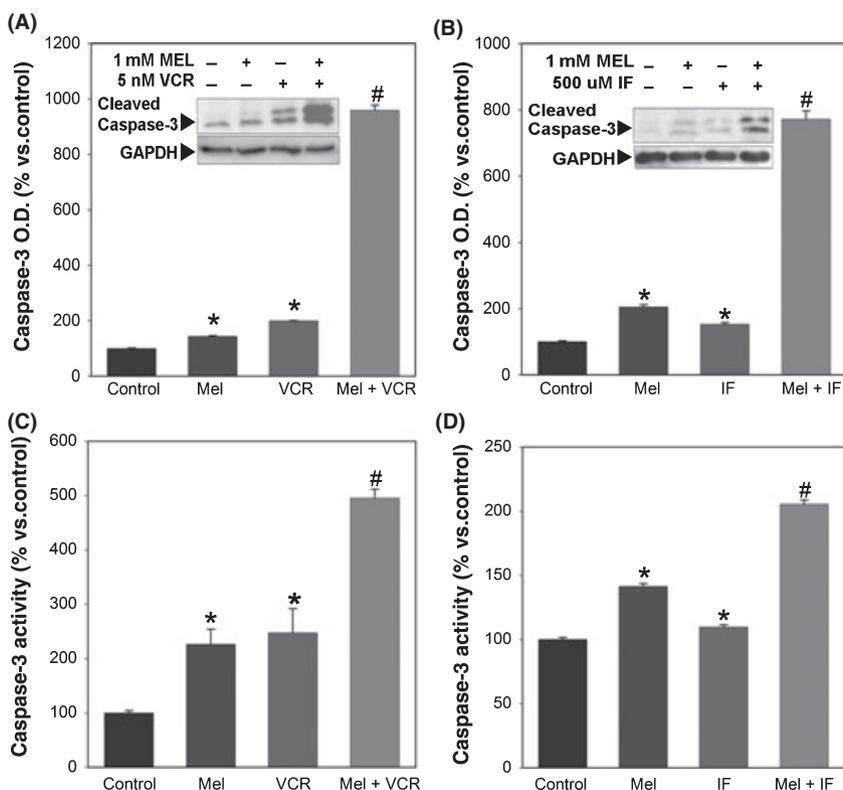


Fig. 3. Activation of caspase-3 induced by melatonin, vincristine, or ifosfamide individually is potentiated when melatonin is combined with each of the drugs (A,B). Cleaved caspase-3 was analyzed by Western blot as indicated in the Material and Methods section. A representative blot is shown in the inserts. Optical density reading values of the cleaved caspase-3 versus the loading control protein GAPDH are represented as percent of the control values. Caspase-3 activity was also measured by a fluorimetric method (C,D). Results are also represented as percent values of the control. Experiments were performed at least three times. \* $P < 0.001$  versus control. # $P < 0.001$  versus all other groups.

melatonin strikingly increased such effect as shown in Fig. 2(E,F).

To investigate the possible potentiation of apoptosis when they are combined, the activation of caspase-3, an enzyme playing a central role in the execution phase of apoptosis, was evaluated by Western blot and its activity was also measured by a fluorimetric assay. As shown in Fig. 3(A,B), single-agent exposure to melatonin, vincristine or ifosfamide induced a significant increase in the cleavage of caspase-3 after 24 hr in the case of vincristine or 48 hr in the case of ifosfamide. However, when cells were treated with each of the chemotherapeutic drugs in combination with melatonin there was a dramatic rise in activated caspase-3, which was statistically significant when compared with the values of each individual treatment.

Similar results were obtained when measuring caspase-3 activity. The single compounds used (melatonin, vincristine or ifosfamide) increased the activity significantly. However, the combination of vincristine or ifosfamide with melatonin increased it significantly compared to the single treatments (Fig. 3C,D).

Melatonin has been shown to induce apoptosis in SK-N-MC cells through the extrinsic pathway. In order to determine which one of the apoptotic pathways, extrinsic, intrinsic or both, was involved in apoptosis potentiation by drug combinations, the activation of caspase-8 (extrinsic pathway), caspase-9 (intrinsic pathway), and Bid (Bcl-2 family protein involved in the activation of the intrinsic pathway after activation of death receptors) was evaluated. Figure 4(A,B) depicts the increases in cleaved caspase-8 after a single treatment with melatonin, vincristine or ifosfamide. It also shows a marked rise in caspase-8 activation when melatonin is combined with vincristine or ifosfamide.

Neither melatonin nor ifosfamide individually activated caspase-9; however, when they are combined there is a small but significant increase in the activation of this protease (Fig. 4D). Caspase-9 is minimally activated after the treatment with vincristine; this activation increases moderately but significantly after its combination with melatonin (Fig. 4C). Finally, the total Bid decreases after the combinations mentioned above thus indicating an activation that may be the cause of the activation of the intrinsic pathway after treatment with the combined molecules (Fig. 4E,F).

Early production of reactive oxygen species (ROS) has been reported in the extrinsic apoptosis signaling pathway; these species are involved in cell death signaling after the death inducing signaling complex assembly [29, 30]. Melatonin induces a transient increase of intracellular oxidants in SK-N-MC cancer cells; these oxidants participate in the cell death induced by melatonin and probably relate to the activation of the extrinsic apoptosis pathway (García-Santos G, Rodríguez-Blanco J, Herrera F, Antolín I, Martín V, Casado-Zapico S, Rodríguez C, unpublished observations). It was of importance to determine if a greater increase in ROS occurs with the combination treatments that we were investigating. For this purpose, we measured intracellular oxidants after treatment of the cells with the agents either separately or in combination with melatonin. We found an increase of free radicals after 2 hr of treatment with melatonin or vincristine, but not with ifosfamide alone; however, when combinations of vincristine or ifosfamide with melatonin were assayed, we found a significant and marked rise in free radical production in both cases (Fig. 5A,B).

Besides the activation of proteases, other extrinsic apoptotic pathway-related proteins regulate cell death

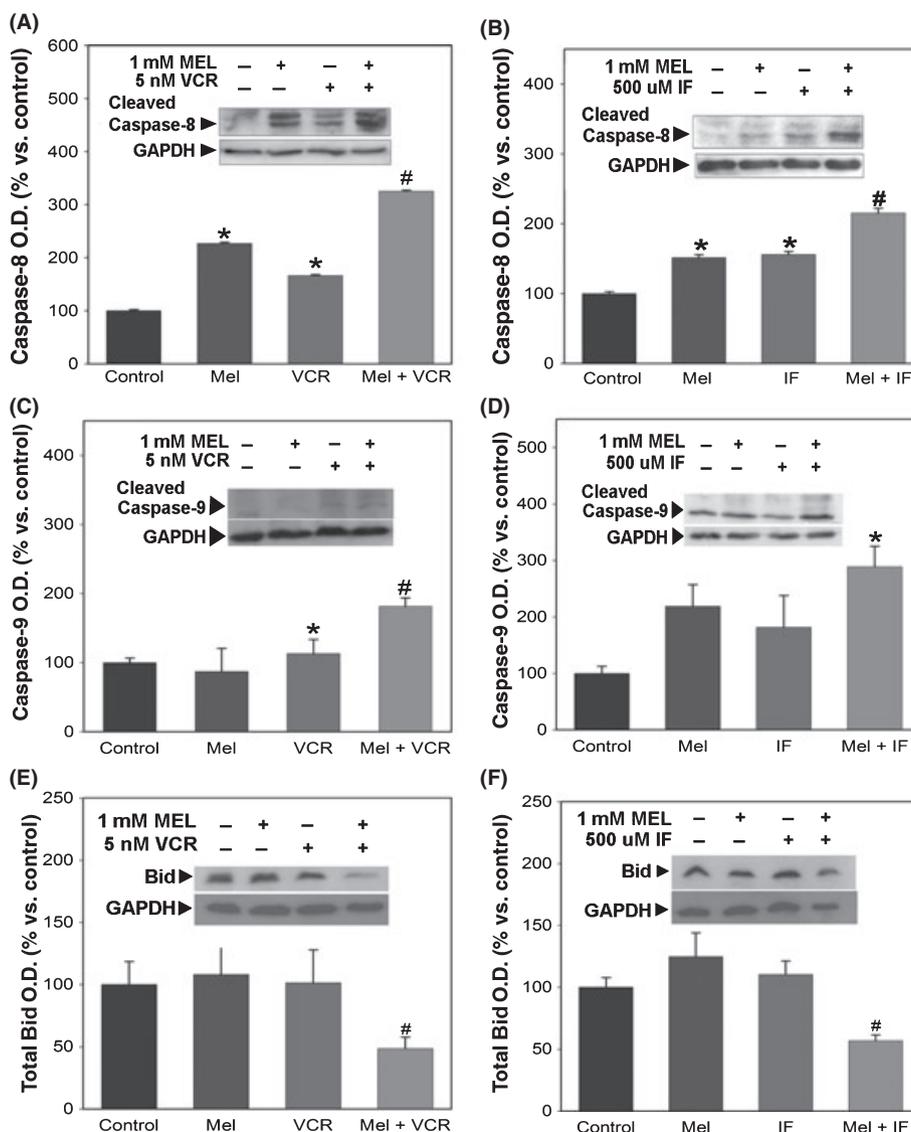


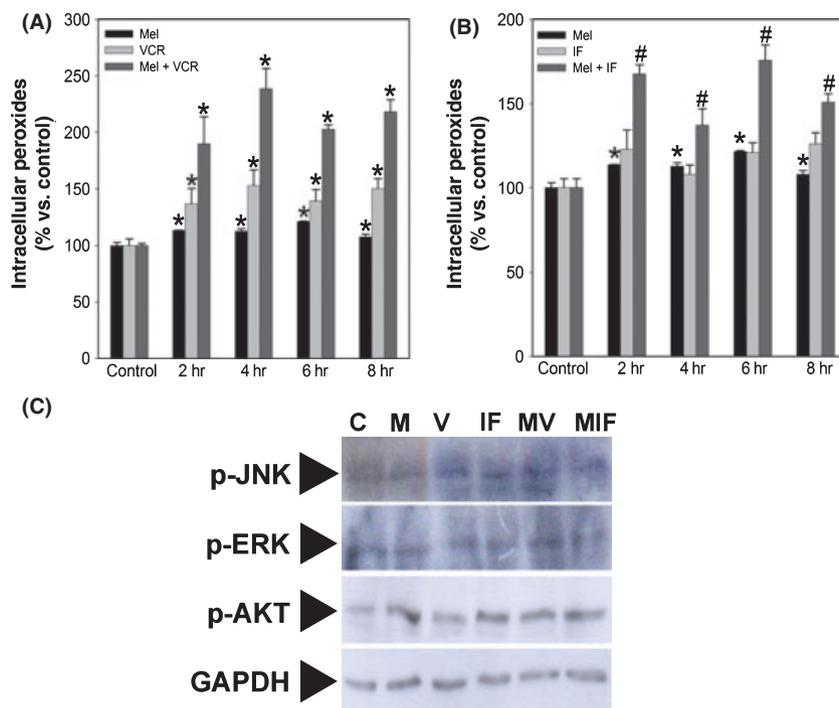
Fig. 4. Activation of caspase-8 (A,B), caspase-9 (C,D) and Bid (E,F) induced by melatonin, vincristine, or ifosfamide individually is potentiated when melatonin is combined with each of the drugs. Cleaved caspases and total Bid were analyzed by Western blot as indicated in the Material and Methods section. A representative blot is shown in the inserts. Optical density reading values of the cleaved caspases or total Bid versus the loading control protein GAPDH are represented as percent of the control values. \* $P < 0.001$  versus control. # $P < 0.001$  versus all other groups.

occurring through this pathway. Protein kinase B/Akt (PKB/Akt) and the proteins of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) family have been reported to be regulated during extrinsic apoptosis in some experimental models. JNK activation has been found to be downstream of the death receptor activation and, once activated, it induces apoptosis by upregulation of pro-apoptotic genes [31]. Also, p38 mediates apoptosis induced by the extrinsic pathway in some cases [32]. On the contrary, both ERK and Akt usually behave as pro-survival proteins, and their inhibition by antitumoral agents inducing extrinsic apoptosis has been reported [33, 34]. Phosphorylation and thereby activation of these proteins were evaluated by Western blot. No significant differences in the expression of any of the kinases studied were found after treatment with the drugs either separately or combined (Fig. 5C).

## Discussion

The results presented here indicate that there is a synergism in the antitumor activity against Ewing sarcoma cells between melatonin and vincristine or ifosfamide but not between melatonin and etoposide. Such synergism is due, at least in part, to the potentiation of induced apoptosis.

Vincristine and ifosfamide are used in combination with other chemotherapeutic drugs in the treatment of Ewing sarcoma, but few reports describe the molecular events that take place after the treatment of cells with these drugs. Although there are few studies on the activation of specific caspases by vincristine, some reports indicate that the apoptotic intrinsic pathway may be involved in the cytotoxic effect [35, 36] while the extrinsic pathway seems not to participate, at least in the reported cell lines [37, 38]. There



**Fig. 5.** Intracellular oxidants increase after the treatment of SK-N-MC cells with melatonin or vincristine individually, but not when are treated with ifosfamide. Combination of melatonin with each of the drugs potentiates the increase of oxidants induced by the agents alone (A,B). Intracellular oxidants were assessed by the DFH-DA fluorochrome method as indicated in the Material and Methods section after the treatment of the cells with the drugs during the indicated times. \* $P < 0.001$  versus control. # $P < 0.001$  versus all other groups. Extrinsic apoptotic pathway-related proteins (the MAPK JNK, p38 and ERK and the protein kinase B/Akt) were analyzed by Western blot measuring the expression of the phosphorylated and so activated form as well as the loading control protein GAPDH. No changes in the amount of the active form were found for any of the proteins studied either after the treatment with the individual agents or after the combination treatment. No signal was detected for p38 MAPK (C).

is also one report indicating that apoptosis induced by vincristine in osteosarcoma is not mediated by caspase-3 [39]. Information about the molecular events occurring after treatment with ifosfamide is even more rare. Ifosfamide seems to induce caspases' activation-dependent apoptosis in the B-cell precursor leukemia cell line REH [40], but chloroacetaldehyde, a metabolite of ifosfamide, does not induce apoptosis but rather necrosis in osteosarcoma Saos-2 cells [41]. The chemically activated form of ifosfamide, 4-hydroperoxyifosfamide, induces caspase-9 and caspase-8 activation in gliosarcoma cells [42]. When put together, these data suggest that the molecular events underlying the cytotoxic effect of these chemotherapeutic drugs depend on the type of tumor cell studied. Previous data indicated that vincristine alone induces low level of apoptosis in several Ewing sarcoma cell lines, and co-treatment with imatinib, an inhibitor of the kinase activity of KIT, greatly increased cell death [43]. On the other hand, we had previously found that melatonin specifically induces apoptosis in several Ewing sarcoma cell lines, mainly through activation of the apoptotic extrinsic pathway with activation of caspase-8 and several down-stream molecules (García-Santos G, Rodríguez-Blanco J, Herrera F, Antolín I, Martín V, Casado-Zapico S, Rodríguez C, unpublished observations).

Synergism between melatonin and vincristine or ifosfamide in the antitumoral activity is due to an elevated cell death induced by melatonin or each of the chemotherapeutic drugs used separately. This rise corresponds to a

large increase in the activation of the caspases 3 and 8 and to a weak rise in caspase-9.

Treatment with melatonin or ifosfamide alone only activates caspase-8 and does not activate either caspase-9 or Bid. The combination of both drugs markedly increases caspase-8 activation while it induces Bid cleavage and the activation of caspase-9. Bid is a pro-apoptotic bcl-2 family protein that is cleaved and activated by activated caspase-8. Truncated Bid activates the mitochondrial apoptotic pathway giving way to an amplification loop of apoptosis. The fact that neither melatonin nor ifosfamide alone can activate Bid (they only did such in combination) suggests that the increase in caspase-9 may be due to the stimulation of the mitochondrial pathway induced by the activated Bid.

Treatment with vincristine alone activates both caspase-8 and -9 although not Bid in SK-N-MC Ewing sarcoma cells, indicating activation of both the extrinsic and the intrinsic apoptotic pathways in an independent manner. The fact that after the combination of both drugs, Bid is activated and caspase-9 activation by vincristine is strongly enhanced suggests that the combined treatment with melatonin again increases caspase-9, and thus the intrinsic apoptotic pathway, due to the activation of Bid.

The reason that the combination of melatonin with ifosfamide or vincristine activates Bid has not been elucidated. Bid cleavage by caspase-8 is constitutively inhibited by phosphorylation, depending at least of the kinases casein kinase I and II (CKI and CKII), although other proteases

may be also involved. Moreover, phosphorylation by CKI and CKII must cooperate with other kinases such as protein kinase C [44]. Melatonin has been previously shown to inhibit protein kinase C in rat glioma cells [45]. The additional inhibition of these kinases by melatonin and by the chemotherapeutic drugs could allow the cleavage of Bid by active caspase-8. This caspase is indeed also present at higher concentrations with respect to the single treatments, also likely contributing to its effect on Bid cleavage.

The early increase in intracellular oxidants and the activation of MAPK and PKB/Akt were previously reported as involved in the extrinsic apoptosis pathway. Our group has found an early and transient increase of intracellular oxidants on several Ewing sarcoma cell lines, including SK-N-MC cells, a few hours after melatonin treatment (García-Santos G, Rodríguez-Blanco J, Herrera F, Antolín I, Martín V, Casado-Zapico S, Rodríguez C, unpublished observations). Results presented here indicate that the early rise of ROS induced by the single agents assayed is also fostered when such agents are combined, suggesting the involvement of the extrinsic apoptotic pathway and its downstream machinery in the synergy showed in their antitumoral action after the combinations used. It is not the case of PKB/Akt and MAPK proteins, where phosphorylation seems not to be involved neither in the apoptosis induced by the agents separately nor after combination.

The search for new antitumor therapies includes biological molecules inhibiting specific cancer signaling pathways. Although current data on this approach are not abundant in ESFT, inhibitors of tyrosine kinase [43], the kinase activity of the insulin-like growth factor 1R [46] or the vascular endothelial growth factor-mediated pathway [47, 48] have been reported to foster chemotherapeutic drugs in Ewing sarcoma. In this work, we report the synergic boost of the cytotoxic activity of some currently used chemotherapeutic drugs in these tumors with melatonin. This indolamine also induces cell death in Ewing sarcoma cells and has been previously reported to protect normal cells from diverse insults. The study opens the door to a novel therapeutic approach for the treatment of this family of tumors based on combined regimes that would enhance the cytotoxic effect of the used chemotherapeutic drugs.

## Acknowledgements

This work was supported by a MEC (SAF2007-64726), FIS (PI061803), and Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) (RD06/0020/1042 – Red Temática de Investigación Cooperativa en Cáncer RTICC) grants to Carmen Rodríguez. Sara Casado-Zapico was supported by a FIS fellowship (FI07-00094). Jezabel Rodríguez-Blanco, Guillermo García-Santos and Ana Sánchez-Sánchez were supported by FICYT (BP06-161, PO02-112, COF 08-35, and COF08-39). Vanesa Martín acknowledges the support by the Juan de la Cierva Program from the Minister of Science and Education (MEC).

## References

1. DE ALAVA E, GERALD WL. Molecular biology of the Ewing's sarcoma/primitive neuroectodermal tumor family. *J Clin Oncol* 2000; **18**:204–213.
2. DAMRON TA, WARD WG, STEWART A. Osteosarcoma, Chondrosarcoma and Ewing's sarcoma: National Cancer Data Base Report. *Clin Orthop Relat Res* 2007; **459**:40–47.
3. GRIER HE, KRAILO MD, TARBELL NJ et al. Addition of ifosfamide and etoposide to standard chemotherapy for Ewing's sarcoma and primitive neuroectodermal tumor of bone. *N Engl J Med* 2003; **348**:694–701.
4. JUERGENS C, WESTON C, LEWIS I et al. Safety assessment of intensive induction with vincristine, ifosfamide, doxorubicin, and etoposide (VIDE) in the treatment of Ewing tumors in the EURO-E.W.I.N.G. 99 clinical trial. *Pediatr Blood Cancer* 2006; **47**:22–29.
5. JOHNSON IS, ARMSTRONG JG, GORMAN M et al. The vinca alkaloids: a new class of oncolytic agents. *Cancer Res* 1963; **23**:1390–1427.
6. ZALUPSKI M, BAKER LH. Ifosfamide. *J Natl Cancer Inst* 1988; **80**:556–566.
7. HANDE KR. Etoposide: four decades of development of a topoisomerase II inhibitors. *Eur J Cancer* 1998; **34**:1514–1521.
8. SCHIMMEL KJ, RICHEL DJ, VAN DEN BRINK RB et al. Cardiotoxicity of cytotoxic drugs. *Cancer Treat Rev* 2004; **30**:181–191.
9. GARCÍA-SANTOS G, ANTOLÍN I, HERRERA F et al. Melatonin induces apoptosis in human neuroblastoma cancer cells. *J Pineal Res* 2006; **41**:130–135.
10. REITER RJ. Melatonin: the chemical expression of darkness. *Mol Cell Endocrinol* 1991; **29**:C153–C158.
11. HARDELAND R, PÖEGGELER G. Non-vertebrate melatonin. *J Pineal Res* 2003; **34**:233–241.
12. TENGATTINI S, REITER RJ, TAN DX et al. Cardiovascular diseases: protective effects of melatonin. *J Pineal Res* 2008; **44**:16–25.
13. PESCHKE E. Melatonin, endocrine pancreas and diabetes. *J Pineal Res* 2008; **44**:26–40.
14. OTALOVA BB, MADRID JA, ALVAREZ N, VICENTE V, ROL MA. Effects of exogenous melatonin and circadian synchronization on tumor progression in melanoma-bearing C57BL4 mice. *J Pineal Res* 2008; **44**:307–315.
15. MARTÍN V, HERRERA F, CARRERA-GONZÁLEZ P et al. Intracellular signaling pathways involved in the cell growth inhibition of glioma cells by melatonin. *Cancer Res* 2006; **66**:1–8.
16. TRUBIANI O, RECCHIONI R, MORONI F et al. Melatonin provokes cell death in human B-lymphoma cells by mitochondrial-dependent apoptosis pathway activation. *J Pineal Res* 2005; **39**:425–431.
17. OMURTAG GZ, TOZAN A, SEHIRLI AO, SENER G. Melatonin protects against endosulfan-induced oxidative tissue damage in rats. *J Pineal Res* 2008; **44**:432–437.
18. REITER RJ, TAN DX, SAINZ RM et al. Melatonin: reducing the toxicity and increasing the efficacy of drugs. *J Pharm Pharmacol* 2005; **54**:1299–1321.
19. VALKO M, MORRIS H, CRONIN MT. Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr Med Chem* 2005; **12**:1161–1208.
20. ESPOSITO E, IACONA A, MUI C et al. Signal transduction pathways involved in the protective effects of melatonin in C6 glioma cells. *J Pineal Res* 2008; **44**:78–87.
21. HERRERA F, MARTÍN V, GARCÍA-SANTOS G et al. Melatonin prevents glutamate-induced oxytosis in the HT22 mouse hippocampal cell line through an antioxidant effect specifically targeting mitochondria. *J Neurochem* 2007; **100**:736–746.
22. BOB P, FEDOR-FREYBERGH P. Melatonin, consciousness and traumatic stress. *J Pineal Res* 2008; **44**:341–347.

23. REITER RJ, PAREDES SD, MANCHESTER LC, TAN DX. Reducing oxidative/nitrosative stress: a newly-discovered genre for melatonin. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2009; **44**:175–200.
24. LISSONI P, BARNI S, MANDALA M et al. 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* 1999; **35**:1688–1692.
25. DENIZOT F, LANG R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. *J Immunol Methods* 1986; **89**:271–277.
26. CHOU TC, TALALAY P. Generalized equations for the analysis of inhibitions of Michaelis-Menten and higher-order kinetic systems with two or more mutually exclusive and nonexclusive inhibitors. *Eur J Biochem* 1981; **115**:207–216.
27. CHOU TC, TALALAY P. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv Enzyme Regul* 1984; **22**:27–55.
28. BASS DA, PARCE JW, DECHATELET LR et al. Flow cytometric studies of oxidative product formation by neutrophils: a grade response to membrane stimulation. *J Immunol* 1983; **130**:1910–1917.
29. CHANDEL NS, SCHUMACKER PT, ARCH RH. Reactive oxygen species are downstream products of TRAF-mediated signal transduction. *J Biol Chem* 2001; **276**:42728–42736.
30. SHEN HM, PERVAIZ S. TNF receptor superfamily-induced cell death: redox-dependent execution. *FASEB J* 2006; **20**:1589–1598.
31. DHANASEKARAN DN, REDDY EP. JNK signaling in apoptosis. *Oncogene* 2008; **27**:6245–6251.
32. SINGHAL PC, BHASKARAN M, PATEL J et al. Role of p38 mitogen-activated protein kinase phosphorylation and Fas-Fas ligand interaction in morphine-induced macrophage apoptosis. *J Immunol* 2002; **168**:4025–4033.
33. MITCHELL C, PARK MA, ZHANG G et al. Extrinsic pathway- and cathepsin-dependent induction of mitochondrial dysfunction are essential for synergistic flavopiridol and vorinostat lethality in breast cancer cells. *Mol Cancer Ther* 2007; **12**:3101–3112.
34. FALSCHLEHNER C, EMMERICH CH, GERLACH B et al. TRAIL signalling: decisions between life and death. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; **39**:1462–1475.
35. CHEN S, GUTTRIDGE DC, YOU Z et al. Wnt-1 signaling inhibits apoptosis by activating beta-catenin/T cell factor-mediated transcription. *J Cell Biol* 2001; **152**:87–96.
36. GRONINGER E, MEEUWSEN-DE BOER GJ, DE GRAAF SS et al. Vincristine induced apoptosis in acute lymphoblastic leukaemia cells: a mitochondrial controlled pathway regulated by reactive oxygen species? *Int J Oncol* 2002; **21**:1339–1345.
37. KATAOKA T, SCHROTER M, HAHNE M et al. FLIP prevents apoptosis induced by death receptors but not by perforin/granzyme B, chemotherapeutic drugs, and gamma irradiation. *J Immunol* 1998; **161**:3936–3942.
38. MATTA H, EBY MT, GAZDAR AF et al. Role of MRIT/cFLIP in protection against chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Biol Ther* 2002; **1**:652–660.
39. SEKI K, YOSHIKAWA H, SHIUKI K et al. Cisplatin (CDDP) specifically induces apoptosis via sequential activation of caspase-8, -3 and -6 in osteosarcoma. *Cancer Chemother Pharmacol* 2000; **45**:199–206.
40. MAUZ-KORHOLZ C, DIETZSCH S, BANNING U et al. Heat and 4-hydroperoxy-10-oxo- $\Delta^9$ -tricosanoic acid-induced apoptosis in B cell precursor leukaemias. *Int J Hyperthermia* 2003; **19**:444–460.
41. TAKAHASHI K, SAKURAI K, TAKAHASHI K et al. Necrotic pathway in human osteosarcoma Saos-2 cell death induced by chloroacetaldehyde. *Anticancer Drugs* 2007; **18**:543–553.
42. SCHWARTZ PS, WAXMAN DJ. Cyclophosphamide induces caspase 9-dependent apoptosis in 9L tumor cells. *Mol Pharmacol* 2001; **60**:1268–1279.
43. GONZÁLEZ I, ANDREU EJ, PANIZO A et al. Imatinib inhibits proliferation of Ewing tumor cells mediated by the stem cell factor/KIT receptor pathway, and sensitizes cells to vincristine and doxorubicin-induced apoptosis. *Clin Cancer Res* 2004; **10**:751–761.
44. DESAGHER S, OSEN-SAND A, MONTESSUIT S et al. Phosphorylation of Bid by casein kinases I and II regulates its cleavage by caspase 8. *Mol Cell* 2001; **8**:601–611.
45. MARTIN V, HERRERA F, GARCÍA-SANTOS G et al. Involvement of protein kinase C in melatonin's oncostatic effect in C6 glioma cells. *J Pineal Res* 2007; **43**:239–244.
46. MARTINS AS, MACKINTOSH C, MARTIN DH et al. Insulin-like growth factor I receptor pathway inhibition by ADW742, alone or in combination with imatinib, doxorubicin or vincristine is a novel therapeutic approach in Ewing tumor. *Clin Cancer Res* 2006; **12**:3532–3540.
47. GUAN H, ZHOU Z, WANG H et al. A small interfering RNA targeting vascular endothelial growth factor inhibits Ewing's sarcoma growth in a xenograft mouse model. *Clin Cancer Res* 2005; **11**:2662–2669.
48. DALAL S, BERRY AM, CULLINANE CJ et al. Vascular endothelial growth factor: a therapeutic target for tumors of the Ewing's sarcoma family. *Clin Cancer Res* 2005; **11**:2364–2378.



