

TESIS DOCTORAL



Universidad de Granada

**El efecto dual de SIRT1 en el Cáncer
Colorrectal depende del estado de p53.
Nuevos tratamientos basados en análogos de
la melatonina.**

Memoria presentada por **Sara Moreno San Juan** para optar a la
mención de Doctor por la Universidad de Granada.

Programa de Doctorado en Bioquímica y Biología Molecular.

Directora:

Dra. Josefa León López

Granada, Julio 2023

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Sara Moreno San Juan
ISBN: 978-84-1195-016-9
URI: <https://hdl.handle.net/10481/84500>

Josefa León López, doctora en Ciencias Químicas e Investigadora principal del grupo “MP-15: Enfermedades hepáticas y Cáncer Colorrectal” del Instituto de Investigación Biosanitaria de Granada, como directora de la tesis doctoral; y **Sara Moreno San Juan**, como doctoranda, certifican al firmar que el trabajo recogido en esta memoria de tesis doctoral titulada: **El efecto dual de SIRT1 en el Cáncer Colorrectal depende del estado de p53. Nuevos tratamientos basados en análogos de la melatonina**, ha sido realizado por la doctoranda bajo la dirección de la directora para optar al grado de Doctor por la Universidad de Granada. Para su realización se han respetado los derechos de autoría al ser citados otros resultados o publicaciones.

Directora:

Doctoranda:

Fdo: Josefa León López

Fdo: Sara Moreno San Juan

La realización de esta tesis doctoral ha sido posible gracias a la financiación obtenida a través de los proyectos PI18/01947 del Instituto de Salud Carlos III-FEDER y PI-067/2013 de la Consejería de Salud de la Junta de Andalucía; y del programa Nicolás Monardes de la Consejería de Salud de la Junta de Andalucía (C-0033-2015).



ÍNDICE

ABREVIATURAS	1
RESUMEN	9
ABSTRACT	15
INTRODUCCIÓN	21
1. CÁNCER	23
2. CÁNCER COLORECTAL (CCR)	23
a. Epidemiología, incidencia y mortalidad	23
b. Factores de riesgo	24
c. Etiología	26
d. Prevención, diagnóstico y tratamiento	28
e. Recurrencia, metástasis y supervivencia	32
3. CÉLULAS MADRE CANCERÍGENAS (CMCs)	34
a. Epitelio colónico y Células Madre	34
b. Células Madre Cancerígenas	35
c. Origen	36
d. Características de las CMCs.....	37
e. Características de las CMCs en colon	38
f. Identificación de CMCs	38
4. GEN TP53	41
a. P53 y cáncer.....	42
b. p53 y CCR.....	43
c. p53 y CMCs.....	44
5. RITMOS CIRCADIANOS	45
a. Ritmos circadianos y cáncer.....	47
b. Ritmos circadianos y CMCs.....	50
c. Reguladores de los ritmos circadianos.....	52
6. SIRT1	54
a. SIRT1 y desarrollo tumoral	55
b. SIRT1 y CCR.....	56
c. SIRT1 y ritmos circadianos.....	57
d. SIRT1 y p53.....	58
7. PEROXIRREDOXINAS	59

a. Peroxirredoxina 1	60
8. MELATONINA.....	62
a. Funciones.....	62
b. Melatonina, cáncer y p53.....	63
c. Melatonina como tratamiento	65
9. AGOMELATINA	67
<i>JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</i>	69
1. JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS	71
2. OBJETIVOS.....	75
<i>MATERIALES Y MÉTODOS</i>	77
1. ESTUDIO A PARTIR DE TEJIDOS DE PACIENTES CON CCR	79
2. EXTRACCIÓN DE ARN Y SÍNTESIS DE ADNc	80
3. Q-PCR EN TIEMPO REAL	81
4. EXTRACCIÓN ADN	83
5. ANÁLISIS DE LAS MUTACIONES DE p53	83
6. LÍNEAS CELULARES Y CULTIVO	83
7. ENSAYO DE VIABILIDAD	84
8. ENSAYO DE FORMACIÓN DE ESFERAS.....	84
a. Método insphero (viabilidad).....	84
b. Caracterización de las esferas formadas (Viabilidad)	85
9. ENSAYO DE FORMACIÓN DE COLONIAS	85
10. ESTUDIO DEL CICLO CELULAR.....	85
11. ENSAYO DE APOPTOSIS	86
12. OBTENCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS	86
13. WESTERN BLOT.....	87
14. GENERACIÓN DE TUMORES XENÓGRAFOS EN RATONES	88
15. OBTENCIÓN DE ARN PARA EL ESTUDIO DEL RITMO CIRCADIANO.....	89
16. ANÁLISIS DE LA RITMICIDAD.....	90
17. TRANSFECCIÓN.....	90
18. SELECCIÓN Y OBTENCIÓN DE MUTANTES ESTABLES	91
19. INMUNOCITOQUÍMICA	91
20. ENSAYO DE HERIDA	91
21. CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS MADRE CANCERÍGENAS	92

a. Cuantificación de la actividad de la enzima aldefluor deshidrogenasa-1 positiva (ALDH1).....	92
b. Fenotipificación del carácter stem por citometría de flujo	92
c. Cuantificación del número de esferas formadas (Capacidad de renovación). 93	
d. Obtención de la población CMC	93
22. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	94
RESULTADOS.....	95
CAPÍTULO 1: ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE Sirt1 Y MARCADORES DE CMCs EN MUESTRAS DE PACIENTES CON CCR	97
1. Estudio de la expresión de SIRT1 en muestras pacientes con CCR.	97
2. Estudio de la expresión de los marcadores de CMCs en muestras de pacientes con CCR.....	97
3. Relación de la expresión de SIRT1 con las características clínico-patológicas de los pacientes con CCR.....	98
4. Relación entre SIRT1 y los marcadores de CMCs en el CCR	99
5. Análisis de correlación de la expresión de Sirt1 con los genes del reloj circadiano según la expresión de los marcadores de CMCs	100
CAPÍTULO 2: ESTUDIO DEL EFECTO DEL TRATAMIENTO CON AGOMELATINA SOBRE LÍNEAS ESTABLES DE CCR HUMANO EN FUNCIÓN DEL ESTADO DE P53.	103
1. La agomelatina inhibe el crecimiento de las células de CCR humano de manera independiente del estado de p53.....	103
2. La agomelatina induce parada del ciclo celular y apoptosis dependiente de caspasas.....	106
3. Regulación del crecimiento tumoral <i>in vivo</i> tras el tratamiento con agomelatina. 110	
4. La agomelatina regula los niveles de la proteína p53 en los modelos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> de CCR.	112
5. Regulación de los genes del reloj circadiano por la agomelatina en las líneas celulares de CCR <i>in vitro</i>	113
CAPÍTULO 3: ESTUDIO DEL PAPEL DE SIRT1 EN LA RESPUESTA A LOS TRATAMIENTOS CON AGOMELATINA O MELATONINA EN MODELOS DE CCR.	123
1. Selección de los clones estables con Sirt1 silenciado.	123
2. El silenciamiento de Sirt1 altera el crecimiento y la efectividad del tratamiento con agomelatina y melatonina.....	123

3. El silenciamiento de Sirt1 altera la distribución de las células en las distintas fases del ciclo celular después del tratamiento.	128
4. El tratamiento con agomelatina induce un incremento del porcentaje de apoptosis.....	130
5. El tratamiento con agomelatina disminuye el área de las colonias formadas.	131
6. El tratamiento con agomelatina reduce el volumen tumoral en ratones.....	133
7. El tratamiento con agomelatina induce autofagia en los clones con Sirt1 silenciado.....	135
8. El tratamiento con agomelatina modificó la capacidad de migración celular en función del estado de Sirt1 y p53.	137
9. La agomelatina modifica el porcentaje de población ALDH1 positiva según el estado de p53 y Sirt1.	138
10. Los tratamientos con agomelatina y melatonina modifican el fenotipo de CMC.	139
11. El tratamiento con agomelatina modifica la capacidad de formación de esferas.....	140
12. La ausencia de p53 y el silenciamiento de Sirt1 incrementa la formación de tumores a partir de células TS1.	142
13. La agomelatina modifica la población de CMCs en función del estado de p53 y Sirt1.	143
14. El tratamiento con agomelatina disminuye el área de las colonias formadas	144
15. Estudio de la capacidad de autorrenovación de la población de CMC.....	147
16. Estudio del efecto del tratamiento con agomelatina sobre los genes del ritmo circadiano en función de Sirt1 y p53.....	148
DISCUSIÓN	155
CONCLUSIONES	169
ANEXOS	173
ANEXO 1: Materiales y métodos	175
1. GELES DE POLIACRILAMIDA.....	175
2. CONFIGURACIÓN DEL CITÓMETRO	175
ANEXO 2: Resultados capítulo 2	177
BIBLIOGRAFÍA	193
PUBLICACIÓN	217

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribución de la incidencia del CCR a nivel mundial (Sung et al., 2021)....	24
Figura 2. Vías de desarrollo de la carcinogénesis colorrectal. Adaptación de Dekker et al., 2019.....	27
Figura 3. Posibles estrategias terapéuticas para el CCR	29
Figura 4. Ruta de acción del 5-FU (Longley et al., 2003).....	31
Figura 5. Capas de células que forman la pared del colon (Adaptado de Cancer.org)	34
Figura 6. Proceso de diferenciación celular en el intestino (Beumer & Clevers, 2016)..	35
Figura 7. Esquema de la implicación de p53 en el desarrollo tumoral. Adaptación de Ozaki & Nakagawa, 2011	42
Figura 8. Relación entre p53 y la adquisición del fenotipo CMC. Adaptado de Shetzar et al., 2014.....	44
Figura 9. Esquema de la localización de los relojes circadianos en el organismo y su regulación.	46
Figura 10. Componentes de la ruta molecular del reloj circadiano (Dierickx et al., 2018)	47
Figura 11. Procesos por los que el reloj circadiano influye en el desarrollo tumoral. Adaptación de (Shafi & Knudsen, 2019)	50
Figura 12. Regulación de la regeneración del epitelio intestinal. Adaptada de Stokes et al., 2017.....	51
Figura 13. Dualidad del efecto de SIRT1.....	55
Figura 14. Regulación circadiana del metabolismo celular (Sahar & Sassone-Corsi, 2009)	58
Figura 15. Distribución de las isoformas de las Prxs y del sistema rédox en la célula (Park et al., 2016).	59
Figura 16. Vías de actuación de la Prx1 (Ding et al., 2017).....	61
Figura 17. Ruta de síntesis de la melatonina	62
Figura 18. Funciones controladas por la melatonina (Adaptación de Chok et al., 2019).	63
Figura 19. Fórmula de la agomelatina.....	67
Figura 20. Expresión relativa de Sirt1 en los tumores con baja y alta expresión de marcadores CMCs considerando todos los casos estudiados o agrupando en función del estado de p53	100
Figura 21. Viabilidad de las líneas celulares HCT-116 y HCY-116 p53 <i>null</i> tras el tratamiento con agomelatina o melatonina.	104
Figura 22. Porcentaje de la viabilidad celular en las líneas HCT-116 y HCT-116 p53 <i>null</i> tras el tratamiento con agomelatina o melatonina.....	105
Figura 23. Ejemplo representativo del ensayo de formación de colonias. Número de colonias de tres experimentos realizados en células HCT-116 y HCT-116 p53 <i>null</i> después del tratamiento con agomelatina (Ago) o melatonina (Mel). Imagen del modelo 3D y área de los esferoides obtenidos tras los tratamientos con agomelatina o melatonina durante 72 horas.	106
Figura 24. Porcentaje de la distribución celular en cada fase del ciclo celular después del tratamiento con agomelatina (Ago) y melatonina (Mel) en las células HCT-116 y HCT-116 p53 <i>null</i>	108

Figura 25. Porcentaje de apoptosis en las células HCT-116 y HCT-116 p53 <i>null</i> después del tratamiento con agomelatina o melatonina.....	109
Figura 26. Expresión de Caspasa 3 activa (Casp 3 activa) y β -actina después de 72 horas de tratamiento con diferentes dosis de melatonina o agomelatina en las células HCT-116 y HCT-116 p53 <i>null</i>	109
Figura 27. Volumen de los tumores en el modelo de xenógrafos en los cuatro grupos de ratones (control, tratados con agomelatina (Ago), melatonina (Mel) o 5-FU) derivados de células HCT-116 o HCT-116 p53 <i>null</i> . Imágenes representativas de los tumores de cada grupo de tratamiento.	111
Figura 28. Niveles de glucosa, alanina transaminasa (ALT), amilasa, la urea, la aspartato aminotransferasa y el ácido úrico presentes en sangre tras el sacrificio de los animales.	112
Figura 29. Expresión de los niveles de proteína de p53 en respuesta a los tratamientos con agomelatina (Ago), melatonina (Mel) en el modelo <i>in vitro</i> y con agomelatina (Ago), melatonina (Mel) y 5-FU en los tumores derivados de las células HCT-116 y HCT-116 p53 <i>null</i>	113
Figura 30. Características de los ritmos obtenidos para los genes del reloj: Per1, Per2, Per3, Cry1, Clock, Bmal y Nr1d2 en las células HCT-116 y HCT-116 p53 <i>null</i> tras el tratamiento con agomelatina 0.5 mM o melatonina 1 mM.....	115
Figura 31. Características de cada uno de los ritmos obtenidos para el gen Sirt1 después del tratamiento con Agomelatina (Ago) 0.5 mM y melatonina (Mel) 1mM en las células HCT-116 y HCT-116 p53 <i>null</i>	120
Figura 32. Representación gráfica de la expresión del gen Prx1 bajo condiciones control, y de tratamiento con Agomelatina 0.5 mM o melatonina 1 mM en las células HCT-116 (A) y HCT-116 p53 <i>null</i> (B).	121
Figura 33. Niveles de expresión de la proteína SIRT1 y β -actina presente en los vectores y en los clones seleccionados (pRS SIRT1) para cada línea celular.	123
Figura 34. Porcentaje de proliferación celular del vector y del clon (pRS SIRT1) en las células HCT-116 y en HCT-116 p53 <i>null</i>	124
Figura 35. Porcentaje de viabilidad celular en el vector y en el clon (pRS SIRT1) de las células HCT-116 y HCT-116 p53 <i>null</i> tras el tratamiento con agomelatina (0-1 mM) o melatonina (0-1 mM) durante 72 horas.	125
Figura 36. Volumen y esfericidad de los esferoides formados a partir de los vectores y clones de las células HCT-116 y HCT-116 p53 <i>null</i> después del tratamiento con agomelatina 0.5 mM (Ago) o melatonina 1 mM (Mel) durante 72h. Imágenes representativas de los esferoides en la línea celular HCT-116 y HCT-116 p53 <i>null</i> . Imágenes obtenidas con un objetivo 10x, la barra negra equivale a 100 μ m.	126
Figura 37. Imágenes representativas de los esferoides derivados de los vectores y clones de las líneas HCT-116 y HCT-116 p53 <i>null</i> . Marcados con <i>Zombie Red</i> y Calceína en condiciones control y tras los tratamientos. Imágenes realizadas con un objetivo 10x. La barra son 100 μ m.	127
Figura 38. Ratio de muerte celular en los esferoides formados a partir de los vectores y clones de las células HCT-116 y HCT-116 p53 <i>null</i> en la condición control y después del tratamiento con agomelatina 0.5 mM (Ago) o melatonina 1 mM (Mel) durante 72h.	128

Figura 39. Porcentaje de la distribución celular en cada fase del ciclo celular del vector y del clon en las células HCT-116 y HCT-116 p53 <i>null</i> tras 72 horas de tratamiento con agomelatina (AGO) o melatonina (MEL).....	130
Figura 40. Porcentaje de apoptosis en el vector y el clon de las células HCT-116 (A) y HCT-116 p53 <i>null</i> (B) después de 72 horas de tratamiento con 0.5 mM de agomelatina (Ago) o 1 mM de melatonina (Mel).....	131
Figura 41. Número y área de las colonias formadas a partir de los vectores y clones de las células HCT-116 y HCT-116 p53 <i>null</i> después del tratamiento con agomelatina 0.5 mM (Ago) o melatonina 1 mM (Mel) durante 72 horas. Imágenes representativas de las colonias formadas en las células HCT-116 y en HCT-116 p53 <i>null</i>	133
Figura 42. Volumen de los tumores formados a partir del vector y del clon de las células HCT-116 y de las células HCT-116 p53 <i>null</i> . Imágenes representativas de los tumores formados derivados de las células HCT-116 y HCT-116 p53 <i>null</i>	135
Figura 43. Nivel de expresión de las proteínas LC3B, p62 y β -tubulina en distintas condiciones (sin tratamiento, con agomelatina y con melatonina) en el vector y en el clon de las líneas celulares HCT-116 y HCT-116 p53 <i>null</i>	136
Figura 44. Nivel de expresión de las proteínas FoxO1A y β -tubulina en distintas condiciones (sin tratamiento, con agomelatina y con melatonina) en el vector y en el clon de las líneas celulares HCT-116 y HCT-116 p53 <i>null</i>	136
Figura 45. Imágenes representativas del ensayo de herida.....	137
Figura 46. Porcentaje de migración en condiciones de control y tras el tratamiento con agomelatina 0.5 mM (Ago) o melatonina 1 mM (Mel) en los vectores y clones de las células HCT-116 y HCT-116 p53 <i>null</i>	138
Figura 47. Porcentaje de población ALDH1 positivo en las células HCT-116 y en las células HCT-116 p53 <i>null</i> después de 72 horas de tratamiento con 0.5 mM de agomelatina (Ago) y 1 mM de melatonina (Mel).....	139
Figura 48. Porcentaje de población triple positiva CD44/CD133/CD326 en las células HCT-116 y doble positiva CD326/CD44 en las células HCT-116 p53 <i>null</i> tras el tratamiento con Agomelatina 0.5 mM (Ago) y melatonina 1mM (Mel).....	140
Figura 49. Número de esferas formadas en condiciones control y tras los tratamientos con agomelatina 0.5 mM (Ago) o melatonina 1 mM (Mel) en las células HCT-116 y HCT-116 p53 <i>null</i> . Imágenes representativas de las esferas formadas. La barra equivale a 100 μ m.....	141
Figura 50. Número y volumen medio de los tumores formados a partir de la población TS1 del vector o el clon de las células HCT-116 y HCT-116 p53 <i>null</i> . Imágenes representativas de los tumores formados.....	143
Figura 51. Porcentaje de células triple positivas para el marcaje CD44/CD326/CD133 en las células HCT-116 y doble positivo CD44/CD326 en las células HCT-116 p53 <i>null</i>	144
Figura 52. Número y área de las colonias formadas a partir de las células HCT-116 y HCT-116 p53 <i>null</i> después del tratamiento con agomelatina 0.5 mM (Ago) y melatonina 1 mM (Mel) durante 72 horas. Imagen representativa de las colonias de las células HCT-116 y en HCT-116 p53 <i>null</i>	146
Figura 53. Número de esferas formadas en condiciones control y tras los tratamientos con agomelatina 0.5 mM (Ago) o melatonina 1 mM (Mel) a partir de la población TS1 de las células HCT-116 y HCT-116 p53 <i>null</i> . Imágenes representativas de las esferas formadas. La barra equivale a 100 μ m.	148

- Figura 54.** Ritmos circadianos obtenidos para el gen Clock en condiciones normales y después del tratamiento con agomelatina 0.5 mM (Ago) o melatonina 1 mM (Mel) en los vectores y clones de las líneas celulares HCT-116 y HCT-116 p53 *null*..... 149
- Figura 55.** Ritmos circadianos obtenidos para el Per2 en condiciones normales y después del tratamiento con agomelatina 0.5 mM (Ago) o melatonina 1 mM (Mel) en los vectores y clones de las líneas celulares HCT-116 y HCT-116 p53 *null*..... 151
- Figura 56.** Ritmos circadianos obtenidos para el gen Prx1 en condiciones normales y después del tratamiento con agomelatina 0.5 mM (Ago) o melatonina 1 mM (Mel) en los vectores y clones de las líneas celulares HCT-116 y HCT-116 p53 *null*..... 153

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de los grados de diferenciación de los tumores en CCR.....	29
Tabla 2. Clasificación TNM de los tumores en CCR.....	30
Tabla 3. Porcentaje de supervivencia en función del estadio tumoral en el momento del diagnóstico.	33
Tabla 4. Características de los pacientes incluidos en el estudio	80
Tabla 5. Cantidades utilizadas en la RT.....	81
Tabla 6. Condiciones de realización de la RT.	81
Tabla 7. Secuencia de los cebadores utilizados.	82
Tabla 8. Cantidades utilizadas por reacción.	82
Tabla 9. Condiciones de temperatura y tiempo de la qRT-PCR.	82
Tabla 10. Cebadores utilizados para analizar las mutaciones en TP53.....	83
Tabla 11. Anticuerpos primarios utilizados.....	87
Tabla 12. Anticuerpos secundarios utilizados.....	87
Tabla 13. Componentes del medio específico para el crecimiento de esferas.....	93
Tabla 14. Expresión de SIRT1 en las muestras de tejido tumoral y no tumoral de los pacientes con CCR.....	97
Tabla 15. Expresión de los marcadores CD133 y CD44 en las muestras de tejido tumoral y no tumoral de los pacientes con CCR.....	98
Tabla 16. Relación entre la expresión relativa de SIRT1, las características clinicopatológicas de los pacientes con CCR y el estado de p53.	99
Tabla 17. Resultados de correlación de SIRT1 y los genes del reloj circadiano.	101
Tabla 18. Resultados del análisis cosinor de la expresión de los genes del reloj tras el tratamiento con agomelatina 0.5 mM o melatonina 1 mM en la línea celular HCT-116.....	117
Tabla 19. Resultados del análisis cosinor de la expresión de los genes del reloj tras el tratamiento con agomelatina 0.5 mM o melatonina 1 mM en la línea HCT-116 p53 null.	118
Tabla 20. Resultados del análisis cosinor de la expresión del gen Sirt1 tras el tratamiento con agomelatina 0.5 mM o melatonina 1 mM en las líneas celulares HCT-116 y HCT-116 p53 null.....	120
Tabla 21. Resultados del análisis cosinor del gen Prx1 tras el tratamiento con agomelatina 0.5 mM o melatonina 1 mM en las líneas celulares HCT-116 y HCT-16 p53 null.....	122

ÍNDICE DE FIGURAS (ANEXOS)

Figura A 1. Datos brutos del análisis del ciclo celular por Citometría de flujo en la línea celular HCT-116 en condiciones control y después del tratamiento con agomelatina o melatonina	177
Figura A 2. Datos brutos del análisis del ciclo celular por citometría de flujo en la línea celular HCT-116 p53 <i>null</i> en condiciones control y después de los tratamientos con agomelatina o melatonina.....	178
Figura A 3. Datos brutos del análisis de apoptosis por citometría de flujo en la línea celular HCT-116 en condiciones control y después del tratamiento con agomelatina o melatonina	179
Figura A 4. Datos brutos del análisis de apoptosis por citometría de flujo en la línea celular HCT-116 p53 <i>null</i> en condiciones control (A) y después del tratamiento con agomelatina o melatonina.....	180
Figura A 5. Nivel de expresión del ARNm de los diferentes genes del reloj: Per1, Per2, Per3, Cry1, Clock, Bmal1 y Nr1d2 en las células HCT-116 y en las células HCT-116 p53 <i>null</i> tras el tratamiento con agomelatina 0.25 o 0.5 mM.	182
Figura A 6. Nivel de expresión del ARNm de los diferentes genes del reloj: Per1, Per2, Per3, Cry1, Clock, Bmal y Nr1d2 en las células HCT-116 y en las células HCT-116 p53 <i>null</i> tras el tratamiento con melatonina 0.5 o 1 mM.....	186
Figura A 7. Representación gráfica de la expresión de ARNm del gen Sirt1 bajo condiciones control y de tratamiento con Agomelatina 0.25 o 0.5 mM en las células HCT-116 y HCT-116 p53 <i>null</i>	188
Figura A 8. Representación de los niveles de ARNm de Sirt1 bajo condiciones de control y de tratamiento con melatonina 0.5 mM o 1 mM en las células HCT-116 y HCT-116 p53 <i>null</i>	189
Figura A 9. Expresión del nivel de ARNm del gen Prx1 tras el tratamiento con agomelatina 0.25 o 0.5 mM en las líneas celulares HCT-116 y HCT-116 p53 <i>null</i>	190
Figura A 10. Expresión del ARNm del gen Prx1 tras el tratamiento con melatonina 0.5 o 1mM en la línea celular HCT-116 y HCT-116 p53 <i>null</i>	190

ÍNDICE DE TABLAS (ANEXOS)

Tabla A1. Receta para la preparación de geles de poliacrilamida	175
Tabla A 2. Porcentaje de gel utilizado en función de la proteína de estudio	175
Tabla A 3. Configuración del citómetro FACS Aria IIIu utilizado para el desarrollo de los experimentos recogidos en este manuscrito.....	176
Tabla A 4. Resultados del análisis cosinor de los genes del reloj tras el tratamiento con agomelatina 0.25 y 0.5 mM en la línea celular HCT-116.....	183
Tabla A 5. Características del análisis cosinor de cada uno de los genes después del tratamiento con agomelatina 0.25 o 0.5 mM en la línea celular HCT-116 p53 <i>null</i>	184
Tabla A 6. Características del análisis cosinor para cada uno de los genes tras el tratamiento con melatonina 0.5 o 1 mM en la línea celular HCT-116.....	187
Tabla A 7. Resultados del análisis cosinor para cada uno de los genes del reloj tras el tratamiento con melatonina 0.5 o 1 mM en la línea celular HCT-116 p53 <i>null</i>	188
Tabla A 8. Resultados del análisis cosinor del gen Sirt1 tras el tratamiento con agomelatina 0.25 o 0.5 mM en las líneas celulares HCT-116 y HCT-116 p53 <i>null</i>	189
Tabla A 9. Resultados del análisis cosinor para el gen Sirt1 tras el tratamiento con melatonina 0.5 o 1 mM en las células HCT-116 y HCT-116 p53 <i>null</i>	189
Tabla A 10. Resultados del análisis cosinor para el gen Prx1 tras el tratamiento con agomelatina 0.25 o 0.5 mM en las células HCT-116 y HCT-116 p53 <i>null</i>	190
Tabla A 11. Resultados del análisis cosinor para el gen Prx1 tras el tratamiento con melatonina 0.5 mM o 1mM en las células hct-116 y hct-116 p53 <i>null</i>	191

ABREVIATURAS

5-FU: 5-fluorouracilo

AA-NAT: Arilalquilamina N-acetiltransferasa

AGO: agomelatina

ADN: ácido desoxirribonucleico

ALDH1: enzima aldefluor deshidrogenasa

ALT: alanina transaminasa

APC: adenomatous polyposis coli

APS: persulfato de amonio

AR: receptor de andrógenos

ARE: elemento de respuesta antioxidante

ARN: ácido ribonucleico

ASMT: N-Acetilserotonina O-metiltransferasa

Atg: genes relacionados con autofagia

ATM: ataxia teleangiectasia

BAX: proteína X asociada a BCL-2

BCL-2: linfoma 2 de células B

BMAL: brain and muscle ARNT-like

BRAF: proto oncogen B-RAF

CBC: células columnares de la base

CCG: genes controlados por el reloj

CCHNP: Cáncer colorrectal hereditario no polipósico

CCR: cáncer colorrectal

CDK:

CES: enzima carboxilesterasa

CKIε: casein kinasa Iε

CIMP: fenotipo metilador de las islas CpG

CIN: inestabilidad cromosómica

CM: célula madre

CMC: célula madre cancerosa

CLOCK: circadian locomotor cycles kaput

CREB:

CRTT: ciclo retroalimentado de transcripción-traslación

CRY: criptocromo

CTD: dominio regulador C-terminal

Cul3: cullina 3

CXCL2: Chemokine (C-X-C motif) ligand 2

DBD: dominio de unión a secuencias específicas del ADN

DDR: damage DNA repair

DFS: supervivencia libre de enfermedad (disease free survival)

DPD: enzima dihidropirimidina deshidrogenasa

EGFR: epidermal growth factor receptor

EMA: agencia europea de evaluación de medicamentos

ER: receptor de estrógenos

ERN: especie reactiva de nitrógeno

ERO: especie reactiva de oxígeno

FBS: suero bovino fetal

FITC: fluoresceína isocianato

FOXO-1: forkhead box protein 1

GWAS: genome wide association studies

HAT: histona acetiltransferasa

HDI: índice de desarrollo humano

IF: inhibidor de fosfatasa

IHC: inmunohistoquímica

IMC: índice de masa corporal

IP: Ioduro de propidio

Keap1: kelch like ECH associated protein 1

LOH: pérdida de la heterocigosidad

LXR: receptor X del hígado

MDM2: Mouse double minute 2 homolog

MEL: melatonina

MESOR: midline estimating statistic of rhythm

MMR: reparación por apareamiento erróneo (mismatch repair)

MSI: inestabilidad microsatelital

MT: receptor de melatonina

MTT: 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide

NAD: nicotinamida adenina dinucleótido

NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

NAMPT: nicotinamida fosforribosil transferasa

Nr1d2: receptor nuclear subfamilia 1 grupo D miembro 2

Nrf2: nuclear factor erytroide 2 related factor.

NSQ: núcleo supraquiasmático

NTD: dominio N-terminal

OMS: Organización Munidal de la Salud

OS: supervivencia (Overall survival)

PAF: poliposis adenomata familiar

PAGE: gel de poliacrilamida para electroforesis

PARP: poli (ADP-ribosa)

PBS: tampón fosfato salino (Phosphate buffer saline)

Per: period

PGC1 α : Peroxisome proliferator-activated receptor γ co-activator 1 α

PI: yoduro de Propidio

PIK3CA: phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha

PMSF: fluoruro de fenilmetilsulfonilo (inhibidor de proteasas)

Prx: peroxirredoxina

PUMA: modulador de apoptosis regulado al alza por p53

qRT-PCR: PCR cuantitativa

RIPA: Radio-Immunoprecipitation Assay

RM: receptores de muerte

ROR α : RAR related orphan receptor α

RT: transcripci

SDS: sodio dodecil sulfato

SEOM: Sociedad Espaola de Oncologfa Mdica

SIRT1: sirtuina 1

SNC: sistema nervioso central

Srx: sulforredoxina

SSRIs: inhibidores selectivos de la recaptaci3n de serotonina

TAD: dominio de transactivaci3n

TBP: tata-binding protein

TCA: 1cido tricarboxilico

TEM: transici3n epitelio mes3nquima

TET: dominio de tetramerizaci3n

TGF: transforming growth factor

TNF: factor de necrosis tumoral

TNM: clasificaci3n tumor/met1stasis/n3dulo

TS: enzima timidilato sintasa

TSG: gen supresor de tumores

UBC: ubiquitina C

VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular

WNT: Wingless-related integration site

RESUMEN

El cáncer colorrectal (CCR) a nivel mundial es el tercer tipo en cuanto a diagnóstico y causa de muerte por cáncer. A pesar de la gran cantidad de avances que se están produciendo en cuanto a prevención, diagnóstico y tratamiento, continúa presentando una alta recidiva y una baja supervivencia. Por ello, es necesaria la descripción de nuevos biomarcadores y el desarrollo de nuevos tratamientos.

El CCR se caracteriza por una gran heterogeneidad celular, debido, en parte, a la presencia de células madre cancerígenas (CMCs). Esta subpoblación de células se considera responsable del inicio del cáncer, pero además se ha relacionado con el proceso de recidiva, metástasis, capacidad de autorrenovación o desarrollo de resistencia a los tratamientos. Por ello, este tipo celular se está utilizando como diana terapéutica. Uno de los tratamientos utilizados como primera línea terapéutica frente al CCR es el 5-Fluorouracilo (5-FU). Una gran cantidad de pacientes desarrollan resistencias frente a él, además de los graves efectos secundarios derivados de su uso. Por esta razón, uno de los principales objetivos en el campo de investigación del CCR es el desarrollo de nuevos fármacos o el uso combinado de los ya existentes, con el fin de aumentar la sensibilidad celular, disminuir los efectos secundarios y aumentar la supervivencia de los pacientes.

A pesar de la mejora observada tras el uso combinado de estos tratamientos, gran parte de los pacientes no se están beneficiando de dicha terapia. Este efecto podría estar relacionado con el estado del represor tumoral p53, el cual se encuentra mutado o sin actividad en más del 50% de los pacientes con CCR, y cuya funcionalidad es fundamental para la eficacia del 5-FU. Por esta razón, apremia la necesidad de encontrar estrategias de tratamiento más efectivas frente a este tipo tumoral teniendo en cuenta no solo las características tumorales sino también las del propio paciente, aplicando la medicina personalizada.

Hace tiempo que se conoce la implicación de Sirt1 en la resistencia al tratamiento con 5-FU. Dada la gran cantidad de funciones que desempeña esta enzima desacetilasa de clase III en el proceso de tumorigénesis y su implicación con el represor tumoral p53, se propuso identificar la causa de la dualidad descrita para Sirt1 en el proceso de desarrollo tumoral, lo que además permitiría su uso como un nuevo biomarcador.

El principal objetivo de este trabajo fue evaluar el papel que presenta Sirt1 en cuanto al desarrollo tumoral en CCR teniendo en cuenta el estado del represor tumoral p53 como posible vía de acción.

Con el fin de desarrollar estos objetivos se comprobó el nivel de expresión de Sirt1 en muestras tumorales de pacientes con CCR, los cuales se organizaron en función del estado de p53. Viendo que el incremento en la expresión de Sirt1 era dependiente del estado del represor tumoral, solamente se producía cuando este se encontraba en estado salvaje. En estos mismos pacientes se observó una elevada expresión de marcadores de CMCs, lo que explicaría el papel dual de Sirt1 en el CCR descrito en la bibliografía. Dada la importante relación entre SIRT1 y los ritmos circadianos, se analizó la posible correlación entre los genes del reloj principal y la expresión de SIRT1 en estas mismas muestras de pacientes. Se observó una correlación entre la expresión de Per1 y Per3 con la expresión de SIRT1 en los tumores que presentaban p53 en estado salvaje y mutado, respectivamente en los casos con marcadores de CMCs elevados, indicando una posible relación entre ellos.

Para corroborar estos resultados, se realizaron estudios *in vitro*, se utilizaron 2 líneas celulares estables de CCR con diferente estado de p53, en las que se silenció de manera estable Sirt1. Después estudiar factores como la proliferación, viabilidad, apoptosis celular y fenotipificación de CMCs, se observó que el silenciamiento de Sirt1 en células con p53 no funcional, hace que estas se comporten de manera más agresiva, mientras que en la línea celular con p53 salvaje ocurre todo lo contrario.

Dada la relación entre Sirt1 y la regulación de los ritmos circadianos, se comprobó si el silenciamiento de este influía en la ritmicidad de estos genes, en función de su estado y del de p53. Se observaron cambios en los parámetros de ritmicidad en todos los genes estudiados (Clock, Per2y Prx1). Las modificaciones fueron diferentes para cada uno de ellos y dependientes del estado de p53, excepto en el caso de Clock donde el silenciamiento de Sirt1 indujo un adelanto de la acrofase en ambas líneas.

Estos resultados demuestran que el papel dual descrito para Sirt1 en el CCR podría deberse a su comportamiento según el estado de p53. Además, actúa a través de la regulación de los ritmos circadianos.

Debido a que Sirt1 se encuentra implicado en la regulación de los ritmos circadianos, muy relacionados con el proceso de homeostasis celular y desarrollo tumoral, se planteó el uso de reguladores de su expresión como posibles tratamientos para el CCR. Un conocido regulador de Sirt1 es la melatonina, una indolamina relacionada con la regulación de los ritmos circadianos a nivel central. Puesto que se ha descrito que esta propiedad la lleva a cabo a través de

sus receptores de membrana, nos planteamos la posibilidad de usar un agonista de la melatonina como posible tratamiento para este tipo de cáncer.

La comprobación del efecto de la melatonina se realizó tanto en modelos *in vivo* como *in vitro*. La melatonina indujo la inhibición del crecimiento celular en los dos modelos utilizados, dio lugar a parada del ciclo celular e incrementó la apoptosis. Aunque estos efectos únicamente fueron significativos cuando p53 se encontraba en estado salvaje.

Teniendo en cuenta las limitaciones observadas a partir del tratamiento con melatonina, se estudió el efecto tras el tratamiento con agomelatina. Este compuesto es un agonista de los receptores de la melatonina MT1 y MT2, y un antagonista del receptor de la serotonina HT_{2c}, que presenta una mayor afinidad frente a estos receptores. Actualmente se utiliza como tratamiento frente a la depresión y otros trastornos neurológicos, a través de la resincronización de los ritmos circadianos. Por ello, se planteó utilizar dicho tratamiento en el CCR dada la importancia de estos procesos en el desarrollo tumoral. Este tratamiento inhibió el crecimiento celular en los modelos *in vivo* e *in vitro* utilizados. También indujo parada del ciclo y apoptosis dependiente de caspasas. El efecto de la agomelatina observado fue independiente del estado de p53, aunque el efecto sobre la reducción del crecimiento celular fue más eficaz en presencia de p53 en estado salvaje, al menos en el modelo *in vitro*.

Tanto la melatonina como la agomelatina fueron capaces de resincronizar los ritmos de Per1, Per2, Per3, Cry1 y Clock en células que presentaban p53 en estado salvaje, aunque los cambios producidos en los parámetros de ritmicidad estudiados fueron más bruscos en el caso del tratamiento con agomelatina. Por su parte en ausencia de p53 el número de genes regulados por ambos fármacos fue menor que lo observado en la otra línea celular. Estos resultados corroboran la influencia que presenta el reloj circadiano sobre el efecto antiproliferativo observado tras el uso de estos tratamientos.

También se analizó el efecto de dichas terapias sobre las CMCs, ya que se ha descrito que esta subpoblación presenta un ritmo circadiano muy robusto. El tratamiento con melatonina indujo un cambio fenotípico de estas células hacia otro menos agresivo únicamente en aquellas que presentaban p53 en estado salvaje. Por su parte la agomelatina incrementó en las células con p53 sin actividad, la capacidad de renovación, la actividad aldefluor deshidrogenasa y el porcentaje de células con una alta expresión de marcadores de CMCs.

Ambos tratamientos redujeron su efectividad en cuanto a la disminución de la viabilidad cuando Sirt1 no se encontraba presente. En cuanto a la distribución de las células en el ciclo celular, se observó un efecto contrario en función del estado de p53. En las células con p53 activo se produjo un incremento de células fase G0/G1, mientras que sin p53 se produjo un incremento de la fase S. Al analizar los efectos en el modelo *in vivo*, se comprobó como el efecto citotóxico de la melatonina si era dependiente de Sirt1, lo que únicamente se producía en aquellas células que presentaban p53 en estado salvaje. Sin embargo, el tratamiento con agomelatina no indujo ningún efecto dependiente del estado de Sirt1 y/o p53. La inducción de la autofagia por parte de la agomelatina fue dependiente del estado de Sirt1. De manera general, el tratamiento con agomelatina sobre células que presenten p53 nulo y Sirt1 silenciado presenta una peor efectividad, ya que se incrementan las características de CMCs y estas presentan una mayor agresividad.

Por último, al estudiar el efecto de los tratamientos sobre la regulación de los ritmos en función del estado de p53 y de Sirt1, se observó que las modificaciones producidas fueron diferentes. El tratamiento con agomelatina modificó al menos uno de los parámetros estudiados en todos los casos, excepto en ausencia de p53 en el gen Clock. Mientras que la melatonina únicamente indujo cambios la ritmicidad de Clock en presencia de p53, y en Per2 y Prx1 cuando p53 no se encontraba presente.

ABSTRACT

Colorectal cancer (CRC) is the third leading type of cancer worldwide in terms of new diagnosis and mortality rates. Despite the progress made in prevention, diagnosis and treatment over the last few years, it continues to have a high recurrence and low survival rates. As a result, the description of new biomarkers along with the development of new treatments are still needed.

One of the main characteristics of this type of cancer is its high cellular heterogeneity, partly, due to the presence of cancer stem cells (CSCs). This subpopulation of cells is considered to be responsible for cancer initiation, but it has also been linked to the process of recurrence, metastasis, self-renewal capacity and development of resistance to treatments. This is the reason for using this cell type as a therapeutic target.

When treating patients for the first time 5-Fluorouracil (5-FU) is one of the main therapies used. However, a large number of patients develop resistance to it, in addition to the serious side effects associated with its use. For this reason, one of the main objectives in the field of CRC research is not only to develop new therapies but to increase cell sensitivity with existing drugs combinations reducing side effects and increasing patient's survival.

Despite the improvement observed after using combinations of these treatments, a large proportion of patients are not benefiting from such therapy. This may be related to the status of the tumour repressor p53, which is mutated or inactive in more than 50% of CRC patients, and whose functionality is critical for the efficacy of 5-FU. For this reason, there is an urgent need to find more effective treatment strategies for this type of tumour, taking into account not only the characteristics of the tumour but also of the patient, applying individualized medicine.

The involvement of Sirt1 in resistance to 5-FU treatment has long been known. Given the many functions of this class III deacetylase enzyme in the process of tumorigenesis and its involvement with the tumour repressor p53, it was proposed to identify the cause of the duality described for Sirt1 in the tumour development process, which would also allow its use as a new biomarker.

The main objective of this work was to evaluate the role of Sirt1 in CRC tumour development, taking into account the status of the tumour repressor p53 as a possible pathway of action.

In order to develop these goals, the level of Sirt1 expression was tested in tumour samples from CRC patients, which were classified according to p53 status. It was found that the increase in Sirt1 expression was dependent on the

status of the tumour repressor, only occurring when the repressor was in the wild-type state. In these same patients, elevated expression of CSCs markers was observed, which would explain the dual role of Sirt1 in CRC described in the literature. Given the important relationship between SIRT1 and circadian rhythms, the possible correlation between master clock genes and SIRT1 expression was analysed in these same patient samples. A correlation between Per1 and Per3 expression and SIRT1 expression was observed in tumours with wild-type and mutated p53, respectively in cases with elevated CSCs markers, indicating a possible relationship between them.

In order To corroborate these results, in vitro studies were performed. Two stable CRC cell lines with different p53 status, in which Sirt1 was stably silenced, were used. After studying factors such as proliferation, viability, cell apoptosis and phenotyping of CSCs, it was observed that silencing Sirt1 in cells with non-functional p53 causes them to behave more aggressively, while the opposite occurs in the cell line with wild-type p53.

Given the relationship between Sirt1 and the regulation of circadian rhythms, it was tested whether silencing Sirt1 influenced the rhythmicity of these genes, depending on their status and that of p53. Changes in rhythmicity parameters were observed in all the genes studied (Clock, Per2 and Prx1). The modifications were different for each of them and dependent on p53 status, except in the case of Clock where Sirt1 silencing induced an acrophase advance in both lines.

These results demonstrate that the dual role described for Sirt1 in CRC could be due to its p53 status-dependent behaviour. In addition, it acts through the regulation of circadian rhythms.

Because Sirt1 is involved in the regulation of circadian rhythms, which are closely related to the process of cell homeostasis and tumour development, the use of regulators of its expression as possible treatments for CRC has been proposed. melatonin, an indolamine involved in the regulation of circadian rhythms at the central level, is known to be a Sirt1 regulator. Since it has been described that this property is carried out through its membrane receptors, it was considered the possibility of using a melatonin agonist as a possible treatment for this type of cancer.

The effect of melatonin was tested in both in vivo and in vitro models. Melatonin induced cell growth inhibition in both models used, resulted in cell cycle arrest

and increased apoptosis. However, these effects were only significant when p53 was in the wild-type state.

Given the limitations observed with melatonin treatment, the effect after treatment with agomelatine was also considered. This compound is an agonist of the melatonin receptors MT1 and MT2, and an antagonist of the serotonin receptor HT_{2C}, which has a higher affinity for these receptors. It is currently used as a treatment for depression and other neurological disorders, through the resynchronisation of circadian rhythms. Therefore, it was proposed to use this treatment in CRC given the importance of these processes in tumour development. This treatment inhibited cell growth in the *in vivo* and *in vitro* models used. It also induced cycle arrest and caspase-dependent apoptosis. Although agomelatine's effect was independent of p53 status, the effect on cell growth reduction was more effective in the presence of wild-type p53, at least in the *in vitro* model.

Both melatonin and agomelatine were able to resynchronise the rhythms of Per1, Per2, Per3, Cry1 and Clock in cells with wild-type p53, although the changes in the rhythmicity parameters studied were more abrupt when using agomelatine. In the absence of p53, the number of genes regulated by both drugs was lower than the one observed in the other cell line. These results corroborate the influence of the circadian clock on the antiproliferative effect observed after the use of these treatments.

The effect of these therapies on CMCs was also analysed, as this subpopulation has been described as having a very robust circadian rhythm. Treatment with melatonin induced a phenotypic shift towards a less aggressive one only in cells with wild-type p53. Agomelatine increased the renewal capacity, aldefluor dehydrogenase activity and the percentage of cells with a high expression of CMC markers in cells with inactivated p53.

Both treatments were less effective in reducing viability when Sirt1 was not present. As for the distribution of cells in the cell cycle, an opposite effect was observed as a function of p53 status. In cells with active p53, there was an increase in G0/G1 phase cells, while without p53 there was an increase in S phase. When analysing the effects in the *in vivo* model, the cytotoxic effect of melatonin was found to be Sirt1-dependent, which only occurred in cells with wild-type p53. However, agomelatine treatment did not induce any Sirt1 and/or p53 status-dependent effect. The induction of autophagy by agomelatine was dependent on Sirt1 status. In general, agomelatine treatment of p53-null and Sirt1-silenced cells

is less effective, as CSC characteristics are increased and CSCs are more aggressive.

Finally, when studying the effect of treatments on the regulation of rhythms according to the p53 and Sirt1 status, it was observed that the modifications produced were different. Treatment with agomelatine modified at least one of the parameters studied in all cases, except in the absence of p53 in the Clock gene where melatonin only induced changes in the rhythmicity of Clock in the presence of p53, and in Per2 and Prx1 when p53 was not present.

INTRODUCCIÓN

1. CÁNCER

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) el término cáncer engloba un amplio y heterogéneo grupo de enfermedades genéticas caracterizadas por el crecimiento celular descontrolado y por la propagación de células malignas.

A pesar de los grandes esfuerzos que se están llevando a cabo en el campo de la investigación, es una de las principales causas de muerte, con una alta tasa de morbilidad y mortalidad a nivel mundial. En 2020 se produjeron 10 millones de muertes por esta causa, y se estima que esta cifra aumente hasta los 28.4 millones en 2040 (Sung et al., 2021a).

2. CÁNCER COLORECTAL (CCR)

a. Epidemiología, incidencia y mortalidad

El Cáncer Colorrectal (CCR), también conocido como **adenocarcinoma colorrectal**, engloba un grupo muy heterogéneo de enfermedades que se agrupan en dos tipos de cáncer: de colon (tercer tipo más diagnosticado a nivel mundial) (Fabregas et al., 2022) y de recto (8º tipo más diagnosticado a nivel mundial) (Dekker et al., 2019; Sung et al., 2021a). Cuando se tienen en cuenta de manera conjunta ambos tipos y sexos, es el tercer tipo de cáncer más diagnosticado. Supone un 11% de todos los casos (Fabregas et al., 2022; Rawla et al., 2019) y es la tercera causa de muerte por cáncer en el mundo, tras el cáncer de pulmón y el de pecho (Sung et al., 2021a; Xie et al., 2020).

Se está observando un descenso de la incidencia en los últimos años gracias al trabajo que se está llevando a cabo en términos de detección temprana, cribado, diagnóstico y tratamiento (Arnold et al., 2017). A pesar de ello, se estima que va a producirse un aumento de casos cercano al 60%, alcanzando los 2.2 millones de casos y 1.1 millones de muertes anuales en 2030; lo que en gran medida se deberá a un cambio en el estilo de vida, pero sobre todo al aumento en la longevidad de la población (Arnold et al., 2017; Rawla et al., 2019).

Existe una gran variabilidad geográfica, la cual se asocia tanto a los diferentes estilos de vida, como a factores ambientales y nutricionales. Cerca de un 55% de los casos se da en los países desarrollados (Arnold et al., 2017; Sung et al., 2021a) (**Figura 1**).

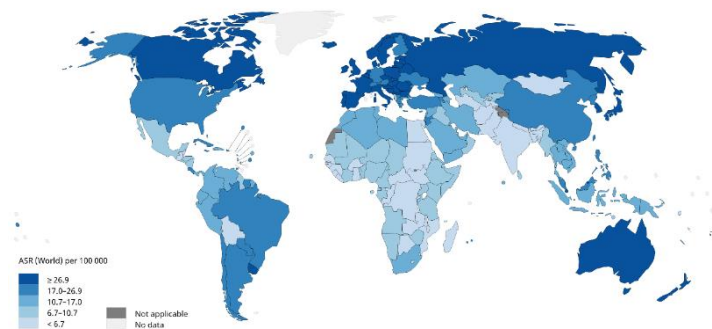


Figura 1. Distribución de la incidencia del CCR a nivel mundial (Sung et al., 2021).

A pesar de estos datos, es importante destacar que en los últimos 5 años se ha producido un aumento de la tasa de supervivencia, debido principalmente a las mejoras en el diagnóstico (Dekker et al., 2019; Sung et al., 2021a).

En España, el número de casos ha aumentado en la última década, presentando un riesgo general de padecerlo de un 3.5%. Es uno de los 13 países a nivel mundial con mayor mortalidad, y el país donde más tumores nuevos de este tipo se diagnosticaron en el año 2020 (Sung et al., 2021a). Está considerado como la segunda causa de muerte por cáncer, lo que supone unas 16.500 muertes por año. Se estima que en 2040 podrían originarse hasta 341.000 casos nuevos y 160.000 muertes anuales (Galceran et al., 2017).

b. Factores de riesgo

Hay numerosos factores de riesgo que pueden influir en el desarrollo de esta patología. Estos pueden agruparse en **modificables** y **no modificables**, la variación de los primeros permite reducir el riesgo de desarrollo.

- **Edad:** es el principal factor no modificable en cuanto a importancia. La edad media en el diagnóstico ronda los 70 años, aunque a partir de los 50 años aumenta significativamente la probabilidad de desarrollo. Actualmente el 90% de los casos se diagnostican en pacientes con edades superiores a 50 años (Dekker et al., 2019), pero en los últimos años se está produciendo un cambio de tendencia, y está aumentando el número de casos en edades más tempranas (inferiores a los 50 años). Este cambio está claramente influenciado por el cambio en el estilo de vida (Howren et al., 2021).
- **Raza y etnia:** son factores no modificables. Se han observado diferencias en los valores de supervivencia y mortalidad independientemente del estadio del tumor en el momento del diagnóstico. Los Afroamericanos y

Nativos Americanos presentan una menor tasa de supervivencia, aunque es posible que estos datos se vean más influenciados por el nivel de calidad de vida de ciertos países, en cuanto a la accesibilidad a una sanidad de calidad, a comida o a una educación nutricional; más que a caracteres genéticos propiamente dichos (Rawla et al., 2019).

- **Sexo:** es un factor de riesgo no modificable. El CCR afecta a ambos sexos, aunque hay una mayor incidencia en hombres, donde es el tercer tipo más común frente a las mujeres, donde, sin embargo, es el segundo tipo más común. Las ratios de incidencia y mortalidad son similares hasta los 50 años (Ferlay et al., 2015). A partir de esta edad la incidencia en mujeres es un 25% más baja que en hombres, pero la ratio de supervivencia a 5 años en hombres es más alta que en mujeres ya que estas suelen presentar neoplasias más agresivas (Dekker et al., 2019; Rawla et al., 2019).
- **Antecedentes familiares:** es un factor de riesgo no modificable, muy influenciado por el número, el grado de parentesco o la edad de diagnóstico de estos familiares, ya que son variables asociadas al riesgo de desarrollo del CCR (Schoen et al., 2015). Más de un 30% de los pacientes tienen familiares con neoplasias lo que probablemente les predisponga al desarrollo de la enfermedad (Cottet et al., 2012; Czene et al., 2002; Thanikachalam & Khan, 2019).
- **Otras enfermedades:** la presencia de enfermedades como la diabetes, la fibrosis quística (Rawla et al., 2019) o enfermedades inflamatorias intestinales como la colitis ulcerosa o la enfermedad de Crohn aumenta significativamente el riesgo de desarrollo de CCR (Eaden et al., 2001).
- **Estilo de vida:** es un factor de riesgo modificable, en el que las decisiones personales influyen de manera directa. Dentro de este grupo pueden englobarse un gran número de actividades como el tabaquismo o el alcoholismo (Arnold et al., 2017; Botteri et al., 2008) que incrementan el desarrollo de CCR. El nivel de actividad física, es un factor fundamental, ya que se ha observado que personas sedentarias con un IMC elevado tienen un incremento en el riesgo de desarrollo de entre el 19 y el 24% (Weiser et al., 2013).
- **Dieta:** es un factor de riesgo modificable que podría estar muy ligado a la variabilidad geográfica (Thanikachalam & Khan, 2019). Las poblaciones con dietas bajas en grasa presentan una incidencia de desarrollo menor que otras poblaciones en las que el consumo de carnes rojas o ultra

procesados suponen un alto porcentaje del aporte calórico de la dieta (Sung et al., 2021a).

Aunque se describen estas situaciones o condiciones como factores de riesgo, la mayoría de los factores que causan el CCR no están del todo claros y necesitan ser estudiados en mayor profundidad (Jiao et al., 2014).

c. Etiología

Este tipo de cáncer comienza generalmente con la proliferación no cancerosa de células glandulares y epiteliales del intestino grueso. Se produce en el momento en que estas células adquieren mutaciones que confieren ciertas ventajas para el desarrollo y crecimiento. Cuanto mayor es el tamaño de estos pólipos, mayor es el riesgo de desarrollo de la enfermedad (Rawla et al., 2019). Desde el inicio del engrosamiento de una cripta aberrante hasta el desarrollo tumoral “completo” pueden transcurrir entre 10 y 20 años, y solamente en un 10% de los casos se convierte en carcinoma (Rawla et al., 2019). La transición de adenoma a carcinoma, está asociada con la acumulación secuencial de mutaciones en las vías Wnt, EGFR, P53 y TGF- β (La Vecchia & Sebastián, 2020). En el caso de la vía p53, se producen mutaciones o pérdidas de función del gen supresor de tumores TP53 (Müller et al., 2016).

Se han descrito al menos tres líneas con diferencias a nivel molecular e histológico por las que tiene lugar este proceso de carcinogénesis (Mundade et al., 2014).

I. Vías moleculares

El desarrollo del pólipo será lo que determine qué tipo de clínica o patología seguirá el tumor (Müller et al., 2016) (**Figura 2**):

- **Vía serrada o fenotipo metilador (CIMP):** el fenotipo metilado de las islas CpG causado por inestabilidad epigenética, es una característica típica del CCR. La hipermetilación de estas islas inactiva genes supresores de tumores que están involucrados en la adhesión célula/célula, la apoptosis, la estabilidad del ADN o el desarrollo de metástasis, entre otras funciones. Los tumores que surgen por esta vía suponen un 35% de los casos diagnosticados (Poturnajova et al., 2021). Estos se caracterizan por mutaciones en los genes BRAF y KRAS (Müller et al., 2016); por localizarse cerca del colon y por ser más frecuente en el sexo femenino principalmente

en mujeres de edad avanzada (Mármol et al., 2017). Además, este tipo de tumores presentan una mala prognosis y una gran capacidad para el desarrollo de resistencias a los tratamientos (Müller et al., 2016).

- **Vía CIN (Inestabilidad cromosómica):** se desencadena la ganancia o pérdida de todo o gran parte del cromosoma, lo que provoca la activación de oncogenes (por ejemplo: KRAS o PIK3CA) (Müller et al., 2016), la pérdida de la heterocigosidad en el brazo largo del cromosoma 18 (18q) y la activación de genes supresores de tumores (TSGs) como APC y p53 que inducirán la proliferación celular (Malki et al., 2020; Mármol et al., 2017; Poturnajova et al., 2021). Este tipo de desarrollo se observa en un 80-85% de los casos esporádicos y de poliposis adenomatosa familiar (PAF) (Yiu & Yiu, 2016).
- **Vía MSI (inestabilidad microsomal):** se produce una inactivación de genes de reparación por apareamiento erróneo (MMR) que cambia el número de bases repetidas en un microsatélite por mutaciones en la línea germinal. Dan lugar a un 10-15% de todos los casos de CCR, habitualmente en las formas hereditarias (Sung et al., 2021a).

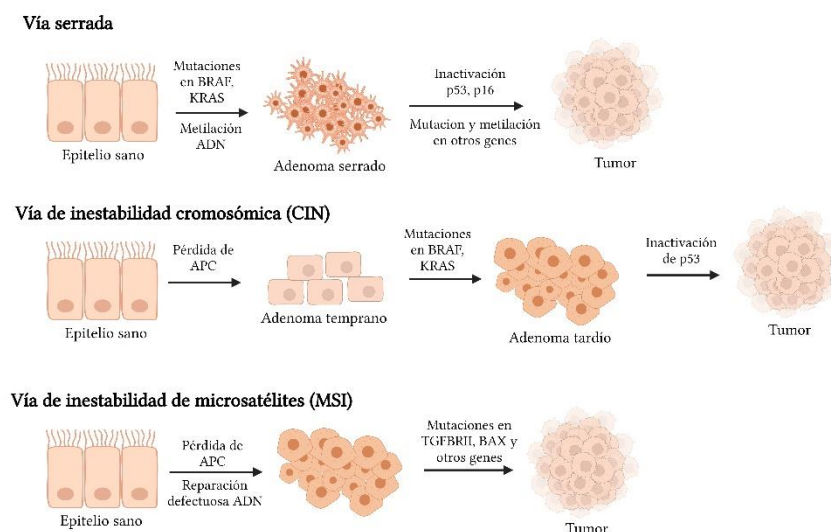


Figura 2. Vías de desarrollo de la carcinogénesis colorrectal. Adaptación de Dekker et al., 2019

Gracias a las técnicas genómicas actuales es posible detectar la diversidad mutacional y el genoma de las diferentes células que componen un tumor, lo que permite una mejora a nivel de diagnóstico, de intervención y de pronóstico (Fox & Loeb, 2014; Mármol et al., 2017).

II. Tipología

En función del origen de la mutación se pueden diferenciar 3 grupos tumorales diferentes (Malki et al., 2020):

- **Hereditarios:** se deben a mutaciones heredadas que afectan a uno de los alelos del gen mutado. Se clasifican en función de la presencia o no de pólipos (Stoffel & Kastrinos, 2014). Este tipo de tumores hereditarios suponen el 5% de los casos diagnosticados.
- **Espontáneos:** se desarrollan a partir de mutaciones puntuales que ocurren en cualquier momento de la vida, desencadenadas por factores externos. Implican una patogénesis muy variada en función del gen en que haya sufrido la mutación. Engloban el 70% de todos los casos de CCR diagnosticados (Stoffel & Kastrinos, 2014), la gran mayoría de ellos presentan modificaciones en la vía Wnt (Müller et al., 2016)
- **Familiares:** son pacientes con historial familiar de CCR, no se incluyen en hereditarios por no poderse agrupar en ninguna de las categorías incluidas en los tumores de tipo hereditario. Cerca de un 25% de los casos diagnosticados son de este tipo (Stoffel & Kastrinos, 2014).

d. Prevención, diagnóstico y tratamiento

El CCR es un tumor de crecimiento lento por lo que a menudo no es fácil diagnosticarlo a través de su sintomatología, al menos en estadios iniciales, por ello podría considerarse en gran medida como una enfermedad asintomática. Los principales síntomas que ponen en evidencia la presencia del tumor son la anemia o el dolor abdominal, en este momento ya se trata de un CCR en un estadio avanzado (Dekker et al., 2019).

Con el fin de prevenir la detección de este tipo tumoral en estadios muy avanzados, momento en que la supervivencia se ve disminuida considerablemente, se están incrementando los programas de cribado poblacional con los que detectar lesiones premalignas. Estas pruebas se realizan mediante el estudio de la presencia de sangre en las heces o por colonoscopia. Esta última es la prueba más completa, ya que permite identificar la presencia o no de pólipos malignos, localizarlos y extirparlos para su análisis; con una sensibilidad del 90-95% (Edwards et al., 2010).

Aunque siempre se analizará el caso de manera individualizada para cada paciente, la cirugía es el primer y único tratamiento a nivel curativo. Cuanto más

personalizado sea el tratamiento, en cuanto a las características propias del tumor y del paciente, mayor eficiencia se obtiene. Las terapias personalizadas son la gran esperanza para el aumento de la supervivencia (Haller et al., 2011) (**Figura 3**).

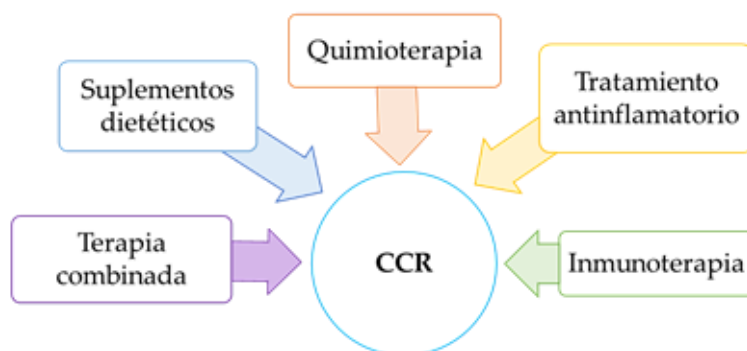


Figura 3. Posibles estrategias terapéuticas para el CCR

I. Cirugía

Está indicada principalmente cuando el tumor se encuentra en una zona muy acotada o incluso en pacientes metastásicos, pero de “fácil” intervención. A partir de los pólipos o tejidos extirpados durante la intervención es posible determinar el grado de diferenciación (**Tabla 1**) o el estadiaje (generalmente clasificación TNM, **Tabla 2**) en que se encuentra con lo que es posible determinar el nivel de pronóstico o supervivencia mediante técnicas histológicas que permitan el estudio de biomarcadores (Aroca-Siendones et al., 2021).

Tabla 1. Clasificación de los grados de diferenciación de los tumores en CCR.

Gx	El grado no puede ser valorado
G1	Bien diferenciado
G2	Moderadamente diferenciado
G3	Pobremente diferenciado
G4	indiferenciado

Tabla 2. Clasificación TNM de los tumores en CCR.

T (Tumor primario)	Tx	no se puede valorar
	T0	no hay evidencia de tumor primario
	Tis	carcinoma in situ; intraepitelial o invasión de la lámina propia.
	T1	Invasión de la submucosa
	T2	Invasión de muscularis propia
	T3	Invasión serosa, grasa
	T4a	Perforación del peritoneo visceral
	T4b	Invasión de otros órganos o estructuras
N (Nódulos linfáticos regionales)	Nx	No se puede valorar
	N0	Sin afección ganglionar
	N1a	1 ganglio linfático regional afectado
	N1b	2-3 ganglios linfáticos regionales afectados
	N1c	Depósitos de tumor
	N2	4 o más ganglios afectados
	N2c	4-6 ganglios afectados
	N2b	7 o más ganglios afectados
M (Metástasis a distancia)	Mx	No se puede estimar
	M0	Sin evidencia de metástasis a distancia
	M1	Metástasis en uno o más órganos a distancia
	M1a	Metástasis en un órgano a distancia sin metástasis peritoneal
	M1b	Metástasis en dos o más órganos a distancia
	M1c	Metástasis peritoneal aislada o en otros órganos

II. Quimioterapia

La combinación de quimio y radio es la terapia más utilizada, en la gran mayoría de pacientes reduce considerablemente el tamaño tumoral, incluso en un 15-20% de los casos hace que desaparezca por completo. El tratamiento adyuvante es un tratamiento sistémico cuya eficacia y necesidad variará en función del estadio del tumor (André et al., 2009).

El CCR es un tumor con una baja sensibilidad a la quimioterapia, aun así, hay agentes efectivos como las **fluoropirimidinas** (fluorouracilo o capecitabina) cuyo uso aumenta la supervivencia. Si este tratamiento se hace de manera combinada con un factor biológico (VEGF o anti-EGFR) mejora la eficacia (Falcone et al., 2007).

La radio-quimio terapia ha mostrado su eficacia en reducir y controlar el tumor, aunque conlleva una gran cantidad de efectos secundarios (inflamación,

dolor, eritema o ulceración, entre otros) (Wu et al., 2019). Además, este tipo de tratamientos pierden su efectividad lo que se debe al **desarrollo de resistencias** frente a ellos por parte de las células tumorales; de ahí la importancia de la generación de nuevas terapias (Xie et al., 2020).

III. 5-Fluoruracilo

El **5-Fluorouracilo** (5-FU) es el agente quimioterápico más utilizado y efectivo en el tratamiento del CCR, tiene la capacidad de detener la división celular (de células cancerígenas) e inducir el proceso apoptótico.

Es un análogo sintético del uracilo e inhibe la síntesis de la enzima timidilato sintasa (TS), así como su incorporación al ADN y al ARN (Longley et al., 2003). La TS es una enzima dependiente de folato que cataliza la producción de una fuente de *novó* intracelular de timidilato, que es un precursor de timina y por lo tanto esencial para la biosíntesis de ADN. Por ello, la administración de 5-FU provoca la inhibición de la división y el crecimiento tumoral (Karthika et al., 2021; Sakatani et al., 2019) (**Figura 4**).

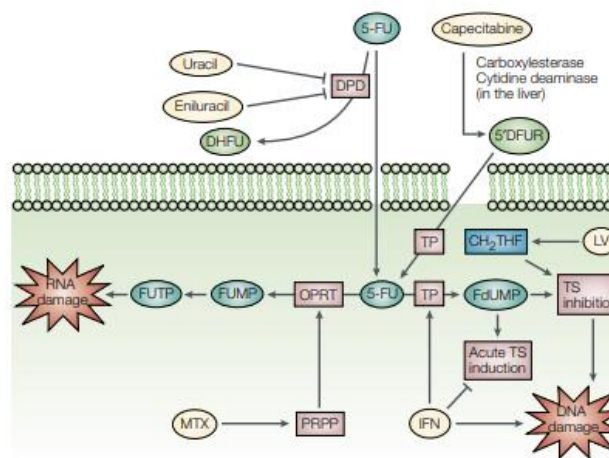


Figura 4. Ruta de acción del 5-FU (Longley et al., 2003).

La administración de 5-FU induce un gran número de efectos secundarios, además, un alto porcentaje de pacientes desarrollan resistencias frente a él (Pariente et al., 2018); de ahí el gran hincapié que se está haciendo en el desarrollo de terapias combinadas que disminuyan tanto la resistencia como los efectos secundarios (Karthika et al., 2021).

Las combinaciones más comunes son **FOLFOX** (5-FU + Oxaliplatino) y/o **FOLFIRI** (5-FU + Irinotecan) utilizadas sobretudo en CCR de tipo metastásico (Yiu & Yiu, 2016) en los que se ha conseguido aumentar la supervivencia hasta

en 2 años (Lu et al., 2020; Vodenkova et al., 2020). A pesar de esta mejora, en un 50% de los pacientes no se observa ningún efecto positivo, sino que el cáncer empeora y se desencadenan serios efectos secundarios por la toxicidad de la terapia. La terapia combinada triple **FOLFOXIRI** (5-FU + Irinotecan + Oxaliplatino) reduce el riesgo de muerte y de progresión tumoral, pero los efectos secundarios derivados de su toxicidad son muy graves (Lu et al., 2020). Todo esto hace que este tipo de quimioterapia no sea tan efectiva.

Los mecanismos por los que las células llegan a adquirir esta resistencia son muy diferentes, pudiendo ser de tipo intrínseco o adquirido, a partir de las características propias del tumor o por mecanismos diferentes que impliquen alteraciones en la TS, mutaciones de pérdida de función de genes tan importantes en el desarrollo tumoral como p53 (Vodenkova et al., 2020).

La respuesta terapéutica del 5-FU es inversamente proporcional a los niveles de expresión de la TS en el tumor. La sobreexpresión de esta enzima posiblemente sea una de las vías de adquisición de resistencia al tratamiento, ya que podría modificar el fenotipo celular provocando alteraciones como el descenso de la transcripción del gen p53, vía directa de disminución de la eficacia de la quimioterapia por afectar un gen involucrado en la apoptosis (Sabeti Aghabozorgi et al., 2020).

El desarrollo de nuevas terapias es esencial para conseguir una mayor tasa de supervivencia, una menor cantidad de efectos secundarios y un mayor número de pacientes que puedan beneficiarse de ellas. Por eso, se está trabajando en el uso de nuevos tratamientos como es la **melatonina** (Vaiopoulos et al., 2012).

e. Recurrencia, metástasis y supervivencia

A pesar de la gran cantidad de avances que se han llevado a cabo el pronóstico de este tipo tumoral se ha estancado y un elevado porcentaje de pacientes sufre un proceso de recaída tras el tratamiento (Aroca-Siendones et al., 2021). Estas recaídas pueden deberse al desconocimiento de las características moleculares y biológicas del tumor en particular, o del CCR en general (Rawla et al., 2019; Xu et al., 2020). Se describen diferentes tipos en función del punto donde se produzcan:

- **Recidiva local:** aparición de células tumorales en el mismo punto donde tuvo lugar la aparición del primer tumor.

- **Recidiva regional:** el tumor se origina en los ganglios linfáticos o en tejidos cercanos al punto de aparición del tumor original.
- **Recidiva metastásica:** se desarrolla un tumor en un órgano diferente al del tumor inicial (Cancer.org).

Cerca de un 50% de los pacientes sufren recaída tras la cirugía (Z. G. Wang et al., 2010) por ello se acompaña de radioterapia pre-operatoria, lo que disminuye el riesgo de recidiva local (B. Ma et al., 2017).

A pesar de los beneficios que presenta la terapia a nivel de regresión tumoral no se ha visto incrementada la tasa global de supervivencia (Dekker et al., 2019). Esta no solo depende del tipo de recidiva sino también del estadio en que se diagnostique el tumor. El estadio tumoral en el momento del diagnóstico se considera el mejor factor pronóstico (Arnold et al., 2017). Solamente un 39.2% de los tumores se diagnostican en estadios precoces, los cuales presentan una supervivencia a 5 años del 90%. La tasa de supervivencia se ve reducida hasta un 64.6% si se diagnostican en cualquier otro estadio (Xu et al., 2020). Entre el 20 y el 25% de los tumores que se diagnostican se encuentran en estadio metastásico y más del 50% de los pacientes desarrollan metástasis hepáticas en los tres años siguientes al diagnóstico (Thanikachalam & Khan, 2019; Van der Jeught et al., 2018) (**Tabla 3**).

Tabla 3. Porcentaje de supervivencia en función del estadio tumoral en el momento del diagnóstico.

Estadio en el diagnóstico	% supervivencia
I	93.2
IIA	84.7
IIB	83.4
IIIA	72.2
IIIB	61.4
IIIC	44.3
IV o metastásico	8.1

A pesar del aumento en la incidencia observado en los países desarrollados, se ha producido un aumento en la supervivencia gracias al desarrollo de nuevos tratamientos, los cribados poblacionales, los test genéticos y la extirpación temprana de pólipos (Rawla et al., 2019).

3. CÉLULAS MADRE CANCERÍGENAS (CMCs)

a. Epitelio colónico y Células Madre

El colon es una de las tres partes en que se divide el intestino grueso. Su estructura a nivel histológico es bastante similar a la presente en el resto del aparato digestivo. Está constituido por 6 capas de células, cada una de ellas con unas características propias. Una de estas capas es el epitelio colónico, el cual se encuentra formado por células columnares simples que forman invaginaciones dando lugar a las criptas intestinales de Lieberkün (**Figura 5**). Este epitelio presenta una gran capacidad de regeneración ya que tiene la posibilidad de renovarse cada 3-4 días (Foerster et al., 2022; Huels & Sansom, 2015).

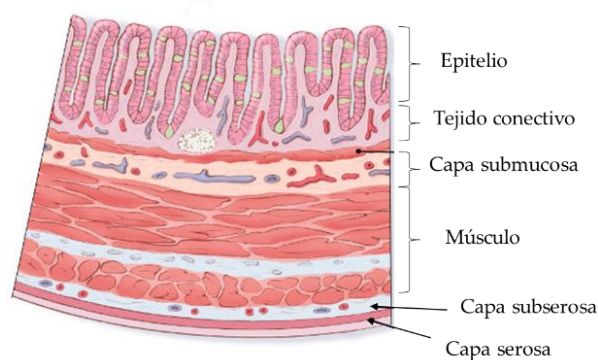


Figura 5. Capas de células que forman la pared del colon (Adaptado de Cancer.org)

En el fondo de las criptas de Lieberkün hay unas células pequeñas e indiferenciadas con capacidad para dividirse, denominadas **células columnares de la base de la cripta (CBC)**. Se consideran las células Madre (CM) intestinales de las que derivan todos los tipos celulares de este tejido. Pueden dividirse de manera asimétrica originando células hijas exactamente idénticas y células que proliferan y se diferencian durante su movimiento ascendente a lo largo de la cripta dando lugar a enterocitos, células endocrinas o células calciformes (Foerster et al., 2022; Huels & Sansom, 2015; Humphries & Wright, 2008; Munro et al., 2018; van der Wath et al., 2013). Con el fin de mantener una renovación constante, las células precursoras de la parte basal de la cripta migran continuamente hasta su parte más apical (Beumer & Clevers, 2016; Foerster et al., 2022; Hoyle & O'Neill, 2015; Huels & Sansom, 2015) (**Figura 6**).

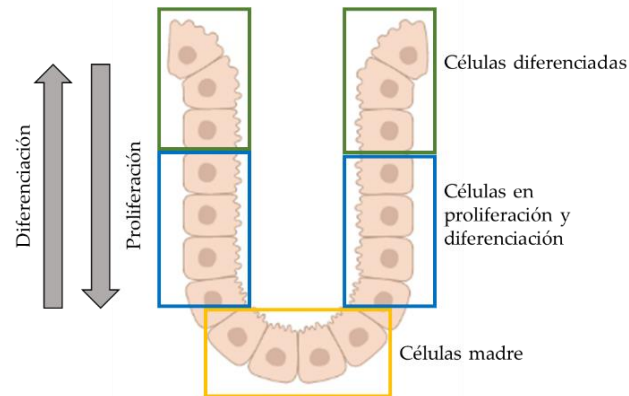


Figura 6. Proceso de diferenciación celular en el intestino (Beumer & Clevers, 2016).

El proceso de migración y por lo tanto de **diferenciación celular** se encuentra mediado por la vía Wnt. El correcto funcionamiento de esta vía en el epitelio del colon es esencial para el mantenimiento del estado proliferativo de las células que lo componen (Sancho et al., 2003), lo que permite mantener el potencial proliferativo de la cripta, y por lo tanto garantizar el nicho de CM, frenando a su vez la diferenciación (Huels & Sansom, 2015). Además cualquier modificación en esta barrera epitelial desencadenará patologías intestinales de diversa gravedad (Foerster et al., 2022).

La vía Wnt se encuentra muy conservada en el desarrollo de tejidos y órganos, y en procesos tumorales (Giles et al., 2003). Comienza con la activación de Frizzled, una vez activo se fosforila la proteína Dishevelled que interacciona con la axina previniendo la actividad de la proteína GSK-3 β . Cuya acumulación se produce a nivel citoplasmático, de forma que la β -catenina, uno sus principales sustratos, se trasloca al núcleo y activa la transcripción de genes dianas de Wnt como son c-Myc o la ciclina D1. La inactivación de la β -catenina favorece la modificación del ciclo celular, en lo que también interviene la proteína APC (Clements & Kimelman, 2003).

b. Células Madre Cancerígenas

El proceso de desarrollo tumoral comienza con la transformación de células normales en células tumorales, lo que se debe a cambios genéticos y a factores ambientales (Ríos-Arrabal, Muñoz-Gámez, Jiménez-Ruíz, et al., 2016). Los tumores están formados por un conjunto de células genéticamente diferentes (Eun et al., 2017; Solomon et al., 2018), entre las que se encuentra una subpoblación denominada células madre cancerígenas (CMCs) (Eun et al., 2017; Najafi et al., 2019).

Inicialmente, las CMCs, se describieron como una pequeña subpoblación con capacidad para iniciar un tumor (Eun et al., 2017; Ríos-Arrabal, Muñoz-Gámez, ManuelJiménez-Ruíz, et al., 2016), ya que presentan una gran plasticidad que permite la transición epitelio-mesénquima (TEM) (Eun et al., 2017). Podrían ser las responsables tanto del origen como del desarrollo de la metástasis tumoral o la resistencia de los tratamientos y las recaídas, ya que presentan características de células madre embrionarias (Kreso & Dick, 2014; Ricci-Vitiani et al., 2010; Shimokawa et al., 2017; Zheng et al., 2013).

El fenotipo maligno de estas células no solo depende de sus propias características intrínsecas, sino también de las características del microentorno en el que se encuentran (Eun et al., 2017; Najafi et al., 2019; Ríos-Arrabal, Muñoz-Gámez, Jiménez-Ruíz, et al., 2016).

En ocasiones los tumores residuales cuentan con una gran cantidad de CMCs, que son esenciales para la reaparición tumoral después del tratamiento (cirugía o quimioterapia), ya que se encuentran generalmente en un estado de quiescencia que les hace ser resistentes al propio tratamiento. Por lo tanto, son la causa principal para tener un pobre pronóstico de supervivencia (Najafi et al., 2019).

Han sido identificadas CMCs en diversos tipos tumorales como leucemia, cáncer de mama, de colon, de piel o de pulmón, entre otros (Najafi et al., 2019; Ríos-Arrabal, Muñoz-Gámez, Jiménez-Ruíz, et al., 2016).

c. Origen

Se han propuesto dos modelos para la descripción del origen y diversidad de este tipo de células, el **modelo estocástico** (o de evolución clonal) y el **modelo jerárquico** (o de células madre cancerígenas). El primero establece que todas las células que forman parte del tumor son capaces de iniciarlo y propagarlo. La heterogeneidad celular se debe a las diferentes mutaciones genéticas adquiridas, lo que genera distintas subpoblaciones dentro del tumor. Mientras que el modelo jerárquico sostiene que las células que forman los tumores se encuentran organizadas jerárquicamente (Kreso & Dick, 2014; Munro et al., 2018; Ricci-Vitiani et al., 2010).

La teoría inicial que consideraba las CMC como un pequeño subtipo celular capaz de mantener el crecimiento del tumor y que explicaba la recurrencia, la quiescencia tumoral o la metástasis (Najafi et al., 2019) ha evolucionado, dando

lugar a lo que se conoce como **modelo dinámico**. En este nuevo modelo las CMCs no son consideradas únicamente como células raras y/o quiescentes, sino que pueden ser una población abundante y con una alta capacidad de proliferación. Además, las jerarquías en las que pueden estar organizadas presentan relativa plasticidad fenotípica desarrollada por las condiciones del microentorno. Estas características hacen que sean más complicados los procesos de identificación y erradicación de este tipo celular (Batlle & Clevers, 2017a).

d. Características de las CMCs

Muchas de las características presentes en este tipo celular son las mismas que caracterizan a las CM normales (Najafi et al., 2019; Ríos-Arrabal, Muñoz-Gámez, Jiménez-Ruíz, et al., 2016).

Presentan la capacidad de **autorrenovación** o de proliferación ilimitada, por tener una proliferación lenta o ser células quiescentes, así como evadir el sistema inmune pudiendo dar lugar a un nuevo tumor a partir de un pequeño número de células (Angelis et al., 2016; Manhas et al., 2016; Najafi et al., 2019; Vaiopoulos et al., 2012; Zeilstra et al., 2014). Son capaces de dividirse de manera asimétrica lo que les permite diferenciarse en células cancerosas heterogéneas con una gran variabilidad de mecanismos protectores y plasticidad. Son células que han perdido el control de la replicación y la diferenciación, lo que dará lugar a la tumorigénesis (Humphries & Wright, 2008; Najafi et al., 2019; Ricci-Vitiani et al., 2010) y a una mayor tasa de crecimiento tumoral (Angelis et al., 2016; Najafi et al., 2019; Vaiopoulos et al., 2012; Yh et al., 2020). Además, no solo son capaces de evadir el sistema inmune, sino también las terapias que actualmente se utilizan para la erradicación del cáncer (Dierickx et al., 2018). Todas estas características son las que dificultan el tratamiento del cáncer (Sabeti Aghabozorgi et al., 2020; Yh et al., 2020).

Otro de los procesos en el que se encuentran implicadas es la **diseminación metastásica** con lo que presentan la capacidad de colonizar nuevos tejidos y generar tumores similares al tumor primario (Saif & Chu, 2010). Además, tiene una alta capacidad angiogénica, mediante la secreción de factores angiogénicos vasculares como el VEGF y CXCL12 que favorecen este proceso en las células endoteliales (Najafi et al., 2019).

Se ha descrito una relación entre la cantidad de CMCs, el pronóstico y la agresividad tumoral (Angelis et al., 2016; Najafi et al., 2019; Vaiopoulos et al., 2012; Yh et al., 2020). Por ello, en los últimos años se ha hecho gran hincapié en

mejorar su identificación, en cuanto a fenotipo y subpoblaciones, así como conocer el mecanismo de diferenciación (Najafi et al., 2019).

e. Características de las CMCs en colon

Como ya se ha descrito anteriormente las CMCs comparten características fenotípicas y moleculares con el resto de CM normales; esta misma característica se observa en el caso de las CMCs del colon y el resto de células del intestino (Hirata et al., 2019). Las CMCs de colon presentan un fenotipo y funcionalidad muy heterogénea, lo que se debe en gran medida a que son poblaciones muy dinámicas. Su naturaleza heterogénea y dinámica es lo que origina los principales problemas para establecer las estrategias de tratamiento del CCR (Hirata et al., 2019).

La alta capacidad de autorrenovación del epitelio colónico a partir de las células madre del intestino (CBCs) favorece la aparición de mutaciones en el ADN. Estas mutaciones darán lugar a la transformación de las CMs en CMCs, lo que provocará el inicio y la progresión del CCR. Aunque también se ha descrito que incluso células intestinales perfectamente diferenciadas pueden iniciar la tumorigénesis, aunque requiere de otros procesos como mutaciones, cambios en el microambiente o procesos de inflamación (Hirata et al., 2019).

En muchos de los casos, estas mutaciones inducen la activación de la señalización Wnt/ β -catetina a través de APC (Hirata et al., 2019; Huels & Sansom, 2015). Esta ruta tiene un papel esencial en el desarrollo de CMCs. Además, es un potente mecanismo que puede inducir el inicio de la formación de adenomas. Solo las células que presentan una elevada activación de Wnt poseen características de CMCs (Huels & Sansom, 2015).

f. Identificación de CMCs

La identificación de las CMCs es bastante compleja, lo que se debe a su elevada plasticidad y a que se encuentran dispersas entre los distintos tipos celulares que componen el tumor (Najafi et al., 2019). Este proceso se basa principalmente en la expresión y la detección de una serie de **marcadores de superficie** (CD44, CD133, EpCam-326, Lgr5, etc.), de **factores de transcripción** (Nanog, Sox2, OCT3/4) (Manhas et al., 2016; Todaro et al., 2010; Wielenga et al., 1999), así como el resultado de la actividad aldehído deshidrogenasa 1 (ALDH1) o la capacidad de autorrenovación.

Una de las funciones clave de los marcadores de superficie es mediar en la adhesión entre las células y el propio nicho (Najafi et al., 2019). El estudio de estos marcadores puede conducir al desarrollo de tratamientos más seguros y eficaces. Entre los más utilizados en el caso de tumores sólidos se encuentran CD44, CD34, CD166, CD133 y ALDH1, y en el caso del CCR, el estudio se centra en los siguientes marcadores:

- **CD44:** es una glicoproteína transmembrana que interviene en la adhesión, proliferación, crecimiento, supervivencia, migración, diferenciación celular y angiogénesis. La sobreexpresión de este marcador otorga la capacidad metastásica a las células tumorales (Manhas et al., 2016; Vaiopoulos et al., 2012; Wielenga et al., 1999). Su transcripción se activa en parte por la señalización de la β -catenina lo que está descrito como un acontecimiento temprano en la transformación del adenoma colorrectal en carcinoma (Dalerba et al., 2007; Du et al., 2008, p. 44; Wielenga et al., 1999).
- **CD166:** es una glicoproteína formada por múltiples dominios transmembrana cuya expresión en cáncer está relacionada con su agresividad. Las células que expresan esta glucoproteína (al igual que presentan ALDH1) muestran mayor capacidad clonogénica, tumorogénica y potencial multilíneaje (Manhas et al., 2016; Vaiopoulos et al., 2012; Wu, S. et al., 2003).
- **CD133:** es una glicoproteína transmembrana que está involucrada en la organización de la membrana plasmática. Aunque no se conoce con exactitud su función en las CMC en las que se expresa, se ha visto que está relacionado con una peor prognosis y menores tasas de supervivencia. Algunas de las funciones en las que parece intervenir son la angiogénesis, la división asimétrica y la autorrenovación celular (Manhas et al., 2016; Vaiopoulos et al., 2012). Las poblaciones positivas para CD133 han mostrado una mayor expresión de genes de reparación del ADN y de genes antiapoptóticos con respecto a otras poblaciones, lo que las relaciona con una mayor capacidad de resistencia a tratamientos (Saif & Chu, 2010).
- **CD326 (EpCAM):** es una glicoproteína transmembrana que se ve sobreexpresada en las células cancerosas. Está implicada en importantes funciones como la adhesión intracelular, la migración celular, la proliferación, la diferenciación y la señalización incluso podría estar involucrada en la carcinogénesis del CCR (Dana et al., 2020).
- **Aldehído deshidrogenasa 1 (ALDH1):** es una enzima NAD(P) dependiente que protege a las células contra el daño oxidativo, gracias a

su capacidad de oxidar los aldehídos intracelulares y de convertir el retinol en ácido retinoico (Todaro et al., 2010; Vaiopoulos et al., 2012). Se ha utilizado para aclarar el papel de CD133 como marcador de CMC, ya que las células que presentan un marcaje positivo para ambos marcadores tienen un mayor potencial de formación de tumores (S. Ma et al., 2008). Se relaciona con la tumorigénesis y con las características metastásicas en las CMCs (Najafi et al., 2019).

- **Lgr5:** es un marcador de células madre intestinal que es expresado en CMCs en pacientes con CCR. Su expresión se asocia con la capacidad clonogénica y la producción de progenie bajo una diferenciación progresiva (Najafi et al., 2019; Z. Zhang & Huang, 2013). Se encuentra sobreexpresado en tumores primarios de CCR y en procesos de metástasis distante (Z. Zhang & Huang, 2013).
- **NANOG:** es un factor de transcripción implicado en la reprogramación celular capaz de inducir pluripotencia. Se considera que presenta un papel oncogénico porque otorga la capacidad de autorrenovación y proliferación celular en CMs no diferenciadas (Osama et al., 2016). Por su gran implicación en el proceso tumoral, se está considerando como una nueva diana terapéutica o un biomarcador de diagnóstico, pronóstico y tratamiento. (Jeter et al., 2015).
- **Oct3/4:** este factor de transcripción desempeña un papel fundamental en el proceso de TEM, un paso clave en la progresión del cáncer y la metástasis.
- **Sox2:** factor de transcripción que se expresa en células madre tanto embrionarias como adultas, desarrolla un papel esencial para la autorrenovación, la reprogramación y la homeostasis celular. La sobreexpresión de este gen se asocia con una baja supervivencia de los pacientes, ya que promueve la proliferación, invasión/metástasis, desarrollo de CMCs y resistencia al tratamiento (Sabeti Aghabozorgi et al., 2020; Zhang et al., 2020).

4. GEN TP53

El gen TP53 es uno de los genes supresores de tumores mejor caracterizados. Se localiza en el brazo corto del cromosoma 17 (17 p13.1), consta de 13 exones de los cuales 11 son los responsables de codificar la proteína p53, la cual se constituye por 393 aminoácidos y 3 dominios (N-terminal, central y C-terminal) (Mármol et al., 2017).

La función fundamental de p53 es actuar, en situaciones de estrés celular, como factor de transcripción de distintos genes que se activan tras un proceso de daño celular. Algunos de estos genes están encargados de controlar la reparación del ADN, la proliferación, la senescencia o la muerte celular (Kruiswijk et al., 2015; Zawacka-Pankau, 2022). Induce la expresión de receptores de muerte (RM) a través de la ruta de la Caspasa-8 (Y. Lin et al., 2000). Bloquea la formación de filipodios y fibronectina, con lo que se inhibe la migración celular y por lo tanto la invasión de otros tejidos (Parrales & Iwakuma, 2015).

No solo actúa como un factor de transcripción sino que también actúa a nivel metabólico y de mantenimiento de la integridad genética, lo que le permite mantener la homeostasis celular en situaciones de estrés y actuar como supresor tumoral (Flöter et al., 2017).

En condiciones normales, fisiológicamente hablando, el nivel de expresión de p53 se mantiene bajo. Estos niveles de expresión se producen gracias a la ubiquitinación y posterior degradación mediada por su regulador negativo MDM2, dentro de un ciclo de retroalimentación negativa. P53 es degradado en el proteosoma tras su ubiquitinación (Parrales & Iwakuma, 2015).

P53 puede ser modificado mediante procesos de fosforilación y acetilación, lo que desencadena unas funciones u otras según el estado en que se encuentre o el gen sobre el que actúe. La desacetilación de p53 puede llevarse a cabo por el complejo PID/HDAC1 o por la enzima SIRT1. Dos de los genes que regula son p16 y p21, responsables de codificar inhibidores de la quinasa dependiente de ciclina 2A y 1A que promueven el arresto del ciclo celular en fase G1 o G2, la senescencia celular, el aumento de las proteínas pro-apoptóticas (BAX, PUMA, etc.) o la disminución de la proteína anti-apoptótica BCL-2; lo que induce el proceso de apoptosis (Yi & Luo, 2010).

a. P53 y cáncer

El gen TP53 presenta una gran relevancia en el área de oncología molecular, ya que es uno de los genes más importantes para suprimir la formación tumoral. En el momento en que este gen se modifica o pierde su actividad, se inhibe la capacidad de controlar el crecimiento y la muerte celular, lo que da lugar a procesos cancerígenos (Bunz et al., 1999).

La mayoría de los tumores presentan la actividad de p53 alterada, ya sea por mutaciones a nivel del gen que pueden invertir su función, o a nivel proteico donde en ocasiones esta proteína puede permanecer inactiva en el citoplasma sin poder desarrollar correctamente su función (Zawacka-Pankau, 2022). A partir de diversos estudios realizados en ratones, se ha observado que cuando p53 se encuentra mutado no solo pierde sus funciones principales, sino que desarrolla nuevas funciones como es la inducción de la angiogénesis, de la metástasis, la inactivación de otros miembros de la familia de proteínas p53 o la resistencia a tratamientos, y todos estos procesos favorecen el crecimiento y desarrollo tumoral. Las mutaciones que hacen que los tumores presenten un carácter más agresivo son principalmente aquellas que originan una ganancia de función de dicho gen (Huang et al., 2018; Meek, 2015; Müller et al., 2016).

Además, en este estado mutado tiene la capacidad de inhibir a p53 en estado salvaje, por lo que tampoco podrá desempeñar su función normal (Ozaki & Nakagawara, 2011) (**Figura 7**).

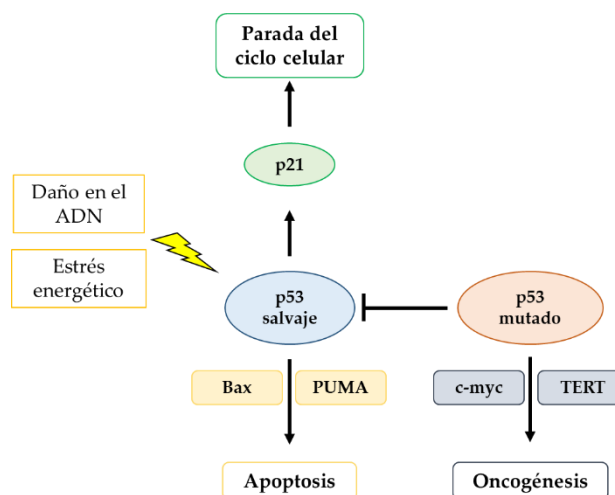


Figura 7. Esquema de la implicación de p53 en el desarrollo tumoral. Adaptación de Ozaki & Nakagawa, 2011

b. p53 y CCR

Más del 50% de los pacientes diagnosticados de CCR presentan mutaciones en p53 (Malki et al., 2020; Mármol et al., 2017). Las mutaciones más frecuentes en este gen son de tipo *missense*, aunque también se han descrito otras de tipo *non-sense*, que representan entre el 5 y 7% de las descritas, las mutaciones *frame-shift*, que suponen un porcentaje similar al de las anteriores, las mutaciones *in frame insertions/deletions* y las mutaciones sinónimas, que suponen menos de un 5%, cada una (Duffy et al., 2022).

También se ha visto la implicación de este gen en la efectividad del tratamiento del CCR con 5-FU. Esta relación se debe a que el proceso de apoptosis que induce este fármaco se produce a través de p53. Por lo tanto, cualquier alteración que sufra este gen afectará de manera directa a la efectividad o toxicidad de este tratamiento (Malki et al., 2020; Mármol et al., 2017; Yh et al., 2020). Esta idea se apoya en resultados tanto *in vivo* como *in vitro*, en los que la pérdida de función de p53 induce un descenso de la sensibilidad al 5-FU (Sabeti Aghabozorgi et al., 2020). En líneas celulares estables se ha demostrado que una pérdida del dominio de unión de la proteína p53 incrementa la proliferación celular, ya que induce la entrada de las células en fase S e inhibe la apoptosis, lo que disminuye la eficacia del tratamiento con 5-FU (Vodenkova et al., 2020).

Se ha descrito también que una prolongada exposición a 5-FU de las células tumorales, produce una desregulación de p53 que desencadena la ganancia de funciones oncogénicas (invasión tisular, metástasis, evasión de muerte celular, etc.), lo que podría desencadenar un aumento de CMCs y con ello un aumento de la resistencia a los distintos tratamientos quimioterápicos (Karthika et al., 2021; Solomon et al., 2018).

Por todo ello, el restablecimiento de p53 se ha convertido en una de las principales dianas de investigación dentro del CCR, ya que su implicación es fundamental en la supervivencia, adaptación al estrés celular o en cuanto a la eficacia y toxicidad del tratamiento. De ahí la importancia de la caracterización de p53 en los pacientes de manera individualizada con el fin de un tratamiento personalizado.

c. p53 y CMCs

Hay una relación directa entre p53 y la activación de las CMCs (Yh et al., 2020). Como se ha descrito anteriormente, las CMCs pueden derivar a partir de distintos tipos celulares, entre las que se encuentran las CMs que sufren alteraciones a partir de mutaciones. Uno de los genes responsables del mantenimiento de la estabilidad genómica de las células y por lo tanto de evitar la formación de las CMCs es p53. De hecho, se ha descrito que una de las causas de desarrollo del fenotipo *stem* deriva de mutaciones en p53, lo que conlleva un aumento de la agresividad del tumor y un peor pronóstico (Solomon et al., 2018; Yh et al., 2020) (**Figura 8**).

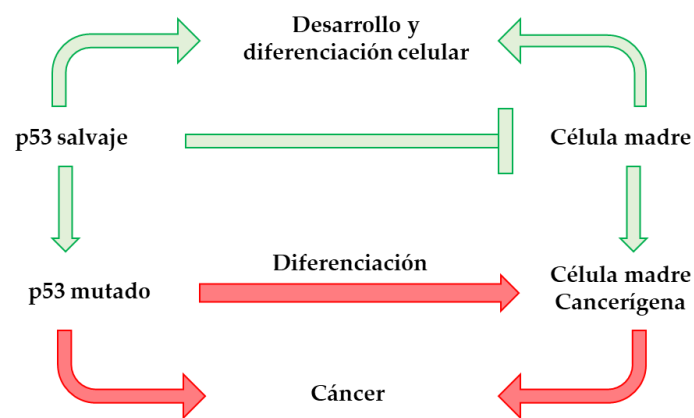


Figura 8. Relación entre p53 y la adquisición del fenotipo CMC. Adaptado de Shetzar et al., 2014

5. RITMOS CIRCADIANOS

El hecho de que la tierra gire sobre su propio eje cada 24 horas origina ciclos de luz/oscuridad que presentan gran influencia sobre el comportamiento de los organismos (Dierickx et al., 2018).

Los ritmos circadianos son procesos biológicos rítmicos con un periodo cercano a 24 horas, son endógenos y permanecen en condiciones constantes y sincronizados con el medio de su entorno. Tienen la capacidad de reestablecerse si sufren cambios extremos (Gallego & Virshup, 2007). La disfunción de los ritmos circadianos se relaciona con un amplio rango de enfermedades como es la depresión, la inflamación, las enfermedades cardíacas, la diabetes o el cáncer (Robinson & Reddy, 2014).

El papel principal de los ritmos circadianos es mantener la homeostasis y la regeneración tisular, ya que son responsables de guiar el metabolismo, la autorrenovación y la diferenciación celular, por lo tanto son los encargados de crear heterogeneidad celular en un tejido, protegiendo al propio tejido de su degradación (Dierickx et al., 2018).

En mamíferos, el sistema circadiano presenta una arquitectura jerárquica. La luz es recibida por la retina que se transmite hasta el sistema nervioso central (SNC), donde se localiza el **reloj endógeno principal**, situado en el núcleo supraesquiasmático (NSQ) del hipotálamo (Dierickx et al., 2018; Patton & Hastings, 2018), que mantiene la ritmicidad en función de los estímulos externos (Robinson & Reddy, 2014). El reloj endógeno principal se encarga de transmitir esta sincronización a los **relojes** de los tejidos **periféricos** (hígado, riñón, intestino, piel o pulmón) los cuales oscilan independientemente del reloj principal (Robinson & Reddy, 2014). Se ha demostrado que otras señales, como el uso de fármacos o la ingesta de alimentos también son capaces de desarrollar esta sincronización (Balsalobre et al., 2000; Ray et al., 2020; Sa et al., 2005) (**Figura 9**). La acción de comer está bajo un control circadiano, pero no depende del sistema principal; lo que demuestra que el mantenimiento de la ritmicidad tiene lugar por la conexión entre múltiples osciladores (Stokkan et al., 2001).

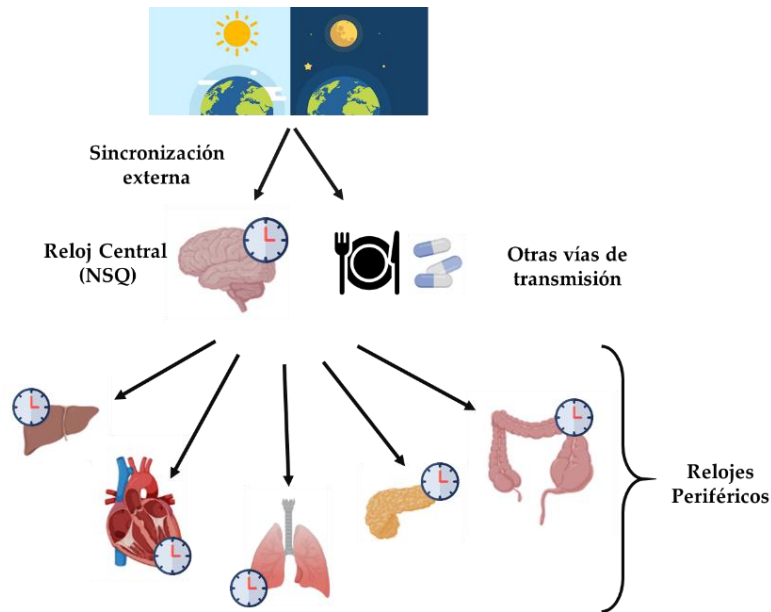


Figura 9. Esquema de la localización de los relojes circadianos en el organismo y su regulación.

El reloj circadiano molecular consiste en **ciclos retroalimentados de transcripción-traslación (CRTT)**. En mamíferos, el factor de transcripción **BMAL1** (*Brain and muscle Arnt-like protein*) dimeriza con **CLOCK** (*circadian locomotor output cycles kaput*), lo que estimula la transcripción de los genes **Per1-3** (*Period 1-3*) y **Cry1-2** (*Criptocromo*) mediante la interacción con el elemento promotor E-box. Las proteínas PER1-3 y CRY1-2 forman complejos en el citoplasma. Cuando la concentración alcanza un determinado nivel, se traslocan al núcleo donde inhiben la acción de BMAL1 y CLOCK, y, por tanto, la transcripción de sus propios genes. Los complejos PER/CRY se degradan en el **proteasoma** tras ser ubiquitinizados y fosforilados por la Casein kinasa Iε (CKIε). Estos procesos eliminan la inhibición sobre CLOCK y BMAL1, permitiendo que el ciclo se restaure cada 24 horas. Existe un **ciclo complementario** o secundario en el que el heterodímero BMAL1/CLOCK controla la expresión de los receptores nucleares **REV-ERB** (REV-ERBα y REV-ERBβ/Nr1d2) y **RORα** que regulan el ciclo principal (**Figura 10**). Estos receptores se unen al promotor de Bmal1 para inhibir o promover su transcripción, respectivamente (Robinson & Reddy, 2014). Las interacciones proteicas dentro del reloj central constituyen un nivel más de regulación, ya que se encuentra modulada por la formación de enlaces disulfuro y de Zinc (Schmalen et al., 2014). También se dan modificaciones a nivel postraduccionales como la fosforilación, la acetilación, la ubiquitinación o la metilación (García-Costela et al., 2020a).

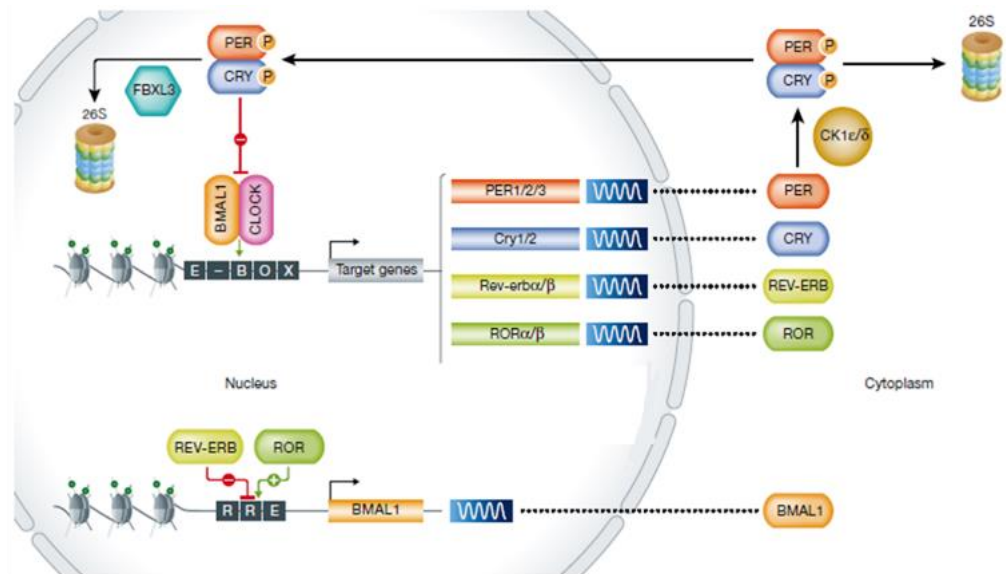


Figura 10. Componentes de la ruta molecular del reloj circadiano (Dierickx et al., 2018)

La gran cantidad de mecanismos reguladores del ritmo a nivel molecular, confieren ritmicidad a procesos importantes a nivel metabólico, fisiológico y celular (Becker-Weimann et al., 2004). En cuanto a estos últimos la maquinaria circadiana coordina la división celular, la respuesta al daño inducido al DNA y la remodelación de la cromatina (Kelleher et al., 2014).

Las proteínas del reloj circadiano son capaces de controlar la expresión rítmica de los **genes controlados por el reloj** (CCG). Estos genes son específicos de cada tejido, y, por lo tanto, son los responsables de los requisitos y características propias de cada órgano (Robinson & Reddy, 2014).

a. Ritmos circadianos y cáncer

El proceso de desarrollo tumoral o tumorigénesis está muy relacionado con la pérdida de la homeostasis celular, lo que se debe a la transformación celular favorecida por la aberración metabólica (Sahar & Sassone-Corsi, 2009). En el caso concreto del CCR existe una relación muy fuerte entre la disrupción circadiana y el desarrollo de este tipo tumoral (Rao & Lin, 2022).

Estudios epidemiológicos llevados a cabo en personas con trabajos con cambios de turnos sugieren una correlación entre la desregulación de los ritmos circadianos y la susceptibilidad a desarrollar cáncer (Tsuchiya et al., 2020). En los últimos años gran cantidad de estudios consideran que las alteraciones que se producen a nivel circadiano contribuyen de manera positiva a la aparición de múltiples patologías y al desarrollo de un gran número de tipos de cáncer

(próstata, mama, colon o pulmón, entre otros) (Kettner et al., 2016; Papagiannakopoulos et al., 2016; Rijo-Ferreira & Takahashi, 2019). Tanto es así que la OMS determinó la alteración circadiana como un probable carcinógeno, con influencia sobre la eficacia de los tratamientos y asociado a una baja supervivencia en los pacientes afectados (Sancar & Van Gelder, 2021; Shafi & Knudsen, 2019).

La funcionalidad del reloj circadiano endógeno es fundamental para el mantenimiento de la homeostasis celular, por lo que una desregulación de su funcionalidad se ha asociado con el proceso de origen y desarrollo tumoral. De hecho, se ha descrito la pérdida parcial o total de la funcionalidad del reloj circadiano en algunas células de una gran variedad de tipos tumorales (CCR, pancreático, gástrico, oral, pecho o pulmón, entre otros). (Fu & Kettner, 2013). El mecanismo por el que se producen estas modificaciones del reloj circadiano, y por lo tanto la pérdida de la funcionalidad aún continúa sin describirse de manera completa. (Tsuchiya et al., 2020). El ritmo circadiano se encuentra implicado en procesos clave para el desarrollo tumoral, que incluyen la diferenciación y ciclo celular, la respuesta al daño en el ADN y la apoptosis; todo ello por su relación con genes como p53, p21, p16, ciclina D1 o Wee1, entre otros (Shafi & Knudsen, 2019; Tsuchiya et al., 2020). Cambios en los ritmos circadianos de la división celular se consideran cambios importantes en cuanto a la transformación neoplásica (Ríos-Arrabal, Muñoz-Gámez, Jiménez-Ruíz, et al., 2016).

Gran cantidad de estudios describen como estas alteraciones pueden desarrollar tanto un **papel protector** como **oncogénico**. La desregulación de los genes centrales del reloj Per1, Per2, Per3, Cry1, Cry2, Bmal1 y Clock se encuentran en distintos tipos celulares (Fu & Kettner, 2013). De ahí que se plantee el uso de estos marcadores como indicadores de pronóstico, malignidad y evolución (Aroca-Siendones et al., 2021). Por ejemplo, los niveles de expresión de Per1-3 se encuentran alterados en cáncer de tipo pancreático, gástrico, colorrectal, pulmonar o de mama entre otros (Tsuchiya et al., 2020). En modelos animales, se han encontrado mutaciones en genes del reloj que conducen a una mayor formación de tumores (Kettner et al., 2016; Papagiannakopoulos et al., 2016). Aunque continúan sin conocerse los mecanismos por los que esto ocurre, se ha planteado una regulación epigenética como un posible mecanismo (Tsuchiya et al., 2020).

Existe una gran relación molecular entre el reloj circadiano y el ciclo celular, de hecho, el primero actúa como un punto de control adicional en el proceso de mitosis. Diversos estudios describen que los distintos componentes del reloj circadiano pueden inducir o reprimir la progresión del ciclo celular dependiendo de la hora del día, de hecho, cada fase puede ser potencialmente influenciada por el reloj circadiano. Por ejemplo, en la fase G1, Nr1d2 y ROR α/γ reprimen la transcripción de CDK promoviendo la progresión del ciclo celular. Por su parte, Per1 inhibe la transición G1-S, lo que origina la detección del ciclo celular. Cry1 promueve la progresión del ciclo al inhibir a WEE1 que también se encuentra regulado por BMAL/CLOCK lo que conlleva la detección del ciclo celular (Abbas & Dutta, 2009; Levens, 2002). Todo esto hace que los ritmos circadianos presenten gran influencia sobre el ciclo celular, aunque su efecto dependerá del contexto celular (Shafi & Knudsen, 2019).

Se ha descrito que los genes del ritmo circadiano son capaces de regular la **apoptosis**, ya sea restringiéndola o promoviendo su actuación, lo que también dependerá del contexto celular. Los genes Cry1/2 y Per1 se encuentran implicados en los procesos de apoptosis. La supresión de Per1 origina la inhibición de BCL-2 y la activación de BAX, aumentando el proceso de apoptosis a través de la vía dependiente de TNF α (Matsunaga, 2011).

Otro de los procesos en los que se encuentra implicado el reloj circadiano con una gran contribución en el desarrollo de diversos tipos tumorales es la alteración de los **mecanismos de reparación del ADN** (DDR). Se ha descrito que Per1/2 y Cry1/2 desarrollan un papel fundamental en procesos DDR (Kang et al., 2011).

A todo lo anterior, hay que sumar la interacción entre el reloj circadiano y el **metabolismo celular**, el cual se mantiene de manera independiente a la actividad transcripcional y se regula a través del ciclo redox de 24 horas metabolizando el peróxido de hidrógeno en diversos tejidos (Robinson & Reddy, 2014). El metabolismo de las células tumorales se modifica para utilizar la actividad glucolítica a pesar de las condiciones anóxicas (**Efecto Warburg**), lo que conlleva un aumento de la formación de NADPH, de la síntesis de ácidos grasos y una disminución de la actividad del ciclo TCA. Todos estos procesos se han relacionado con el reloj circadiano (Rey et al., 2016) (**Figura 11**).

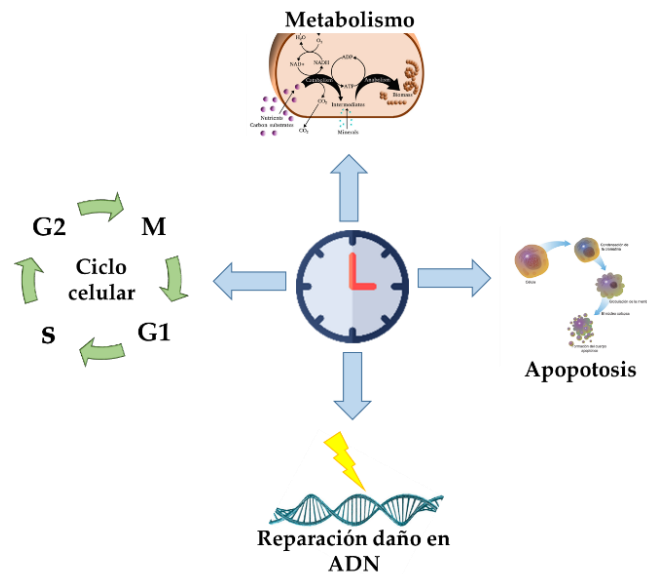


Figura 11. Procesos por los que el reloj circadiano influye en el desarrollo tumoral.
Adaptación de (Shafi & Knudsen, 2019)

Teniendo todo esto en cuenta y sabiendo que los componentes circadianos pueden actuar de una u otra manera en función del momento del día, pudiendo desencadenar tanto el desarrollo como la inhibición de la apoptosis (Ozturk et al., 2009), es fundamental implementar la **cronoterapia** como nueva medida de tratamiento del cáncer. Esto consiste en tener en cuenta los ritmos circadianos y los ciclos naturales del organismo con el fin de tratar una enfermedad (Rao & Lin, 2022; Shafi & Knudsen, 2019). De hecho, se ha descrito la mejora de la tolerabilidad a los regímenes de quimioterapia por parte de pacientes con estadios avanzados de cáncer al aplicar de esta manera el tratamiento (Rao & Lin, 2022; Ríos-Arrabal, Muñoz-Gámez, Jiménez-Ruíz, et al., 2016; Robinson & Reddy, 2014).

b. Ritmos circadianos y CMCs

Las células madre embrionarias parecen no presentar reloj lo cual puede deberse a la necesidad de no ralentizar su proliferación durante las primeras etapas del desarrollo. Por su parte, las células madre adultas presentan un reloj circadiano funcional responsable de dirigir los procesos de proliferación y diferenciación, esto facilita la homeostasis tisular y la regeneración después de un daño; lo cual también es debido a su capacidad pluripotente (Dierickx et al., 2018).

En el caso del intestino estas células son capaces de renovar el epitelio de manera constante después de un daño. Se ha visto que esto es dependiente de

una ritmicidad de la expresión de Per y Cry lo cual influye en la transcripción de más de 100 CCGs que están implicados en la respuesta a estrés (Dierickx et al., 2018).

Las CMCs tienen un reloj circadiano intrínseco que se encuentra regulado por las señales propias de los tejidos donde se localizan con gran influencia en su supervivencia. De hecho, las características propias de estos relojes es lo que determinará la facilidad de desarrollo de nuevos tumores en estos tejidos (Ríos-Arrabal, Muñoz-Gámez, Jiménez-Ruíz, et al., 2016).

En tumores de CCR con niveles elevados de marcadores de CMCs, se observan niveles elevados de CLOCK (Aroca-Siendones et al., 2021). Por lo tanto, las terapias dirigidas hacia el control de los ritmos circadianos podrían ser de utilidad en el tratamiento para la erradicación de CMCs (Aroca-Siendones et al., 2021; Dierickx et al., 2018).

El reloj circadiano está presente en el epitelio intestinal tanto en estadios sanos como patológicos, aunque con diferencias en cuanto a la expresión de dichos genes según la situación (Karpowicz et al., 2013; Stokes et al., 2017) (**Figura 12**).

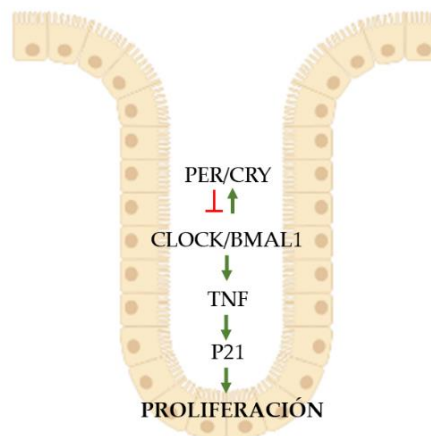


Figura 12. Regulación de la regeneración del epitelio intestinal. Adaptada de Stokes et al., 2017.

El desarrollo de tratamientos que afectan a las CMCs directamente podrían aumentar la eficacia de la quimioterapia y evitar la recurrencia del cáncer (T. I. Kim, 2014; Shibue & Weinberg, 2017; Solomon et al., 2018; Yh et al., 2020). Pero estos nuevos tratamientos no deben tener como única diana las CMCs, ya que es posible la recurrencia del cáncer por la diferenciación y reprogramación celular a partir de las CMs normales. Estas nuevas CMCs pueden presentar incluso características diferentes a las que presentaba su célula de origen, por lo que las

nuevas terapias deben ser capaces de erradicar las CMCs sin provocar gran toxicidad y sin atacar las CMs normales (Eun et al., 2017).

c. Reguladores de los ritmos circadianos

Como ya se ha descrito anteriormente las proteínas del reloj circadiano se encuentran reguladas a nivel transcripcional y post-transcripcional por la relación existente entre los distintos genes y proteínas que lo conforman, y que dan lugar a los CRTT (Robinson & Reddy, 2014; Sahar & Sassone-Corsi, 2009).

Las modificaciones transcripcionales modulan la expresión de varias **enzimas antioxidantes** y los niveles de especies reactivas de oxígeno (EROs) y nitrógeno (ERNs) de la célula (Khaper et al., 2018; Méndez et al., 2016). De manera recíproca, las variaciones del estado redox de la célula afectan a la expresión de los genes del reloj circadiano (Dierickx et al., 2018).

Las modificaciones a nivel post-traslacional, como la fosforilación, la acetilación y la ubiquitinación, son inducidas a través de diferentes rutas de señalización intracelular con un papel fundamental en el mantenimiento de la ritmicidad (Sahar & Sassone-Corsi, 2009). Dentro de estas modificaciones post-transcripcionales se ha descrito **SIRT1** como un modulador esencial para el mantenimiento de la maquinaria del reloj circadiano, ya que algunas de sus dianas son CLOCK, BMAL1 o PER2, entre otros (Kleszcz et al., 2015; Patke et al., 2020).

Estudios en ratones han demostrado el uso de reguladores del ritmo circadiano como terapia para diversas patologías. En concreto el uso de agonistas para REV-ERB han mostrado su eficacia en el tratamiento de la ansiedad, para aliviar los problemas metabólicos derivados de la obesidad o para inducir la muerte celular de manera selectiva. Sin embargo, el uso de antagonistas de este gen, muestran su potencial terapéutico en modelos animales con enfermedad de Parkinson, Alzheimer u obesidad. Otras dianas terapéuticas son Cry o Bmal1 (Patke et al., 2020).

Teniendo en cuenta la eficacia obtenida en cuanto a la manipulación de los ritmos circadianos como terapia en modelos preclínicos, hay un gran campo de investigación en desarrollo de nuevas terapias a partir del uso de nuevos tratamientos o la combinación de fármacos ya existentes (Patke et al., 2020; Ruan et al., 2021). Actualmente, se encuentra aprobado por la FDA y la EMEA el uso de ciertos fármacos para la regulación de estos ritmos, este efecto puede llevarlo

a cabo manera directa sobre algún componente del reloj o sobre alguna vía reguladora de dicho proceso (Sulli et al., 2019). Algunos de los fármacos que actualmente se están utilizando son la melatonina, el tasimelton, ramelton o modafinil, entre otros (Porcu et al., 2019; Ruan et al., 2021)

6. SIRT1

Las **sirtuinas** (SIRT) son una familia de proteínas HDAC que actúan como factores de silenciamiento de la cromatina (Yu et al., 2016). Sus principales funciones están relacionadas con la **regulación del metabolismo celular**. Se han descrito hasta 7 isoformas de SIRT, todas ellas presentan un dominio altamente conservado de unión a NAD⁺, aunque tienen diferente localización y función celular. En situaciones de estrés celular, en los que se produce un aumento del ratio NAD⁺/NADH y un descenso de nicotinamida produce la estimulación de las sirtuinas (Mayo et al., 2017).

En algunos casos las diferentes isoformas de SIRT actúan de manera sinérgica para regular los procesos fisiológicos en los que se encuentran implicadas (Kleszcz et al., 2015; Vellinga et al., 2015). Algunas de las funciones relacionadas con la inestabilidad genómica, en las que están implicadas son la regulación del ciclo celular, la reparación del ADN, la supervivencia y la apoptosis celular; todas estas funciones han sido descritas tanto en células normales como en células tumorales (Mayo et al., 2017; Yu et al., 2016).

La presencia de algunos de los marcadores (*Hallmarks*) de inicio tumoral como son la pérdida de inhibición por contacto, la transición epitelio-mesénquima, a la activación de la angiogénesis o la diseminación de células tumorales, que terminen originando metástasis, pueden inducir la activación de sirtuinas a través de la regulación de la diferenciación celular, la adhesión comunicación célula/célula y la inflamación (Mayo et al., 2017).

La isoforma 1 de las sirtuinas (**SIRT1**) es una **histona desacetilasa de clase III dependiente de NAD⁺**, se encuentra codificada por el gen del mismo nombre ubicado en el cromosoma 10. Se localiza en el núcleo y en el citosol (Kleszcz et al., 2015). Puede regular la desacetilación de los residuos de lisina de múltiples proteínas, lo que desencadena funciones implicadas en el **control redox celular** (Tang, 2016), en procesos de supervivencia, senescencia, apoptosis, diferenciación celular (Yu et al., 2016) y en el control metabólico (Bordone & Guarente, 2005). La actividad enzimática de esta desacetilasa tiene como diana proteínas de tipo histona (H1, H3 o H4) o no histónicas (p53, FOXO3, PGC1 α y LXR) (Bellet et al., 2011; Osama et al., 2016) lo que permite la adaptación a situaciones de restricción calórica, de crecimiento celular, apoptosis, senescencia o tumorigénesis (Jung et al., 2013).

a. SIRT1 y desarrollo tumoral

SIRT1 presenta un **efecto dual** en cuanto a la carcinogénesis en general. Hay estudios que demuestran un claro **papel oncostático** frente a otros que describen un **papel oncogénico** (Jung et al., 2013; Rifai et al., 2018). El hecho de que desempeñe una u otra función podría depender de las características propias del tumor (Jung et al., 2013), de la localización subcelular mayoritaria que se da en las células tumorales (Lv et al., 2014) o incluso de su concentración (Ríos-Arrabal, Muñoz-Gámez, Jiménez-Ruíz, et al., 2016) (**Figura 13**).

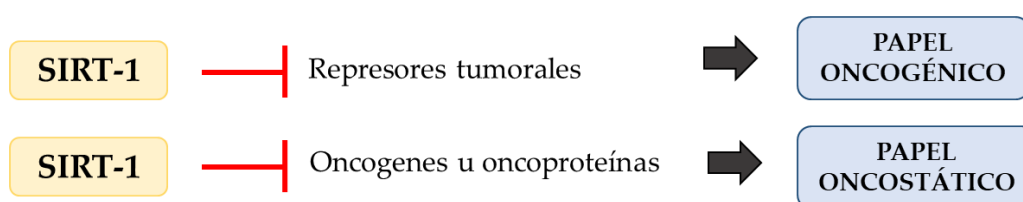


Figura 13. Dualidad del efecto de SIRT1

Cuando SIRT1 es considerado como **promotor tumoral** (papel oncogénico), se debe a que está implicado en el crecimiento y la regulación de las CMCs en varios tipos de cáncer, entre ellos el CCR (Lucena-Cacace et al., 2018). Se ha observado que tiene capacidad de **desacetilar p53**, lo que impide que este desarrolle su papel como represor tumoral (Osama et al., 2016; Vaziri et al., 2001). Además, también se encuentra implicados en los procesos de transición epitelio-mesénquima (TEM), y migración e invasión celular a partir de la desacetilación de proteínas implicadas en la movilidad celular (Lv et al., 2014); además de con la resistencia al tratamiento quimioterápico a través del gen PGC1 α (Schmidt, V, 2017).

El proceso de autofagia presenta un papel incierto en el desarrollo tumoral (White et al., 2015) ya que puede actuar como supresor o precursor tumoral. Es responsable de limitar la iniciación tumoral pero tras la neoplasia se da una adaptación que favorece el mantenimiento y desarrollo tumoral (Foerster et al., 2022). En el caso de SIRT1 se ha observado que niveles bajos de esta proteína inducen la acetilación de Atg5/7/8 y por lo tanto bloquean el desarrollo de la autofagia, favoreciendo la supervivencia y el mantenimiento tumoral (Ríos-Arrabal, Muñoz-Gámez, Jiménez-Ruíz, et al., 2016).

Además, teniendo en cuenta la característica multifacética de SIRT1, es capaz de regular el crecimiento y la supervivencia de las CMCs, lo que se relaciona con la capacidad de desarrollar resistencia a los distintos tratamientos.

Dentro de las funciones que hacen considerar a SIRT1 como un **represor tumoral** (papel oncostático), se encuentran los procesos metabólicos que incluyen la apoptosis o la senescencia y por lo tanto puede actuar activando diferentes represores tumorales (Z. Lin & Fang, 2013). Bajo situaciones de estrés desacetila p53 e inhibe PARP, lo que produce un aumento de la supervivencia celular (Ríos-Arrabal, Muñoz-Gámez, Jiménez-Ruíz, et al., 2016).

b. SIRT1 y CCR

Se ha descrito que SIRT1 desempeña un importante papel en el desarrollo del CCR, aunque aún no se conoce cuál es este con exactitud y continúa siendo contradictorio (Jung et al., 2013). Actúa como un importante regulador de la β -catenina, lo que permite que se utilice como marcador pronóstico tras la cirugía (Osama et al., 2016), de hecho se ha descrito que una acumulación de este en el citoplasma origina alteraciones que se relacionan con un mal pronóstico para el paciente (Jung et al., 2013; Zu et al., 2016). En estudios realizados sobre muestras de pacientes con este tipo tumoral se ha observado una mayor expresión de SIRT1 citoplasmático cuando estos presentan estadios tumorales muy avanzados, lo que indica menor nivel de OS y de DFS (Yu et al., 2016).

En modelos *in vitro* e *in vivo*, la inhibición de SIRT1 conduce a un descenso de la proliferación celular y de la viabilidad tumoral, asociado a la **resincronización** de los ritmos. A favor del papel oncogénico, actúa como promotor del proceso de metástasis, ya que se ha observado en experimentos *in vivo* e *in vitro* que el silenciamiento de SIRT1 disminuye el progreso de la metástasis en el CCR. También es capaz de desacetilar CREB, un factor de transcripción clave para la expresión de KISS1, uno de los principales supresores de metástasis tumoral (Shen et al., 2016).

Teniendo en cuenta las características de SIRT1, tanto este como los propios agentes que lo modulan podrían suponer nuevas estrategias terapéuticas (Ríos-Arrabal, Muñoz-Gámez, Jiménez-Ruíz, et al., 2016). Debido a que el NAD⁺ es la co-enzima de SIRT1 y un agotamiento de NAD⁺ provoca un déficit energético, se produce una disminución en las tasas de glucólisis, del ciclo del ácido cítrico y de la fosforilación oxidativa (Mayo et al., 2017), causando citotoxicidad y sensibilización de las células cancerosas frente al daño oxidativo propiciando su apoptosis y reduciendo su proliferación celular (Kennedy et al., 2016). Teniendo en cuenta la potencial diana que sería SIRT1 como regulador de los ritmos

circadianos para el tratamiento del cáncer, podría considerarse el uso de inhibidores de este, como es el caso de la **melatonina**.

c. SIRT1 y ritmos circadianos

SIRT1 **regula el reloj circadiano** a nivel del sistema nervioso central al activar la transcripción de BMAL1 y CLOCK (Kleszcz et al., 2015). A nivel periférico, desacetila BMAL1, afectando a su actividad (Nakahata et al., 2008), y a PER2, impidiendo su dimerización con CRY (Asher et al., 2008). También puede unirse a los complejos CLOCK/BMAL1, lo que altera la expresión de otros genes asociados como PER, esto probablemente se relacione con la concentración variable de los **niveles de su co-enzima**, el NAD⁺ (Bellet et al., 2011; Nakahata et al., 2009a).

SIRT1 desempeña un papel crucial en cuanto a metabolismo y supervivencia, para lo que desacetila una gran cantidad de proteínas y regula la expresión genética a partir de la desacetilación de histonas. La ratio NAD⁺/NADH es una medida directa del estado de energía de la célula y, por tanto y debido a la dependencia de NAD⁺ por parte de SIRT1, hace que este sea una conexión directa entre el metabolismo energético de la célula y la desacetilación de proteínas diana. La oscilación circadiana de SIRT1 sugiere que los niveles de NAD⁺ también presentan cierta oscilación (Bellet et al., 2011).

Los genes del reloj controlan la expresión de la NAMPT, la cual cataliza la transferencia del residuo PRPP a la nicotinamida para producir NMN, el cual es convertido en NAD⁺. Los niveles intracelulares de SIRT1 y de NAD⁺ oscilan con un patrón circadiano; los niveles de proteína no presentan niveles de expresión oscilatorios típicos de los ritmos circadianos, pero si lo hace su **actividad enzimática**. De ahí la existencia de un ciclo enzimático y transcripcional en el que SIRT1 regula los niveles de su propio co-factor (Bellet et al., 2011) (**Figura 14**).

Otras enzimas dependientes de NAD⁺, como **PARP**, también interaccionan con SIRT1, y se activan tras el daño en el ADN. Un aumento de la actividad de PARP-1 como consecuencia del daño celular origina un agotamiento de NAD⁺, y por lo tanto reduce la actividad de SIRT1 y la muerte celular (Sahar & Sassone-Corsi, 2009).

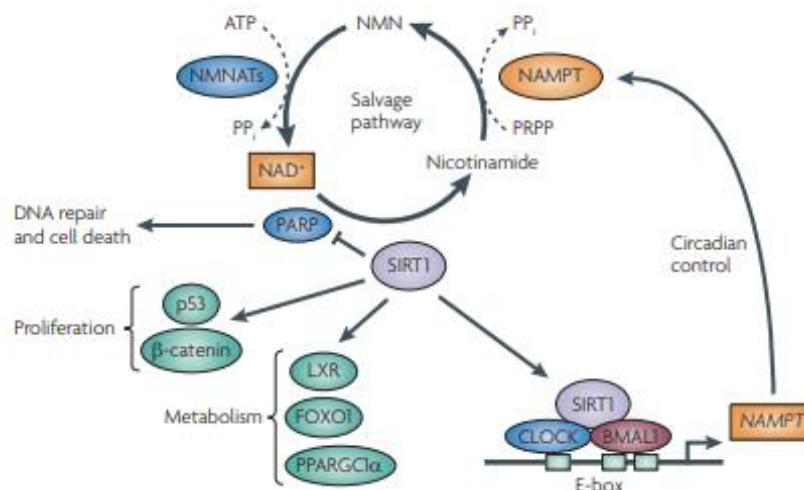


Figura 14. Regulación circadiana del metabolismo celular (Sahar & Sassone-Corsi, 2009)

d. SIRT1 y p53

P53 fue la primera molécula no histónica identificada como diana para SIRT1. La cooperación entre estas moléculas se relaciona con la integridad genómica ya que SIRT1 regula la acetilación de p53 (Luo, J 2001).

En condiciones normales p53 se encuentra regulado por el control negativo de MDM2 que lo ubiquitina para su degradación. En condiciones de estrés donde p53 se acumula y se activa por medio de diferentes modificaciones postraduccionales, SIRT1 es responsable de desacetilar el p53 citosólico, que se dirige a la mitocondria y por lo tanto bloquea su translocación al núcleo. Una vez en la mitocondria desencadena la activación de proteínas pro-apoptóticas que induce la salida del citocromo C de la mitocondria hacia el citoplasma induciendo la apoptosis (Yi & Luo, 2010; Yu et al., 2016).

La interacción p53/SIRT1 protege a la célula de la senescencia y la apoptosis inducida por 53 (Langley et al., 2002).

En condiciones óptimas p53 induce la disminución de SIRT1 y establece un bucle de retroalimentación entre ambas proteínas (Yamakuchi et al., 2008). Mientras que, en condiciones de estrés celular, SIRT1 desacetila p53, lo que inhibe sus funciones de arresto celular y apoptosis. La célula no muere, pero presenta una gran cantidad de mutaciones, lo que hace que sea gran candidata a convertirse en célula madre cancerosa (CMC). Por lo tanto, el eje SIRT1/p53 puede ser un punto interesante para el control de las vías de señalización implicadas en el desarrollo tumoral (Yin et al., 2023).

7. PEROXIRREDOXINAS

Las peroxirredosinas (**Prx** o Prdx) son proteínas antioxidantes que depuran peróxidos (superóxido, peróxido de hidrógeno o hidroxilo) creados durante los procesos metabólicos en los que se genera una alteración del balance redox de las células (Ríos-Arrabal, Muñoz-Gámez, Jiménez-Ruíz, et al., 2016; Robinson & Reddy, 2014). Estas actúan con el fin de mantener un equilibrio en los niveles de EROs que permitan desarrollar con normalidad los procesos de proliferación, diferenciación y supervivencia celular normal (Ding et al., 2017) y evitar el estrés oxidativo (Robinson & Reddy, 2014).

Esta familia de Prxs se encuentra altamente conservada (Edgar et al., 2012). Está constituida por 6 isoformas, las cuales se clasifican en función del número de residuos activos de cisteína (Cys) que presenten: uno (Prx6) o dos (Prx1-5) (Ding et al., 2017; Park et al., 2016; Rhee, 2016). En estos residuos activos es el punto donde tiene lugar la reducción de los sustratos (Park et al., 2016). Las distintas isoformas se encuentran en distintas localizaciones celulares (Hoyle & O'Neill, 2015; Rhee & Kil, 2016). Lo que se debe a una de sus funciones principales la regulación del estado redox celular (Hoyle & O'Neill, 2015; Rhee & Kil, 2016). Otras funciones son esenciales para la señalización celular y el metabolismo, por lo que están implicadas en la protección frente al estrés celular y por ello, frente a un gran número de enfermedades, entre las que se encuentra el cáncer (Park et al., 2016) (**Figura 15**).

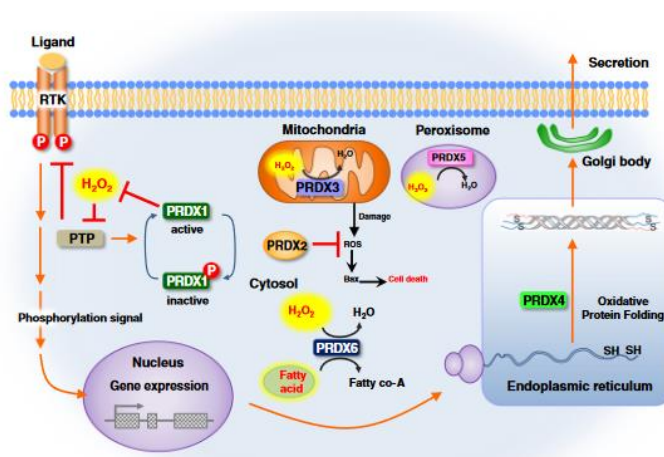


Figura 15. Distribución de las isoformas de las Prxs y del sistema redox en la célula (Park et al., 2016).

El estado redox de las Prxs se encuentra controlado por el estado metabólico celular pero es independiente de las modificaciones transcripcionales (Robinson & Reddy, 2014). Tiene un papel fundamental en la regulación del reloj molecular

(Ríos-Arrabal, Muñoz-Gámez, Jiménez-Ruíz, et al., 2016) es posible que sea un ciclo secundario del reloj circadiano principal o un biomarcador celular (Robinson & Reddy, 2014).

Existe un ritmo circadiano de oxidación-reducción de peroxirredoxinas, se encuentra presente tanto en organismos eucariotas como procariotas, aunque su mecanismo y método de actuación completo no se conoce en profundidad (Millius et al., 2019). Se encuentra interconectado con el CRTT, y ambos son necesarios individualmente para el **mantenimiento de los ritmos a nivel celular** (Edgar et al., 2012). A su vez, el ritmo de oxidación de las Prxs parece reflejar que el ritmo endógeno de generación de ERO y ERN depende de los niveles celulares de NADPH sintetizados en la vía de las pentosas fosfato (Rey et al., 2016).

Una mejor comprensión de cómo la producción localizada de EROs puede afectar a la actividad de los osciladores dentro de la célula podría ayudar al desarrollo de terapias más eficaces para la restauración de una señalización adecuada. Además, teniendo en cuenta que se encuentran implicadas en situaciones patológicas podrían ser buenas dianas terapéuticas en algunos tipos tumorales (Park et al., 2016).

La capacidad hiperproliferativa de células tumorales está asociada con una alta producción de ROS lo que concuerda con una gran cantidad de mitocondrias aberrantes presentes en este tipo celular. Una mayor EROs a nivel mitocondrial y modificaciones en los niveles de Prxs puede originar un aumento del nivel oxidativo que desencadene en un proceso apoptótico (Park et al., 2016).

a. Peroxirredoxina 1

La isoforma 1 de la familia de las peroxirredoxinas (**Prx1**) es una proteína multifuncional cuya función principal es la eliminación residuos de H_2O_2 producidos durante el metabolismo. Presenta la capacidad de modular diferentes moléculas, de intervenir en la regulación transcripcional, de actuar como inmunomodulador y de actuar como regulador del estado redox celular (Park et al., 2016).

Se ha descrito que se encuentra sobreexpresada en situaciones de estrés celular, ya que tiene un papel fundamental en la transcripción de Nrf2 y de su inhibidor Keap1 (Park et al., 2016). En algunos tipos tumorales se ha descrito que no solo presenta funciones antioxidantes, sino que puede actuar como un oncogen, ya que puede suprimir la muerte celular en el tumor interaccionando

con la vía de NF-KB y los AR. Aunque también presenta un papel principal en la activación de la apoptosis a través de p53 (Ding et al., 2017) (**Figura 16**).

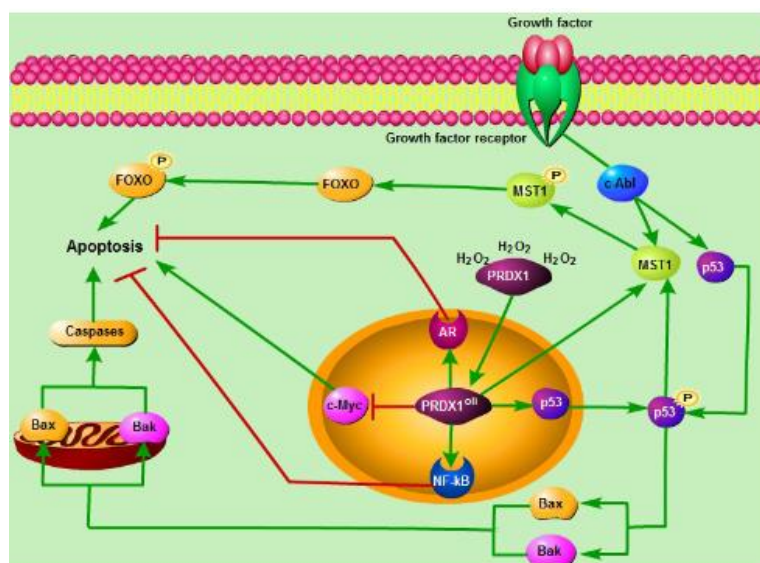


Figura 16. Vías de actuación de la Prx1 (Ding et al., 2017)

8. MELATONINA

La melatonina o **N-acetil-5-metoxitriptamina** es una **indolamina** derivada del triptófano (Talib, 2018) y sintetizada a partir de la serotonina, principalmente en la **glándula pineal**, donde se localizan las enzimas ASMT y AA-NAT necesarias para su síntesis (Chok et al., 2019; Samec et al., 2021). Se ha descrito la presencia de melatonina en otros tejidos extrapineales como son la retina, la piel, el tracto gastrointestinal o el hígado (Chok et al., 2019); y en una gran cantidad de fluidos biológicos (Acuña Castroviejo et al., 2014).

La **síntesis** tiene lugar con una oscilación diaria dependiente de la luz, es decir, se lleva a cabo en función de los **ritmos circadianos**. Se produce una inhibición de su actividad durante el día y aumenta su secreción durante la noche (Kennedy et al., 2016) (**Figura 17**).

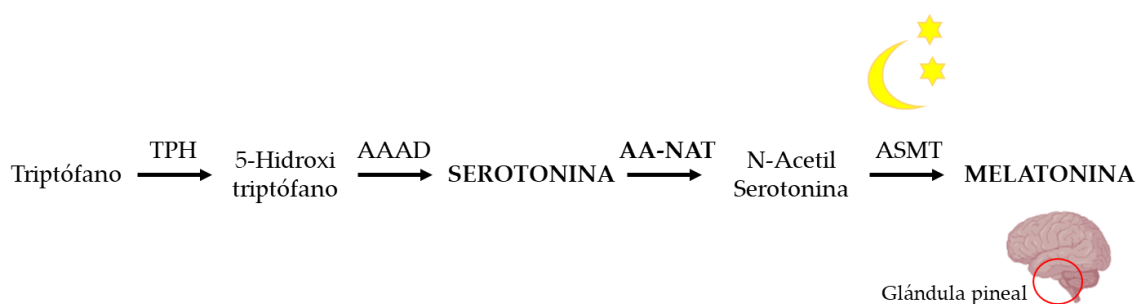


Figura 17. Ruta de síntesis de la melatonina

El 90% de la hormona se desactiva a nivel hepático y es eliminada por la vía renal por lo que sus niveles en orina pueden utilizarse como control del nivel hormonal en sangre (Skene & Arendt, 2006). La producción de melatonina tiende a disminuir de manera gradual con la edad, hasta alcanzar niveles cercanos al 10% a la edad de 70 años (Acuña Castroviejo et al., 2014).

a. Funciones

La melatonina desarrolla una gran cantidad de **funciones fisiológicas**, como son: la reducción de la producción de radicales libres (Robinson & Reddy, 2014), la inhibición de la angiogénesis, reducción del daño en los linfocitos, regula la actividad inmune, neutraliza el receptor del factor de crecimiento epidérmico (esencial en la transición epitelio-mesénquima), modula el ciclo celular y la inducción de la apoptosis o la autofagia (Chok et al., 2019; Samec et al., 2021). desencadena sus efectos a través de sus **receptores de membrana** (MT1 y MT2) o **nuclear** (RZR/ROR), aunque su capacidad para depurar radicales libres es independiente de receptor (J. Liu et al., 2016) (**Figura 18**).

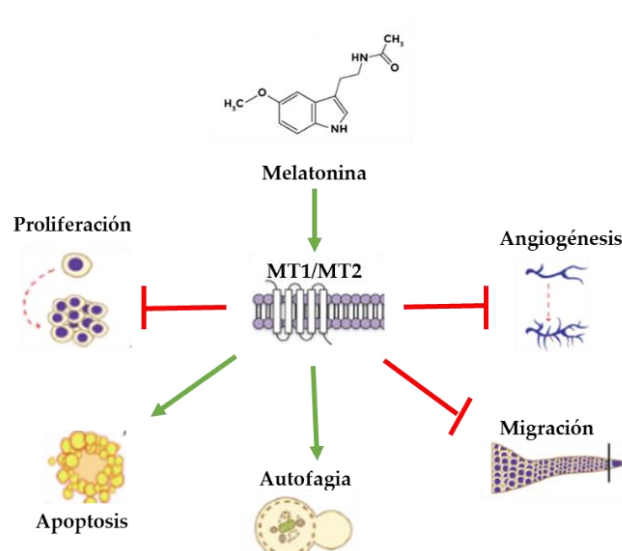


Figura 18. Funciones controladas por la melatonina (Adaptación de Chok et al., 2019).

Presenta la capacidad de aumentar la expresión de enzimas antioxidantes, entre ellas Prx1. En algunos casos puede tener **efecto pro-oxidante** principalmente en las células que presentan una gran cantidad de daño y en células cancerígenas. De hecho, esta función pro-oxidante puede explicar las **acciones oncostáticas** atribuidas a la melatonina y que tienen lugar a través de los receptores MT1 y MT2 (J. Liu et al., 2016).

La melatonina parece regular los ritmos circadianos a partir de la expresión de Per1 y Per2 en condiciones de toxicidad o incluso en células cancerígenas en cultivo, lo que se ha relacionado con su capacidad para inhibir el crecimiento tumoral *in vitro*. Por ejemplo, en células de cáncer de próstata en cultivo, la melatonina aumenta la expresión de Per2 y Clock, inhibe la expresión de Bmal1 y resincroniza los ritmos de Per2 a través de SIRT1 (Hardeland, 2017). La melatonina inhibe la actividad de SIRT1 en modelos tumorales, mientras que la aumenta en otros modelos fisiológicos o fisiopatológicos (Mayo et al., 2017).

b. Melatonina, cáncer y p53

La **función oncostática** se produce en cualquier estadio de la carcinogénesis (E. J et al., 2019), ya que es capaz de controlar la proliferación celular mediante la regulación de la expresión de microARNs que intervienen en vías de señalización relacionadas con cáncer (Kvietkauskas et al., 2020). Además, se ha visto que esta función se lleva a cabo principalmente en los tumores de tipo hormono-dependientes. Los mecanismos por los que la melatonina puede tener la habilidad de contrarrestar el crecimiento tumoral, mediante el control del ciclo celular y la inducción de la apoptosis, la inhibición de la actividad telomerasa, de

la metástasis, previene la alteración del ritmo circadiano, presenta efectos antiangiogénicos, estimula la diferenciación celular, y activa el sistema inmune, entre otros (Samec et al., 2021; Talib, 2018).

La relación exacta existente las células tumorales que presentan p53 mutado y la melatonina en el desarrollo tumoral, no se conoce por completo. Pero si se ha descrito que la expresión del receptor MT2 se encuentra regulada por p53 y viceversa, lo que implicaría que una pérdida de función de p53 conllevaría un descenso en la expresión de este receptor. Los receptores MT1 y MT2 presentan capacidad de regular la activación de las vías mediadas por p53, ya que la melatonina aumenta el daño causado al ADN por p53 mutado regulando la expresión de la proteína a través de los receptores (Casado et al., 2017a).

La melatonina tiene la capacidad de fosforilar p53, lo que produce la inhibición de la proliferación celular y previene la acumulación de daños en el ADN (Samec et al., 2021). Esta fosforilación la lleva a cabo la kinasa mutada de ataxia teleangiectasia (ATM) en respuesta a la radiación gamma, mientras que en el caso de radiación UV, la lleva a cabo mediante la vía MAPK (Farhood et al., 2019).

Las concentraciones nocturnas de melatonina en pacientes con CCR son relativamente más bajas que en personas sanas (Kos Kudla et al., 2002). La mucosa de colon presenta receptores de andrógenos (AR) y de estrógenos (ER), una disminución de la expresión de ambos está relacionada con la progresión del CCR.

En el tracto digestivo hay un importante punto de síntesis de melatonina, en concreto en las **células enterocromafines** de la mucosa. Los niveles de melatonina detectados son hasta 400 veces superiores que los observados en la glándula pineal (Bubenik, 2002). Esta melatonina es producida por la flora intestinal y otros compuestos implicados en la digestión, aunque también hay cierta parte proveniente de la dieta. La síntesis llevada a cabo en este órgano es completamente independiente de la sintetizada a nivel pineal (Acuña Castroviejo et al., 2014). Los momentos de mayor secreción están relacionados con los momentos de ingestión y digestión de los alimentos, y entre sus funciones se encuentran la prevención del daño tisular mediado por enzimas digestivas (Bubenik, 2002).

La melatonina es capaz de inhibir la carcinogénesis en el CCR, y aunque su papel en este tipo tumoral no se ha descrito por completo se ha comprobado que

un descenso de los niveles de melatonina en sangre, o una disminución de sus receptores induce un aumento del riesgo de desarrollo de CCR (Chok et al., 2019). Lo cual se ha comprobado al comparar los niveles de expresión del ARN mensajero de las proteínas MT1 y MT2 en muestras cancerosas y de tejido normal (Ziółko et al., 2015).

c. Melatonina como tratamiento

El uso de la melatonina como tratamiento produce una mejora en pacientes con distintos tipos de cáncer, ya sea en su uso combinado con otras terapias o como terapia única. Estos beneficios se observaron a nivel de supervivencia, respuesta al tratamiento y perfil de toxicidad. En tumores que no responden a la melatonina como única terapia, se ha comprobado que el uso de esta hormona como quimioterapia adyuvante sensibiliza a las células, de manera que aumenta la eficacia de otras terapias ya sean de tipo quimio o radioterápico (E. J et al., 2019). De hecho, se ha observado un aumento de la apoptosis en las células de CCR (Pariente et al., 2018; Sakatani et al., 2019), lo que corrobora este efecto.

En el caso de la terapia con 5-FU, utilizada de manera generalizada en pacientes con CCR, y que generan una gran cantidad de efectos secundarios y de desarrollo de resistencias al tratamiento por parte de los pacientes, se ha observado que la combinación con la melatonina permite aumentar la efectividad del 5-FU. Este proceso inhibe la proliferación celular, además de aumentar la sensibilidad de las células de CCR (Chok et al., 2019; Pariente et al., 2018).

Este efecto se ha observado en ensayos *in vitro* sobre células HT29 de CCR, se produce un incremento del número de células apoptóticas y un descenso de la viabilidad celular. La causa de este aumento de la apoptosis es debido a un aumento de la activación de la caspasa 9, iniciadora de la vía de las caspasas efectoras, que desarrolla la pérdida de función y estructura celular, y con ello la muerte celular. Este aumento se ha observado incluso en células que han desarrollado resistencia al 5-FU, lo que se debe a que la melatonina disminuye los niveles de la enzima TS aumentados por el 5-FU, de manera que consigue su sensibilización al tratamiento (Chok et al., 2019).

Debido a los efectos sinérgicos observados entre la melatonina y otros tratamientos, es necesario seguir estudiando el papel de la melatonina en la carcinogénesis y la progresión del CCR, y poder utilizarlos como un agente anticancerígeno eficaz (Chok et al., 2019).

A nivel de moduladores de los ritmos circadianos, dos de los más potentes que se conocen, son la melatonina y la serotonina.

La **serotonina** o 5-hidroxitriptamina (5-HT), es una monoamina producida desde el aminoácido esencial triptófano. Se sintetiza a nivel del SNC y en tejidos periféricos (plaquetas y células enterocromafines del intestino). Presenta una gran variedad de funciones, lo que se debe a la gran cantidad de receptores existentes a través de los que desempeña sus funciones, y a que estos se distribuyen por múltiples tejidos (Balakrishna et al., 2021). Gran cantidad de estudios tanto a nivel *in vivo* como *in vitro* han demostrado que la serotonina se encuentra implicada en el crecimiento tumoral, la diferenciación, la invasión, la angiogénesis, la migración celular y la metástasis. De hecho, se ha demostrado su efecto mitogénico en diversos tipos de cáncer, entre ellos cáncer de próstata, vejiga, mama y colon (Siddiqui et al., 2006). En el caso concreto del cáncer de colon se ha demostrado que los inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (SSRIs), que aumentan su concentración en los terminales nerviosos tanto a nivel central como periférico, poseen efectos preventivos en este tipo de cáncer (Sarrouilhe & Mesnil, 2019). El uso de antagonistas de receptores, de inhibidores de la síntesis o de transportadores de serotonina, se están planteando como posible diana terapéutica para la inhibición del crecimiento tumoral (Balakrishna et al., 2021).

Otras vías de tratamiento es el uso de ciertos agonistas no selectivos de MT1/MT2 que presentan una mayor afinidad por estos receptores que la propia melatonina y que son capaces de regular los ritmos circadianos a nivel central. Algunos de ellos, como son la agomelatina, el ramelteon o el tasimelteon, se están utilizando para el tratamiento del insomnio o de la depresión (Kast, 2015). Estos compuestos son más potentes que la propia melatonina y poseen más afinidad por sus receptores, por lo que podrían tener interés en el desarrollo de terapias más eficaces frente al cáncer (J. Liu et al., 2016).

9. AGOMELATINA

La agomelatina (**N-(2-7-metoxi-1naftil)-etil)-acetamida**) es un derivado naftalénico derivado de la melatonina y por lo tanto con una estructura análoga a la de esta (**Figura 19**). Fue desarrollada por la compañía farmacéutica Servier Laboratories LTd (Neuililly-sur-Seine, Francia) que lo nombró inicialmente como compuesto S20098 (de Bodinat et al., 2010).

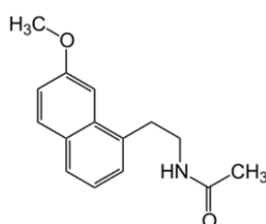


Figura 19. Fórmula de la agomelatina

Ensayos clínicos randomizados de doble ciego y estudios en animales de experimentación han puesto de manifiesto la efectividad de este compuesto como antidepresivo, comercializado como Valdoxan® (Olié & Kasper, 2007).

Es el primer antidepresivo aprobado por la EMEA en 2009, pero no por lo FDA, con capacidad para actuar de forma complementaria y posiblemente como **agonista de MT1 y MT2**, con mayor afinidad que la melatonina, y **antagonista de 5-HT_{2c}**, receptor de la serotonina (de Bodinat et al., 2010; Taylor et al., 2014). Presenta una mayor vida media, una mejor absorción oral y una alta afinidad frente a los receptores de melatonina (Kast, 2015). Y es el primer antidepresivo que presenta como diana los ritmos circadianos (Taylor et al., 2014).

Estudios en modelos *in vivo* han demostrado que son capaces de resincronizar los ritmos circadianos, aumentando la inervación dopaminérgica y adrenérgica de la corteza frontal, e induciendo neurogénesis, entre otros mecanismos (de Bodinat et al., 2010; Sansone & Sansone, 2011). Su influencia sobre los ritmos circadianos es similar a la que presenta la melatonina, ya que es capaz de resincronizarlos y acelerar la fase del ritmo todo ello a través de los receptores de la propia melatonina (Zupancic & Guilleminault, 2006).

Como ya se ha descrito con anterioridad hay trabajos previos en los que se muestra el papel oncostático que desarrollan los receptores de melatonina en el CCR (Karasek et al., 2002; Winczyk et al., 2009a), de ahí que el uso de tratamientos antagonistas de dichos receptores, como es la agomelatina, puedan

ser de interés como tratamiento de esta enfermedad (León, Casado, Carazo, Sanjuán, Maté, Rueda, et al., 2012).

JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1. JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS

El cáncer colorrectal (CCR) es el tercer tipo en cuanto a diagnóstico y muerte por cáncer a nivel mundial (Bray et al., 2018; Sung et al., 2021b). A pesar de los grandes avances que se están produciendo en cuanto a diagnóstico y tratamiento, se estima que el número de casos aumente de manera significativa, en gran medida debido a un cambio en el estilo de vida (Sung et al., 2021b). Los tratamientos actuales para el CCR incluyen el tratamiento con 5-Fluorouracilo (5-FU) como principal agente quimioterápico, ya sea como terapia simple o combinada con otros fármacos, como el oxaliplatino o el irinotecan (Xie et al., 2020). Sin embargo, estos tratamientos presentan gran cantidad de limitaciones, además de graves efectos secundarios en el paciente y el desarrollo de quimiorresistencia, obteniendo resultados insatisfactorios (Vodenkova et al., 2020). Estas limitaciones hacen imprescindible describir nuevos fármacos para el tratamiento de esta patología. Estas nuevas terapias van encaminadas a un desarrollo más personalizado y dirigido a las características propias del tumor de cada paciente (Fox & Loeb, 2014). Sin embargo, a día de hoy la aplicación de este tipo de terapias en la clínica aún está lejos de ser implementada, esto se debe a que el incremento en cuanto a coste beneficio aún es escaso, a que continúan produciéndose efectos adversos y a que la eficacia difiere entre pacientes con características similares, de hecho, continúan dándose resistencias (Vodenkova et al., 2020; Xie et al., 2020). Por todo ello es necesario el desarrollo de nuevos tratamientos que mejoren o reemplacen los actuales.

Los ritmos circadianos son procesos biológicos cíclicos con una duración cercana a las 24 horas, regulan importantes eventos fisiológicos, como es el ciclo sueño-vigilia, la reproducción o procesos de respuesta inmune, entre otros. A nivel molecular, el ritmo circadiano consiste en ciclos retroalimentados de retro-transcripción (CRTT). El factor de transcripción BMAL1 dimeriza con CLOCK y estimula la transcripción de los genes *Per1-3*, *Cry1-2*, *Nr1d2* y *ROR α* . Por su parte las proteínas *PER1-3* y *CRY1-2* forman complejos en el citoplasma, cuando su concentración alcanza cierto nivel, se trasloca al núcleo, donde inhibe la acción de BMAL-1 y CLOCK y, por lo tanto, la transcripción de sus propios genes. El complejo *PER/CRY* es degradado, permitiendo que el ciclo se restaure de nuevo cada 24 horas (Robinson & Reddy, 2014).

El ritmo circadiano no solo se encuentra basado en mecanismos transcripcionales, sino que también se han descrito modificaciones a nivel postraslacional. SIRT1 es una histona desacetilasa de clase III dependiente de

NAD⁺ implicada en el control del estado redox celular (Tang, 2016). Es responsable de regular el reloj circadiano a nivel del sistema nervioso central a partir de la activación de la transcripción de BMAL1 y CLOCK (Kleszcz et al., 2015). A nivel periférico, desacetila BMAL1, lo que afecta a su actividad, y PER2, previniendo su dimerización con CRY (Asher et al., 2008). También puede unirse al complejo CLOCK/BMAL1, alterando la expresión de otros genes asociados como PER2, lo que probablemente esté relacionado con las concentraciones variables de su co-enzima, NAD⁺ (Bellet et al., 2011). Además, se ha descrito la existencia de ritmos circadianos independientes del reloj principal. De hecho, hay un ritmo circadiano de oxidación reducción de la peroxirredoxina (PRX), una proteína antioxidante que tiene como sustrato el peróxido de hidrógeno. Este ciclo está interconectado con el CCRT, y ambos son individualmente necesarios para el mantenimiento de los ritmos a nivel celular (Edgar et al., 2012). Se ha descrito que SIRT1 puede activar la transcripción de PRX1 (Yang et al., 2022). El gen de la Prx1 humana es una diana de Nrf2 (Y. J. Kim et al., 2012), un factor de transcripción compartido por múltiples enzimas antioxidantes (Hailemariam et al., 2010). Además, SIRT1 incrementa la activación de Nrf2 y disminuye su poli-ubiquitinación al disminuir la expresión de Keap1/Cul3 e incrementando la capacidad de unión entre Nrf2 y ERA (Patel et al., 2022).

Las alteraciones en la ritmicidad circadiana se han relacionado con el inicio y desarrollo tumoral. Además, la tolerabilidad y la eficacia de la radio y quimioterapia también dependen de los ritmos circadianos (Van der Jeught et al., 2018). Estudios previos han puesto en el punto de mira la manipulación de los ritmos circadianos con el fin de prevenir la transformación tumoral, todo ello encaminado al desarrollo de nuevas estrategias de tratamiento, de manera que sea posible incrementar la supervivencia de los pacientes (Lee, 2021). En este sentido, la melatonina es una indolamina secretada principalmente por la glándula pineal, aunque también puede encontrarse en tejidos extrapineales; desarrolla un papel principal en el control de los ritmos circadianos (García-Costela et al., 2020b). La melatonina presenta propiedades oncostáticas en diversos tipos tumorales. En el caso concreto del CCR, la melatonina reduce el crecimiento tumoral y la proliferación, además de inducir el proceso de apoptosis en modelos *in vitro* (León et al., 2014; Wei et al., 2015) e *in vivo* (Kannen et al., 2011). Algunas de las funciones de la melatonina se encuentran mediadas por los receptores de la melatonina MT1 y MT2. De hecho, los pacientes con CCR muestran bajos niveles de expresión de estos receptores, sin cambios en los niveles de melatonina, cuando se compara el tejido tumoral con el no tumoral, lo

que se ha asociado con el género y la invasión (León, Casado, Carazo, Sanjuán, Maté, Rueda, et al., 2012). Además, los niveles de MT1 y MT2 se encuentran correlacionados de manera negativa con marcadores típicos de CMCs, considerados el origen y la mayor fuente de contribución en cuanto a la progresión tumoral, la metástasis y el desarrollo de resistencias a los tratamientos por parte de los tumores (Casado et al., 2017b). Todo lo anterior sugiere que el uso de agonistas no selectivos para los receptores MT1 y MT2 podría dar lugar al desarrollo de nuevos tratamientos frente al CCR.

La agomelatina es un análogo naftalénico de la melatonina, que muestra actividad agonista hacia los receptores MT1 y MT2, con una mayor afinidad hacia ellos que la propia melatonina. También es un antagonista de la actividad del receptor de la serotonina 5-HT_{2c}, y su uso como tratamiento frente a la depresión ya ha sido aprobado (Guardiola-Lemaitre et al., 2014). Diferentes modelos *in vivo* han probado que la melatonina sincroniza los ritmos circadianos, probablemente a través de la interacción con los receptores MT1 y MT2 (M. J et al., 2013). Por su parte, la activación de MT1 y MT2 trabaja de manera sinérgica con el bloqueo del receptor 5-HT_{2c} dando lugar a la inducción de la neurogénesis, remodelación sináptica y la señalización del glutamato, lo cual explica el papel antidepresivo de la agomelatina (Guardiola-Lemaitre et al., 2014). Curiosamente, la serotonina ha sido asociada con la progresión de diversos tipos tumorales, incluyendo el CCR, por lo que un inhibidor de los receptores de la serotonina podría ser utilizado como terapia en esta enfermedad (Kannen et al., 2020). A partir de todo lo descrito en cuanto a la influencia de los ritmos circadianos y MT1/MT2 en el desarrollo y progresión tumoral, sería posible que la agomelatina pudiese ser utilizada como tratamiento para el CCR. Sin embargo, a día de hoy no hay estudios que hayan analizado esta alternativa.

Se ha descrito una vía de regulación que relaciona la melatonina, los ritmos circadianos y SIRT1 (Soni et al., 2011). La agomelatina también podría regular SIRT1 en numerosos modelos de patologías (A. M. Mahmoud et al., 2021; N. M. Mahmoud et al., 2023). A día de hoy hay cierta controversia en cuanto al papel que desempeña SIRT1 en el desarrollo tumoral del CCR. Hay estudios que lo describen como promotor tumoral y otros como represor. Al igual que se ha relacionado un incremento de su expresión con una mayor capacidad para desarrollar resistencias a la quimioterapia o un silenciamiento con una resincronización de los ritmos circadianos (Lucena-Cacace et al., 2018). Pero aun

así el papel de SIRT1 continúa sin estar claramente definido y son necesarios más estudios que determinen cuál es el mecanismo por el que origina dicha dualidad.

Por todo ello, en este estudio se plantea evaluar la expresión de SIRT1 en muestras de pacientes con CCR, y describir su papel en el desarrollo tumoral mediante el uso de modelos *in vitro* e *in vivo* con el fin de estudiar su implicación en la proliferación, autorrenovación o invasión tumoral entre otras características. También se plantea el uso de la agomelatina como terapia antitumoral en modelos de líneas celulares establecidas de CCR y en modelos *in vivo*, así como analizar la vía SIRT1/PRX1 en la regulación de la ritmicidad de los genes del reloj principal por la agomelatina.

2. OBJETIVOS

El **objetivo principal** durante el desarrollo de esta tesis fue describir el posible mecanismo por el que Sirt1 ejerce su papel dual en el desarrollo del CCR, para lo cual es necesario estudiar la implicación de este en el reloj circadiano. Todo ello conlleva el estudio del efecto de este gen a nivel de crecimiento tumoral, viabilidad, resistencia a quimioterapia o regulación de las CMCs.

Los **objetivos específicos** planteados para el desarrollo de esta tesis son:

1. Evaluar la expresión de SIRT1 en biopsias de pacientes con CCR, y su correlación con parámetros del tumor (estadio, grado de diferenciación, estatus de p53).
2. Evaluar la expresión de SIRT1 en biopsias de pacientes con CCR y su correlación con genes del reloj circadiano.
3. Analizar el efecto de reguladores del reloj circadiano como la melatonina y la agomelatina como posibles tratamientos para el CCR en función del estado del represor tumoral p53.
4. Determinar si el silenciamiento de SIRT1 aumenta el crecimiento, la capacidad invasiva y la resistencia a la quimioterapia de las CMCs en el CCR y su efecto sobre los genes del reloj circadiano.

Tras el desarrollo de esta tesis se espera proporcionar un paso adelante en la explicación de las diferencias en la respuesta al tratamiento de los pacientes con CCR.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. ESTUDIO A PARTIR DE TEJIDOS DE PACIENTES CON CCR

La cohorte de pacientes que se utilizó forma parte de un trabajo mucho mayor que abarca un estudio prospectivo que tiene como objetivo estudiar las vías regulatorias de las CMCs en el CCR.

El estudio contaba con el dictamen favorable del Comité de Bioética del Hospital Clínico Universitario San Cecilio de Granada (PI-067/2013; nº 201952915737). Las muestras analizadas provenían de pacientes que habían sido sometidos a cirugía para la extracción de un tumor primario esporádico de CCR y se obtuvieron a través del Banco Andaluz de Tumores.

Los pacientes incluidos en el estudio debían ser personas mayores de 18 años que no hubiesen sido diagnosticadas ni tratadas de una neoplasia previa. Se excluyeron del estudio aquellos pacientes diagnosticados de CCR con carga hereditaria y/o que no firmaron un consentimiento informado. Teniendo en cuenta estos criterios en el estudio se incluyeron 118 pacientes con una edad media de 71 ± 10 años, cuyas características clínico-patológicas se recogen en la **Tabla 4**.

De cada paciente, se han utilizado muestras de tejido tumoral y de la mucosa no tumoral adyacente. Las secciones de tumores y de la mucosa normal adyacente se diseccionó inmediatamente y se congeló en Tissue-Tek1 (Optimal Cutting Temperature Compound, Sakura Finetek Europe B.V., Zoeterwoude).

Tabla 4. Características de los pacientes incluidos en el estudio

CARACTERÍSTICAS		N(%)
Género	Femenino	73 (62.4)
	Masculino	45 (36.6)
Localización	Colon	111(94)
	Recto	8(6)
Diferenciación	Bien diferenciado	25 (21.0)
	Moderadamente	80 (67.7)
	Pobremente	13 (11.3)
Estadio según clasificación TMN	Estadio I	13 (11.1)
	Estadio II	45 (38.1)
	Estadio III	49 (41.3)
	Estadio IV	11 (9.5)
Nº de nódulos linfáticos extirpados	<12	42 (35.5)
	≥12	76 (64.5)

2. EXTRACCIÓN DE ARN Y SÍNTESIS DE ADNc

El ARN total fue extraído de las células utilizando el protocolo de extracción del kit de *Qiagen* (Hilden, Alemania) en el que tras varios pasos, se obtuvo el ARN diluido en 30 µL de agua. La cantidad total de ARN fue determinada por espectrofotometría UV utilizando el NanoDrop ND-1000 (*Implen GmbH*, Munich, Germany).

Tras extraer y cuantificar el ARN, se llevó a cabo la síntesis de ADNc para lo que se utilizó el kit *qScript cDNA Synthesis* (*Quanta*, Houston, TX, EEUU) con el fin de obtener una cantidad final de 500 ng de ADNc (**Tabla 5**). Las condiciones en que se llevó a cabo dicho proceso se recogen en la **Tabla 6**.

Tabla 5. Cantidades usadas en la RT.

Componentes de la Reacción	Volumen
ARN	Variable, se calcula para tener 500ng
Agua	Variable, para completar el volumen final
OligodT	2 μ L
qScript Flex Reaction Mix (5X)	4 μ L
qScript Reverse transcriptase	1 μ L
Volumen final	20 μ L

Tabla 6. Condiciones de realización de la RT.

Fase	Tiempo (min)	Temperatura
Preparación	5	25°C
Transcripción reversa	20	46°C
Inactivación de la RT	1	96°C
Mantenimiento	∞	4°C

3. Q-PCR EN TIEMPO REAL

El análisis cuantitativo de la expresión de ARNm se realizó utilizando los cebadores correspondientes para los genes de interés descritos en la **Tabla 7**. Para la reacción se utilizó el kit *Sso Advanced Universal Syber Green SuperMix* (BioRad, CA, EEUU) siguiendo el protocolo de la casa comercial (**Tablas 8 y 9**) y el lector Quant Studio 7 Flex (*Thermo Fisher*, Waltham, MA, EEUU). En cada placa se metieron dos pocillos por gen de estudio como blanco. Para todos los genes, se realizó una curva estándar trazando los valores de Cq frente al logaritmo de la dilución de ADNc. Además, se verificó que no existiesen productos inespecíficos o dímeros de cebadores en los productos de la PCR mediante el perfil de temperatura de disociación y una electroforesis en gel de agarosa. Con el fin de normalizar los niveles de ARNm se utilizaron los genes UBC o TBP.

Tabla 7. Secuencia de los cebadores utilizados.

Gen	Sentido	Anti-sentido
Per1	ttgatgtgatggcctgtgtggactgtggg	gtgcagtttctgctgtaggtaaggctgg
Per2	ttcttcggttgaaccacccagacatctgc	ccctggtccttttaagcctcatagtcttgg
Per3	ggggactgcaaaagagaaaacgtccaggcg	aaaaggctcgattttcctaatacattatcaggacgc
Cry1	gtgcgtaatccaaattggtattgtagc	acatgatacttcacaagtttgggtc
Clock	ctatgaggtatgatgtgctgtgggaatgg	aaaatcaaggcactatgggggtttttccctg
Bmal1	gcaaatggtcatttcagatgtatgg	ggattcttacaaggaagaataaacgg
Nr1d2	acttgaagctattctggaactaacat	catgtcctcatcaattacagttttag
Sirt1	tagacacgctggaacaggttgc	ctcctcgtagagcttcacagtc
Prx1	gggtcttaaaggctgatgaaggcatctcg	agctgggcacacttccccatgtttgtc
CD44	gctttcaatagcacctgcccacaatgg	aaagaggctctgtctgtccaatcttcc
CD133	cactaccaaggacaaggcgcttc	caacgcctctttggtctccttg
TBP	ttgtccttttgcatttgctgggctcctc	gtcatcagtgagacgggttccatttaacc
UBC	tgggatgcaaactctcgtgaagaccctgac	accaagtgcagagtggactctttctggatg

Tabla 8. Cantidades utilizadas por reacción.

Reactivo	Volumen (μL)
Cebadores (5μM)	1
Sso Advanced Universal Syber Green SuperMix	10
ADNc (50 ng)	5
Agua	4
Volumen total	20

Tabla 9. Condiciones de temperatura y tiempo de la qRT-PCR.

Etapas	Ciclos	Tiempo	Temperatura
Activación de la polimerasa	1	2 minutos	95°C
Desnaturalización	40	20 segundos	95°C
Anillamiento/extensión		30 segundos	65°C
Curva melt	1	5 segundos	65*
		5 segundos	95

*aumentar la temperatura 0,5°C/s

4. EXTRACCIÓN ADN

La extracción de ADN de los tejidos de las muestras se realizó utilizando el kit *QIAamp DNA Mini* (Qiagen, Hilden, Germany) siguiendo el protocolo proporcionado por la casa comercial. Posteriormente, se cuantificó utilizando el *NanoDrop ND-1000* (Implen GmbH, Munich, Germany).

5. ANÁLISIS DE LAS MUTACIONES DE p53

Se analizaron las mutaciones en los exones 2-10 de TP53 de las muestras de tejido mediante PCR utilizando cebadores específicos (**Tabla 10**). Los productos obtenidos de la PCR se purificaron utilizando el kit comercial *Wizard SV Gel and PCR clean-up system* (Promega, Madison, WI, USA). Posteriormente, se realizó la secuenciación automatizada de los productos purificados de la PCR utilizando el secuenciador *3130 XL Applied Biosystems* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Los resultados obtenidos se analizaron utilizando el software libre *Chromas Lite 2.1.1* (St South Brisbane, QLD, Australia).

Tabla 10. Cebadores utilizados para analizar las mutaciones en TP53.

Exones	Sentido	Antisentido	Tamaño (pb)
2-4	agctgtctcagacactggcatggtgttgg	cactgacaggaagccaaagggtgaagagg	840
5-6	gttgctttatctgttcactgtgcctgac	tagggagggtcaatatagcagcaggagaaag	548
7-9	cagcctgggcgacagagcgagattccatc	aaccaggagccattgtctttgaggcatcac	987
10	tacttgaagtgcagtttctactaaatgcatg	Aggaagactaaaaaatgtctgtgcagggc	393

6. LÍNEAS CELULARES Y CULTIVO

Durante el desarrollo de este estudio se utilizaron dos líneas celulares estables de carcinoma colorrectal humano con diferente estado del gen *p53*: HCT-116 *p53 wt* y HCT-116 *p53 null*, pertenecientes al repositorio de *Horizon Discovery* (Cambridge, Reino Unido). Estas células se cultivaron bajo condiciones estándar de temperatura (37°C) y CO₂ (5%), en una atmósfera de humedad relativa. El medio de cultivo utilizado fue RPMI 1640 (*Gibco, Carsbad, CA, EE.UU*) suplementado con 10% suero bovino fetal (FBS), 1 % penicilina-estreptomicina y 2 mM de L-Glutamina (*Gibco, Carsbad, CA, EE.UU*).

La sincronización de los cultivos en aquellos ensayos en que fue necesario se realizó suplementando el medio con Forskolina (*Sigma-Aldrich Co*, Burlington, MO, EE.UU) 10 μ M durante una hora antes de comenzar el experimento.

Los tratamientos con agomelatina y melatonina se llevaron a cabo utilizando fármacos de *Sigma-Aldrich Co* (Burlington, MO, EE.UU).

7. ENSAYO DE VIABILIDAD

El análisis de la viabilidad se llevó a cabo mediante en ensayo MTT. Para ello, se sembraron 4.000 células por pocillo en placas de 96 pocillos en un volumen final de 100 μ L. Se dejaron crecer las células toda la noche y se trataron con dosis diferentes de los fármacos de interés (agomelatina y melatonina) durante 72 horas.

Una vez transcurrido el tiempo de tratamiento se añadieron 10 μ L de 5 mg/ml MTT en cada pocillo y se incubó a 37°C y 5% de CO₂ durante 4 horas. Posteriormente, las células se lisaron con 100 μ L de tampón de lisis (20% SDS en 50% formamida a pH 4,7). A continuación, se midió la densidad óptica utilizando el lector Triad Multimode (Dynex Technologies, Chantilly, VA, USA) a 570 nm. La media del porcentaje de viabilidad se determinó en base a la absorbancia del control interno de cada condición.

8. ENSAYO DE FORMACIÓN DE ESFERAS

a. Método insphero (viabilidad)

En este método se utilizó la técnica de *PerkinElmer* (Waltham, MA, EE.UU) *InSphero GravityPLUS™* siguiendo el protocolo descrito por el propio fabricante. Para ello se sembraron 2.500 células por pocillo en la placa de 96 pocillos *GravityPLUS™*, y se dejaron crecer en condiciones de mantenimiento (5% de CO₂ y 37°C de humedad). Después de 3 días en cultivo, las células comenzaron a formar esferoides visibles a simple vista que se transfirieron a la placa *GravityTRAP™* donde se dejaron crecer durante 4 días más. Durante este tiempo, el medio se fue cambiando cada 2 días. Transcurrido este tiempo, los esferoides fueron tratados con diferentes fármacos y dosis según las condiciones de estudio durante 72 horas.

Las imágenes de los esferoides se llevaron a cabo utilizando un objetivo de 4x del módulo de imagen del lector de placas *EnSight™* (*PerkinElmer*). La adquisición se realizó de manera automática por el software *Kaleido 2.0*.

b. Caracterización de las esferas formadas (Viabilidad)

Para ello se utilizaron placas de 96 pocillos, en los que se añadió 50 μL de agarosa 2% por pocillo. Se sembraron 500 células por pocillo en un volumen final de 150 μL (el medio utilizado fue RPMI para ensayos de viabilidad, o el de crecimiento de esferas, descrito en el punto 22, para caracterización de CMCs).

Se dejaron crecer las células a 37°C y 5% CO_2 hasta que se formaron los esferoides (72 horas). En este momento se retiró parte del medio y se añadió el medio con o sin tratamiento según fuera necesario. Cada 24 horas se hace una foto de cada uno de los esferoides con la que determinar su evolución, hasta alcanzar las 72 horas de tratamiento.

El volumen de los esferoides formados se analizó utilizando ImageJ/Fiji a partir de la siguiente fórmula: $V = (4\pi/3) \times (\text{ancho}/2)^2 \times (\text{largo}/2)$.

9. ENSAYO DE FORMACIÓN DE COLONIAS

Se sembraron 1.000 células por pocillo en placas de 6 pocillos y se dejaron crecer durante 72 horas a 37°C y 5% de CO_2 , momento en el que fueron tratadas con el fármaco correspondiente. Tras 72 horas de tratamiento, este se retiró y se dejaron crecer las células bajo condiciones estándar de temperatura y CO_2 hasta completar los 10 días post-siembra.

El conteo de las colonias formadas se realizó una vez que estas se habían teñido con cristal violeta + metanol 20%. Para la tinción se retiró el medio de cultivo y se lavaron los pocillos con agua fría, posteriormente se añadió el colorante de manera que cubriese toda la superficie del pocillo. Se dejó actuar durante 5 minutos, se retiró el excedente y se lavó 2 veces con agua fría. La cuantificación del número y área de las colonias se llevó a cabo utilizando el software de análisis de imagen *Fiji*. Fueron considerados colonias aquellas que presentaron un área superior a 20 μm^2 .

10. ESTUDIO DEL CICLO CELULAR

El estudio del ciclo celular se basa en el contenido de ADN, el cual permite determinar el porcentaje de células que se encuentran en cada una de las fases del ciclo (G0/G1, S o G2/M).

Para llevarlo a cabo se sembraron 50.000 células en placas de 6 pocillos, se trataron con el fármaco y dosis correspondiente, y se dejaron crecer durante 72 horas. Transcurrido este tiempo, las células se lavaron con PBS 1X y se fijaron con

etanol 70% frío, posteriormente, se lavaron con PBS-BSA 2% y se centrifugaron. El pellet de células se resuspendió en PBS/IP (20 μ M) /RNasa (50 μ M) (*ImmunoStep*, Salamanca, España) y se incubó durante 15 minutos a 4°C.

La identificación de las células en cada una de las fases se llevó a cabo utilizando el Citómetro de flujo BD FACSAria IIIu (*Becton Dickinson, BD Biosciences*, CA, EE.UU) estudiando la variación de la intensidad de señal del marcaje con Ioduro de Propidio (IP).

11. ENSAYO DE APOPTOSIS

La apoptosis se analizó utilizando el kit *IP-Anexina V-FITC* (*Becton Dickinson, BD Biosciences*, CA, EE.UU).

Para realizarlo, se sembraron 50.000 células por pocillo en placas de 6 pocillos. Las células se dejaron crecer durante toda la noche y se trataron según las condiciones de estudio correspondientes. Posteriormente, se tripsinizaron y lavaron con PBS 1x. Una vez retirado el sobrenadante y resuspendido el pellet en *Binding Buffer* (tampón proporcionado por el propio kit), se incubaron con 2.5 μ L de Anexina V-FITC y 2.5 μ L de IP durante 15 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad.

Se estudió la señal emitida en PE-Texas Red y FITC utilizando el Citómetro de flujo BD FACSAria IIIu (*Becton Dickinson, BD Biosciences*, CA, EE.UU).

12. OBTENCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

Con el fin de extraer las proteínas, se sembraron las células y se dejaron crecer hasta que alcanzaron una confluencia cercana al 80 %. En este momento se tripsinizaron y levantaron utilizando 0,05% Tripsina-EDTA 1x (*Gibco*, Carsbad, CA, EE.UU) durante 5 minutos.

Una vez recogidas, se centrifugaron y se retiró el sobrenadante. El pellet se incubó durante 30 minutos sobre hielo con tampón de lisis *RIPA*, suplementado con inhibidores de proteasas (IP, *PMSF*) y fosfatasa (IF) (*Santa Cruz*, CA, EEUU). Tras centrifugar a 4°C y 1.100 rpm durante 10 minutos, se recogió el sobrenadante, en el que se encuentran disueltas las proteínas.

Con el fin de utilizar la misma cantidad de proteína se cuantificaron mediante el método colorimétrico *Bradford* (*Bio-Rad Laboratories*, Hercules, CA, EEUU). Para ello fue necesario obtener una curva patrón que se realizó a partir de concentraciones conocidas de BSA a las que se les añadió Bradford en

proporción 1:5 en agua destilada y se midió su absorbancia a 595 nm en el lector Triad Multimode (*Dynex Technologies*, Chantilly, VA, USA). A partir de la ecuación de la recta obtenida es posible determinar la cantidad de proteína de la que se dispone.

13. WESTERN BLOT

Una vez obtenida y cuantificada la proteína, se cargaron 35 µg de proteína en un gel de SDS-poliacrilamida de diferente porcentaje (**Tabla A1**) en función del tamaño de la proteína de estudio (**Tabla A2**).

El gel se transfirió a una membrana de PVDF (*Amersham*, GE Healthcare, Reino Unido) utilizando el sistema de transferencia Bio-Rad Trans-Blot Turbo (*Bio-Rad Laboratories*, Hercules, CA, EEUU). Una vez transferida, la membrana se incubó con el anticuerpo primario correspondiente (**Tabla 11**) durante toda la noche a 4°C o durante 1 hora a 37°C.

Tabla 11. Anticuerpos primarios utilizados.

Proteína	Isotipo	Especie	Referencia	Casa comercial
P53	Monoclonal	Ratón	SC-126	Santa Cruz Biotechnology
Casp3	Monoclonal	Ratón	SC-271028	Santa Cruz Biotechnology
SIRT1	Monoclonal	Ratón	SC-74504	Santa Cruz Biotechnology
β-actina	Monoclonal	Ratón	SC-59673	Santa Cruz Biotechnology
β-tubulina	Monoclonal	Ratón	SC-166729	Santa Cruz Biotechnology
SQSTM1/p62	Monoclonal	Ratón	SC-28359	Santa Cruz Biotechnology
MAP-LC3α/β	Monoclonal	RATÓN	SC-398822	Santa Cruz Biotechnology
FoXO1	Monoclonal	Conejo	2880	Abcam

Tras varios lavados con TBS-T 1x (tampón de lavado con detergente), se incubó con el anticuerpo secundario correspondiente durante 1 hora a temperatura ambiente (**Tabla 12**). Las proteínas fueron detectadas sobre la membrana utilizando el revelador *Amersham ECL Select Western Blotting Detection Reagent* (*GE Healthcare*, Reino Unido) y el equipo ChemiDoc MP Imaging System (*Bio-Rad Laboratories*, Hercules, CA, EEUU).

Tabla 12. Anticuerpos secundarios utilizados.

Especie reactiva	Isotipo	Referencia	Casa comercial
Anti-mouse	m-IgG	SC-516102-CM	Santa Cruz Biotechnology
Anti-rabbit	m-IgG	SC-2357	Santa Cruz Biotechnology

14. GENERACIÓN DE TUMORES XENÓGRAFOS EN RATONES

Después de obtener el dictamen favorable por parte del Comité de ética del (Aprobación nº. 12/07/2019/127) se comenzó con los ensayos sobre ratones. Los protocolos difieren ligeramente según el estudio.

- **Estudio del efecto de los tratamientos de agomelatina y melatonina sobre líneas celulares estables de CCR en función del estado de p53** (Capítulo 2 de resultados). Se utilizaron ratones hembra Balb/c (un/un) (*Charles River Laboratories*) con una edad de entre 6 y 8 semanas. Los ratones se mantuvieron en cuarentena durante una semana antes de la inyección subcutánea de las células. Se inyectaron 250.000 células de las líneas HCT-116 y HCT-116 p53 *null*, en el flanco derecho e izquierdo de cada ratón, respectivamente, en 100 µL de medio RPMI 1640. Una vez que el tumor adquirió un tamaño de unos 100-150 mm³, los animales fueron divididos aleatoriamente en 4 grupos (n= 8 ratones), los cuales se corresponderían con control o sin tratamiento, agomelatina, melatonina y 5-FU. Los tratamientos de agomelatina, melatonina y 5-FU se llevaron a cabo de manera intraperitoneal con una concentración de 5 mg/kg, 5 mg/kg y 50 mg/kg, respectivamente, tres veces por semana durante dos semanas. Los días de tratamiento se medía el volumen tumoral. Tras el sacrificio de los animales se extrajo sangre de los ratones en la que se analizaron diferentes metabolitos con el fin de completar el estudio con la descripción de posibles efectos secundarios de los tratamientos. Para el cálculo del volumen tumoral se aplicó la siguiente fórmula: $V = (4\pi/3) \times (\text{ancho}/2)^2 \times (\text{largo}/2)$.
- **Estudio del papel de SIRT1 y su implicación en el efecto de los tratamientos con agomelatina y melatonina en líneas celulares estables de CCR** (Capítulo 3 de resultados). En este caso se utilizaron ratones hembra NSG (*Charles River Laboratories*) con una edad de entre 6 y 8 semanas. Con estos animales se llevaron a cabo dos estudios. Por un lado y con el fin de comprobar el efecto de los tratamientos sobre el volumen tumoral, se inyectaron 250.000 células embebidas en 100 µL Matrigel y RPMI en proporción 1:1, de los vectores vacíos o clones estables del silenciamiento de SIRT1 de las líneas HCT-116 y HCT-116 p53 *null*, en el flanco derecho e izquierdo de cada ratón, respectivamente. A partir de este punto se siguió el mismo protocolo

que en el caso anterior. El tamaño tumoral se midió tres veces por semana y se calculó su volumen utilizando la siguiente fórmula $V = (4\pi/3) \times (\text{ancho}/2)^2 \times (\text{largo}/2)$. Tras las dos semanas de tratamiento, los animales fueron sacrificados y se analizó el volumen final de dichos tumores.

Por otro lado, estos animales se utilizaron para determinar la capacidad de formación de tumores a partir de la población TS1. Para ello se inocularon 2.500 células embebidas en 100 μL Matrigel y RPMI en proporción 1:1, de los vectores vacíos o clones estables del silenciamiento de SIRT1 de las líneas HCT-116 y HCT-116 p53 *null*, en el flanco derecho e izquierdo de cada ratón, respectivamente. Se fue comprobando el estado de los animales hasta que se observaron los tumores. Tras 4 semanas, los animales fueron sacrificados y se analizó el volumen final de dichos tumores.

15. OBTENCIÓN DE ARN PARA EL ESTUDIO DEL RITMO CIRCADIANO

Este se llevó a cabo de dos maneras. En un primer momento se realizó el estudio durante un periodo de 48 horas, en el que se recogió ARN cada 4 horas. Posteriormente se modificó la duración del estudio, acortándolo a 24 horas y se recogió ARN cada 3 horas.

Independientemente de la duración del estudio se sembraron las células en placas de 6 pocillos. Una vez sembradas, se dejaron crecer durante toda la noche y antes de comenzar con la recogida, a la mañana siguiente, se sincronizaron con Forskolina 10 μM durante una hora, transcurrido este tiempo se retiró el medio y se añadió el tratamiento correspondiente. A partir de este momento, se fueron recogiendo cada 3/4 horas utilizando el tampón *RLT* del kit de extracción de ARN (*Qiagen*, Hilden, Alemania).

Las muestras recogidas se mantuvieron a -20°C hasta el momento de su procesamiento.

16. ANÁLISIS DE LA RITMICIDAD

Para obtener los parámetros circadianos, se determinó la distribución correcta (interdependencia de datos y distribución normal) para los datos de cada serie de tiempo mediante *lag plots*/Q-test y gráficos de probabilidad normal/K-S test.

Con el fin de conocer la ritmicidad de los datos, así como cada uno de los parámetros que lo conforman se realizó un análisis Cosinor utilizando el programa TSA (*Time Series Analysis - Cosinor 8.0 Lab View* January 2020) (<http://www.euroestech.com/>). Este método consiste en ajustar los puntos experimentales a una función sinoidal (coseno). La función es $y = M + A \cos(\omega t - \varphi)$, donde:

- M es el MESOR (*mean estimated over rythm*). Valor medio de un ritmo ajustado a la función sinusoidal
- A es la amplitud. Valor obtenido como la diferencia entre el valor máximo y el mínimo de un ritmo.
- φ representa la acrofase. Localización temporal del máximo valor de la función sinusoidal ajustada a los datos de una variable biológica
- t el tiempo.

Además, con estos valores pueden determinarse los parámetros de:

- Periodo: duración de un ciclo completo en una variable rítmica.
- Frecuencia: Número de veces que se repite un fenómeno en una unidad de tiempo. Inversa del periodo.

17. TRANSFECCIÓN

Para la obtención de clones estables se transfectaron ambas líneas celulares con el plásmido de silenciamiento de SIRT1 pRS shRNA Cat. TR20003 de Origine Technologies (Rockville, MA, USA) o con su correspondiente vector vacío.

Las células se sembraron en placas de 6 pocillos, 150.000 células por pocillo. En el momento en que las células alcanzaron una confluencia cercana al 60-70%, se realizó el protocolo de transfección propiamente dicho. Para ello, se preparó la mezcla de lipofectamina 3000 (*Thermo Fisher Scientific Waltham, MA, EE. UU*) en un ratio de lipofectamina/ADN de 2,5 en medio Opti-MEM I (1X) +GlutaMAX-I (*Gibco, Carsbad, CA, EE.UU*) sin suero. Se eliminó el medio de cultivo de los pocillos y se añadieron 500 μ L de la mezcla por pocillo. Tras 6 horas en

condiciones de mantenimiento de temperatura y CO₂, se añadió medio RPMI 1640 de crecimiento (*Gibco, Carsbad, CA, EE.UU*) hasta los 2 mL.

18. SELECCIÓN Y OBTENCIÓN DE MUTANTES ESTABLES

La selección de los clones estables se llevó a cabo mediante resistencia a antibiótico, es decir, solamente las células que hayan integrado el plásmido en su genoma sobrevivirán. Para ello, 48 horas post-transfección, se añadió una alta concentración de puomicina (*Sigma Aldrich, Burlington, EE.UU*), antibiótico indicado para el plásmido utilizado. Las células que sobrevivieron comenzaron a crecer formando colonias, momento en que la concentración de antibiótico se disminuye progresivamente hasta alcanzar la concentración de mantenimiento de 0,2 µg/mL.

19. INMUNOCITOQUÍMICA

Los esferoides formados se pasaron a una placa *Low Attachment* de Ibidi, donde se cambió el medio de cultivo por PBS. Para la tinción de las células muertas se añadió 1 µL de *Zombie Red* (*Zombie Red Fixable viability kit, Biolegend*) por cada 100 µL de PBS, y se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente y oscuridad. Transcurrido este tiempo, y con el fin de determinar las células vivas, se añadió 0.5 µL de Calceína (*Calcein Violet-AM, Biolegend*) por cada 100 µL de PBS y se incubó 10 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad.

Posteriormente se obtuvieron las imágenes utilizando el microscopio confocal ZEISS LSM900, un objetivo 10x y las mismas características en cuanto a ganancia y potencia del láser para todas las condiciones.

El número de células marcadas con *ZombieRed* se determinó utilizando el software ImageJ/Fiji. Dicho número se normalizó en función del volumen de la esfera, con lo que se obtuvo la ratio de células muertas por esfera en cada condición.

20. ENSAYO DE HERIDA

Se realizó este ensayo para determinar la capacidad de migración celular, para ello se cuantificó el porcentaje de cierre de herida.

Se sembraron las células en placas de 6 pocillos, y se dejaron crecer hasta obtener una monocapa de células con una confluencia cercana al 90%. Después de sincronizar el cultivo con forskolina, se realizó la herida utilizando una punta de pipeta de 200 µL. Se lavó el pocillo dos veces con PBS y se añadió RPMI 1640

sin suero con o sin tratamiento, en función de la condición de estudio. En este momento y con el microscopio LEICA IRB, se realizaron 3 fotografías a lo largo de la herida, lo que se consideró tiempo 0. Posteriormente, se dejaron crecer las células durante 72 horas, momento en que se repitieron las fotografías.

Para calcular el porcentaje de cierre se comparó el área de dicha herida en estos dos puntos de tiempo, tomando como 100% el área de la herida a tiempo 0. Este análisis se llevó a cabo utilizando el software gratuito de análisis de imagen ImageJ.

21. CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS MADRE CANCERÍGENAS

a. Cuantificación de la actividad de la enzima aldefluor deshidrogenasa-1 positiva (ALDH1).

Para detectar la actividad ALDH1 en el cultivo celular con y sin tratamientos se utilizó el kit *ALDEFLUOR* (*Stem Cell Technologies*, Vancouver, Canadá) de acuerdo con el protocolo propuesto por el fabricante.

Se sembraron las células en placas de 6 pocillos, después del crecimiento y tratamiento durante 72 horas, se tripsinizaron y se lavaron con PBS 1x. A continuación, se centrifugaron durante 5 minutos y se eliminó el sobrenadante. Se rotularon dos tubos uno en el que se añadirá el inhibidor DEAB (diethylaminobenzaldehyde) y BODIPY-aminoacetaldehyde (BAAA) y otro en el que solo se añadirá BAAA. Una vez resuspendido el pellet en el tampón proporcionado en el kit, se añadieron 500 µL a cada uno de los tubos y se incubaron los tubos durante 40 minutos a temperatura ambiente y oscuridad.

El porcentaje de células ALDH1 positivas se cuantificó midiendo la señal en FITC utilizando el Citómetro de flujo BD FACSAria IIIu (Becton Dickinson, BD Biosciences, CA, EE.UU).

b. Fenotipificación del carácter stem por citometría de flujo

Con el fin de caracterizar el fenotipo CMCs, una vez tripsinizadas las células se tiñeron con 1µL de cada uno de los siguientes marcadores de membrana: anti-CD44-PE, anti-CD133-APC, anti-CD326-FITC (Biolegend, San Diego, CA, EEUU). Se incubó la mezcla durante 30 minutos a 4°C y en oscuridad. Transcurrido este tiempo se centrifugó, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en PBS. De manera que ya están listas para realizar el análisis propiamente dicho.

La fenotipificación celular se realizó utilizando el Citómetro de flujo BD FACSAria IIIu (Becton Dickinson, BD Biosciences, CA, EE.UU).

c. Cuantificación del número de esferas formadas (Capacidad de renovación)

Este ensayo se llevó a cabo utilizando tanto la población total como la población de CMCs presente en el cultivo. Se sembraron 750 células por pocillo en placas de 24 pocillos de ultra baja adherencia, en medio específico para cultivo de esferas DMEM:F12 (*Gibco, Carsbad, CA, EE.UU*) suplementado (**Tabla 13**). Una vez sembradas se dejaron crecer 72h, momento en que comenzaron a formarse las primeras esferas. A continuación, fueron tratadas con los diferentes fármacos y se dejaron crecer otras 72 h más. Transcurrido este tiempo se llevó a cabo el recuento de esferas formadas utilizando el microscopio Leica DM IRB, se consideraron esferas aquellas que presentaban un diámetro superior a $> 25 \mu\text{m}$.

Tabla 13. Componentes del medio específico para el crecimiento de esferas.

Componentes	Concentración final
DMEM/F12	
antibiótico	1%
Hidrocortisona	1 $\mu\text{g/mL}$
Heparina	4 ng/mL
Insulina	10 $\mu\text{L/mL}$
B27	1X
EGF	10 ng/mL
FGF	20 ng/mL

d. Obtención de la población CMC

Para el aislamiento de una población compuesta únicamente por células madre cancerígenas propiamente dichas se siguió el protocolo de tripsinizaciones seriadas diferenciales como se describe en *Morata-Tarifa, C et al. 2016* (Morata-Tarifa et al., 2016).

Con este fin se sembraron 50.000 células por pocillo en una placa de 6 pocillos, y se dejaron crecer hasta que alcanzaron una confluencia cercana al 60-80%. Tras lo cual se retiró el medio de cultivo y se lavaron las células con PBS 1x, este se añadió muy despacio y sin dejarlo caer directamente sobre las células. Posteriormente, se añadieron 250 μL de tripsina 0.05%, previamente atemperada a 37°C . Se dejó actuar la tripsina durante 2 minutos y se recogieron las células que

se habían despegado, estas células son la población 1 sensible a la tripsina (TS1), consideradas como población compuesta únicamente por CMCs.

22. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El tipo de análisis estadístico llevado a cabo varió en función del tipo de muestra que se estuviera utilizando. A continuación, se describen los diferentes métodos y softwares utilizados para el análisis de los resultados obtenidos en este trabajo.

En el estudio realizado sobre muestras de pacientes, las variables se normalizaron mediante su transformación logarítmica. Los niveles de ARNm de la mucosa normal y el tejido tumoral se compararon mediante la prueba *t Student* para muestras pareadas. Para el resto de las comparaciones, los niveles de ARNm de los genes analizados en los tejidos tumorales fueron normalizados utilizando los niveles de ARNm de la mucosa no tumoral adyacente en cada paciente por separado. En estos casos, las comparaciones se realizaron utilizando la *t de Student* para muestras no pareadas. La expresión alta o baja del ARNm de cada gen se determinó en base a la mediana. Los valores de *p* inferiores a 0.05 se consideraron significativos. Todos los cálculos estadísticos se llevaron a cabo con el software *SPSS* versión 15.0 para Windows (*SPSS Inc.*).

Para el análisis estadístico llevado a cabo en la parte 2 y 3 de los resultados (a excepción del análisis de los ritmos), lo primero que se llevó a cabo fue el estudio de la normalidad de los datos. Posteriormente, realizó el test estadístico ANOVA seguido de un test de Tukey, para lo que se ha utilizado el software *GraphPad Prism 8* (*GraphPad*, La Jolla, EE.UU). Las diferencias estadísticas entre las muestras se consideran significativas cuando el *p*-valor fue $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), o $p < 0.001$ (***)).

En el caso concreto del estudio de los ritmos circadianos la determinación de la ritmicidad se llevó a cabo mediante el rechazo de la hipótesis de amplitud cero con un 95% de certeza, como lo refleja el valor de *P*. Los parámetros de amplitud, acrofase y MESOR se compararon según correspondía. Los datos de las curvas ajustadas se transfirieron a *GraphPad Prism 8* (*GraphPad*, La Jolla, EE.UU). Las características del ritmo de cada variable se compararon mediante una prueba no paramétrica (Orozco-Solis et al., 2015; Refinetti, 1992). Las diferencias estadísticas entre las muestras se consideran significativas cuando el *p*-valor fue $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), o $p < 0.001$ (***)).

RESULTADOS

CAPÍTULO 1: ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE SIRT1 Y MARCADORES DE CMCS EN MUESTRAS DE PACIENTES CON CCR

1. Estudio de la expresión de SIRT1 en muestras pacientes con CCR.

Con el fin de determinar los niveles de expresión de SIRT1 en muestras de pacientes con CCR, se analizó su expresión en tejido tumoral y en tejido no tumoral adyacente. La cuantificación se realizó mediante qRT-PCR.

Se comprobó que la expresión de SIRT1 era significativamente mayor en la muestra de tejido tumoral en comparación con su propio tejido de mucosa adyacente no tumoral (**Tabla 14**). Esta mayor expresión ($P=0.013$) se observó en el conjunto de todos los casos indistintamente del estado de p53. Al agrupar las muestras en función del estado de p53 se observó cómo este incremento de la expresión únicamente se mantenía en aquellas con p53 en estado salvaje ($P=0.038$). Mientras que en el grupo de pacientes que presentaban p53 mutado no se observaron diferencias.

Tabla 14. Expresión de SIRT1 en las muestras de tejido tumoral y no tumoral de los pacientes con CCR.

Todos los casos		
Mucosa no Tumoral ^a	Mucosa Tumoral ^a	P
1.084 (0.931 – 1.262)	1.370 (1.174 – 1.599)	0.013
Muestras con p53 salvaje		
1.103 (0.896 - 1.359)	1.446 (1.147 - 1.823)	0.038
Muestras con p53 mutado		
1.236 (0.972 - 1.665)	1.206 (0.928 - 1.645)	ns

^aLos datos representan la media geométrica y los límites de confianza de la variable.

2. Estudio de la expresión de los marcadores de CMCS en muestras de pacientes con CCR

Se comprobó la expresión en muestras de pacientes con CCR de los marcadores CD133 y CD44, marcadores típicos de CMCS.

Los resultados mostraron que la expresión de ambos marcadores fue significativamente mayor ($P<0.0001$) en el tejido tumoral que, en el tejido no tumoral adyacente, efecto observado independientemente del estado de p53 (**Tabla 15**).

Tabla 15. Expresión de los marcadores CD133 y CD44 en las muestras de tejido tumoral y no tumoral de los pacientes con CCR.

Todos los casos			
Gen	Mucosa no Tumoral ^a	Mucosa Tumoral ^a	P
CD133	5.965 (24.4 – 158.2)	6.960 (10.7 – 52.4)	0.0001
CD44	2.442 (47.0 – 225.7)	4.239 (42.2 – 192.4)	0.0001
Casos p53 salvaje			
CD133	5.508 (5.043 - 5.973)	6.647 (6.207 - 7.087)	0.0001
CD44	2.180 (1.822 - 2.537)	4.292 (3.962 - 4.622)	0.0001
Casos p53 mutado			
CD133	6.167 (5.660 - 6.675)	6.961 (6.448 - 7.474)	0.0001
CD44	2.656 (2.302 - 3.010)	4.165 (3.810 - 4.520)	0.0001

^aLos datos representan la media geométrica y los límites de confianza de la variable.

3. Relación de la expresión de SIRT1 con las características clínico-patológicas de los pacientes con CCR

Tras comprobar que la expresión de SIRT1 era significativamente superior en el tejido tumoral en comparación con el tejido no tumoral adyacente, se estudió la posible relación entre dichos niveles de expresión y las características clínico-patológicas de los pacientes (**Tabla 16**).

Teniendo en cuenta todos los pacientes analizados se observó un aumento significativo en la expresión de SIRT1 asociado al grado de diferenciación del tumor ($P=0.018$). Este aumento también se observó al agrupar los tumores en función del estado de p53 apareciendo únicamente en aquellos casos donde p53 se encontraba en estado salvaje ($P=0.032$).

Sin embargo, no se encontraron relaciones significativas entre la expresión de SIRT1 y factores como la edad, el sexo o el estadio tumoral (TNM).

Tabla 16. Relación entre la expresión relativa de SIRT1, las características clinicopatológicas de los pacientes con CCR y el estado de p53.

Variable		Todos los casos ^a		Casos p53 salvaje ^a		Casos p53 mutado ^a	
		Media ± LC	P	Media ± LC	P	Media ± LC	P
Edad(y)	<72	1.36 (1.04-1.53)	ns	1.29 (0.87-1.89)	ns	1.23 (0.81-1.86)	ns
	≥72	1.30 (1.22-2.08)		1.74 (1.03-2.08)	ns	0.85 (0.59-1.19)	
Género	Hombres	1.48 (1.10-1.77)	ns	1.44 (1.00-2.10)	ns	1.01 (0.66-1.80)	ns
	Mujeres	1.19 (1.13-1.76)	ns	1.55 (0.91-1.88)	ns	1.06 (0.70-1.37)	
Grado Diferenciación	Bien	1.08 (0.78-1.57)	0.018	1.02 (0.68-1.55)	0.032	1.16 (0.87-1.38)	ns
	Moderado + Pobre	1.55 (0.92-2.28)	ns	1.71 (1.29-2.41)	ns	1.22 (0.88-1.84)	ns
TNM	Estadio I + II	1.44 (1.23-1.83)	ns	1.54 (1.12-2.24)	ns	1.22 (0.53-1.89)	ns
	Estadio III + IV	1.34 (1.10-1.71)	ns	1.07 (0.74-1.64)	ns	1.17 (0.18-1.39)	ns

^aLos datos representan la media geométrica y los límites de confianza de SIRT1.

4. Relación entre SIRT1 y los marcadores de CMCs en el CCR

El siguiente paso fue estudiar si existía una relación entre la expresión de SIRT1 y la de los marcadores CD133 y CD44 en los pacientes incluidos en el estudio. Estos marcadores habían sido medidos previamente en esta cohorte (Casado et al., 2017a).

Como se puede observar en la **Figura 20A**, la expresión de SIRT1 fue significativamente mayor en los casos con una elevada expresión de marcadores de CMCs, esto solamente ocurre al considerar todos los casos ($P=0.007$) o aquellos que presentaban p53 en estado salvaje ($P=0.047$). Por el contrario, los tumores con p53 mutado presentaron aproximadamente el mismo valor de expresión de SIRT1 independientemente de la expresión de los marcadores de CMCs (**Figura 20B**).

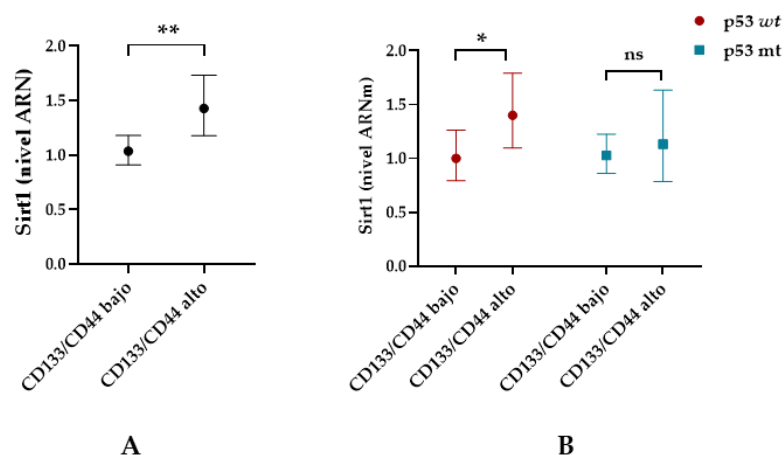


Figura 20. Expresión relativa de Sirt1 en los tumores con baja y alta expresión de marcadores CMCs considerando todos los casos estudiados (**A**) o agrupando en función del estado de p53 (**B**). Los datos representan la media geométrica de los datos y los límites de confianza (95%).

5. Análisis de correlación de la expresión de Sirt1 con los genes del reloj circadiano según la expresión de los marcadores de CMCs

Debido a la implicación de SIRT1 en la regulación del reloj circadiano, se llevó a cabo el análisis de la expresión relativa de diferentes genes del reloj (Per1-3, Cry1-2, Clock, Bmal1 y Nr1d2). Las muestras de los pacientes se agruparon en función de la intensidad relativa de los marcadores de CMCs y el estado de p53 (**Tabla 17**).

Tras el análisis de correlación, únicamente se observaron dos correlaciones significativas. La primera de ellas con Per1 ($P=0.026$) en aquellos tumores que presentaban p53 mutado y un nivel de expresión de CD44 y CD133 bajo. La segunda correlación se dio con Per3 ($P=0.035$) en los tumores con p53 salvaje y una alta expresión de los marcadores de CMCs analizados.

Tabla 17. Resultados de correlación de SIRT1 y los genes del reloj circadiano.

	p53 salvaje		p53 mutado	
	CD44 CD133		CD44 CD133	
	Bajo	Alto	Bajo	Alto
Gen	Per1			
<i>Rs</i>	0.185	0.204	-0.410	0.157
<i>P</i>	0.204	0.216	0.026	0.343
Gen	Per2			
<i>Rs</i>	-0.74	0.082	-0.201	0.164
<i>P</i>	0.372	0.377	0.179	0.337
Gen	Per 3			
<i>Rs</i>	0.306	0.449	0.082	0.110
<i>P</i>	0.083	0.035	0.356	0.389
Gen	Cry1/2			
<i>Rs</i>	-0.223	0.275	0.243	0.001
<i>P</i>	0.195	0.151	0.151	0.499
Gen	Clock			
<i>Rs</i>	0.137	-0.135	0.149	-0.298
<i>P</i>	0.271	0.303	0.249	0.218
Gen	Bmal1			
<i>Rs</i>	-0.247	0.80	0.083	0.277
<i>P</i>	0.170	0.384	0.361	0.273
Gen	Nr1d2			
<i>Rs</i>	-0.123	0.091	-0.043	-0.033
<i>P</i>	0.319	0.369	0.427	0.472

Rs: coeficiente de correlación de Pearson.

CAPÍTULO 2: ESTUDIO DEL EFECTO DEL TRATAMIENTO CON AGOMELATINA SOBRE LÍNEAS ESTABLES DE CCR HUMANO EN FUNCIÓN DEL ESTADO DE P53.

1. La agomelatina inhibe el crecimiento de las células de CCR humano de manera independiente del estado de p53.

Las líneas celulares estables de CCR, HCT-116 (p53 *wild type*) y HCT-116 p53 *null*, se utilizaron para evaluar el efecto antiproliferativo de la agomelatina en ensayos *in vitro*. Estas células se cultivaron en presencia de concentraciones crecientes de agomelatina (0-1 mM) durante 24, 48 y 72 horas.

El tratamiento con agomelatina inhibió el crecimiento celular en ambas líneas de manera dosis-dependiente, desde la dosis más baja utilizada (0.1 mM) y a todos los tiempos estudiados (**Figuras 21A y 21B**). La inhibición del crecimiento celular fue mucho mayor en las células HCT-116 que en las HCT-116 p53 *null*.

Estas mismas líneas celulares fueron tratadas con concentraciones crecientes de melatonina (0-1 mM) durante los mismos periodos de tiempo que el tratamiento anterior. El efecto observado sobre el crecimiento celular fue similar al obtenido con la agomelatina. Se produjo un efecto dosis dependiente en ambas líneas celulares, aunque la indolamina redujo el crecimiento celular de manera significativa después de las 48 horas de tratamiento y con la dosis más alta utilizada (1 mM) (**Figuras 21 C y 21D**).

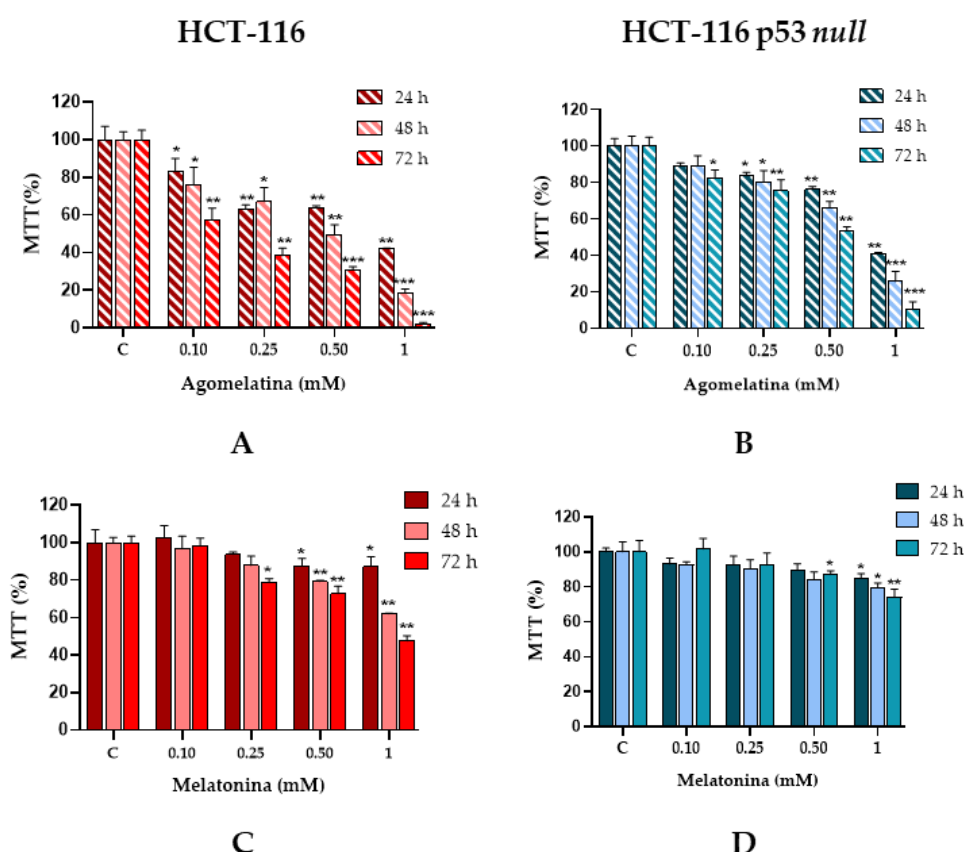


Figura 21. Viabilidad de las líneas celulares HCT-116 y HCT-116 p53 *null* tras el tratamiento con agomelatina (A y B) o melatonina (C y D). Los resultados representan la media $\pm$ SD de 3 experimentos llevados a cabo por cuadruplicado. * P<0.05 vs control; ** P<0.01 vs control; *** P<0.001 vs control.

Posteriormente se comparó el efecto de ambos fármacos después de 72 horas de tratamiento en función del estado de p53 que presentaban las líneas celulares utilizadas. El tratamiento con agomelatina inhibió el crecimiento celular de manera significativa desde la dosis de 0.1 mM, el efecto fue mayor en la línea celular HCT-116 al compararlo con los resultados obtenidos para la línea HCT-116 p53 *null*. A la dosis de 0.5 mM se observó que las células con p53 en estado salvaje presentaban un 30.73% de viabilidad frente un 53.42% observado en ausencia de p53 (Figura 22A).

Tal y como se esperaba, la melatonina indujo una inhibición del crecimiento de manera dosis dependiente en ambas líneas, siendo más efectivo en las células HCT-116 que en las HCT-116 p53 *null*. En la Figura 22B se observa como la melatonina inhibió significativamente el crecimiento de las células HCT-116 desde la dosis de 0.25 mM mientras que en las células HCT-116 p53 *null*, el efecto no fue estadísticamente significativo hasta la concentración de 0.5 mM. A la dosis de melatonina 1 mM, la más elevada utilizada, el porcentaje de viabilidad varió

de un 47.57% en las células HCT-116, frente a un 74.17% en la línea celular HCT-116 p53 *null*.

Estos resultados indican que la agomelatina es más potente que la melatonina, a las dosis usadas, en la inhibición del crecimiento de células de CCR *in vitro*.

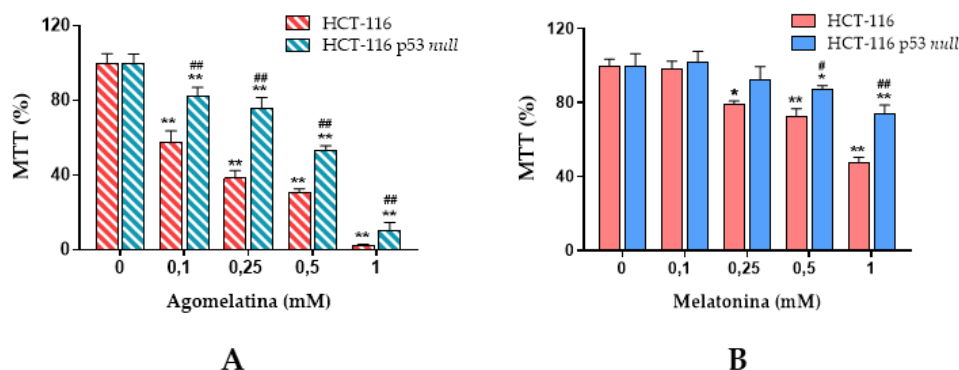


Figura 22. Porcentaje de la viabilidad celular en las líneas HCT-116 y HCT-116 p53 *null* tras el tratamiento con agomelatina (A) o melatonina (B). Los resultados representan la media ± SD de 3 experimentos llevados a cabo por cuadruplicado. * P<0.05 vs control; ** P<0.01 vs control; #P<0.05 vs HCT-116 con igual dosis; ## P<0.01 vs HCT-116 con igual dosis.

Con el fin de determinar el efecto de la agomelatina y la melatonina sobre la supervivencia celular a largo plazo se llevó a cabo el ensayo de formación de colonias durante 10 días (Figura 23).

Se observó una reducción notable ($P<0.001$) del número de colonias formadas en las células HCT-116 (551.33 ± 13.47 colonias) tras el tratamiento con la agomelatina (0.5 mM) (307.66 ± 16.21 colonias) y con melatonina (1 mM) (375 ± 2 colonias), aunque el efecto de la agomelatina fue significativamente mayor ($P<0.01$) comparándolo con el efecto inducido por la melatonina. Al realizar este mismo estudio en las células HCT-116 p53 *null* (327 ± 14 colonias) se comprobó como la agomelatina 0.5 mM (112.33 ± 18.37 colonias) provocó un descenso ($P<0.001$) del número de colonias formadas; mientras que el tratamiento con Melatonina 1 mM (326.33 ± 7.04 colonias) no indujo diferencias significativas al compararlo con el control (Figuras 23A y 23B).

Para corroborar estos resultados, se llevó a cabo un modelo de cultivo en 3D (Figura 23C). A partir de las imágenes obtenidas de los esferoides formados, se calculó su área (Figura 23D). Independientemente del tratamiento utilizado, el tamaño de los esferoides provenientes de las células HCT-116 ($206.28 \mu\text{m}^2$) se vio reducido. Esta disminución fue más significativa tras el tratamiento con agomelatina ($103.25 \mu\text{m}^2$; $P<0.001$) que la observada con el tratamiento con

melatonina ($174.5 \mu\text{m}^2$; $P < 0.01$) a las dosis utilizadas. En los esferoides formados a partir de las células HCT-116 p53 *null* ($177.85 \mu\text{m}^2$), solamente la agomelatina ($142.25 \mu\text{m}^2$; $P < 0.001$) fue capaz de reducir su tamaño.

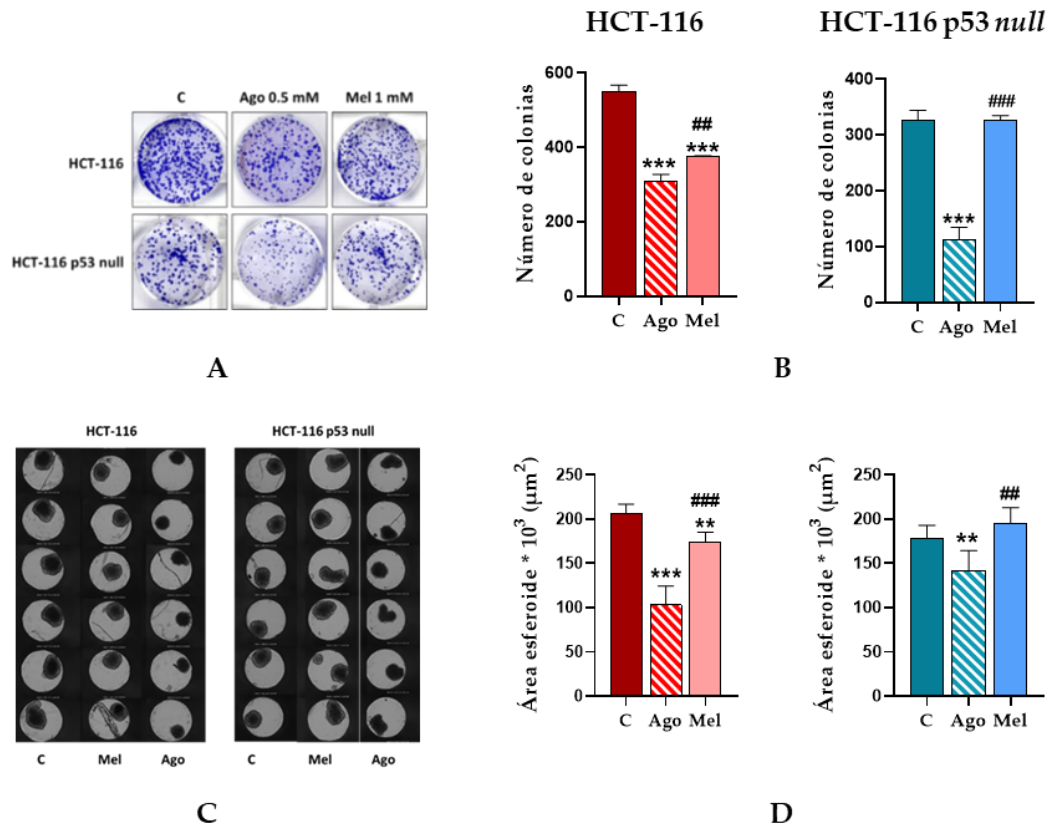


Figura 23. Ejemplo representativo del ensayo de formación de colonias (A). Número de colonias (B) de tres experimentos realizados en células HCT-116 y HCT-116 p53 *null* después del tratamiento con agomelatina (Ago) o melatonina (Mel). Se representa la media $\pm$ SD. Imagen del modelo 3D (C) y área (D) de los esferoides obtenidos tras los tratamientos con agomelatina o melatonina durante 72 horas. ** $P < 0.01$ vs Control (C); *** $P < 0.001$ vs C; ## $P < 0.01$ vs Ago; ### $P < 0.001$ vs Ago.

2. La agomelatina induce parada del ciclo celular y apoptosis dependiente de caspasas

El estudio de la distribución de las células en las distintas fases del ciclo celular tras el tratamiento con agomelatina y melatonina se llevó a cabo mediante citometría de flujo (Figuras A1 y A2).

El tratamiento con agomelatina 0.5 mM durante 72 horas indujo la acumulación en la fase G2/M tanto en las células HCT-116 ($33.25 \pm 1.91\%$ de las células tratadas vs $23.35 \pm 1.42\%$ de las células control) como en las HCT-116 p53 *null* ($35.50 \pm 1.13\%$ de las células tratadas vs $19.90 \pm 1.42\%$ de las células control). Este tratamiento también provocó un descenso de células en fase G1 en presencia

de p53 ($33.25 \pm 5.24\%$ en el grupo tratado vs $69.47 \pm 1.72\%$ en el grupo control) y en ausencia de este ($54.90 \pm 2.07\%$ tras el tratamiento vs $73.00 \pm 2.68\%$ en el grupo control). El tratamiento con agomelatina 0.25 mM produjo un efecto similar en la línea celular HCT-116 p53 *null* (**Figuras 24A y 24B**).

El tratamiento con melatonina 1 mM durante 72 horas originó una acumulación en la fase G1 del ciclo en las células HCT-116 ($78.70 \pm 3.33\%$ en las células tratadas vs $68.5 \pm 1.83\%$ en las células sin tratar). Este efecto se asoció con un descenso del número de células en fase G2/M ($17.70 \pm 1.91\%$ en el grupo tratado vs $25.60 \pm 1.42\%$ en el grupo control). Por otra parte, en la línea celular HCT-116 p53 *null*, se observó una acumulación de las células en fase G2/M ($28.10 \pm 1.91\%$ en el grupo tratado vs $19.00 \pm 2.73\%$ en el grupo control) y un descenso en la fase G1 ($64.00 \pm 4.33\%$ tras el tratamiento vs $73.00 \pm 4.59\%$ en el grupo control). El tratamiento con melatonina 0.5 mM no produjo variaciones significativas en la distribución del ciclo celular en ninguna de las líneas celulares utilizadas (**Figuras 24C y 24D**).

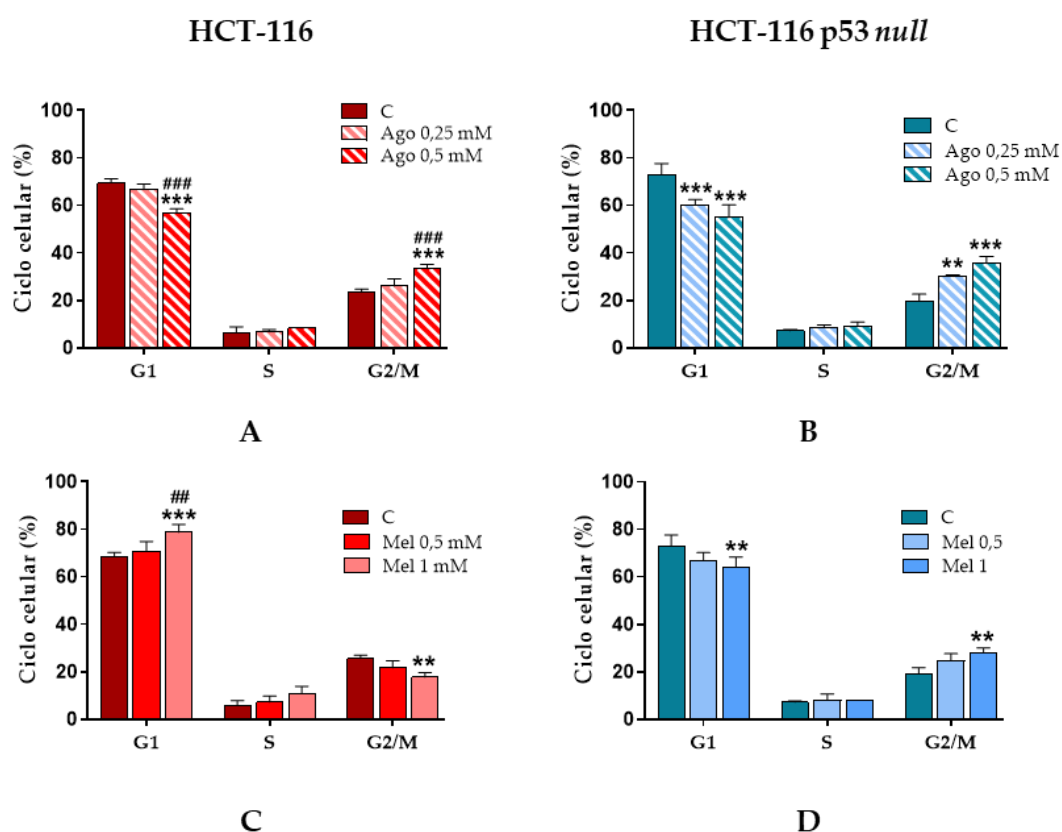


Figura 24. Porcentaje de la distribución celular en cada fase del ciclo celular después del tratamiento con agomelatina (Ago) (A y B) y melatonina (Mel) (C y D) en las células HCT-116 (A y C) y HCT-116 p53 null (B y D). Los datos representan la media $\pm$ SD de tres experimentos hechos por triplicado. ** $P < 0.01$ vs control (C) en la misma fase; *** $P < 0.001$ vs C en la misma fase; ## $P < 0.01$ vs dosis menor del mismo tratamiento; ### $P < 0.001$ vs dosis menor del mismo tratamiento.

Además del efecto sobre el crecimiento celular y la distribución en el ciclo celular, *in vitro*, se estudió el posible efecto del tratamiento con agomelatina o melatonina sobre la apoptosis celular a partir del análisis de la expresión de la Anexina V y del Ioduro de propidio mediante citometría de flujo (**Figuras A3 y A4**).

El tratamiento con agomelatina indujo un alto porcentaje de apoptosis en ambas líneas celulares tras 72 horas de tratamiento a las dosis estudiadas (**Figura 25A**). En las células HCT-116 (18.5% en control) se observó un aumento significativo ($P < 0.001$) de la apoptosis a la dosis de 0.25 mM (68.7%) y a la de 0.5 mM (75.9%). El mismo aumento significativo ($P < 0.001$) se observó en las células HCT-116 p53 null (21.6%) tanto a la dosis menor de 0.25 mM (57.6%) como a la mayor de 0.5 mM (71.46%).

Después del tratamiento de las células con melatonina 1mM durante 72 horas se observó un incremento de la apoptosis en ambas líneas. Las diferencias fueron

mayores en las células HCT-116 ($P<0.01$) (18.5% control vs 21.4% Mel 1 mM) que en la línea celular HCT-116 p53 *null* ($P<0.05$) (21.6% control vs 28.95% Mel 1 mM). A la dosis más baja de esta indolamina (0.5 mM) no se produjo efecto citotóxico en ninguna de las dos líneas analizadas (**Figura 25B**).

Como era de esperar, el tratamiento de las células con agomelatina indujo un mayor porcentaje de apoptosis.

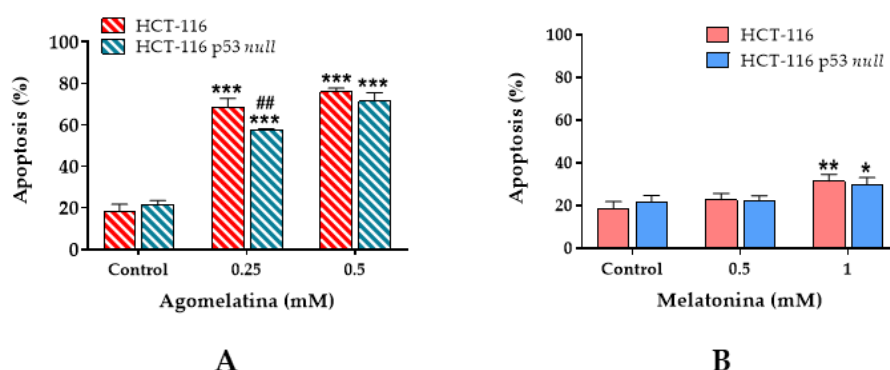


Figura 25. Porcentaje de apoptosis en las células HCT-116 y HCT-116 p53 *null* después del tratamiento con agomelatina (**A**) o melatonina (**B**). Los datos representan la media $\pm$ SD de tres experimentos realizados por duplicado. * $P<0.05$ vs Control; ** $P<0.01$ vs Control; *** $P<0.001$ vs Control; ## $P<0.01$ vs HCT-116 a la misma dosis y fármaco.

Para determinar la implicación de la ruta de las Caspasas en la apoptosis inducida por agomelatina y melatonina, se analizó la expresión de la caspasa 3 activa después del tratamiento con ambos fármacos durante 72 horas. Tal y como se muestra en la **figura 26**, el tratamiento con agomelatina 0.5 mM indujo la activación de la caspasa 3 en ambas líneas celulares, mientras que después de tratar con melatonina no se observó dicha activación, probablemente debido al bajo porcentaje de apoptosis inducido por la indolamina.

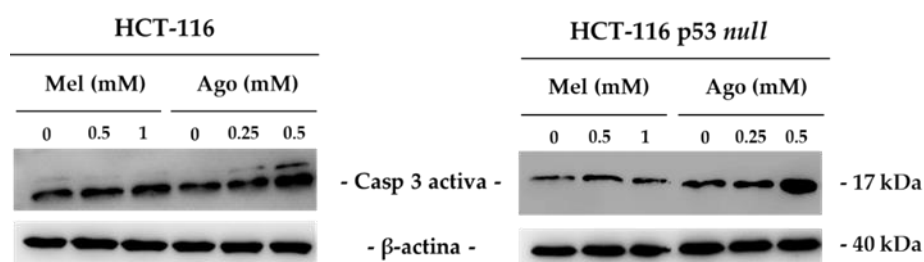


Figura 26. Expresión de Caspasa 3 activa (Casp 3 activa) y β -actina después de 72 horas de tratamiento con diferentes dosis de melatonina o agomelatina en las células HCT-116 y HCT-116 p53 *null*.

3. Regulación del crecimiento tumoral *in vivo* tras el tratamiento con agomelatina.

Para estudiar el efecto del crecimiento tumoral *in vivo* y la regulación del crecimiento tumoral por parte de los tratamientos, se inocularon células HCT-116 y HCT-116 p53 *null* en el flanco derecho e izquierdo, respectivamente, de ratones inmunodeprimidos Balb/c un/un.

Se incluyó un grupo de tratamiento con 5-FU con el fin de comparar su efecto con los obtenidos con agomelatina y melatonina, ya que el 5-FU es actualmente la primera línea de tratamiento frente al CCR.

Todos los tratamientos, a las dosis utilizadas, fueron capaces de reducir el tamaño de los tumores xenógrafos originados a partir de las células HCT-116. Los tratamientos con agomelatina o 5-FU presentaron un efecto similar ($P < 0.05$ vs ratones control). El tratamiento con melatonina mostró un efecto casi significativo ($P = 0.076$) (**Figura 27A**). En los tumores generados a partir de las células HCT-116 p53 *null* solamente la agomelatina redujo el tamaño tumoral ($P < 0.05$); además, el efecto fue significativamente ($P < 0.01$) diferente del obtenido tras el tratamiento con 5-FU (**Figura 27B**).

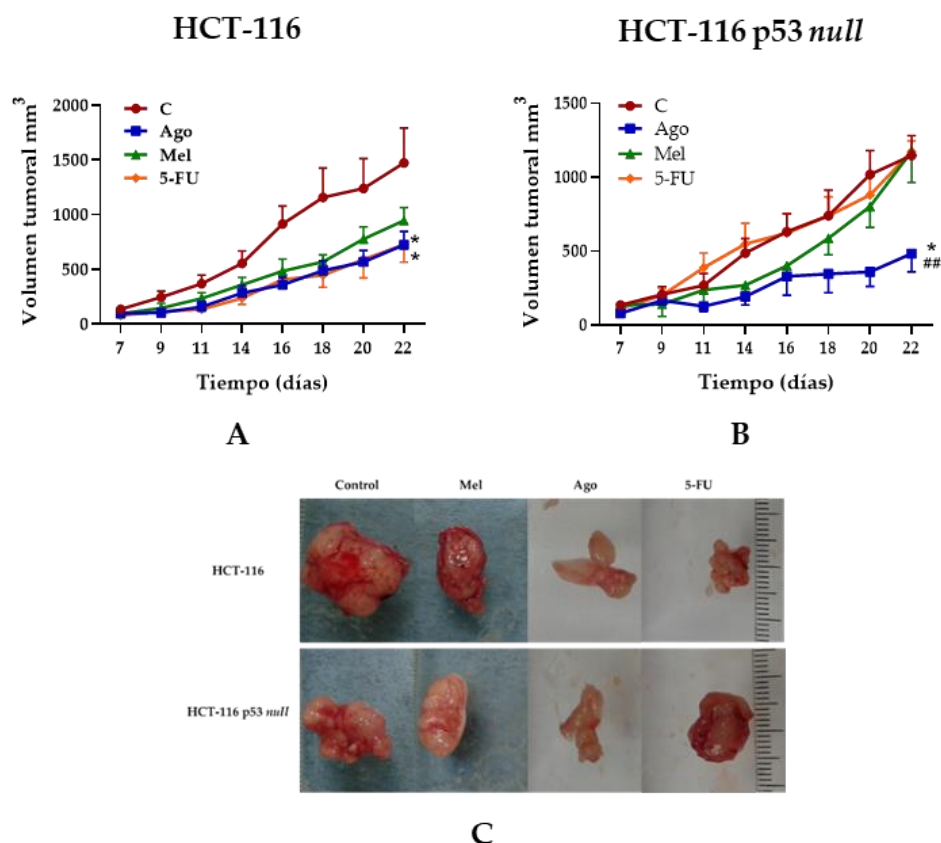


Figura 27. Volumen de los tumores en el modelo de xenógrafos en los cuatro grupos de ratones (control, tratados con agomelatina (Ago), melatonina (Mel) o 5-FU) derivados de células HCT-116 (A) o HCT-116 p53 null (B). Los datos representan la media $\pm$ SEM. * $P < 0.05$ vs Control (C); ## $P < 0.01$ vs 5-FU. Imágenes representativas de los tumores de cada grupo de tratamiento (C).

Con el fin de comprobar el efecto a nivel sistémico de los tratamientos se analizaron los niveles de glucosa, alanina transaminasa (ALT), amilasa, urea, aspartato aminotransferasa y ácido úrico en la sangre de los animales una vez que estos fueron sacrificados (**Figura 28**). Tanto la agomelatina como la melatonina indujeron un aumento ($P < 0.05$) de la glucosa (A) y la alanina transaminasa (B) en sangre, mientras que el tratamiento con 5-FU únicamente originó un incremento ($P < 0.01$) de los niveles de ALT (B). En el resto de los parámetros cuantificados (C-F) no se observaron diferencias en ninguno de los grupos.

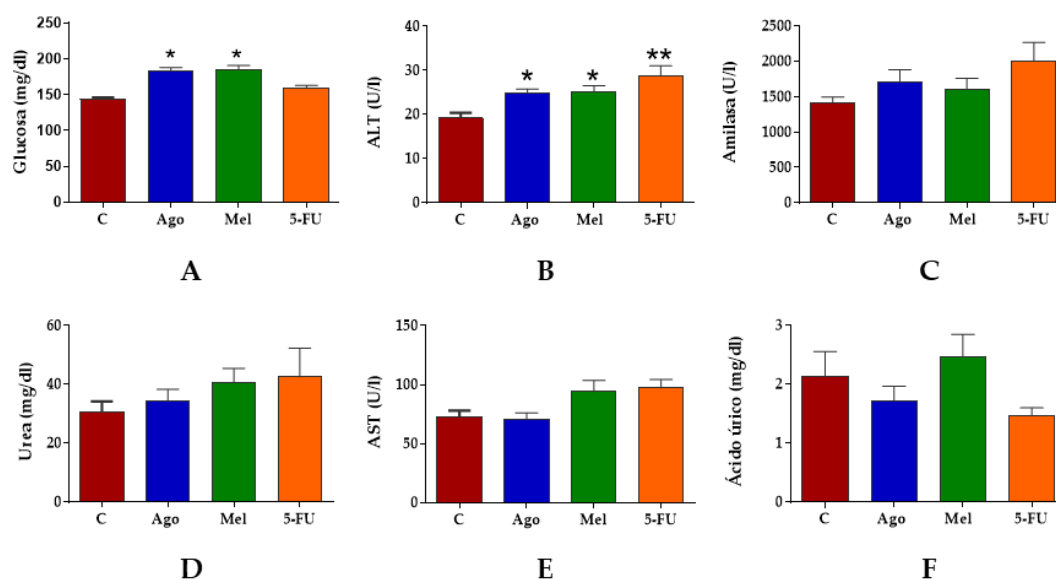


Figura 28. Niveles de glucosa (A), alanina transaminasa (ALT) (B), amilasa (C), la urea (D), la aspartato aminotransferasa (E) y el ácido úrico (F) presentes en sangre tras el sacrificio de los animales. *P<0.05 vs Control (C); **P<0.01 vs C; ***P<0.001 vs C.

4. La agomelatina regula los niveles de la proteína p53 en los modelos *in vitro* e *in vivo* de CCR.

La melatonina y el 5-FU regulan la expresión de los niveles de la proteína p53, y como se ha descrito anteriormente, su presencia es crucial para la efectividad del 5-FU (Longley et al., 2003; Santoro et al., 2012; Violette et al., 2002). También se analizó el efecto de la agomelatina, la cual fue capaz de regular los niveles de p53 tanto en el modelo *in vivo* como en el modelo *in vitro* de CCR utilizados en este trabajo. Como se muestra en la **Figura 29A**, la agomelatina indujo un pequeño incremento de la expresión de la proteína p53 después de 72 horas de tratamiento en la línea celular HCT-116, aunque no se observó ningún cambio tras el tratamiento con melatonina durante este mismo periodo de tiempo. Resultados similares se observaron en el modelo *in vivo*, donde el 5-FU fue el que mayor efecto desencadenó (**Figura 29B**). Tal y como se esperaba la expresión de la proteína p53 fue nula en ambos modelos derivados a partir de la línea celular HCT-116 p53 *null* (**Figura 29**).

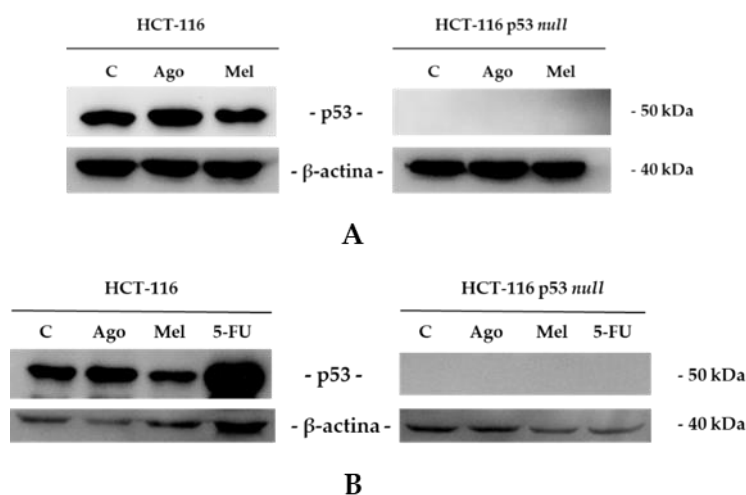


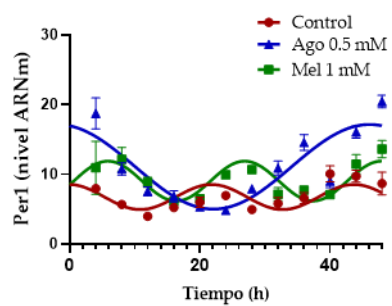
Figura 29. Expresión de los niveles de proteína de p53 en respuesta a los tratamientos con agomelatina (Ago), melatonina (Mel) en el modelo *in vitro* (A), y con agomelatina (Ago), melatonina (Mel) y 5-FU en los tumores derivados de las células HCT-116 y HCT-116 p53 null (B).

5. Regulación de los genes del reloj circadiano por la agomelatina en las líneas celulares de CCR *in vitro*

A partir de los resultados obtenidos hasta el momento, se analizó la implicación de ambos tratamientos sobre los genes del reloj circadiano y la posible relación con el efecto observado sobre el crecimiento y la viabilidad celular.

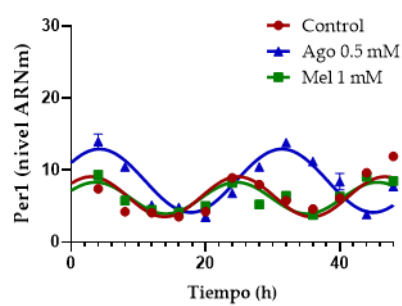
Teniendo en cuenta que el efecto del tratamiento con agomelatina 0.5 mM sobre el crecimiento celular se produjo a partir de las 24 horas en ambas líneas celulares, después de la sincronización del cultivo, las células fueron tratadas durante un máximo de 48 horas con agomelatina 0.5 mM y melatonina 1 mM. Las células se recogieron cada 4 horas con el fin de determinar la expresión del ARNm de los genes del reloj *Per1-3*, *Cry1*, *Clock*, *Bmal1* y *Nr1d2* en estos puntos de tiempo (Figura 30).

HCT-116

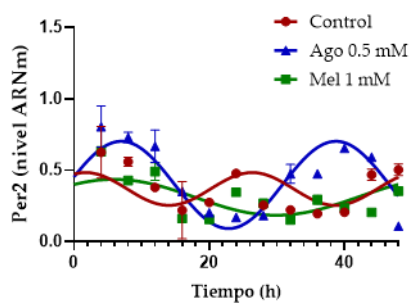


A

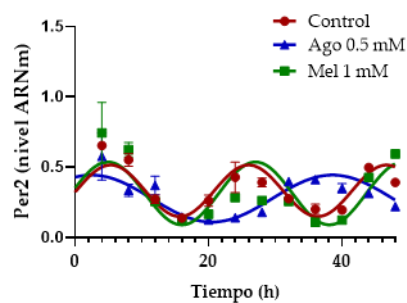
HCT-116 p53 null



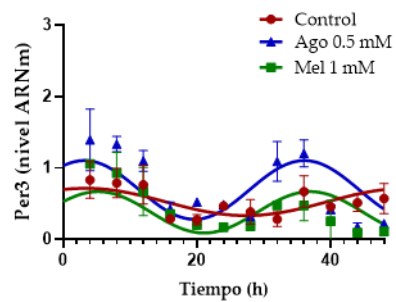
B



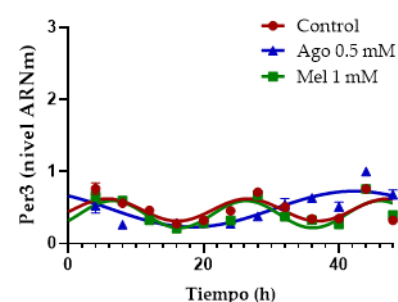
C



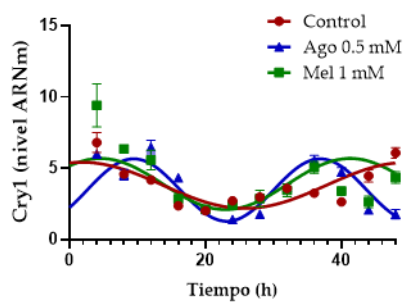
D



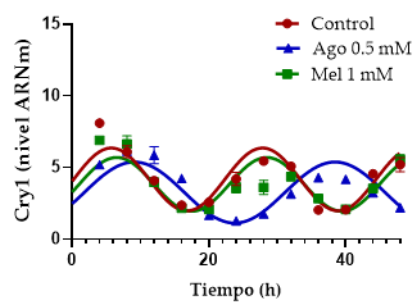
E



F



G



H

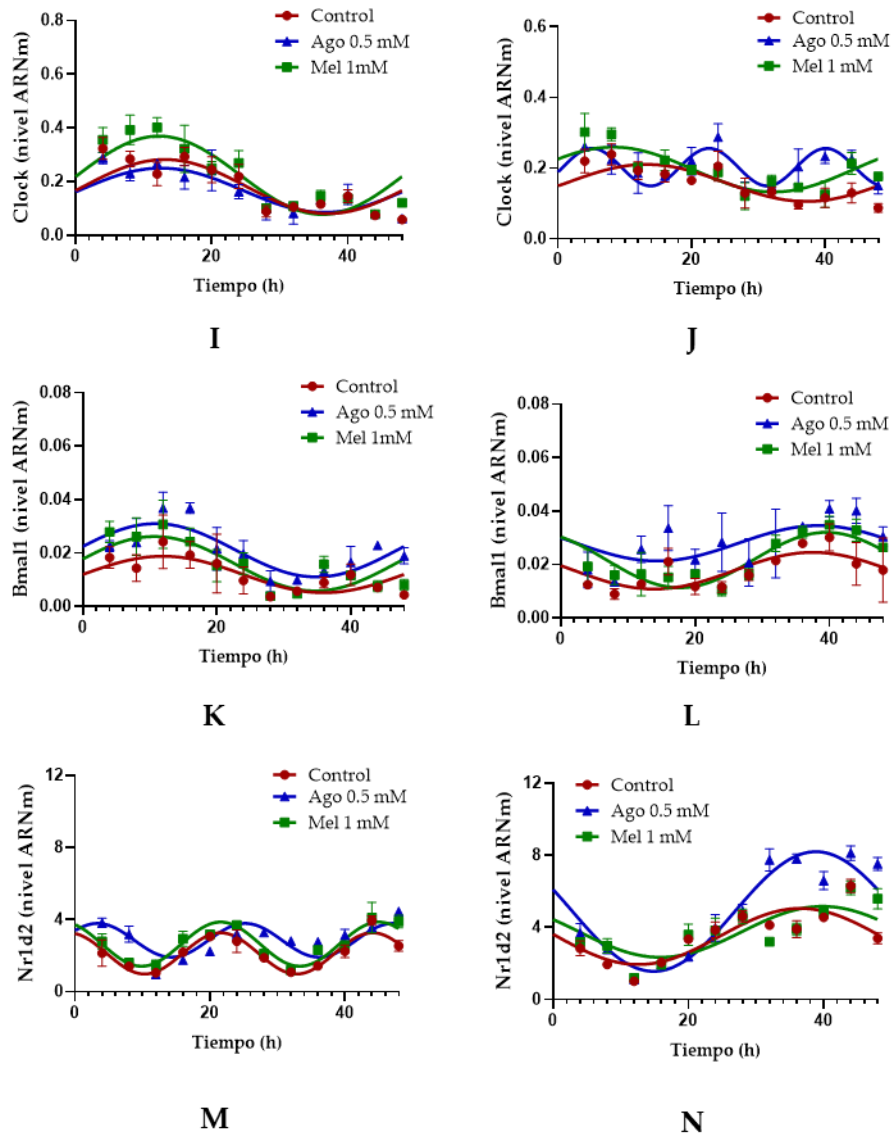


Figura 30. Características de los ritmos obtenidos para los genes del reloj: Per1 (A y B), Per2 (C y D), Per3 (E y F), Cry1 (G y H), Clock (I y J), Bmal (K y L) y Nr1d2 (M y N) en las células HCT-116 (columna izquierda) y HCT-116 p53 *null* (columna derecha) tras el tratamiento con agomelatina 0.5 mM o melatonina 1 mM.

Se observaron diferencias significativas en la ritmicidad de todos los genes estudiados tanto en presencia (Tabla 18) como en ausencia de p53 (Tabla 19). Sin embargo, también se dieron diferencias en cuanto a las características de los ritmos después de cada tratamiento.

Se produjo un adelanto de la acrofase de Per2, Cry1, Bmal1 y Nr1d2 en las células HCT-116 p53 *null* ($P < 0.001$) en comparación con la observada en sus células isogénicas HCT-116. El valor de MESOR de Per1 ($P < 0.05$) y Per3 ($P < 0.01$) fue inferior en las células HCT-116 p53 *null* al compararlo con los valores obtenidos para la línea HCT-116, aunque este parámetro fue mayor en el caso del gen Bmal1 ($P < 0.01$) en la línea sin p53. También se han encontrado diferencias en

el valor de la amplitud de algunos genes en estas células, aunque estas fueron menores que las observadas para la acrofase y el MESOR. La amplitud de los genes Per2 ($P<0.05$) y Nr1d2 ($P<0.01$) fue inferior en las células HCT-116 p53 *null* que en las células HCT-116, mientras que este parámetro se incrementó en el caso del gen Bmal1 ($P<0.001$) (**Figura 30, tablas 18 y 19**).

El tratamiento con agomelatina o melatonina en las células HCT-116 mantuvo la ritmicidad de los genes estudiados, aunque con algunas diferencias (**Tabla 16**). Ambos fármacos indujeron un adelanto en la acrofase de Per1 ($P<0.001$), Per2 ($P<0.001$), Per3 ($P<0.001$) y Cry1 ($P<0.001$), sin embargo, el efecto de la agomelatina fue significativamente mayor en todos los genes a excepción del gen Per3 en el cual ambos tratamientos indujeron un efecto similar. Solo la agomelatina fue capaz de inducir un retraso de la acrofase ($P<0.001$) del gen Nr1d2. En cuanto a los valores de acrofase de los genes Clock y Bmal1 no se observaron diferencias significativas.

La agomelatina incrementó el MESOR de Bmal1 ($P<0.001$) y disminuyó dicho valor en Nr1d2 ($P<0.001$), mientras la melatonina incrementó este parámetro en Clock ($P<0.001$). Ambos tratamientos incrementaron la amplitud en el caso de Per3 ($P<0.05$), mientras que solo la agomelatina indujo un aumento en Per2 ($P<0.05$) y un descenso de esta en Nr1d2 ($P<0.01$). El tratamiento con melatonina disminuyó la amplitud de Per1 ($P<0.001$) al compararlo con el efecto provocado por la agomelatina, mientras producía un aumento en el caso de Clock ($P<0.001$).

Tabla 18. Resultados del análisis cosinor de la expresión de los genes del reloj tras el tratamiento con agomelatina 0.5 mM o melatonina 1 mM en la línea celular HCT-116.

Gen	Tratamiento	PR ¹	P-valor ²	Amplitud (A.U.) ³	Acrofase (h) ⁴	MESOR (A.U.) ³
Per1	Control	29.41	0.003	5.17 ± 1.45	3.06 ± 1.91	9.77 ± 0.99
	Ago 0.5	42.85	0.0001	6.06 ± 1.22	45.30 ± 1.53***	10.40 ± 0.86
	Mel 1	34.77	0.0009	2.24 ± 0.53 [#]	32.83 ± 2.00***,###	8.25 ± 0.39
Per2	Control	31.66	0.001	0.076 ± 0.018	2.76 ± 1.19	0.28 ± 0.01
	Ago 0.5	42.02	0.0001	0.140 ± 0.003*	9.35 ± 0.08***	0.25 ± 0.02
	Mel 1	27.81	0.003	0.088 ± 0.024	6.58 ± 2.09***,###	0.26 ± 0.02
Per3	Control	25.36	0.008	0.33 ± 0.09	17.47 ± 1.15	0.72 ± 0.07
	Ago 0.5	60.62	0.0001	0.91 ± 0.14*	6.06 ± 0.68***	0.94 ± 0.09
	Mel 1	31.33	0.002	0.96 ± 0.25*	5.55 ± 1.44***	0.83 ± 0.18
Cry1	Control	63.01	<0.0001	1.62 ± 0.22	1.79 ± 1.02	3.81 ± 0.15
	Ago 0.5	73.64	<0.0001	2.19 ± 0.21	9.47 ± 0.48***	3.48 ± 0.16
	Mel 1	37.72	0.0004	1.79 ± 0.42	4.55 ± 1.31**,###	3.90 ± 0.29
Clock	Control	57.99	<0.0001	0.101 ± 0.015	13.14 ± 1.13	0.18 ± 0.01
	Ago 0.5	56.69	0.001	0.111 ± 0.019	11.76 ± 2.97	0.16 ± 0.01
	Mel 1	56.75	<0.0001	0.189 ± 0.029**,###	10.77 ± 1.16	0.26 ± 0.02**,###
Bmal1	Control	61.01	<0.0001	0.0088 ± 0.0012	12.99 ± 1.06	0.014 ± 0.001
	Ago 0.5	71.30	<0.0001	0.0138 ± 0.0015	10.47 ± 0.84	0.025 ± 0.001***
	Mel 1	38.63	0.0003	0.0092 ± 0.0020	10.85 ± 1.67	0.016 ± 0.001###
Nr1d2	Control	48.84	<0.0001	1.73 ± 0.32	12.19 ± 0.63	3.79 ± 0.22
	Ago 0.5	55.56	<0.0001	0.94 ± 0.15**	3.32 ± 0.55***	2.86 ± 0.11***
	Mel 1	57.84	<0.0001	1.89 ± 0.28 [#]	11.55 ± 0.56###	3.74 ± 0.20###

PR¹: porcentaje de ritmicidad; P-valor²: amplitud del test. A.U.³: unidad arbitraria. h⁴: horas.

Comparación de los parámetros de ritmicidad en distintas condiciones llevada a cabo a partir de un estudio con un periodo de 48 horas. *P<0.05 vs Control; **P<0.01 vs Control; ***P<0.001 vs Control;

[#]P<0.05 vs Ago 0.5; [#]P<0.01 vs Ago 0.5; ^{###}P<0.001 vs Ago 0.5.

Los resultados observados en la línea celular HCT-116 p53 *null* fueron muy similares a los obtenidos en las células HCT-116, es decir, ambos tratamientos mantuvieron la ritmicidad de los genes analizados (**Tabla 19**). En estas células, solo la agomelatina fue capaz de inducir un adelanto de la acrofase de Per1 (P<0.001), Per3 (P<0.001) y Cry1 (P<0.05) frente a las células no tratadas, a la vez que un retraso de la acrofase de Per2 (P<0.001) y Clock (P<0.001). La agomelatina también incrementó el valor del MESOR de Per1 (P<0.01), Clock (P<0.01) y Nr1d2 (P<0.001) mientras lo disminuyó en el caso de Cry1 (P<0.001). El tratamiento con melatonina también aumento el valor de MESOR para Clock (P<0.01) y lo redujo en Bmal1 (P<0.05). La amplitud de Per3 (P<0.05) y Nr1d2 (P<0.001) se vio incrementada tras el tratamiento con la agomelatina. Por su parte, la melatonina no cambió este parámetro en ninguno de los genes analizados en esta línea celular en concreto.

Tabla 19. Resultados del análisis cosinor de la expresión de los genes del reloj tras el tratamiento con agomelatina 0.5 mM o melatonina 1 mM en la línea HCT-116 p53 null.

Gen	Tratamiento	PR ¹	P-valor ²	Amplitud (A.U.) ³	Acrofase (h) ⁴	MESOR (A.U.) ³
Per1	Control	47.47	0.0001	2.42 ± 0.45	3.01 ± 0.65	6.11 ± 0.33 [†]
	Ago 0.5	51.58	0.003	2.54 ± 1.22	4.80 ± 3.68 ^{***}	8.36 ± 0.86 ^{**}
	Mel1	68.24	<0.0001	2.2 ± 0.26	2.61 ± 0.41 ^{###}	6.13 ± 0.19 [#]
Per2	Control	61.90	<0.0001	0.22 ± 0.03 [†]	4.89 ± 0.48 ⁺⁺⁺	0.34 ± 0.02
	Ago 0.5	44.57	0.0001	0.19 ± 0.04	1.29 ± 1.16 ^{***}	0.29 ± 0.03
	Mel 1	56.40	<0.0001	0.25 ± 0.04	5.44 ± 0.56	0.32 ± 0.03
Per3	Control	40.65	0.0002	0.13 ± 0.03	6.02 ± 0.71	0.37 ± 0.02 ^{††}
	Ago 0.5	65.87	<0.0001	0.21 ± 0.03 [*]	42.48 ± 0.95 ^{***}	0.37 ± 0.02
	Mel 1	56.89	<0.0001	0.17 ± 0.02	6.41 ± 1.16 ^{###}	0.34 ± 0.02
Cry1	Control	78.47	<0.0001	2.19 ± 0.20	5.73 ± 0.34 ⁺⁺⁺	4.16 ± 0.14
	Ago 0.5	79.43	<0.0001	2.13 ± 0.17	9.11 ± 0.42 [*]	3.25 ± 0.13 ^{***}
	Mel 1	67.89	<0.0001	1.88 ± 0.22	6.51 ± 0.44	3.82 ± 0.16 [#]
Clock	Control	41.13	0.0002	0.05 ± 0.01 [†]	11.99 ± 1.59	0.16 ± 0.01
	Ago 0.5	73.01	0.0001	0.04 ± 0.01	4.57 ± 0.76 ^{***}	0.19 ± 0.01 ^{**}
	Mel 1	56.47	<0.0001	0.06 ± 0.01	8.86 ± 1.17 [#]	0.19 ± 0.01 ^{**}
Bmal1	Control	58.43	<0.0001	0.018 ± 0.003 ⁺⁺⁺	35.12 ± 1.09 ⁺⁺⁺	0.025 ± 0.002 ⁺⁺⁺
	Ago 0.5	50.78	<0.0001	0.011 ± 0.002	39.95 ± 1.31	0.022 ± 0.001
	Mel 1	37.40	0.0004	0.010 ± 0.002	37.92 ± 1.56	0.020 ± 0.002 [*]
Nr1d2	Control	45.84	<0.0001	1.41 ± 0.27 ^{††}	35.29 ± 1.44 ⁺⁺⁺	3.25 ± 0.19
	Ago 0.5	71.46	<0.0001	3.78 ± 0.41 ^{***}	37.66 ± 0.84	5.54 ± 0.29 ^{***}
	Mel 1	44.92	0.0001	2.08 ± 0.40 [#]	36.94 ± 1.47	4.07 ± 0.28 ^{###}

PR¹: porcentaje de ritmicidad; P-valor²: amplitud del test. A.U.³: unidad arbitraria. h⁴: horas.

Comparación de los parámetros de ritmicidad en distintas condiciones llevada a cabo a partir de un estudio con un periodo de 48 horas. *P<0.05 vs Control; **P<0.01 vs Control; ***P<0.001 vs Control;

[#]P<0.05 vs Ago 0.5; [#]P<0.01 vs Ago 0.5; ^{###}P<0.001 vs Ago 0.5; [†]P<0.05 vs HCT-116; ^{††}P<0.01 vs HCT-116;

⁺⁺⁺P<0.001 vs HCT-116.

Con la idea de comprobar si las modificaciones observadas eran dependientes de la dosis de tratamiento, utilizaron dosis intermedias de ambos tratamientos.

Para la agomelatina se utilizó la dosis de 0.25 mM, que se comparó con la de 0.5 mM (**Figura A5**).

En las células HCT-116 no se produjeron cambios en cuanto a los parámetros de ritmicidad en los genes Per1 y Cry1 tras el tratamiento con agomelatina, independientemente de la dosis utilizada. En el resto de genes estudiados Per2, Per3, Clock, Bmal1 y Nr1d2 se produjeron cambios en al menos uno de los parámetros. Con el tratamiento intermedio se observó como la acrofase sufrió un retraso en Per3 (P<0.05) y un adelanto en Per2 (P<0.001) y Clock (P<0.001). Por último, el parámetro MESOR se vio incrementado para el gen Per2 (P<0.01) y disminuido en los genes Bmal1 (P<0.001) y Nr1d2 (P<0.05) (**Figura A5, Tabla A4**) al comparar con la dosis de 0.5 mM.

En las células HCT-116 p53 *null* se produjeron modificaciones dosis-dependientes únicamente en algunos genes. Se produjo un aumento de la amplitud de los genes Per3 ($P<0.05$) y Nr1d2 ($P<0.001$). Se indujo un adelanto de la acrofase ($P<0.001$) en los genes Per1 y Per3 y un retraso ($P<0.001$) en el caso de Per2. Por último, el parámetro MESOR también sufrió un incremento en los genes Per1 ($P<0.01$), Per3 ($P<0.05$) y Nr1d2 ($P<0.05$) (**Figura A5, Tabla A5**).

De igual manera se quiso determinar si el efecto de la melatonina era dosis-dependiente; por lo que las células fueron tratadas con melatonina 0.5 mM y 1 mM (**Figura A6**).

En las células HCT-116 la ritmicidad de los genes Per3, Cry1 y Bmal1 no fue dependiente de la dosis de melatonina utilizada. En el resto de genes sí se observaron cambios. La amplitud disminuyó en Per1 ($P<0.01$), mientras en Nr1d2 ($P<0.05$) se observó el efecto contrario. El valor de acrofase sufrió un retraso en Per1 ($P<0.05$) y Per2 ($P<0.001$) y un adelanto ($P<0.001$) en el gen Nr1d2. Por último, el valor de MESOR también se vio modificado al comparar la dosis de tratamiento menor con la mayor, se produjo un incremento en los genes Clock ($P<0.05$) y Nr1d2 ($P<0.001$); mientras que en el caso de Per1 indujo un descenso de este parámetro ($P<0.05$) (**Figura A6, Tabla A6**).

Al comprobar el efecto de las dos dosis de melatonina sobre las células HCT-116 p53 *null* se comprobó que los genes Per1, Per2, Cry1 y Nr1d2 no presentaban efectos dosis-dependientes. Mientras que en el resto de genes estudiados se producían modificaciones en alguno de los parámetros medidos. La ritmicidad del gen Bmal1 se vio modificada, sufrió un aumento de la amplitud ($P<0.05$) y un adelanto de la acrofase ($P<0.001$) en el gen Bmal1. este segundo parámetro también se adelantó en el caso del gen Per3 ($P<0.001$). En cuanto al valor del MESOR también sufrió variaciones, en concreto se produjo un aumento en el gen Clock ($P<0.05$) y un descenso en el gen Bmal1 ($P<0.05$) (**Figura A6, Tabla A7**).

Posteriormente se analizó la ritmicidad de SIRT1 tanto en condiciones control (sin tratamiento) como después de los tratamientos con agomelatina y melatonina en ambas líneas celulares (**Figura 31**).

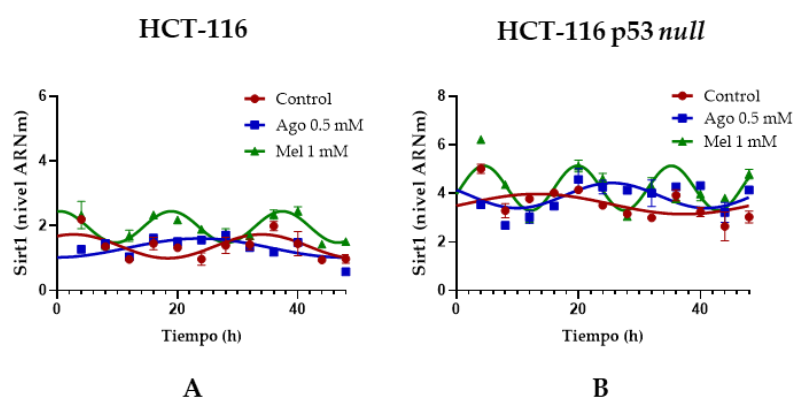


Figura 31. Características de cada uno de los ritmos obtenidos para el gen Sirt1 después del tratamiento con Agomelatina (Ago) 0.5 mM y melatonina (Mel) 1mM en las células HCT-116 (A) y HCT-116 p53 null (B).

Las células HCT-116 presentaron un retraso en la acrofase y un descenso en el valor del MESOR en comparación con la línea celular HCT-116 p53 null (Tabla 20). Ambos tratamientos modificaron los valores de la acrofase del gen en ambas líneas celulares, pero con efectos contrarios. La agomelatina indujo un adelanto ($P < 0.001$) de la acrofase mientras la melatonina la retrasó ($P < 0.001$). La melatonina también produjo un incremento de la amplitud de la ritmicidad de Sirt1 en las células HCT-116 p53 null.

Tabla 20. Resultados del análisis cosinor de la expresión del gen Sirt1 tras el tratamiento con agomelatina 0.5 mM o melatonina 1 mM en las líneas celulares HCT-116 y HCT-116 p53 null.

Línea celular	Tratamiento	PR ¹	P-valor ²	Amplitud (A.U.) ³	Acrofase (h) ⁴	MESOR (A.U.) ³
HCT-116	Control	47.58	<0.0001	0.367 ± 0.071	2.80 ± 0.92	1.37 ± 0.15
	Ago 0.5	47.05	<0.0001	0.456 ± 0.084	$22.31 \pm 1.41^{***}$	1.23 ± 0.16
	Mel 1	80.65	<0.0001	0.483 ± 0.042	$0.52 \pm 0.24^{**}, \###$	1.96 ± 0.13
HCT-116 p53 null	Control	34.8	0.0009	0.392 ± 0.093	$16.42 \pm 1.82^{+++}$	$3.48 \pm 0.17^{+++}$
	Ago 0.5	35.92	0.0006	0.518 ± 0.114	$25.48 \pm 1.12^{***}$	3.91 ± 0.18
	Mel 1	62.29	<0.0001	$0.766 \pm 0.102^{**}$	$4.59 \pm 0.34^{**}, \###$	4.14 ± 0.17

PR¹: porcentaje de ritmicidad; P-valor²: amplitud del test. A.U.³: unidad arbitraria. h⁴: horas.

Comparación de los parámetros de ritmicidad en distintas condiciones llevada a cabo a partir de un estudio con un periodo de 48 horas. ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ vs Control; ### $P < 0.001$ vs Ago 0.5; +++ $P < 0.001$ vs HCT-116.

En cuanto al estudio de la ritmicidad del gen Sirt1 dependiente de la dosis de agomelatina, se observó que el único parámetro que presentó diferencias en función de la dosis utilizada fue la acrofase, que tanto en las células HCT-116 como en las HCT-116 p53 null sufrió un adelanto ($P < 0.001$) (Figura A7, Tabla A8).

El tratamiento con melatonina indujo en las células HCT-116 variaciones en función de la dosis utilizada, se produjo un retraso ($P < 0.01$) de la acrofase y

un aumento del valor MESOR ($P < 0.001$). Este último también se vio incrementado en el caso de las células HCT-116 p53 *null*. El único parámetro que no sufrió cambios independientemente de la dosis utilizada fue la amplitud en cualquiera de las dos líneas celulares (**Figura A8, Tabla A9**).

Con la idea de encontrar las diferencias en el mecanismo de acción de la agomelatina y la melatonina que pudieran explicar las distintas características de los ritmos para cada uno de los genes estudiados en las dos líneas celulares, se analizó la ritmicidad de la Prx1 tanto en condiciones control como tras los tratamientos con agomelatina y melatonina (**Figura 32**).

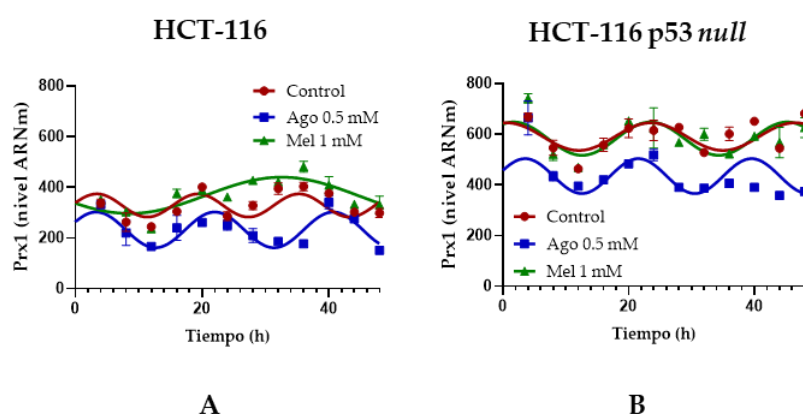


Figura 32. Representación gráfica de la expresión del gen Prx1 bajo condiciones control, y de tratamiento con Agomelatina 0.5 mM o melatonina 1 mM en las células HCT-116 (**A**) y HCT-116 p53 *null* (**B**).

Las células HCT-116 mostraron un adelanto de la acrofase ($P < 0.01$) pero un descenso en el MESOR ($P < 0.001$) mayor que el observado en la línea HCT-116 p53 *null* (**Tabla 21**). Ambos tratamientos indujeron cambios en diferentes parámetros en el caso de las células HCT-116. La melatonina indujo un adelanto de la acrofase ($P < 0.01$) y un incremento del MESOR ($P < 0.001$), mientras la agomelatina disminuyó este último parámetro ($P < 0.01$). En las células HCT-116 p53 *null* la agomelatina adelantó la acrofase ($P < 0.01$) y disminuyó el valor de MESOR ($P < 0.01$) de la Prx1, mientras que el tratamiento con melatonina no indujo cambios en ningún parámetro de la ritmicidad.

Tabla 21. Resultados del análisis cosinor del gen *Prx1* tras el tratamiento con agomelatina 0.5 mM o melatonina 1 mM en las líneas celulares HCT-116 y HCT-16 p53 *null*.

Línea celular	Tratamiento	PR ¹	P-valor ²	Amplitud (A.U.) ³	Acrofase (h) ⁴	MESOR (A.U.) ³
HCT-116	Control	38.04	0.0004	45.7 ± 10.2	3.38 ± 0.56	329 ± 7
	Ago 0.5	74.50	<0.0001	70.4 ± 7.4	3.27 ± 0.31	232 ± 5***
	Mel 1	67.01	<0.0001	71.6 ± 8.7	32.54 ± 0.93***,###	368 ± 6***,###
HCT-116 p53 null	Control	38.90	0.0003	54 ± 12	0.63 ± 0.79 ⁺⁺	591 ± 8 ⁺⁺⁺
	Ago 0.5	64.23	<0.0001	81 ± 10	3.83 ± 0.39***	447 ± 8***
	Mel 1	46.83	<0.0001	65 ± 12	1.71 ± 0.62 ^{##}	583 ± 9 ^{##}

PR¹: porcentaje de ritmicidad; P-valor²: amplitud del test. A.U.³: unidad arbitraria. h⁴: horas.

Comparación de los parámetros de ritmicidad en distintas condiciones llevada a cabo a partir de un estudio con un periodo de 48 horas. ***P<0.001 vs Control; **P<0.01 vs Ago 0.5 mM; ###P<0.001 vs Ago 0.5 mM; ⁺⁺P<0.01 vs HCT-116.; ⁺⁺⁺P<0.001 vs HCT-116.

La ritmicidad del gen *Prx1* sí que sufre grandes modificaciones en función de la dosis de agomelatina con la que se trate, independientemente del estado del gen p53. En las células HCT-116 se produjo una disminución de la amplitud (P<0.05) y del MESOR (P<0.001) y un retraso de la acrofase (P<0.001), al comparar el efecto generado tras la dosis de 0.5 mM frente a la de 0.25 mM. Mientras que en la línea celular HCT-116 p53 *null* se observó un incremento (P<0.05) de la amplitud, un retraso de la acrofase (P<0.05) y un descenso del MESOR (P<0.001) (**Figura A9, Tabla A10**).

En ambas líneas celulares se produjo un retraso de la acrofase al comparar el resultado obtenido con la dosis de 0.5 mM con la de 1 mM de melatonina, en el caso de las células HCT-116 este descenso (P<0.05) fue mucho menos significativo que el observado en el caso de las células HCT-116 p53 *null* (P<0.001) (**Figura A10, Tabla A11**).

CAPÍTULO 3: ESTUDIO DEL PAPEL DE SIRT1 EN LA RESPUESTA A LOS TRATAMIENTOS CON AGOMELATINA O MELATONINA EN MODELOS DE CCR.

1. Selección de los clones estables con Sirt1 silenciado.

Las líneas celulares HCT-116 y HCT-116 p53 *null* se transfectaron con el plásmido SIRT1 pRS shRNA con el fin de obtener clones con Sirt1 silenciado y estudiar su papel en procesos de viabilidad, apoptosis o ritmos circadianos, así como en el desarrollo de fenotipo de CMC. Estas mismas células también se transfectaron con el plásmido vacío para utilizarlo como control. Se utilizó la β -actina como control de carga de proteína (**Figura 33**).

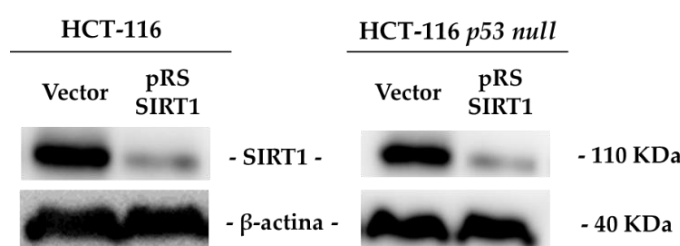


Figura 33. Niveles de expresión de la proteína SIRT1 y β -actina presente en los vectores y en los clones seleccionados (pRS SIRT1) para cada línea celular.

2. El silenciamiento de Sirt1 altera el crecimiento y la efectividad del tratamiento con agomelatina y melatonina.

La tasa de proliferación celular en la condición control se realizó mediante un ensayo de MTT.

El clon de la línea HCT-116 presentó una tasa de crecimiento mayor ($P < 0.001$) a los 2 (pRS SIRT1 3.68% vs vector 2.14%) y 4 días (pRS SIRT1 12.34% vs vector 8.71%) que la de su propio vector, aunque esta diferencia desapareció en el punto de tiempo superior (6 días) (**Figura 34A**). En el caso de las células HCT-116 p53 *null*, el silenciamiento de Sirt1 desencadenó un mayor crecimiento ($P < 0.001$) (pRS SIRT1 35.35% vs vector 14.4% a los 6 días) en cualquiera de los puntos de tiempo estudiados (**Figura 34B**).

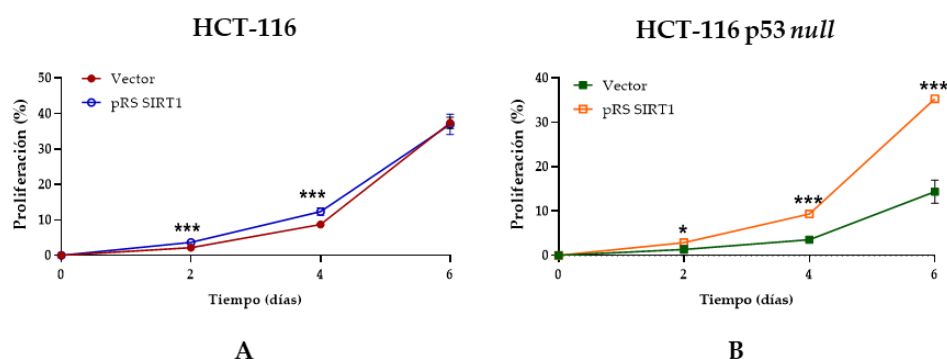


Figura 34. Porcentaje de proliferación celular del vector y del clon (pRS SIRT1) en las células HCT-116 (A) y en HCT-116 p53 *null* (B). *P<0.05 vs vector en el mismo punto de tiempo; ***P<0.001 vs vector en el mismo punto de tiempo.

Una vez conocida la tasa de proliferación en condiciones normales, se estudió el efecto de los tratamientos con agomelatina (0-1 mM) o melatonina (0-1 mM) sobre la viabilidad celular. El porcentaje de viabilidad se calculó tomando como control el punto sin tratamiento.

En las células HCT-116 se produjo un descenso de la viabilidad desde la dosis de agomelatina 0.25 mM (P<0.001), este efecto fue independiente del estado de Sirt1 (pRS SIRT1 63.66 % y vector 37.79%) (**Figura 35A**). En las células HCT-116 p53 *null* se produjo el mismo descenso a igual dosis de tratamiento (P<0.001) (79.55% pRS SIRT1 y 54.37% vector) (**Figura 35B**).

El efecto más significativo de la melatonina se dio con la dosis de 1 mM tanto en las células HCT-116 (P<0.001) donde la viabilidad del clon (47.24%) fue superior a la del vector (33.07%) (**Figura 35C**), como en las células HCT-116 p53 *null* (pRS SIRT1 67.08% y vector 38.99%) (**Figura 35D**).

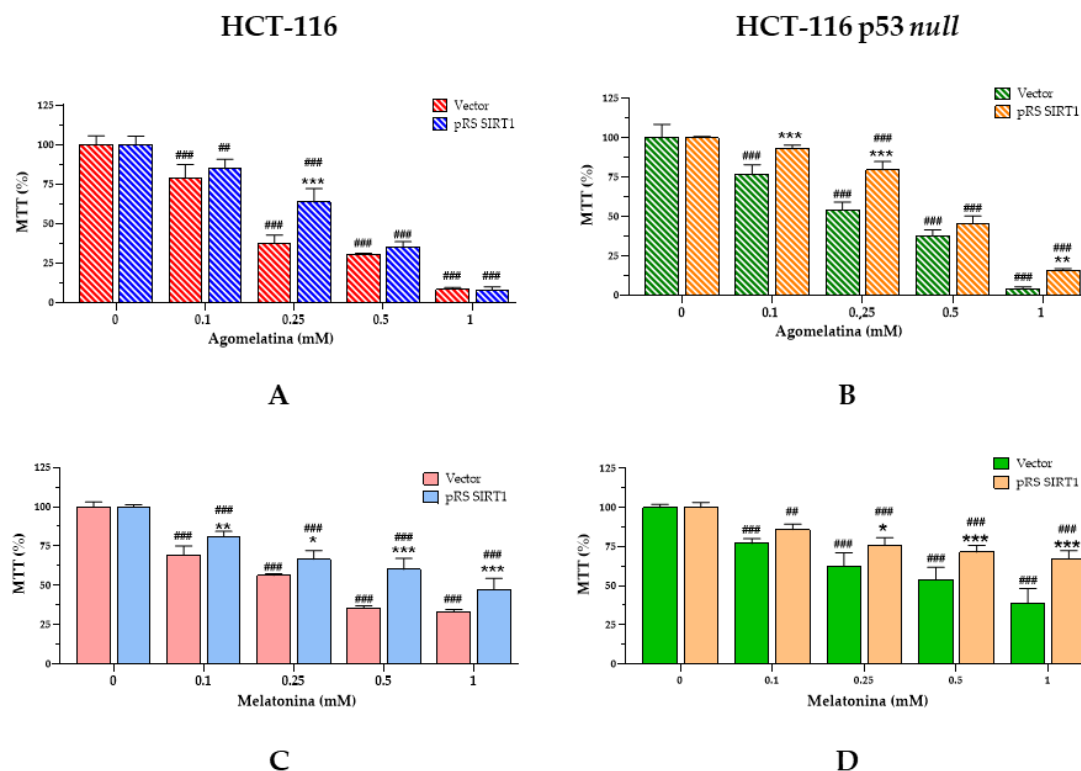


Figura 35. Porcentaje de viabilidad celular en el vector y en el clon (pRS SIRT1) de las células HCT-116 (A y C) y HCT-116 p53 *null* (B y D) tras el tratamiento con agomelatina (0-1 mM) (A y B) o melatonina (0-1 mM) (C y D) durante 72 horas. Se representa la media $\pm$ SD de tres experimentos realizados por triplicado. * $P < 0.05$ vs Vector en cada dosis; ** $P < 0.01$ vs Vector en cada dosis; *** $P < 0.001$ vs Vector en cada dosis; ## $P < 0.01$ vs 0 mM del mismo tipo celular; ### $P < 0.001$ vs 0 mM del mismo tipo celular.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, se seleccionaron las dosis de agomelatina 0.5 mM y melatonina 1 mM para el resto de los estudios.

Por último, se realizó un modelo 3D en el que se estudió el tamaño de los esferoides después de haberse tratado durante 72 horas (**Figura 36**).

Los esferoides derivados de los clones presentaron un menor tamaño en la condición control en ambas líneas celulares (HCT-116: $P < 0.01$; 8.81 vector vs 5.57 pRS SIRT1 (**Figura 36A**)) (HCT-116 p53 *null*: $P < 0.001$; 10.54 control vs 2.69 pRS SIRT1 (**Figura 36B**)).

No se observaron diferencias en el volumen de los esferoides después de los tratamientos en ninguna de las líneas estudiadas (**Figuras 36A y 36B**).

Se analizó también la esfericidad en la condición control y tras los tratamientos y no se observaron diferencias significativas, aunque si cierta tendencia a una mayor esfericidad tras el tratamiento con agomelatina en todos

los casos, excepto en el vector de la línea HCT-116 donde el tratamiento con melatonina supuso una mayor esfericidad (**Figuras 36A y 36B**).

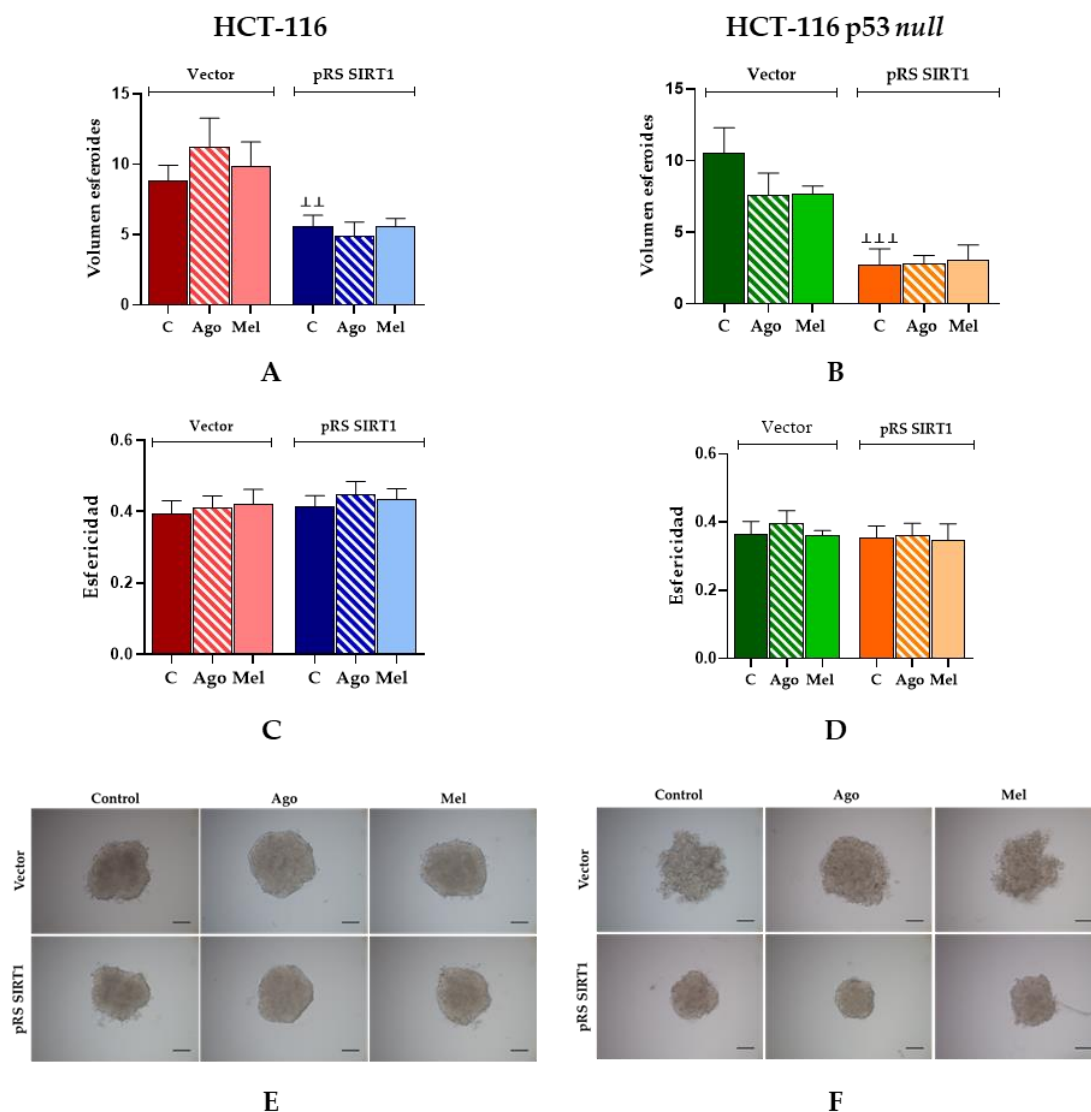


Figura 36. Volumen (**A y B**) y esfericidad (**C y D**) de los esferoides formados a partir de los vectores y clones de las células HCT-116 y HCT-116 p53 *null* después del tratamiento con agomelatina 0.5 mM (Ago) o melatonina 1 mM (Mel) durante 72h. Se muestra la media $\pm$ SD de tres experimentos realizados por cuadruplicado. ¹¹¹ $P < 0.01$ vs Vector; ¹¹¹¹ $P < 0.001$ vs Vector. Imágenes representativas de los esferoides en la línea celular HCT-116 (**E**) y HCT-116 p53 *null* (**F**). Imágenes obtenidas con un objetivo 10x, la barra negra equivale a 100 μ m.

Dado que no se observaron diferencias significativas ni en el volumen ni en la esfericidad, se realizó una prueba de viabilidad mediante inmunocitoquímica, marcando las células con Calceína y *ZombieRed*, y visualizándolo por microscopía confocal (**Figura 37**).

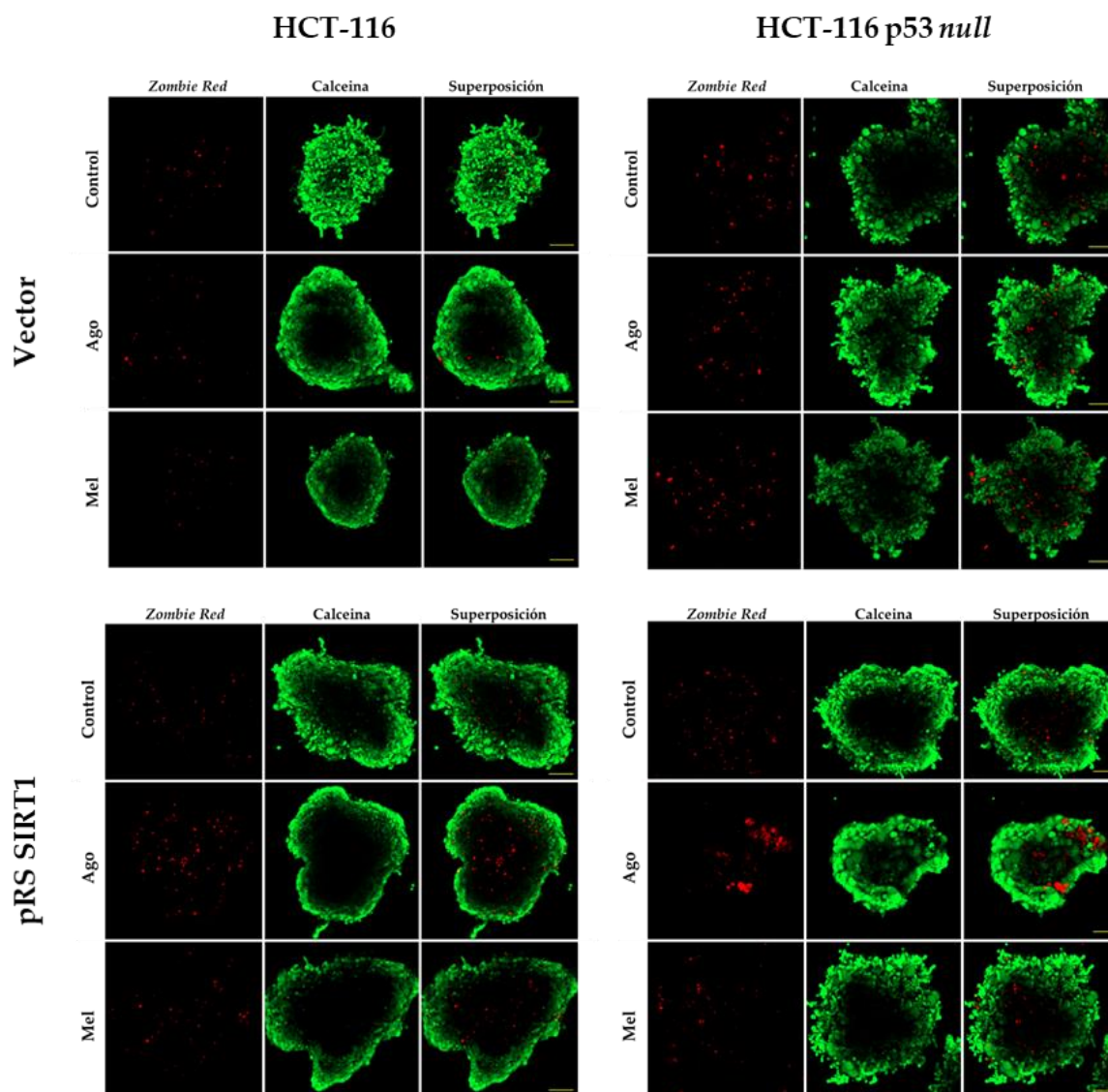


Figura 37. Imágenes representativas de los esferoides derivados de los vectores y clones de las líneas HCT-116 y HCT-116 p53 *null*. Marcados con *Zombie Red* y Calceina en condiciones control y tras los tratamientos. Imágenes realizadas con un objetivo 10x. La barra son 100 μm .

El cálculo de la ratio de células muertas/vivas se hizo a partir del número de células teñidas con *Zombie Red* y el volumen total del esferoide.

En condiciones normales se observó una menor tasa de muerte en el clon de las células HCT-116 p53 *null* al compararlo con la de su propio vector ($P < 0.001$) (**Figura 38B**).

En las células HCT-116 se observó una tendencia en la que la agomelatina aumentó la cantidad de células muertas (**Figura 38A**). Sin embargo, en la línea HCT-116 p53 *null* el tratamiento con agomelatina incrementó la muerte celular

tanto en el vector ($P<0.01$) como en el clon ($P<0.001$) de manera significativa (**Figura 38B**).

El tratamiento con melatonina no originó diferencias en ninguna de las líneas estudiadas. Aunque comparando el efecto de este tratamiento con el inducido por la agomelatina, se observó una menor tasa de muerte en todos los casos.

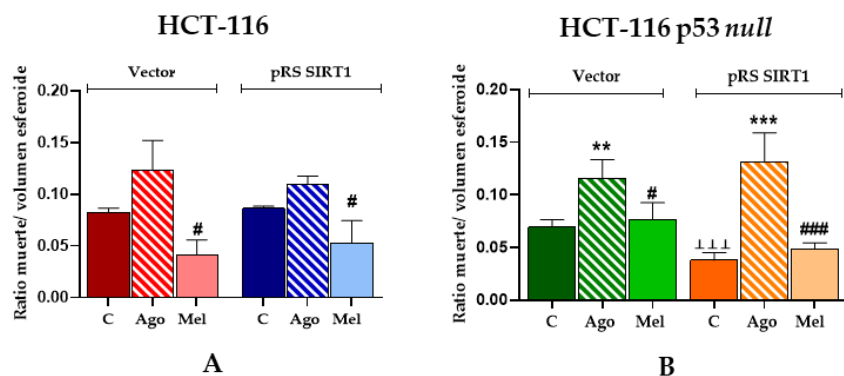


Figura 38. Ratio de muerte celular en los esferoides formados a partir de los vectores y clones de las células HCT-116 (**A**) y HCT-116 p53 *null* (**B**) en la condición control y después del tratamiento con agomelatina 0.5 mM (Ago) o melatonina 1 mM (Mel) durante 72h. Se muestra la media $\pm$ SD de tres experimentos realizados por cuadruplicado. ** $P<0.01$ vs C; *** $P<0.001$ vs C; # $P<0.05$ vs Ago; ## $P<0.01$ vs Ago; ### $P<0.001$ vs Vector.

3. El silenciamiento de Sirt1 altera la distribución de las células en las distintas fases del ciclo celular después del tratamiento.

El estudio de la distribución de las células en las distintas fases del ciclo, se realizó mediante citometría de flujo en función de la cantidad de ADN presente.

La distribución celular en la condición control se vio modificada en las células HCT-116 en función del estado de Sirt1. Se produjo un aumento ($P<0.001$) de la fase G0 (Vector 64.2% vs pRS SIRT1 89.13%) lo que implicó un descenso ($P<0.001$) en las fases S (Vector 13.9% vs pRS SIRT1 4.37%) y G2/M (20.03% Vector vs 3.4% pRS SIRT1) (**Figuras 39A y 39C**).

El tratamiento con agomelatina en la línea HCT-116 originó diferentes efectos en función del estado de Sirt1. En el vector se indujo un incremento ($P<0.001$) de células en fase G0/G1 (control 64.2% vs 79.9% Ago) y un descenso ($P<0.001$) en las fases S (13.9% control vs 6.9% Ago) y G2/M (20.03% control vs 14.9% Ago) (**Figura 39A**). Mientras que en el clon se produjo un descenso ($P<0.001$) en la fase G0 (89.13% control vs 67.1% Ago), lo que conllevó un aumento ($P<0.001$) de las fases S (4.37% control vs 13.95% Ago) y G2/M (3.4% control vs 18% Ago) (**Figura 39C**).

El efecto de la agomelatina sobre las células HCT-116 p53 *null* también fue dependiente del estado de Sirt1. El vector presentó un aumento ($P<0.001$) de la fase S (9.8% control vs 17.27% Ago) y un descenso ($P<0.001$) de la fase G2/M (25.4% control vs 19.7% Ago) (**Figura 39B**). Por su parte, el clon sufrió el efecto contrario, un descenso ($P<0.05$) de las células en fase S (29.27% control vs 20.15% Ago) y un aumento del porcentaje en la fase G2/M (13.93% control vs 30.45% Ago) (**Figura 39D**).

El tratamiento con melatonina originó diferencias en la distribución de las células HCT-116. Se dio un descenso ($P<0.001$) en la fase G0/G1 (64.2% control vs 55.45% Mel) y un incremento ($P<0.001$) de la fase G2/M (20.03% control vs 28.6% Mel) en el vector (**Figura 39A**). No se observaron cambios en el comportamiento del clon (**Figura 39C**). Por otro lado, en las células HCT-116 p53 *null*, el vector sufrió un descenso significativo ($P<0.001$) del porcentaje de células en la fase G0 (63.25% control vs 56.7% Mel) y en la fase G2/M (25.4% control vs 20.85% Mel), aumentando ($P<0.001$) el porcentaje de la fase S (9.8% control vs 21.6% Mel) (**Figura 39B**). Al silenciar Sirt1 se observó un aumento ($P<0.001$) de células en la fase G0 (54% control vs 68.07% Mel) y un descenso en la fase S ($P<0.05$) (13.93% control vs 11.53% Mel) (**Figura 39D**).

Comparando entre sí el efecto de cada tratamiento se observaron diferencias en función de del estado de Sirt1 y p53. En el vector de las células HCT-116, la agomelatina originó un descenso ($P<0.001$) de la fase G0 (76.9% Ago vs 55.45% Mel) y un aumento ($P<0.001$) de las fases S (6.9% Ago vs 13.6% Mel) y G2/M (14.9% Ago vs 28.6% Mel) al compararlo con el efecto de la melatonina (**Figura 39A**). En el clon de esta misma línea celular se observó el efecto contrario, un aumento ($P<0.001$) de la fase G0 (67.1% Ago vs 88.27% Mel) y un descenso ($P<0.001$) de las fases S (13.95% Ago vs 3.7% Mel) y G2/M (18% Ago vs 5.97% Mel) (**Figura 39C**). En ausencia de p53, se dio un descenso ($P<0.001$) de células en la fase G0 (62.2% Ago vs 56.7% Mel) y un aumento ($P<0.001$) de la fase S (17.27% Ago vs 21.6% Mel) en el vector (**Figura 39B**). Sin embargo, en el clon el tratamiento con melatonina produjo un aumento ($P<0.001$) de las células en fase G0 (48.75% Ago vs 68.07% Mel) y un descenso ($P<0.001$) de las que se encontraban en fase G2/M (30.45% Ago vs 11.53% Mel) (**Figura 39D**).

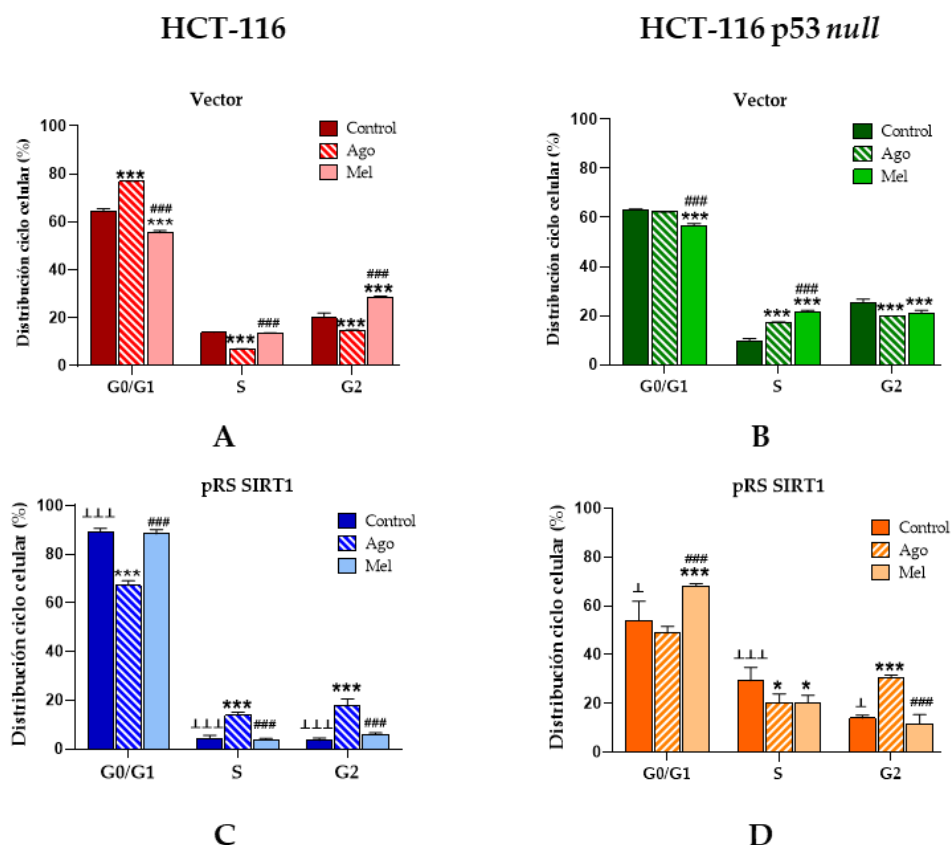


Figura 39. Porcentaje de la distribución celular en cada fase del ciclo celular del vector (A y B) y del clon (C y D) en las células HCT-116 y HCT-116 p53 null tras 72 horas de tratamiento con agomelatina (AGO) o melatonina (MEL). Se representa la media $\pm$ SD de tres experimentos realizados por duplicado. * $P < 0.05$ vs Control; *** $P < 0.001$ vs Control; ## $P < 0.001$ vs Ago. 1 $P < 0.05$ vs vector.

4. El tratamiento con agomelatina induce un incremento del porcentaje de apoptosis.

El estudio del porcentaje de apoptosis se llevó a cabo mediante citometría de flujo determinando el porcentaje de células que presentaban marcaje positivo simple para Anexina V y marcaje positivo doble para Anexina V y IP.

La línea celular HCT-116 p53 null se presentó un mayor porcentaje de apoptosis ($P < 0.001$) (12.36% HCT-116 vs 31.83% HCT-116 p53 null) en condiciones control (**Figuras 40A y 40B**). De hecho, en ausencia de Sirt1 y p53 el porcentaje de células apoptóticas disminuyó significativamente ($P < 0.05$) (31.83% vector vs 23.26% pRS SIRT1) (**Figura 40B**).

El tratamiento con agomelatina sobre el vector de la línea HCT-116 incrementó ($P < 0.001$) el porcentaje de células apoptóticas (12.36% control vs 81.1% Ago); el mismo provocó sobre el clon ($P < 0.001$) (10.03% control vs 70.05% Ago) (**Figura 40A**). El aumento de la apoptosis originado por la agomelatina fue

independiente del estado de p53, ya que en las células HCT-116 p53 *null* también se observó dicho efecto, tanto en el vector ($P<0.001$) (31.83% control vs 87.66% Ago) como en el clon ($P<0.001$) (23.26% control vs 92.47% Ago) (**Figura 40B**).

La apoptosis también se vio incrementada tras el tratamiento con melatonina en las células HCT-116 ($P<0.05$), tanto en el vector (12.36% control vs 23.6% Mel) como en el clon (10.03% control vs 18.3% Mel) (**Figura 40A**). Este mismo aumento se observó en el clon de las células HCT-116 p53 *null* ($P<0.05$) (23.26% control vs 28.96% Mel) (**Figura 40B**).

El tratamiento con melatonina originó menos ($P<0.001$) apoptosis que la agomelatina en todas las líneas (**Figura 40**).

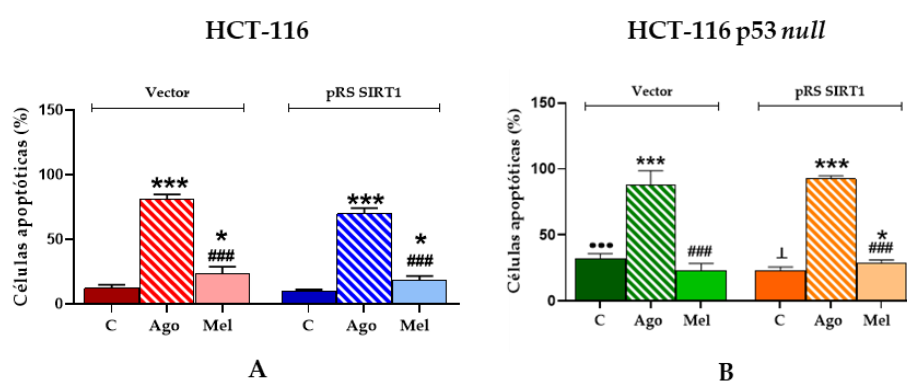


Figura 40. Porcentaje de apoptosis en el vector y el clon de las células HCT-116 (A) y HCT-116 p53 *null* (B) después de 72 horas de tratamiento con 0.5 mM de agomelatina (Ago) o 1 mM de melatonina (Mel). Se representa la media $\pm$ SD de tres experimentos realizados por triplicado. * $P<0.05$ vs Control; *** $P<0.001$ vs control; ### $P<0.001$ vs Ago; ⊥ $P<0.05$ vs Vector de HCT-116 p53 *null*; ∴ $P<0.001$ vs Vector.

5. El tratamiento con agomelatina disminuye el área de las colonias formadas.

Con el fin de estudiar el efecto de los tratamientos sobre la viabilidad celular a tiempos más largos (10 días) se estudió la capacidad de formación de colonias.

En condiciones normales el clon de las células HCT-116 p53 *null* generó más colonias que su propio vector ($P<0.05$) (325 colonias vector vs 423 colonias pRS SIRT1) (**Figura 41B**).

Las colonias formadas por los clones presentaron mayor área que las formadas por sus propios vectores, tanto en la línea HCT-116 ($P<0.01$) (0.036 μm^2 vector vs 0.072 μm^2 pRS SIRT1) (**Figura 41C**) como en la HCT-116 p53 *null* ($P<0.01$) (0.014 vector vs 0.049 pRS SIRT1) (**Figura 41D**).

El tratamiento con agomelatina sobre el clon de la línea HCT-116 originó un aumento del número de colonias ($P < 0.001$) (326.66 ± 13.19 colonias control vs 565 ± 37 colonias Ago) (**Figura 41A**) aunque estas presentaban una menor área ($P < 0.001$) ($0.072 \mu\text{m}^2$ control vs $0.06 \mu\text{m}^2$ Ago) (**Figura 41C**). Esto mismo se produjo en el clon de las células HCT-116 p53 *null* ($P < 0.001$) ($0.049 \mu\text{m}^2$ control vs $0.01 \mu\text{m}^2$ Ago) (**Figura 41D**).

El tratamiento con melatonina únicamente indujo un descenso del número de colonias formadas en el clon de la línea HCT-116 p53 *null* ($P < 0.05$) (423 colonias control vs 308.67 colonias Mel) (**Figura 41B**). Este tratamiento no modificó el tamaño de las colonias.

Al comparar los efectos originados por el tratamiento con melatonina y agomelatina se observó un descenso ($P < 0.001$) del número de colonias derivadas de las células HCT-116 tras el tratamiento con melatonina (565 ± 37 colonias Ago vs 355 ± 13 colonias Mel) (**Figura 41A**). Aunque el área de dichas colonias fue superior en todos los casos tras el tratamiento con melatonina. La mayor diferencia se produjo en el clon de las células HCT-116 ($P < 0.001$) ($0.010 \mu\text{m}^2$ Ago vs $0.037 \mu\text{m}^2$ Mel) (**Figura 41C**).

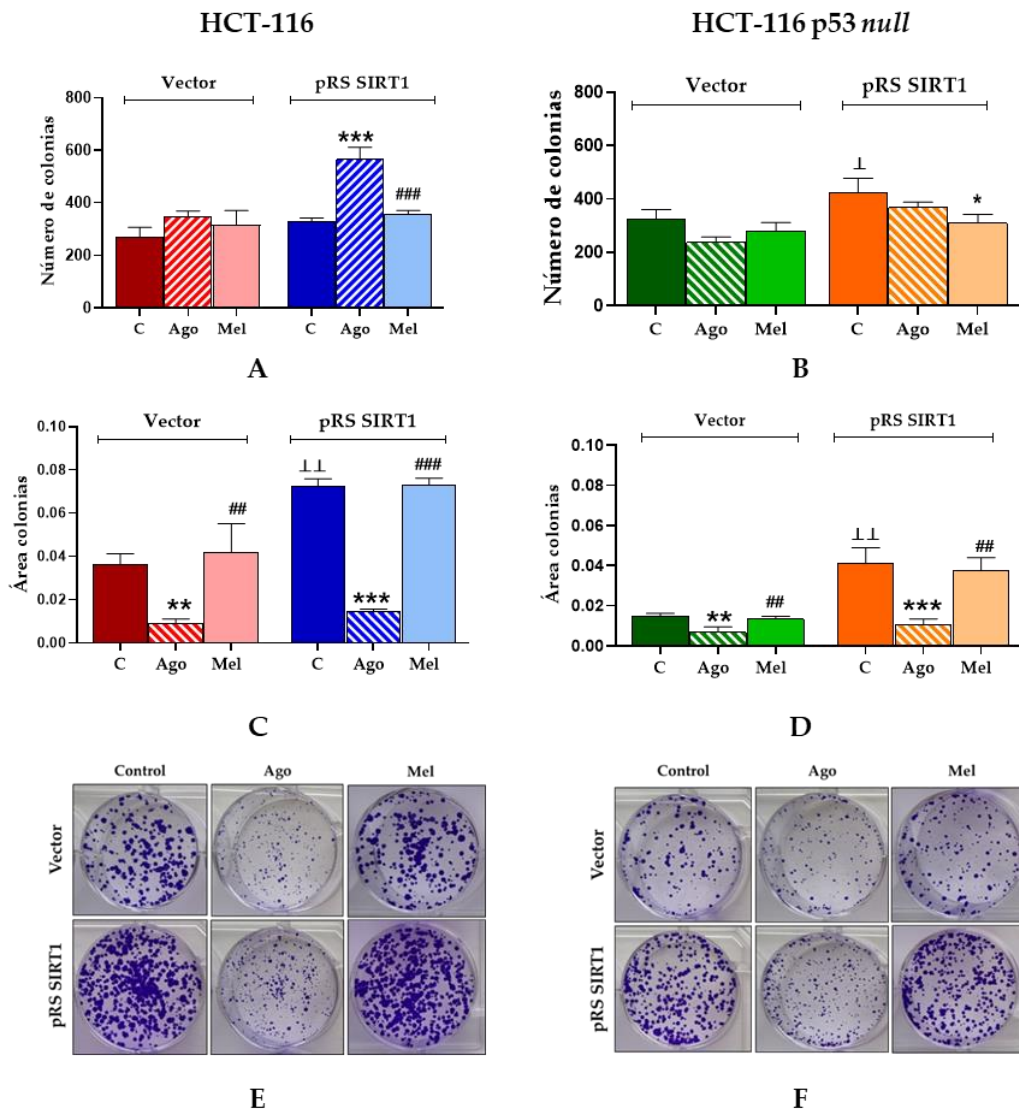


Figura 41. Número (A y B) y área (C y D) de las colonias formadas a partir de los vectores y clones de las células HCT-116 (A y C) y HCT-116 p53 null (B y D) después del tratamiento con agomelatina 0.5 mM (Ago) o melatonina 1 mM (Mel) durante 72 horas. Se representa la media $\pm$ SD de tres experimentos realizados por triplicado. ** $P < 0.01$ vs C; *** $P < 0.001$ vs C; ## $P < 0.01$ vs Ago; ### $P < 0.001$ vs Ago; $\perp\perp P < 0.01$ vs Vector. Imágenes representativas de las colonias formadas en las células HCT-116 (E) y en HCT-116 p53 null (F).

6. El tratamiento con agomelatina reduce el volumen tumoral en ratones.

El estudio *in-vivo* se llevó a cabo en ratones hembras NGS con una edad de entre 6 y 8 semanas.

Tras la inoculación de las células se fue controlando la aparición del tumor de manera diaria, hasta que se formaron los primeros tumores 7 días más tarde de la inoculación. En ese momento se dividieron a los animales en 3 grupos

(control, agomelatina y melatonina) de manera aleatoria y se comenzó el tratamiento. Los días de tratamiento se midió el tamaño tumoral (**Figuras 42A-D**). Tras 6 dosis de tratamiento, se sacrificaron los animales y se extrajeron los tumores (**Figuras 42E y 42F**).

El vector de las células HCT-116 originó tumores de mayor tamaño que los formados a partir de las células del clon de esta misma línea ($P < 0.001$) (Vector 1303.18 mm^3 vs pRS SIRT1 587.96 mm^3) (**Figuras 42A y 42C**).

El tratamiento con agomelatina indujo un descenso significativo del volumen tumoral, tanto en el vector ($P < 0.001$) (control 1303.18 mm^3 vs Ago 570.29 mm^3) (**Figura 42A**) como en el clon ($P < 0.01$) (control 587.96 mm^3 vs Ago 260.75 mm^3) (**Figura 42C**) de las células HCT-116. Este mismo descenso también se produjo en los tumores derivados del vector ($P < 0.001$) (control 809.98 mm^3 vs Ago 428.15 mm^3) clon de las células HCT-116 p53 *null* ($P < 0.001$) (control 786.85 mm^3 vs Ago 275.37 mm^3) (**Figura 42D**).

El tratamiento con melatonina solo produjo una disminución del volumen en los tumores derivados del vector de HCT-116 ($P < 0.001$) (control 1303.18 mm^3 vs Mel 529.02 mm^3) (**Figura 42A**).

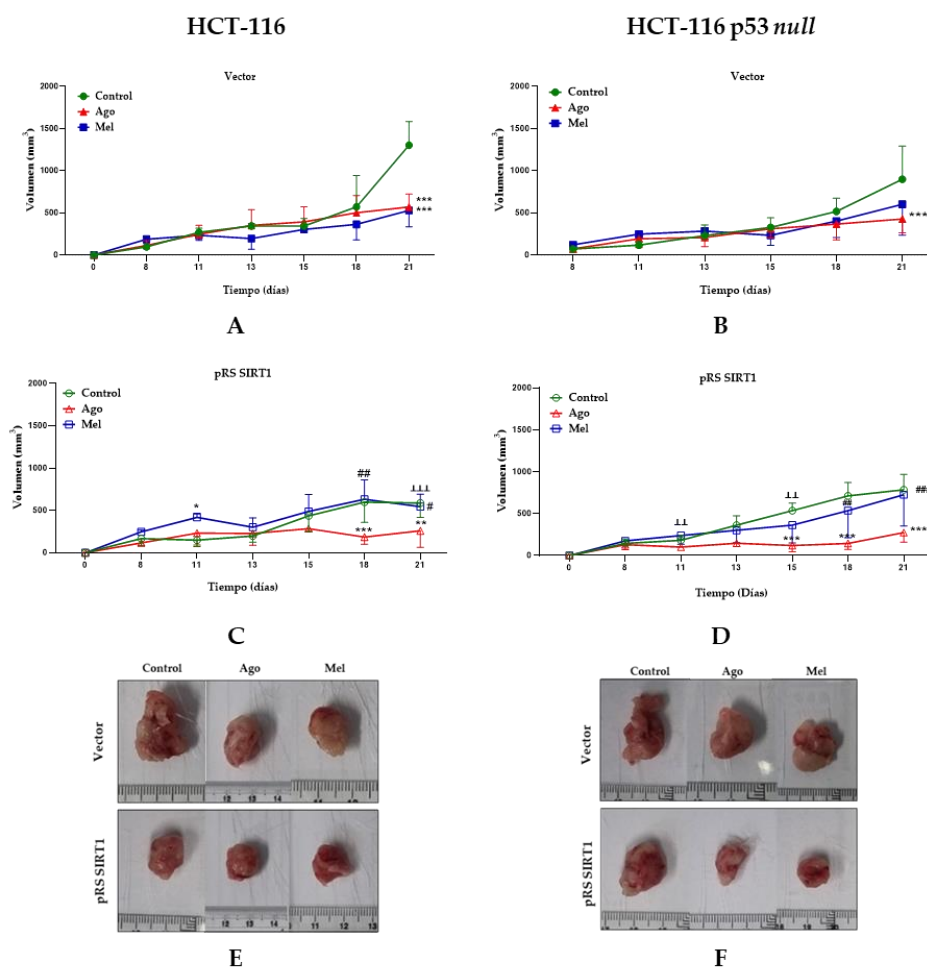


Figura 42. Volumen de los tumores formados a partir del vector y del clon de las células HCT-116 (A y C) y de las células HCT-116 p53 null (B y D). **P<0.01 vs Control; ***P<0.001 vs Control; #P<0.05 vs Ago; ###P<0.001 vs Ago; LLLP<0.001 vs Vector. Imágenes representativas de los tumores formados derivados de las células HCT-116 (E) y HCT-116 p53 null (F).

7. El tratamiento con agomelatina induce autofagia en los clones con Sirt1 silenciado.

Debido al papel que desempeña Sirt1 en la autofagia y a los efectos de los tratamientos sobre el porcentaje de apoptosis, se intentó determinar si la muerte celular observada era inducida por medio de la vía de autofagia.

Para ello se analizaron los niveles de expresión de las proteínas LC3B, p62 y FoxO1A, tras los tratamientos con agomelatina o melatonina durante 72 horas. Se utilizó la expresión de la β -tubulina como control de carga.

Tras el tratamiento con agomelatina se observó un aumento de la expresión de LC3B en ambos clones independientemente del estado de p53, este incremento se correlacionó con una disminución de los niveles de p62 en estas mismas

células. Mientras que en el vector con p53 *wt* se produjo un descenso de LC3B y un incremento de p62 (**Figura 43**).

Por su parte el tratamiento con melatonina produjo un descenso de la expresión de LC3B y por lo tanto un aumento de p62 en el vector de las células HCT-116. En esta misma línea celular con Sirt1 silenciado se observó el efecto contrario que en el vector. Por su parte en el vector de la línea HCT-116 p53 *null* la melatonina desencadenó un descenso de la expresión de LC3B induciendo un incremento de la expresión de p62 (**Figura 43**).

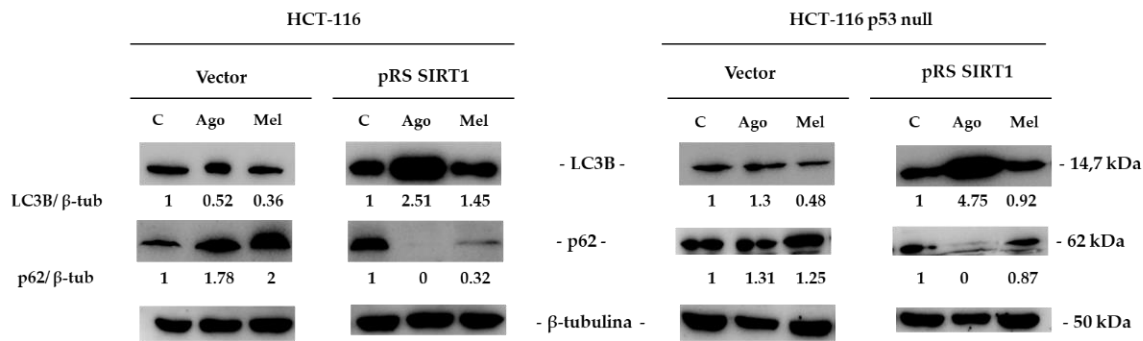


Figura 43. Nivel de expresión de las proteínas LC3B, p62 y β-tubulina en distintas condiciones (sin tratamiento, con agomelatina y con melatonina) en el vector y en el clon de las líneas celulares HCT-116 y HCT-116 p53 *null*.

En la línea HCT-116, la expresión de FoxO1A no se modificó tras el tratamiento con agomelatina independientemente del estado de Sirt1, sin embargo, la melatonina si produjo cambios en función del estado de dicho gen. En el vector se originó un descenso de la expresión mientras que en el clon se dio un aumento de esta (**Figura 44**).

Por su parte, en la línea HCT-116 p53 *null* el tratamiento con agomelatina originó un incremento de la expresión independiente del estado de Sirt1. Mientras que la melatonina no modificó dicha expresión (**Figura 44**).

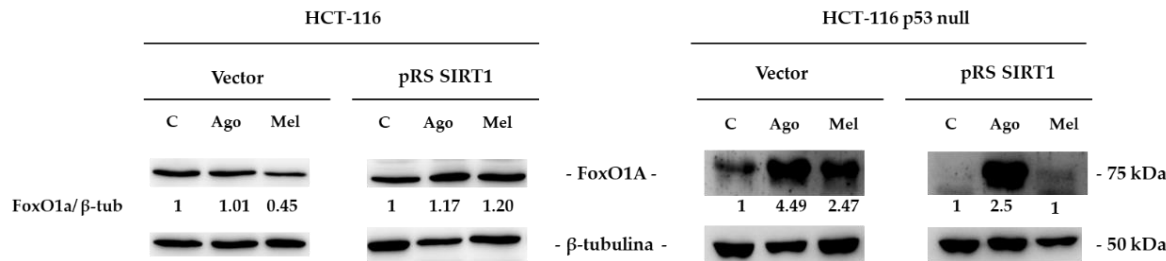


Figura 44. Nivel de expresión de las proteínas FoxO1A y β-tubulina en distintas condiciones (sin tratamiento, con agomelatina y con melatonina) en el vector y en el clon de las líneas celulares HCT-116 y HCT-116 p53 *null*.

8. El tratamiento con agomelatina modificó la capacidad de migración celular en función del estado de Sirt1 y p53.

Para comprobar el efecto de los tratamientos sobre la capacidad de migración celular, se llevó a cabo el ensayo de cierre de herida (**Figura 45**).

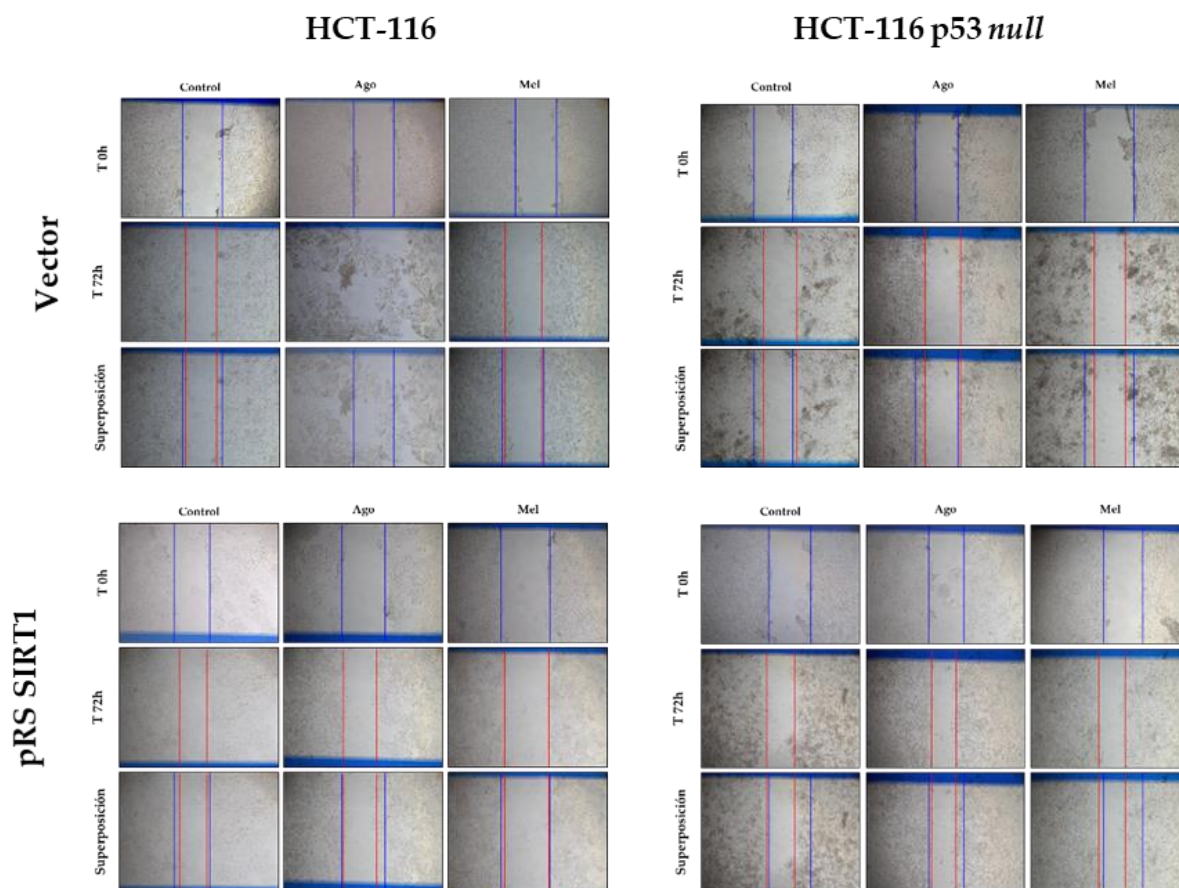


Figura 45. Imágenes representativas del ensayo de herida.

En condiciones normales la presencia de p53 en estado salvaje proporcionó una mayor capacidad de migración en el vector ($P < 0.01$) (22.90% p53 *wt* vs 14.16% p53 *null*) (**Figura 46**). Teniendo en cuenta el estado de Sirt1, en las células HCT-116 p53 *null* el clon presentó una mayor migración que el vector (14.16% vector vs 27.77% pRS SIRT1) (**Figura 46B**).

El tratamiento con agomelatina inhibió la migración en el clon de la línea celular HCT-116 (25.17% Control vs 5.76% Ago) (**Figura 46A**), mientras que, en el caso del vector, las células no soportaron el tratamiento durante 72 horas en un medio sin suero (**Figura 45**). Por su parte, en la línea celular HCT-116 p53 *null* se produjo el efecto contrario tanto en el vector ($P < 0.001$) (14.16% control vs 28.32% Ago) (**Figura 46B**), como en el clon ($P < 0.001$) (27.77% control vs 38.95% Ago) (**Figura 46B**).

La melatonina únicamente indujo modificaciones en la capacidad de migración en las células HCT-116. Disminuyó la capacidad de migración tanto en el vector ($P<0.001$) (22.90 % control vs 11.79% Mel) como en el clon ($P<0.001$) (25.17% Control vs 12.92% Mel) (**Figura 46A**).

Comparando el efecto inducido por la melatonina con el de la agomelatina, se observó que en el clon de las células HCT-116 p53 *null* el tratamiento con agomelatina aumentó la migración ($P<0.001$) (38.95% Ago vs 22.32 % Mel) (**Figura 46B**).

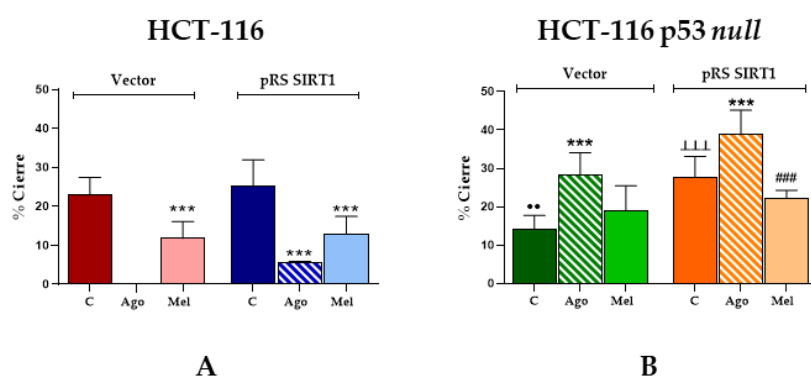


Figura 46. Porcentaje de migración en condiciones de control y tras el tratamiento con agomelatina 0.5 mM (Ago) o melatonina 1 mM (Mel) en los vectores y clones de las células HCT-116 (A) y HCT-116 p53 *null* (B). Se representa la media $\pm$ SD de dos experimentos realizados por cuadruplicado. *** $P<0.001$ vs C; ### $P<0.001$ vs Ago; ### $P<0.001$ vs Vector HCT-116 p53 *null*; ** $P<0.01$ vs Vector HCT-116.

9. La agomelatina modifica el porcentaje de población ALDH1 positiva según el estado de p53 y Sirt1.

La actividad aldefluor deshidrogenasa (ALDH1+) se analizó mediante citometría de flujo.

La ausencia de p53 produjo un descenso ($P<0.001$) de la población ALDH1 positiva (38.93% vector p53 *wt* vs 27.36% vector p53 *null*) bajo condiciones control. En estas mismas condiciones la ausencia de Sirt1 indujo un aumento ($P<0.001$) de esta población (38.93% Vector vs 43.76% pRS SIRT1) en las células HCT-116 y un descenso ($P<0.001$) (27.36% Vector vs 9.86% pRS SIRT1) (**Figura 47**).

En las células HCT-116 la agomelatina incrementó la población ALDH1 positiva en el vector (38.93% control vs 58.5% Ago) (**Figura 47A**). Sin embargo, en el vector de las células HCT-116 p53 *null* se produjo un ligero descenso, aunque no llegó a ser significativo (27.36% control vs 19.26Ago) mientras que en

el clon provocó un aumento significativo ($P<0.001$) (9.86% control vs 41.2% Ago) (Figura 47B).

La melatonina en las células HCT-116 (Figura 47A) produjo un descenso ($P<0.001$) de la población positiva ALDH1 tanto en el vector (38.93% control vs 9.43% Mel) como en el clon (43.76% control vs 21.53% Mel). Este mismo efecto se observó en el vector de las células HCT-116 p53 *null* (27.36% control vs 6.66% Mel) (Figura 47B).

La melatonina indujo un menor porcentaje de población ALDH1 positiva que el observado tras el tratamiento con agomelatina.

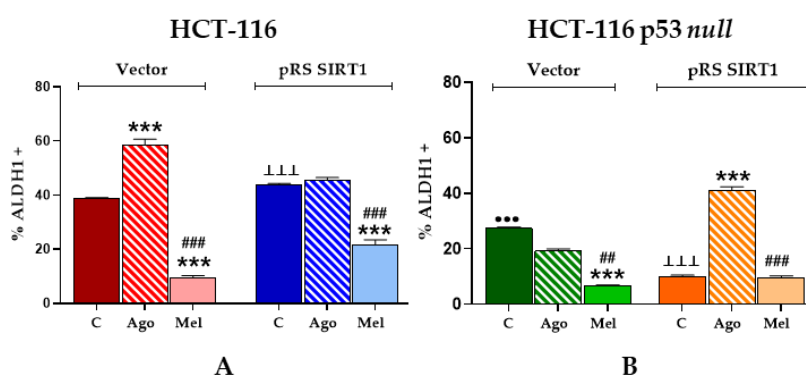


Figura 47. Porcentaje de población ALDH1 positivo en las células HCT-116 (A) y en las células HCT-116 p53 *null* (B) después de 72 horas de tratamiento con 0.5 mM de agomelatina (Ago) y 1 mM de melatonina (Mel). Se representa la media $\pm$ SD de tres experimentos realizados por triplicado. *** $P<0.001$ vs C; ## $P<0.01$ vs Ago; ### $P<0.001$ vs Ago. LLL $P<0.001$ vs Vector C.

10. Los tratamientos con agomelatina y melatonina modifican el fenotipo de CMC.

La caracterización de las células en cuanto a su fenotipo *stem* se llevó a cabo mediante el análisis de los marcadores de membrana CD44, CD326 y CD133 por Citometría de flujo.

Se analizó el porcentaje de células que presentaban un triple marcaje positivo para CD44/CD326/CD133 para las células HCT-116 y un doble marcaje para CD44/CD326 en las células HCT-116 p53 *null* tal y como se describe en la bibliografía.

En las células HCT-116 se produjo un descenso ($P<0.001$) de la población triple positiva en el clon (22.91% vector vs 11.08% pRS SIRT1) en condiciones normales. En estas mismas células tras el tratamiento con agomelatina se dieron diferencias dependientes de Sirt1. El vector sufrió un descenso ($P<0.05$) (22.91% control vs 12.19% Ago), mientras el clon aumentó ($P<0.01$) (11.08% control vs

25.28% Ago) el porcentaje de esta población triple positiva. La melatonina únicamente modificó el porcentaje en el clon al compararlo con el tratamiento con agomelatina ($P<0.05$) (25.25% Ago vs 15.02% Mel) (**Figura 48A**).

En las células HCT-116 p53 *null* se observaron variaciones en función del tratamiento y del estado de Sirt1. La agomelatina originó un aumento ($P<0.001$) de dicho porcentaje solamente en el clon (control 30.32% vs 42.81% Ago). El efecto de la melatonina provocó un descenso significativo tanto en el vector ($P<0.01$) (29.12% control vs 22.38% Mel) como en el clon ($P<0.001$) (30.32% control vs 19.75% Mel) (**Figura 48B**).

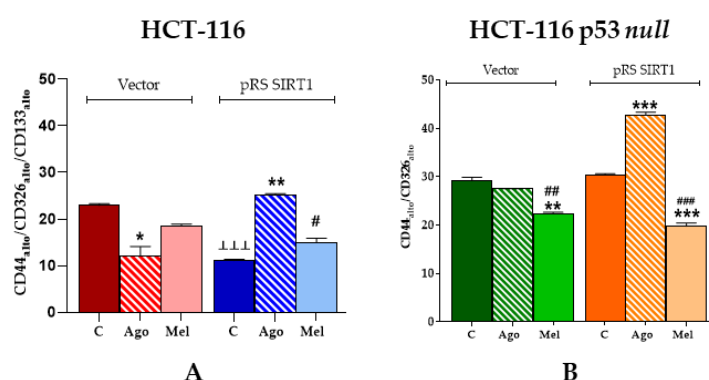


Figura 48. Porcentaje de población triple positiva CD44/CD133/CD326 en las células HCT-116 (**A**) y doble positiva CD326/CD44 en las células HCT-116 p53 *null* (**B**) tras el tratamiento con Agomelatina 0.5 mM (Ago) y melatonina 1mM (Mel). * $P<0.05$ vs C; ** $P<0.01$ vs C; *** $P<0.001$ vs C; # $P<0.05$ vs Ago; ## $P<0.01$ vs Ago; ### $P<0.001$ vs Ago; LLL $P<0.001$ vs Vector C en HCT-116.

11. El tratamiento con agomelatina modifica la capacidad de formación de esferas.

Otro método con el que estudiar el fenotipo de CMC que presentaban las diferentes líneas celulares es determinando la capacidad del mantenimiento y formación de esferas tanto en condiciones de control como tras los tratamientos con melatonina o agomelatina.

En condiciones control el vector de la línea HCT-116 presentó una mayor capacidad de formación de esferas que su propio vector ($P<0.05$) (31 esferas vector vs 25 esferas pRS SIRT1) (**Figura 49A**). En las células HCT-116 p53 *null* se observó un incremento del número de esferas formadas en el clon con respecto al control ($P<0.0001$) (38.5 esferas vector vs 73.5 esferas pRS SIRT1) (**Figura 49B**). Teniendo en cuenta el estado de p53 en estas mismas condiciones, el vector en ausencia de p53 mostró una mayor capacidad de formación de esferas que el vector con p53 en estado salvaje ($P<0.001$) (31 esferas p53 *wt* vs 38.5 esferas p53 *null*) (**Figura 49**).

El tratamiento con agomelatina disminuyó el número de esferas formadas tanto en el vector ($P<0.001$) (31 esferas control vs 19 esferas Ago) como en el clon ($P<0.001$) (25 esferas control vs 6.5 esferas Ago) (**Figura 49A**) de la línea celular HCT-116. Este mismo descenso se produjo en el vector ($P<0.001$) (38.5 esferas control vs 12 esferas Ago) y en el clon ($P<0.001$) (73.25 esferas control vs 36 esferas Ago) de las células HCT-116 p53 *null* (**Figura 49B**).

Por su parte el tratamiento con melatonina también indujo un descenso de dicha capacidad en el vector ($P<0.001$) (31 esferas control vs 22 esferas Mel) y en el clon ($P<0.001$) (25 esferas control vs 13 esferas Mel) (**Figura 49A**) de la línea celular HCT-116. Sin embargo, en la línea HCT-116 p53 *null* solamente se observó este efecto en el clon ($P<0.001$) (73.25 colonias control vs 10.5 colonias Mel) (**Figura 49B**).

El tratamiento con melatonina aumentó la capacidad de formación de esferas comparando con la capacidad observada tras el tratamiento con agomelatina, en el clon ($P<0.001$) de la línea HCT-116 y en el vector ($P<0.001$) de las células HCT-116 p53 *null*, mientras que en el caso del clon de esta última línea la melatonina disminuyó dicha capacidad ($P<0.001$) (**Figura 49**).

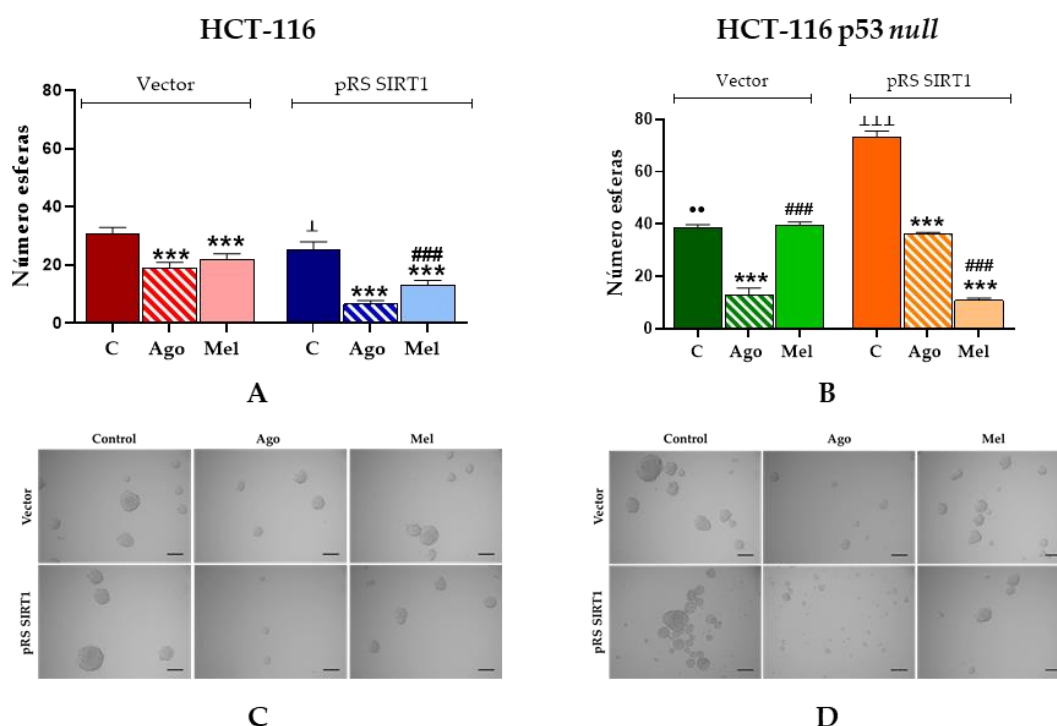


Figura 49. Número de esferas formadas en condiciones control y tras los tratamientos con agomelatina 0.5 mM (Ago) o melatonina 1 mM (Mel) en las células HCT-116 (A) y HCT-116 p53 *null* (B). Se muestra la media $\pm$ SD de dos experimentos realizados por cuadruplicado.

*** $P<0.001$ vs C; ### $P<0.001$ vs Ago; ↓ $P<0.05$ vs Vector; ↓↓ $P<0.01$ vs Vector; ** $P<0.01$ vs Vector. Imágenes representativas de las esferas formadas. La barra equivale a 100 μm.

12. La ausencia de p53 y el silenciamiento de Sirt1 incrementa la formación de tumores a partir de células TS1.

Este ensayo se llevó a cabo con el fin de obtener una mejor caracterización de las células en cuanto a su fenotipo *stem*. Se obtuvo la población TS1 tanto de los vectores como de los clones de ambas líneas y se inocularon en los flancos de los animales.

Se crearon dos grupos, uno se inoculó con células provenientes de los vectores, y el otro grupo por las células de los clones.

Se fueron controlando los ratones hasta el momento en que aparecieron los primeros tumores (30 días). En las células HCT-116, no se observaron diferencias significativas en cuanto al número de tumores formados (Vector 5 tumores vs 4 tumores pRS SIRT1). Sin embargo, en la línea celular HCT-116 p53 *null* solamente el clon fue capaz de formar tumor (Vector 0 tumores vs 1 tumor pRS SIRT1) (**Figura 50A**).

El volumen tumoral también varió en función del estado de Sirt1, en el caso de las células HCT-116 los tumores generados a partir de las células del vector fueron significativamente mayores que los generados a partir del clon ($P < 0.001$) (377.97 mm^3 vector vs 43.01 mm^3 pRS SIRT1). En la línea HCT-116 p53 *null* el único tumor formado presentó un volumen de 245.81 mm^3 (**Figura 50B**).

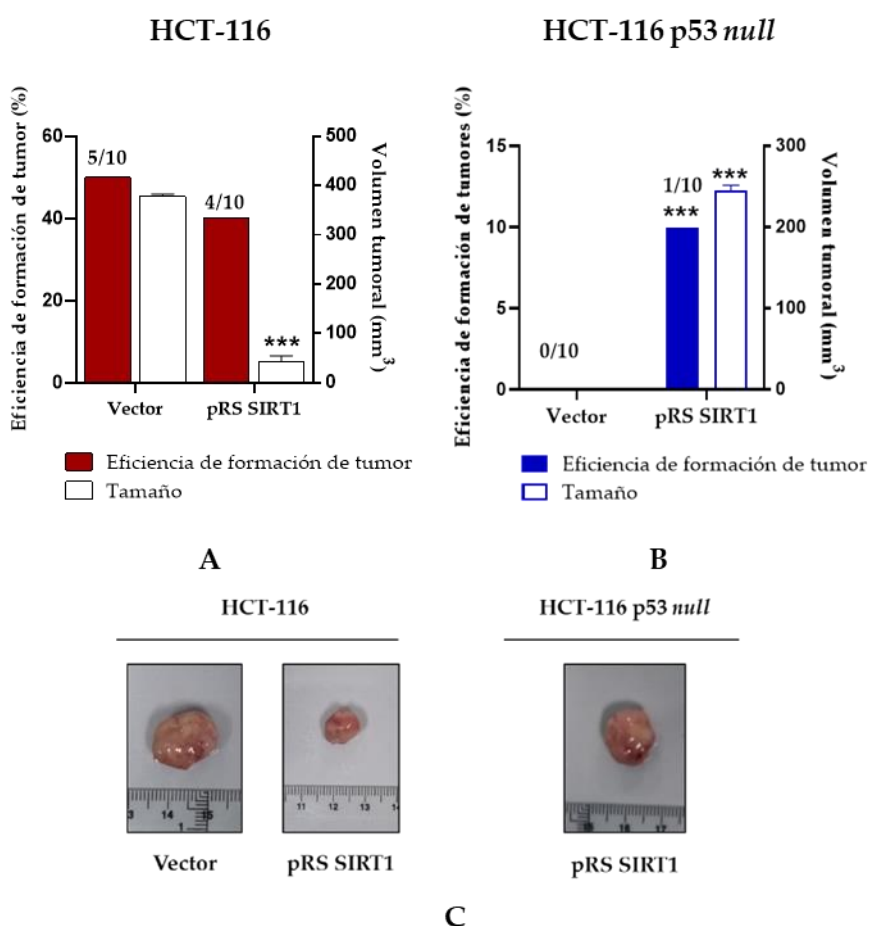


Figura 50. Número y volumen medio de los tumores formados a partir de la población TS1 del vector o el clon de las células HCT-116 (A) y HCT-116 p53 null (B). ***P<0.001 vs vector HCT-116. Imágenes representativas de los tumores formados (C).

13. La agomelatina modifica la población de CMCs en función del estado de p53 y Sirt1.

A partir de la población de CMCs aisladas por tripsinización diferencial se llevó a cabo el marcaje de estas células con los marcadores CD44, CD133 y CD326 y análisis por citometría de flujo para comprobar su fenotipo.

En condiciones normales el vector de las células HCT-116 presentó un mayor porcentaje de células triple positivas que su propio clon (P<0.001) (24.99% vector vs 11.35% pRS SIRT1) (Figura 51A).

El tratamiento con agomelatina indujo un descenso de la población positiva en ambos vectores, tanto con p53 *wt* (P<0.001) (24.99% control vs 11.35% Ago) (Figura 51A) como con p53 *null* (P<0.001) (32.07% control vs 11.28% Ago) (Figura 51B).

Comparando el efecto del tratamiento con agomelatina y melatonina en las células HCT-116, se observó como la melatonina incrementó el porcentaje de células triple positivas en el vector ($P<0.01$) (9.22% Ago vs 19.31% Mel) (**Figura 51A**). Este mismo efecto se observó comparando el porcentaje de la población doble positiva en el vector de la línea HCT-116 p53 *null* ($P<0.001$) (11.28% Ago vs 20.21% Mel) (**Figura 51B**).

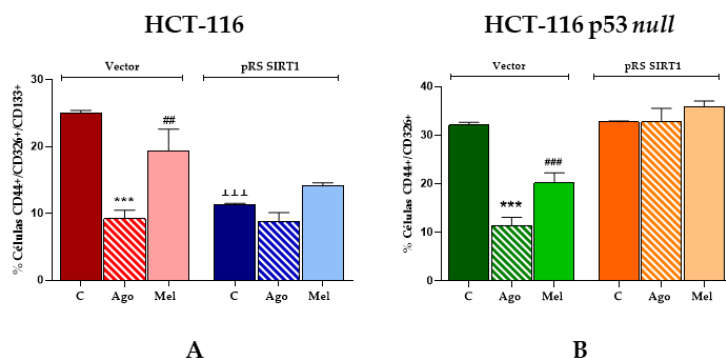


Figura 51. Porcentaje de células triple positivas para el marcaje CD44/CD326/CD133 en las células HCT-116 (A) y doble positivo CD44/CD326 en las células HCT-116 p53 *null* (B). Se muestra la media $\pm$ SD de tres experimentos realizados por triplicado. *** $P<0.001$ vs C; ## $P<0.01$ vs Ago; ### $P<0.001$ vs Ago; LLL $P<0.001$ vs Vector.

14. El tratamiento con agomelatina disminuye el área de las colonias formadas

Se comprobó el efecto que presentaban los tratamientos sobre la capacidad de formación de colonias, únicamente utilizando la parte de CMCs o TS1 presentes en el cultivo.

En condiciones normales no se observaron diferencias en función del estado de p53. Aunque si dependientes del estado de SIRT1, el clon de las células HCT-116 mostró un descenso ($P<0.01$) del número de colonias (383.3 ± 24.6 colonias Vector vs 253 ± 3 colonias pRS SIRT1) (**Figura 52A**). Además, presentaron una menor área ($P<0.05$) ($0.039 \mu\text{m}^2$ vector vs $0.018 \mu\text{m}^2$ pRS SIRT1) (**Figura 52C**). El efecto contrario se observó en el clon de las células HCT-116 p53 *null*, donde se produjo un aumento ($P<0.05$) ($0.013 \mu\text{m}^2$ Vector vs $0.023 \mu\text{m}^2$ pRS SIRT1) (**Figura 52D**).

El tratamiento con agomelatina no produjo diferencias significativas en el número de colonias que se formaron (**Figuras 52A y 52B**), pero si en cuanto al área que presentaban estas. En las células HCT-116 se observó una disminución de este parámetro tanto en el vector ($P<0.01$) ($0.039 \mu\text{m}^2$ control vs $0.007 \mu\text{m}^2$ Ago) como en el clon ($P<0.01$) ($0.018 \mu\text{m}^2$ control vs $0.006 \mu\text{m}^2$ Ago) (**Figura 52C**). Este

mismo efecto se observó en el clon de la línea celular HCT-116 p53 *null* ($P < 0.001$) ($0.023 \mu\text{m}^2$ control vs $0.003 \mu\text{m}^2$ Ago) (**Figura 52D**).

El tratamiento con melatonina no produjo diferencias significativas ni en el número de colonias formadas ni en el área de estas (**Figuras 52C y 52D**).

Comparando el efecto originado por el tratamiento con la agomelatina con el desencadenado por la melatonina se observó un aumento significativo en el tamaño de las colonias. Este incremento del área se produjo tanto en el vector ($P < 0.05$) ($0.007 \mu\text{m}^2$ Ago vs $0.02 \mu\text{m}^2$ Mel) como en el clon ($P < 0.01$) ($0.006 \mu\text{m}^2$ Ago vs $0.016 \mu\text{m}^2$ Mel) de las células HCT-116 (**Figura 52C**) y solamente en el clon de las células HCT-116 p53 *null* ($P < 0.001$) ($0.003 \mu\text{m}^2$ Ago vs $0.029 \mu\text{m}^2$ Mel) (**Figura 52D**).

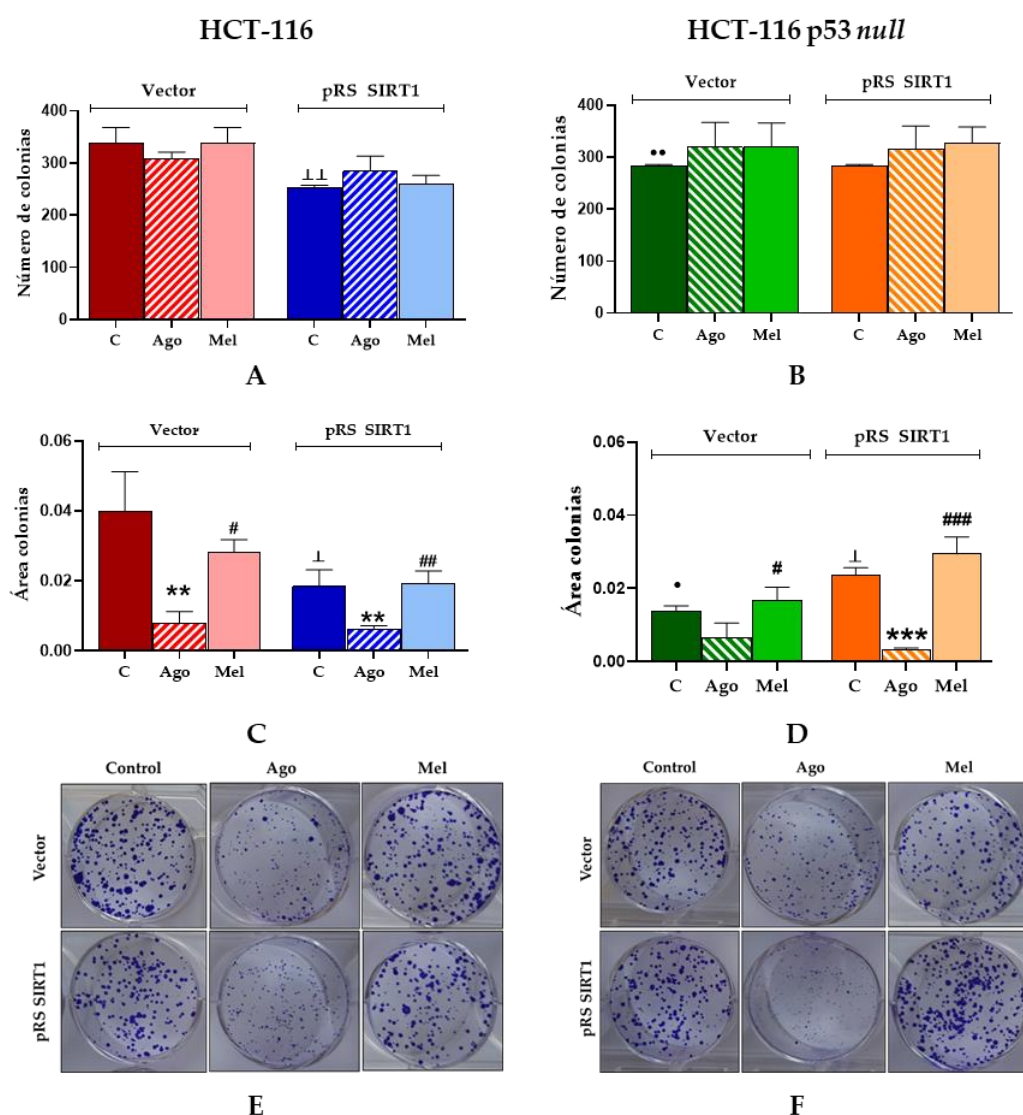


Figura 52. Número (A y B) y área (C y D) de las colonias formadas a partir de las células HCT-116 (A y C) y HCT-116 p53 *null* (B y D) después del tratamiento con agomelatina 0.5 mM (Ago) y melatonina 1 mM (Mel) durante 72 horas. Se representa la media $\pm$ SD de tres experimentos realizados por triplicado. **P<0.01 vs C; ***P<0.001 vs C; #P<0.05 vs Ago; ##P<0.01 vs Ago; ###P<0.001 vs Ago. 1P<0.05 vs Vector C; 11P<0.01 vs Vector C. ·P<0.05 vs Vector C de HCT-116. Imagen representativa de las colonias de las células HCT-116 (E) y en HCT-116 p53 *null* (F).

15. Estudio de la capacidad de autorrenovación de la población de CMC

Se realizó la comprobación de la capacidad de formación de esferas teniendo en cuenta únicamente la población TS1, lo que permite ampliar la caracterización de esta subpoblación en cuanto a sus características de CMCs.

La población TS1 derivada de la línea celular HCT-116, independientemente del vector o del clon, no fue capaz de formar esferas a los 5 días tras la siembra, tiempo que tardaron en formarse las esferas derivadas de la línea HCT-116 p53 *null* (**Figuras 53A y 53C**). Por lo que, en condiciones normales, el vector con p53 nulo presenta mayor ($P<0.001$) capacidad de formar esferas que cuando p53 se encuentra en estado salvaje (22.5 esferas con p53 nulo vs 0 esferas con p53 *wt*) (**Figura 53**).

Analizando los resultados en condiciones normales en la línea celular HCT-116 p53 *null* se observó como el clon presentaba una mayor capacidad de formación de esferas (22.5 esferas vector vs 57.5 esferas pRS SIRT1) (**Figuras 53B y 53D**).

Tras el tratamiento con agomelatina solamente se observaron diferencias en el clon de las células HCT-116 p53 *null*. En este caso el tratamiento incrementó la capacidad de formación de esferas ($P<0.001$) (57.5 esferas C vs 75.5 esferas Ago) (**Figura 53B**).

Por su parte el tratamiento con melatonina indujo una menor capacidad de formación de colonias tanto en el vector ($P<0.01$) (22.5 esferas C vs 17.5 esferas Mel) como en el clon ($P<0.05$) (57.5 esferas C vs 49 esferas Mel) de la línea celular HCT-116 p53 *null* (**Figura 53B**).

Comparando el efecto de ambos tratamientos se observó como la melatonina redujo la capacidad de formación de esferas en la línea HCT-116 p53 *null*, independientemente del estado de Sirt1. Es decir, este efecto se produjo tanto con SIRT1 presente ($P<0.01$) (17.5 esferas Mel vs 28.5 esferas Ago) como con Sirt1 silenciado ($P<0.001$) (49 esferas Mel vs 75.5 esferas Ago) (**Figura 53B**).

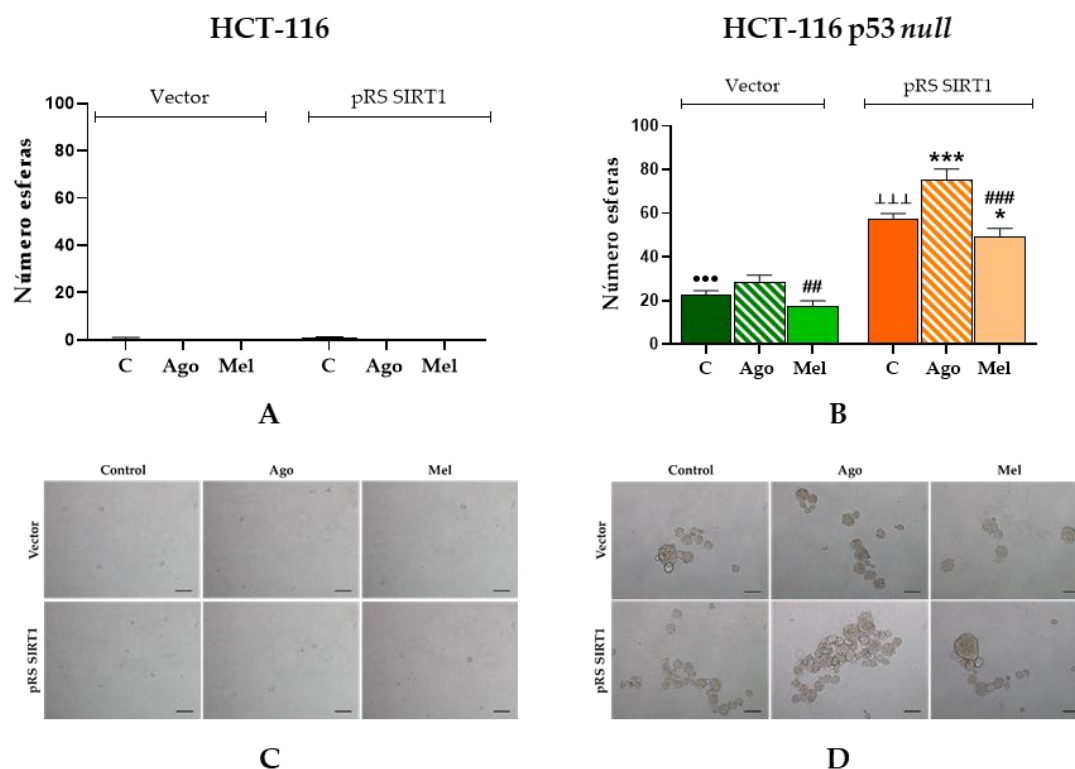


Figura 53. Número de esferas formadas en condiciones control y tras los tratamientos con agomelatina 0.5 mM (Ago) o melatonina 1 mM (Mel) a partir de la población TS1 de las células HCT-116 (A) y HCT-116 p53 *null* (B). Se muestra la media $\pm$ SD de dos experimentos realizados por cuadruplicado. * $P < 0.05$ vs C; *** $P < 0.001$ vs C; ## $P < 0.01$ vs Ago; ### $P < 0.001$ vs Ago; lll $P < 0.001$ vs Vector; ... $P < 0.001$ vs Vector. Imágenes representativas de las esferas formadas. La barra equivale a 100 μ m.

16. Estudio del efecto del tratamiento con agomelatina sobre los genes del ritmo circadiano en función de Sirt1 y p53

Dada la implicación de Sirt1 en los ritmos circadianos y del papel como reguladores de la agomelatina y la melatonina en este proceso, se comprobó si existía variación en cuanto a amplitud, acrofase y MESOR en los genes Clock, Per2 y Prx1 en función del estado de p53 y de Sirt1.

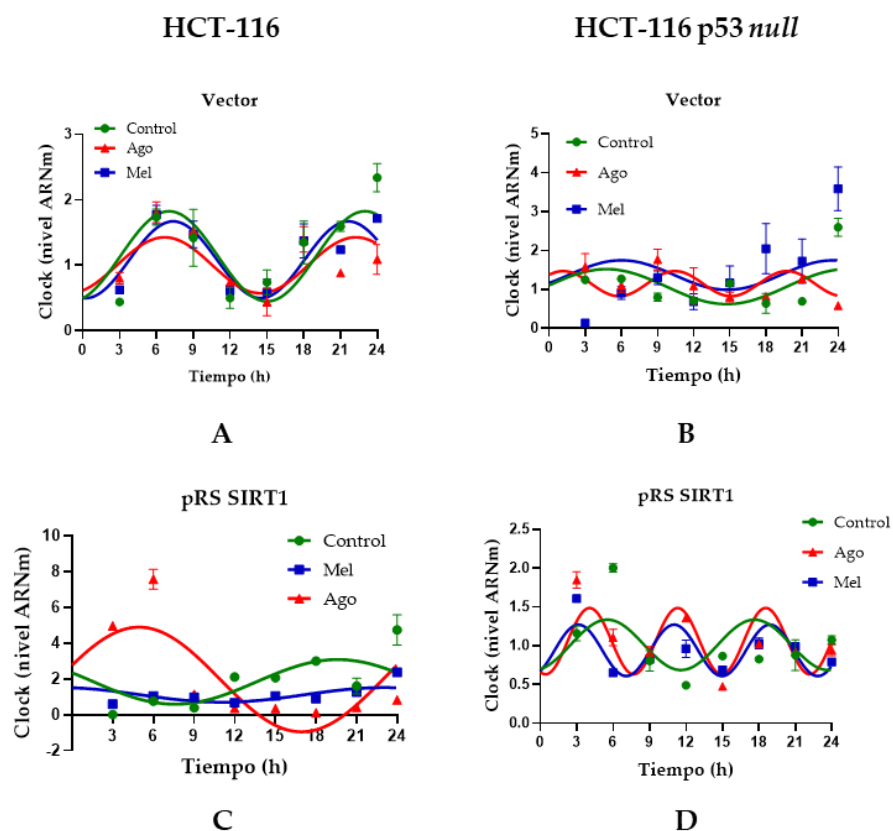


Figura 54. Ritmos circadianos obtenidos para el gen Clock en condiciones normales y después del tratamiento con agomelatina 0.5 mM (Ago) o melatonina 1 mM (Mel) en los vectores (A y B) y clones (C y D) de las líneas celulares HCT-116 y HCT-116 p53 *null*.

En condiciones normales se produjo un adelanto en la acrofase y un descenso en los parámetros de amplitud y MESOR en el vector de la línea HCT-116 p53 *null* al compararlo con el vector de la línea HCT-116 ($P < 0.001$) (**Figuras 54A y 54B, Tabla 22**). En estas mismas condiciones el clon de la línea HCT-116 presentó un adelanto de la acrofase al compararlo con su vector ($P < 0.001$) (**Figuras 54A y 54C, Tabla 20**), este mismo efecto se observó en la línea HCT-116 p53 *null* ($P < 0.05$) (**Figuras 54B y 54D, Tabla 22**).

Analizando de manera individualizada por línea celular el efecto de los tratamientos, se observó que en el vector de las células HCT-116 ambos tratamientos originaron un descenso de la amplitud ($P < 0.001$) y del MESOR ($P < 0.001$) (**Figura 54A, Tabla 22**). En el clon de esta misma línea, el tratamiento con agomelatina originó un retraso en la acrofase ($P < 0.001$) y un descenso en el MESOR ($P < 0.01$). Por su parte el tratamiento con melatonina desencadenó un descenso de la amplitud ($P < 0.001$) y del MESOR ($P < 0.001$) (**Figura 54C, Tabla 22**).

En el vector de la línea HCT-116 p53 *null* solamente el tratamiento con melatonina indujo cambios en la ritmicidad, desencadenó un descenso de la

amplitud ($P<0.001$), un adelanto de la acrofase ($P<0.001$) y un incremento en el MESOR ($P<0.001$) (**Figura 54B, Tabla 22**). En el clon de esta línea no se observaron modificaciones en la ritmicidad después de cualquiera de los tratamientos utilizados (**Figura 54D, Tabla 22**).

Tabla 22. Resultados del análisis Cosinor de la expresión del gen Clock después del tratamiento con agomelatina o melatonina.

Línea celular	Tto ¹	PR ²	P-valor ³	Amplitud (U.A.) ⁴	Acrofase (h) ⁵	MESOR (U.A.) ⁴
Vector HCT-116	Control	52.54	0.0004	1.71 ± 0.35	7.72 ± 1.64	1.92 ± 0.26
	Ago	83.39	<0.0001	$0.99 \pm 0.09^{***}$	8.83 ± 0.82	$1.20 \pm 0.06^{***}$
	Mel	64.78	<0.0001	$0.59 \pm 0.09^{***}$	7.37 ± 1.05	$1.09 \pm 0.064^{***}$
pRS SIRT1 HCT-116	Control	36.25	0.0088	1.25 ± 0.36	19.59 ± 5.66^{111}	1.84 ± 0.26
	Ago	19.26	0.1058	1.47 ± 0.62	$5.44 \pm 2.41^{***}$	$1.38 \pm 0.46^{**}$
	Mel	30.35	0.0224	$0.41 \pm 0.14^{***, ###}$	$23.07 \pm 7.63^{***}$	$1.11 \pm 0.09^{***}$
Vector HCT-116 p53 <i>null</i>	Control	34.44	0.0119	$0.51 \pm 0.15^{+++}$	$1.49 \pm 0.45^{+++}$	$1.14 \pm 0.11^{+++}$
	Ago	30.05	0.0235	0.32 ± 0.11	1.16 ± 0.39	1.15 ± 0.07
	Mel	31.37	0.0192	$0.82 \pm 0.27^{***}$	$21.24 \pm 6.86^{***}$	$1.44 \pm 0.19^{***}$
pRS SIRT1 HCT-116 p53 <i>null</i>	Control	29.35	0.026	0.33 ± 0.11	5.52 ± 1.87^1	1.01 ± 0.08
	Ago	52.64	0.0004	0.43 ± 0.08	4.06 ± 0.83	1.06 ± 0.06
	Mel	64.62	<0.0001	0.33 ± 0.05	3.15 ± 0.50	0.94 ± 0.04

¹Tto: tratamiento ²PR: porcentaje de ritmo; ³ P-valor: amplitud test cero; ⁴A.U.: unidad arbitraria; ⁵h: horas. Comparación de los parámetros de ritmicidad en distintas condiciones llevada a cabo a partir de un estudio con un periodo de 24 horas. ** $P<0.01$ vs Control; *** $P<0.001$ vs Control; ### $P<0.001$ vs Ago 0.5;

¹ $P<0.05$ vs Vector de la misma línea; ⁺⁺⁺ $P<0.001$ vs HCT-116.

El siguiente gen en que se comprobó la variación de su ritmicidad en función del estado de Sirt1 y p53, y del tratamiento utilizado fue Per2 (**Figura 55 y Tabla 23**).

En condiciones normales en el clon de la línea HCT-116 se produjo un aumento de la amplitud($P<0.001$) y el MESOR ($P<0.001$) en comparación con el vector de esta misma línea (**Figuras 55A y 55C, Tabla 23**). Este mismo incremento ($P<0.01$) se originó al comparar los vectores de las diferentes líneas (**Figura 55A y 55B, Tabla 21**). Teniendo en cuenta únicamente la línea HCT-116 p53 *null* se produjo un incremento de la amplitud ($P<0.05$) y un retraso de la acrofase ($P<0.001$) en el clon al compararlo con el vector (**Figura 55B y 55D, Tabla 23**).

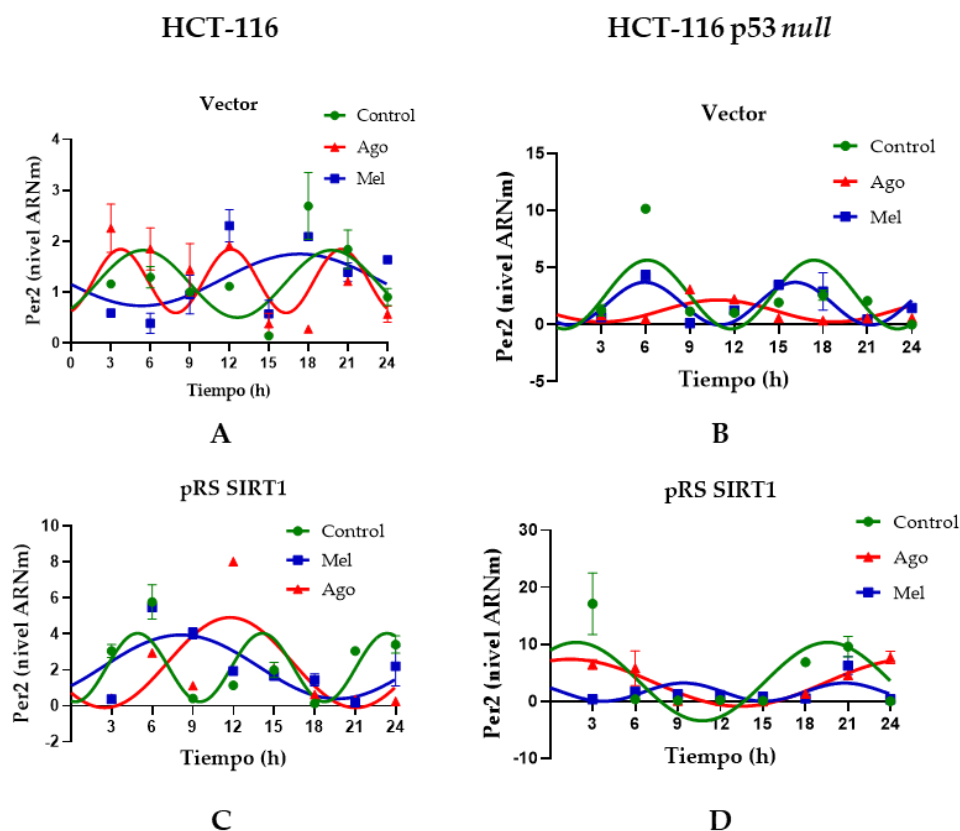


Figura 55. Ritmos circadianos obtenidos para el gen Per2 en condiciones normales y después del tratamiento con agomelatina 0.5 mM (Ago) o melatonina 1 mM (Mel) en los vectores (A y B) y clones (C y D) de las líneas celulares HCT-116 y HCT-116 p53 null.

Analizando la ritmicidad de manera individualizada en el vector de la línea HCT-116 se produjo un adelanto de la acrofase tras el tratamiento con melatonina (**Figura 55A, Tabla 23**). En el clon de esta misma línea se originó un aumento de la amplitud ($P < 0.01$) y un adelanto de la acrofase ($P < 0.001$) después del tratamiento con agomelatina (**Figuras 55A y 55B, Tabla 23**). Comparando el efecto de ambos tratamientos se observó como la melatonina disminuye la amplitud ($P < 0.001$) (**Figura 55C, Tabla 23**).

En el vector de la línea HCT-116 p53 null se produjo un adelanto de la acrofase ($P < 0.001$) tras el tratamiento con agomelatina. Por su parte la melatonina originó un retraso de la acrofase ($P < 0.001$) comparándolo con el efecto de la agomelatina (**Figura 55B, Tabla 23**). En el clon de esta misma línea se produjo un aumento de la amplitud ($P < 0.001$) y el MESOR ($P < 0.001$) así como un adelanto de la acrofase tras el tratamiento con la melatonina (**Figura 55D, Tabla 23**).

Tabla 23. Resultados del análisis cosinor de la expresión del gen *Per2* después del tratamiento con agomelatina o melatonina.

Línea celular	Tto ¹	PR ²	P-valor ³	Amplitud (U.A.) ⁴	Acrofase (h) ⁵	MESOR (U.A.) ⁴
Vector HCT-116	Control	35.22	0.0105	0.66 ± 0.18	5.46 ± 1.61	1.16 ± 0.13
	Ago	23.96	0.0563	0.53 ± 0.23	3.61 ± 1.39	1.25 ± 0.15
	Mel	26.07	0.0419	0.51 ± 0.19	17.34 ± 6.36***,###	1.24 ± 0.13
pRS SIRT1 HCT-116	Control	52.69	0.0004	1.90 ± 0.40 ¹¹¹	4.92 ± 0.93	2.14 ± 0.27 ¹¹¹
	Ago	52.06	0.0004	2.51 ± 0.54**	11.75 ± 2.50***	2.41 ± 0.39
	Mel	51.68	0.0005	1.78 ± 0.36 ^{###}	8.13 ± 1.71	2.17 ± 0.26
Vector HCT-116 p53 <i>null</i>	Control	48.96	0.0009	3.01 ± 0.69 ^{††}	6.13 ± 1.29	2.64 ± 0.47 ^{††}
	Ago	50.95	0.0006	0.96 ± 0.22	10.90 ± 2.31***	1.20 ± 0.15
	Mel	37.85	0.0068	2.70 ± 0.71	6.49 ± 1.83 ^{###}	2.67 ± 0.52
pRS SIRT1 HCT-116 p53 <i>null</i>	Control	46.02	0.0010	5.72 ± 1.29 ¹	1.73 ± 0.04 ¹¹¹	2.99 ± 0.92
	Ago	57.96	0.0001	3.18 ± 0.59*	1.65 ± 0.31	2.73 ± 0.42
	Mel	31.76	0.0181	11.70 ± 3.56***,###	9.65 ± 3.15***,###	6.66 ± 2.61***,###

¹Tto: tratamiento ²PR: porcentaje de ritmo; ³ P-valor: amplitud test cero; ⁴A.U.: unidad arbitraria; ⁵h: horas. Comparación de los parámetros de ritmicidad en distintas condiciones llevada a cabo a partir de un estudio con un periodo de 24 horas. *P<0.05 vs Control; **P<0.01 vs Control; ***P<0.001 vs Control; ###P<0.001 vs Ago 0.5; ¹P0.05 vs Vector de la misma línea; ¹¹P0.01 vs Vector de la misma línea; ¹¹¹P0.001 vs Vector de la misma línea; ^{††}P<0.01 vs HCT-116.

Por último, se analizó la variación de la ritmicidad de *Prx1* (**Figura 56, Tabla 24**). En condiciones normales, en ausencia de p53, el vector presentó un menor valor de amplitud (P<0.001) y MESOR (P<0.001), así como un retraso de la acrofase (P<0.001) al compararlo con el vector con p53 *wt* (**Figuras 56A y 57B, Tabla 24**). Teniendo en cuenta el estado de *Sirt1*, en el clon de las células HCT-116 se observó un descenso de la amplitud (P<0.001) y del MESOR (P<0.001) y un adelanto de la acrofase (P<0.001) (**Figuras 56A y 56C, Tabla 24**). Se observó el mismo efecto en el caso de las células HCT-116 p53 *null* (**Figuras 56B y 56C, Tabla 24**).

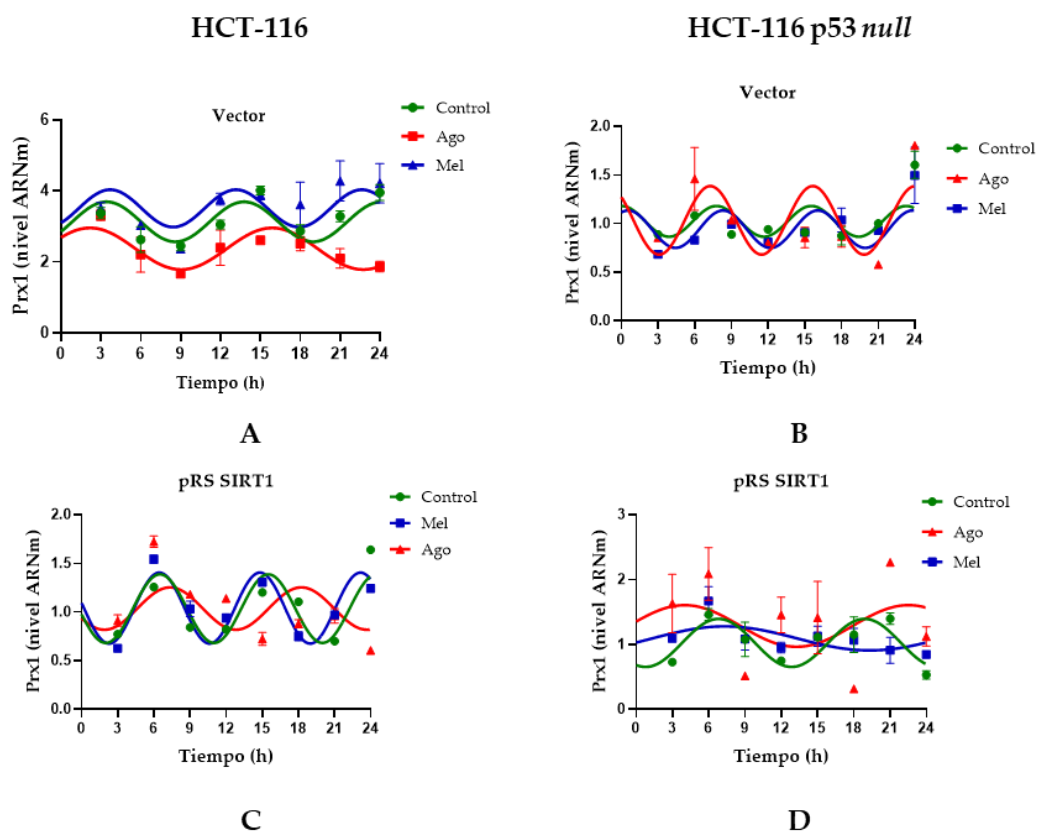


Figura 56. Ritmos circadianos obtenidos para el gen Prx1 en condiciones normales y después del tratamiento con agomelatina 0.5 mM (Ago) o melatonina 1 mM (Mel) en los vectores (**A** y **B**) y clones (**C** y **D**) de las líneas celulares HCT-116 y HCT-116 p53 null.

Analizando de manera individual cada línea celular, en el clon de la línea celular HCT-116 el tratamiento con agomelatina disminuyó la amplitud ($P < 0.001$), mientras que la melatonina indujo un aumento de la amplitud ($P < 0.001$) al compararlo con el efecto de la agomelatina (**Figura 56C**, **Tabla 24**).

Por su parte en el vector de la línea HCT-116 p53 null la agomelatina indujo un adelanto de la acrofase ($P < 0.001$), este mismo efecto se observó tras el tratamiento con melatonina, la cual también incrementó la amplitud ($P < 0.001$) (**Figura 56B**, **Tabla 24**). En esta misma línea, pero con Sirt1 silenciado la agomelatina incrementó el MESOR ($P < 0.001$), mientras la agomelatina disminuyó la amplitud ($P < 0.001$) (**Figura 56**, **Tabla 24**).

Tabla 24. Resultados del análisis Cosinor de la expresión del gen Prx1 después del tratamiento con agomelatina o melatonina.

Línea celular	Tto ¹	PR ²	P-valor ³	Amplitud (U.A.) ⁴	Acrofase (h) ⁵	MESOR (U.A.) ⁴
Vector HCT-116	Control	59.48	0.0001	0.562 ± 0.107	3.42 ± 0.64	3.13 ± 0.08
	Ago	80.93	<0.0001	0.586 ± 0.064	0.21 ± 0.24	2.37 ± 0.05
	Mel	26.89	<0.3164	0.525 ± 0.295	3.69 ± 0.21	3.51 ± 0.22
pRS SIRT1 HCT-116	Control	77.86	<0.0001	0.35 ± 0.04 ¹	6.51 ± 0.87 ¹¹¹	1.04 ± 0.03 ¹¹¹
	Ago	24	0.0561	0.21 ± 0.08***	7.34 ± 3.05	1.04 ± 0.06
	Mel	87.8	0.0052	0.37 ± 0.06 ^{###}	6.46 ± 1.10	1.04 ± 0.04
Vector HCT-116 p53 <i>null</i>	Control	30.98	0.0204	0.19 ± 0.06 ⁺⁺⁺	0.57 ± 0.19 ⁺⁺⁺	1.02 ± 0.04 ⁺⁺⁺
	Ago	6.1	0.5165	0.13 ± 0.01	10.37 ± 9.63***	1.03 ± 0.08
	Mel	54.57	0.0003	0.53 ± 0.11***,###	7.70 ± 1.43*	1.11 ± 0.07
pRS SIRT1 HCT-116 p53 <i>null</i>	Control	61.87	<0.0001	0.37 ± 0.06 ¹	6.82 ± 1.17 ¹	1.02 ± 0.04
	Ago	11.46	0.2784	0.39 ± 0.24	3.83 ± 2.53	1.32 ± 0.18***
	Mel	24.17	0.0548	0.19 ± 0.07*,##	7.33 ± 2.83	1.09 ± 0.05 ^{###}

¹Tto: tratamiento ²PR: porcentaje de ritmo; ³ P-valor: amplitud test cero; ⁴A.U.: unidad arbitraria; ⁵h: horas. Comparación de los parámetros de ritmicidad en distintas condiciones llevada a cabo a partir de un estudio con un periodo de 24 horas. *P<0.05 vs Control; **P<0.01 vs Control; ***P<0.001 vs Control; ##P<0.01 vs Ago 0.5; ###P<0.001 vs Ago 0.5; ¹P0.05 vs Vector de la misma línea; ¹¹¹P0.001 vs Vector de la misma línea; ⁺⁺⁺P<0.001 vs HCT-116.

DISCUSIÓN

El cáncer es una enfermedad compleja causada por la proliferación incontrolada de células con capacidad invasiva y metastásica (Yin et al., 2023). Su desarrollo se debe a un conjunto de cambios epigenéticos, y a la acumulación de mutaciones a nivel de oncogenes y genes supresores de tumores (Gonfloni et al., 2014) todos ellos implicados en diversos procesos como el ciclo celular, la supervivencia o la invasión. El equilibrio entre la actividad de los oncogenes y de los genes supresores de tumores es lo que mantiene la homeostasis celular (Yin et al., 2023).

Dentro de esta enfermedad, se encuentra el cáncer colorrectal que es el tercer tipo de cáncer más común en cuanto a diagnóstico (Fabregas et al., 2022; Sung et al., 2021a; Yin et al., 2023) y la tercera causa de muerte por cáncer a nivel mundial (Fabregas et al., 2022; Rawla et al., 2019; Sung et al., 2021a; Xie et al., 2020). A pesar de los grandes avances a nivel de prevención, diagnóstico y tratamiento (Arnold et al., 2017), un alto porcentaje de pacientes continúan siendo diagnosticados en estadios avanzados o metastásicos (Yin et al., 2023). El grado de diferenciación tumoral en el momento del diagnóstico se encuentra directamente relacionado con la probabilidad de supervivencia, lo que hace imprescindible la búsqueda de nuevos biomarcadores y tratamientos que mejoren la supervivencia de los pacientes (Xu et al., 2020; Zu et al., 2016).

Durante la transición de adenoma a carcinoma comienzan a acumularse gran cantidad de mutaciones en diferentes vías, entre ellas la vía de p53 (La Vecchia & Sebastián, 2020; Müller et al., 2016). El papel que desempeña este represor tumoral en el desarrollo tumoral del CCR es de gran importancia, ya que más del 50% de los pacientes diagnosticados presentan mutaciones en dicho gen (Malki et al., 2020; Mármol et al., 2017). En el momento en que este gen sufre modificaciones o pierde su actividad, se inhibe la capacidad de controlar el crecimiento y la muerte celular, originando procesos cancerígenos (Bunz et al., 1999). Estas mutaciones también se han relacionado con resistencia a los tratamientos, como ocurre con el 5-FU (Malki et al., 2020; Mármol et al., 2017; Yh et al., 2020). De ahí la gran necesidad de desarrollar nuevos tratamientos que sean efectivos en células que presenten p53 mutado o sin función.

Sirt1 es una histona desacetilasa de clase III dependiente de NAD⁺, proceso que lleva a cabo tanto en proteínas de tipo histonas como no histonas (Gonfloni et al., 2014; Yu et al., 2016; Zu et al., 2016), entre estas últimas se encuentra el represor tumoral p53 (Yin et al., 2023). El papel de SIRT1 en el proceso de

tumorigénesis es ambiguo y se ha descrito que presenta un papel dual (Rifaï et al., 2018). Podría actuar como promotor tumoral al inhibir la activación de p53 (Lucena-Cacace et al., 2018; Osama et al., 2016; Zu et al., 2016) y como represor a través de la supresión de distintos genes o proteínas (Jung et al., 2013; Rifaï et al., 2018; Yin et al., 2023). De hecho, se ha descrito, una sobreexpresión en varios tipos tumorales (Zu et al., 2016), por lo que desempeñaría un importante papel en el crecimiento tumoral y en el desarrollo de resistencias a los tratamientos en múltiples tipos de cáncer, incluyendo el CCR (Jung-Hynes et al., 2010; Ríos-Arrabal, Muñoz-Gámez, Jiménez-Ruíz, et al., 2016).

A pesar de saber que desempeña un importante papel en el desarrollo del CCR no se conoce con exactitud cuál es y lo propuesto continúa siendo contradictorio (Jung et al., 2013; Zu et al., 2016). Hay estudios en los que se relaciona una baja expresión de SIRT1 con un mejor pronóstico, por lo que podría utilizarse como biomarcador (Zu et al., 2016).

La actividad del represor tumoral p53 se encuentra muy regulada por las modificaciones postraduccionales. En condiciones de estrés celular, SIRT1 desacetila p53 (Luo et al., 2001; Yin et al., 2023). Gran cantidad de estudios relacionan la aparición tumoral con un mal funcionamiento del eje Sirt1-p53, ya que Sirt1 es capaz de controlar procesos como la apoptosis o la parada del ciclo celular dependientes de p53. Por lo que el uso de este eje como diana terapéutica podría ser esencial para el tratamiento del CCR, aunque a la vez muy complejo por la cantidad de vías y rutas metabólicas que dependen de dichas moléculas (Yin et al., 2023).

De hecho, en este trabajo se ha observado una mayor expresión de SIRT1 en tejido tumoral de CCR al compararlo con la expresión en la mucosa sana del mismo paciente. Teniendo en cuenta la importancia de p53 en esta enfermedad, se agruparon los pacientes en función de su estado. El incremento de la expresión de SIRT1 únicamente se producía en aquellos pacientes que presentaban p53 en estado salvaje, por lo que su expresión es dependiente del estado de p53.

En estudios realizados en muestras de pacientes con este tipo tumoral únicamente se ha podido correlacionar un incremento de la expresión de SIRT1 con un mayor grado de diferenciación del tumor (Yu et al., 2016; Zu et al., 2016). Esto coincide con los resultados obtenidos en este estudio a partir de las muestras de pacientes con CCR. A pesar de observar una variación en la expresión de SIRT1 no ha sido posible correlacionarlo con otros parámetros estudiados como la edad o el sexo de los pacientes.

Se ha descrito una posible asociación entre la expresión de SIRT1 y la presencia de células madre cancerígenas en distintos tipos de cáncer entre los que se incluye el CCR (Garcia-Peterson & Li, 2021). De hecho, el estudio realizado por *Chen et al.* describe que una elevada expresión del marcador CD133 se relaciona con una elevada expresión de SIRT1. Este mismo efecto se observó en este trabajo en el que se relacionó una mayor expresión de Sirt1 con una elevada expresión de los marcadores CD133 y CD44, marcadores característicos de células madre cancerígenas.

La desacetilación de p53 por parte de SIRT1 implica que la célula no entre en apoptosis y que por lo tanto no muera, aunque presente gran cantidad de mutaciones, lo que la hace firme candidata de convertirse en CMC. En este estudio al agrupar las muestras según el estado de p53 se relacionó una mayor expresión de Sirt1 con una mayor expresión de marcadores CD44 y CD133. Esta relación únicamente se observó en aquellos pacientes que presentaban p53 en estado salvaje. Estos resultados podrían explicar el efecto dual que se ha descrito en bibliografía para Sirt1 en cáncer.

Los ritmos circadianos presentan cierta jerarquía en cuanto a su organización y mantenimiento. Se encuentran regulados tanto a nivel del sistema nervioso central como a través de otros mecanismos, entre los que se encuentran SIRT1 (Gonfloni et al., 2014; Kleszcz et al., 2015; Yin et al., 2023) y p53 que lo hacen de manera conjunta (Asher et al., 2008; Miki et al., 2013; Nakahata et al., 2008; Ray et al., 2020). SIRT1 es capaz de unirse al complejo BMAL1/CLOCK por lo que afecta a otros genes como *Per*. A nivel periférico es responsable de desacetilarse *Per2* (Asher et al., 2008), además la actividad de CLOCK se encuentra balanceada por los niveles de NAD⁺ (Nakahata et al., 2009b).

De hecho, en este trabajo se observó una correlación entre la expresión de *Per1* y *Per3* con la expresión de SIRT1 en los tumores que presentaban p53 en estado salvaje y mutado, respectivamente.

La regulación de los ritmos circadianos es esencial para el mantenimiento de la homeostasis celular. Teniendo en cuenta la capacidad de regular los ritmos por parte de SIRT1, lo convierte en una potencial diana para el tratamiento del cáncer. Esto podría llevarse a cabo a partir del uso de inhibidores de SIRT1, como es el caso de la melatonina.

En este trabajo se utilizaron dos líneas celulares estables de adenocarcinoma humano con diferente estado de p53 (p53 salvaje y p53 nulo) sobre las que se comprobó el efecto del tratamiento con melatonina.

La melatonina indujo la inhibición del crecimiento celular tanto en los modelos *in vivo* como *in vitro* utilizados. Además, desencadenó la parada del ciclo celular. Sin embargo, no incrementó los niveles de apoptosis tal y como se esperaba. Estos efectos solamente se observaron en presencia de p53 de tipo salvaje. La activación de p53 es crítica para el desarrollo del efecto oncostático de la melatonina, lo que favorece la acumulación de p53 a nivel celular (Santoro et al., 2012). Sin embargo, la expresión de la proteína aumenta transitoriamente, mostrando un máximo a las tres horas después del tratamiento de las células con melatonina (Santoro et al., 2012). La inhibición del crecimiento tumoral después del tratamiento se relaciona con la inhibición de la progresión celular desde la fase G0/G1 a la fase S, un efecto dependiente del estado de p53 ya que la melatonina induce la activación de p53 y p21. El incremento del porcentaje de apoptosis observado después del tratamiento con esta indolamina podría deberse al bloqueo de la vía Akt/MDM2, un efecto que ya se había observado en modelos celulares de estómago (Song et al., 2018). El incremento de la apoptosis y el parada del ciclo celular debería desencadenar la activación de la vía de la Caspasa-3 tal y como se describe en células de hepatocarcinoma (Samec et al., 2021). Teniendo en cuenta todo lo anterior, cabría esperar que en el modelo celular utilizado en este trabajo se observase un incremento de la expresión de la Caspasa-3 después del tratamiento con melatonina, aunque este aumento no se ha producido lo que podría deberse al bajo aumento del porcentaje de apoptosis obtenido.

La señalización intracelular de la melatonina a través de sus receptores puede verse afectada por el estado de p53. Se ha descrito que la expresión de los receptores de membrana (MT1 y MT2) de la melatonina disminuye en pacientes con CCR (León, Casado, Carazo, Sanjuán, Maté, Muñoz de Rueda, et al., 2012). Esta disminución ocurre principalmente en aquellos pacientes que presentan mutaciones en el gen p53 (Casado et al., 2017b), aunque no se producen cambios en la expresión de los niveles de melatonina y del receptor nuclear (ROR α) (León, Casado, Carazo, Sanjuán, Maté, Muñoz de Rueda, et al., 2012). Por otro lado, numerosos trabajos previos han mostrado la implicación de los receptores de melatonina en los efectos oncostáticos que tienen lugar en el transcurso de esta enfermedad (Karasek et al., 2002; Winczyk et al., 2009b). Esto podría indicar que

agonistas no selectivos para MT1 y MT2 con una mayor afinidad por estos receptores que la propia melatonina podrían ser interesantes para el tratamiento de CCR (León, Casado, Carazo, Sanjuán, Maté, Muñoz de Rueda, et al., 2012).

En línea con estos datos se propuso estudiar el papel de la agomelatina, agonista no selectivo para los receptores MT1 y MT2 con mayor afinidad por ellos que la propia melatonina (Z. Liu et al., 2017), como tratamiento para el CCR. Por otra parte, la agomelatina es un antagonista de los receptores HT-2c y HT-2b de la serotonina. La implicación de la serotonina en procesos de crecimiento tumoral, diferenciación y expresión genética es ampliamente conocida. De hecho, sus efectos mitogénicos han sido demostrados en varios tipos de cáncer, entre los que se incluye el cáncer de próstata, vejiga, pecho y colon (Siddiqui et al., 2006). En el caso concreto del cáncer de colon se ha descrito que los inhibidores selectivos de la recaptación de la serotonina (SSRIs), los cuales incrementan su concentración en terminales nerviosos centrales y periféricos, presentan un efecto preventivo (Pantaleo et al., 2006).

De igual manera que en el caso del tratamiento con la melatonina, se comprobó la eficacia del tratamiento a nivel de viabilidad, apoptosis o ciclo celular, entre otros, utilizando para ello las dos mismas líneas celulares con el fin de comparar el efecto de dicho fármaco en función del estado del gen.

La agomelatina inhibió el crecimiento celular en los modelos *in vivo* e *in vitro* de esta enfermedad utilizados. También indujo parada del ciclo y muerte celular mediante apoptosis dependiente de caspasas. El efecto de la agomelatina observado fue independiente del estado de p53, aunque la reducción del crecimiento celular fue más eficaz en el modelo *in vitro* inoculado con células con p53 en estado salvaje.

La agomelatina fue más potente que la melatonina, al menos en los modelos *in vivo* e *in vitro* que presentaban el represor tumoral p53 en estado salvaje. En este caso, la agomelatina indujo un leve incremento de la expresión de la proteína P53 al punto de tiempo analizado. Además, inhibió de manera más potente el crecimiento celular en el modelo *in vitro* que presentaba p53 no activo. Tal y como se describe anteriormente y a diferencia de lo observado tras el tratamiento con la melatonina, la agomelatina inhibió el crecimiento celular *in vivo* cuando p53 no era funcional, indicando que otros mecanismos de regulación de p53 podrían estar implicados en su mecanismo de acción, al menos bajo estas condiciones. Se propuso que estos efectos desencadenados por la agomelatina se producían a

través de la regulación de la ritmicidad de varios genes del reloj circadiano principal.

La eficacia antitumoral del 5-FU se debe a su capacidad para inducir parada del ciclo celular y apoptosis dependiente del estado de p53 (Sun et al., 2007). De manera similar a la melatonina, diferentes líneas de investigación han demostrado que este agente quimioterápico disminuye la capacidad para inhibir el crecimiento celular en CCR con p53 mutado o inactivo (Bunz et al., 1999). En este estudio, se utilizó el tratamiento con 5-FU como control para el modelo *in vivo* en el que se generaron tumores con ausencia de p53, donde solamente la agomelatina fue capaz de reducir el crecimiento tumoral. Aunque los efectos secundarios encontrados a nivel sistémico fueron similares para los tres tratamientos, el tratamiento con 5-FU indujo un gran incremento la actividad de la AST. A nivel metabólico, la melatonina produjo un incremento en los niveles de glucosa y de alanina aminotransferasa, probablemente debido al papel que desempeña la melatonina en procesos como la glicogénesis o la glicólisis (Samec et al., 2021).

Una actividad aberrante por parte de p53, da lugar a una subpoblación celular que a pesar de contar con una gran cantidad de mutaciones continúa su división y crecimiento. Estas células tienen una gran probabilidad de transformarse en CMCs, cuya plasticidad celular permite la transición epitelio-mesénquima (TEM) (Eun et al., 2017). El crecimiento y la supervivencia de las CMCs se relaciona con la capacidad para el desarrollo de resistencias a los tratamientos (Eun et al., 2017; Najafi et al., 2019).

En ocasiones los tumores residuales cuentan con una gran cantidad de CMCs que son esenciales en las recidivas, ya que se encuentran en un estado de quiescencia (Najafi et al., 2019). Se ha descrito una relación entre la cantidad de CMCs, el pronóstico y la agresividad tumoral (Angelis et al., 2016; Najafi et al., 2019; Vaiopoulos et al., 2012; Yh et al., 2020). De hecho, un incremento del fenotipo *stem* conlleva un aumento de la agresividad tumoral y un peor pronóstico (Solomon et al., 2018; Yh et al., 2020).

La gran variabilidad fenotípica de las CMCs hace que sea complicada su identificación y erradicación (Batlle & Clevers, 2017b). Por ello, la caracterización de este tipo celular se llevó a cabo por varios métodos. Uno de ellos fue a partir de la cantidad de células que presentaban actividad de la enzima ALDH1. Se ha descrito que la actividad de esta enzima es específica de tejido y que de manera general un incremento de su expresión se correlaciona con una peor prognosis.

Se está estudiando su papel como posible diana terapéutica en algunos tipos de cáncer entre los que se encuentra el CCR (Tomita et al., 2016). En este trabajo se observó que el modelo *in vitro* con p53 activo presentaba una mayor actividad de esta enzima.

Las células madre del colon se caracterizan por la expresión de ciertos marcadores que permiten su detección y por lo tanto que estas células puedan utilizarse como posible diana de los tratamientos (Y.-S. Ma et al., 2020). Con el fin de caracterizar las células en cuanto a su fenotipo de CMCs se realizó el estudio de la expresión de los marcadores de membrana CD44, CD326 y CD133 en el modelo con p53 activo y de CD44 y CD326 en el caso de p53 nulo. Una mayor expresión de los marcadores CD44 y CD133 se ha relacionado con una peor prognosis en una gran variedad de tipos tumorales (Abdou Hassan et al., 2022). Además, la expresión de CD326 se ha descrito como un posible marcador de pronóstico tumoral (Gires et al., 2020). Debido a que las células con p53 nulo no presentan expresión de CD133, no fue posible determinar la función de p53 en cuanto a la expresión de estos marcadores.

Otra característica de las CMCs es su alta capacidad de autorrenovación (Angelis et al., 2016), lo que puede determinarse a partir de su capacidad para formar esferoides (Reidy et al., 2021). En este trabajo se observó que la ausencia de actividad por parte de p53 incrementó dicha capacidad, lo que hace que este tipo celular desencadene una peor prognosis. Estos resultados coinciden con el gran porcentaje de pacientes de CCR que presentan p53 mutado o inactivo (Malki et al., 2020; Mármol et al., 2017)

El tratamiento con melatonina disminuyó la cantidad de células con una elevada actividad ALDH1 positiva independientemente del estado de p53. Además, se produjo un descenso de la población doble positiva CD44/CD326 con p53 nulo. Todo esto proporciona una menor capacidad de progresión tumoral tal y como se ha descrito para otros tipos tumorales como el cáncer de mama (Maroufi et al., 2020). Lo que se corresponde con una menor capacidad de autorrenovación en el modelo *in vivo* con p53 activo.

Por su parte la agomelatina presentó un efecto diferente sobre el fenotipo *stem* en función del ensayo utilizado, incrementó la población ALDH1 en el modelo *in vivo* con p53 en estado salvaje, a la vez que disminuyó el porcentaje de la población triple positiva CD44/CD326/CD44. Sin embargo, la capacidad de autorrenovación fue inferior en ambas líneas celulares, lo que se relaciona con una menor progresión tumoral (Li et al., 2015; Najafi et al., 2019).

Debido al importante papel que desempeñan los ritmos circadianos en cuanto a la proliferación y desarrollo tumoral (Robinson & Reddy, 2014), en este estudio se analizó el uso de la agomelatina y la melatonina como reguladores de los mismos.

En el modelo *in vitro* utilizado en este estudio, se ha observado la resincronización de los ritmos circadianos por parte de la agomelatina y la melatonina. Ambos fármacos regulan Per1, Per2, Per3, Cry1 y Clock en células que presentan p53 en estado salvaje. El cambio inducido en los parámetros de ritmicidad analizados (amplitud, acrofase y MESOR) fueron muy elevados después del tratamiento con agomelatina. En estas células, la agomelatina también fue capaz de regular la expresión de Bmal1 y Nr1d2.

El silenciamiento de p53 indujo la pérdida de la efectividad de ambos fármacos, aunque la agomelatina presentó un efecto más potente que la melatonina. Además, en este tipo celular, también se observó un descenso en el número de genes del reloj circadiano regulados por ambos fármacos, lo que muestra la influencia que presenta el reloj circadiano en el efecto antiproliferativo de estos tratamientos. Estudios previos muestran que la melatonina regula el reloj circadiano después de la activación de los receptores MT1 y MT2 a nivel central (J. Liu et al., 2016) y en el proceso tumoral (Hill et al., 2015). Por su parte la agomelatina actúa a nivel del sistema nervioso central de manera complementaria y posiblemente sinérgica sobre los receptores MT1 y MT2 de la melatonina y el receptor HT2c de la serotonina con el fin de resincronizar los ritmos (de Bodinat et al., 2010; Tardito et al., 2012). La agomelatina presenta una mayor efectividad que la melatonina cuando se utiliza como tratamiento para el insomnio, la depresión o la obesidad asociada (Diez-Echave et al., 2022; H. K. Kim & Yang, 2022; Z. Liu et al., 2017). Además, la agomelatina tiene una vida media más larga y mejor capacidad de absorción por vía oral (Kast, 2015). Todo esto podría explicar el gran efecto observado tras el tratamiento con la agomelatina.

Las Peroxirredoxinas son una familia de enzimas altamente conservadas implicadas en la regulación de los niveles de peróxido (Edgar et al., 2012). El estado de oxidación-reducción de la PRX1 presenta una oscilación propia en ausencia de los mecanismos de los ciclos retroalimentados de transcripción-traslación. Además, la baja expresión de la proteína PRX1 afecta a los ritmos circadianos en células nucleadas, indicando que el ciclo de oxidación-reducción

de la PRX1 está interconectado con el ciclo principal del reloj circadiano (Ray et al., 2020).

De hecho, en este trabajo, se ha observado que la agomelatina y la melatonina pueden regular la ritmicidad de SIRT1, independientemente de p53. Sin embargo, cada tratamiento modifica un parámetro diferente de la ritmicidad de SIRT1. Curiosamente, solo la agomelatina fue capaz de regular la oscilación de PRX1 en ambos tipos celulares, mientras que la melatonina únicamente afectó a las células que presentaban p53 en estado salvaje.

La capacidad antioxidante de la melatonina influye sobre la regulación de la expresión y la actividad de la PRX1 (Torres et al., 2022), aunque no hay datos disponibles que muestren el papel de p53 en el mecanismo de acción de la melatonina.

A partir de los resultados obtenidos hasta el momento parece que una posible vía de regulación de los ritmos tendría lugar a través del eje Sirt1/Prx1. Teniendo en cuenta la gran cantidad de sustratos descritos para Sirt1 entre los que se encuentran componentes de señalización celular, moduladores de la reparación del ADN o reguladores del metabolismo, entre los que se incluyen genes del reloj circadiano (Gonfloni et al., 2014; Yin et al., 2023), lo que le permite la adaptación en situaciones de estrés celular (Jung et al., 2013) manteniendo el control de la homeostasis redox a nivel celular (Kleszcz et al., 2015). Se planteó comprobar el papel de Sirt1 en cuanto a la viabilidad celular, apoptosis, fenotipo de CMC y regulación de los ritmos circadianos en función de su estado y del estado de p53.

Los efectos observados en los distintos parámetros de estudio tras el silenciamiento de Sirt1 fueron en gran medida dependientes del estado de p53.

El silenciamiento de Sirt1 en la línea celular con p53 en estado salvaje incrementó el número de células quiescentes (fase G0/G1) lo que se relaciona con una mayor probabilidad de recidiva tumoral (Aguirre-Ghiso, 2007). Lo que se corresponde con el descenso de la población triple positiva de los marcadores de CMCs estudiados y la menor capacidad de renovación de estas células. Además, también concuerda con los resultados obtenidos en el modelo *in vivo* donde los animales inoculados con este tipo celular generaron tumores de menor volumen independientemente de si se trataba exclusivamente de CMCs o no.

Por su parte, al estudiar el efecto del silenciamiento de Sirt1 en ausencia de p53 se observó una mayor proliferación celular, lo que podría estar asociado a un incremento en la progresión tumoral (Yin et al., 2023). Lo cual se ve apoyado con

un incremento de las células en la fase S y un descenso en la apoptosis. Se observa un incremento de la expresión de LC3B y un descenso de p62, lo que indica que se produce la activación de la vía de la autofagia (W. J. Liu et al., 2016). Lo que implica que este proceso no se encuentra mediado por Sirt1, tal y como se ha descrito en estudios previos (L. Wang et al., 2021). El hecho de no haber observado expresión de FoxO1A en estas condiciones, hace pensar que en este caso el proceso es mediado a través de otro miembro de la familia FoxO, proteínas muy relacionadas con el desarrollo tumoral (Y. Zhang et al., 2011).

Además, se observó que en modelo *in vitro* las células presentaron una mayor capacidad de autorrenovación y una mayor actividad ALDH1 lo que hace que presenten una mayor agresividad a nivel tumoral (Tomita et al., 2016). Estos mismos resultados se observaron en el modelo *in vivo* donde las células CMCs presentaron mayor capacidad para la formación de tumores.

En cuanto al papel de Sirt1 en la regulación de los ritmos circadianos, se observó como el silenciamiento de este modificó los parámetros de ritmicidad en todos los genes estudiados (Clock, Per2 y Prx1). En presencia de p53 se produjo un adelanto de la acrofase de todos ellos, además de un incremento de la amplitud en los genes Per2 y Prx1. Sin embargo, en ausencia de p53 se observó un adelanto de la acrofase en Clock y Prx1 y un retraso en el caso de Per2. Además de un incremento de la amplitud de los genes Per2 y Prx1.

Dado que se ha observado como la agomelatina y la melatonina son capaces de regular la ritmicidad de Sirt1, se quiso determinar el papel que tenía Sirt1 en la efectividad de los tratamientos con agomelatina o melatonina.

El tratamiento con melatonina disminuyó la viabilidad celular tras el silenciamiento de Sirt1 en ambas líneas celulares siendo más efectivo en presencia de p53. Este efecto se observó tanto en los modelos 2D como 3D. El uso de cultivos en 3D permite estudiar en detalle el efecto de los tratamientos, ya que las células presentan una mayor variabilidad a nivel fenotípico y las condiciones son más similares a las que se producen durante el desarrollo tumoral (Reidy et al., 2021). Este mismo efecto se observó en el modelo *in vitro* utilizado. Esta menor viabilidad fue acompañada de un ligero incremento en la apoptosis celular independiente del estado de p53 y la activación de la vía de la autofagia únicamente en presencia de p53 activo. Produjo un incremento de células quiescentes en ausencia de p53 activo, lo que puede relacionarse con una mayor capacidad de recidiva (Aguirre-Ghiso, 2007). Sirt1 es responsable de controlar el proceso de apoptosis y parada de ciclo celular mediados por p53 (Yin et al., 2023).

En cuanto a la ritmicidad tras el tratamiento con melatonina se observaron cambios en todos los parámetros estudiados de *Per2* y una disminución de la amplitud de la *Prx1* en ausencia de *p53*. En el modelo *in vivo* con *p53* en estado salvaje solamente se observaron cambios en *Clock*, donde se produjo una disminución de la amplitud y del MESOR.

El tratamiento con agomelatina inhibió el crecimiento celular en ambas líneas celulares y en el modelo *in vivo* utilizado. Este efecto fue inferior al observado en presencia de *Sirt1* e independiente del estado de *p53*. Incrementó el número de células quiescentes en presencia de *p53*, lo que cambió a una parada en fase S y G2 cuando *p53* no se encontraba presente. La acumulación de células en estas fases podría relacionarse con una activación de la vía de senescencia, proceso en el que se encuentran implicados tanto *Sirt1* como *p53* (Chen et al., 2020).

Otro efecto observado tras el tratamiento con agomelatina, fue un incremento del porcentaje de células apoptóticas. Se ha descrito que un aumento de la apoptosis, junto con un incremento en la expresión de *FoxO1A* y *LC3B* y un descenso de la quiescencia celular, se relaciona con el proceso de autofagia (Y. Zhang et al., 2011). Todos estos efectos se observan tras el tratamiento con agomelatina en el modelo *in vitro*, por lo que este tratamiento activa esta vía de muerte celular. Además, origina un descenso del volumen tumoral en el modelo *in vivo*. En cuanto al efecto sobre el fenotipo *stem* solamente teniendo en cuenta los marcadores de superficie la agomelatina incrementó este fenotipo indistintamente del estado de *p53*. En cuanto al fenotipo *stem* de las células residuales tras el tratamiento se observó como la agomelatina incrementó este fenotipo, teniendo en cuenta la actividad aldefluor 1 positiva que presentaron, lo que además se corresponde con un incremento del porcentaje de células doble positivas *CD44/CD326* en el caso del silenciamiento de *Sirt1* y la ausencia de *p53*.

Otra manera de determinar el fenotipo *stem* es en función de la auto renovación, ya que se considera una característica propia de esta subpoblación celular (Munro et al., 2018; Najafi et al., 2019). En este trabajo se comprobó que las células con *p53* inactivo y *Sirt1* silenciado generan un mayor número de esferas, efecto que se ve incrementado tras el tratamiento con agomelatina. Este resultado junto con la mayor capacidad de migración que presentan estas células tras el tratamiento con agomelatina, reafirman su malignidad y capacidad de recidiva tumoral (Saif & Chu, 2010). Los ensayos de clonogénicos permiten estudiar la capacidad de proliferación, autorrenovación o incluso de recidiva tumoral (Adan et al., 2016; Brix et al., 2021). En este trabajo se ha comprobado

cómo el número de colonias formadas no se vio modificado en ninguno de los casos ni tratamientos, pero si el tamaño de dichas colonias, que presentaron una menor área después de cualquiera de los 2 tratamientos.

Además, en el ensayo de clonogénicos realizado se observó como el tratamiento con agomelatina disminuyó el tamaño de las colonias formadas, lo que permite una mayor diseminación celular que desencadenará un proceso metastásico (Saif & Chu, 2010).

En cuanto al estudio de la ritmicidad la agomelatina indujo diferencias en la ritmicidad de todos los genes estudiados. En el caso de Clock produjo un adelanto de la acrofase y un descenso del MESOR. Se produjo un adelanto de la acrofase y un incremento de la amplitud en el caso de Per2 en el modelo *in vivo* con p53 en estado salvaje, mientras que se disminuyó en ausencia de p53. Por último, se observó una disminución de la amplitud de Prx1 en presencia de p53 y un aumento del MESOR. Lo que podría indicar que la regulación de la Prx1 por parte de la agomelatina se lleva cabo a través de la regulación de los ritmos

Estudios recientes han demostrado que el uso de algunos tratamientos frente a la depresión también ejerce un efecto anti tumoral, lo cual es debido a la modificación del microambiente tumoral o a la alteración de la respuesta inmune desencadenada. Esto ocurre en el caso del CCR, donde el uso de la fluoxetina inhibe la actividad transcripcional de NF-kappa y la proliferación celular (Stopper et al., 2014). Además, en general, el uso de este tipo de fármacos no presenta una gran cantidad de efectos secundarios en el organismo (Zheng et al., 2013).

También hay que tener en cuenta que el tratamiento con fármacos antidepresivos después de un diagnóstico de cáncer es bastante frecuente, por lo tanto, si es posible llevar a cabo ambos tratamientos con el mismo fármaco, como es el caso de la agomelatina, desencadenará un beneficio doble. Además, la presencia del represor tumoral p53 no funcional ha desencadenado la resistencia de los pacientes con CCR al 5-FU (Bunz et al., 1999). Por lo que el uso de la agomelatina como tratamiento, que actúa con una efectividad similar independientemente del estado de p53, al menos en el modelo *in vivo* utilizado este estudio, podría suplir la falta de efectividad del 5-FU.

CONCLUSIONES

1. SIRT1 podría utilizarse como biomarcador de pronosis en pacientes con Cáncer Colorrectal, teniendo siempre en cuenta el estado que presente el represor tumoral p53.
2. El estado de p53 en las células tumorales es fundamental para determinar el papel de SIRT1 en el desarrollo tumoral, y poder describirlo como un agente oncogénico u oncostático.
3. La expresión de Sirt1 se correlaciona con la expresión de diferentes genes del reloj circadiano principal, las diferencias son dependientes del estado de p53.
4. La melatonina es capaz de ejercer efectos citotóxicos y de mantener la ritmicidad celular siempre que p53 se encuentre en estado salvaje. Lo que supone grandes limitaciones en cuanto a su uso como tratamiento.
5. El uso de la agomelatina como nueva estrategia terapéutica frente al CCR podría aplicarse a pacientes independientemente del estado de p53 que presenten, ya que ha demostrado mayor efectividad que la melatonina y el 5-FU.
6. La melatonina y la agomelatina son capaces de resincronizar los ritmos de los genes del ciclo principal del reloj circadiano en presencia de p53, por lo que podrían ser fundamentales para el tratamiento del CCR. Lo que se debe a la relación existente entre el proceso de desarrollo tumoral y homeostasis celular y los ritmos circadianos.
7. Los efectos inducidos por la agomelatina sobre los parámetros de ritmicidad son mucho más bruscos que los observados por la melatonina, lo que corrobora la influencia de los ritmos circadianos sobre el efecto antiproliferativo.
8. Las modificaciones de los parámetros de ritmicidad por los tratamientos no presenta efectos dosis-dependientes (al menos a las 2 dosis estudiadas).
9. El uso de la agomelatina como tratamiento tumoral supondría un doble beneficio por su ya probada efectividad como tratamiento antidepresivo, este efecto lo lleva a cabo a partir de la regulación de los ritmos, en concreto mediante la regulación de la PRX1.
10. El tratamiento con melatonina modifica el fenotipo *stem* de las células hacia uno menos agresivo siempre que p53 se encuentre en estado salvaje; mientras que el tratamiento con agomelatina lo modifica hacia un estado más agresivo cuando p53 se encuentra inactivo.

11. La ausencia de Sirt1 modifica la distribución de las células en el ciclo celular de manera dependiente de p53, lo que implica un incremento de la quiescencia o de la senescencia.
12. El efecto citotóxico de los tratamientos con melatonina y agomelatina son dependientes del estado de Sirt1, mostrando una mayor eficacia cuando este se encuentra presente.
13. El tratamiento con melatonina sobre el modelo *in vivo* es dependiente de la presencia de Sirt1 siempre que p53 se encuentre en estado salvaje, sin embargo, la agomelatina origina el mismo efecto independientemente del estado de Sirt1 y/o p53.
14. La agomelatina incrementa el fenotipo *stem* de las células con Sirt1 silenciado y p53 inactivo.
15. El mantenimiento de la ritmicidad de los distintos genes del reloj circadiano por parte de la agomelatina es dependiente del estado de SIRT1 y p53.
16. El papel dual de SIRT1 es dependiente del estado de p53 y actúa a través de la regulación de los ritmos circadianos.
17. Es necesaria la implementación de la medicina personalizada, basando el tratamiento en las características propias del tumor y del paciente, con el fin de seleccionar el tratamiento con mayor efectividad y menor cantidad de efectos secundarios.

ANEXOS

ANEXO 1: MATERIALES Y MÉTODOS

1. GELES DE POLIACRILAMIDA

El porcentaje del gel de poliacrilamida puede ser mayor o menor (**Tabla A1**) en función del tamaño de la proteína de estudio (**Tabla A2**).

Tabla A1. Receta para la preparación de geles de poliacrilamida

	<i>Gel Stacking</i>	<i>Gel Resolving</i>		
	5%	7.5%	10%	12%
Agua Mili-Q (ml)	3.1	5.5	4,9	4
40% Acrilamida, 29:1 * (ml)	0.6	1,9	2,5	3
1.5M Tris HCl pH 8.8 (ml)		2.5	2.5	2.5
10% SDS (μl)	50	100	100	100
10% Persulfato de amonio (APS) (μl)	50	100	100	100
TEMED * (μl)	10	20	20	20
1.5M Tris HCl pH 6.8 (ml)	1.25			

* Bio-Rad Laboratories Hercules, CA, EEUU

Tabla A 2. Porcentaje de gel utilizado en función de la proteína de estudio

Proteína de estudio	Porcentaje de gel
SIRT1	7.5 %
P53	10 %
Caspasa 3	12%
β-actina	7.5 / 10 %
B-tubulina	7.5 /10 / 12 %
SQTM1/p62	12 %
LC3B	12 %
FoxO1a	7.5%

2. CONFIGURACIÓN DEL CITÓMETRO

En los ensayos en los que se utilizó la citometría se utilizó el citómetro de flujo FACS Aria IIIu, cuya configuración en cuanto a láser y filtros se recoge en la **Tabla A3**.

Tabla A 3. Configuración del citómetro FACS Aria IIIu utilizado para el desarrollo de los experimentos recogidos en este manuscrito.

FLUOROCROMO	LÁSER	FILTROS
AF421	Violeta 405nm	450/40
FITC/AF488	Blue 488nm	502LP 530/30
IP/PE-TexasRed	Yellow/Green 561 nm	600LP 610/20
PeCy7	Yellow/Green 561nm	735LP 780/60
PE	Yellow/Green 561 nm	582/15
APC	Rojo	660/20

ANEXO 2: Resultados capítulo 2

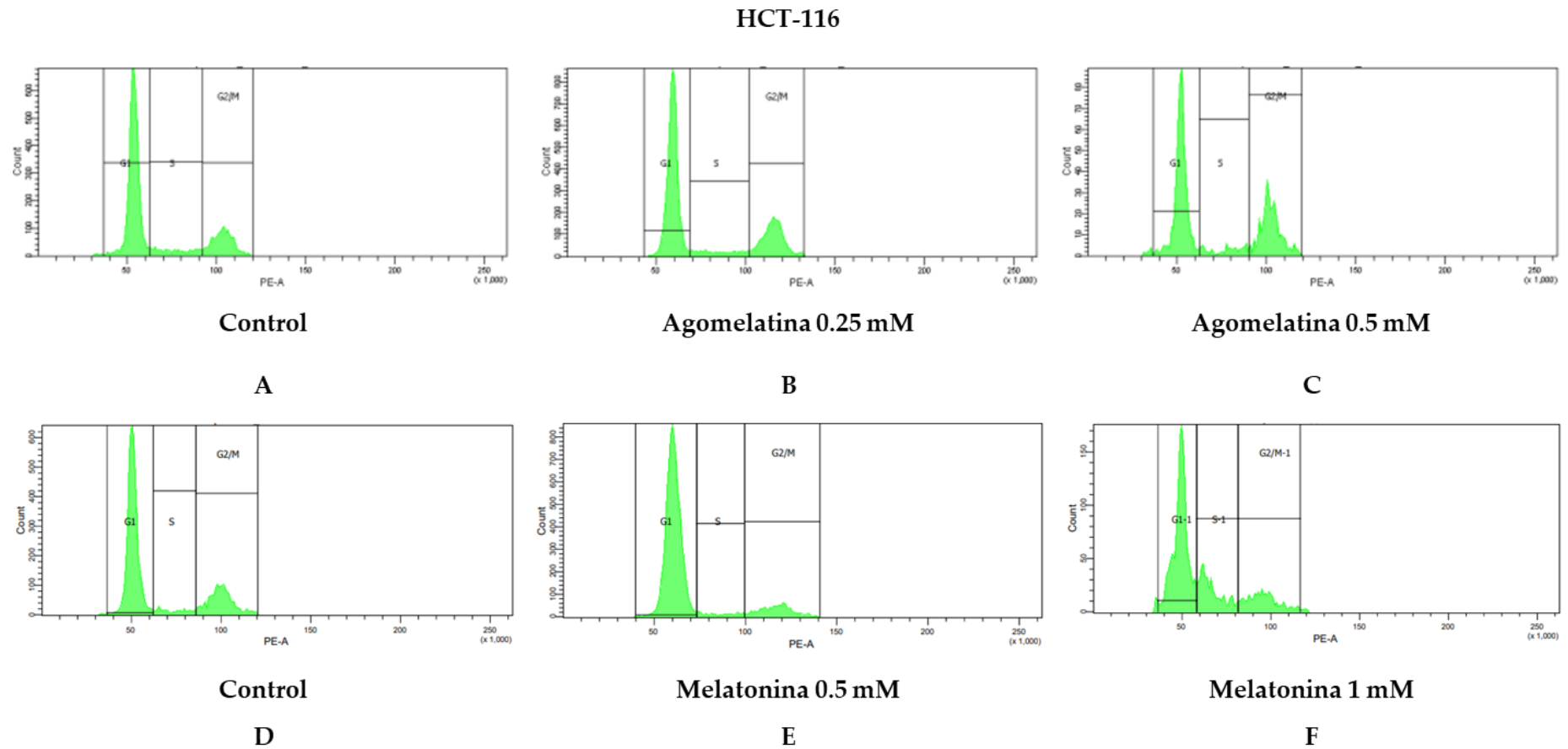


Figura A 1. Datos brutos del análisis del ciclo celular por Citometría de flujo en la línea celular HCT-116 en condiciones control (A y D) y después del tratamiento con agomelatina (B y C) o melatonina (E y F).

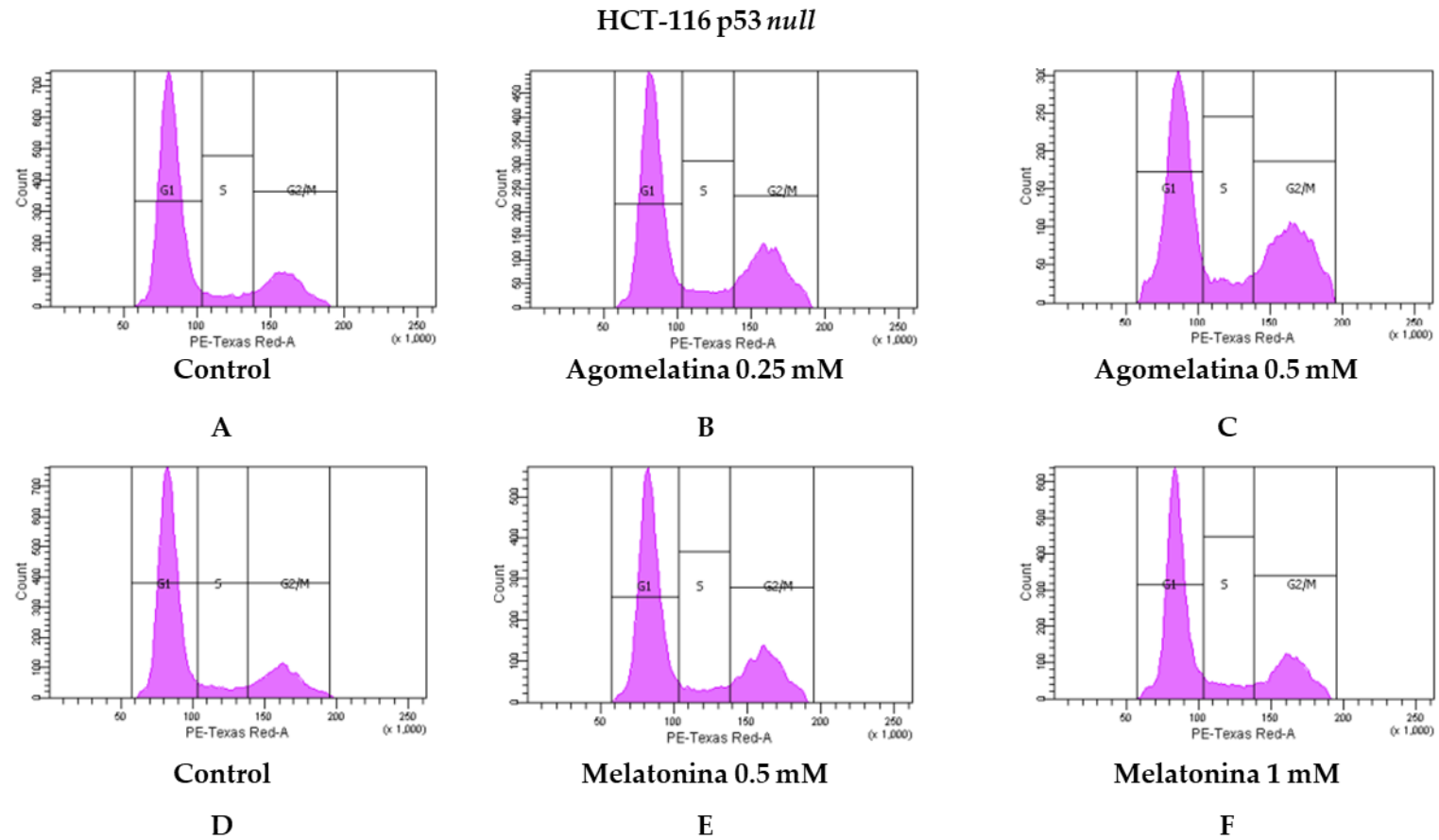


Figura A 2. Datos brutos del análisis del ciclo celular por citometría de flujo en la línea celular HCT-116 p53 *null* en condiciones control (A y D), y después de los tratamientos con agomelatina (B y C) o melatonina (E y F).

HCT-116

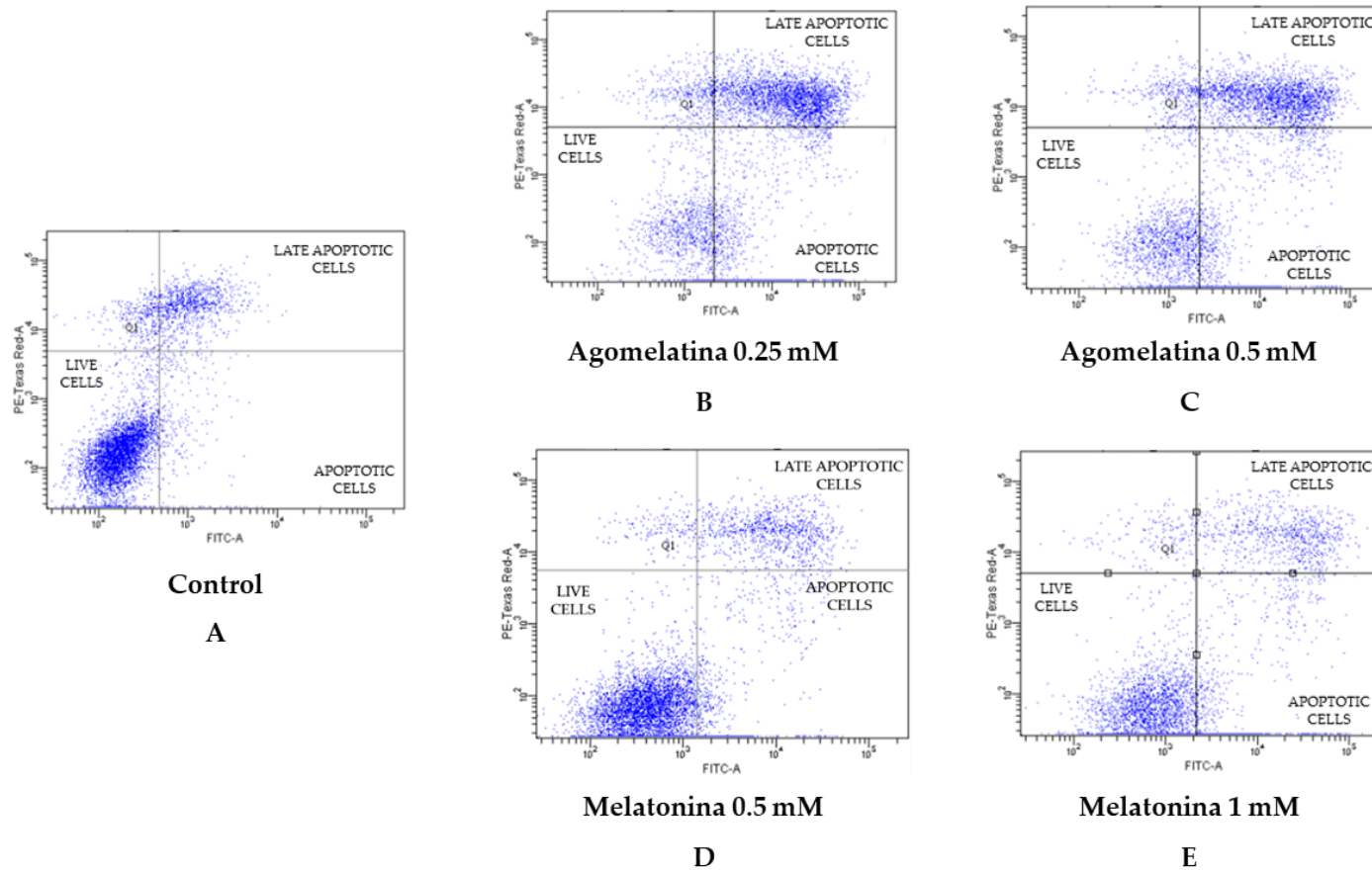


Figura A 3. Datos brutos del análisis de apoptosis por citometría de flujo en la línea celular HCT-116 en condiciones control (**A** y **D**), y después del tratamiento con agomelatina (**B** y **C**) o melatonina (**D** y **E**).

HCT-116 p53 null

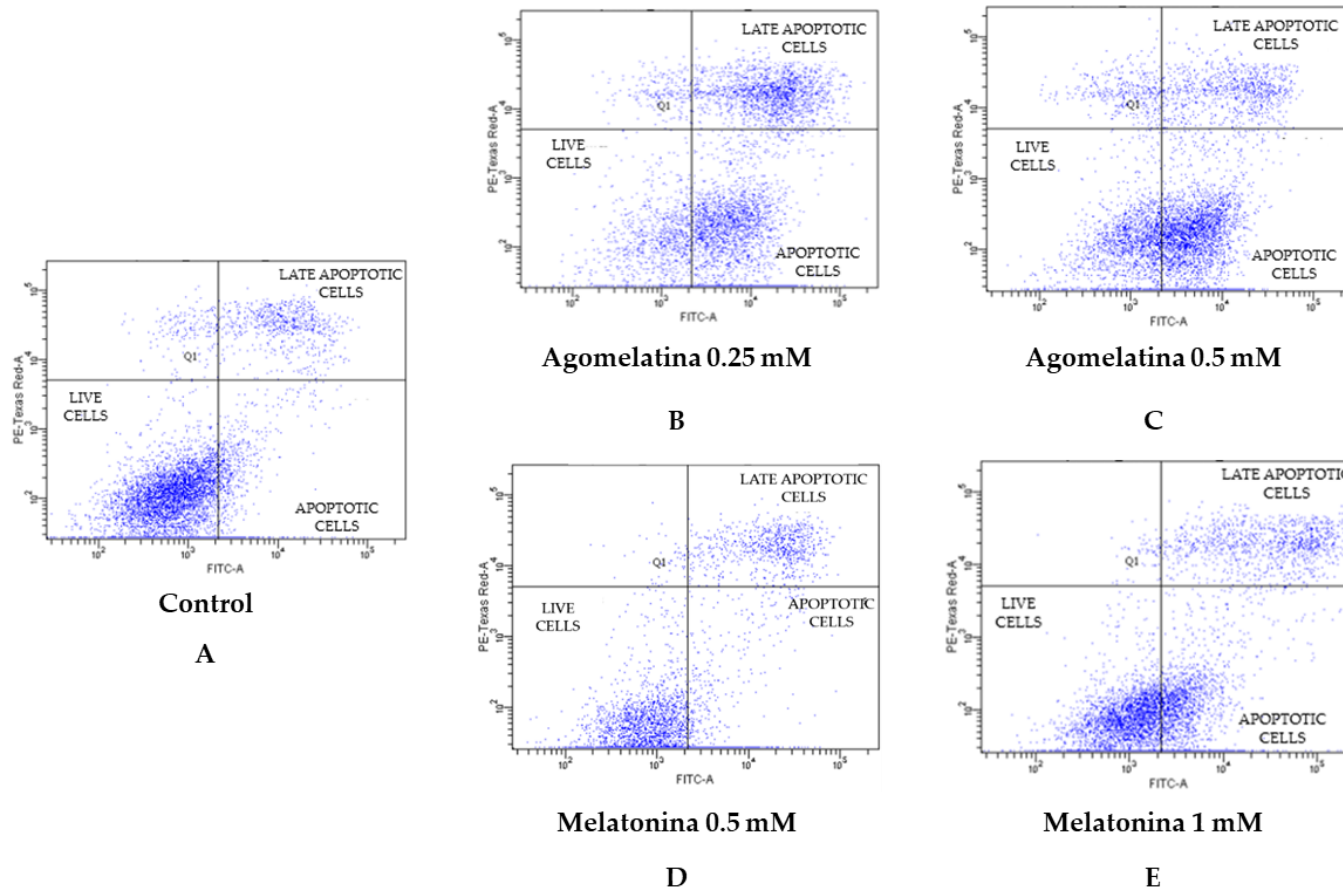
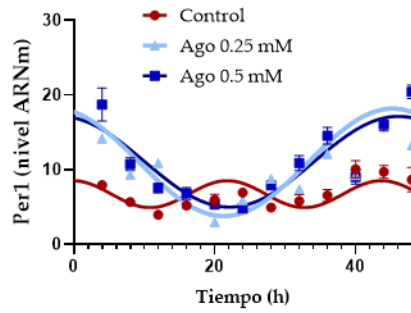


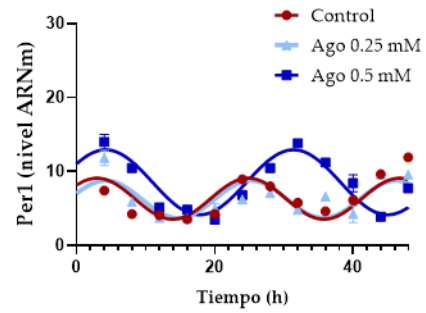
Figura A 4. Datos brutos del análisis de apoptosis por citometría de flujo en la línea celular HCT-116 p53 null en condiciones control (A) y después del tratamiento con agomelatina (B y C) o melatonina (D y E).

HCT-116

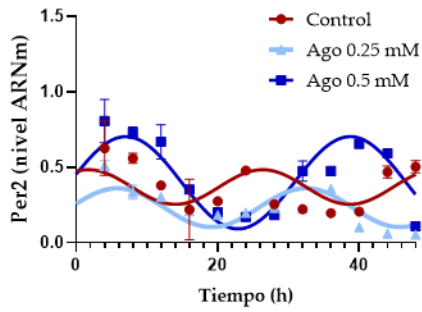


A

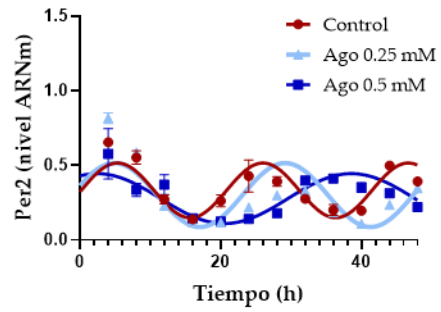
HCT-116 p53 null



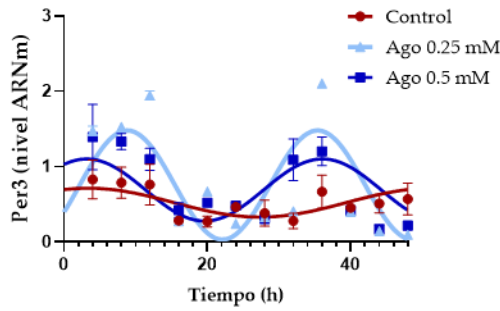
B



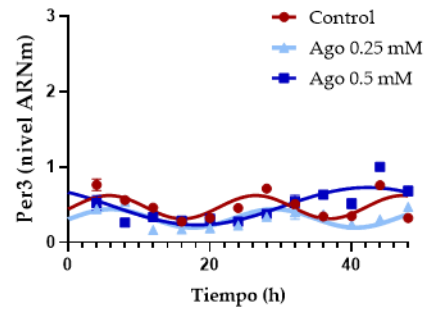
C



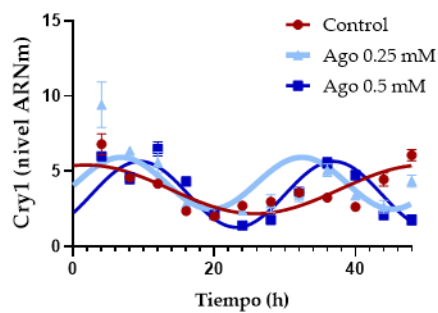
D



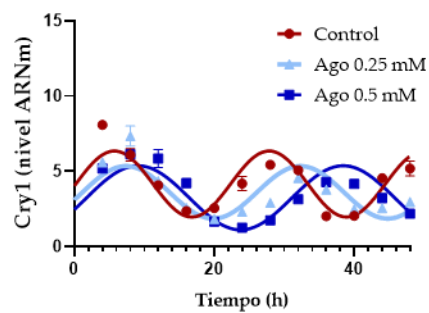
E



F



G



H

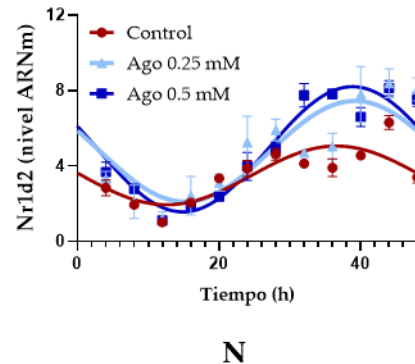
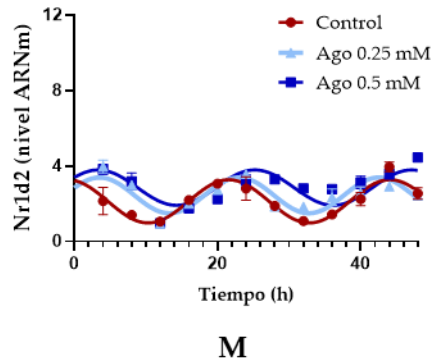
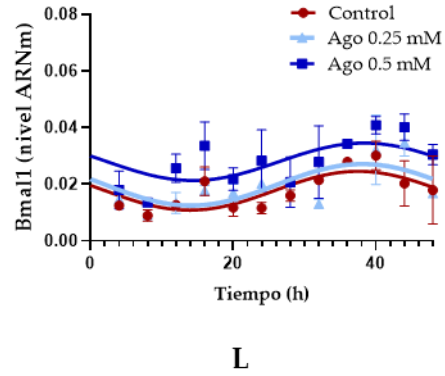
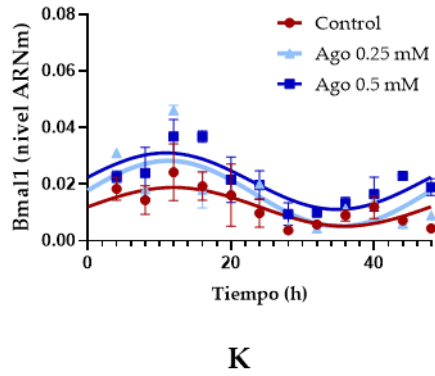
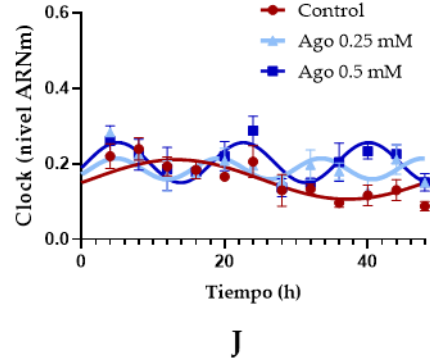
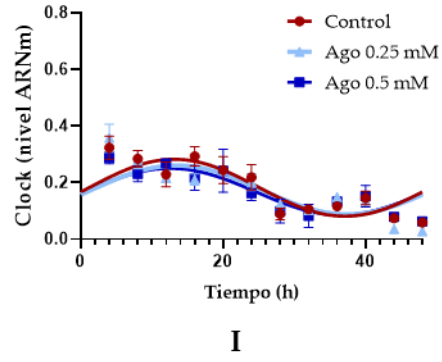


Figura A 5. Nivel de expresión del ARNm de los diferentes genes del reloj: Per1 (A y B), Per2 (C y D), Per3 (E y F), Cry1 (G y H), Clock (I y J), Bmal1 (K y L) y Nr1d2 (M y N) en las células HCT-116 (columna izquierda) y en las células HCT-116 p53 *null* (columna derecha) tras el tratamiento con agomelatina 0.25 o 0.5 mM.

Tabla A 4. Resultados del análisis cosinor de los genes del reloj tras el tratamiento con agomelatina 0.25 y 0.5 mM en la línea celular HCT-116.

Gen	Tratamiento	PR ¹	P-valor ²	Amplitud (A.U.) ³	Acrofase (h) ⁴	MESOR (A.U.) ³
Per1	Control	29.41	0.003	5.17 ± 1.45	3.06 ± 1.91	9.77 ± 0.99
	Ago 0.25	43.9	<0.0001	7.66 ± 1.51	44.29 ± 1.50***	10.40 ± 1.07
	Ago 0.5	42.85	<0.0001	6.06 ± 1.22	45.30 ± 1.53***	10.40 ± 0.86
Per2	Control	31.66	0.001	0.076 ± 0.018	22.76 ± 1.19	0.28 ± 0.01
	Ago 0.25	56.76	<0.0001	0.129 ± 0.019*	7.17 ± 0.89***	0.32 ± 0.02
	Ago 0.5	42.02	<0.0001	0.140 ± 0.003*	9.35 ± 0.08***,###	0.25 ± 0.02 [#]
Per3	Control	25.36	0.008	0.329 ± 0.098	7.47 ± 1.15	0.720 ± 0.070
	Ago 0.25	44.52	<0.0001	0.723 ± 0.138	8.84 ± 0.88	0.757 ± 0.101
	Ago 0.5	60.62	<0.0001	0.912 ± 0.135*	6.06 ± 0.68 [#]	0.939 ± 0.097
Cry1	Control	63.01	<0.0001	1.62 ± 0.21	1.79 ± 1.02	3.81 ± 0.15
	Ago 0.25	71.05	<0.0001	2.14 ± 0.24	9.05 ± 0.46***	3.37 ± 0.17
	Ago 0.5	73.64	<0.0001	2.19 ± 0.21	9.47 ± 0.48***	3.48 ± 0.16
Clock	Control	57.99	<0.0001	0.101 ± 0.015	13.14 ± 1.13	0.182 ± 0.010
	Ago 0.25	40.89	0.0002	0.086 ± 0.018	1.12 ± 0.13***	0.174 ± 0.013
	Ago 0.5	16.69	0.049	0.051 ± 0.019	11.76 ± 2.97###	0.159 ± 0.014
Bmal1	Control	61.01	<0.0001	0.008 ± 0.001	12.99 ± 1.06	0.013 ± 0.001
	Ago 0.25	41.76	<0.0001	0.016 ± 0.002**	11.31 ± 1.57	0.016 ± 0.001
	Ago 0.5	71.30	<0.0001	0.013 ± 0.001	10.47 ± 0.84	0.024 ± 0.001***,###
Nr1d2	Control	48.84	<0.0001	1.73 ± 0.32	12.19 ± 0.63	3.79 ± 0.22
	Ago 0.25	66.42	<0.0001	0.94 ± 0.12**	3.54 ± 0.38***	2.44 ± 0.08***
	Ago 0.5	55.56	<0.0001	0.94 ± 0.15**	3.31 ± 0.55***	2.86 ± 0.11***, [#]

PR¹: porcentaje de ritmicidad; P-valor²: amplitud del test. A.U.³: unidad arbitraria. h⁴: horas.

Comparación de los parámetros de ritmicidad en distintas condiciones llevada a cabo a partir de un estudio con un periodo de 48 horas. **P<0.01 vs Control; ***, P<0.001 vs Control; #, P<0.05 vs Ago 0.25 mM; [#]P<0.01 vs Ago 0.25 mM; ###P<0.001 vs Ago 0.25 mM.

Tabla A 5. Características del análisis cosinor de cada uno de los genes después del tratamiento con agomelatina 0.25 o 0.5 mM en la línea celular HCT-116 p53 null

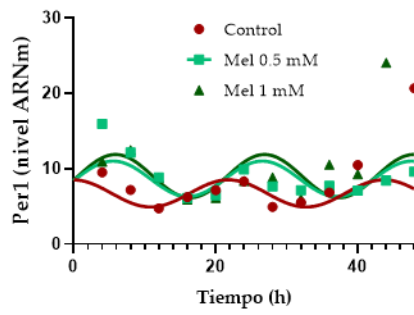
Gen	Tratamiento	PR ¹	P-valor ²	Amplitud (A.U.) ³	Acrofase (h) ⁴	MESOR (A.U.) ³
Per1	Control	47.47	0.0001	2.42 ± 0.45	4.01 ± 0.65	6.11 ± 0.32
	Ago 0.25	46.89	0.0001	2.39 ± 0.46	3.00 ± 0.69***	6.26 ± 0.33
	Ago 0.5	11.58	0.1313	2.54 ± 1.22	39.80 ± 3.67###	8.36 ± 0.86**,##
Per2	Control	61.90	<0.0001	0.223 ± 0.030	4.89 ± 0.48	0.341 ± 0.022
	Ago 0.25	56.62	<0.0001	0.214 ± 0.032	4.91 ± 0.13	0.301 ± 0.023
	Ago 0.5	44.57	0.0001	0.194 ± 0.039	1.29 ± 1.16***,###	0.298 ± 0.027
Per3	Control	40.65	0.0002	0.137 ± 0.029	6.02 ± 0.71	0.369 ± 0.021
	Ago 0.25	46.87	<0.0001	0.123 ± 0.022	6.11 ± 0.68	0.318 ± 0.016*
	Ago 0.5	65.87	<0.0001	0.206 ± 0.025*,#	42.48 ± 0.95***,###	0.372 ± 0.018#
Cry1	Control	78.47	<0.0001	2.19 ± 0.19	5.73 ± 0.34	4.16 ± 0.144
	Ago 0.25	64.94	<0.0001	1.74 ± 0.22	7.38 ± 0.52	3.61 ± 0.161**
	Ago 0.5	79.43	<0.0001	2.13 ± 0.17	9.11 ± 0.42*	3.25 ± 0.131***
Clock	Control	41.13	0.0002	0.050 ± 0.010	11.99 ± 1.59	0.157 ± 0.007
	Ago 0.25	17.83	0.0391	0.027 ± 0.010	4.83 ± 0.87	0.187 ± 0.008*
	Ago 0.5	33.01	0.0013	0.044 ± 0.011	4.57 ± 0.76	0.197 ± 0.008**
Bmal1	Control	58.43	<0.0001	0.018 ± 0.003	35.12 ± 1.09	0.024 ± 0.002
	Ago 0.25	35.91	0.0006	0.007 ± 0.002**	38.12 ± 1.78	0.019 ± 0.001*
	Ago 0.5	50.78	<0.0001	0.011 ± 0.002	39.95 ± 1.31	0.021 ± 0.001
Nr1d2	Control	45.84	<0.0001	1.41 ± 0.26	35.29 ± 1.44	3.25 ± 0.19
	Ago 0.25	62.38	<0.0001	2.69 ± 0.36**	39.88 ± 1.03**	4.66 ± 0.26***
	Ago 0.5	71.46	<0.0001	3.78 ± 0.42***,###	37.66 ± 0.84	5.54 ± 0.29***,#

PR¹: porcentaje de ritmicidad; P-valor²: amplitud del test. A.U.³: unidad arbitraria. h⁴: horas.

Comparación de los parámetros de ritmicidad en distintas condiciones llevada a cabo a partir de un estudio con un periodo de 48 horas. *P< 0.05 vs Control; **P<0.01 vs Control; ***P<0.001 vs Control; #

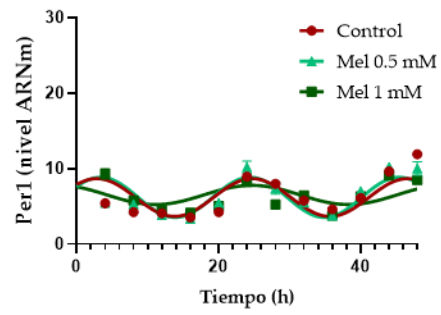
P<0.05 vs Ago 0.25 mM; **P<0.01 vs Ago 0.25 mM; ***P<0.001 vs Ago 0.25 mM.

HCT-116

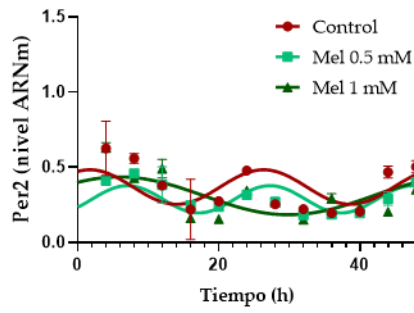


A

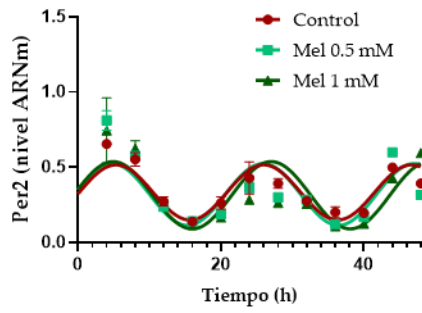
HCT-116 p53 null



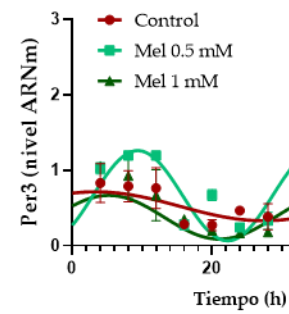
B



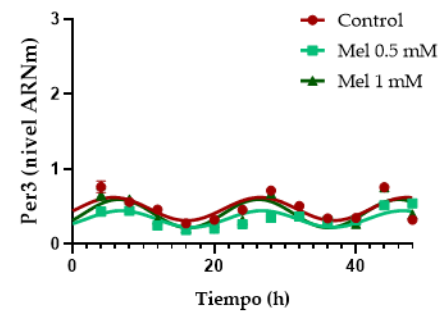
C



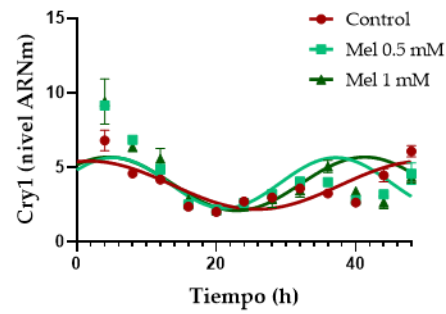
D



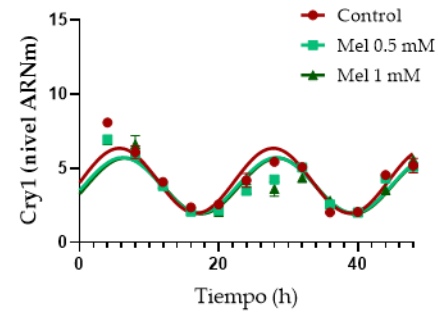
E



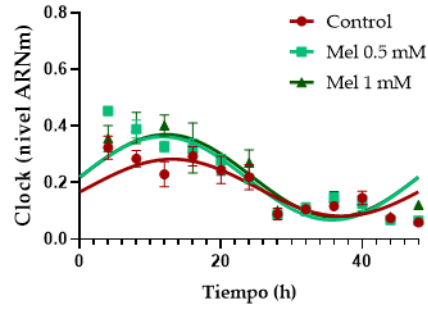
F



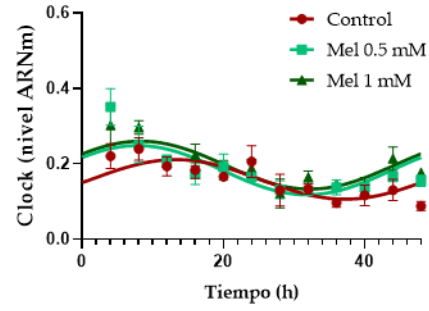
G



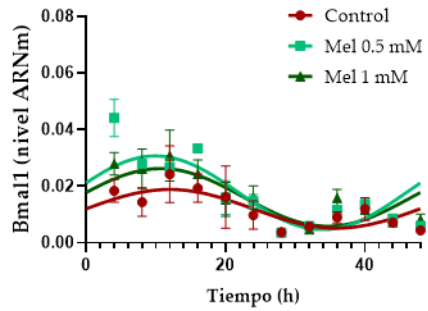
H



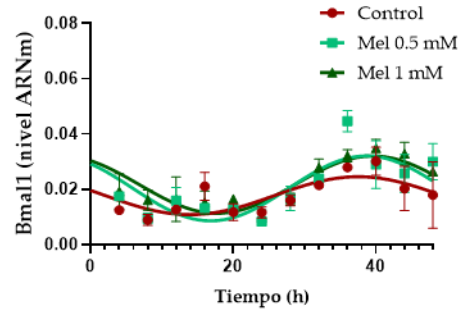
I



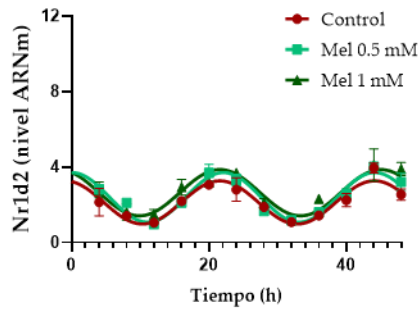
J



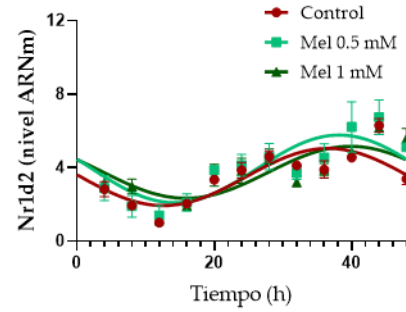
K



L



M



N

Figura A 6. Nivel de expresión del ARNm de los diferentes genes del reloj: Per1 (A y B), Per2 (C y D), Per3 (E y F), Cry1 (G y H), Clock (I y J), Bmal (K y L) y Nr1d2 (M y N) en las células HCT-116 (columna izquierda) y en las células HCT-116 p53 null (columna derecha) tras el tratamiento con melatonina 0.5 o 1 mM.

Tabla A 6. Características del análisis cosinor para cada uno de los genes tras el tratamiento con melatonina 0.5 o 1 mM en la línea celular HCT-116

Gen	Tratamiento	PR ¹	P-valor ²	Amplitud (A.U.) ³	Acrofase (h) ⁴	MESOR (A.U.) ³
Per1	Control	29.41	0.003	5.17 ± 1.45	3.06 ± 1.91	9.77 ± 0.99
	Mel 0.5	50.21	<0.0001	8.25 ± 1.43	46.75 ± 1.32***	11.40 ± 1.01
	Mel 1	34.77	0.0009	2.24 ± 0.53 [#]	32.83 ± 2.00 ^{***, #}	8.25 ± 0.39 [#]
Per2	Control	31.66	0.001	0.076 ± 0.018	22.76 ± 1.19	0.282 ± 0.013
	Mel 0.5	41.30	<0.0001	0.090 ± 0.019	7.08 ± 0.68***	0.287 ± 0.014
	Mel 1	27.81	0.003	0.088 ± 0.024	6.58 ± 2.09 ^{***, ###}	0.257 ± 0.017
Per3	Control	25.36	0.008	0.329 ± 0.099	7.47 ± 1.15	0.720 ± 0.069
	Mel 0.5	29.42	0.003	0.967 ± 0.260*	4.92 ± 1.46	0.876 ± 0.189
	Mel 1	31.33	0.002	0.956 ± 0.246*	0.54 ± 1.43	0.827 ± 0.179
Cry1	Control	63.01	<0.0001	1.62 ± 0.21	1.79 ± 1.02	3.810 ± 0.153
	Mel 0.5	35.98	<0.0001	1.70 ± 0.41	5.28 ± 1.16***	3.960 ± 0.288
	Mel 1	37.72	<0.0001	1.79 ± 0.42	4.55 ± 1.31*	3.900 ± 0.294
Clock	Control	57.99	<0.0001	0.101 ± 0.015	13.14 ± 1.13	0.182 ± 0.011
	Mel 0.5	63.53	<0.0001	0.147 ± 0.019	11.76 ± 2.97	0.215 ± 0.014
	Mel 1	56.75	<0.0001	0.189 ± 0.028**	10.77 ± 1.01	0.258 ± 0.020 ^{***, #}
Bmal1	Control	61.01	<0.0001	0.009 ± 0.001	12.99 ± 1.06	0.013 ± 0.001
	Mel 0.5	54.62	<0.0001	0.013 ± 0.002	9.93 ± 1.21	0.017 ± 0.001
	Mel 1	38.63	<0.0001	0.009 ± 0.002	10.85 ± 1.67	0.016 ± 0.001
Nr1d2	Control	48.84	<0.0001	1.73 ± 0.32	12.19 ± 0.63	3.79 ± 0.22
	Mel 0.5	85.47	<0.0001	1.31 ± 0.09	0.05 ± 0.24***	2.39 ± 0.06***
	Mel 1	57.84	<0.0001	1.89 ± 0.28*	11.55 ± 0.56 ^{###}	3.74 ± 0.19 ^{###}

PR¹: porcentaje de ritmicidad; P-valor²: amplitud del test. A.U.³: unidad arbitraria. h⁴: horas.

Comparación de los parámetros de ritmicidad en distintas condiciones llevada a cabo a partir de un estudio con un periodo de 48 horas. *P<0.05 vs Control; **P<0.01 vs control; ***P<0.001 vs Control;

[#]P<0.05 vs Mel 0.5 mM; ^{##}P<0.01 vs Mel 0.5 mM; ^{###}P<0.001 vs Mel 0.5 mM.

Tabla A 7. Resultados del análisis cosinor para cada uno de los genes del reloj tras el tratamiento con melatonina 0.5 o 1 mM en la línea celular HCT-116 p53 null

Gen	Tratamiento	PR ¹	P-valor ²	Amplitud (A.U.) ³	Acrofase (h) ⁴	MESOR (A.U.) ³
Per1	Control	47.47	0.0001	2.42 ± 0.45	4.01 ± 0.65	6.11 ± 0.33
	Mel 0.5	61.03	<0.0001	2.65 ± 0.37	3.53 ± 0.48	6.19 ± 0.27
	Mel 1	68.24	<0.0001	2.20 ± 0.26	3.61 ± 0.41	6.13 ± 0.19
Per2	Control	61.90	<0.0001	0.223 ± 0.030	4.89 ± 0.48	0.341 ± 0.022
	Mel 0.5	53.08	<0.0001	0.205 ± 0.033	4.75 ± 0.59	0.318 ± 0.025
	Mel 1	56.40	<0.0001	0.254 ± 0.038	5.44 ± 0.56	0.319 ± 0.028
Per3	Control	40.65	0.0002	0.137 ± 0.029	6.02 ± 0.71	0.369 ± 0.021
	Mel 0.5	45.39	<0.0001	0.110 ± 0.021	6.87 ± 0.61	0.335 ± 0.015
	Mel 1	56.89	<0.0001	0.165 ± 0.025	40.41 ± 1.16 ^{***,###}	0.335 ± 0.017
Cry1	Control	78.47	<0.0001	2.19 ± 0.19	5.73 ± 0.34	4.16 ± 0.14
	Mel 0.5	74.35	<0.0001	1.87 ± 0.18	6.19 ± 0.38	3.86 ± 0.14
	Mel 1	67.89	<0.0001	1.88 ± 0.21	6.51 ± 0.44	3.82 ± 0.16
Clock	Control	41.13	0.0002	0.05 ± 0.01	11.99 ± 1.59	0.157 ± 0.007
	Mel 0.5	48.67	0.0498	0.05 ± 0.02	9.63 ± 2.61	0.166 ± 0.013
	Mel 1	56.47	<0.0001	0.06 ± 0.01	8.86 ± 1.17	0.196 ± 0.007 ^{*,#}
Bmal1	Control	58.43	<0.0001	0.017 ± 0.002	35.12 ± 1.09	0.024 ± 0.001
	Mel 0.5	10.99	0.1465	0.005 ± 0.002 ^{***}	0.10 ± 1.24 ^{***}	0.021 ± 0.002
	Mel 1	37.40	0.0004	0.010 ± 0.002 [#]	37.92 ± 1.56 ^{*,###}	0.020 ± 0.002 [*]
Nr1d2	Control	45.84	<0.0001	1.41 ± 0.27	35.29 ± 1.44	3.25 ± 0.19
	Mel 0.5	56.03	<0.0001	1.86 ± 0.29	38.96 ± 1.18 [*]	3.85 ± 0.20
	Mel 1	44.92	0.0001	2.08 ± 0.40	41.94 ± 1.47 ^{***}	4.17 ± 0.29 ^{**}

PR¹: porcentaje de ritmicidad; P-valor²: amplitud del test. A.U.³: unidad arbitraria. h⁴: horas.

Comparación de los parámetros de ritmicidad en distintas condiciones llevada a cabo a partir de un estudio con un periodo de 48 horas. *P< 0.05 vs Control; **P<0.01 vs Control; ***P<0.001 vs Control);

[#]P<0.05 vs Mel 0.5 mM; ^{###}P<0.001 vs Mel 0.5 mM.

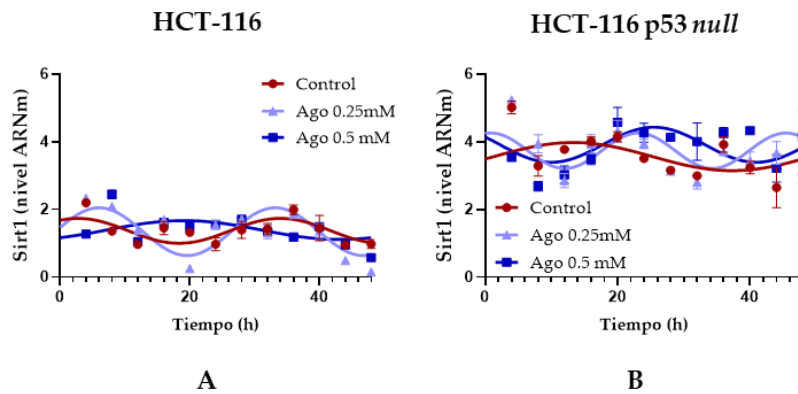


Figura A 7. Representación gráfica de la expresión de ARNm del gen Sirt1 bajo condiciones control y de tratamiento con Agomelatina 0.25 o 0.5 mM en las células HCT-116 (A) y HCT-116 p53 null (B).

Tabla A 8. Resultados del análisis cosinor del gen Sirt1 tras el tratamiento con agomelatina 0.25 o 0.5 mM en las líneas celulares HCT-116 y HCT-116 p53 null

Línea celular	Tratamiento	PR ¹	P-valor ²	Amplitud (A.U.) ³	Acrofase (h) ⁴	MESOR (A.U.) ³
HCT-116	Control	47.58	<0.0001	0.367 ± 0.071	2.80 ± 0.92	1.37 ± 0.05
	Ago 0.25	60.57	<0.0001	0.706 ± 0.102**	6.05 ± 0.67*	1.34 ± 0.07
	Ago 0.5	47.05	<0.0001	0.456 ± 0.084	22.31 ± 1.41***,###	1.23 ± 0.06
HCT-116 p53null	Control	34.8	0.0009	0.39 ± 0.09	16.42 ± 1.82	3.48 ± 0.07
	Ago 0.25	41.50	0.0001	0.58 ± 0.12	3.98 ± 0.55*	3.77 ± 0.09**
	Ago 0.5	35.92	0.0006	0.52 ± 0.11	25.48 ± 1.12***,###	3.91 ± 0.08***

PR¹: porcentaje de ritmicidad; P-valor²: amplitud del test. A.U.³: unidad arbitraria. h⁴: horas.
 Comparación de los parámetros de ritmicidad en distintas condiciones llevada a cabo a partir de un estudio con un periodo de 48 horas. *P<0.05 vs Control; **P<0.01 vs Control; ***P<0.001 vs Control; ###P<0.001 vs Ago 0.25 mM.

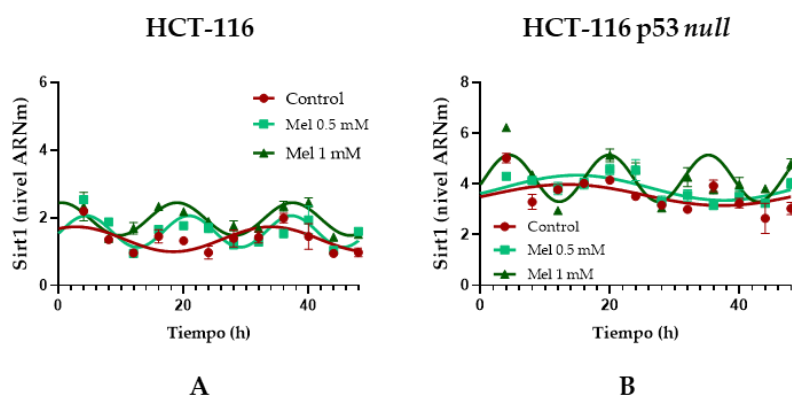


Figura A 8. Representación de los niveles de ARNm de Sirt1 bajo condiciones de control y de tratamiento con melatonina 0.5 mM o 1 mM en las células HCT-116 (A) y HCT-116 p53 null (B).

Tabla A 9. Resultados del análisis cosinor para el gen Sirt1 tras el tratamiento con melatonina 0.5 o 1 mM en las células HCT-116 y HCT-116 p53 null

Línea celular	Tratamiento	PR ¹	P-valor ²	Amplitud (A.U.) ³	Acrofase (h) ⁴	MESOR (A.U.) ³
HCT-116	Control	47.58	<0.0001	0.367 ± 0.071	2.80 ± 0.92	1.37 ± 0.05
	Mel 0.5	63.54	<0.0001	0.466 ± 0.062	4.42 ± 0.35***	1.60 ± 0.04**
	Mel 1	80.65	<0.0001	0.483 ± 0.042	0.52 ± 0.24##	1.96 ± 0.03***,###
HCT-116 p53 null	Control	34.8	0.0009	0.392 ± 0.093	16.42 ± 1.82	3.48 ± 0.06
	Mel 0.5	51.42	<0.0001	0.495 ± 0.081	14.87 ± 1.20	3.85 ± 0.06***
	Mel 1	62.29	<0.0001	0.766 ± 0.102**	4.59 ± 0.34	4.14 ± 0.07***,##

PR¹: porcentaje de ritmicidad; P-valor²: amplitud del test. A.U.³: unidad arbitraria. h⁴: horas.
 Comparación de los parámetros de ritmicidad en distintas condiciones llevada a cabo a partir de un estudio con un periodo de 48 horas. **P<0.01 vs Control; *** P<0.001 vs Control; ##P<0.01 vs Mel 0.5 mM; ###P<0.001 vs Mel 0.5 mM.

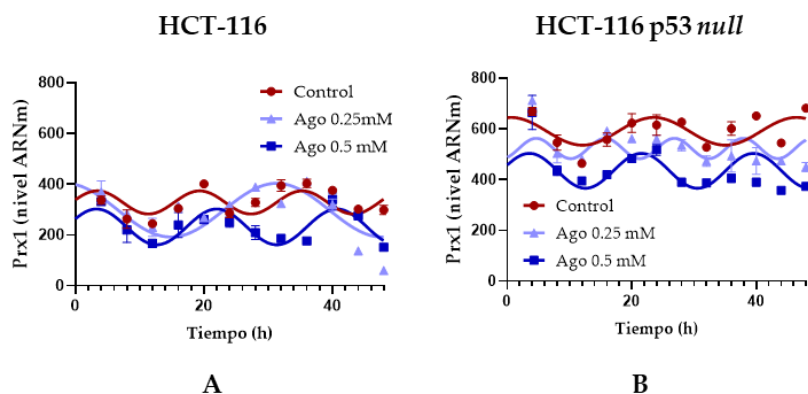


Figura A 9. Expresión del nivel de ARNm del gen Prx1 tras el tratamiento con agomelatina 0.25 o 0.5 mM en las líneas celulares HCT-116 (A) y HCT-116 p53 null (B).

Tabla A 10. Resultados del análisis cosinor para el gen Prx1 tras el tratamiento con agomelatina 0.25 o 0.5 mM en las células HCT-116 y HCT-116 p53 null

Línea celular	Tratamiento	PR ¹	P-valor ²	Amplitud (A.U.) ³	Acrofase (h) ⁴	MESOR (A.U.) ³
HCT-116	Control	38.04	0.0004	45 ± 10	3.38 ± 0.56	329 ± 7
	Ago 0.25	56.48	<0.0001	106 ± 16***	31.31 ± 0.81***	298 ± 11***
	Ago 0.5	74.50	<0.0001	70 ± 7 [#]	3.27 ± 0.31 ^{###}	232 ± 5***,###
HCT-116 p53 null	Control	38.90	0.0003	54 ± 12	0.63 ± 0.79	591 ± 8
	Ago 0.25	17.04	0.0459	40 ± 16	4.64 ± 0.67**	523 ± 11***
	Ago 0.5	64.23	0.0000	81 ± 10 [#]	3.83 ± 0.39***, [#]	447 ± 7***,###

PR¹: porcentaje de ritmicidad; P-valor²: amplitud del test. A.U.³: unidad arbitraria. h⁴: horas.

Comparación de los parámetros de ritmicidad en distintas condiciones llevada a cabo a partir de un estudio con un periodo de 48 horas. **P<0.01 vs Control; ***P<0.001 vs Control; [#]P<0.05 vs Ago 0.25 mM;

^{###}P<0.001 vs Ago 0.25 mM.

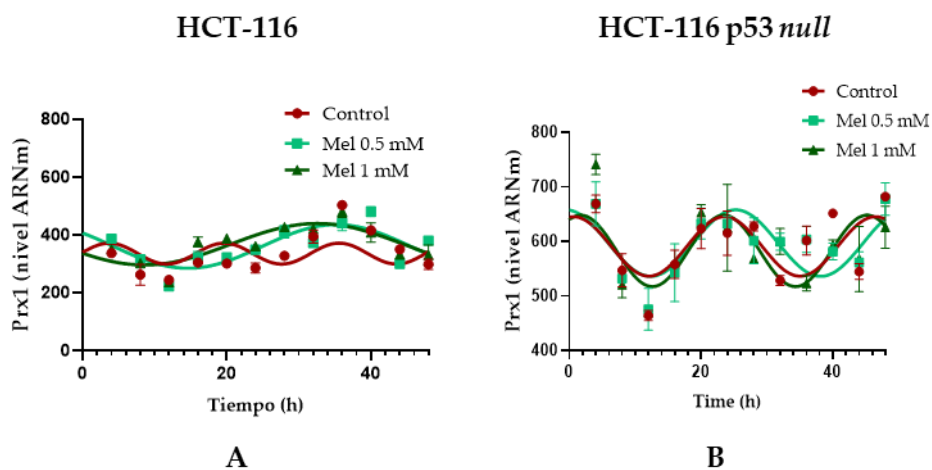


Figura A 10. Expresión del ARNm del gen Prx1 tras el tratamiento con melatonina 0.5 o 1mM en la línea celular HCT-116 (A) y HCT-116 p53 null (B).

Tabla A 11. Resultados del análisis cosinor para el gen Prx1 tras el tratamiento con melatonina 0.5 mM o 1mM en las células hct-116 y hct-116 p53 *null*.

Línea celular	Tratamiento	PR ¹	P-valor ²	Amplitud (A.U.) ³	Acrofase (h) ⁴	MESOR (A.U.) ³
HCT-116	Control	38.04	0.0004	45.7 ± 10.2	3.38 ± 0.56	329 ± 7
	Mel 0.5	57.41	<0.0001	75.5 ± 10.2*	35.23 ± 0.98***	361 ± 7***
	Mel 1	67.01	<0.0001	71.6 ± 8.7	32.54 ± 0.32***,#	368 ± 6***
HCT-116 p53 <i>null</i>	Control	38.90	0.0003	54 ± 12	0.63 ± 0.79	591 ± 8
	Mel 0.5	54.54	<0.0001	61 ± 9	25.26 ± 0.60***	597 ± 6
	Mel 1	46.83	<0.0001	65 ± 12	1.71 ± 0.62*,###	583 ± 8

PR¹: porcentaje de ritmicidad; P-valor²: amplitud del test. A.U.³: unidad arbitraria. h⁴: horas.
 Comparación de los parámetros de ritmicidad en distintas condiciones llevada a cabo a partir de un estudio con un periodo de 48 horas. *P<0.05 vs Control; ***P<0.001 vs Control; #P<0.05 Mel 0.5 mM; ###P<0.001 Mel 0.5 mM.

BIBLIOGRAFÍA

- Abbas, T., & Dutta. (2009). *P21 in cancer: Intricate networks and multiple activities*—PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19440234/>
- Abdou Hassan, W., Muqresh, M. A., & Omer, M. (2022). The Potential Role of CD44 and CD133 in Colorectal Stem Cell Cancer. *Cureus*, 14(10), e30509. <https://doi.org/10.7759/cureus.30509>
- Acuña Castroviejo, D., G, E., C, V., Me, D.-C., E, L.-C., Lc, L., S, R.-C., Dx, T., & Rj, R. (2014). Extrapineal melatonin: Sources, regulation, and potential functions. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, 71(16). <https://doi.org/10.1007/s00018-014-1579-2>
- Adan, A., Kiraz, Y., & Baran, Y. (2016). Cell Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 17(14), 1213-1221. <https://doi.org/10.2174/1389201017666160808160513>
- Aguirre-Ghiso, J. A. (2007). Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy. *Nature Reviews. Cancer*, 7(11), 834-846. <https://doi.org/10.1038/nrc2256>
- André, T., Boni, C., Navarro, M., Tabernero, J., Hickish, T., Topham, C., Bonetti, A., Clingan, P., Bridgewater, J., Rivera, F., & de Gramont, A. (2009). Improved overall survival with oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment in stage II or III colon cancer in the MOSAIC trial. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 27(19), 3109-3116. <https://doi.org/10.1200/JCO.2008.20.6771>
- Angelis, M. L. D., Zeuner, A., Policicchio, E., Russo, G., Bruselles, A., Signore, M., Vitale, S., Luca, G. D., Pillozzi, E., Boe, A., Stassi, G., Ricci-Vitiani, L., Amoreo, C. A., Pagliuca, A., Francescangeli, F., Tartaglia, M., Maria, R. M. D., & Baiocchi, M. (2016). Cancer stem cell-based models of colorectal cancer reveal molecular determinants of therapy resistance. *Stem Cells Translational Medicine*, 5(4), 511-523. <https://doi.org/10.5966/sctm.2015-0214>
- Arnold, M., Sierra, M. S., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2017). Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. *Gut*, 66(4), 683-691. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2015-310912>
- Aroca-Siendones, M. I., Moreno-SanJuan, S., Puentes-Pardo, J. D., Verbeni, M., Arnedo, J., Escudero-Feliu, J., García-Costela, M., García-Robles, A., Carazo, Á., & León, J. (2021). Core Circadian Clock Proteins as Biomarkers of Progression in Colorectal Cancer. *Biomedicines*, 9(8), Article 8. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9080967>
- Asher, G., Gatfield, D., Stratmann, M., Reinke, H., Dibner, C., Kreppel, F., Mostoslavsky, R., Alt, F. W., & Schibler, U. (2008). SIRT1 Regulates Circadian Clock Gene Expression through PER2 Deacetylation. *Cell*, 134(2), 317-328. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.06.050>
- Balakrishna, P., George, S., Hatoum, H., & Mukherjee, S. (2021). Serotonin Pathway in Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(3), 1268. <https://doi.org/10.3390/ijms22031268>

- Balsalobre, A., Brown, S. A., Marcacci, L., Tronche, F., Kellendonk, C., Reichardt, H. M., Schütz, G., & Schibler, U. (2000). Resetting of circadian time in peripheral tissues by glucocorticoid signaling. *Science (New York, N.Y.)*, 289(5488), 2344-2347. <https://doi.org/10.1126/science.289.5488.2344>
- Batlle, E., & Clevers, H. (2017a). Cancer stem cells revisited. *Nature Medicine*, 23(10), 1124-1134. <https://doi.org/10.1038/nm.4409>
- Batlle, E., & Clevers, H. (2017b). Cancer stem cells revisited. *Nature Medicine*, 23(10), 1124-1134. <https://doi.org/10.1038/nm.4409>
- Becker-Weimann, S., Wolf, J., Herzel, H., & Kramer, A. (2004). Modeling feedback loops of the Mammalian circadian oscillator. *Biophysical Journal*, 87(5), 3023-3034. <https://doi.org/10.1529/biophysj.104.040824>
- Bellet, M. M., Orozco-Solis, R., Sahar, S., Eckel-Mahan, K., & Sassone-Corsi, P. (2011). The time of metabolism: NAD⁺, SIRT1, and the circadian clock. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 76, 31-38. <https://doi.org/10.1101/sqb.2011.76.010520>
- Beumer, J., & Clevers, H. (2016). Regulation and plasticity of intestinal stem cells during homeostasis and regeneration. *Development (Cambridge, England)*, 143(20), 3639-3649. <https://doi.org/10.1242/dev.133132>
- Bordone, L., & Guarente, L. (2005). Calorie restriction, SIRT1 and metabolism: Understanding longevity. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 6(4), 298-305. <https://doi.org/10.1038/nrm1616>
- Botteri, E., Iodice, S., Bagnardi, V., Raimondi, S., Lowenfels, A. B., & Maisonneuve, P. (2008). Smoking and colorectal cancer: A meta-analysis. *JAMA*, 300(23), 2765-2778. <https://doi.org/10.1001/jama.2008.839>
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68(6), 394-424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>
- Brix, N., Samaga, D., Belka, C., Zitzelsberger, H., & Lauber, K. (2021). Analysis of clonogenic growth in vitro. *Nature Protocols*, 16(11), 4963-4991. <https://doi.org/10.1038/s41596-021-00615-0>
- Bubenik, G. A. (2002). Gastrointestinal melatonin: Localization, function, and clinical relevance. *Digestive Diseases and Sciences*, 47(10), 2336-2348. <https://doi.org/10.1023/a:1020107915919>
- Bunz, F., Hwang, P. M., Torrance, C., Waldman, T., Zhang, Y., Dillehay, L., Williams, J., Lengauer, C., Kinzler, K. W., & Vogelstein, B. (1999). Disruption of p53 in human cancer cells alters the responses to therapeutic agents. *The Journal of Clinical Investigation*, 104(3), 263-269. <https://doi.org/10.1172/JCI6863>
- Casado, J., Iñigo-Chaves, A., Jiménez-Ruiz, S. M., Ríos-Arrabal, S., Carazo-Gallego, Á., González-Puga, C., Núñez, M. I., Ruíz-Extremera, Á., Salmerón, J., & León, J. (2017a). AA-NAT, MT1 and MT2 Correlates with Cancer Stem-Like Cell Markers

- in Colorectal Cancer: Study of the Influence of Stage and p53 Status of Tumors. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(6). <https://doi.org/10.3390/ijms18061251>
- Casado, J., Iñigo-Chaves, A., Jiménez-Ruiz, S. M., Ríos-Arrabal, S., Carazo-Gallego, Á., González-Puga, C., Núñez, M. I., Ruíz-Extremera, Á., Salmerón, J., & León, J. (2017b). AA-NAT, MT1 and MT2 Correlates with Cancer Stem-Like Cell Markers in Colorectal Cancer: Study of the Influence of Stage and p53 Status of Tumors. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(6), Article 6. <https://doi.org/10.3390/ijms18061251>
- Chen, C., Zhou, M., Ge, Y., & Wang, X. (2020). SIRT1 and aging related signaling pathways. *Mechanisms of Ageing and Development*, 187, 111215. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2020.111215>
- Chok, K. C., Ng, C. H., Koh, R. Y., Ng, K. Y., & Chye, S. M. (2019). The potential therapeutic actions of melatonin in colorectal cancer. *Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation*, 39(1), 20190001. <https://doi.org/10.1515/hmbci-2019-0001>
- Clements, W. K., & Kimelman, D. (2003). Wnt signalling gets XEEKy. *Nature Cell Biology*, 5(10), 861-863. <https://doi.org/10.1038/ncb1003-861>
- Cottet, V., Jooste, V., Fournel, I., Bouvier, A.-M., Faivre, J., & Bonithon-Kopp, C. (2012). Long-term risk of colorectal cancer after adenoma removal: A population-based cohort study. *Gut*, 61(8), 1180-1186. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2011-300295>
- Czene, K., Lichtenstein, P., & Hemminki, K. (2002). Environmental and heritable causes of cancer among 9.6 million individuals in the Swedish Family-Cancer Database. *International Journal of Cancer*, 99(2), 260-266. <https://doi.org/10.1002/ijc.10332>
- Dalerba, P., Dylla, S. J., Park, I.-K., Liu, R., Wang, X., Cho, R. W., Hoey, T., Gurney, A., Huang, E. H., Simeone, D. M., Shelton, A. A., Parmiani, G., Castelli, C., & Clarke, M. F. (2007). Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(24), 10158-10163. <https://doi.org/10.1073/pnas.0703478104>
- Dana, H., Mahmoodi Chalbatani, G., Gharagouzloo, E., Miri, S. R., Memari, F., Rasoolzadeh, R., Zinatizadeh, M. R., Kheirandish Zarandi, P., & Marmari, V. (2020). In silico Analysis, Molecular Docking, Molecular Dynamic, Cloning, Expression and Purification of Chimeric Protein in Colorectal Cancer Treatment. *Drug Design, Development and Therapy*, 14, 309-329. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S231958>
- de Bodinat, C., Guardiola-Lemaitre, B., Mocaër, E., Renard, P., Muñoz, C., & Millan, M. J. (2010). Agomelatine, the first melatonergic antidepressant: Discovery, characterization and development. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 9(8), 628-642. <https://doi.org/10.1038/nrd3140>

- Dekker, E., Tanis, P. J., Vleugels, J. L. A., Kasi, P. M., & Wallace, M. B. (2019). Colorectal cancer. *The Lancet*, 394(10207), 1467-1480. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)32319-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)32319-0)
- Dierickx, P., Van Laake, L. W., & Geijsen, N. (2018). Circadian clocks: From stem cells to tissue homeostasis and regeneration. *EMBO Reports*, 19(1), 18-28. <https://doi.org/10.15252/embr.201745130>
- Diez-Echave, P., Vezza, T., Algieri, F., Ruiz-Malagón, A. J., Hidalgo-García, L., García, F., Morón, R., Sánchez, M., Toral, M., Romero, M., Duarte, J., Garrido-Mesa, J., Rodríguez-Cabezas, M. E., Rodríguez-Nogales, A., & Gálvez, J. (2022). The melatonergic agonist agomelatine ameliorates high fat diet-induced obesity in mice through the modulation of the gut microbiome. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*, 153, 113445. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.113445>
- Ding, C., Fan, X., & Wu, G. (2017). Peroxiredoxin 1 — An antioxidant enzyme in cancer. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 21(1), 193-202. <https://doi.org/10.1111/jcmm.12955>
- Du, L., Wang, H., He, L., Zhang, J., Ni, B., Wang, X., Jin, H., Cahuzac, N., Mehrpour, M., Lu, Y., & Chen, Q. (2008). CD44 is of Functional Importance for Colorectal Cancer Stem Cells. *Clinical Cancer Research*, 14(21), 6751-6760. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-1034>
- Duffy, M. J., Synnott, N. C., O'Grady, S., & Crown, J. (2022). Targeting p53 for the treatment of cancer. *Seminars in Cancer Biology*, 79, 58-67. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2020.07.005>
- Eaden, J. A., Abrams, K. R., & Mayberry, J. F. (2001). The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: A meta-analysis. *Gut*, 48(4), 526-535. <https://doi.org/10.1136/gut.48.4.526>
- Edgar, R. S., Green, E. W., Zhao, Y., van Ooijen, G., Olmedo, M., Qin, X., Xu, Y., Pan, M., Valekunja, U. K., Feeney, K. A., Maywood, E. S., Hastings, M. H., Baliga, N. S., Merrow, M., Millar, A. J., Johnson, C. H., Kyriacou, C. P., O'Neill, J. S., & Reddy, A. B. (2012). Peroxiredoxins are conserved markers of circadian rhythms. *Nature*, 485(7399), 459-464. <https://doi.org/10.1038/nature11088>
- Edwards, B. K., Ward, E., Kohler, B. A., Ehemann, C., Zaubler, A. G., Anderson, R. N., Jemal, A., Schymura, M. J., Lansdorp-Vogelaar, I., Seeff, L. C., van Ballegooijen, M., Goede, S. L., & Ries, L. A. G. (2010). Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2006, featuring colorectal cancer trends and impact of interventions (risk factors, screening, and treatment) to reduce future rates. *Cancer*, 116(3), 544-573. <https://doi.org/10.1002/cncr.24760>
- Eun, K., Ham, S. W., & Kim, H. (2017). Cancer stem cell heterogeneity: Origin and new perspectives on CSC targeting. *BMB Reports*, 50(3), 117-125. <https://doi.org/10.5483/bmbrep.2017.50.3.222>

- Fabregas, J. C., Ramnaraigh, B., & George, T. J. (2022). Clinical Updates for Colon Cancer Care in 2022. *Clinical Colorectal Cancer*, 21(3), 198-203. <https://doi.org/10.1016/j.clcc.2022.05.006>
- Falcone, A., Ricci, S., Brunetti, I., Pfanner, E., Allegrini, G., Barbara, C., Crinò, L., Benedetti, G., Evangelista, W., Fanchini, L., Cortesi, E., Picone, V., Vitello, S., Chiara, S., Granetto, C., Porcile, G., Fioretto, L., Orlandini, C., Andreuccetti, M., ... Gruppo Oncologico Nord Ovest. (2007). Phase III trial of infusional fluorouracil, leucovorin, oxaliplatin, and irinotecan (FOLFOXIRI) compared with infusional fluorouracil, leucovorin, and irinotecan (FOLFIRI) as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: The Gruppo Oncologico Nord Ovest. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 25(13), 1670-1676. <https://doi.org/10.1200/JCO.2006.09.0928>
- Farhood, B., Goradel, N. H., Mortezaee, K., Khanlarkhani, N., Salehi, E., Nashtaei, M. S., Mirtavoos-mahyari, H., Motevaseli, E., Shabeeb, D., Musa, A. E., & Najafi, M. (2019). Melatonin as an adjuvant in radiotherapy for radioprotection and radiosensitization. *Clinical and Translational Oncology*, 21(3), 268-279. <https://doi.org/10.1007/s12094-018-1934-0>
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D. M., Forman, D., & Bray, F. (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer*, 136(5), E359-386. <https://doi.org/10.1002/ijc.29210>
- Flöter, J., Kaymak, I., & Schulze, A. (2017). Regulation of Metabolic Activity by p53. *Metabolites*, 7(2), E21. <https://doi.org/10.3390/metabo7020021>
- Foerster, E. G., Mukherjee, T., Cabral-Fernandes, L., Rocha, J. D. B., Girardin, S. E., & Philpott, D. J. (2022). How autophagy controls the intestinal epithelial barrier. *Autophagy*, 18(1), 86-103. <https://doi.org/10.1080/15548627.2021.1909406>
- Fox, E. J., & Loeb, L. A. (2014). Cancer: One cell at a time. *Nature*, 512(7513), 143-144. <https://doi.org/10.1038/nature13650>
- Fu, L., & Kettner, N. M. (2013). The circadian clock in cancer development and therapy. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 119, 221-282. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-396971-2.00009-9>
- Galceran, J., Ameijide, A., Carulla, M., Mateos, A., Quirós, J. R., Rojas, D., Alemán, A., Torrella, A., Chico, M., Vicente, M., Díaz, J. M., Larrañaga, N., Marcos-Gragera, R., Sánchez, M. J., Perucha, J., Franch, P., Navarro, C., Ardanaz, E., Bigorra, J., ... REDECAN Working Group. (2017). Cancer incidence in Spain, 2015. *Clinical & Translational Oncology: Official Publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico*, 19(7), 799-825. <https://doi.org/10.1007/s12094-016-1607-9>
- Gallego, M., & Virshup, D. M. (2007). Post-translational modifications regulate the ticking of the circadian clock. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 8(2), 139-148. <https://doi.org/10.1038/nrm2106>

- García-Costela, M., Escudero-Feliú, J., Puentes-Pardo, J. D., San Juan, S. M., Morales-Santana, S., Ríos-Arrabal, S., Carazo, Á., & León, J. (2020a). Circadian Genes as Therapeutic Targets in Pancreatic Cancer. *Frontiers in Endocrinology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00638>
- García-Costela, M., Escudero-Feliú, J., Puentes-Pardo, J. D., San Juan, S. M., Morales-Santana, S., Ríos-Arrabal, S., Carazo, Á., & León, J. (2020b). Circadian Genes as Therapeutic Targets in Pancreatic Cancer. *Frontiers in Endocrinology*, 11, 638. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00638>
- Garcia-Peterson, L. M., & Li, X. (2021). Trending topics of SIRT1 in tumorigenicity. *Biochimica Et Biophysica Acta. General Subjects*, 1865(9), 129952. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2021.129952>
- Giles, R. H., van Es, J. H., & Clevers, H. (2003). Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1653(1), 1-24. [https://doi.org/10.1016/s0304-419x\(03\)00005-2](https://doi.org/10.1016/s0304-419x(03)00005-2)
- Gires, O., Pan, M., Schinke, H., Canis, M., & Baeuerle, P. A. (2020). Expression and function of epithelial cell adhesion molecule EpCAM: Where are we after 40 years? *Cancer Metastasis Reviews*, 39(3), 969-987. <https://doi.org/10.1007/s10555-020-09898-3>
- Gonfloni, S., Iannizzotto, V., Maiani, E., Bellusci, G., Ciccone, S., & Diederich, M. (2014). P53 and Sirt1: Routes of metabolism and genome stability. *Biochemical Pharmacology*, 92(1), 149-156. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2014.08.034>
- Guardiola-Lemaitre, B., De Bodinat, C., Delagrangé, P., Millan, M. J., Munoz, C., & Mocaër, E. (2014). Agomelatine: Mechanism of action and pharmacological profile in relation to antidepressant properties: Pharmacological properties of the antidepressant agomelatine. *British Journal of Pharmacology*, 171(15), 3604-3619. <https://doi.org/10.1111/bph.12720>
- Hailemariam, K., Iwasaki, K., Huang, B. W., Sakamoto, K., & Tsuji, Y. (2010). Transcriptional regulation of ferritin and antioxidant genes by HIPK2 under genotoxic stress. *Journal of Cell Science*, 123(22), 3863-3871. <https://doi.org/10.1242/jcs.073627>
- Haller, D. G., Tabernero, J., Maroun, J., de Braud, F., Price, T., Van Cutsem, E., Hill, M., Gilbert, F., Rittweger, K., & Schmoll, H.-J. (2011). Capecitabine plus oxaliplatin compared with fluorouracil and folinic acid as adjuvant therapy for stage III colon cancer. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 29(11), 1465-1471. <https://doi.org/10.1200/JCO.2010.33.6297>
- Hardeland, R. (2017). Melatonin and the pathologies of weakened or dysregulated circadian oscillators. *Journal of Pineal Research*, 62(1), e12377. <https://doi.org/10.1111/jpi.12377>
- Hill, S. M., Belancio, V. P., Dauchy, R. T., Xiang, S., Brimer, S., Mao, L., Hauch, A., Lundberg, P. W., Summers, W., Yuan, L., Frasc, T., & Blask, D. E. (2015).

- Melatonin: An inhibitor of breast cancer. *Endocrine-Related Cancer*, 22(3), R183-204. <https://doi.org/10.1530/ERC-15-0030>
- Hirata, A., Hatano, Y., Niwa, M., Hara, A., & Tomita, H. (2019). Heterogeneity of Colon Cancer Stem Cells. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1139, 115-126. https://doi.org/10.1007/978-3-030-14366-4_7
- Howren, A., Sayre, E. C., Loree, J. M., Gill, S., Brown, C. J., Raval, M. J., Farooq, A., & De Vera, M. A. (2021). Trends in the Incidence of Young-Onset Colorectal Cancer With a Focus on Years Approaching Screening Age: A Population-Based Longitudinal Study. *Journal of the National Cancer Institute*, 113(7), 863-868. <https://doi.org/10.1093/jnci/djaa220>
- Hoyle, N. P., & O'Neill, J. S. (2015). Oxidation–Reduction Cycles of Peroxiredoxin Proteins and Nontranscriptional Aspects of Timekeeping. *Biochemistry*, 54(2), 184-193. <https://doi.org/10.1021/bi5008386>
- Huang, D., Sun, W., Zhou, Y., Li, P., Chen, F., Chen, H., Xia, D., Xu, E., Lai, M., Wu, Y., & Zhang, H. (2018). Mutations of key driver genes in colorectal cancer progression and metastasis. *Cancer Metastasis Reviews*, 37(1), 173-187. <https://doi.org/10.1007/s10555-017-9726-5>
- Huels, D. J., & Sansom, O. J. (2015). Stem vs non-stem cell origin of colorectal cancer. *British Journal of Cancer*, 113(1), 1-5. <https://doi.org/10.1038/bjc.2015.214>
- Humphries, A., & Wright, N. A. (2008). Colonic crypt organization and tumorigenesis. *Nature Reviews. Cancer*, 8(6), 415-424. <https://doi.org/10.1038/nrc2392>
- J, E., Rj, R., & A, R. (2019). The emergence of melatonin in oncology: Focus on colorectal cancer. *Medicinal Research Reviews*, 39(6). <https://doi.org/10.1002/med.21582>
- J, M., V, S., C, L., Ar, Z., A, G., M, C., G, van C., M, M., S, G., S, C., A, C., G, M., A, M., O, van R., C, G., E, M., F, N., S, M.-F., & S, M. (2013). Chronic agomelatine treatment corrects the abnormalities in the circadian rhythm of motor activity and sleep/wake cycle induced by prenatal restraint stress in adult rats. *The International Journal of Neuropsychopharmacology*, 16(2). <https://doi.org/10.1017/S1461145711001970>
- Jeter, C. R., Yang, T., Wang, J., Chao, H.-P., & Tang, D. G. (2015). Concise Review: NANOG in Cancer Stem Cells and Tumor Development: An Update and Outstanding Questions. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 33(8), 2381-2390. <https://doi.org/10.1002/stem.2007>
- Jiao, S., Peters, U., Berndt, S., Brenner, H., Butterbach, K., Caan, B. J., Carlson, C. S., Chan, A. T., Chang-Claude, J., Chanock, S., Curtis, K. R., Duggan, D., Gong, J., Harrison, T. A., Hayes, R. B., Henderson, B. E., Hoffmeister, M., Kolonel, L. N., Le Marchand, L., ... Hsu, L. (2014). Estimating the heritability of colorectal cancer. *Human Molecular Genetics*, 23(14), 3898-3905. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddu087>
- Jung, W., Hong, K. D., Jung, W. Y., Lee, E., Shin, B. K., Kim, H. K., Kim, A., & Kim, B.-H. (2013). SIRT1 Expression Is Associated with Good Prognosis in Colorectal

- Cancer. *Korean Journal of Pathology*, 47(4), 332-339.
<https://doi.org/10.4132/KoreanJPathol.2013.47.4.332>
- Jung-Hynes, B., Reiter, R. J., & Ahmad, N. (2010). Sirtuins, melatonin and circadian rhythms: Building a bridge between aging and cancer. *Journal of Pineal Research*, 48(1), 9-19. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2009.00729.x>
- Kang, T.-H., Reardon, J. T., & Sancar, A. (2011). Regulation of nucleotide excision repair activity by transcriptional and post-transcriptional control of the XPA protein. *Nucleic Acids Research*, 39(8), 3176-3187. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq1318>
- Kannen, V., Bader, M., Sakita, J. Y., Uyemura, S. A., & Squire, J. A. (2020). The Dual Role of Serotonin in Colorectal Cancer. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 31(8), 611-625. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2020.04.008>
- Kannen, V., Marini, T., Zanette, D. L., Frajacomo, F. T., Silva, G. E. B., Silva, W. A., & Garcia, S. B. (2011). The melatonin action on stromal stem cells within pericryptal area in colon cancer model under constant light. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 405(4), 593-598. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.01.074>
- Karasek, M., Carrillo-Vico, A., Guerrero, J. M., Winczyk, K., & Pawlikowski, M. (2002). Expression of melatonin MT(1) and MT(2) receptors, and ROR alpha(1) receptor in transplantable murine Colon 38 cancer. *Neuro Endocrinology Letters*, 23 Suppl 1, 55-60.
- Karpowicz, P., Zhang, Y., Hogenesch, J. B., Emery, P., & Perrimon, N. (2013). The Circadian Clock Gates the Intestinal Stem Cell Regenerative State. *Cell Reports*, 3(4), 996-1004. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.03.016>
- Karthika, C., Hari, B., Rahman, M. H., Akter, R., Najda, A., Albadrani, G. M., Sayed, A. A., Akhtar, M. F., & Abdel-Daim, M. M. (2021). Multiple strategies with the synergistic approach for addressing colorectal cancer. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*, 140, 111704. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111704>
- Kast, R. E. (2015). Agomelatine or ramelteon as treatment adjuncts in glioblastoma and other M1- or M2-expressing cancers. *Współczesna Onkologia*, 2, 157-162. <https://doi.org/10.5114/wo.2015.51421>
- Kelleher, F. C., Rao, A., & Maguire, A. (2014). Circadian molecular clocks and cancer. *Cancer Letters*, 342(1), 9-18. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2013.09.040>
- Kennedy, B. E., Sharif, T., Martell, E., Dai, C., Kim, Y., Lee, P. W. K., & Gujar, S. A. (2016). NAD⁺ salvage pathway in cancer metabolism and therapy. *Pharmacological Research*, 114, 274-283. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2016.10.027>
- Kettner, N. M., Voicu, H., Finegold, M. J., Coarfa, C., Sreekumar, A., Putluri, N., Katchy, C. A., Lee, C., Moore, D. D., & Fu, L. (2016). Circadian Homeostasis of Liver Metabolism Suppresses Hepatocarcinogenesis. *Cancer Cell*, 30(6), 909-924. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2016.10.007>

- Khaper, N., Bailey, C. D. C., Ghugre, N. R., Reitz, C., Awosanmi, Z., Waines, R., & Martino, T. A. (2018). Implications of disturbances in circadian rhythms for cardiovascular health: A new frontier in free radical biology. *Free Radical Biology & Medicine*, 119, 85-92. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.11.006>
- Kim, H. K., & Yang, K. I. (2022). Melatonin and melatonergic drugs in sleep disorders. *Translational and Clinical Pharmacology*, 30(4), 163-171. <https://doi.org/10.12793/tcp.2022.30.e21>
- Kim, T. I. (2014). Chemopreventive drugs: Mechanisms via inhibition of cancer stem cells in colorectal cancer. *World Journal of Gastroenterology*, 20(14), 3835-3846. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i14.3835>
- Kim, Y. J., Kim, E.-H., & Hahm, K. B. (2012). Oxidative stress in inflammation-based gastrointestinal tract diseases: Challenges and opportunities. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 27(6), 1004-1010. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2012.07108.x>
- Kleszcz, R., Paluszczak, J., & Baer-Dubowska, W. (2015). Targeting aberrant cancer metabolism—The role of sirtuins. *Pharmacological Reports: PR*, 67(6), 1068-1080. <https://doi.org/10.1016/j.pharep.2015.03.021>
- Kos Kudla, B., Ostrowska, Z., Marek, B., Kajdaniuk, D., Ciesielska-Kopacz, N., Kudla, M., Mazur, B., Glogowska-Szelag, J., & Nasiek, M. (2002). Circadian rhythm of melatonin in postmenopausal asthmatic women with hormone replacement therapy. *Neuro endocrinology letters*, 23, 243-248.
- Kreso, A., & Dick, J. E. (2014). Evolution of the cancer stem cell model. *Cell Stem Cell*, 14(3), 275-291. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2014.02.006>
- Kruiswijk, F., Labuschagne, C. F., & Vousden, K. H. (2015). p53 in survival, death and metabolic health: A lifeguard with a licence to kill. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 16(7), 393-405. <https://doi.org/10.1038/nrm4007>
- Kvietkauskas, M., Zitkute, V., Leber, B., Strupas, K., Stiegler, P., & Schemmer, P. (2020). The role of melatonin in colorectal cancer treatment: A comprehensive review. *Therapeutic Advances in Medical Oncology*, 12, 1758835920931714. <https://doi.org/10.1177/1758835920931714>
- La Vecchia, S., & Sebastián, C. (2020). Metabolic pathways regulating colorectal cancer initiation and progression. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 98, 63-70. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2019.05.018>
- Langley, E., Pearson, M., Faretta, M., Bauer, U.-M., Frye, R. A., Minucci, S., Pelicci, P. G., & Kouzarides, T. (2002). Human SIR2 deacetylates p53 and antagonizes PML/p53-induced cellular senescence. *The EMBO Journal*, 21(10), 2383-2396. <https://doi.org/10.1093/emboj/21.10.2383>
- Lee, Y. (2021). Roles of circadian clocks in cancer pathogenesis and treatment. *Experimental & Molecular Medicine*, 53(10), 1529-1538. <https://doi.org/10.1038/s12276-021-00681-0>

- León, J., Casado, J., Carazo, A., Sanjuán, L., Maté, A., Muñoz de Rueda, P., de la Cueva, P., Quiles, R., Ruíz, S., Ruíz-Extremera, A., & Salmerón, J. (2012). Gender-related invasion differences associated with mRNA expression levels of melatonin membrane receptors in colorectal cancer. *Molecular Carcinogenesis*, 51(8), 608-618. <https://doi.org/10.1002/mc.20832>
- León, J., Casado, J., Carazo, Á., Sanjuán, L., Maté, A., Rueda, P. M. de, Cueva, P. de la, Quiles, R., Ruíz, S., Ruíz-Extremera, Á., & Salmerón, J. (2012). Gender-related invasion differences associated with mRNA expression levels of melatonin membrane receptors in colorectal cancer. *Molecular Carcinogenesis*, 51(8), 608-618. <https://doi.org/10.1002/mc.20832>
- León, J., Casado, J., Ruiz, S. M. J., Zurita, M. S., González-Puga, C., Rejón, J. D., Gila, A., Rueda, P. M. de, Pavón, E. J., Reiter, R. J., Ruiz-Extremera, A., & Salmerón, J. (2014). Melatonin reduces endothelin-1 expression and secretion in colon cancer cells through the inactivation of FoxO-1 and NF- κ B. *Journal of Pineal Research*, 56(4), 415-426. <https://doi.org/10.1111/jpi.12131>
- Levens, D. (2002). Disentangling the MYC web. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(9), 5757-5759. <https://doi.org/10.1073/pnas.102173199>
- Li, Y., Rogoff, H. A., Keates, S., Gao, Y., Murikipudi, S., Mikule, K., Leggett, D., Li, W., Pardee, A. B., & Li, C. J. (2015). Suppression of cancer relapse and metastasis by inhibiting cancer stemness. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(6), 1839-1844. <https://doi.org/10.1073/pnas.1424171112>
- Lin, Y., Ma, W., & Benchimol, S. (2000). Pidd, a new death-domain-containing protein, is induced by p53 and promotes apoptosis. *Nature Genetics*, 26(1), 122-127. <https://doi.org/10.1038/79102>
- Lin, Z., & Fang, D. (2013). The Roles of SIRT1 in Cancer. *Genes & Cancer*, 4(3-4), 97-104. <https://doi.org/10.1177/1947601912475079>
- Liu, J., Clough, S. J., Hutchinson, A. J., Adamah-Biassi, E. B., Popovska-Gorevski, M., & Dubocovich, M. L. (2016). MT1 and MT2 Melatonin Receptors: A Therapeutic Perspective. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 56, 361-383. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010814-124742>
- Liu, W. J., Ye, L., Huang, W. F., Guo, L. J., Xu, Z. G., Wu, H. L., Yang, C., & Liu, H. F. (2016). P62 links the autophagy pathway and the ubiquitin-proteasome system upon ubiquitinated protein degradation. *Cellular & Molecular Biology Letters*, 21, 29. <https://doi.org/10.1186/s11658-016-0031-z>
- Liu, Z., Zou, D., Yang, X., Xue, X., Zuo, L., Zhou, Q., Hu, R., & Wang, Y. (2017). Melatonin inhibits colon cancer RKO cell migration by downregulating Rho-associated protein kinase expression via the p38/MAPK signaling pathway. *Molecular Medicine Reports*, 16(6), 9383-9392. <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.7836>

- Longley, D. B., Harkin, D. P., & Johnston, P. G. (2003). 5-fluorouracil: Mechanisms of action and clinical strategies. *Nature Reviews. Cancer*, 3(5), 330-338. <https://doi.org/10.1038/nrc1074>
- Lu, W., Fu, D., Kong, X., Huang, Z., Hwang, M., Zhu, Y., Chen, L., Jiang, K., Li, X., Wu, Y., Li, J., Yuan, Y., & Ding, K. (2020). FOLFOX treatment response prediction in metastatic or recurrent colorectal cancer patients via machine learning algorithms. *Cancer Medicine*, 9(4), 1419-1429. <https://doi.org/10.1002/cam4.2786>
- Lucena-Cacace, A., Otero-Albiol, D., Jiménez-García, M. P., Muñoz-Galvan, S., & Carnero, A. (2018). NAMPT Is a Potent Oncogene in Colon Cancer Progression that Modulates Cancer Stem Cell Properties and Resistance to Therapy through Sirt1 and PARP. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 24(5), 1202-1215. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-17-2575>
- Luo, J., Nikolaev, A. Y., Imai, S., Chen, D., Su, F., Shiloh, A., Guarente, L., & Gu, W. (2001). Negative control of p53 by Sir2alpha promotes cell survival under stress. *Cell*, 107(2), 137-148. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(01\)00524-4](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(01)00524-4)
- Lv, L., Shen, Z., Zhang, J., Zhang, H., Dong, J., Yan, Y., Liu, F., Jiang, K., Ye, Y., & Wang, S. (2014). Clinicopathological significance of SIRT1 expression in colorectal adenocarcinoma. *Medical Oncology (Northwood, London, England)*, 31(6), 965. <https://doi.org/10.1007/s12032-014-0965-9>
- Ma, B., King, A. D., Leung, L., Wang, K., Poon, A., Ho, W. M., Mo, F., Chan, C. M. L., Chan, A. T. C., & Wong, S. C. C. (2017). Identifying an early indicator of drug efficacy in patients with metastatic colorectal cancer-a prospective evaluation of circulating tumor cells, 18F-fluorodeoxyglucose positron-emission tomography and the RECIST criteria. *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology*, 28(7), 1576-1581. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdx149>
- Ma, S., Chan, K. W., Lee, T. K.-W., Tang, K. H., Wo, J. Y.-H., Zheng, B.-J., & Guan, X.-Y. (2008). Aldehyde Dehydrogenase Discriminates the CD133 Liver Cancer Stem Cell Populations. *Molecular Cancer Research*, 6(7), 1146-1153. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-08-0035>
- Ma, Y.-S., Li, W., Liu, Y., Shi, Y., Lin, Q.-L., & Fu, D. (2020). Targeting Colorectal Cancer Stem Cells as an Effective Treatment for Colorectal Cancer. *Technology in Cancer Research & Treatment*, 19, 1533033819892261. <https://doi.org/10.1177/1533033819892261>
- Mahmoud, A. M., Abd El-Ghafar, O. A. M., Alzoghaibi, M. A., & Hassanein, E. H. M. (2021). Agomelatine prevents gentamicin nephrotoxicity by attenuating oxidative stress and TLR-4 signaling, and upregulating PPAR γ and SIRT1. *Life Sciences*, 278, 119600. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.119600>
- Mahmoud, N. M., Elshazly, S. M., Hassan, A. A., & Soliman, E. (2023). Agomelatine improves streptozotocin-induced diabetic nephropathy through melatonin

- receptors/SIRT1 signaling pathway. *International Immunopharmacology*, 115, 109646. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2022.109646>
- Malki, A., ElRuz, R. A., Gupta, I., Allouch, A., Vranic, S., & Al Moustafa, A.-E. (2020). Molecular Mechanisms of Colon Cancer Progression and Metastasis: Recent Insights and Advancements. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(1), E130. <https://doi.org/10.3390/ijms22010130>
- Manhas, J., Bhattacharya, A., Agrawal, S. K., Gupta, B., Das, P., Deo, S. V. S., Pal, S., & Sen, S. (2016). Characterization of cancer stem cells from different grades of human colorectal cancer. *Tumour Biology: The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 37(10), 14069-14081. <https://doi.org/10.1007/s13277-016-5232-6>
- Mármol, I., Sánchez-de-Diego, C., Pradilla Dieste, A., Cerrada, E., & Rodríguez Yoldi, M. J. (2017). Colorectal Carcinoma: A General Overview and Future Perspectives in Colorectal Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(1), E197. <https://doi.org/10.3390/ijms18010197>
- Maroufi, N. F., Ashouri, N., Mortezaia, Z., Ashoori, Z., Vahedian, V., Amirzadeh-Iranaq, M. T., Fattahi, A., Kazemzadeh, H., Bizzarri, M., Akbarzadeh, M., Nejabati, H. R., Faridvand, Y., Rashidi, M.-R., & Nouri, M. (2020). The potential therapeutic effects of melatonin on breast cancer: An invasion and metastasis inhibitor. *Pathology, Research and Practice*, 216(10), 153226. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2020.153226>
- Matsunaga. (2011). *PRIME PubMed | Influence of CLOCK on cytotoxicity induced by diethylnitrosamine in mouse primary hepatocytes*. https://neuro.unboundmedicine.com/medline/citation/21167249/Influence_of_CLOCK_on_cytotoxicity_induced_by_diethylnitrosamine_in_mouse_primary_hepatocytes_
- Mayo, J. C., Sainz, R. M., Menéndez, P. G., Cepas, V., Tan, D. X., & Reiter, R. J. (2017). Melatonin and sirtuins: A “not-so unexpected” relationship. *Journal of Pineal Research*, 62(2), e12391. <https://doi.org/10.1111/jpi.12391>
- Meek, D. W. (2015). Regulation of the p53 response and its relationship to cancer. *The Biochemical Journal*, 469(3), 325-346. <https://doi.org/10.1042/BJ20150517>
- Méndez, I., Vázquez-Martínez, O., Hernández-Muñoz, R., Valente-Godínez, H., & Díaz-Muñoz, M. (2016). Redox regulation and pro-oxidant reactions in the physiology of circadian systems. *Biochimie*, 124, 178-186. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2015.04.014>
- Miki, T., Matsumoto, T., Zhao, Z., & Lee, C. C. (2013). P53 regulates Period2 expression and the circadian clock. *Nature Communications*, 4, 2444. <https://doi.org/10.1038/ncomms3444>
- Millius, A., Ode, K. L., & Ueda, H. R. (2019). A period without PER: Understanding 24-hour rhythms without classic transcription and translation feedback loops. *F1000Research*, 8. <https://doi.org/10.12688/f1000research.18158.1>

- Morata-Tarifa, C., Jiménez, G., García, M. A., Entrena, J. M., Griñán-Lisón, C., Aguilera, M., Picon-Ruiz, M., & Marchal, J. A. (2016). Low adherent cancer cell subpopulations are enriched in tumorigenic and metastatic epithelial-to-mesenchymal transition-induced cancer stem-like cells. *Scientific Reports*, 6, 18772. <https://doi.org/10.1038/srep18772>
- Müller, M. F., Ibrahim, A. E. K., & Arends, M. J. (2016). Molecular pathological classification of colorectal cancer. *Virchows Archiv: An International Journal of Pathology*, 469(2), 125-134. <https://doi.org/10.1007/s00428-016-1956-3>
- Mundade, R., Imperiale, T. F., Prabhu, L., Loehrer, P. J., & Lu, T. (2014). Genetic pathways, prevention, and treatment of sporadic colorectal cancer. *Oncoscience*, 1(6), 400-406. <https://doi.org/10.18632/oncoscience.59>
- Munro, M. J., Wickremesekera, S. K., Peng, L., Tan, S. T., & Itinteang, T. (2018). Cancer stem cells in colorectal cancer: A review. *Journal of Clinical Pathology*, 71(2), 110-116. <https://doi.org/10.1136/jclinpath-2017-204739>
- Najafi, M., Farhood, B., & Mortezaee, K. (2019). Cancer stem cells (CSCs) in cancer progression and therapy. *Journal of Cellular Physiology*, 234(6), 8381-8395. <https://doi.org/10.1002/jcp.27740>
- Nakahata, Y., Kaluzova, M., Grimaldi, B., Sahar, S., Hirayama, J., Chen, D., Guarente, L. P., & Sassone-Corsi, P. (2008). The NAD⁺-Dependent Deacetylase SIRT1 Modulates CLOCK-Mediated Chromatin Remodeling and Circadian Control. *Cell*, 134(2), 329-340. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.07.002>
- Nakahata, Y., Sahar, S., Astarita, G., Kaluzova, M., & Sassone-Corsi, P. (2009a). CIRCADIAN CONTROL OF THE NAD⁺ SALVAGE PATHWAY BY CLOCK-SIRT1. *Science (New York, N.Y.)*, 324(5927), 654-657. <https://doi.org/10.1126/science.1170803>
- Nakahata, Y., Sahar, S., Astarita, G., Kaluzova, M., & Sassone-Corsi, P. (2009b). Circadian control of the NAD⁺ salvage pathway by CLOCK-SIRT1. *Science (New York, N.Y.)*, 324(5927), 654-657. <https://doi.org/10.1126/science.1170803>
- Olié, J. P., & Kasper, S. (2007). Efficacy of agomelatine, a MT₁/MT₂ receptor agonist with 5-HT_{2C} antagonistic properties, in major depressive disorder. *The International Journal of Neuropsychopharmacology*, 10(5), 661-673. <https://doi.org/10.1017/S1461145707007766>
- Orozco-Solis, R., Ramadori, G., Coppari, R., & Sassone-Corsi, P. (2015). SIRT1 Relays Nutritional Inputs to the Circadian Clock Through the Sf1 Neurons of the Ventromedial Hypothalamus. *Endocrinology*, 156(6), 2174-2184. <https://doi.org/10.1210/en.2014-1805>
- Osama, A., Sabry, D., Hassany, S. M., Abdelmoneim, S. S., & Sabry, A. (2016). SIRT1 expression is associated with expression of NANOG in patients with colorectal adenocarcinoma. *Cancer Biomarkers*, 17(2), 155-163. <https://doi.org/10.3233/cbm-160626>

- Ozaki, T., & Nakagawara, A. (2011). Role of p53 in Cell Death and Human Cancers. *Cancers*, 3(1), 994-1013. <https://doi.org/10.3390/cancers3010994>
- Ozturk, N., Lee, J. H., Gaddameedhi, S., & Sancar, A. (2009). Loss of cryptochrome reduces cancer risk in p53 mutant mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(8), 2841-2846. <https://doi.org/10.1073/pnas.0813028106>
- Pantaleo, M. A., Palassini, E., Labianca, R., & Biasco, G. (2006). Targeted therapy in colorectal cancer: Do we know enough? *Digestive and Liver Disease: Official Journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver*, 38(2), 71-77. <https://doi.org/10.1016/j.dld.2005.10.004>
- Papagiannakopoulos, T., Bauer, M. R., Davidson, S. M., Heimann, M., Subbaraj, L., Bhutkar, A., Bartlebaugh, J., Vander Heiden, M. G., & Jacks, T. (2016). Circadian Rhythm Disruption Promotes Lung Tumorigenesis. *Cell Metabolism*, 24(2), 324-331. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.07.001>
- Pariente, R., Bejarano, I., Rodríguez, A. B., Pariente, J. A., & Espino, J. (2018). Melatonin increases the effect of 5-fluorouracil-based chemotherapy in human colorectal adenocarcinoma cells in vitro. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 440(1-2), 43-51. <https://doi.org/10.1007/s11010-017-3154-2>
- Park, M. H., Jo, M., Kim, Y. R., Lee, C.-K., & Hong, J. T. (2016). Roles of peroxiredoxins in cancer, neurodegenerative diseases and inflammatory diseases. *Pharmacology & Therapeutics*, 163, 1-23. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2016.03.018>
- Parrales, A., & Iwakuma, T. (2015). Targeting Oncogenic Mutant p53 for Cancer Therapy. *Frontiers in Oncology*, 5, 288. <https://doi.org/10.3389/fonc.2015.00288>
- Patel, S., Khan, H., & Majumdar, A. (2022). Crosstalk between Sirtuins and Nrf2: SIRT1 activators as emerging treatment for diabetic neuropathy. *Metabolic Brain Disease*, 37(7), 2181-2195. <https://doi.org/10.1007/s11011-022-00956-z>
- Patke, A., Young, M. W., & Axelrod, S. (2020). Molecular mechanisms and physiological importance of circadian rhythms. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 21(2), 67-84. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0179-2>
- Patton, A. P., & Hastings, M. H. (2018). The suprachiasmatic nucleus. *Current Biology: CB*, 28(15), R816-R822. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.06.052>
- Porcu, A., Gonzalez, R., & McCarthy, M. J. (2019). Pharmacological Manipulation of the Circadian Clock: A Possible Approach to the Management of Bipolar Disorder. *CNS Drugs*, 33(10), 981-999. <https://doi.org/10.1007/s40263-019-00673-9>
- Poturnajova, M., Furielova, T., Balintova, S., Schmidtova, S., Kucerova, L., & Matuskova, M. (2021). Molecular features and gene expression signature of metastatic colorectal cancer (Review). *Oncology Reports*, 45(4), 10. <https://doi.org/10.3892/or.2021.7961>
- Rao, X., & Lin, L. (2022). Circadian clock as a possible control point in colorectal cancer progression (Review). *International Journal of Oncology*, 61(6), 149. <https://doi.org/10.3892/ijo.2022.5439>

- Rawla, P., Sunkara, T., & Barsouk, A. (2019). Epidemiology of colorectal cancer: Incidence, mortality, survival, and risk factors. *Przegląd Gastroenterologiczny*, 14(2), 89-103. <https://doi.org/10.5114/pg.2018.81072>
- Ray, S., Valekunja, U. K., Stangherlin, A., Howell, S. A., Snijders, A. P., Damodaran, G., & Reddy, A. B. (2020). Circadian rhythms in the absence of the clock gene Bmal1. *Science (New York, N.Y.)*, 367(6479), 800-806. <https://doi.org/10.1126/science.aaw7365>
- Refinetti, R. (1992). Non-parametric procedures for the determination of phase markers of circadian rhythms. *International Journal of Bio-Medical Computing*, 30(1), 49-56. [https://doi.org/10.1016/0020-7101\(92\)90061-v](https://doi.org/10.1016/0020-7101(92)90061-v)
- Reidy, E., Leonard, N. A., Treacy, O., & Ryan, A. E. (2021). A 3D View of Colorectal Cancer Models in Predicting Therapeutic Responses and Resistance. *Cancers*, 13(2), 227. <https://doi.org/10.3390/cancers13020227>
- Rey, G., Valekunja, U. K., Feeney, K. A., Wulund, L., Milev, N. B., Stangherlin, A., Ansel-Bollepalli, L., Velagapudi, V., O'Neill, J. S., & Reddy, A. B. (2016). The Pentose Phosphate Pathway Regulates the Circadian Clock. *Cell Metabolism*, 24(3), 462-473. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.07.024>
- Rhee, S. G. (2016). Overview on Peroxiredoxin. *Molecules and Cells*, 39(1), 1-5. <https://doi.org/10.14348/molcells.2016.2368>
- Rhee, S. G., & Kil, I. S. (2016). Mitochondrial H₂O₂ signaling is controlled by the concerted action of peroxiredoxin III and sulfiredoxin: Linking mitochondrial function to circadian rhythm. *Free Radical Biology and Medicine*, 100, 73-80. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.10.011>
- Ricci-Vitiani, L., Pallini, R., Biffoni, M., Todaro, M., Invernici, G., Cenci, T., Maira, G., Parati, E. A., Stassi, G., Larocca, L. M., & De Maria, R. (2010). Tumour vascularization via endothelial differentiation of glioblastoma stem-like cells. *Nature*, 468(7325), 824-828. <https://doi.org/10.1038/nature09557>
- Rifaï, K., Idrissou, M., Daures, M., Bignon, Y.-J., Penault-Llorca, F., & Bernard-Gallon, D. (2018). SIRT1 in Colorectal Cancer: A Friend or Foe? *OMICS: A Journal of Integrative Biology*, 22(4), 298-300. <https://doi.org/10.1089/omi.2018.0006>
- Rijo-Ferreira, F., & Takahashi, J. S. (2019). Genomics of circadian rhythms in health and disease. *Genome Medicine*, 11(1), 82. <https://doi.org/10.1186/s13073-019-0704-0>
- Ríos-Arrabal, S., Muñoz-Gámez, J. A., Jiménez-Ruíz, S. M., Casado-Ruiz, J., Artacho-Cordón, F., & León-López, J. (2016). *Circadian Regulation of Colon Cancer Stem Cells: Implications for Therapy* (L. Rodrigo, Ed.). InTech. <https://doi.org/10.5772/62323>
- Ríos-Arrabal, S., Muñoz-Gámez, J. A., ManuelJiménez-Ruiz, S., Casado-Ruiz, J., León-López, F. A.-C. and J., Ríos-Arrabal, S., Muñoz-Gámez, J. A., ManuelJiménez-Ruiz, S., Casado-Ruiz, J., & León-López, F. A.-C. and J. (2016). Circadian Regulation of Colon Cancer Stem Cells: Implications for Therapy. En *Colorectal*

Cancer—From Pathogenesis to Treatment. IntechOpen.
<https://doi.org/10.5772/62323>

- Robinson, I., & Reddy, A. B. (2014). Molecular mechanisms of the circadian clockwork in mammals. *FEBS Letters*, 588(15), 2477-2483. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2014.06.005>
- Ruan, W., Yuan, X., & Eltzschig, H. K. (2021). Circadian rhythm as a therapeutic target. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 20(4), 287-307. <https://doi.org/10.1038/s41573-020-00109-w>
- Sa, B., F, F.-O., E, N., C, H., C, J., Ca, M., R, C., Jm, D., U, A., & U, S. (2005). The period length of fibroblast circadian gene expression varies widely among human individuals. *PLoS Biology*, 3(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0030338>
- Sabeti Aghabozorgi, A., Moradi Sarabi, M., Jafarzadeh-Esfehani, R., Koochakkhani, S., Hassanzadeh, M., Kavousipour, S., & Eftekhari, E. (2020). Molecular determinants of response to 5-fluorouracil-based chemotherapy in colorectal cancer: The undisputable role of micro-ribonucleic acids. *World Journal of Gastrointestinal Oncology*, 12(9), 942-956. <https://doi.org/10.4251/wjgo.v12.i9.942>
- Sahar, S., & Sassone-Corsi, P. (2009). Metabolism and cancer: The circadian clock connection. *Nature Reviews. Cancer*, 9(12), 886-896. <https://doi.org/10.1038/nrc2747>
- Saif, M. W., & Chu, E. (2010). Biology of colorectal cancer. *Cancer Journal (Sudbury, Mass.)*, 16(3), 196-201. <https://doi.org/10.1097/PPO.0b013e3181e076af>
- Sakatani, A., Sonohara, F., & Goel, A. (2019). Melatonin-mediated downregulation of thymidylate synthase as a novel mechanism for overcoming 5-fluorouracil associated chemoresistance in colorectal cancer cells. *Carcinogenesis*, 40(3), 422-431. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgy186>
- Samec, M., Liskova, A., Koklesova, L., Zhai, K., Varghese, E., Samuel, S. M., Šudomová, M., Lucansky, V., Kassayova, M., Pec, M., Biringer, K., Brockmueller, A., Kajo, K., Hassan, S. T. S., Shakibaei, M., Golubnitschaja, O., Büsselberg, D., & Kubatka, P. (2021). Metabolic Anti-Cancer Effects of Melatonin: Clinically Relevant Prospects. *Cancers*, 13(12), 3018. <https://doi.org/10.3390/cancers13123018>
- Sancar, A., & Van Gelder, R. N. (2021). Clocks, cancer, and chronochemotherapy. *Science (New York, N.Y.)*, 371(6524), eabb0738. <https://doi.org/10.1126/science.abb0738>
- Sancho, E., Batlle, E., & Clevers, H. (2003). Live and let die in the intestinal epithelium. *Current Opinion in Cell Biology*, 15(6), 763-770. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2003.10.012>
- Sansone, R. A., & Sansone, L. A. (2011). Agomelatine: A novel antidepressant. *Innovations in Clinical Neuroscience*, 8(11), 10-14.
- Santoro, R., Marani, M., Blandino, G., Muti, P., & Strano, S. (2012). Melatonin triggers p53Ser phosphorylation and prevents DNA damage accumulation. *Oncogene*, 31(24), 2931-2942. <https://doi.org/10.1038/onc.2011.469>

- Sarrouilhe, D., & Mesnil, M. (2019). Serotonin and human cancer: A critical view. *Biochimie*, 161, 46-50. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2018.06.016>
- Schoen, R. E., Razzak, A., Yu, K. J., Berndt, S. I., Firl, K., Riley, T. L., & Pinsky, P. F. (2015). Incidence and mortality of colorectal cancer in individuals with a family history of colorectal cancer. *Gastroenterology*, 149(6), 1438-1445.e1. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2015.07.055>
- Shafi, A. A., & Knudsen, K. E. (2019). Cancer and the Circadian Clock. *Cancer Research*, 79(15), 3806-3814. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-19-0566>
- Shen, Z.-L., Wang, B., Jiang, K.-W., Ye, C.-X., Cheng, C., Yan, Y.-C., Zhang, J.-Z., Yang, Y., Gao, Z.-D., Ye, Y.-J., & Wang, S. (2016). Downregulation of miR-199b is associated with distant metastasis in colorectal cancer via activation of SIRT1 and inhibition of CREB/KISS1 signaling. *Oncotarget*, 7(23), 35092-35105. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9042>
- Shibue, T., & Weinberg, R. A. (2017). EMT, CSCs, and drug resistance: The mechanistic link and clinical implications. *Nature Reviews. Clinical Oncology*, 14(10), 611-629. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2017.44>
- Shimokawa, M., Ohta, Y., Nishikori, S., Matano, M., Takano, A., Fujii, M., Date, S., Sugimoto, S., Kanai, T., & Sato, T. (2017). Visualization and targeting of LGR5+ human colon cancer stem cells. *Nature*, 545(7653), 187-192. <https://doi.org/10.1038/nature22081>
- Siddiqui, E. J., Shabbir, M. A., Mikhailidis, D. P., Mumtaz, F. H., & Thompson, C. S. (2006). The effect of serotonin and serotonin antagonists on bladder cancer cell proliferation. *BJU International*, 97(3), 634-639. <https://doi.org/10.1111/j.1464-410X.2006.06056.x>
- Skene, D. J., & Arendt, J. (2006). Human circadian rhythms: Physiological and therapeutic relevance of light and melatonin. *Annals of Clinical Biochemistry*, 43(Pt 5), 344-353. <https://doi.org/10.1258/000456306778520142>
- Solomon, H., Dinowitz, N., Pateras, I. S., Cooks, T., Shetzer, Y., Molchadsky, A., Charni, M., Rabani, S., Koifman, G., Tarcic, O., Porat, Z., Kogan-Sakin, I., Goldfinger, N., Oren, M., Harris, C. C., Gorgoulis, V. G., & Rotter, V. (2018). Mutant p53 gain of function underlies high expression levels of colorectal cancer stem cells markers. *Oncogene*, 37(12), Article 12. <https://doi.org/10.1038/s41388-017-0060-8>
- Song, J., Ma, S.-J., Luo, J.-H., Zhang, H., Wang, R.-X., Liu, H., Li, L., Zhang, Z.-G., & Zhou, R.-X. (2018). Melatonin induces the apoptosis and inhibits the proliferation of human gastric cancer cells via blockade of the AKT/MDM2 pathway. *Oncology Reports*, 39(4), 1975-1983. <https://doi.org/10.3892/or.2018.6282>
- Soni, H., Jain, M., & Mehta, A. A. (2011). Investigation into the mechanism(s) of antithrombotic effects of carbon monoxide releasing molecule-3 (CORM-3). *Thrombosis Research*, 127(6), 551-559. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2011.02.009>

- Stoffel, E. M., & Kastrinos, F. (2014). Familial colorectal cancer, beyond Lynch syndrome. *Clinical Gastroenterology and Hepatology: The Official Clinical Practice Journal of the American Gastroenterological Association*, 12(7), 1059-1068. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2013.08.015>
- Stokes, K., Cooke, A., Chang, H., Weaver, D. R., Breault, D. T., & Karpowicz, P. (2017). The Circadian Clock Gene BMAL1 Coordinates Intestinal Regeneration. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*, 4(1), 95-114. <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2017.03.011>
- Stokkan, K. A., Yamazaki, S., Tei, H., Sakaki, Y., & Menaker, M. (2001). Entrainment of the circadian clock in the liver by feeding. *Science (New York, N.Y.)*, 291(5503), 490-493. <https://doi.org/10.1126/science.291.5503.490>
- Stopper, H., Garcia, S. B., Waaga-Gasser, A. M., & Kannen, V. (2014). Antidepressant fluoxetine and its potential against colon tumors. *World Journal of Gastrointestinal Oncology*, 6(1), 11-21. <https://doi.org/10.4251/wjgo.v6.i1.11>
- Sulli, G., Lam, M. T. Y., & Panda, S. (2019). Interplay between Circadian Clock and Cancer: New Frontiers for Cancer Treatment. *Trends in Cancer*, 5(8), 475-494. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2019.07.002>
- Sun, X.-X., Dai, M.-S., & Lu, H. (2007). 5-fluorouracil activation of p53 involves an MDM2-ribosomal protein interaction. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(11), 8052-8059. <https://doi.org/10.1074/jbc.M610621200>
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021a). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(3), 209-249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021b). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(3), 209-249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- Talib, W. H. (2018). Melatonin and Cancer Hallmarks. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 23(3), 518. <https://doi.org/10.3390/molecules23030518>
- Tang, B. L. (2016). Sirt1 and the Mitochondria. *Molecules and Cells*, 39(2), 87-95. <https://doi.org/10.14348/molcells.2016.2318>
- Tardito, D., Molteni, R., Popoli, M., & Racagni, G. (2012). Synergistic mechanisms involved in the antidepressant effects of agomelatine. *European Neuropsychopharmacology: The Journal of the European College of Neuropsychopharmacology*, 22 Suppl 3, S482-486. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2012.06.016>
- Taylor, D., Sparshatt, A., Varma, S., & Olofinjana, O. (2014). Antidepressant efficacy of agomelatine: Meta-analysis of published and unpublished studies. *BMJ (Clinical Research Ed.)*, 348, g1888. <https://doi.org/10.1136/bmj.g1888>

- Thanikachalam, K., & Khan, G. (2019). Colorectal Cancer and Nutrition. *Nutrients*, 11(1), 164. <https://doi.org/10.3390/nu11010164>
- Todaro, M., Francipane, M. G., Medema, J. P., & Stassi, G. (2010). Colon cancer stem cells: Promise of targeted therapy. *Gastroenterology*, 138(6), 2151-2162. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.12.063>
- Tomita, H., Tanaka, K., Tanaka, T., & Hara, A. (2016). Aldehyde dehydrogenase 1A1 in stem cells and cancer. *Oncotarget*, 7(10), 11018-11032. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.6920>
- Torres, F. F., Bernardo, V. S., de Paula, C. P., da Silva, J. P. M. de O., de Almeida, E. A., da Cunha, A. F., & da Silva, D. G. H. (2022). Influence of Melatonin Treatment on Cellular Mechanisms of Redox Adaptation in K562 Erythroleukemic Cells. *Genes*, 13(12), 2337. <https://doi.org/10.3390/genes13122337>
- Tsuchiya, Y., Umemura, Y., & Yagita, K. (2020). Circadian clock and cancer: From a viewpoint of cellular differentiation. *International Journal of Urology: Official Journal of the Japanese Urological Association*, 27(6), 518-524. <https://doi.org/10.1111/iju.14231>
- Vaiopoulos, A. G., Kostakis, I. D., Koutsilieris, M., & Papavassiliou, A. G. (2012). Colorectal cancer stem cells. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 30(3), 363-371. <https://doi.org/10.1002/stem.1031>
- Van der Jeught, K., Xu, H.-C., Li, Y.-J., Lu, X.-B., & Ji, G. (2018). Drug resistance and new therapies in colorectal cancer. *World Journal of Gastroenterology*, 24(34), 3834-3848. <https://doi.org/10.3748/wjg.v24.i34.3834>
- van der Wath, R. C., Gardiner, B. S., Burgess, A. W., & Smith, D. W. (2013). Cell organisation in the colonic crypt: A theoretical comparison of the pedigree and niche concepts. *PloS One*, 8(9), e73204. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073204>
- Vaziri, H., Dessain, S. K., Ng Eaton, E., Imai, S. I., Frye, R. A., Pandita, T. K., Guarente, L., & Weinberg, R. A. (2001). HSIR2(SIRT1) functions as an NAD-dependent p53 deacetylase. *Cell*, 107(2), 149-159. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(01\)00527-x](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(01)00527-x)
- Vellinga, T. T., Borovski, T., Boer, V. C. J. de, Fatrai, S., Schelven, S. van, Trumpi, K., Verheem, A., Snoeren, N., Emmink, B. L., Koster, J., Rinkes, I. H. M. B., & Kranenburg, O. (2015). SIRT1/PGC1 α -Dependent Increase in Oxidative Phosphorylation Supports Chemotherapy Resistance of Colon Cancer. *Clinical Cancer Research*, 21(12), 2870-2879. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-2290>
- Violette, S., Poulain, L., Dussaulx, E., Pepin, D., Faussat, A.-M., Chambaz, J., Lacorte, J.-M., Staedel, C., & Lesuffleur, T. (2002). Resistance of colon cancer cells to long-term 5-fluorouracil exposure is correlated to the relative level of Bcl-2 and Bcl-X(L) in addition to Bax and p53 status. *International Journal of Cancer*, 98(4), 498-504. <https://doi.org/10.1002/ijc.10146>

- Vodenkova, S., Buchler, T., Cervena, K., Veskrnova, V., Vodicka, P., & Vymetalkova, V. (2020). 5-fluorouracil and other fluoropyrimidines in colorectal cancer: Past, present and future. *Pharmacology & Therapeutics*, 206, 107447. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2019.107447>
- Wang, L., Xu, C., Johansen, T., Berger, S. L., & Dou, Z. (2021). SIRT1—A new mammalian substrate of nuclear autophagy. *Autophagy*, 17(2), 593-595. <https://doi.org/10.1080/15548627.2020.1860541>
- Wang, Z. G., Wang, Q., Wang, W. J., & Qin, H. L. (2010). Randomized clinical trial to compare the effects of preoperative oral carbohydrate versus placebo on insulin resistance after colorectal surgery. *The British Journal of Surgery*, 97(3), 317-327. <https://doi.org/10.1002/bjs.6963>
- Wei, J.-Y., Li, W.-M., Zhou, L.-L., Lu, Q.-N., & He, W. (2015). Melatonin induces apoptosis of colorectal cancer cells through HDAC4 nuclear import mediated by CaMKII inactivation. *Journal of Pineal Research*, 58(4), 429-438. <https://doi.org/10.1111/jpi.12226>
- Weiser, M. R., Jarnagin, W. R., & Saltz, L. B. (2013). Colorectal cancer patients with oligometastatic liver disease: What is the optimal approach? *Oncology (Williston Park, N.Y.)*, 27(11), 1074-1078.
- White, E., Mehnert, J. M., & Chan, C. S. (2015). Autophagy, Metabolism, and Cancer. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 21(22), 5037-5046. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-0490>
- Wielenga, V. J., Smits, R., Korinek, V., Smit, L., Kielman, M., Fodde, R., Clevers, H., & Pals, S. T. (1999). Expression of CD44 in Apc and Tcf mutant mice implies regulation by the WNT pathway. *The American Journal of Pathology*, 154(2), 515-523. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)65297-2](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)65297-2)
- Winczyk, K., Fuss-Chmielewska, J., Lawnicka, H., Pawlikowski, M., & Karasek, M. (2009a). Luzindole but not 4-phenyl-2- propionamidotetralin (4P-PDOT) diminishes the inhibitory effect of melatonin on murine Colon 38 cancer growth in vitro. *Neuro Endocrinology Letters*, 30(5), 657-662.
- Winczyk, K., Fuss-Chmielewska, J., Lawnicka, H., Pawlikowski, M., & Karasek, M. (2009b). Luzindole but not 4-phenyl-2- propionamidotetralin (4P-PDOT) diminishes the inhibitory effect of melatonin on murine Colon 38 cancer growth in vitro. *Neuro Endocrinology Letters*, 30(5), 657-662.
- Wu, H., Liu, J., Yin, Y., Zhang, D., Xia, P., & Zhu, G. (2019). Therapeutic Opportunities in Colorectal Cancer: Focus on Melatonin Antioncogenic Action. *BioMed Research International*, 2019, undefined-undefined. <https://doi.org/10.1155/2019/9740568>
- Wu, S. et al. (2003). *Myc represses differentiation-induced p21CIP1 expression via Miz-1-dependent interaction with the p21 core promoter* | *Oncogene*. <https://www.nature.com/articles/1206145>

- Xie, Y.-H., Chen, Y.-X., & Fang, J.-Y. (2020). Comprehensive review of targeted therapy for colorectal cancer. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 5(1), 22. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-0116-z>
- Xu, W., He, Y., Wang, Y., Li, X., Young, J., Ioannidis, J. P. A., Dunlop, M. G., & Theodoratou, E. (2020). Risk factors and risk prediction models for colorectal cancer metastasis and recurrence: An umbrella review of systematic reviews and meta-analyses of observational studies. *BMC Medicine*, 18(1), 172. <https://doi.org/10.1186/s12916-020-01618-6>
- Yamakuchi, M., Ferlito, M., & Lowenstein, C. J. (2008). MiR-34a repression of SIRT1 regulates apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(36), 13421-13426. <https://doi.org/10.1073/pnas.0801613105>
- Yang, Y., Liu, Y., Wang, Y., Chao, Y., Zhang, J., Jia, Y., Tie, J., & Hu, D. (2022). Regulation of SIRT1 and Its Roles in Inflammation. *Frontiers in Immunology*, 13, 831168. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.831168>
- Yh, C., Ej, R., Js, Y., T, M., Dw, K., Jc, P., T, I. K., H, C., & Ky, C. (2020). 5-FU promotes stemness of colorectal cancer via p53-mediated WNT/ β -catenin pathway activation. *Nature Communications*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19173-2>
- Yi, J., & Luo, J. (2010). SIRT1 and p53, effect on cancer, senescence and beyond. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1804(8), 1684-1689. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2010.05.002>
- Yin, J.-Y., Lu, X.-T., Hou, M.-L., Cao, T., & Tian, Z. (2023). Sirtuin1-p53: A potential axis for cancer therapy. *Biochemical Pharmacology*, 212, 115543. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2023.115543>
- Yiu, A. J., & Yiu, C. Y. (2016). Biomarkers in Colorectal Cancer. *Anticancer Research*, 36(3), 1093-1102.
- Yu, D.-F., Jiang, S.-J., Pan, Z.-P., Cheng, W.-D., Zhang, W.-J., Yao, X.-K., Li, Y.-C., & Lun, Y.-Z. (2016). Expression and clinical significance of Sirt1 in colorectal cancer. *Oncology Letters*, 11(2), 1167-1172. <https://doi.org/10.3892/ol.2015.3982>
- Zawacka-Pankau, J. E. (2022). The Role of p53 Family in Cancer. *Cancers*, 14(3), 823. <https://doi.org/10.3390/cancers14030823>
- Zeilstra, J., Joosten, S. P. J., van Andel, H., Tolg, C., Berns, A., Snoek, M., van de Wetering, M., Spaargaren, M., Clevers, H., & Pals, S. T. (2014). Stem cell CD44v isoforms promote intestinal cancer formation in Apc(min) mice downstream of Wnt signaling. *Oncogene*, 33(5), 665-670. <https://doi.org/10.1038/onc.2012.611>
- Zhang, S., Xiong, X., & Sun, Y. (2020). Functional characterization of SOX2 as an anticancer target. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 5(1), 135. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-00242-3>
- Zhang, Y., Gan, B., Liu, D., & Paik, J. (2011). FoxO family members in cancer. *Cancer Biology & Therapy*, 12(4), 253-259. <https://doi.org/10.4161/cbt.12.4.15954>

- Zhang, Z., & Huang, J. (2013). Intestinal stem cells—Types and markers. *Cell Biology International*, 37(5), 406-414. <https://doi.org/10.1002/cbin.10049>
- Zheng, S., Xin, L., Liang, A., & Fu, Y. (2013). Cancer stem cell hypothesis: A brief summary and two proposals. *Cytotechnology*, 65(4), 505-512. <https://doi.org/10.1007/s10616-012-9517-3>
- Ziółko, E., Kokot, T., Skubis, A., Sikora, B., Szota-Czyż, J., Kruszniewska-Rajs, C., Wierzgoń, J., Mazurek, U., Grochowska-Niedworok, E., & Muc-Wierzgoń, M. (2015). The profile of melatonin receptors gene expression and genes associated with their activity in colorectal cancer: A preliminary report. *Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents*, 29(4), 823-828.
- Zu, G., Ji, A., Zhou, T., & Che, N. (2016). Clinicopathological significance of SIRT1 expression in colorectal cancer: A systematic review and meta analysis. *International Journal of Surgery*, 26, 32-37. <https://doi.org/10.1016/j.ijssu.2016.01.002>
- Zupancic, M., & Guilleminault, C. (2006). Agomelatine: A Preliminary Review of a New Antidepressant. *CNS Drugs*, 20(12), 981-992. <https://doi.org/10.2165/00023210-200620120-00003>

PUBLICACIÓN



Article

Agomelatine, a Melatonin-Derived Drug, as a New Strategy for the Treatment of Colorectal Cancer

Sara Moreno-SanJuan ^{1,2,†}, Jose D. Puentes-Pardo ^{2,3,†} , Jorge Casado ², Julia Escudero-Feliu ², Huda Khaldy ⁴, Javier Arnedo ⁵ , Ángel Carazo ^{2,6,‡} and Josefa León ^{2,7,*}

¹ Cytometry and Microscopy Research Service, Biosanitary Research Institute of Granada (ibs.GRANADA), 18012 Granada, Spain

² Biosanitary Research Institute of Granada (ibs.GRANADA), 18012 Granada, Spain

³ Department of Pharmacy, University of Granada, 18011 Granada, Spain

⁴ Fundamental Biology Service, Scientific Instrument Center, University of Granada, 18071 Granada, Spain

⁵ Department of Statistics and Operations Research, University of Granada, 18071 Granada, Spain

⁶ Clinical Management Unit of Microbiology, San Cecilio University Hospital, 18006 Granada, Spain

⁷ Clinical Management Unit of Digestive Disease, San Cecilio University Hospital, 18006 Granada, Spain

* Correspondence: pepileon@ugr.es; Tel.: +34-95-802-3709

† These authors contributed equally to this work.

‡ These authors contributed equally to this work.

Abstract: The potential use of agomelatine as an alternative treatment for colorectal cancer is evaluated in this work. The effect of agomelatine was studied in an in vitro model using two cell lines with different p53 statuses (HCT-116, wild-type p53, and HCT-116 p53 null) and an in vivo xenograft model. The inhibitory effects of agomelatine and melatonin were stronger in the cells harboring the wild-type p53, although in both cell lines, the effect of agomelatine was greater than that of the melatonin. In vivo, only agomelatine was able to reduce the volumes of tumors generated by the HCT-116-p53-null cells. Both treatments induced changes in the rhythmicity of the circadian-clock genes in vitro, albeit with some differences. Agomelatine and melatonin regulated the rhythmicity of Per1-3, Cry1, Sirt1, and Prx1 in the HCT-116 cells. In these cells, agomelatine also regulated Bmal1 and Nr1d2, while melatonin changed the rhythmicity of Clock. In the HCT-116-p53-null cells, agomelatine regulated Per1-3, Cry1, Clock, Nr1d2, Sirt1, and Prx1; however, melatonin only induced changes in Clock, Bmal1, and Sirt1. The differences found in the regulation of the clock genes may explain the greater oncostatic effect of agomelatine in CRC.

Keywords: agomelatine; melatonin; p53; circadian clock; colorectal cancer; SIRT1



Citation: Moreno-SanJuan, S.; Puentes-Pardo, J.D.; Casado, J.; Escudero-Feliu, J.; Khaldy, H.; Arnedo, J.; Carazo, Á.; León, J. Agomelatine, a Melatonin-Derived Drug, as a New Strategy for the Treatment of Colorectal Cancer. *Antioxidants* **2023**, *12*, 926. <https://doi.org/10.3390/antiox12040926>

Academic Editors: Marina Garcia-Macia and Adrián Santos-Ledo

Received: 10 February 2023

Revised: 1 April 2023

Accepted: 6 April 2023

Published: 13 April 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Colorectal cancer (CRC) is the third most common type of cancer and the second in terms of mortality worldwide [1]. The current treatments for CRC include 5-fluorouracil (5-FU) as a standard agent for chemotherapy, either as a single agent or in combination with other drugs, such as oxaliplatin or irinotecan [2]. However, these treatments have several limitations, such as severe side effects and the development of chemoresistance, which lead to unsatisfactory results [3]. These limitations have encouraged the development of the so-called targeted therapies, which are based on targeting concrete pathways according to each patient's characteristics. However, the clinical application of these therapies is far from being established because they do not provide an improvement in cost-benefit terms, they still possess adverse effects, they differ in efficacy between patients with similar characteristics, and resistance has been shown to arise [2,3]. Therefore, there is a necessity to develop new approaches to improve or replace the current treatments.

Circadian rhythms are cyclic biological processes with a duration of close to 24 h, which are implicated in the regulation of major physiological events, such as the sleep–wake cycle, reproduction, and inflammatory and immune responses, among others. At

the molecular level, the circadian rhythm consists of transcription–translation feedback loops (TTFL). The transcription-factor brain and muscle ARNT-like (BMAL-1) dimerizes circadian locomotor cycles kaput (CLOCK) and stimulates the transcription of Period 1-3 (Per1-3), Cryptochrome 1-2 (Cry1-2), the nuclear receptor subfamily 1 group D member 2 (Nr1d2), and RAR-related orphan receptor alpha (ROR α) genes. In turn, the PER1-3 and CRY1-2 proteins form complexes in the cytoplasm and, when their concentration reaches a certain level, they translocate to the nucleus, where they inhibit the action of BMAL-1 and CLOCK and, thus, the transcription of their own genes. The PER/CRY complex is degraded, allowing the cycle to be restored every 24 h [4].

The circadian clock is not only based on transcriptional mechanisms; post-translational modifications of core circadian genes have also been described. Sirtuin 1 (SIRT1) is a nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺)-dependent class III histone deacetylase, which is involved in cellular redox control [5]. It regulates the circadian clock at the central-nervous-system level by activating BMAL1 and CLOCK transcription [6]. At the peripheral level, it deacetylates BMAL1, affecting its activity [7], and PER2, preventing its dimerization with CRY [8]. It can also bind to CLOCK/BMAL1 complexes, which alters the expression of other associated genes, such as PER, in a manner that is probably related to the variable concentration of its co-enzyme, NAD⁺ [9]. In addition, the existence of circadian rhythms independent of the canonical molecular clock has been demonstrated. Specifically, there is a circadian rhythm of oxidation-reduction of peroxiredoxin-1 (PRX1), an antioxidant protein that scavenges hydrogen peroxide. This cycle is interconnected with the TTFL cycle, and both are individually necessary for the maintenance of rhythms at the cellular level [10]. In fact, it has been demonstrated that SIRT1 can activate PRX1 transcription [11]. The human PRX1 gene is a target of nuclear factor erythroid 2 related factor-2 (Nrf2) [12], a transcription factor shared by several antioxidant enzymes [13]. Furthermore, SIRT1 increases Nrf2 activation and decreases its polyubiquitination by decreasing the expression of Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1)/Cullin 3 (Cul3) and by increasing Nrf2's binding ability to anti-oxidant response element (ARE) [14].

Alterations in circadian rhythmicity have been linked to the onset and development of cancer [15]. Furthermore, the tolerability and efficacy of radiotherapy and chemotherapy also depend on circadian rhythms [16]. These experimental findings have raised interest in manipulating rhythms to prevent malignant transformation, to develop novel treatment strategies, and ultimately improve the outcomes of cancer patients [17]. In this sense, melatonin is an indolic compound secreted mainly by the pineal gland, although it can also be found in extrapineal tissues; it plays a key role in the control of circadian rhythms [18]. Melatonin exerts oncostatic properties in several cancer types. Regarding CRC, melatonin reduces tumour growth and proliferation and induced apoptosis in *in vitro* [19,20] and *in vivo* models [21]. Some of melatonin's functions are mediated by the melatonin receptors MT1 and MT2. In fact, in CRC patients showed decreased levels of MT1 and MT2, without changes in melatonin levels, compared to their paired mucosa, in association with gender and invasion [22]. In addition, MT1 and MT2 levels are negatively correlated with cancer-stem-cell markers (CSCs), considered as the origins and major contributors to cancer progression, metastasis, and therapy resistance [23]. Taken together, these reports suggest that the use of non-selective MT1/MT2 agonists may be an interesting new approach for the treatment of CRC.

Agomelatine is a naphthalene analogue of melatonin, which shows agonist activities toward MT1/MT2 receptors, as well as greater affinity with them than melatonin, and antagonist activity toward the serotonin 5-HT_{2c} receptor, and its use as an antidepressant drug has been approved [24]. Different *in vivo* models have proven that agomelatine synchronizes circadian rhythms, probably through MT1/MT2-receptor interaction [25]. The activation of MT1/MT2 synergically works with the blockage of the 5-HT_{2c} receptor, resulting in neurogenesis induction, synaptic remodeling, and glutamate signaling, which explains agomelatine's antidepressant role [24]. Curiously, serotonin has been associated with the progression of several cancer types, including CRC, and serotonin-receptor in-

hibitors may be used as therapy [26]. Along with the aforementioned influence of circadian rhythms and MT1/MT2 on cancer development and progression, this suggests that agomelatine could be used as a treatment for CRC. However, to date, no studies exploiting this alternative function have been reported.

An interconnected pathway of regulation exists between melatonin, circadian clocks, and SIRT1 [27]. Agomelatine also regulates SIRT1 in several models of disease [28,29]. In this study, we evaluate the use of agomelatine as an antitumor therapy in established colorectal cell lines *in vitro* and *in vivo* in nude mice. We also analyze the implication of the SIRT1/PRX1 pathway in the regulation of the rhythmicity of core clock genes by agomelatine.

2. Materials and Methods

2.1. Cell Culture and Reagents

The colorectal adenocarcinoma cell lines HCT-116 (p53 wild type) and HCT-116 p53 null (Horizon Discovery Ltd., Cambridge, UK) were grown under standard conditions (37 °C and 5% CO₂ in a humid atmosphere) using RPMI 1640 medium supplemented with 10% FBS and 1% penicillin-streptomycin (Gibco; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). For the experiments that required cell synchronization, cells were cultured in serum-free medium for 6 h prior to the initiation of the experiment [1]. Next, the cells were cultured in media with serum in the conditions required for the experiments carried out.

Melatonin, agomelatine, fluorouracil (5-FU), and the remaining reagents employed in this study were obtained from Sigma-Aldrich (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA).

2.2. Cell Viability Assay

Cell viability was analyzed with 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay. Briefly, 4000 cells were seeded per well in a 96-well plate in a final volume of 100 µL. Twenty-four hours later, the cells were treated with different drugs and concentrations for 24, 48, and 72 h. Once the treatment was stopped, 10 µL of MTT (5 mg/mL) was added and the plate was incubated for 4 h at 37 °C and 5% CO₂. Subsequently, 100 µL of lysis buffer (20% SDS in 50% formamide, pH 4.7) was added, and the plate was kept at 37 °C and 5% CO₂ overnight. Optical density was measured with a Triad Multimode Microplate reader (Cultek SL, Madrid, Spain) at 570 nm.

2.3. Sphere-Formation Assay

Three-dimensional spheroids were generated and cultured in the InSphero GravityPLUS™ Hanging Drop System (PerkinElmer), according to the manufacturer's instructions. Briefly, cells were seeded at a density of 2500 cells per well in a 96-well GravityPLUS™ Plate and placed in a 5% humidified CO₂ incubator at 37 °C. After 3 days in culture, cells formed visible spheroids that were transferred to the GravityTRAP™ Plate and allowed to grow for 4 more days. Every 2 days, the medium was changed. Subsequently, spheroids were treated with different doses of melatonin and agomelatine for 3 more days. Spheroids were imaged using a 4× objective on the image module of an EnSight™ plate reader (PerkinElmer, Waltham, MA, USA). Acquired Images were automatically analyzed by the Kaleido 2.0 software.

2.4. Clonogenic Assay

Cells were seeded in 6-well plates at a concentration of 10³ cells/well and left to grow 72 h. Next, cells were treated for 72 h. Subsequently, the medium was changed, and cells were allowed to grow under standard conditions for 10 more days. To perform fixation and staining of colonies, the medium was removed, and the cells were incubated for 5 min with 0.5% crystal-violet-oxalate solution in 50% methanol. Colonies with more than 50 cells were counted.

2.5. Cell-Cycle Analysis

The percentage of cells in each cell-cycle phase was determined based on the cellular DNA content in at least 20,000 nuclei. Cells were seeded in 6-well plates and after treatments, they were harvested, washed with PBS, and fixed with 200 μ L of 70% ice-cold ethanol at 4 °C for 30 min. Next, cells were washed with a solution of PBS containing 2% BSA and incubated in 500 μ L of PI/RNase solution (Immunostep SL; Salamanca, Spain) at room temperature in darkness for 15 min. The percentages of cells in G0/G1, S, and G2/M phases were determined using a BD FACSAria IIIu flow cytometer (Becton Dickinson, BD Biosciences; Franklin Lakes, NJ, USA) from the Cytometry and Microscopy Research Service of the Biosanitary Research Institute of Granada. Experiments were performed at least three times and three samples per group were analyzed in each case.

2.6. Apoptosis Assay

The percentages of apoptotic cells in response to the different treatments were analyzed using a FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA). Briefly, the cells were seeded in 6-well plates, and after treatments they were harvested and washed with PBS and concentrated at 1×10^6 cells/mL. About 10^5 cells (100 μ L) were incubated with Annexin V-FITC and propidium iodide at room temperature and in darkness for 15 min. The samples were immediately analyzed using a BD FACSAria IIIu flow cytometer (Becton Dickinson, BD Biosciences; Franklin Lakes, NJ, USA) from the Cytometry and Microscopy Research Service of the Biosanitary Research Institute of Granada. The percentage of apoptosis was calculated by taking into account the sum of percentages of apoptotic cells (Annexin-FITC+/PI−) and late apoptotic cells (Annexin-FITC+/PI+).

2.7. Real-Time PCR

Total RNA was extracted using TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). The RNA was reverse-transcribed by RT-PCR into cDNA using the commercial kit, AccuScript™ High Fidelity 1st Strand cDNA Synthesis Kit (Stratagene, Austin, TX, USA), according to the manufacturer's instructions.

About 5 μ L of the cDNA was amplified with specific primers for Per1, Per2, Per3, Cry1, Clock, Bmal1, Nr1d2, SIRT1, PRX1, and UBC (Table S1). Furthermore, PCR reactions with SYBER-green were performed using the Mx3000P qPCR System (Stratagene, Austin, TX, USA). Relative expression was calculated using UBC as a reference gene. Standard curves for each gene were made by plotting C_t values versus log cDNA dilution.

2.8. Immunoblot

Proteins were isolated from the lysed cells in RIPA buffer supplemented with protease inhibitors) for 30 min at 4 °C. The amount of proteins was quantified through Bradford assay, and samples were loaded in equal amounts (50 μ g) into 12% SDS-polyacrylamide gels. The proteins resolved were transferred into PVDF-transfer membranes using a Bio-Rad Trans-Blot Turbo Transfer System (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA). The blots were probed with the appropriate antibodies for caspase-3 (Santa Cruz Biotechnology, dilution 1:200), p53 (Santa Cruz Biotechnology, dilution 1:200), and β -Actin (Santa Cruz Biotechnology, dilution 1:200). As secondary antibody, HRP-conjugated anti-mouse antibody (Santa Cruz Biotechnology, dilution 1:50,000) was used. Amersham ECL Select Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare, Chicago, IL, USA) was applied before luminography for protein detection in a ChemiDoc MP System (Bio-Rad Inc., Hercules, CA, USA).

2.9. In Vivo Anti-Tumor Xenograft Studies

Female athymic Balb/c (nu/nu) mice (Charles Rivers Laboratory, Wilmington, MA, USA) housed in a regular 12:12 light–dark (LD) cycle (lights on at 08:00 h) were used for the in vivo studies. The mice were maintained in quarantine for a week before the

subcutaneous injection of 2.5×10^6 HCT-116 and HCT-116-p53-null cells suspended in 100 μ L of RPMI 1640 medium into the right and left sides, respectively. Once the tumor size reached about 50–100 mm³, the animals were randomly divided into 4 groups (n = 8) and intraperitoneally treated for 2 weeks. Groups were as follows: (1) control (vehicle, three times per week); (2) melatonin (5 mg/kg, three times per week); (3) agomelatine (5 mg/kg, three times per week); (4) 5-fluorouracil (50 mg/kg, two times per week). The agomelatine and melatonin groups were treated two hours before lights off, whereas the 5-fluorouracil group was treated 2 h after lights on. The tumor growth was measured three times per week and calculated by the formula $V = (4\pi/3) \times (\text{width}/2)^2 \times (\text{length}/2)$. Blood of each animal was extracted to analyze different biochemical parameters (glucose, urea, uric acid, AST, ALT, and amylase) by a Cobas c311 analyzer (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland). Two weeks after the initiation of the treatments, the animals were sacrificed, and the tumors were extracted.

2.10. Statistical Analysis

All the experiments were performed at least in triplicate and data were expressed as mean $\pm$ SEM. To obtain circadian parameters, we determined the correct distribution (data interdependency and normal distribution) for each set of time-series data by lag plots/Q-test and normal probability plots/K-S test and, next, we calculated the acrophase and amplitude through the cosinor method using the TSA (Time Series Analysis—Cosinor 8.0 Lab View January 2020) software (<http://www.euroestech.com/>, accessed on 21 January 2020). Detection of rhythm was achieved by rejection of the zero-amplitude hypothesis with 95% certainty, as reflected by the *p* value. The amplitude (i.e., the difference between the peak or trough and the mean value of a cosine curve), acrophase (i.e., the phase angle of the peak of a cosine curve), and midline estimating statistic of rhythm (MESOR) (i.e., the average value of cosine curve fitted to the data) were compared where applicable using 48-h trial period, since, in some cases, the oscillation period of the genes studied was close to this time. Nevertheless, comparisons were also performed using a 24-h test period (Tables S2–S5), with similar results obtained at both periods. Data from fitted curves were transferred to GraphPad Prism (GraphPad, La Jolla, SD, USA). Rhythm characteristics (MESOR, amplitude, acrophase) for each variable were compared by a non-parametric test [30,31].

3. Results

3.1. Agomelatine Inhibits the Growth of Human CRC Cells in a p53-Dependent Manner

Two established CRC cell lines, HCT-116 (wild-type p53) and HCT-116 p53 null, were used to evaluate the antiproliferative effects of agomelatine *in vitro*. Cells were cultured in the presence of increasing concentrations of agomelatine (0–1 mM) for 24, 48, and 72 h. Treatment of both cell lines with agomelatine led to a dose-dependent inhibitory effect on cell growth at all times studied (Figure S1a,b). Similarly, the effect of melatonin was dose-dependent in both cell lines, although in HCT-116-p53-null cells, the indoleamine reduced cell growth significantly after 48 h treatment and at the highest dose studied (1 mM) (Figure S1c,d). We next compared the effects of both drugs regarding the p53 status of the cells at 72 h. Treatment of both cell lines with agomelatine inhibited cell growth significantly from the lowest dose used (0.1 mM), although the effect was higher in the HCT-116 than in the HCT-116 p53 null (Figure 1a). As we expected, melatonin was more effective on the HCT-116 than on the HCT-116 p53 null. As shown in Figure 1b, melatonin significantly inhibited the HCT-116's growth from 0.25 mM, whereas in the HCT-116 p53 null, the effect was statistically significant from 0.5 mM. These results indicate that agomelatine is more potent than melatonin in inhibiting CRC growth *in vitro*.

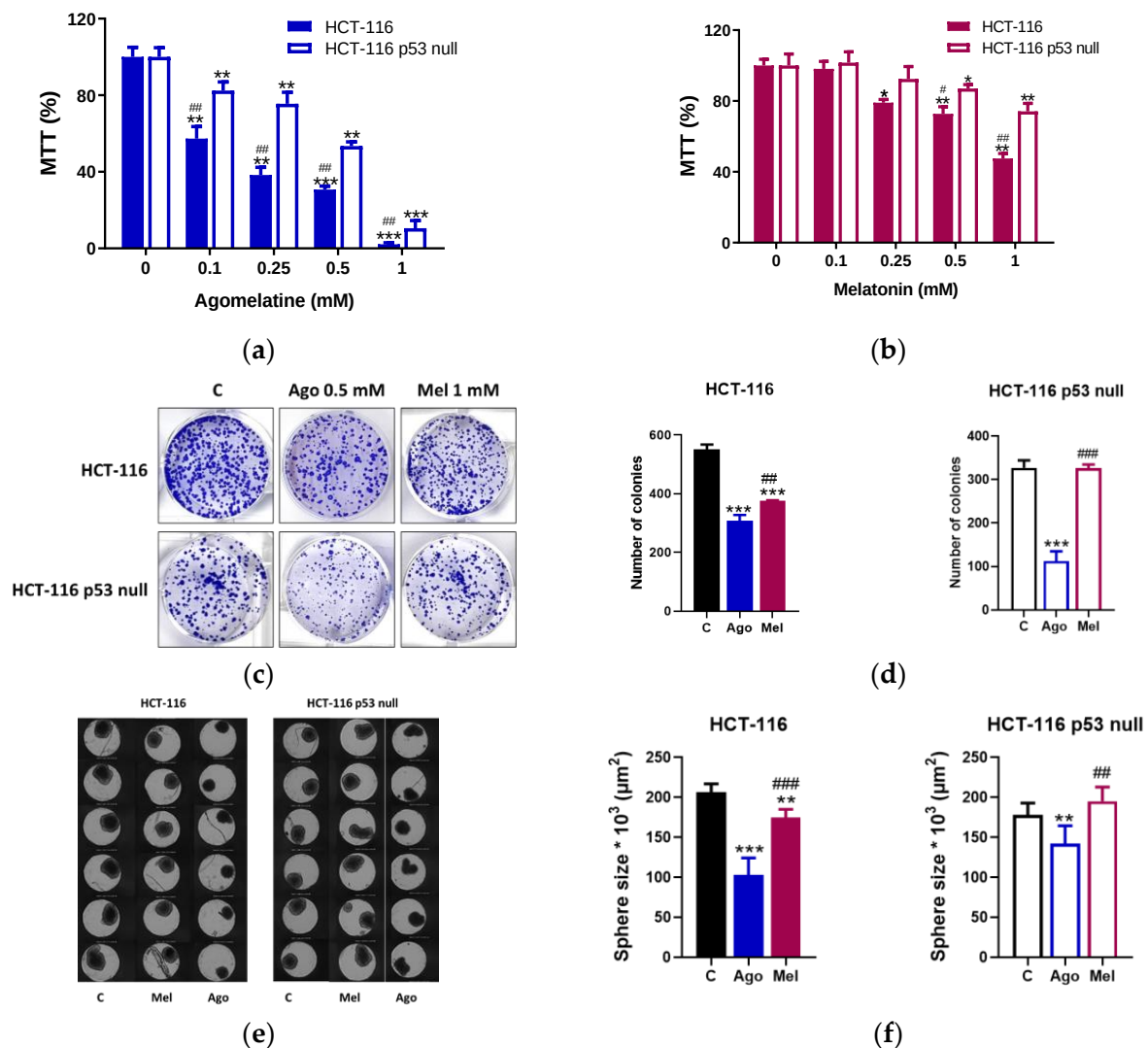


Figure 1. Inhibition of viability on HCT-116 and HCT-116-p53-null cells by (a) agomelatine and (b) melatonin. The results represent the mean $\pm$ SD of three experiments performed in quadruplicate. * $p < 0.05$ vs. C; ** $p < 0.01$ vs. C; *** $p < 0.001$ vs. C; ### $p < 0.01$ vs. the same concentration of agomelatine (Ago) or melatonin (Mel); # $p < 0.05$ vs. the same concentration of melatonin (Mel) or agomelatine (Ago). (c) Representative example of colony-formation assay and (d) graphical representation of three experiments in HCT-116 and HCT-116-p53-null cells after treatment with agomelatine (Ago) (0.5 mM) and melatonin (Mel) (1 mM) versus control (C) cells. Results are presented as means $\pm$ SD. *** Values of $p < 0.001$ versus C; ## $p < 0.01$ vs. agomelatine; ### $p < 0.001$ vs. agomelatine. In other experiments, (e) HCT-116 and HCT-116-p53-null cells were cultured in a 3D model and (f) the size of the spheroids was measured in control and after agomelatine (Ago) (0.5 mM) and melatonin (Mel) (1 mM) treatments during 72 h. ** Values of $p < 0.01$ vs. C; *** $p < 0.001$ vs. C; ## $p < 0.01$ vs. melatonin; ### $p < 0.001$ vs. melatonin.

We also conducted a clonogenic assay for up to 10 days after treatment to evaluate the long-term effects of agomelatine and melatonin on the cancer-cell survival (Figure 1c). Notably, the number of colonies in the HCT-116 cells reduced after the treatments with agomelatine (0.5 mM) and melatonin (1 mM), although the effect of agomelatine was significantly higher ($p < 0.01$) (Figure 1d). Only agomelatine (0.5 mM) was able to reduce the number of colonies in the HCT-116-p53-null cells (Figure 1d).

To corroborate these results, we also performed a 3D-culture model. To identify the sizes of the spheroids formed (Figure 1e), images were obtained and, subsequently, the

perimeter was calculated (Figure 1f). According to the results described in the 2D model, both agomelatine (0.5 mM) and the melatonin (1 mM) reduced the sizes of the spheroids in the HCT-116, and agomelatine was more potent than melatonin ($p < 0.001$) at the doses used. In the HCT-116-p53-null cells, only agomelatine was able to reduce the sizes of the spheroids formed.

3.2. Agomelatine Induces Cell-Cycle Arrest and Caspase-Dependent Apoptosis in CRC Cells

The cell-cycle distribution after agomelatine and melatonin treatments was assessed by flow cytometry (Figures S2 and S3). The treatment with 0.5 mM of agomelatine for 72 h induced accumulation in the G2/M phase of the cycle in the HCT-116 ($33.25 \pm 1.91\%$ of agomelatine-treated cells in the G2/M vs. $23.35 \pm 1.42\%$ of control cells in the same phase) and the HCT-116 p53 null ($35.50 \pm 1.13\%$ of agomelatine-treated cells in the G2/M vs. $19.90 \pm 1.42\%$ of control cells in the same phase). Agomelatine treatment also resulted in a decrease in the number of cells in the G1 phase in the HCT-116 ($33.25 \pm 5.24\%$ in the agomelatine-treated group vs. $69.47 \pm 1.72\%$ in the control cells) and HCT-116 p53 null ($54.90 \pm 2.07\%$ in the agomelatine-treated group vs. $73.00 \pm 2.68\%$ in the control cells). The treatment of the cells with 0.25 mM agomelatine produced similar variations in cell-cycle distribution in the HCT-116-p53-null cells (Figure 2a,b).

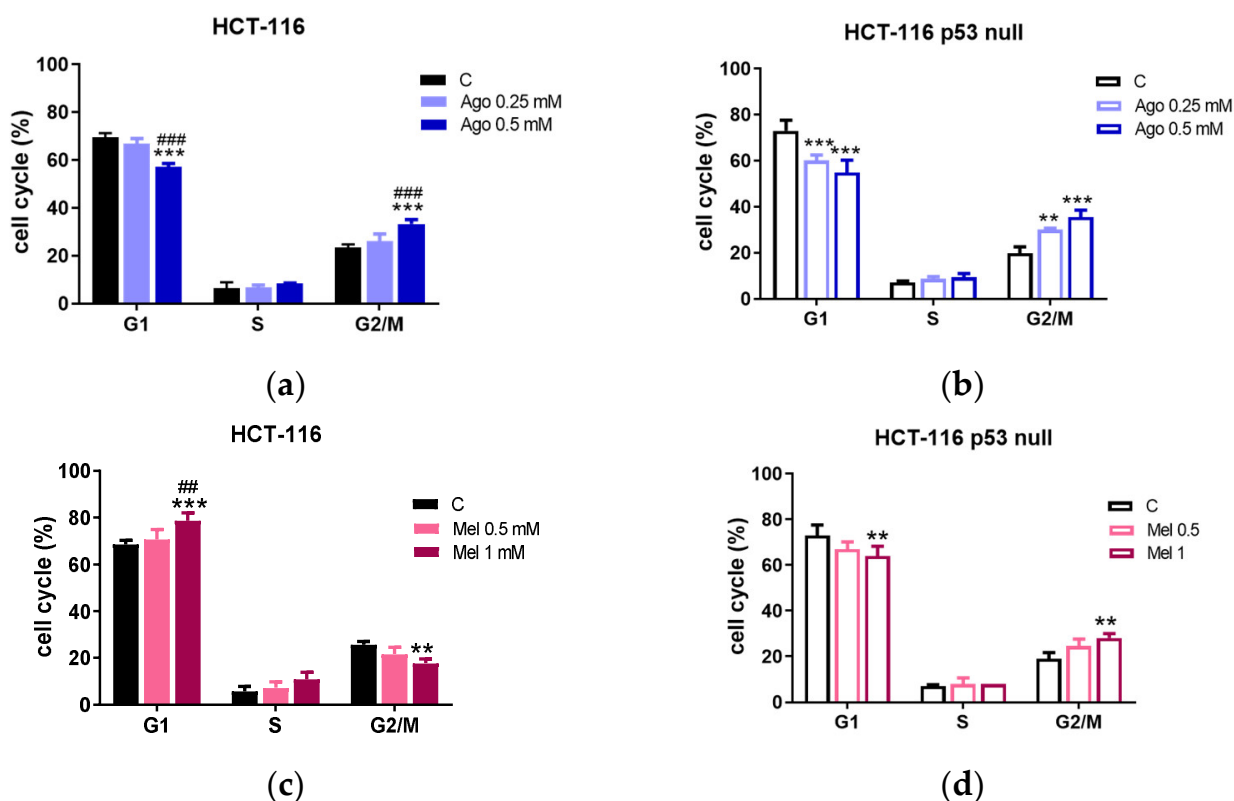


Figure 2. Percentage distribution in the different stages of the cell-cycle after treatment of HCT-116 and HCT-116-p53-null cells with agomelatine (Ago) (a,b) and melatonin (Mel) (c,d). Data represent the mean $\pm$ SD of three experiments performed in triplicate. ** Values of $p < 0.01$ vs. C; *** $p < 0.001$ vs. C. ## $p < 0.01$ vs. lower doses of treatment; ### $p < 0.001$ vs. lower doses of treatment.

The treatment with 1 mM melatonin for 72 h induced accumulation in the G1 phase of the cycle in the HCT-116 ($78.70 \pm 3.33\%$ of melatonin-treated cells versus $68.5 \pm 1.83\%$ of control cells). This was associated with a decrease in the number of cells in the G2/M ($17.70 \pm 1.91\%$ in the melatonin-treated group vs. $25.60 \pm 1.42\%$ in control cells). In the HCT-116-p53-null cells, we found an accumulation of cells in the G2/M phase ($28.10 \pm 1.91\%$ of melatonin-treated cells versus $19.00 \pm 2.73\%$ of control cells) and a decrease in the G1

phase ($64.00 \pm 4.33\%$ in the melatonin-treated group vs. $73.00 \pm 4.59\%$ in the control cells). The treatment with 0.5 mM melatonin did not produce any significant variations in the cell-cycle distribution in either of the two lines tested (Figure 2c,d).

In addition to the effects on the cell growth and cell cycle *in vitro*, we studied whether agomelatine and melatonin induced cell death through apoptosis using annexin V and propidium iodide and analyzing cell populations stained by flow cytometry (Figures S4 and S5).

The treatment with agomelatine induced a high percentage of apoptosis in both cell lines after 72 h at the doses studied (Figure 3a). Differences were found in the number of apoptotic cells in the two lines, although they were only observed at the lowest dose of agomelatine used (0.25 mM), and were greater in the HCT-116 cells (Figure 3a). When we used melatonin as a treatment for 72 h, we found increased apoptosis in the two cell lines tested only at 1 mM, while a smaller concentration of the indolamine (0.5 mM) did not produce cytotoxicity in either of the two lines analyzed. As expected, the percentage of cell death by apoptosis was higher in both cell lines treated with agomelatine.

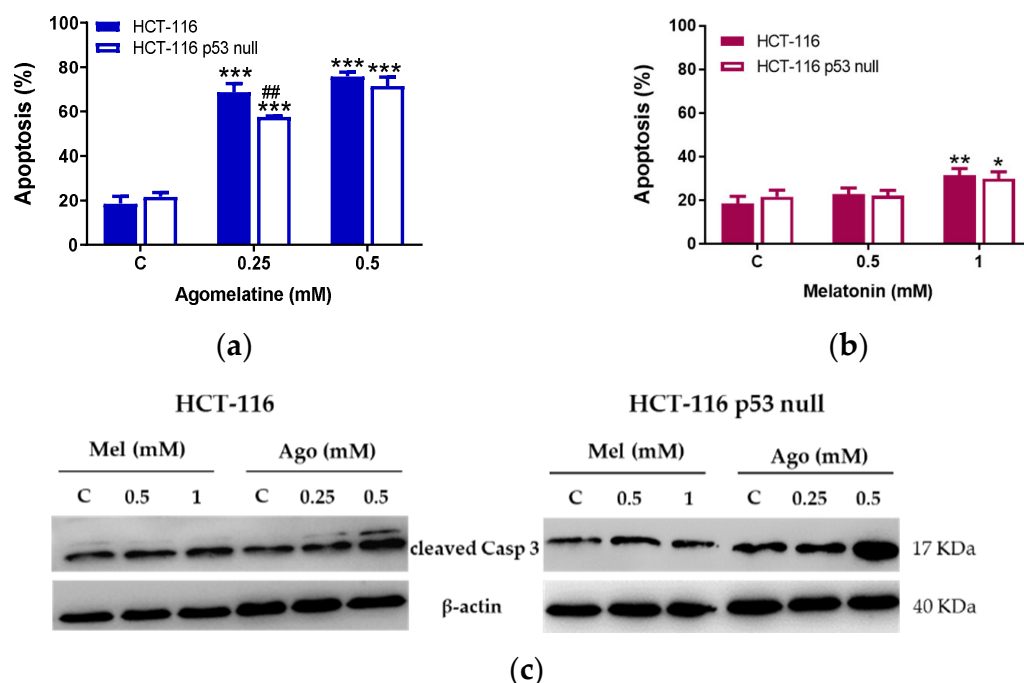


Figure 3. Percentage of apoptosis in HCT-116 and HCT-116-p53-null cells after agomelatine (a) and melatonin (b) treatments. Data represent the mean $\pm$ SD of three experiments performed in duplicate. * Values of $p < 0.05$ vs. C; ** $p < 0.01$ vs. C; *** $p < 0.001$ vs. C; ## $p < 0.01$ vs. HCT-116. (c) Expression of cleaved caspase-3 after treatment for 72 h with different doses of melatonin (Mel) and agomelatine (Ago) on HCT-116 and HCT-116 p53 null.

As shown in Figure 3c, the cell death induced by agomelatine was caspase-dependent, since this treatment induced increased the expression of active caspase-3 (cleaved caspase-3), at least at the higher doses used (0.5 mM), in the HCT-116 and HCT-116-null cells.

3.3. Regulation of Tumor Growth *In Vivo* by Agomelatine

To study their effect on tumor growth *in vivo* and to analyze possible side effects after treatment with both drugs, the HCT-116 and HCT-116-p53-null cell lines were injected into the right and left flanks of the immunosuppressed Balb/c nu/nu mice, respectively. Agomelatine and melatonin were injected at a dose of 5 mg/kg of body weight three times per week. A group of animals injected with 5-fluorouracil (5-FU) at a dose of 50 mg/kg twice per week was also used. This treatment was chosen to compare the effects of both agomelatine and melatonin, since it remains the first-line treatment for CRC, both

alone (capecitabine) or in combination with other drugs (oxaliplatin and irinotecan, among others). The protein p53 serves as the major route for the anti-cancer effect of 5-FU [32]. In fact, the absence of an active p53 drastically reduces its effectiveness [33].

At the doses used, all the drugs reduced the sizes of the tumors generated by the HCT-116 cells. In this case, agomelatine and 5-FU showed similar levels of potency ($p < 0.05$ vs. non-treated mice). Melatonin showed an almost statistically significant effect ($p = 0.076$) (Figure 4a). In the tumors generated by the HCT-116-p53-null cells, only agomelatine was able to reduce their size ($p < 0.05$), and its effect was significantly different from that of the 5-FU ($p < 0.01$) (Figure 4b). At the systemic level, agomelatine and melatonin led to an increase in blood glucose and alanine transaminase (ALT), whereas the treatment with 5-FU induced an increase in ALT levels (Figure S6).

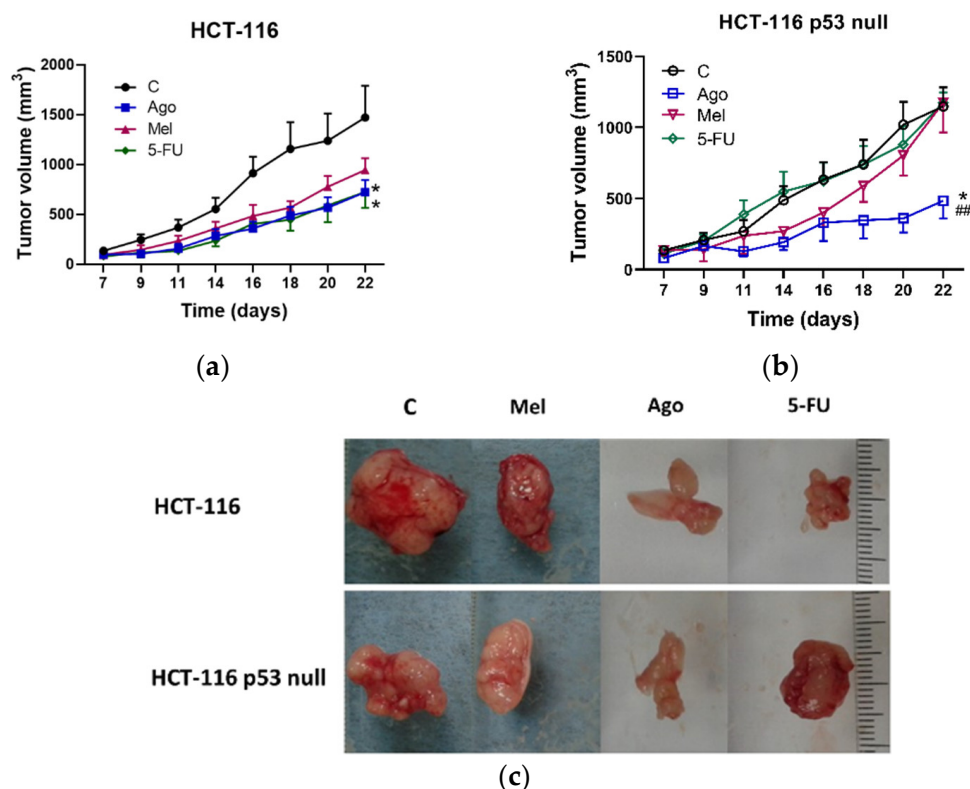


Figure 4. Tumor growth in the four groups of nude mice (controls and those treated with agomelatine, melatonin, or 5-FU, as described in Materials and Methods) in cell-line-derived xenografts in either (a) HCT-116 or (b) HCT-116 p53 null. Data represent mean $\pm$ SEM. * $p < 0.05$ vs. control mice; ** $p < 0.01$ vs. 5-FU group. (c) Representative images of tumors in control and treated mice in cell-line-derived xenografts. C: control; Mel: melatonin; Ago: agomelatine; 5-FU: 5-fluorouracil.

3.4. Agomelatine Regulates p53-Protein Levels in In Vitro and In Vivo Models of CRC

Melatonin and 5-FU regulate the expression of p53 protein levels and, as mentioned above, the presence of p53 is crucial for 5-FU's effectiveness [32–34]. As an analogue of melatonin, we analyzed whether agomelatine also regulated the levels of p53 in our in vitro and in vivo models. As shown in Figure 5a, agomelatine induced a small increase in the expression of the p53 protein after 72 h of treatment in the HCT-116 cells, although no effect was found after melatonin treatment at this point. Similar results were found in the in vivo model, in which the 5-FU displayed the highest effect (Figure 5b). As expected, the expression of the p53 protein was absent in the in vitro and in vivo models derived from the HCT-116-p53-null line (Figure 5).

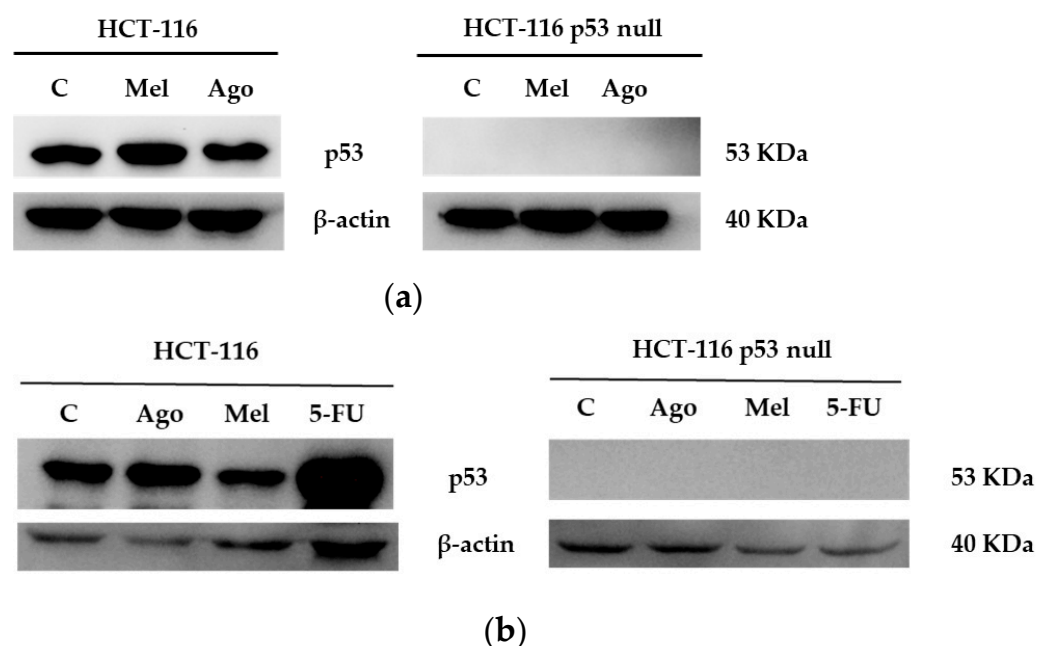


Figure 5. Expression levels of p53-protein in response to the treatments (a) with 0.5 mM agomelatine (Ago) and 1 mM melatonin (Mel) in the in vitro model, and (b) with agomelatine (Ago), melatonin (Mel), and 5-5-fluorouracil (FU) in tumors derived from HCT-116 and HCT-116-p53-null cell lines.

3.5. Agomelatine Regulates Circadian-Clock Genes' Rhythmicity in CRC Cell Lines In Vitro

Next, we analyzed the involvement of circadian-clock genes in the effects on the cell growth and viability induced by agomelatine and melatonin in both cell lines. Given that the effect of 0.5 mM agomelatine on cell growth was significant from 24 h in both cell lines, after cell-culture synchronization by serum shock for 6 h, the cells were cultured in the presence of 10% FBS and treated with vehicle, 0.5 mM agomelatine, or 1 mM melatonin for 48 h. The expressions of Per1-3, Cry1, Clock, Bmal1, and Nr1d2 were analyzed every 4 h (Figure 6).

We found a statistically significant rhythmicity in all the genes studied in the HCT-116 and HCT-116-p53-null cells (Tables 1 and 2). However, these cells showed some differences in the characteristics of their rhythmicity (Table 2). The acrophase of the Per2, Cry1, Bmal1, and Nr1d2 showed an advance in phase in the HCT-116-p53-null cells versus their isogenic HCT-116 cells. The MESOR levels of the Per1 and Per3 were lower in the HCT-116-p53-null cells than in the HCT-116 cells, but this parameter of Bmal1 was higher in the cell line HCT-116 p53 null. There were also differences in the amplitudes of some of the genes between these cells, although these were smaller than those found for the acrophase and the MESOR. The Per2 and Nr1d2 showed lower amplitudes in the HCT-116-p53-null cells than in the HCT-116, while this parameter was higher for the Bmal1.

The treatments with agomelatine and melatonin in the HCT-116 control cells maintained the rhythmicity of the genes studied, albeit with some differences (Table 1). Both drugs induced an advance in phase in the acrophase of the Per1, Per2, Per3, and Cry1; however, the effect of agomelatine was significantly higher in all these genes, except in the case of the Per3, in which both treatments had a similar effect. Only agomelatine induced a delay in the acrophase of the Nr1d2. No significant effects were found on the acrophase in the Clock or Bmal1. Agomelatine increased the MESOR in the Bmal1 and decreased it in the Nr1d2, while melatonin increased this parameter in the Clock. Both treatments increased the amplitude in the Per3. Agomelatine increased the amplitude in the Per2 and decreased it in the Nr1d2. Melatonin treatment decreased the amplitude in Per1 compared with the agomelatine treatment, while increased it in the Clock.

Similar to the results found in the HCT-116 cells, both treatments maintained the rhythmicity of the genes analyzed in the HCT-116-p53-null cells (Table 2). In these cells, only agomelatine was able to induce an advance in phase in the acrophase of the Per1, Per3, and Cry1 compared with the non-treated cells, whereas Per2 and Clock acrophase showed a delay in phase. Agomelatine also increased the MESOR in the Per1, Clock, and Nr1d2, while it decreased the MESOR in the Cry1. Melatonin also enhanced the MESOR in the Clock and reduced it in the Bmal1. Agomelatine increased the amplitude in the Per3 and Nr1d2. Melatonin did not change this parameter in any of the genes studied in this cell line.

We also analyzed the rhythmicity of the Sirt1 in the non-treated cells and after the agomelatine and melatonin treatments in both cell lines (Figure 7). The HCT-116 cells showed a delay in phase in the acrophase and lower MESOR levels than the HCT-116-p53-null cells (Table 3). Agomelatine and melatonin changed the acrophase of the genes in both types of cell, but while agomelatine induced an advance in phase of this parameter, melatonin delayed it. Melatonin also increased the amplitude of the SIRT1 rhythmicity.

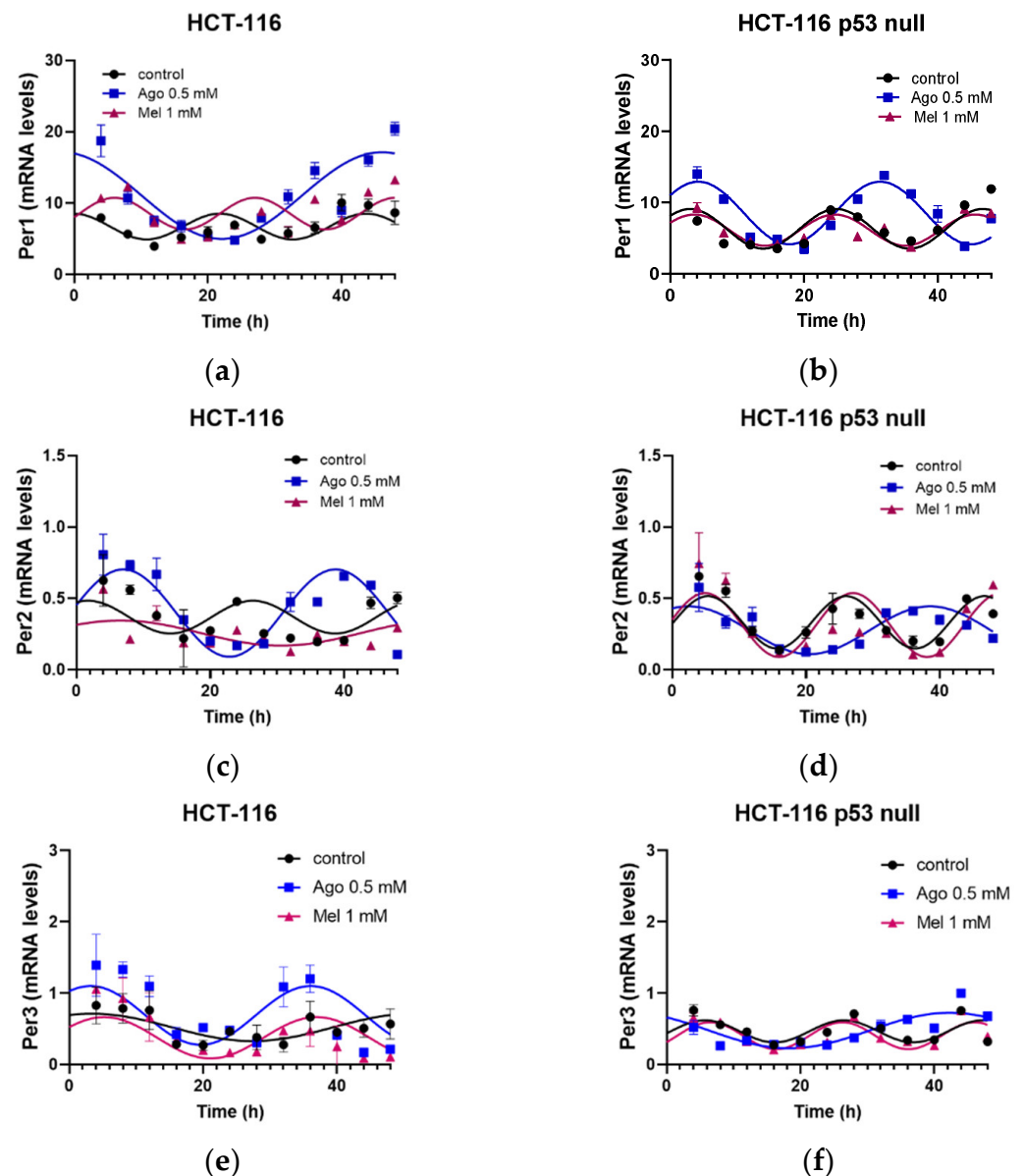


Figure 6. Cont.

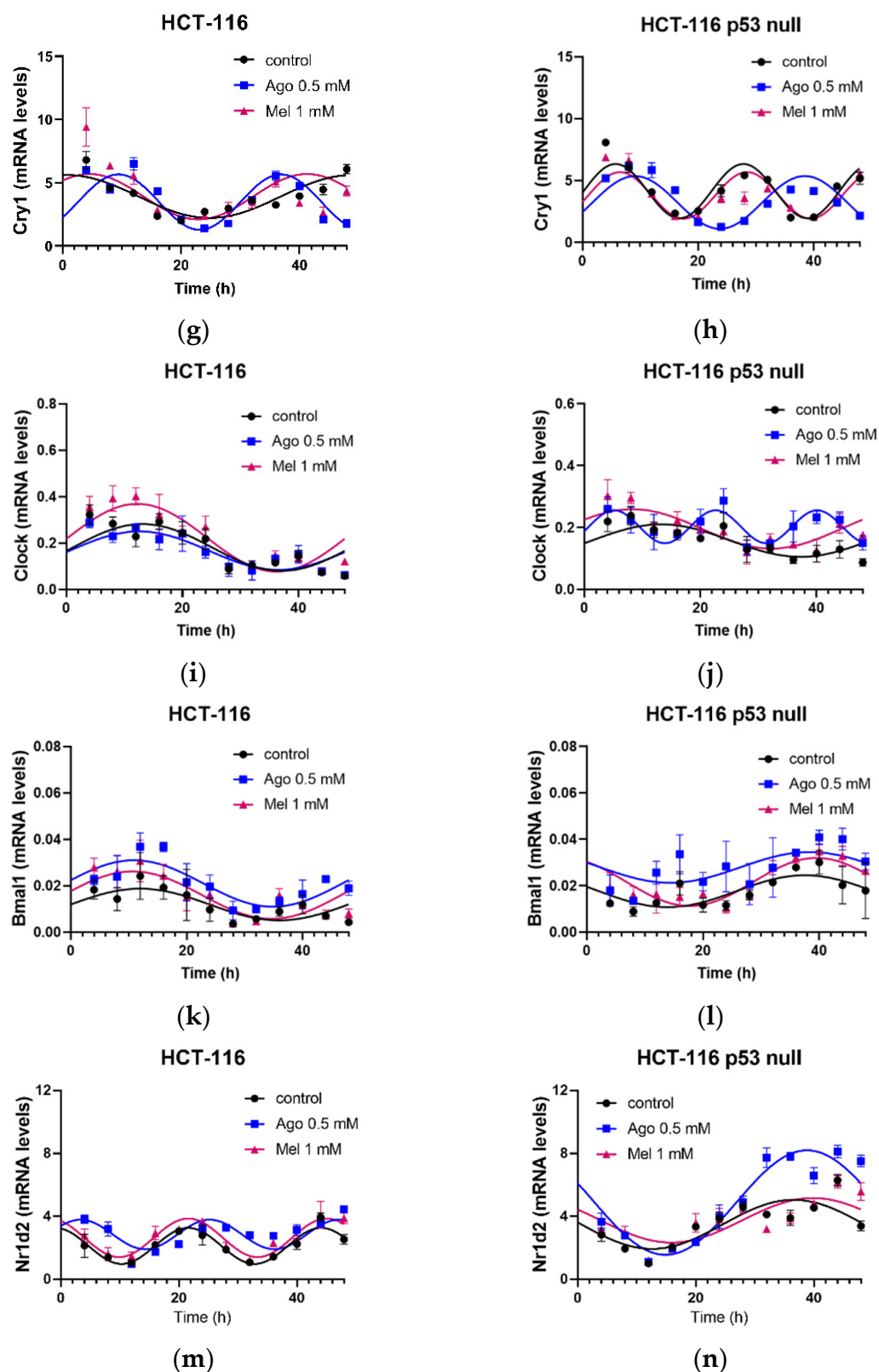
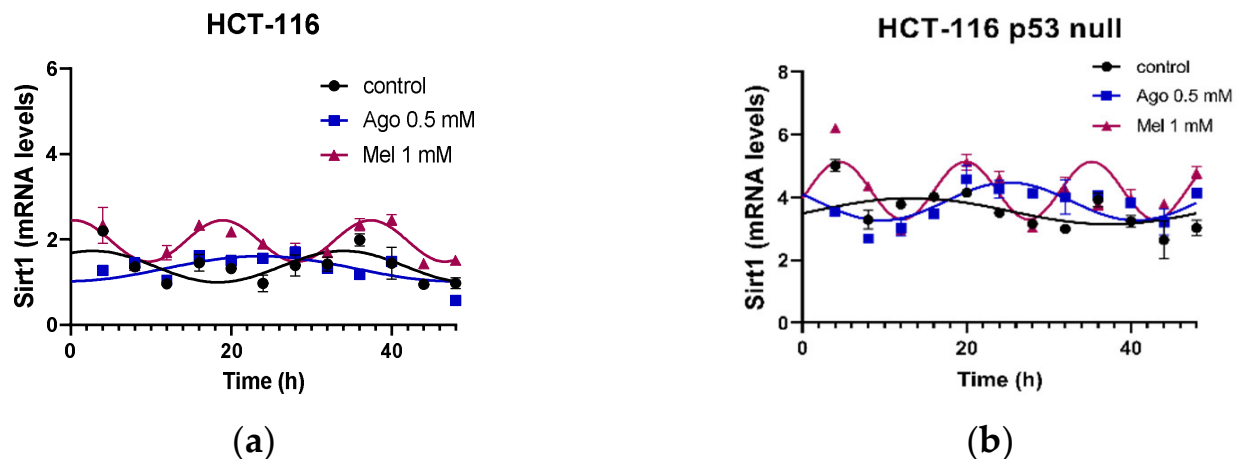


Figure 6. Characteristics of the rhythms obtained for Period 1 (Per1) (a,b), Period 2 (Per2) (c,d), Period 3 (Per3) (e,f), cryptochrome 1 (Cry1) (g,h), circadian locomotor cycles kaput (Clock) (i,j), brain and muscle ARNT-like (Bmal1) (k,l) and nuclear receptor subfamily 1 group D member 2 (Nr1d2) (m,n) gene after agomelatine (Ago) and melatonin (Mel) treatments in the HCT-116 and HCT-116-p53-null cell lines. Curve fittings under the different conditions were performed using a 48-h test period.

Table 1. Results of the cosinor analysis of the clock genes' expression after agomelatine or melatonin treatment in the HCT-116 cell line.

Gene	Treatment	PR ¹	<i>p</i> -Value ²	Amplitude (A.U.) ³	Acrophase (h) ⁴	MESOR (A.U.)
Per1	Control	29.41	0.03	5.17 ± 1.45	3.06 ± 1.91	9.77 ± 0.99
	Ago 0.5	42.85	0.003	6.06 ± 1.22	45.30 ± 1.53 ***	10.40 ± 0.86
	Mel 1	34.77	0.008	2.24 ± 0.53 #	32.83 ± 2.00 ***,###	8.25 ± 0.39
Per2	Control	31.66	0.006	0.076 ± 0.018	2.76 ± 1.19	0.28 ± 0.01
	Ago 0.5	42.02	0.001	0.140 ± 0.003 *	9.35 ± 0.08 ***	0.25 ± 0.02
	Mel 1	27.81	0.003	0.088 ± 0.024	6.58 ± 2.09 ***,###	0.26 ± 0.02
Per3	Control	25.36	0.008	0.33 ± 0.09	17.47 ± 1.15	0.72 ± 0.07
	Ago 0.5	60.62	0.0001	0.91 ± 0.14 *	6.06 ± 0.68 ***	0.94 ± 0.09
	Mel 1	31.33	0.002	0.96 ± 0.25 *	5.55 ± 1.44 ***	0.83 ± 0.18
Cry1	Control	63.01	<0.0001	1.62 ± 0.22	1.79 ± 1.02	3.81 ± 0.15
	Ago 0.5	73.64	<0.0001	2.19 ± 0.21	9.47 ± 0.48 ***	3.48 ± 0.16
	Mel 1	37.72	0.0004	1.79 ± 0.42	4.55 ± 1.31 **,###	3.90 ± 0.29
Clock	Control	57.99	<0.0001	0.101 ± 0.015	13.14 ± 1.13	0.18 ± 0.01
	Ago 0.5	56.69	0.001	0.111 ± 0.019	11.76 ± 2.97	0.16 ± 0.01
	Mel 1	56.75	<0.0001	0.189 ± 0.029 **,###	10.77 ± 1.16	0.26 ± 0.02 ***,###
Bmal1	Control	61.01	<0.0001	0.0088 ± 0.0012	12.99 ± 1.06	0.014 ± 0.001
	Ago 0.5	71.30	<0.0001	0.0138 ± 0.0015	10.47 ± 0.84	0.025 ± 0.001 ***
	Mel 1	38.63	0.0003	0.0092 ± 0.0020	10.85 ± 1.67	0.016 ± 0.001 ###
Nr1d2	Control	48.84	<0.0001	1.73 ± 0.32	12.19 ± 0.63	3.79 ± 0.22
	Ago 0.5	55.56	<0.0001	0.94 ± 0.15 **	3.32 ± 0.55 ***	2.86 ± 0.11 ***
	Mel 1	57.84	<0.0001	1.89 ± 0.28 ##	11.55 ± 0.56 ###	3.74 ± 0.20 ###

¹ PR: percentage of rhythm; ² *p*-value: zero-amplitude test; ³ A.U.: arbitrary units; ⁴ h: hours. Comparisons of parameters under the different conditions were performed using a 48-h test period. * Values of *p* < 0.05 vs. control, ** *p* < 0.01 vs. control, *** *p* < 0.001 vs. control; # *p* < 0.05 vs. agomelatine, ## *p* < 0.01 vs. agomelatine, ### *p* < 0.001 vs. agomelatine.

**Figure 7.** Characteristics of each of the rhythms obtained for sirtuin 1 (SIRT1) gene after agomelatine (Ago) and melatonin (Mel) treatments in the HCT-116 (a) and HCT-116-p53-null (b) cell lines. Curve fittings under the different conditions were performed using a 48-h test period.

In order to find differences between the mechanisms of action of agomelatine and melatonin that could explain the differences in rhythmicity found between the genes studied in the two cell lines, we also analyzed the PRX1 in the non-treated cells and after the agomelatine and melatonin treatments (Figure 8). The PRX1 acrophase in the HCT-116 cells showed an advance in phase but lower MESOR than in the HCT-116-p53-null cells (Table 4). Agomelatine and melatonin induced changes in different parameters in the HCT-116 cells (Figure 8a). Melatonin induced an advance in phase in the acrophase and the

MESOR of the gene, while agomelatine delayed this parameter. By contrast, agomelatine induced an advance in phase in the acrophase and decreased the MESOR of the PRX1 in the HCT-116-p53-null cells (Figure 8b), while melatonin did not induce changes in any of the rhythmic parameters in this gene (Table 4).

Table 2. Results of the cosinor analysis of the clock genes' expression after agomelatine or melatonin treatment in the HCT-116-p53-null cell line.

Gene	Treatment	PR ¹	p-Value ²	Amplitude (A.U.) ³	Acrophase (h) ⁴	MESOR (A.U.)
Per1	Control	47.47	0.0001	2.42 ± 0.45	3.01 ± 0.65	6.11 ± 0.33 [†]
	Ago 0.5	51.58	0.003	2.54 ± 1.22	4.80 ± 3.68 ***	8.36 ± 0.86 **
	Mel1	68.24	<0.0001	2.2 ± 0.26	2.61 ± 0.41 ###	6.13 ± 0.19 ##
Per2	Control	61.90	<0.0001	0.22 ± 0.03 [†]	4.89 ± 0.48 ^{†††}	0.34 ± 0.02
	Ago 0.5	44.57	0.0001	0.19 ± 0.04	1.29 ± 1.16 ***	0.29 ± 0.03
	Mel 1	56.40	<0.0001	0.25 ± 0.04	5.44 ± 0.56 ###	0.32 ± 0.03
Per3	Control	40.65	0.0002	0.13 ± 0.03	6.02 ± 0.71	0.37 ± 0.02 ^{††}
	Ago 0.5	65.87	<0.0001	0.21 ± 0.03 *	42.48 ± 0.95 ***	0.37 ± 0.02
	Mel 1	56.89	<0.0001	0.17 ± 0.02	6.41 ± 1.16 ###	0.34 ± 0.02
Cry1	Control	78.47	<0.0001	2.19 ± 0.20	5.73 ± 0.34 ^{†††}	4.16 ± 0.14
	Ago 0.5	79.43	<0.0001	2.13 ± 0.17	9.11 ± 0.42 *	3.25 ± 0.13 ***
	Mel 1	67.89	<0.0001	1.88 ± 0.22	6.51 ± 0.44	3.82 ± 0.16 ##
Clock	Control	41.13	0.0002	0.05 ± 0.01 [†]	11.99 ± 1.59	0.16 ± 0.01
	Ago 0.5	73.01	0.0001	0.04 ± 0.01	4.57 ± 0.76 ***	0.19 ± 0.01 **
	Mel 1	56.47	<0.0001	0.06 ± 0.01	8.86 ± 1.17 ##	0.19 ± 0.01 **
Bmal1	Control	58.43	<0.0001	0.018 ± 0.003 ^{†††}	35.12 ± 1.09 ^{†††}	0.025 ± 0.002 ^{†††}
	Ago 0.5	50.78	<0.0001	0.011 ± 0.002	39.95 ± 1.31	0.022 ± 0.001
	Mel 1	37.40	0.0004	0.010 ± 0.002	37.92 ± 1.56	0.020 ± 0.002 *
Nr1d2	Control	45.84	<0.0001	1.41 ± 0.27 ^{††}	35.29 ± 1.44 ^{†††}	3.25 ± 0.19
	Ago 0.5	71.46	<0.0001	3.78 ± 0.41 ***	37.66 ± 0.84	5.54 ± 0.29 ***
	Mel 1	44.92	0.0001	2.08 ± 0.40 ##	36.94 ± 1.47	4.07 ± 0.28 ###

¹ PR: percentage of rhythm; ² p-value: zero-amplitude test; ³ A.U.: arbitrary units; ⁴ h: hours. Comparisons of parameters at the different conditions were performed using a 48-h test period. * Values of $p < 0.05$ vs. control, ** $p < 0.01$ vs. control, *** $p < 0.001$ vs. control; ## $p < 0.01$ vs. agomelatine, ### $p < 0.001$ vs. agomelatine. [†] $p < 0.05$ vs. HCT-116, ^{††} $p < 0.01$ vs. HCT-116, ^{†††} $p < 0.001$ vs. HCT-116.

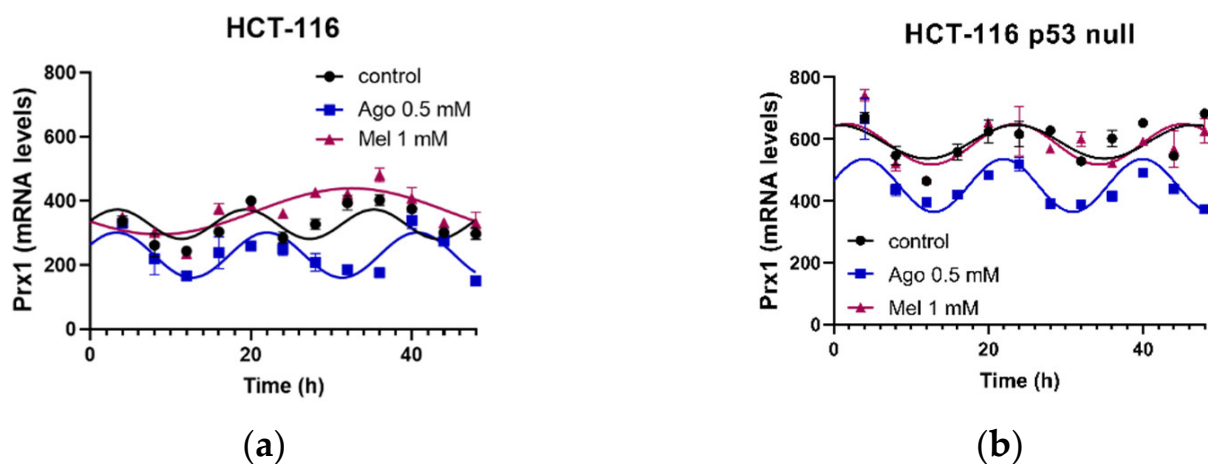


Figure 8. Circadian rhythms obtained for peroxiredoxin 1 (PRX1) gene after agomelatine (Ago) and melatonin (Mel) treatments in the HCT-116 (a) and HCT-116-p53-null (b) cell lines. Curve fittings under the different conditions were performed using a 48-h test period.

Table 3. Results of the cosinor analysis of Sirt1-gene expression after agomelatine or melatonin treatment in the HCT-116 and HCT-116-p53-null cell lines.

Cell Line	Treatment	PR ¹	p-Value ²	Amplitude (A.U.) ³	Acrophase (h) ⁴	MESOR (A.U.)
HCT-116	Control	47.58	<0.0001	0.367 ± 0.071	2.80 ± 0.92	1.37 ± 0.15
	Ago 0.5	47.05	<0.0001	0.456 ± 0.084	22.31 ± 1.41 ***	1.23 ± 0.16
	Mel 1	80.65	<0.0001	0.483 ± 0.042	0.52 ± 0.24 ***,###	1.96 ± 0.13
HCT-116 p53 null	Control	34.8	0.0009	0.392 ± 0.093	16.42 ± 1.82 †††	3.48 ± 0.17 †††
	Ago 0.5	35.92	0.0006	0.518 ± 0.114	25.48 ± 1.12 ***	3.91 ± 0.18
	Mel 1	62.29	<0.0001	0.766 ± 0.102 **	4.59 ± 0.34 ***,###	4.14 ± 0.17

¹ PR: percentage of rhythm; ² p-value: zero-amplitude test; ³ A.U.: arbitrary units; ⁴ h: hours. Comparisons of parameters at the different conditions were performed using a 48-h test period. ** $p < 0.01$ vs. control, *** $p < 0.001$ vs. control; ### $p < 0.001$ vs. agomelatine. ††† $p < 0.001$ vs. HCT-116.

Table 4. Results of the cosinor analysis of PEX1-gene expression after agomelatine or melatonin treatment in the HCT-116 and HCT-116-p53-null cell lines.

Cell Line	Treatment	PR ¹	p-Value ²	Amplitude (A.U.) ³	Acrophase (h) ⁴	MESOR (A.U.)
HCT-116	Control	38.04	0.0004	45.7 ± 10.2	3.38 ± 0.56	329 ± 7
	Ago 0.5	74.50	<0.0001	70.4 ± 7.4	3.27 ± 0.31	232 ± 5 ***
	Mel 1	67.01	<0.0001	71.6 ± 8.7	32.54 ± 0.93 ***,###	368 ± 6 ***,###
HCT-116 p53 null	Control	38.90	0.0003	54 ± 12	0.63 ± 0.79 ††	591 ± 8 †††
	Ago 0.5	64.23	<0.0001	81 ± 10	3.83 ± 0.39 ***	447 ± 8 ***
	Mel 1	46.83	<0.0001	65 ± 12	1.71 ± 0.62 ###	583 ± 9 ###

¹ PR: percentage of rhythm; ² p-value: zero-amplitude test; ³ A.U.: arbitrary units; ⁴ h: hours. Comparisons of parameters at the different conditions were performed using a 48-h test period *** $p < 0.001$ vs. control; # $p < 0.01$ vs. agomelatine, ### $p < 0.001$ vs. agomelatine. †† $p < 0.01$ vs. HCT-116, ††† $p < 0.001$ vs. HCT-116.

4. Discussion

This study describes, for the first time, the potential use of agomelatine as a treatment for CRC. Agomelatine inhibited cell growth in our in vitro and in vivo models of this disease and induced cell-cycle arrest and caspase-dependent apoptotic cell death. We propose that agomelatine exerted these effects through the regulation of the rhythmicity of several core Clock genes. The effect of agomelatine was independent of the p53, although this treatment decreased the cell growth more efficiently in the in vitro models of cells harboring the wild-type p53.

Similarly, melatonin induced cell-growth inhibition in vitro and in vivo and cell-cycle arrest. However, it was not able to increase apoptosis, as expected. These effects were only observed in the presence of the wild-type p53, since p53 activation is critical for the oncostatic effect of melatonin, encouraging p53 accumulation at the cellular level [34]. However, the expression of the protein increases transiently, displaying a maximum at three hours after the treatment of with melatonin cells [34]. This could explain the lack of effect found in our study, in which the effect on the p53-protein levels was assessed after 72 h of melatonin treatment. The inhibition of tumor growth after the treatment with melatonin was related to the inhibition of cell progression from the G0/G1 phase to the S phase. This effect was dependent on the p53 status, since melatonin induces the activation of p53 and p21. The observed increase in the percentage of apoptosis after the treatment with the indoleamine may have been due to the blockade of the Akt/MDM2 pathway, an effect that was previously observed in gastric cancer cells [35]. Increased apoptosis and cell-cycle arrest should trigger the activation of the caspase-3 pathway, as described for hepatocarcinoma cells [36]. Considering these observations, in our model, the fact that we did not observe an increase in caspase-3 expression after melatonin treatment may have been due to the small increase in apoptosis we obtained.

Intracellular melatonin signaling through its receptors can also be affected by the status of p53. It has been reported that the expression of the membrane (MT1 and MT2)

receptors of melatonin decreases in patients with colon cancer [22], but mainly in those with mutations in the p53 gene [23], although melatonin levels and the expression of nuclear (ROR α) receptors do not change [22]. On the other hand, several works previously showed the implication of melatonin receptors in its oncostatic actions in this disease [37,38]. This could indicate that non-selective MT1/MT2 agonists with a higher affinity with these receptors than melatonin itself could be of interest in the treatment of CRC [22]. In line with this observation, we found that agomelatine was more potent than melatonin, at least in the in vitro and in vivo models in which the tumor-suppressor gene p53 was in its wild form. In this case, agomelatine seemed to induce a slight increase in the p53 protein levels at the time at which it was analyzed. In addition, agomelatine was more potent than the indoleamine in inhibiting cell growth in the in vitro models with the non-active p53. Interestingly, unlike melatonin, as described above, agomelatine inhibited tumor growth in vivo in the cases with the non-functional p53, indicating that mechanisms other than p53 regulation may be involved in its mechanism of action, at least under these conditions. Agomelatine has been shown to be more effective than melatonin when used as a treatment for insomnia, depression, or obesity-associated comorbidities [39–41]. Agomelatine is a non-selective agonist of MT1 and MT2 receptors, with a higher affinity with these receptors than melatonin itself [42]. In addition, agomelatine has a longer half-life and better oral absorption [43]. On the other hand, agomelatine is a serotonin-HT2c- and -HT2b-receptor antagonist. The involvement of serotonin in tumor growth, differentiation, and gene expression has long been known. In fact, its mitogenic effect has been demonstrated in various types of cancer, including prostate, bladder, breast, and colon cancer [44]. In the specific case of colon cancer, selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs), which increase its concentration in nerve terminals both centrally and peripherally, have been shown to have preventive effects [45].

In our in vitro model, we found the resynchronization of circadian rhythmicity by agomelatine and melatonin in vitro. Both drugs regulated Per1, Per2, Per3, Cry1, and Clock in cells harboring the wild-type p53. The change induced in the characteristics of the rhythms analyzed (i.e., amplitude, acrophase, and/or MESOR) was always higher after the treatment with agomelatine. In these cells, agomelatine also regulated Bmal1 and Nr1d2. The deletion of p53 induced a loss of effect in both drugs, although agomelatine was also found to be more potent than melatonin. In this type of cell, we also found a decrease in the number of circadian genes regulated by both drugs, indicating the influence of the circadian clock on the antiproliferative effect of these treatments. Previous reports showed that melatonin regulates the circadian clock after the activation of MT1 and MT2 receptors at the central level [39] and in cancer [46], whereas agomelatine acts at the central level in a complementary and possibly synergistic manner on the MT1 and MT2 receptors of melatonin and the HT2c receptor of serotonin to resynchronize circadian rhythms [47,48], which could explain the greater effect found after the treatment with agomelatine.

The SIRT1 is a NAD⁺ dependent class III histone deacetylase, which is involved in the control of cellular redox homeostasis [6]. It regulates the circadian clock by activating the transcription of BMAL1 and Clock [6], and the intracellular levels of SIRT1 and NAD⁺ oscillate with a circadian pattern [7]. Although the exact role of SIRT1 is not well understood, it has been implicated in tumor growth and resistance to therapy in several types of cancer, including CRC [49,50]. An important relationship between melatonin, the circadian clock, and SIRT1 has been described, although it remains unclear whether SIRT1 is a key mediator of circadian-clock regulation by melatonin or whether melatonin acts through circadian genes to regulate SIRT1 [51]. Peroxiredoxins (PRX) are a family of conserved enzymes involved in the regulation of peroxide levels. The oxidation-reduction states of PRX1 proteins exhibit self-sustained oscillation in the absence of TTFL mechanisms. In addition, the knockdown of PRX1 proteins affects circadian rhythms in nucleated cells, indicating that the oxidation-reduction cycle of PRX1 is interconnected with the main circadian-clock cycle [52]. Furthermore, Tp53 and SIRT1 are mediators of these connections [52], which are important regulators of circadian-clock-gene expression [8,53,54]. In fact, in the present

study, we found that agomelatine and melatonin can regulate the rhythmicity of SIRT1, regardless of p53, although they differ in the characteristics of the rhythmicity affected. Interestingly, only agomelatine was able to regulate the oscillations of the PRX1 in both the wild-type p53 and p53 null cells, whereas melatonin only affected it in the wild-type p53 cells. Further research is warranted to determine the mechanism underlying these differences. The antioxidant ability of melatonin is extended to the regulation of the expression and activity of PRX1 [55], although there are no available data regarding the role of p53 in this action of the indoleamine.

The antitumor efficacy of 5-FU is due to its ability to induce cell-cycle arrest and p53-dependent apoptosis [56]. Similarly to melatonin, several lines of research demonstrated that this chemotherapeutic agent has a reduced ability to inhibit cell growth in CRC with mutated or inactive p53 [57]. In this study, we used the treatment with 5-FU as a control for the in vivo model carrying p53 null tumors, and only agomelatine was able to reduce tumor growth in these animals. Although the side effects found at the systemic level were similar after the three treatments, the 5-FU induced the greatest increase in AST activity. At the metabolic level, melatonin treatment produced an increase in glucose and alanine-aminotransferase levels, probably due to the role of melatonin in processes such as glycogenesis or glycolysis [36].

5. Conclusions

Recent studies have shown that some anti-depressant treatments also exert an anti-tumor effect, which is due to the modification of the tumor environment or the alteration of the immune response. This is the case in colon-cancer, in which the use of fluoxetine inhibits the transcriptional activity of NF-kappa B, and the proliferation of cells [58]. In addition, in general, the use of these drugs does not present a large number of side effects in the organism [59]. Therefore, taking into account the fact that treatment with antidepressant drugs after a cancer diagnosis is quite frequent, if it is possible to perform both treatments with the same drug, as is the case with agomelatine, conferring a double benefit. In addition, the presence of a non-functional p53 has been implicated in 5-FU resistance in CRC patients [57]. This barrier could be overcome with treatment with agomelatine, since it has similar effectiveness regardless of p53 status, at least in the xenograft model used in this study.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/antiox12040926/s1>. Figure S1: Growth inhibition of HCT-116 and HCT-116-p53-null cells after treatment with (a) (c) agomelatine (0–1 mM) and (b) (d) melatonin (0–1 mM) for 24, 48, and 72 h; Figure S2: Raw data of cell-cycle analysis by flow cytometry in HCT-116 cell line after treatment with agomelatine or melatonin; Figure S3: Raw data of cell-cycle analysis by flow cytometry in HCT-116-p53-null cell line after treatment with agomelatine or melatonin; Figure S4: Raw data of apoptosis analysis by flow cytometry in HCT-116 cell line after treatment with agomelatine or melatonin; Figure S5: Raw data of apoptosis analysis by flow cytometry in HCT-116 cell line after treatment with agomelatine or melatonin; Figure S6: Levels of glucose (a), alanine aminotransferase (ALT) (b), amylase (c), urea (d), aspartate aminotransferase (e), and uric acid (f) in sera of nude mice (controls and those treated with agomelatine, melatonin, or 5-FU, as described in Materials and Methods); Table S1: Primers used in the real-time PCR assay; Table S2: Results at 24 h of the cosinor analysis of the Clock genes' expression after agomelatine or melatonin treatment in the HCT-116 cell line; Table S3: Results at 24 h of the cosinor analysis of the Clock genes' expression after agomelatine or melatonin treatment in the HCT-116-p53-null cell line; Table S4: Results at 24 h of the cosinor analysis of SIRT1 gene's expression after agomelatine or melatonin treatment in the HCT-116 and HCT-116-p53-null cell lines; Table S5: Results at 24 h of the cosinor analysis of PRX1 gene expression after agomelatine or melatonin treatment in the HCT-116 and HCT-116-p53-null cell line; Table S6: Median Ct values obtained in the circadian rhythmicity analysis for each gene under all conditions included in the study in HCT-116 cells; Table S7: Median Ct values obtained in the circadian rhythmicity analysis for each gene under all conditions included in the study in HCT-116-p53-null cells.

Author Contributions: Conceptualization: J.L.; methodology: S.M.-S., J.D.P.-P., J.C., J.E.-F. and H.K.; investigation: J.L.; data curation: J.D.P.-P., S.M.-S., J.C. and J.A.; writing—original draft preparation: S.M.-S., J.D.P.-P. and J.L.; writing—review and editing: J.L. and Á.C.; supervision: J.L.; project administration: J.L.; funding acquisition: J.L. and Á.C. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by a research grant from the Instituto de Salud Carlos III- FEDER (PI18/01947) and the Consejería de Salud from the Junta de Andalucía (PI-067/2013). J.L. was supported by the Nicolás Monardes Program in the Andalusian Health Service (C-0033-2015). J.D.P.-P. is funded by a FPU2019 fellowship (FPU190/02269) from the Ministerio de Universidades (Spain).

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Data is contained within the article and Supplementary Materials.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Abbreviations

5-FU	5-fluorouracil
Ago	agomelatine
ALT	alanine transaminase
ARE	anti-oxidant-response element
BMAL	brain and muscle ARNT-like
Clock	circadian locomotor cycles kaput
CRC	colorectal cancer
Cry	cryptochrome
CSCs	cancer stem cells
Cul3	cullin 3
Keap1	kelch-like ECH-associated protein 1
Mel	melatonin
MESOR	midline estimating statistic of rhythm
MT	melatonin receptor
NAD	nicotinamide adenine dinucleotide
Nr1d2	nuclear receptor subfamily 1 group D member 2
Nrf2	nuclear factor erythroid 2 related factor-2
Per	period
PR	percentage of rhythm
Prx-1	peroxiredoxin-1
ROR α	RAR-related orphan receptor alpha
SIRT1	sirtuin 1
TTFL	transcription–translation feedback loops.

References

1. Bray, F.; Ferlay, J.; Soerjomataram, I.; Siegel, R.L.; Torre, L.A.; Jemal, A. Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA A Cancer J. Clin.* **2018**, *68*, 394–424. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Xie, Y.-H.; Chen, Y.-X.; Fang, J.-Y. Comprehensive Review of Targeted Therapy for Colorectal Cancer. *Signal Transduct. Target. Ther.* **2020**, *5*, 22. [[CrossRef](#)]
3. Vodenkova, S.; Buchler, T.; Cervena, K.; Veskrnova, V.; Vodicka, P.; Vymetalkova, V. 5-Fluorouracil and Other Fluoropyrimidines in Colorectal Cancer: Past, Present and Future. *Pharmacol. Ther.* **2020**, *206*, 107447. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Robinson, I.; Reddy, A.B. Molecular Mechanisms of the Circadian Clockwork in Mammals. *FEBS Lett.* **2014**, *588*, 2477–2483. [[CrossRef](#)]
5. Tang, B.L. Sirt1 and the Mitochondria. *Mol. Cells* **2016**, *39*, 87–95. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Kleszcz, R.; Paluszczak, J.; Baer-Dubowska, W. Targeting Aberrant Cancer Metabolism—The Role of Sirtuins. *Pharmacol. Rep.* **2015**, *67*, 1068–1080. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Nakahata, Y.; Sahar, S.; Astarita, G.; Kaluzova, M.; Sassone-Corsi, P. Circadian Control of the NAD⁺ Salvage Pathway by CLOCK-SIRT1. *Science* **2009**, *324*, 654–657. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

8. Asher, G.; Gatfield, D.; Stratmann, M.; Reinke, H.; Dibner, C.; Kreppel, F.; Mostoslavsky, R.; Alt, F.W.; Schibler, U. SIRT1 Regulates Circadian Clock Gene Expression through PER2 Deacetylation. *Cell* **2008**, *134*, 317–328. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
9. Bellet, M.M.; Orozco-Solis, R.; Sahar, S.; Eckel-Mahan, K.; Sassone-Corsi, P. The Time of Metabolism: NAD⁺, SIRT1, and the Circadian Clock. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **2011**, *76*, 31–38. [\[CrossRef\]](#)
10. Edgar, R.S.; Green, E.W.; Zhao, Y.; van Ooijen, G.; Olmedo, M.; Qin, X.; Xu, Y.; Pan, M.; Valekunja, U.K.; Feeney, K.A.; et al. Peroxiredoxins Are Conserved Markers of Circadian Rhythms. *Nature* **2012**, *485*, 459–464. [\[CrossRef\]](#)
11. Yang, Y.; Li, X.; Peng, L.; An, L.; Sun, N.; Hu, X.; Zhou, P.; Xu, Y.; Li, P.; Chen, J. Tanshinolone C Inhibits Oxidized Low-Density Lipoprotein Induced Macrophage Foam Cell Formation via a Peroxiredoxin 1 Dependent Pathway. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* **2018**, *1864*, 882–890. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
12. Kim, Y.-J.; Ahn, J.-Y.; Liang, P.; Ip, C.; Zhang, Y.; Park, Y.-M. Human Prx1 Gene Is a Target of Nrf2 and Is Up-Regulated by Hypoxia/Reoxygenation: Implication to Tumor Biology. *Cancer Res.* **2007**, *67*, 546–554. [\[CrossRef\]](#)
13. Tonelli, C.; Chio, I.I.C.; Tuveson, D.A. Transcriptional Regulation by Nrf2. *Antioxid. Redox. Signal.* **2018**, *29*, 1727–1745. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
14. Patel, S.; Khan, H.; Majumdar, A. Crosstalk between Sirtuins and Nrf2: SIRT1 Activators as Emerging Treatment for Diabetic Neuropathy. *Metab. Brain Dis.* **2022**, *37*, 2181–2195. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
15. Kelleher, F.C.; Rao, A.; Maguire, A. Circadian Molecular Clocks and Cancer. *Cancer Lett.* **2014**, *342*, 9–18. [\[CrossRef\]](#)
16. Van der Jeught, K.; Xu, H.-C.; Li, Y.-J.; Lu, X.-B.; Ji, G. Drug Resistance and New Therapies in Colorectal Cancer. *World J. Gastroenterol.* **2018**, *24*, 3834–3848. [\[CrossRef\]](#)
17. Lee, Y. Roles of Circadian Clocks in Cancer Pathogenesis and Treatment. *Exp. Mol. Med.* **2021**, *53*, 1529–1538. [\[CrossRef\]](#)
18. García-Costela, M.; Escudero-Feliú, J.; Puentes-Pardo, J.D.; San Juan, S.M.; Morales-Santana, S.; Ríos-Arrabal, S.; Carazo, Á.; León, J. Circadian Genes as Therapeutic Targets in Pancreatic Cancer. *Front. Endocrinol.* **2020**, *11*, 638. [\[CrossRef\]](#)
19. León, J.; Casado, J.; Ruiz, S.M.J.; Zurita, M.S.; González-Puga, C.; Rejón, J.D.; Gila, A.; de Rueda, P.M.; Pavón, E.J.; Reiter, R.J.; et al. Melatonin Reduces Endothelin-1 Expression and Secretion in Colon Cancer Cells through the Inactivation of FoxO-1 and NF- κ B. *J. Pineal Res.* **2014**, *56*, 415–426. [\[CrossRef\]](#)
20. Wei, J.-Y.; Li, W.-M.; Zhou, L.-L.; Lu, Q.-N.; He, W. Melatonin Induces Apoptosis of Colorectal Cancer Cells through HDAC4 Nuclear Import Mediated by CaMKII Inactivation. *J. Pineal Res.* **2015**, *58*, 429–438. [\[CrossRef\]](#)
21. Kannen, V.; Marini, T.; Zannette, D.L.; Frajacom, F.T.; Silva, G.E.B.; Silva, W.A.; Garcia, S.B. The Melatonin Action on Stromal Stem Cells within Pericryptal Area in Colon Cancer Model under Constant Light. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2011**, *405*, 593–598. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
22. León, J.; Casado, J.; Carazo, Á.; Sanjuán, L.; Maté, A.; Rueda, P.M.; de Cueva, P.; de la Quiles, R.; Ruiz, S.; Ruiz-Extremiera, Á.; et al. Gender-Related Invasion Differences Associated with mRNA Expression Levels of Melatonin Membrane Receptors in Colorectal Cancer. *Mol. Carcinog.* **2012**, *51*, 608–618. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
23. Casado, J.; Iñigo-Chaves, A.; Jiménez-Ruiz, S.M.; Ríos-Arrabal, S.; Carazo-Gallego, Á.; González-Puga, C.; Núñez, M.I.; Ruiz-Extremiera, Á.; Salmerón, J.; León, J. AA-NAT, MT1 and MT2 Correlates with Cancer Stem-Like Cell Markers in Colorectal Cancer: Study of the Influence of Stage and P53 Status of Tumors. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 1251. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
24. Guardiola-Lemaitre, B.; De Bodinat, C.; Delagrè, P.; Millan, M.J.; Munoz, C.; Mocaër, E. Agomelatine: Mechanism of Action and Pharmacological Profile in Relation to Antidepressant Properties. *Br. J. Pharm.* **2014**, *171*, 3604–3619. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
25. Mairesse, J.; Silletti, V.; Laloux, C.; Zúena, A.R.; Giovine, A.; Consolazione, M.; Van Camp, G.; Malagodi, M.; Gaetani, S.; Cianci, S.; et al. Chronic Agomelatine Treatment Corrects the Abnormalities in the Circadian Rhythm of Motor Activity and Sleep/Wake Cycle Induced by Prenatal Restraint Stress in Adult Rats. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* **2013**, *16*, 323–338. [\[CrossRef\]](#)
26. Kannen, V.; Bader, M.; Sakita, J.Y.; Uyemura, S.A.; Squire, J.A. The Dual Role of Serotonin in Colorectal Cancer. *Trends Endocrinol. Metab.* **2020**, *31*, 611–625. [\[CrossRef\]](#)
27. Soni, S.K.; Basu, P.; Singaravel, M.; Sharma, R.; Pandi-Perumal, S.R.; Cardinali, D.P.; Reiter, R.J. Sirtuins and the Circadian Clock Interplay in Cardioprotection: Focus on Sirtuin 1. *Cell. Mol. Life Sci.* **2021**, *78*, 2503–2515. [\[CrossRef\]](#)
28. Mahmoud, A.M.; Abd El-Ghaffar, O.A.M.; Alzoghbi, M.A.; Hassanein, E.H.M. Agomelatine Prevents Gentamicin Nephrotoxicity by Attenuating Oxidative Stress and TLR-4 Signaling, and Upregulating PPAR γ and SIRT1. *Life Sci.* **2021**, *278*, 119600. [\[CrossRef\]](#)
29. Mahmoud, N.M.; Elshazly, S.M.; Hassan, A.A.; Soliman, E. Agomelatine Improves Streptozotocin-Induced Diabetic Nephropathy through Melatonin Receptors/SIRT1 Signaling Pathway. *Int. Immunopharmacol.* **2023**, *115*, 109646. [\[CrossRef\]](#)
30. Refinetti, R. Non-Parametric Procedures for the Determination of Phase Markers of Circadian Rhythms. *Int. J. Biomed. Comput.* **1992**, *30*, 49–56. [\[CrossRef\]](#)
31. Orozco-Solis, R.; Ramadori, G.; Coppari, R.; Sassone-Corsi, P. SIRT1 Relays Nutritional Inputs to the Circadian Clock through the Sf1 Neurons of the Ventromedial Hypothalamus. *Endocrinology* **2015**, *156*, 2174–2184. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
32. Longley, D.B.; Harkin, D.P.; Johnston, P.G. 5-Fluorouracil: Mechanisms of Action and Clinical Strategies. *Nat. Rev. Cancer* **2003**, *3*, 330–338. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
33. Violette, S.; Poulain, L.; Dussaulx, E.; Pepin, D.; Faussat, A.-M.; Chambaz, J.; Lacorte, J.-M.; Staedel, C.; Lesuffleur, T. Resistance of Colon Cancer Cells to Long-Term 5-Fluorouracil Exposure Is Correlated to the Relative Level of Bcl-2 and Bcl-X(L) in Addition to Bax and P53 Status. *Int. J. Cancer* **2002**, *98*, 498–504. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

34. Santoro, R.; Marani, M.; Blandino, G.; Muti, P.; Strano, S. Melatonin Triggers P53Ser Phosphorylation and Prevents DNA Damage Accumulation. *Oncogene* **2012**, *31*, 2931–2942. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
35. Song, J.; Ma, S.-J.; Luo, J.-H.; Zhang, H.; Wang, R.-X.; Liu, H.; Li, L.; Zhang, Z.-G.; Zhou, R.-X. Melatonin Induces the Apoptosis and Inhibits the Proliferation of Human Gastric Cancer Cells via Blockade of the AKT/MDM2 Pathway. *Oncol. Rep.* **2018**, *39*, 1975–1983. [\[CrossRef\]](#)
36. Samec, M.; Liskova, A.; Koklesova, L.; Zhai, K.; Varghese, E.; Samuel, S.M.; Šudomová, M.; Lucansky, V.; Kassayova, M.; Pec, M.; et al. Metabolic Anti-Cancer Effects of Melatonin: Clinically Relevant Prospects. *Cancers* **2021**, *13*, 3018. [\[CrossRef\]](#)
37. Winczyk, K.; Fuss-Chmielewska, J.; Lawnicka, H.; Pawlikowski, M.; Karasek, M. Luzindole but Not 4-Phenyl-2-Propionamidotetralin (4P-PDOT) Diminishes the Inhibitory Effect of Melatonin on Murine Colon 38 Cancer Growth In Vitro. *Neuro Endocrinol. Lett.* **2009**, *30*, 657–662.
38. Karasek, M.; Carrillo-Vico, A.; Guerrero, J.M.; Winczyk, K.; Pawlikowski, M. Expression of Melatonin MT(1) and MT(2) Receptors, and ROR Alpha(1) Receptor in Transplantable Murine Colon 38 Cancer. *Neuro Endocrinol. Lett.* **2002**, *23*, 55–60.
39. Liu, J.; Clough, S.J.; Hutchinson, A.J.; Adamah-Biassi, E.B.; Popovska-Gorevski, M.; Dubocovich, M.L. MT1 and MT2 Melatonin Receptors: A Therapeutic Perspective. *Annu. Rev. Pharm. Toxicol.* **2016**, *56*, 361–383. [\[CrossRef\]](#)
40. Diez-Echave, P.; Vezza, T.; Algieri, F.; Ruiz-Malagón, A.J.; Hidalgo-García, L.; García, F.; Morón, R.; Sánchez, M.; Toral, M.; Romero, M.; et al. The Melatonergic Agonist Agomelatine Ameliorates High Fat Diet-Induced Obesity in Mice through the Modulation of the Gut Microbiome. *Biomed. Pharm.* **2022**, *153*, 113445. [\[CrossRef\]](#)
41. Kim, H.K.; Yang, K.I. Melatonin and Melatonergic Drugs in Sleep Disorders. *Transl. Clin. Pharm.* **2022**, *30*, 163–171. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
42. Liu, Z.; Zou, D.; Yang, X.; Xue, X.; Zuo, L.; Zhou, Q.; Hu, R.; Wang, Y. Melatonin Inhibits Colon Cancer RKO Cell Migration by Downregulating Rho-associated Protein Kinase Expression via the P38/MAPK Signaling Pathway. *Mol. Med. Rep.* **2017**, *16*, 9383–9392. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
43. Kast, R.E. Agomelatine or Ramelteon as Treatment Adjuncts in Glioblastoma and Other M1- or M2-Expressing Cancers. *Contemp. Oncol. Współczesna Onkol.* **2015**, *2*, 157–162. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
44. Siddiqui, E.J.; Shabbir, M.A.; Mikhailidis, D.P.; Mumtaz, F.H.; Thompson, C.S. The Effect of Serotonin and Serotonin Antagonists on Bladder Cancer Cell Proliferation. *BJU Int.* **2006**, *97*, 634–639. [\[CrossRef\]](#)
45. Pantaleo, M.A.; Palassini, E.; Labianca, R.; Biasco, G. Targeted Therapy in Colorectal Cancer: Do We Know Enough? *Dig. Liver Dis.* **2006**, *38*, 71–77. [\[CrossRef\]](#)
46. Hill, S.M.; Belancio, V.P.; Dauchy, R.T.; Xiang, S.; Brimer, S.; Mao, L.; Hauch, A.; Lundberg, P.W.; Summers, W.; Yuan, L.; et al. Melatonin: An Inhibitor of Breast Cancer. *Endocr. Relat. Cancer* **2015**, *22*, R183–R204. [\[CrossRef\]](#)
47. de Bodinat, C.; Guardiola-Lemaitre, B.; Mocaër, E.; Renard, P.; Muñoz, C.; Millan, M.J. Agomelatine, the First Melatonergic Antidepressant: Discovery, Characterization and Development. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2010**, *9*, 628–642. [\[CrossRef\]](#)
48. Tardito, D.; Molteni, R.; Popoli, M.; Racagni, G. Synergistic Mechanisms Involved in the Antidepressant Effects of Agomelatine. *Eur. Neuropsychopharmacol.* **2012**, *22*, S482–S486. [\[CrossRef\]](#)
49. Jung-Hynes, B.; Reiter, R.J.; Ahmad, N. Sirtuins, Melatonin and Circadian Rhythms: Building a Bridge between Aging and Cancer. *J. Pineal Res.* **2010**, *48*, 9–19. [\[CrossRef\]](#)
50. Ríos-Arrabal, S.; Muñoz-Gámez, J.A.; Jiménez-Ruiz, S.M.; Casado-Ruiz, J.; Artacho-Cordón, F.; León-López, J. *Circadian Regulation of Colon Cancer Stem Cells: Implications for Therapy*; IntechOpen: London, UK, 2016; ISBN 978-953-51-2545-7.
51. Mayo, J.C.; Sainz, R.M.; González Menéndez, P.; Cepas, V.; Tan, D.-X.; Reiter, R.J. Melatonin and Sirtuins: A “Not-so Unexpected” Relationship. *J. Pineal Res.* **2017**, *62*, e12391. [\[CrossRef\]](#)
52. Ray, S.; Valekunja, U.K.; Stangherlin, A.; Howell, S.A.; Snijders, A.P.; Damodaran, G.; Reddy, A.B. Circadian Rhythms in the Absence of the Clock Gene Bmal1. *Science* **2020**, *367*, 800–806. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
53. Miki, T.; Matsumoto, T.; Zhao, Z.; Lee, C.C. P53 Regulates Period2 Expression and the Circadian Clock. *Nat. Commun.* **2013**, *4*, 2444. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
54. Nakahata, Y.; Kaluzova, M.; Grimaldi, B.; Sahar, S.; Hirayama, J.; Chen, D.; Guarente, L.P.; Sassone-Corsi, P. The NAD⁺-Dependent Deacetylase SIRT1 Modulates CLOCK-Mediated Chromatin Remodeling and Circadian Control. *Cell* **2008**, *134*, 329–340. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
55. Torres, F.F.; Bernardo, V.S.; de Paula, C.P.; da Silva, J.P.M.D.O.; de Almeida, E.A.; da Cunha, A.F.; da Silva, D.G.H. Influence of Melatonin Treatment on Cellular Mechanisms of Redox Adaptation in K562 Erythroleukemic Cells. *Genes* **2022**, *13*, 2337. [\[CrossRef\]](#)
56. Sun, X.-X.; Dai, M.-S.; Lu, H. 5-Fluorouracil Activation of P53 Involves an MDM2-Ribosomal Protein Interaction. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 8052–8059. [\[CrossRef\]](#)
57. Bunz, F.; Hwang, P.M.; Tarrance, C.; Waldman, T.; Zhang, Y.; Dillehay, L.; Williams, J.; Lengauer, C.; Kinzler, K.W.; Vogelstein, B. Disruption of P53 in Human Cancer Cells Alters the Responses to Therapeutic Agents. *J. Clin. Investig.* **1999**, *104*, 263–269. [\[CrossRef\]](#)

-
58. Stopper, H.; Garcia, S.B.; Waaga-Gasser, A.M.; Kannen, V. Antidepressant Fluoxetine and Its Potential against Colon Tumors. *World J. Gastrointest. Oncol.* **2014**, *6*, 11–21. [[CrossRef](#)]
 59. Zheng, Y.; Chang, X.; Huang, Y.; He, D. The Application of Antidepressant Drugs in Cancer Treatment. *Biomed. Pharm.* **2023**, *157*, 113985. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

SUPPLEMENTARY

Table S1: primers used in this study

Gen	Gene Accession Number	Forward	Reverse
Per1	NM_002616.3	ttgatgtgatggcctgtgtggactgtggg	gtgcagtttctgctgtaggtaaggctgg
Per2	NM_022817.3	ttctccgttggaaccaccagacatctgc	ccctgggtccctttaagcctcatagtcttg
Per3	NM_001289862.2	ggggactgcaaaagagaaaacgtccaggcg	aaaagggtcgattttcctaatacattatcaggacgc
Cry1	NM_001413465.1	gtgcgtaatccaaattggtattgtagc	acatgatactccacaagtttgggtc
Clock	NM_001267843.2	ctatgaggatgatgtgctgctgggaatgg	aaaatcaaggcactatgggggtttttccctcg
Bmal1	NM_001178.6	gcaaatgggtcatttcagatgtatgg	ggattcttacaaggaagaataaacgg
Nr1d2	NM_005126.5	acttgaagctattctggaactaacat	catgtcctcatcaattacagttttag
Sirt1	NM_012238.5	tagacacgctggaacagggttc	ctcctcgtacagcttcacagtc
Prx1	NM_002574.4	gggtcttaaaggctgatgaaggcatctcg	agctgggcacacttccccatgtttgc
UBC	NM_001135592.2	tgggatgcaaatcttcgtgaagaccctgac	accaagtgcagagtggactcttctggatg

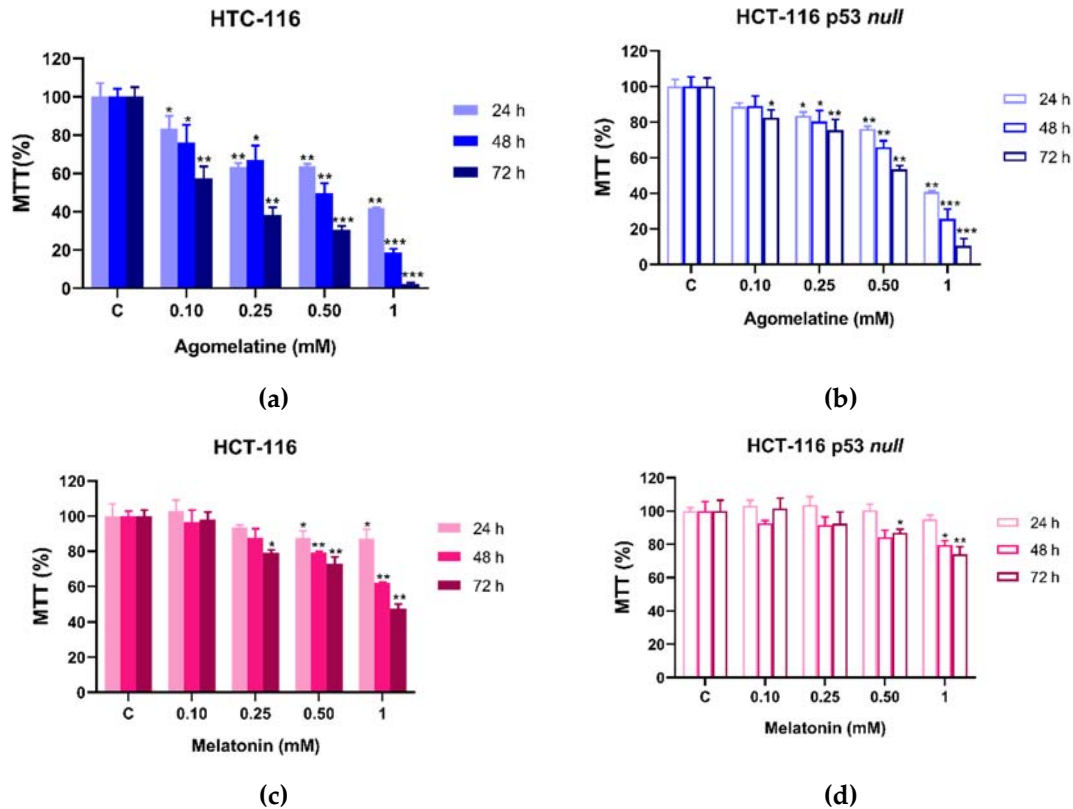


Figure S1. Growth inhibition of HCT-116 and HCT-116 p53 null cells after treatment with (a) (c) agomelatine (0-1 mM) and (b) (d) melatonin (0-1 mM) for 24, 48 and 72 hours. The results represented the mean $\pm$ SD of 3 experiments performed in quadruplicate. *P<0.05 vs C; **P<0.01 vs C; ***P<0.001 vs C.

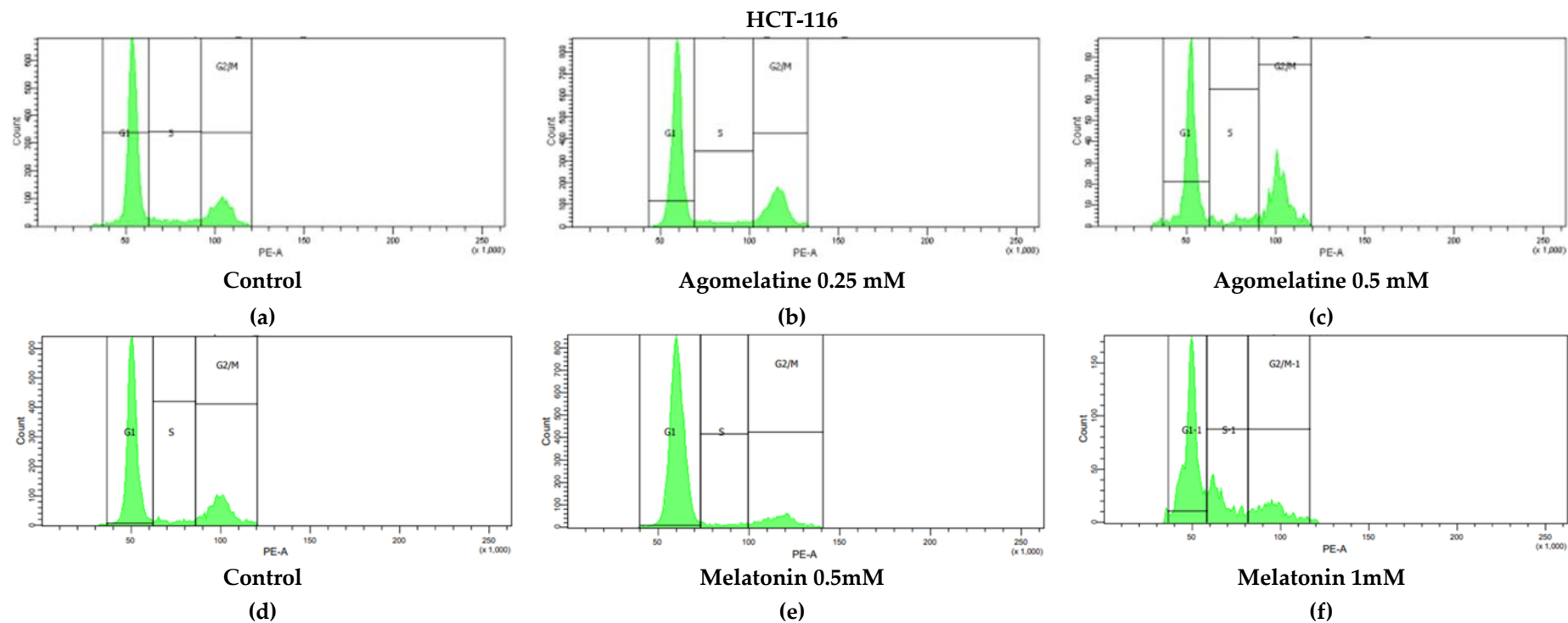


Figure S2. Raw data of cell cycle analysis by flow cytometry in HCT-116 cell line after treatment with agomelatine or melatonin.

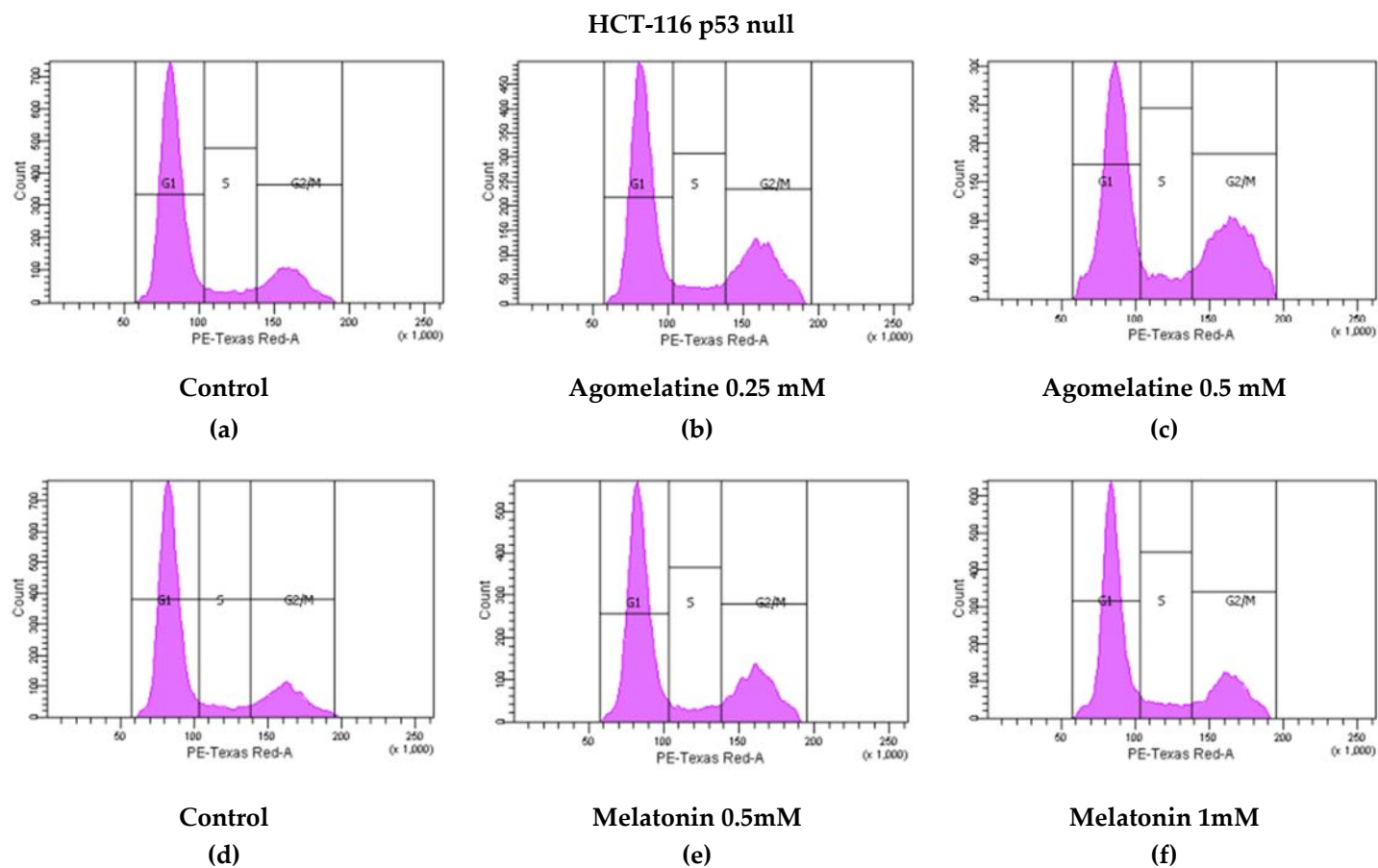


Figure S3. Raw data of cell cycle analysis by flow cytometry in HCT-116 p53 null cell line after treatment with agomelatine or melatonin.

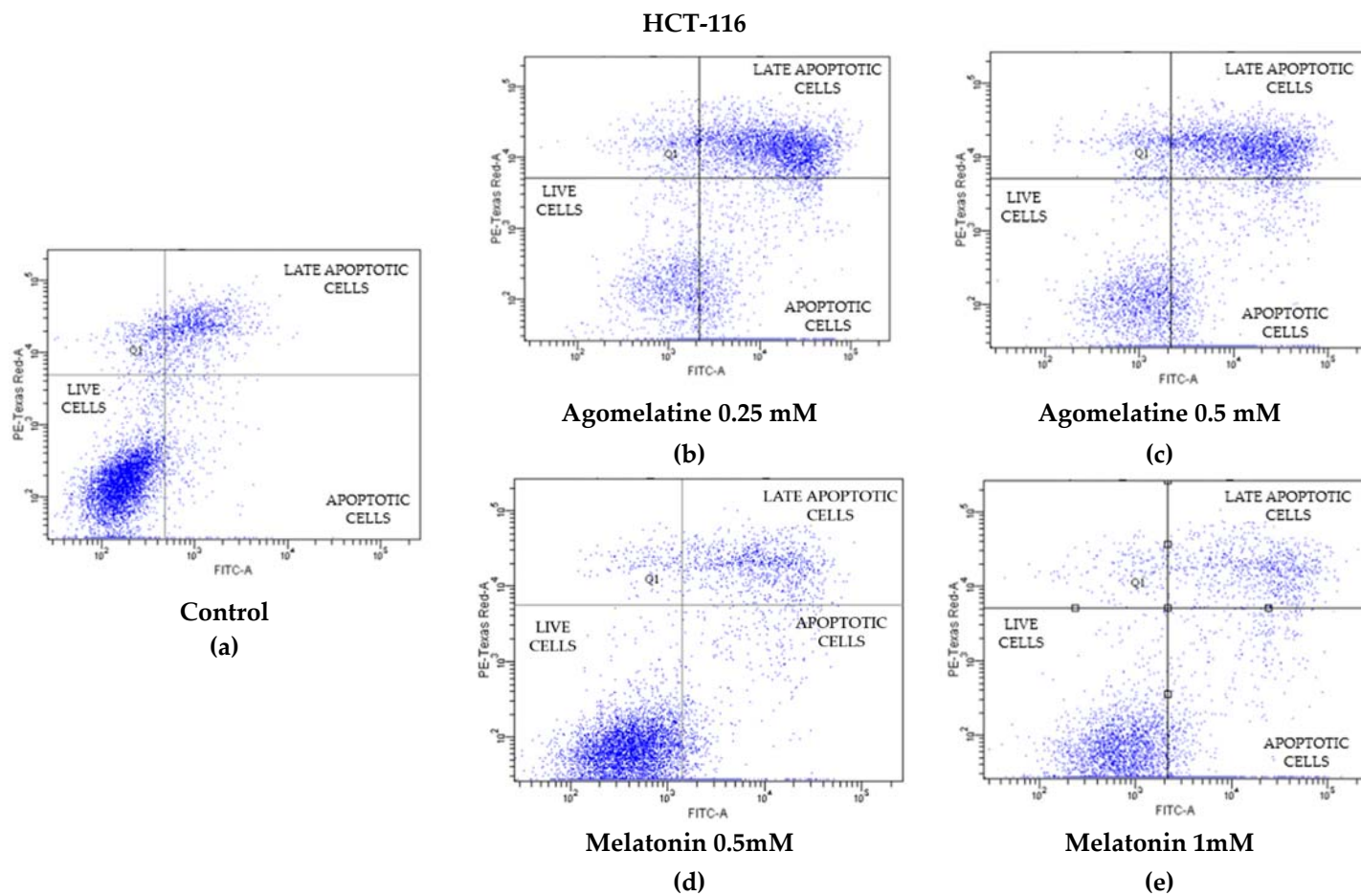


Figure S4. Raw data of apoptosis analysis by flow cytometry in HCT-116 cell line after treatment with agomelatine or melatonin.

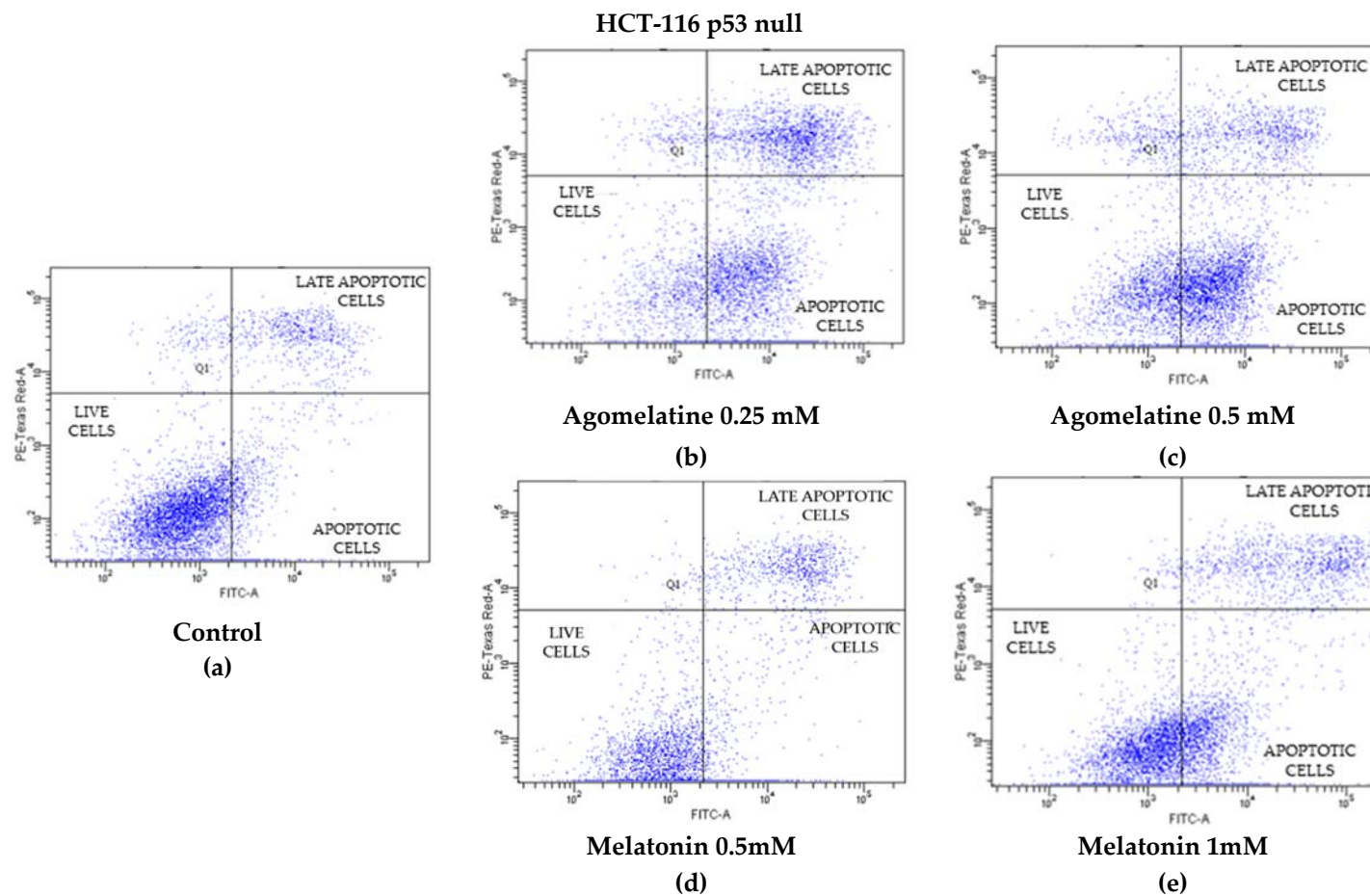


Figure S5. Raw data of apoptosis analysis by flow cytometry in HCT-116 cell line after treatment with agomelatine or melatonin.

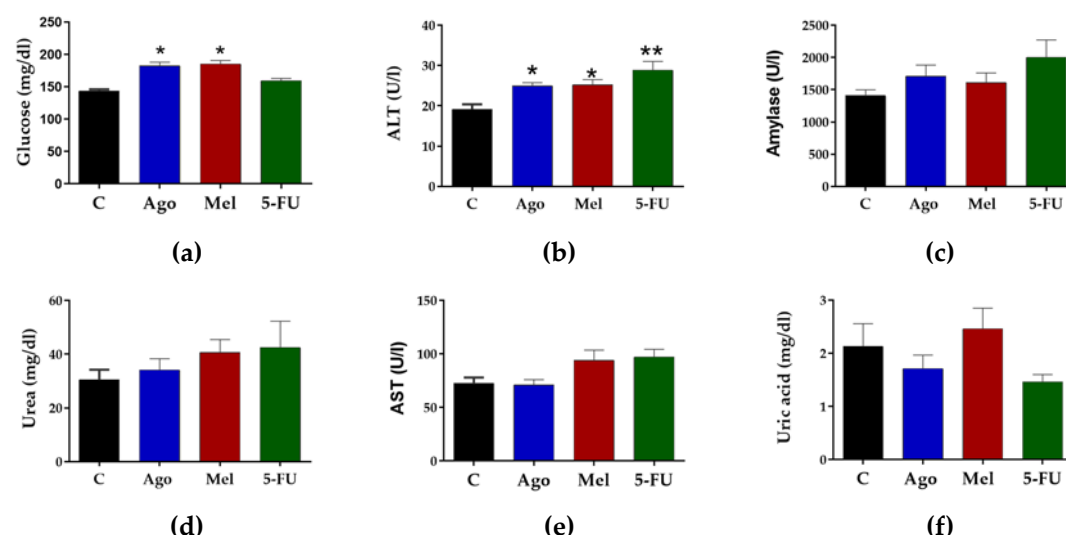


Figure S6. Levels of glucose (a), alanine aminotransferase (ALT) (b), amylase (c), urea (d), aspartame aminotransferase (e) and uric acid (f) in blood, present after the sacrifice of the animals. * P<0.05 C vs. Ago/Mel; **P<0.01 C vs. 5-FU.

Table S2. Results at 24 hours of the cosinor analysis of the clock genes expression after agomelatine or melatonin treatments in the HCT-116 cell line.

Gene	Treatment	PR ¹	P-value ²	Amplitude (A.U.) ³	Acrophase (h) ⁴	MESOR (A.U.)
Per1	Control	81.32	<0.0001	1.63 ± 0.20	3.38 ± 0.95	5.93 ± 0.143
	Ago 0.5	45.07	0.0112	6.06 ± 1.73*	10.24 ± 2.18*	8.49 ± 1.22*
	Mel 1	72.88	0.0001	4.78 ± 0.75*	5.46 ± 0.86	6.84 ± 1.06
Per2	Control	73.84	<0.0001	0.087 ± 0.013	1.69 ± 0.59	0.293 ± 0.009
	Ago 0.5	59.78	0.0011	0.155 ± 0.033	8.75 ± 0.81	0.343 ± 0.023***
	Mel 1	35.93	0.0355	0.118 ± 0.041	5.39 ± 1.32	0.305 ± 0.029**,#
Per3	Control	76.86	<0.0001	0.73 ± 0.10	6.76 ± 0.54	0.83 ± 0.07
	Ago 0.5	62.12	0.0007	1.09 ± 0.22	7.05 ± 0.77	1.25 ± 0.16
	Mel 1	63.79	0.0005	1.70 ± 0.33**,#	7.07 ± 0.74	1.47 ± 0.23*
Cry1	Control	74.52	<0.0001	2.03 ± 0.31	6.34 ± 0.96	3.78 ± 0.22
	Ago 0.5	67.37	0.0002	2.18 ± 0.39	9.78 ± 1.76*	4.15 ± 0.28
	Mel 1	72.36	0.0001	3.19 ± 0.51*	6.80 ± 1.09	4.79 ± 0.36*
Clock	Control	8.75	0.5033	0.021 ± 0.018	6.91 ± 5.77	0.265 ± 0.012
	Ago 0.5	63.61	0.0005	0.108 ± 0.021*	3.49 ± 0.68	0.195 ± 0.015*
	Mel 1	28.22	0.0832	0.110 ± 0.046*	7.07 ± 2.91	0.400 ± 0.032***,###
Bmal1	Control	44.46	0.0121	0.0053 ± 0.0029	13.25 ± 3.83	0.020 ± 0.001
	Ago 0.5	18.65	0.2126	0.0059 ± 0.0029	11.61 ± 6.25	0.036 ± 0.002***
	Mel 1	3.00	0.7956	0.0023 ± 0.0034	8.44 ± 12.41	0.023 ± 0.002###
Nr1d2	Control	74.52	<0.0001	2.10 ± 0.43	10.11 ± 2.14	4.21 ± 0.31
	Ago 0.5	67.37	0.0002	1.23 ± 0.16*	3.76 ± 0.47	2.42 ± 0.11***
	Mel 1	72.36	0.0001	1.48 ± 0.27	20.70 ± 3.83***,##	2.28 ± 0.19***

¹PR: Percentage of rhythm; ²P-value: zero amplitude test; ³A.U.: arbitrary units; ⁴h: hours; * P<0.05 vs control, **P<0.01 vs control, ***P<0.001 vs control; #P<0.05 vs agomelatine, ##P<0.01 vs agomelatine, ###P<0.001 vs agomelatine.

Table S3. Results at 24 hours of the cosinor analysis of the clock genes expression after agomelatine or melatonin treatments in the HCT-116 p53 null cell line.

Gene	Treatment	PR ¹	P-value ²	Amplitude (A.U.) ³	Acrophase (h) ⁴	MESOR (A.U.)
Per1	Control	51.93	0.0041	1.77 ± 0.49*	3.49 ± 1.12	4.86 ± 0.33 [†]
	Ago 0.5	39.04	0.0244	5.87 ± 1.89	3.23 ± 0.82	7.46 ± 1.34*
	Mel 1	81.12	<0.0001	2.42 ± 0.31 [‡]	4.08 ± 0.52	5.87 ± 0.22
Per2	Control	73.63	<0.0001	0.282 ± 0.042 [†]	5.65 ± 0.95 [†]	0.386 ± 0.032 [†]
	Ago 0.5	50.15	0.0054	0.271 ± 0.069	5.96 ± 1.53	0.329 ± 0.050
	Mel 1	60.68	0.0009	0.327 ± 0.064	6.70 ± 1.50	0.365 ± 0.049
Per3	Control	81.66	<0.0001	0.181 ± 0.022 ^{††}	5.42 ± 0.66	0.378 ± 0.015 ^{††}
	Ago 0.5	15.86	0.2739	0.044 ± 0.027 ^{***}	5.19 ± 3.09	0.252 ± 0.019 ^{***}
	Mel 1	83.65	<0.0001	0.181 ± 0.021 ^{###}	5.76 ± 0.66	0.307 ± 0.015 ^{*,#}
Cry1	Control	90.30	<0.0001	2.70 ± 0.22	5.24 ± 0.46	4.57 ± 0.16 [†]
	Ago 0.5	91.51	<0.0001	2.64 ± 0.21	9.55 ± 0.75 ^{***}	4.06 ± 0.15*
	Mel 1	95.49	<0.0001	2.69 ± 0.15	6.15 ± 0.35 ^{###}	4.22 ± 0.11
Clock	Control	61.31	0.0008	0.049 ± 0.010	6.42 ± 1.32	0.198 ± 0.007 ^{††}
	Ago 0.5	39.02	0.0002	0.059 ± 0.011	5.24 ± 0.95	0.207 ± 0.077
	Mel 1	50.92	0.0048	0.053 ± 0.013	6.61 ± 1.67	0.235 ± 0.009
Bmal1	Control	32.37	0.0532	0.0036 ± 0.0013	16.53 ± 0.62	0.013 ± 0.001 ^{††}
	Ago 0.5	4.06	0.7328	0.0012 ± 0.0014	4.97 ± 0.63	0.014 ± 0.001 ^{***}
	Mel 1	7.02	0.5792	0.0019 ± 0.0018	2.24 ± 2.11	0.014 ± 0.001 ^{***}
Nr1d2	Control	92.54	<0.0001	1.32 ± 0.09	2.34 ± 0.17 [†]	2.51 ± 0.06 ^{††}
	Ago 0.5	83.42	<0.0001	1.33 ± 0.15	1.85 ± 0.21*	2.64 ± 0.11*
	Mel 1	73.99	<0.0001	1.20 ± 0.18	0.59 ± 0.09 ^{***,###}	2.79 ± 0.13

¹PR: Percentage of rhythm; ²P-value: zero amplitude test; ³A.U.: arbitrary units; ⁴h: hours; * P<0.05 vs control, **P<0.01 vs control, ***P<0.001 vs control; #P<0.05 vs agomelatine, ##P<0.01 vs agomelatine, ###P<0.001 vs agomelatine. [†]P<0.05 vs HCT-116, ^{††} P<0.01 vs HCT-116.

Table S4. Results at 24 hours of the cosinor analysis of Sirt1 gene expression after agomelatine or melatonin treatments in the HCT-116 and HCT-116 p53 null cell lines.

Cell line	Treatment	PR ¹	P-value ²	Amplitude (A.U.) ³	Acrophase (h) ⁴	MESOR (A.U.)
HCT-116	Control	19.34	0.1995	0.256 ± 0.135	4.13 ± 2.01	1.38 ± 0.09
	Ago 0.5	38.31	0.0267	0.170 ± 0.056	21.12 ± 1.25 ^{***}	1.41 ± 0.04
	Mel 1	81.95	<0.0001	0.488 ± 0.059 ^{*,#}	0.23 ± 0.03 ^{*,###}	1.97 ± 0.04 ^{***,###}
HCT-116 p53 null	Control	34.47	0.042	0.255 ± 0.090	18.83 ± 6.71	3.79 ± 0.06 ^{†††}
	Ago 0.5	95.96	<0.0001	0.908 ± 0.048 ^{***}	21.61 ± 1.09	3.60 ± 0.34
	Mel 1	93.55	<0.0001	1.050 ± 0.070 ^{###}	2.93 ± 0.21 ^{*,##}	4.21 ± 0.05 [#]

¹PR: Percentage of rhythm; ²P-value: zero amplitude test; ³A.U.: arbitrary units; ⁴h: hours; * P<0.05 vs control, **P<0.01 vs control, ***P<0.001 vs control; #P<0.05 vs agomelatine, ##P<0.01 vs agomelatine, ###P<0.001 vs agomelatine. ^{†††} P<0.001 vs HCT-116.

Table S5. Results at 24 hours of the cosinor analysis of Prx1 gene expression after agomelatine or melatonin treatments in the HCT-116 and HCT-116 p53 null cell lines.

	Treatment	PR ¹	P-value ²	Amplitude (A.U.) ³	Acrophase (h) ⁴	MESOR (A.U.)
HCT-116	Control	82.62	<0.0001	67.2 ± 8.2	3.35 ± 0.49	299 ± 6
	Ago 0.5	76.24	<0.0001	61.5 ± 8.9	2.56 ± 0.44	235 ± 6 ^{***}
	Mel 1	68.02	0.0002	60.5 ± 10.7	21.88 ± 0.21 ^{***,###}	336 ± 8 [*]
HCT-116 p53 null	Control	80.94	<0.0001	83 ± 11	0.85 ± 0.11 ^{††}	464 ± 13 ^{†††}
	Ago 0.5	67.76	0.0002	99 ± 17	3.77 ± 0.73 ^{***}	576 ± 7 ^{***}
	Mel 1	75.83	<0.0001	108 ± 2	1.22 ± 0.68 ^{###}	586 ± 12 ^{###}

¹PR: Percentage of rhythm; ² P-value: zero amplitude test; ³A.U.: arbitrary units; ⁴h: hours; * P<0.05 vs control, ***P<0.001 vs control; ###P<0.001 vs agomelatine. †† P<0.01 vs HCT-116, ††† P<0.001 vs HCT-116.

Table S6. Median of Ct values obtained in the circadian rhythmicity analysis for each gene at all conditions included in the study in HCT-116 cells.

	Gene																										
	Per1			Per2			Per3			Cry1			Clock			Bmal1			Nr1d2			Sirt1			Prx1		
Time (h)	C	M el	Ag o	C	M el	Ag o	C	M el	Ag o	C	M el	Ag o	C	M el	Ag o	C	M el	Ag o	C	M el	Ag o	C	M el	Ag o	C	M el	Ag o
4	22.56	22.72	21.79	26.44	26.43	26.05	26.10	25.71	25.26	22.80	22.33	22.99	27.46	27.32	27.65	31.48	30.87	31.18	24.50	24.11	23.65	24.46	24.38	25.27	17.08	17.02	17.11
8	22.82	22.19	21.68	26.62	27.03	26.20	26.18	25.92	25.33	23.38	22.91	23.40	27.66	27.16	27.99	31.84	30.96	31.09	25.12	24.92	23.91	25.17	25.13	25.08	17.45	17.24	17.71
12	23.29	22.11	22.34	27.22	26.82	26.34	26.24	26.45	25.64	23.52	23.10	22.88	28.00	27.13	27.75	31.08	30.73	30.46	25.55	25.05	25.68	25.67	24.85	25.55	17.55	17.60	18.11
16	22.68	22.54	22.49	28.07	28.54	27.33	27.83	27.49	27.19	24.35	24.08	23.47	27.62	27.47	28.09	31.41	31.07	30.46	24.47	24.04	24.79	25.07	24.37	24.91	17.23	16.92	17.58
20	22.53	22.68	22.97	27.72	28.60	28.20	27.91	28.40	26.85	24.59	24.51	24.53	27.90	27.86	27.91	31.68	31.75	31.25	23.98	23.92	24.44	25.21	24.47	25.02	16.82	16.87	17.46
24	22.23	21.91	23.25	26.86	27.36	28.47	27.04	28.69	26.98	24.15	24.33	25.12	28.07	27.75	28.53	32.41	31.67	31.38	24.11	23.70	23.91	25.66	24.68	24.96	17.32	16.98	17.51
28	23.07	21.96	22.63	27.84	27.76	28.36	27.36	28.57	27.67	24.02	24.07	24.77	29.47	29.25	29.29	33.84	33.75	32.46	24.69	24.54	23.88	25.13	24.79	24.84	17.12	16.73	17.78
32	22.78	22.36	22.27	28.05	28.64	26.87	27.86	27.01	25.66	23.74	23.80	23.72	29.20	29.16	29.59	33.18	33.47	32.38	25.50	25.36	24.10	25.10	24.85	25.20	16.85	16.75	17.95
36	22.60	22.85	21.91	28.25	27.62	26.87	26.45	27.01	25.50	23.89	23.24	23.10	29.05	28.69	28.84	32.54	31.70	31.96	25.09	24.39	24.12	24.61	24.37	25.37	16.82	16.56	18.03
40	22.16	22.92	22.78	28.17	27.96	26.37	27.07	28.02	27.21	24.20	23.82	23.33	28.70	28.80	28.63	32.12	32.15	31.64	24.43	24.26	23.94	25.08	24.30	25.04	16.92	16.80	17.07
44	22.63	22.55	20.74	26.89	28.18	26.53	26.89	29.69	28.66	23.42	24.19	24.54	29.75	29.65	29.65	32.86	32.77	31.16	23.60	23.54	23.75	25.70	25.09	25.84	17.24	17.10	17.38
48	22.86	22.39	20.85	26.78	27.33	29.16	26.71	29.41	28.26	22.97	23.46	24.77	30.10	28.99	30.01	33.59	32.69	31.44	24.25	23.63	23.43	25.66	25.01	26.43	17.26	17.11	18.25

Table S7. Median of Ct values obtained in the circadian rhythmicity analysis for each gene at all conditions included in the study in HCT-116 p53 null cells.

	Gene																										
	Per1			Per2			Per3			Cry1			Clock			Bmal1			Nr1d2			Sirt1			Prx1		
Ti me (h)	C	M el	Ag o	C	M el	Ag o	C	M el	Ag o	C	M el	Ag o	C	M el	Ag o	C	M el	Ag o	C	M el	Ag o	C	M el	Ag o	C	M el	Ag o
4	22. 75	22. 72	21. 91	26. 48	26. 27	26. 67	26. 34	26. 59	26. 95	22. 65	22. 88	23. 30	28. 16	27. 67	27. 90	32. 14	31. 50	31. 61	24. 18	24. 02	23. 81	23. 35	23. 03	23. 86	16. 17	16. 02	16. 18
8	23. 31	23. 05	22. 18	26. 74	26. 55	27. 51	26. 84	26. 75	28. 08	23. 06	22. 94	23. 05	28. 03	27. 70	28. 13	32. 63	31. 77	32. 02	24. 74	24. 11	24. 21	23. 97	23. 55	24. 27	16. 47	16. 54	16. 80
12	23. 37	22. 91	23. 04	27. 84	27. 93	27. 35	27. 16	27. 73	27. 67	23. 65	23. 69	23. 12	28. 36	28. 29	28. 42	32. 12	31. 74	31. 09	25. 69	25. 44	25. 56	23. 77	24. 13	24. 09	16. 71	16. 69	16. 94
16	23. 40	23. 34	23. 11	28. 90	29. 13	28. 80	28. 00	28. 42	27. 94	24. 45	24. 59	23. 60	28. 44	28. 14	28. 49	31. 37	31. 86	30. 69	24. 66	24. 76	24. 74	23. 67	23. 66	23. 88	16. 44	16. 43	16. 85
20	22. 90	22. 97	23. 80	27. 89	28. 61	29. 05	27. 74	27. 95	27. 79	24. 33	24. 65	24. 97	28. 60	28. 35	28. 16	32. 23	31. 74	31. 33	23. 94	23. 84	24. 44	23. 63	23. 32	23. 48	16. 27	16. 21	16. 65
24	22. 33	22. 24	22. 95	27. 13	27. 78	28. 87	27. 18	27. 77	28. 00	23. 61	23. 84	25. 37	28. 27	28. 41	27. 75	32. 25	32. 41	30. 94	23. 73	23. 74	23. 69	23. 87	23. 47	23. 59	16. 29	16. 27	16. 54
28	22. 64	23. 05	22. 16	27. 27	27. 89	28. 48	26. 45	26. 54	27. 48	23. 23	23. 83	24. 89	28. 98	29. 09	28. 90	31. 78	31. 74	31. 40	23. 47	23. 47	23. 38	24. 03	24. 08	23. 63	16. 26	16. 41	16. 96
32	22. 80	22. 75	21. 85	27. 82	27. 93	27. 24	27. 00	27. 50	26. 89	23. 33	23. 56	24. 03	28. 95	28. 62	28. 76	31. 35	30. 97	30. 97	23. 64	24. 01	22. 71	24. 10	23. 58	23. 68	16. 52	16. 33	16. 97
36	23. 01	23. 57	22. 17	28. 31	29. 29	27. 19	27. 64	27. 74	26. 64	24. 68	24. 19	23. 58	29. 44	28. 80	28. 28	30. 96	30. 76	30. 66	23. 72	23. 72	22. 70	23. 71	23. 76	23. 58	16. 33	16. 56	18. 03
40	22. 59	22. 63	22. 53	28. 35	29. 07	27. 44	27. 62	28. 03	26. 99	24. 66	24. 64	23. 62	29. 15	29. 02	28. 07	30. 85	30. 64	30. 41	23. 49	23. 40	22. 95	23. 99	23. 69	23. 57	16. 21	16. 80	17. 07
44	22. 14	22. 60	24. 29	26. 90	27. 14	27. 62	26. 35	26. 35	25. 90	23. 49	23. 86	24. 00	28. 98	28. 21	28. 12	31. 43	30. 72	30. 43	23. 01	23. 04	22. 64	24. 29	23. 75	24. 00	16. 47	17. 10	17. 38
48	22. 04	22. 64	23. 07	27. 27	26. 62	28. 17	27. 74	27. 41	26. 53	23. 30	23. 19	24. 56	29. 58	28. 50	28. 75	31. 61	31. 05	30. 83	23. 92	23. 19	22. 75	24. 09	23. 42	23. 63	16. 14	17. 11	18. 25