

IMPLICACIÓN DE LA ENDOTELINA-1 EN EL MECANISMO DE INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO DE CÁNCER DE COLON POR LA MELATONINA

TESIS DOCTORAL



HOSPITAL UNIVERSITARIO SAN CECILIO
UNIVERSIDAD DE GRANADA

MARÍA SOL ZURITA SAAVEDRA

Granada, 2014

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: María Sol Zurita Saavedra
D.L.: GR 2338-2014
ISBN: 978-84-9083-382-7

El doctorando María Sol Zurita Saavedra y los directores de la tesis Dr. Javier Salmerón Escobar, Dra. Josefa León López y Dra. Cristina González Puga, garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por el doctorando bajo la dirección de los directores de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Granada, 10 de Julio de 2014

Director/es de la Tesis

Doctorando

Fdo.: Javier Salmerón Escobar

Fdo.: María Sol Zurita Saavedra

Fdo.: Josefa León López

Fdo.: Cristina González Puga

Índice

INTRODUCCIÓN	3
1. ADENOCARCINOMA COLORRECTAL	3
1.1. Factores de riesgo para el cáncer colorrectal	3
1.1.1. Predisposición genética	5
a) <i>Cáncer de colon hereditario no polipósico (CCHNP)</i>	6
b) <i>Poliposis adenomatosa familiar (PAF)</i>	6
1.1.2. Factores ambientales	6
1.1.3. Trastornos premalignos: Enfermedad inflamatoria intestinal ..	7
1.2. Prevención y detección temprana del cáncer colorrectal	8
1.2.1. Prevención primaria	8
1.2.2. Programas de despistaje	8
1.3. Signos y síntomas del cáncer colorrectal	9
1.4. Diagnóstico y valoración	10
1.5. Estadificación y pronóstico del cáncer colorrectal	10
1.6. Tratamiento del cáncer colorrectal	13
1.6.1. Tratamiento quirúrgico	13
1.6.2. Criterios para decidir la utilización del tratamiento neoadyuvante	13
2. ENDOTELINA	15
2.1. Síntesis de endotelinas	15
2.2. Regulación de la síntesis de ET-1	17
2.2.1. Factores reguladores del promotor de <i>edn1</i>	17
2.2.2. Mecanismos reguladores emergentes	21
2.2.2.1. Regulación epigenética	21
2.2.2.2. Regulación de la estabilidad del ARNm	22
2.3. Receptores de endotelina	22
2.4. Efectos biológicos	23

2.5. Sistema endotelina y cáncer	24
2.5.1. <i>Endotelina 1 y proliferación de células tumorales</i>	25
2.5.2. <i>Endotelina 1 y neovascularización tumoral</i>	26
2.5.3. <i>Endotelina 1 y apoptosis</i>	26
2.5.4. <i>ET-1, remodelación ósea y metástasis.</i>	27
2.5.5. <i>Endotelina y cáncer de colon.</i>	28
3. MELATONINA	29
3.1. Síntesis y catabolismo de la melatonina	29
3.2. Regulación de la síntesis de melatonina	31
3.3. Mecanismos de acción de la melatonina	31
3.3.1. <i>Receptores de membrana de melatonina</i>	32
3.3.2. <i>Receptores nucleares</i>	33
3.3.3. <i>Eliminación de radicales libres</i>	34
3.4. Melatonina y cáncer	35
3.4.1. <i>Efecto antioxidante.</i>	35
3.4.2. <i>Regulación en la expresión de receptores de estrógenos y andrógenos</i>	36
3.4.3. <i>Modulación en la actividad de la telomerasa</i>	37
3.4.4. <i>Modulación del ciclo celular y apoptosis</i>	38
3.4.5. <i>Melatonina y angiogénesis</i>	39
3.4.6. <i>Melatonina y sistema inmune</i>	40
3.4.7. <i>Melatonina y ritmos circadianos.</i>	40
3.4.8. <i>Melatonina y p53</i>	41
3.5. Melatonina y cáncer de colon	42
OBJETIVOS	47
MATERIALES Y MÉTODOS	49
1. CULTIVOS CELULARES	49
2. PREPARACIÓN DE MELATONINA Y TRATAMIENTOS	500
3. ESTIMACIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR	50
3.1. Ensayo MTT	50
3.2. Ensayo Azul Tripán	51
4. DETERMINACIÓN DEL CICLO CELULAR	51
5. EXTRACCIÓN DE ARN	52
6. SÍNTESIS DE ADNC	53
7. PCR A TIEMPO REAL	53

8. DETERMINACIÓN DE CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS	54
8.1. Preparación de la muestra	54
9. WESTERN BLOTTING	54
10. MEDIDA DE LOS NIVELES DE ET-1	55
11. INMUNOFLUORESCENCIA	56
12. MEDIDA DE LOS NIVELES DE AMPc	56
13. MEDIDA DE LA ACTIVIDAD DE PKA Y PKC	57
14. MUESTRAS HUMANAS DE CCR	58
 RESULTADOS	 61
1. EFECTO DE LA MELATONINA SOBRE LA VIABILIDAD CELULAR EN LÍNEAS ESTABLECIDAS DE CÁNCER DE COLON EN CULTIVO	61
2. EFECTO DE LA MELATONINA SOBRE EL EJE ENDOTELINA-1 EN LÍNEAS CELULARES ESTABLECIDAS DE CÁNCER DE COLON	64
3. MECANISMO DE INHIBICIÓN DEL GEN edn1 POR LA MELATONINA	68
3.1. FoxO-1	68
3.2. NF-KB Y AP-1	75
4. PROMOTOR	79
5. ESTUDIOS EN TUMORES PROCEDENTES DE PACIENTES	80
 DISCUSIÓN	 85
 CONCLUSIONES	 95
 BIBLIOGRAFÍA	 97
 ANEXOS	 133

INTRODUCCIÓN

1. ADENOCARCINOMA COLORRECTAL

El carcinoma colorrectal (CCR) es el segundo tumor maligno más común en los países desarrollados, considerando ambos sexos. Se trata del tercer tumor más frecuente diagnosticado en varones, y el segundo en mujeres, con más de 1,2 millones de casos nuevos al año (Ferlay y cols., 2010). Ocupa el primer lugar como causa de muerte por tumor. En varones es la segunda causa después del cáncer de pulmón. En España, la prevalencia es de 26.500 casos/año y representa aproximadamente el 15% de la incidencia de todos los tumores, con una incidencia estimada de 22.000 nuevos casos (Castell A y cols., 2009).

El cáncer de colon representa dos tercios de todos los cánceres colorrectales (el 97% de los tumores colorrectales son adenocarcinomas) (Levin y cols., 2008). El riesgo de cáncer colorrectal aumenta con la edad, elevándose al 0,87% en los individuos de cincuenta años de edad y al 5,8% en personas de más de 80 años. Y en todos los países es más común en los hombres que en las mujeres (Ferlay y cols., 2010).

Pese a estas cifras, la detección precoz y los tratamientos han mejorado de manera apreciable en los últimos años, incrementando la supervivencia de los pacientes, especialmente la de los más jóvenes (Edwards y cols., 2011).

1.1. Factores de riesgo para el cáncer colorrectal

El cáncer colorrectal es el resultado de una combinación de factores ambientales y genéticos. Las diferencias en la incidencia de cáncer colorrectal entre países, el incremento en el número de casos de enfermedad en inmigrantes de zonas de baja incidencia hacia otras donde es más alta, así como su asociación con una dieta rica en carne roja y procesada, ingesta de alcohol, tabaquismo, vida sedentaria y obesidad (sobre todo central) sugieren un impacto de factores ambientales. El aumento de la incidencia en los familiares de pacientes diagnosticados con esta enfermedad apunta a la participación de factores hereditarios (Weitz y cols., 2005). Tabla 1 (*Colorrectal Cancer facts and figures 2008-2010, American Cancer Society*).

Tabla 1. Factores de riesgo para el cáncer colorrectal

		Riesgo relativo
Factores que incrementan el riesgo		
<i>Antecedentes familiares:</i>		
-	1 Familiar de primer grado	2,2
-	>1 Familiar de primer grado	4
-	Familiar diagnosticado antes de los 45 años	3,9
<i>Enfermedad Inflamatoria Intestinal:</i>		
-	Enfermedad de Crohn (colon)	2,6
-	Colitis ulcerosa (colon)	2,8
-	Colitis ulcerosa (recto)	1,9
<i>Otros factores:</i>		
-	Obesidad	
	Hombre colon	1,3
	recto	1,1
	Mujer colon	1,1
-	Consumo de alcohol	1,1
-	Consumo de carnes rojas	1,3
-	Diabetes	1,3
-	Consumo de carnes procesadas	1,2
Factores que disminuyen el riesgo		
	Consumo de leche (<70 y >250 gr/día)	0,9
	Calcio (incluido suplementos)	0,8
	Actividad física (colon)	
-	Hombre	0,8
-	Mujer	0,7

El riesgo relativo compara el riesgo de enfermedad entre las personas expuestas al factor de riesgo y las personas no expuestas. Si el riesgo relativo es >1.0, el riesgo de padecer enfermedad es más alto en las personas expuestas que en las no expuestas. El riesgo relativo <1.0, refleja una asociación inversa entre factor de riesgo y enfermedad.

IMC: Índice de Masa Corporal (peso/talla²)

* Extraído de *Colorrectal Cancer facts and figures 2008-2010*, American Cancer Society.

1.1.1. Predisposición genética

El campo de la genética del cáncer colorrectal experimentó una revolución en 1988 al descubrirse los cambios implicados en la progresión de un pólipo adenomatoso benigno hacia un carcinoma invasivo (Vogelstein y cols., 1988). Desde entonces se ha producido una eclosión de datos sobre las vías moleculares y genéticas que conducen al cáncer colorrectal. En el 15 % de los carcinomas colorrectales existe una relación familiar, y el 5% se asocia a cáncer colorrectal hereditario (Fearhead y cols., 2002).

Los genes supresores de los tumores, los genes reparadores de los errores en la replicación del ADN y los protooncogenes contribuyen todos ellos a las neoplasias de colon y recto, tanto en las variantes esporádicas como hereditarias.

En la mayor parte de los cánceres colorrectales esporádicos y en los que se desarrollan en pacientes con poliposis adenomatosa familiar (PAF), la alteración genética inicial parece ser la inactivación del gen APC, localizado en el cromosoma 5q21-22 (Fearhead y cols., 2002).

Los tumores que se desarrollan en pacientes con síndrome de cáncer colorrectal hereditario no polipósico (CCHNP), y aproximadamente el 15% de los cánceres colorrectales esporádicos, están causados por la inactivación de los genes que codifican las enzimas encargadas de supervisar y corregir las mutaciones que se producen durante la replicación del ADN. Hasta el momento actual se han clonado seis genes diferentes, denominados MSH2, MSH6, MLH1, MLH3, PMS1 Y PMS2. Su inactivación tiene como resultado la acumulación de mutaciones en secuencias repetitivas, que están distribuidas uniformemente en el genoma y se conocen como microsatélites. Las variaciones de longitud en dichas secuencias entre el ADN normal y tumoral se conocen como "inestabilidad de microsatélites". En la mayor parte de los pacientes con CCHNP, la inestabilidad de microsatélites se origina como resultado de una mutación germinal en los genes MLH1 y MSH2, y más raramente en los genes MSH6, MLH3, PMS1 y PMS2. En pacientes con cáncer colorrectal esporádico, la inestabilidad de microsatélites es el resultado de la inactivación epigenética del gen MLH1, como consecuencia de la hipermetilación de secuencias pCG en el promotor. La inestabilidad de microsatélites contribuiría en el proceso de carcinogénesis colorrectal, a través de la acumulación de mutaciones en oncogenes y genes supresores, como TGF- β RII, Bax, Smad4 y otros genes involucrados en las vías moleculares reguladoras de la proliferación y muerte celular (Lynch y De La Chapelle, 2003, Alvarez y cols., 2010).

a) Cáncer de colon hereditario no polipósico (CCHNP)

El CCHNP, también conocido como síndrome de Lynch, es la forma más común de cáncer colorrectal hereditario. Es responsable del 2 al 3% de los cánceres colorrectales, provocando su aparición en individuos jóvenes pertenecientes a varias generaciones de una misma familia. La enfermedad se transmite con carácter autosómico dominante, con una penetración cercana al 80%. En estos pacientes, los tumores tienden a localizarse en el lado derecho del colon, y tienen un número elevado de tumores sincrónicos y metacrónicos. En algunas familias el cáncer colorrectal es la única manifestación de la enfermedad (Lynch I), mientras que en otras, además del cáncer colorrectal, existe una predisposición para otros tipos de cánceres, principalmente de endometrio, ovario, estómago, intestino delgado, páncreas, hígado y vías biliares, cerebro y uréter (Lynch II) (Vasen y cols. 2007).

b) Poliposis adenomatosa familiar (PAF)

La PAF es un síndrome autosómico dominante, caracterizado por la aparición de más de cien pólipos adenomatosos a lo largo del colon y recto. Las personas afectadas tienen un riesgo de cáncer colorrectal que se aproxima al 100%, y este síndrome es responsable del 1% de los casos de cáncer colorrectal.

En las formas típicas de la enfermedad, la edad promedio de aparición de cáncer colorrectal es 39 años (rango 34-43 años), y se debe considerar que el 7% lo desarrollará a los 21 años de edad. El diagnóstico precoz de los portadores de la mutación de APC ha mejorado el manejo, permitiendo intervenciones a tiempo y aumentado la supervivencia (Nieuwenhuis y cols., 2011).

1.1.2. Factores ambientales

El colon es un órgano expuesto de forma constante a sustancias ingeridas o producidas por su digestión, por lo que la dieta se ha involucrado en la etiopatogenia del cáncer colorrectal desde hace ya unas décadas. Por otro lado, la variación existente en la incidencia de cáncer colorrectal entre diferentes regiones geográficas, se debe probablemente a la diferente exposición a determinados factores de riesgo relacionados con el cáncer colorrectal.

Actualmente, los resultados de varios estudios epidemiológicos son insuficientes para demostrar el papel de la fibra en el cáncer colorrectal. Por otro lado, sólo existe un estudio que muestre una asociación de aumento de riesgo (doble que en la población de control) en individuos con una ingestión alta de

grasa de origen animal. Hay mayor evidencia de la asociación entre la ingestión de carnes rojas y un aumento de la incidencia de cáncer colorrectal, de manera que se estima que un aumento diario de ingestión de 100 g de carnes rojas, va unido a un 12-17% de incremento de riesgo de cáncer colorrectal (Aune y cols., 2011).

A pesar de esto, se aceptan los siguientes factores de riesgo: alcohol, consumo de carnes rojas, bajo consumo de vegetales y ácido fólico (importante para la metilación normal del ADN), tabaco, vida sedentaria, obesidad (sobre todo central), diabetes y corta y mala calidad del sueño. Como factores protectores se incluyen el consumo de pescado, la terapia hormonal sustitutiva, los anticonceptivos orales, la ingesta de calcio (actúa como un agente quelante de sales biliares, con influencia directa en la mucosa del colon), y la práctica de ejercicio diario (Fernández y cols., 2001; Cho y cols., 2004; Larsson y Wolk, 2007; Thompson y cols., 2010; Egeberg y cols., 2011).

1.1.3. Trastornos premalignos: Enfermedad inflamatoria intestinal

Los pacientes con colitis ulcerosa (CU) y enfermedad de Crohn (EC), tienen un riesgo de cáncer colorrectal más elevado que la población en general. Un metaanálisis de 2001 (Eaden y cols., 2001) determina que la prevalencia de CCR en pacientes con colitis ulcerosa (CU) es del 3,7%. También en la enfermedad de Crohn se detecta una prevalencia elevada para estos tumores, estimada alrededor del 2-1,9%, que se alcanza el 2,5% si solo se contempla el cáncer de colon (Jess y cols., 2005).

Sin embargo, la enfermedad inflamatoria intestinal (EII) sólo contribuye en el 1-2% de todos los casos de cáncer colorrectal.—Existen controversias con respecto a la influencia de la edad de inicio de la EII en el riesgo de padecer neoplasia (Castell A y cols., 2009); sin embargo, el riesgo aumenta en pacientes con afectación difusa del colon, presencia de colangitis esclerosante, historia familiar de cáncer colorrectal, pseudopólipos postinflamación y larga duración de la dolencia. Se estima que a partir de los 10 años desde el diagnóstico de la enfermedad, el riesgo acumulado de cáncer colorrectal aumenta un 1% cada año (Rizzo y cols., 2011). Así, el riesgo de cáncer colorrectal en pacientes con CU es del 2% después de 10 años, el 8% después de 20 años, y del 18% después de 30 años de enfermedad activa. La frecuencia total de cáncer en pacientes con enfermedad de Crohn es de un 7% en 20 años. No obstante, es de reseñar que la EII tiene una tendencia a la baja, lo que se explica, posiblemente, por el uso de 5-aminosalicílico y el incremento de la vigilancia colonoscópica (Lakatos PL y cols., 2008).

1.2. Prevención y detección temprana del cáncer colorrectal

1.2.1. Prevención primaria

La prevención del cáncer colorrectal mediante la inhibición del desarrollo de pólipos adenomatosos es objeto de extensa investigación clínica. La ingesta de suplementos de calcio parece proporcionar un modesto beneficio en la prevención de los pólipos adenomatosos, pero el hipotético efecto protector de los suplementos de fibra, el incremento en el consumo de frutas y vegetales y el uso de vitaminas antioxidantes no ha sido confirmado en estudios prospectivos (Rinella y cols., 2012).

Varios estudios epidemiológicos han establecido una relación entre la ingesta de aspirina y un menor riesgo de cáncer colorrectal (Zhou y cols., 2011). Además, estudios prospectivos han demostrado que los inhibidores selectivos y no selectivos de la ciclooxygenasa reducen el número y tamaño de los adenomas en pacientes con poliposis adenomatosa familiar (Cole y cols., 2009). Por otro lado, existen otros estudios que demuestran que el uso de aspirina reduce el riesgo de pólipos adenomatosos en pacientes operados de cáncer colorrectal y en pacientes con historia previa de adenomas colorrectales extirpados endoscópicamente (Ali y cols., 2011). Sin embargo, no todos los pólipos adenomatosos se transforman en cáncer colorrectal, por lo que la evidencia actual no apoya su uso como forma de prevención primaria ni como sustituto de los programas de detección precoz de carcinoma colorrectal (Burn y cols., 2011).

1.2.2. Programas de despistaje

Existe evidencia concluyente de que el diagnóstico y tratamiento precoces de pólipos adenomatosos y de los cánceres asintomáticos mediante programas de despistaje en la población general disminuyen la mortalidad por cáncer colorrectal.

Las sociedades médicas y las autoridades sanitarias han establecido recomendaciones para el despistaje del cáncer colorrectal que se adaptan a las necesidades de cada país. La mayoría de ellas estadifica a los pacientes en grupos de riesgo, para los que se recomiendan programas de despistaje diferentes. Los pacientes con síntomas o signos sugerentes de cáncer colorrectal deben ser evaluados de forma convencional y, por lo tanto, no son candidatos a estos programas.

El primer paso debe ser la clasificación del *riesgo* de cada individuo basándose en su historia clínica, antecedentes personales y familiares (Robert y cols., 2010).

Las nuevas tecnologías, como la colonoscopia virtual o la detección de mutaciones específicas de cáncer colorrectal en el ADN obtenido en las heces de los pacientes, han proporcionado resultados alentadores en el despistaje del cáncer colorrectal. Sin embargo, su efectividad en la relación costo-beneficio está por demostrarse (Gonçalves y cols., 2011).

En cuanto al cribado del cáncer colorrectal en España, las últimas reuniones de expertos, recomiendan una estrategia poblacional basada en el test de sangre oculta en heces (TSOH) con periodicidad bienal a una población diana de 50-69 años. Se propone además, analizar la posibilidad de utilizar el test de sangre oculta en heces inmunológico (TSOH-I), ya que se obtiene una tasa de pruebas positivas mayor, y ampliar la población diana hasta los 74 años (Castell y cols., 2009).

1.3. Signos y síntomas del cáncer colorrectal

Los signos y síntomas del cáncer colorrectal son variables e inespecíficos y están determinados por la localización y tamaño de la lesión. Se caracteriza por una fase de crecimiento asintomático cuya forma de presentación clínica depende de la localización y de la evolución. Los *tumores de colon derecho* se relacionan con una historia de hemorragia crónica y oculta (anemia, melenas), debida a la ulceración del tumor junto con una pérdida de peso y astenia. Los *tumores de colon izquierdo* se relacionan más con fenómenos de disminución del calibre de la luz intestinal que provocan cambios en el hábito defecatorio (estreñimiento), junto con dolor abdominal y rectorragias (Towson y cols., 2009)).

Esta sintomatología clínica puede tener una historia de unos seis meses de promedio y obliga, entre el 25-30% de los casos, a acudir a urgencias por presentar formas avanzadas de la enfermedad: obstrucción o perforación.

A pesar de todos los síntomas, en un 20-25% de los casos, existe enfermedad diseminada en el momento del diagnóstico (Parrilla y cols., 2009).

1.4. Diagnóstico y valoración

El diagnóstico del tumor nos debe permitir conocer, en primer lugar, la localización del mismo y la presencia de otras lesiones sincrónicas de colon, y si existe metástasis o invasión de órganos vecinos.

El síntoma principal es el *sangrado digestivo*, por lo que la determinación de sangre oculta en heces debería ser la "piedra angular" para el cribado inicial, junto con una analítica en sangre para el estudio de la anemia. No obstante, la técnica de elección para el diagnóstico de cáncer colorrectal es la colonoscopia, con una sensibilidad del 90-95% para detectar tumores (Parrilla y cols., 2009).

El *enema opaco* y el *de bario con doble contraste* implican radiación, son baratos y con menos complicaciones que la colonoscopia, pero no permiten localizar lesiones de pequeño tamaño ni la toma de biopsias.

La *TC (Tomografía Axial Computerizada)* y *RM (Resonancia Magnética)*, son nuevos métodos para evaluar el colon, aunque el primero implica radiación; ambos precisan de preparación intestinal, y han demostrado ser una alternativa para detectar lesiones superiores a 5 mm, permitiendo al mismo tiempo la evaluación simultánea de órganos intraabdominales (Parrilla y cols., 2009).

La determinación preoperatoria de los *marcadores tumorales (antígeno carcinoembrionario, CEA y el antígeno carbohidratado, CA 19-9)* es obligatoria; no sólo como factor pronóstico preoperatorio, sino también como método de diagnóstico precoz de recurrencia (Parrilla y cols., 2009).

Las metástasis hepáticas se deben buscar de forma sistemática. Su frecuencia varía entre un 15-20%, pero un 29% de los pacientes las desarrollan en los dos años que siguen a la exéresis quirúrgica. La *ecografía* es la prueba diagnóstica de elección (Parrilla y cols., 2009).

1.5. Estadificación y Pronóstico del cáncer colorrectal

La posibilidad de que el paciente se cure a través de una operación destinada a extirpar un cáncer de colon y recto depende de varios factores, entre ellos los aspectos técnicos de la cirugía, por ejemplo, la extirpación completa de todo el tumor, determinadas propiedades biológicas del cáncer que no se comprenden bien y el estadio de la enfermedad.

La clasificación TNM puede basarse en la evaluación clínica y radiológica obtenida antes del tratamiento (cTNM), o en el análisis anatomopatológico posquirúrgico (pTNM), (Tabla 2) (Parrilla y cols., 2009), y contempla también las modificaciones introducidas por el tratamiento coadyuvante preoperatorio (yTNM).

Otras variables clinicopatológicas indicadoras de pronóstico desfavorable son el tamaño y la configuración del tumor, la invasión de órganos vecinos, la oclusión cólica, la perforación tumoral, la invasión de vasos sanguíneos y linfáticos, la invasión perineural, la morfología del borde invasor, la fibrosis del estroma tumoral, la respuesta inmunológica al tumor, la aneuploidía y las alteraciones moleculares. Hasta el 10% de los cánceres colorrectales invade órganos o estructuras vecinas. El riesgo relativo de morir por cáncer colorrectal es 2,6 veces más alto en pacientes con invasión de órganos o estructuras adyacentes.

Dentro de cada grado de extensión tumoral, existe una considerable variación en el comportamiento biológico, que no puede explicarse únicamente por las características histopatológicas. La identificación de las alteraciones moleculares en el cáncer colorrectal ha despertado el interés de identificar marcadores biológicos que permiten predecir el pronóstico.

El único marcador bioquímico con valor pronóstico es el nivel preoperatorio del antígeno carcinoembrionario (CEA). Las concentraciones séricas preoperatorias superiores a 5 ng/mL se asocian con mayor riesgo de recidiva tumoral tras la cirugía, tanto en pacientes con enfermedad primaria como en pacientes con enfermedad metastásica. El valor pronóstico de otros marcadores séricos, como el CA 19-9, no se ha establecido con claridad (Parrilla y cols., 2009).

Tabla 2. Clasificación de cáncer colorrectal de la UIC

Categoría T (tumor primario)
Tx: no se puede valorar el tumor primario
T0: no hay evidencia de tumor primario
Tis: Carcinoma <i>in situ</i> intraepitelial o invasión de la lámina propia
T1: tumor que invade la submucosa
T2: tumor que invade la capa muscular
T3: tumor que invade la subserosa o tejidos pericólicos
T4: tumor que invade directamente otros órganos o estructuras o perfora el peritoneo visceral
Categoría N (ganglios linfáticos)
Nx: no se pueden valorar los ganglios regionales
N0: sin metástasis ganglionares regionales
N1: metástasis en 1-3 ganglios regionales
N2: metástasis en 4 o más ganglios regionales
Categoría M (metástasis)
Mx: no se puede valorar la presencia de metástasis a distancia
M0: no se detectan metástasis a distancia
M1: metástasis a distancia
Agrupación por estadios
Estadio
O: Tis N0 M0
I: T1-2 N0 M0
IIA: T3 N0 M0
IIB: T4 N0 M0
IIIA: T1-2 N1 M0
IIIB: T3-4 N1 M0
IIIC: cualquier T N2 M0
IV: cualquier T- N M1

Extraído de Parrilla Paricio P, Landa García JL. En: *Cáncer Colrectal: Aspectos generales y lesiones precancerosas*. Cirugía AEC 2ª Ed: 500-518. 2009.

1.6. Tratamiento del cáncer colorrectal

El tratamiento principal para el cáncer de colon es la resección anatómica, aunque es importante tener en cuenta la terapéutica adyuvante.

1.6.1. Tratamiento quirúrgico

La extensión de la resección viene determinada por la ubicación del cáncer de colon primario, así como por la presencia o ausencia de invasión hacia estructuras adyacentes y por las metástasis a distancia. Cuando no hay evidencia de invasión colónica hacia los órganos vecinos ni de metástasis, el tratamiento principal es la resección del segmento colónico. Los principios en los que se basa esta resección segmentaria incluyen la ligadura de los principales pedículos vasculares, la disección de ganglios linfáticos mesentéricos y el logro de márgenes libres de tumor. Cuando el cáncer de colon es localmente invasivo, es necesaria la resección de los órganos contiguos en aproximadamente un 10% de los casos.

En los pacientes con enfermedad local avanzada, la irradiación prequirúrgica con 4500 cGy puede ser beneficiosa para aumentar la resecabilidad y obtener márgenes libres, sobre todo en pacientes con afectación pelviana (AEC).

Otra opción que se puede encontrar durante la colectomía para la neoplasia de colon son las metástasis hepáticas. Si es aislada, se puede extirpar mediante una resección en cuña con un margen. Si el número, las localizaciones y el tamaño de las masas hepáticas determinan una hepatectomía formal, generalmente se realiza con un intervalo de 6 a 12 semanas respecto a la intervención de colon (Wu y cols., 2011).

El manejo del cáncer rectal se ha basado en la suposición de que el objetivo ideal del tratamiento para cualquier paciente con enfermedad neoplásica fuese la erradicación de la condición maligna, con la conservación del mayor grado de función anatómica y fisiológica posible. El tratamiento de esta entidad requiere un enfoque multidisciplinar, en el que participen cirujanos, digestólogos, oncólogos clínicos y radioterapeutas, radiólogos y enfermeras estomoterapeutas.

1.6.2. Criterios para decidir la utilización del tratamiento neoadyuvante

La quimioterapia en cáncer de colon tiene como objetivo mejorar los resultados del tratamiento quirúrgico y aumentar las posibilidades de curación, debiendo comenzar a las 4 semanas tras la cirugía.

En los *estadios 0 y I*, el seguimiento sin quimioterapia es el tratamiento estándar. En el *estadio II* no existe un patrón de tratamiento, y se plantean dos alternativas: seguimiento sin quimioterapia o quimioterapia adyuvante. Los resultados de los ensayos clínicos con adyuvancia no son coincidentes, ya que mientras en algunos se aprecia un beneficio respecto a la supervivencia global, en otro no, estimándose recientemente una mejoría del 3,6%, en términos de supervivencia a 5 años.

De todas formas, existe un consenso para valorar su indicación en los casos en que exista como mínimo uno de los siguientes factores de mal pronóstico: tumor T4, oclusión o perforación tumoral, número de ganglios extirpados o analizados inferior a doce, valores preoperatorios elevados de CEA e invasión linfática, venosa o perineural. Las pautas de tratamiento son las mismas que en el *estadio III* (deberán prolongarse durante 6 meses).

En el *estadio III* se ha demostrado que la quimioterapia mejora la supervivencia, y existen tres opciones terapéuticas: combinaciones con oxaliplatino, fluoropirimidinas orales e infusión de 5 FU con levamisol.

Con respecto al cáncer de recto, actualmente se considera que los factores predictivos de recidiva local, y por lo tanto de la supervivencia, son la presencia de metástasis ganglionares y la profundidad de invasión en la pared rectal y en el mesorrecto.

La radioterapia se puede empelar en el preoperatorio o en el postoperatorio, aunque desde un punto de vista práctico, tres metanálisis y un estudio prospectivo aleatorio han demostrado que el tratamiento neoadyuvante es superior al tratamiento adyuvante en todos los aspectos y además produce menos efectos adversos. No se debe emplear en los tumores en *estadio I* (T1-T2, N0), ya que las tasas de recidiva al operarlos de forma adecuada son tan bajas que los efectos beneficiosos de la misma no contrapesan los adversos. Se aplica en los tumores de *estadios II* (T3-T4, N0) y *III* (T1-T4, N+). Sin embargo, los tumores T3N0 deben considerarse de forma separada, mediante la evaluación de la profundidad de invasión en el mesorrecto y la proximidad al "margen de resección circunferencial". Por otra parte, a diferencia de lo que se ha probado en el cáncer de colon, no hay evidencia alguna de que la adyuvancia con quimioterapia sirva de algo. No obstante, se usa de forma habitual por los oncólogos clínicos para disminuir el riesgo de metástasis (AEC).

2. ENDOTELINA

Las endotelinas (ET) son una familia de péptidos integrada por endotelina 1 (ET-1), endotelina 2 (ET- 2), y endotelina 3 (ET-3) (Bagnato A, Rosanó 2008).

La ET-1 se sintetiza predominantemente por células del endotelio, aunque también por células de músculo liso vascular (Lerman y cols., 1991), células epiteliales, mesangiales, células de la glía y hepáticas (Emori y cols., 1991). La ET-2 es producida principalmente en el riñón y en el intestino por células aún no identificadas, asimismo, es producida por la placenta, útero y miocardio. La ET-3 se produce en cerebro, vías digestivas y en menor proporción en pulmones y riñón (Nelson y cols., 2003).

Las endotelinas, además de actuar como vasoconstrictores endógenos, son mediadores en determinados trastornos cardiovasculares y renales, participan en la formación de nuevos vasos (angiogénesis), en la modulación del sistema inmune, la osteogénesis, en la regulación de la sensibilidad nociceptiva y, por último, en fenómenos de apoptosis y en procesos de diseminación metastásica (Nelson y cols., 2003). El mecanismo de acción de las ETs está mediado por el sistema de receptores acoplados a proteínas G (GPCR), concretamente a dos subtipos de receptores, el ETR_A y ETR_B (Baltazares y cols., 2005).

2.1. Síntesis de endotelinas

Las tres isoformas de endotelina (ET-1, ET-2, ET-3) están constituidas por 21 aminoácidos con cuatro residuos de cisteína, estableciéndose dos puentes intramoleculares de disulfuro, y formando una estructura semicónica inusual (Figura 1) (Baltazares y cols., 2005). Los puentes de disulfuro y el dominio carboxi terminal son cruciales, tanto para la unión de las endotelinas con su receptor específico como para conservar su actividad biológica (Inoue y cols., 1989). Todas tienen una estructura peptídica similar, ya que tan solo la ET-3 se diferencia de las otras dos isoformas en el aminoácido en posición 6 de la cadena peptídica (Bagnato A, Rosanó 2008).

Cada uno de los péptidos (ET-1, ET-2, ET-3) es codificado por un gen independiente en un cromosoma determinado, en concreto, 6, 1 y 20, respectivamente (Inoue y cols., 1989).

Las tres endotelinas son sintetizadas como prehormonas y, posteriormente, procesadas a péptidos activos. La vía metabólica para la activación biológica es similar para las tres ETs. El proceso de biosíntesis de la ET-1 es el más caracterizado;

este proceso se desarrolla en el citosol de las células endoteliales. El ARNm de la ET-1 humana codifica a la preproendotelina, de 212 aminoácidos que, a través de la acción proteolítica de una endopeptidasa, la transforma en Big-endotelina de 39 aminoácidos (Big-ET-1). Este fragmento sufre posteriormente la acción de la enzima convertidora de endotelina (ECE-1), que es una metaloendoproteasa que rompe la unión en la posición Trp21-Val22 transformándola en ET-1 de 21 aminoácidos que es el péptido activo. La vida media de la ET-1 en circulación es de 1 minuto (Levin, 1995; Galie y cols., 2004) (Figura 2) (Baltazares y cols., 2005).

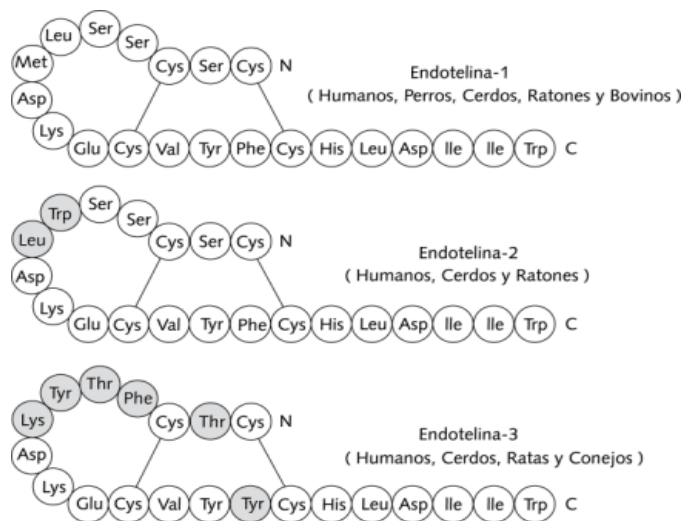


Figura 1. Estructura y homología de las endotelinas, cadenas peptídicas de 21 aminoácidos ET-1, ET-2 y ET-3.

* Extraído de Baltazares Lipp M, Rodríguez Crespo H, Ortega Martínez J, Sotres-Vega A, Baltazares Lipp MA. Sistema Endotelina. Rev Inst Nal Enf Resp Mex. 2005; 18 (4): 308-320.

La hipoxia y la isquemia son importantes estímulos fisiológicos para la producción de ET-1 (Fukunaga y cols., 1991). También es estimulada por una variedad de sustancias que incluyen catecolaminas y proteínas semejantes como trombina, angiotensina, lipoproteínas de alta y baja densidad, TGF β , citoquinas e iones de calcio. Varias sustancias vasoactivas como el óxido nítrico (NO), el péptido natriurético, las prostaglandinas PGI $_2$ y PGE $_2$, inhiben la producción y secreción de ET-1 (Morawietz y col., 2000; Nelson y cols., 2003). La endotelina, a su vez, estimula la secreción de NO, péptido natriurético, aldosterona y prostaglandinas. A través de estas interacciones, las ET participan dinámicamente en el control hormonal, en el balance de líquidos y electrolitos y en el tono vascular (Pérez del Villar y cols., 2005).

2.2. Regulación de la síntesis de ET-1

Como veremos más adelante, la ET-1 es un péptido que juega un importante papel en la correcta función de diferentes órganos (cardiovascular, renal, óseo, pulmonar, etc). Es por esto que la producción de la misma debe estar perfectamente regulada con el fin de preservar sus funciones biológicas. El principal mecanismo de control de la biodisponibilidad de la endotelina, es la tasa de transcripción del gen de la ET-1 (*edn1*). Existen estudios en una amplia variedad de células donde se han identificado factores de transcripción que regulan la expresión del gen. También se han identificado otros mecanismos, como la regulación epigenética y de la estabilidad del ARNm (Stow y cols., 2011).

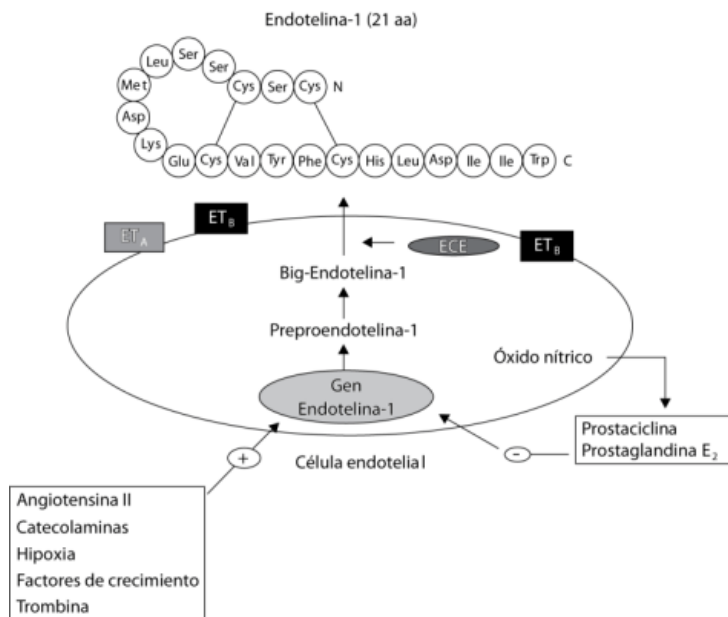


Figura 2. Célula endotelial: Síntesis de la endotelina-1. Factores de estimulación e inhibición

* Extraído de Baltazares Lipp M, Rodríguez Crespo H, Ortega Martínez J, Sotres-Vega A, Baltazares Lipp MA. Sistema Endotelina. Rev Inst Nal Enf Resp Mex. 2005; 18 (4): 308-320.

2.2.1. Factores reguladores del promotor de *edn1*

El gen *edn1* contiene 5 exones y abarca aproximadamente 6,8 kb de DNA genómico. Existen dos sitios de inicio de la transcripción, uno primario y otro localizado 65 pb antes del primero. El comienzo de la transcripción en este sitio alternativo tiene lugar de forma específica de tejido y parece ser importante para

la expresión de *edn1* en cerebro y corazón. El promotor del gen contiene tanto elementos que actúan en cis como otros inducibles y específicos de determinados tipos celulares. El centro del promotor se encuentra 150 pb antes del sitio primario de la transcripción y contiene secuencias TATA y CAAT localizados en las posiciones -31 y -98 bp. También incluye sitios de unión para los factores de transcripción Vezf1, FOXO, AP-1, HIF1 y GATA2. El promotor distal incluye como factores reguladores a NF- κ B, SMAD, HRE1, HRE2 y c-Myc ((Stow y cols., 2011).

El sitio de unión del factor de transcripción Vezf1, se localiza en posición -55 del promotor del gen de *edn1* (Xiong y cols., 1999). Este sitio de unión es el responsable de la expresión de la célula en el endotelio vascular. La señalización celular comienza a partir de una GTPasa: p68RacGAP, que interacciona con el Vezf1, y la coexpresión de ambas en el endotelio vascular inhibe al Vezf1 del sitio del *edn1* de manera dosis dependiente (Aitsebaomo y cols., 2004). Más recientemente se ha demostrado que el aumento de los niveles de insulina a nivel extracelular, aumenta la expresión del *edn1* en las células endoteliales (Yang y Li., 2008), a través de la activación de la PIK3 (fosfatidilinositol 3 kinasa), que inhibe a la glucógeno sintasa 3 β que inhibe la expresión del Vezf1. Por tanto, la glucógeno sintasa 3 β y el p68RacGAP son parte de una misma vía de señalización, que tienen como diana a la insulina, que activa al *edn1*. Así, estudiar los componentes de la vía de señalización insulina-Vezf1, puede proporcionar terapias útiles para la modulación de acciones adversas de la ET-1 en el sistema vascular de los pacientes con hiperinsulinismo y resistencia a la insulina (Stow y cols., 2011).

Por otro lado, un reciente estudio ha demostrado que el sitio de unión del factor de transcripción FOXO1, se localiza en posición -60 del promotor del *edn1* (Reiter y cols., 2010). Mediante ensayo de inmunoprecipitación con cromatina (ChIP), se demostró que los polifenoles del té verde, disminuyen los niveles de ARNm del *edn1*, a través de una vía Akt- dependiente de fosforilación a través del fosfatidilinositol 3 quinasa, que estimula producción de NO, y además conlleva a la inactivación de FOXO1. Así, la disminución en la expresión de las células vasculares del *edn1* puede explicar algunos de los beneficios de los polifenoles en la dieta (Reiter y cols., 2010).

Otro factor de transcripción, cuyo sitio de unión se localiza en posición 108 del promotor del *edn1*, es el AP-1, con dos subunidades, denominadas *Fos* y *Jun* (Lee y cols., 1991). El AP-1 es un factor que interviene en respuestas relacionadas con factores de crecimiento, citoquinas proinflamatorias y otras vías de proliferación. Los ésteres de forfol, estimulan al AP-1 a través de la proteinquinasa C (PKC), y esto conlleva una activación de la transcripción del *edn-1* (Kitazumi y Tasaka, 1993). Esta vía de señalización también es utilizada por otros estímulos como son la trombina, la angiotensina II y la lipoproteína de alta densidad. Sin

embargo, la activación de la PKC no siempre es necesaria para activar el *edn-1*. Así, la insulina y la trombina activan al *edn1* mediante un mecanismo independiente de la PKC (Marsen y cols., 1995). Una de estas vías alternativas es la de la leptina-dependiente del AP-1, a través de las proteinquinasas JNK y ERK1/2 (Chao y cols., 2007). Por otro lado, el AP-1 interacciona con otros factores de transcripción cuando el gen *edn1* está activado. Por ejemplo, AP-1 y proteínas Smad inducen la transcripción del *edn1* en células endoteliales tratadas con factor de crecimiento transformante β (TGF β) (Rodríguez-Pascual y cols., 2003).

Por otro lado, existe en el *edn1*, un sitio de unión especialmente sensible a la hipoxia, concretamente el HIF1, Factor Inducible por Hipoxia 1, en posición -118 del promotor del *edn1*. De manera que mutaciones en este sitio de unión, produce una interrupción de la respuesta celular a la hipoxia (Yamashita y cols., 2001). A su vez, esta vía de señalización hipoxia-dependiente se ejerce a través de la tirosinquinasa PI3K (Zhang y cols., 2009). Además, esta mecanismo se ha estudiado en diferentes tipos celulares, no sólo en células endoteliales (Xiong y cols., 1999), como en células de la médula renal (Miller y Kohan, 1998), células de los islotes pancreáticos (Kugelmeier y cols., 2008), cardiomiocitos (Takanashi y cols., 2004) y células de la glia (Zhang y cols., 2006). También, se ha implicado en patología de restricción del crecimiento fetal (Thaete y cols., 2007), en el infarto de miocardio (Cernacek y cols., 2003) y en la apnea del sueño (Belaidi y cols., 2009). Por otra parte, existe evidencia que demuestra que el factor de transcripción HIF1 puede regular al *edn1*, por vías de señalización independientes de la hipoxia, así, a través de factor de crecimiento placentario, y mediante la activación del PIK3 y de la NADPH oxidasa, se activa al HIF-1, que promueva la transcripción del *edn1* (Patel y cols., 2008). Por último, se ha demostrado que el etanol, activa al HIF1 de forma independiente a la vía de la PIK3, y estimularía la transcripción del *edn1* (Yeligar y cols., 2009).

En posición -135 del promotor del gen, se localiza el sitio de unión al factor de transcripción GATA, concretamente GATA 2, 1, 3 y 4, que se expresan en células hematopoyéticas, cerebrales, medulares y del oído interno (Viger y cols., 2008). Así, existe evidencia que este factor regula la transcripción del *edn1*. Concretamente, la activación de GATA 2 y AP1, produce una activación sinérgica del promotor del gen (Kawana y cols., 1995). Más recientemente, Glenn y cols., han demostrado la relación entre el péptido atrial natriurético, que inhibe el crecimiento de fibroblastos cardíacos mediante un mecanismo GATA 4 dependiente (Glenn y cols., 2009). Por otro lado, existen vías de señalización a través de la activación de la proteína RhoA y p38 MAPK, que producen la fosforilación y la activación del GATA 4, a través de una señal hipertrófica extracelular (Charron y cols., 2001). Existen también factores inhibidores como la heparina, que bloquea al GATA- 2 y AP-1 (Dorfman y cols., 1992), y los retinoides que disminuyen la expresión del *edn-1*

(Yokota y cols., 2001). Así, altos niveles de ácido retinoico disminuyen la expresión de *edn1* y, esto se relaciona con malformaciones embrionarias craneofaciales (Vieux-Rochas y cols., 2007). La suplementación dietética con ácido fólico restablece los niveles de ARNm del *edn1* y disminuye el desarrollo de malformaciones craneofaciales en ratones (Zhang y cols., 2006).

Por último, las proteínas Smad, cuyo sitio de unión en el promotor del *edn1* se encuentra en posición -191, (Rodríguez-Pascual y cols., 2003), gracias al estímulo del TGF β y mediado por la proteína ALK5, son un potente estímulo de transcripción del *edn1* (Castanares y cols., 2007).

Existen otros factores reguladores cuyo sitio de unión se encuentra en la región 5' del gen *edn1* humano. Así, la aldosterona estimula la expresión de *edn1* en células musculares lisas vasculares (Wolf y cols., 2006), cardiomiocitos (Doi y cols., 2008) y células epiteliales renales (Gumz y cols., 2003). También, los mineralocorticoides y glucocorticoides, activan a este gen por un mecanismo dependiente de aldosterona y a través de la interacción con proteínas SRC-1 y p300. La interrupción de este mecanismo de retroalimentación negativa tiene implicaciones cardiovasculares y renales, como la hipertensión y la enfermedad renal crónica (Stow y cols., 2009).

Otro factor de transcripción que activa al gen de la endotelina, es el NF- κ B cuyo sitio de unión se encuentra en posición -2090 del promotor del *edn1*, a través de las subunidades p65 y p50 (Quehenberger y cols., 2000). Existen varios componentes importantes en la activación de esta vía como son el ácido oleico, a través de la PKC (Park y cols., 2003), la glucosa, a través de la p300 (Chen y cols., 2010), y citocinas como el TNF α , la IL-2 y el IFN γ , a través de la interacción con la proteína P13K (Boesen y cols., 2008; Terragni y cols., 2008) (Figura 3) (Stow y cols., 2011).

2006). Por otro lado, el factor de transcripción Vezf1 protege de la metilación del ADN (Dickson y cols., 2010).

Por otra parte, las modificaciones en las histonas, también influye en la transcripción del *edn1*; la metilación de la histona H3 se asocia a la activación de la transcripción a través de un mecanismo dependiente de la aldosterona en células epiteliales renales (Stow y cols., 2009). Además, los estímulos que activan al NF- κ B, dependen de la expresión de la H3 y H4 (Wortz y cols., 2009).

2.2.2.2. Regulación de la estabilidad del ARNm

La transcripción del ARNm del *edn1* es muy lábil y tiene una vida media intracelular de 15 minutos (Inoue y cols., 1991). Así, enzimas como la GAPDH (gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa), interactúa con el ARNm y aumenta su degradación (Rodríguez-Pascual y cols., 2008). También, se ha visto que es modulado por microARNm (miRNAs) en células epiteliales de rata y en las células sinusoidales en humanos (Yeligar y cols., 2009).

2.3. Receptores de endotelina

Se han caracterizado dos subtipos de receptores que pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteína G: **ETRA** y **ETRB**. Los receptores tipo ETRA tienen 10 veces más afinidad por la ET-1 y ET-2 que por la ET-3 y se encuentran predominantemente en las células de músculo liso vascular, y en los miocardiocitos, y son mediadores de vasoconstricción. La estimulación de estos receptores por la ET-1 activa la fosfolipasa C (PLC) (Masaki 2000), la cual induce un incremento de inositol trifosfato, diacilglicerol y del calcio intracelular que conduce a la contracción de las células de músculo liso (CML) (Ergul 2002). El incremento de diacilglicerol y de calcio estimula también a la proteinquinasa C, la cual media la acción mitógena de la ET-1 (Rozenfurt, 2007). También, el factor de crecimiento epidérmico (EGFR) actúa como transductor en la vía de señalización de la endotelina. Finalmente, la ET-1, promueve la proliferación de determinadas células tumorales, y es inhibida en presencia de antagonistas del receptor ETRA y no en presencia de antagonistas del receptor ETRB. Por tanto, la ET-1 endógena actúa como una sustancia autocrina moduladora de la proliferación celular a través del receptor ETRA.

Por último, la actividad mitógena de la ET-1 puede ser amplificada cuando interacciona con otros factores de crecimiento como son el EGFR, factor de crecimiento de fibroblastos (bFGF), factor de crecimiento insulínico (IGF), factor de

crecimiento de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento transformante (TGF) e interleuquina 6 (IL-6) (Nelson y cols., 2003) (Figura 4).

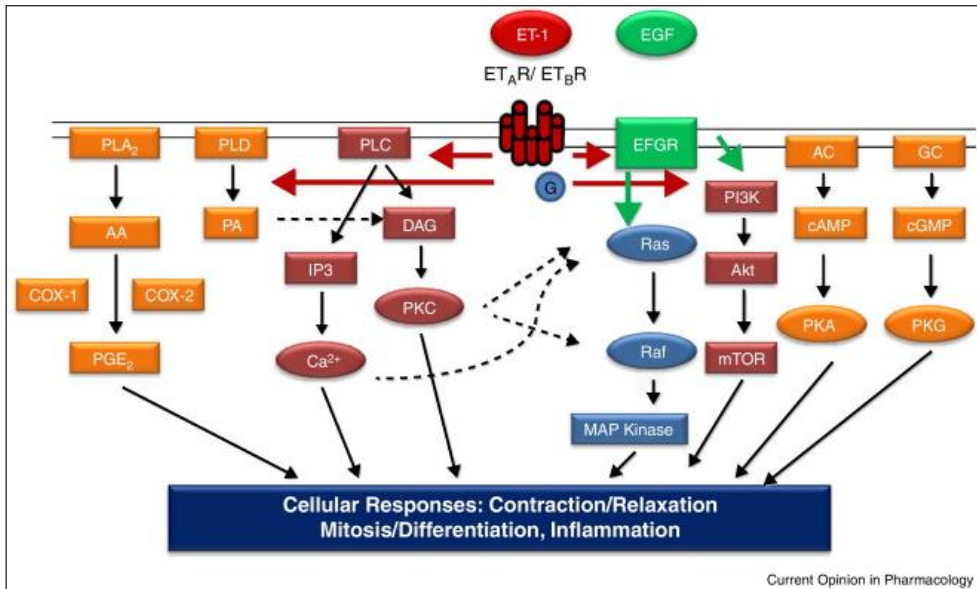


Figura 4. Vías de señalización de los receptores de ET

* Extraído de Nelson JB, Bagnato A, Battistini B, Nisen P. The endothelin axis: Emerging role in cancer. *Nature Review Cancer* 2003; 3 (2): 110-116.

Los receptores ETR_B se encuentran principalmente en las células endoteliales y en menor proporción en las células de músculo liso y tienen una afinidad comparable por todas las isoformas. También se han encontrado ampliamente distribuidos en el riñón, hígado y útero. El estímulo de los receptores ETR_B produce, tanto vasoconstricción como vasodilatación, esta última mediada por el incremento de la producción de NO y prostaciclina (Dupuis y cols., 2000).

2.4. Efectos biológicos

La ET-1 y el receptor ETR_A, tienen un papel en el mantenimiento basal del tono vasomotor y de la presión sanguínea en los humanos (Haynes y cols., 1995). Así, la administración intravenosa de la ET-1 causa un rápido y transitorio estado de vasodilatación seguido de un sustancial incremento de la presión sanguínea (Yang y cols., 1990). La endotelina, también afecta el flujo sanguíneo en varias regiones de la circulación. En la circulación mesentérica y cerebral reduce el flujo sanguíneo; por el contrario, en los vasos pulmonares causa un incremento en el

flujo (Josko y cols., 2001). En la siguiente tabla, se resumen los efectos fisiológicos de las endotelinas en los diferentes órganos (Baltazares y cols., 2005).

Tabla 3. Efecto de la endotelina en diferentes órganos

ÓRGANO-SISTEMA	EFECTO
Vasos sanguíneos	<ul style="list-style-type: none"> • Potente sustancia vasoconstrictora (Yanagisawa y Masaki, 1983) • Proliferación celular • Remodelación celular y depósitos de colágeno (Luscher y Barton 2000) • Estimulación de la producción de óxido nítrico y prostaciclina vía receptores ET_B (Dupuis y cols., 2000)
Corazón	<ul style="list-style-type: none"> • Acción positiva inotrópica y cronotrópica bajo condiciones fisiológicas e hipertrofia (Piihola y cols., 2003) • Incremento del potencial de acción y disminución del gasto cardíaco in vivo (Luscher y cols., 2002)
Pulmón	<ul style="list-style-type: none"> • Broncoconstricción y depuración de ET-1 (Baltazares y cols., 2004)
Riñón	<ul style="list-style-type: none"> • Incremento en la resistencia vascular. Disminución en el grado de filtración glomerular y en el flujo sanguíneo renal • Natriuresis y diuresis vía receptores ET_B tubular (Pérez del Villar 2005)
Acción neuroendocrina	<ul style="list-style-type: none"> • Estimulación de la secreción del péptido natriurético, renina, aldosterona y catecolaminas (Galei 2004)

* Extraído de Baltazares Lipp M, Rodríguez Crespo H, Ortega Martínez J, Sotres-Vega A, Baltazares Lipp MA. Sistema Endotelina. Rev Inst Nal Enf Resp Mex. 2005; 18 (4): 308-320.

2.5. Sistema endotelina y cáncer

Los diferentes péptidos que forman el sistema de endotelina, tienen un papel importante en el crecimiento de determinadas células tumorales. La ET-1 ejerce sus efectos a través de la activación de sus receptores ETR_A y ETR_B, que una vez son activados, transmiten sus señales por diferentes vías intracelulares, así la ET-1 es una molécula cuyos niveles se encuentran elevados en varios tipos de cáncer, y en la actualidad, el bloqueo del receptor de ET-1 representa un enfoque prometedor en el control de la progresión del cáncer. Por otra parte, estudios recientes de antagonistas de receptores de la endotelina, destacan que pueden crear nuevas terapias contra el cáncer (Ballha y cols., 2009).

Así, la ET-1 y su receptor ETR_A, se han encontrado en elevadas concentraciones en determinadas líneas celulares y tumores, como el de próstata, mama, ovario, pulmón, renal, cérvix uterino y glioma. En muchos de estos tumores,

la ET-1 actúa mediante mecanismos paracrinos y autocrinos (Nelson y cols., 2003), influyendo en mecanismos como apoptosis, angiogénesis y en la invasión y diseminación metastásica. Además, en el cáncer de próstata o de mama, la ET-1 estimula la proliferación de osteoblastos, disminuyendo la resorción ósea por estos últimos, lo que produce una alteración de los estímulos nociceptivos y en el dolor óseo maligno. Por último, la ET-1 modula la diferenciación y activación de la infiltración tumoral en células inmunes (Figura 5) (Bagnato y Rosano, 2008).

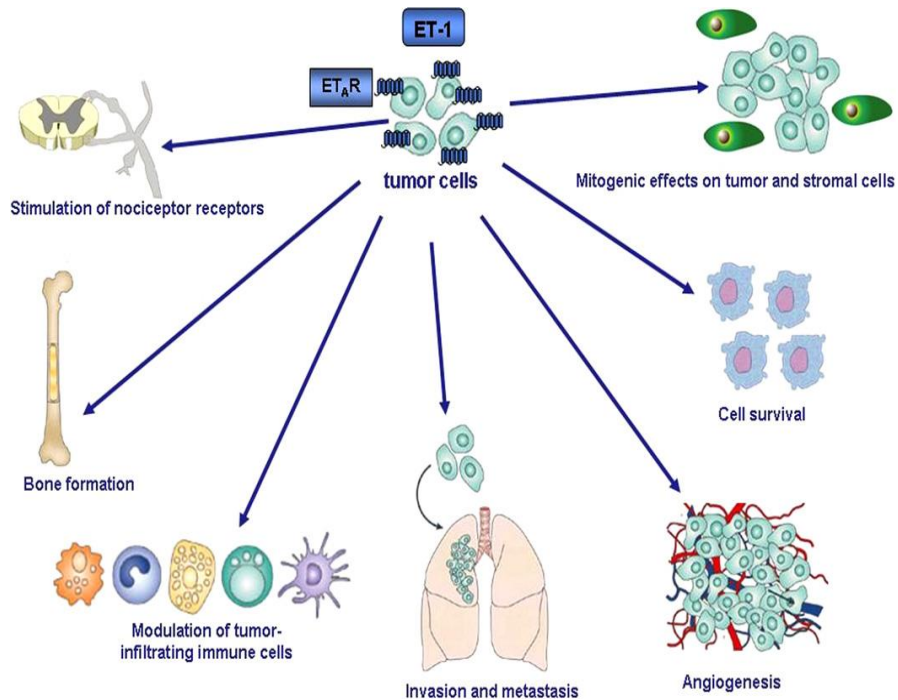


Figura 5. Endotelina y cáncer

* Extraído de Bagnato A, Rosan`o, L. The endothelin axis in cáncer. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology IJBCB.* 2008; 40 (8): 1443–1451.

2.5.1. Endotelina 1 y proliferación de células tumorales

La ET-1 estimula la síntesis de ADN y la proliferación celular en diversas células como las células del músculo liso vascular, osteoblastos, células glomerulares mesangiales, fibroblastos y melanocitos. También actúa como mitógeno en la proliferación de células tumorales en la próstata, cuello uterino y ovario. Así, el crecimiento de células tumorales en el ovario, es inhibido por antagonistas del receptor de endotelina, concretamente a través del receptor ETR_A (Bagnato y cols., 1999). Por otra parte, en las células del cáncer de ovario, la ET-1 estimula la síntesis de ADN de la misma manera y con la misma eficacia que el EGF, y su acción, se suma al mecanismo de acción del EGF. Por tanto, la

Implicación de la endotelina-1 en el mecanismo de inhibición del crecimiento de cáncer de colon por la melatonina

activación del receptor EGFR es, en parte, responsable del efecto mitógeno ejercido por la ET-1 a través de su receptor ETR_A. Por todo lo anterior, parece ser que la ET-1 participa en el crecimiento celular mediante mecanismos autocrinos en las células tumorales (Rosanó y cols., 2010).

2.5.2. Endotelina 1 y neovascularización tumoral

Las endotelinas actúan como agentes mitogénicos de las células endoteliales vasculares, a través del receptor de ETR_B, y de las células del músculo liso, fibroblastos y periocitos, a través del receptor ETR_A (Salani y cols., 2000). Así, una elevación en la expresión de la ET-1 y de su receptor, se asocia a un aumento significativo de los microvasos y del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) en el cáncer de ovario, lo que indica que la ET-1 y el VEGF, tienen un papel complementario en la neovascularización del cáncer de ovario (Salani y cols., 2000).

La regulación en la transcripción del VEGF, está relacionada con un factor de señalización de hipoxia celular, el factor HIF1 α , que puede ser el responsable del aumento de la neovascularización tumoral. Así, la degradación del factor HIF α , reduce los niveles de ET-1 tanto en condiciones de hipoxia como de normoxia. En las células tumorales, y en condiciones de hipoxia, la ET-1 estimula al factor HIF1 α , que estimula la producción de VEGF (Gupta y cols., 2003).

Las prostaglandinas (PG) y sus enzimas limitantes, ciclooxigenasa 1 y 2 (COX-1 y COX-2), también son agentes proangiogénicas en el cáncer de ovario. Así, a través de la ET-1, y mediado por el receptor ETR_A, aumentan los niveles de COX-1 y de COX-2. En esta cascada también están involucradas algunas MAPK, como la p42/44 MAPK y la p38 MAPK, además del EGFR (Denkert y cols., 2002).

Por último, existen evidencias que el efecto de la COX 1 y 2, está mediado por la VEGF. Cuando la ET-1 aumenta los niveles de VEGF, éste aumenta la actividad de la COX-1 y 2, que hace que aumenten los niveles de PG. Así, antagonistas del receptor ETR_A, pueden ser ventajosos desde el punto de vista terapéutico para disminuir la vascularización de las células tumorales ováricas (Spinella y cols., 2004).

2.5.3. Endotelina 1 y apoptosis

La ET-1 actúa como factor antiapoptótico en diferentes tipos de células, lo que indica que es un péptido que puede modular la supervivencia celular (Vacca y cols., 2000).

Así, en las células del cáncer de colon, la endotelina actúa como un factor de supervivencia, a través del ETR_A, al inhibir la apoptosis interactuando con el sistema Fas/FasL. Fas es una proteína de superficie con un dominio citoplasmático de "muerte celular" conservado. El ligando Fas, (FasL o Apo-1), es una proteína de membrana tipo II, miembro de la familia del factor de necrosis tumoral (TNF), y la interacción de FAS con su ligando, es crucial para desencadenar la apoptosis en determinados tipo de células, a través de la activación de caspasas (Eberl y cols., 2000).

En el cáncer de ovario, la ET-1 también es eficaz en la inhibición de la apoptosis a través de ETR_A, mediado por la fosforilación del Bcl-2 a través de la fosfatidilinositol 3-quinasa, mediada a su vez por la vías AKT (serina/treonina protein kinasa) (Vacca y cols., 2000).

Por último, las funciones de proliferación y supervivencia celular realizadas por la ET-1, las realiza por los receptores ETR_A en fibroblastos, células de músculo liso y epiteliales, y por los receptores ETR_B en las células sanguíneas (Bagnato y Catt 1998; Pristivishalil y Nelson 2000; Vacca y cols., 2000).

2.5.4. ET-1, remodelación ósea y metástasis

Existen multitud de factores implicados en el desarrollo y progresión de las metástasis óseas como son los factores de crecimiento insulínico tipo 1 y 2, el factor de crecimiento β , antígeno prostático específico (PSA), uroquinasa activadora de plasminógeno (uPA), factor de crecimiento de fibroblastos tipo 1 y 2 (FGF 1 y FGF2) y la ET-1, que la estimula mitogénesis en los osteoblastos y disminuye la resorción ósea por los osteoclastos, así como la movilidad de los mismos (Nelson 1999; Chiao 2000).

En pacientes con cáncer de mama y cáncer de próstata, es frecuente el desarrollo de metástasis óseas (Mundy 2002). En la mama predominan las lesiones osteoclásticas, mientras que en la próstata, las lesiones son predominantemente osteoblásticas, aunque este patrón puede variar (Chiao 2000; Mundy 2002). Así, la ET-1 estimula la formación ósea, ya que sus niveles en sangre aumentan en pacientes con cáncer de próstata y de mama avanzados.

Por último, existen modelos experimentales *in vivo* que demuestran que la proliferación de osteoblastos y el desarrollo de metástasis ósea, es inhibido por antagonistas de receptores ETR_A (Chiao 2000).

2.5.5. Endotelina y cáncer de colon

Se han detectado en células de adenomas y adenocarcinoma humano, un aumento de los niveles de pre-pro ET-1, ECE-1 y ET-1 (Rosanó y cols., 2008). Así, *in vitro*, la ET-1 actúa como un agente mitógeno en el cáncer colorrectal (Hoosein y cols., 2007). Concretamente, el gen de ET-1 se sobreexpresa, *in vivo* e *in vitro*, por acción de la β -catenina, que es la responsable del inicio en la inmensa mayoría de los cánceres de colon. Así, existe una zona específica de unión en la región promotora del gen de ET-1, denominada TCF-4, y la inhibición en la señalización para la unión de la β -catenina produce una disminución en la expresión de *end1*. Por esta razón, en el 80% de los principales cánceres de colon humano, el *edn1* se encuentra elevado (Kim y cols., 2005).

Con respecto a los receptores de ET-1, el ETR_B se encuentra disminuido en las células tumorales de cáncer de colon en comparación con células normales; esto puede ser debido a la hipermetilación del gen del ERT_B (Pau y cols., 2001). Además, el receptor ETR_B , se asocia a una disminución endógena de la ET-1, por tanto, cualquier mecanismo de regulación inhibitorio de este subtipo de receptor, podría aumentar los niveles de ET-1 endógena ((Hoosein y cols., 2007). No obstante, esta regulación no se encuentra en otros tumores sólidos como el de mama o el melanoma (Wulfing y cols., 2004). En células de colon normal, el receptor ETR_A se localiza a nivel de las células endoteliales, y en las células tumorales, la expresión de este receptor está aumentada, a través de mecanismos dependientes de proteínas quinasas que inducen la producción de VEGF y que contribuye a la angiogénesis vascular (Hoosein y cols., 2007).

Técnicas de inmunotinción han demostrado que en células de colon normales existen poca unión de fibroblastos a los receptores ETR_A , sin embargo en las células tumorales colorrectales, si existe un aumento de la unión a los fibroblastos; así el aumento de los niveles de ET-1 podría estimular la migración de fibroblastos en el cáncer colorrectal (Asham y cols., 2001). Por tanto, existe un predominio del receptor ERT_A en células tumorales del cáncer de colon, sobre todo asociado a células endoteliales y fibroblastos, que puede contribuir al crecimiento del cáncer colorrectal y a procesos de neoangiogénesis (Hoosein y cols., 2007).

La ET-1 actúa como un factor de supervivencia que promueve proliferación celular a través del receptor ETR_A y no del ETR_B (Ali y cols., 2000) y protege las células de cáncer de colon frente a la apoptosis inducida por FasL (Eberl y cols., 2003). La ET-1, en el cáncer colorrectal, podría actuar tanto mediante mecanismos paracrinos como autocrinos, provocando aumento del crecimiento celular a través del receptor ETR_A , ya sea a través de estímulos mitogénicos, o por

control de la resistencia a la apoptosis, como ya hemos señalado (Grant y cols., 2007).

Según todo lo expuesto anteriormente, puesto que la ET-1 es una molécula multifuncional que se sobreexpresa en cáncer, el eje ET podría considerarse como diana terapéutica en esta enfermedad. De hecho, se han desarrollado diversas estrategias para disminuir su producción, entre las que se incluyen la inhibición de ECE-1, y el antagonismo selectivo y no selectivo de los receptores ETR_A y ETR_B (Bhalla et al., 2009). Así, Ferrero y cols., demostraron *in vitro*, que antagonistas del receptor de ETR_B (BQ788), disminuyen el flujo sanguíneo en las arterias que irrigan el tumor, pero no en las que irrigan células sanas, y por el contrario, antagonistas del receptor ETR_A (BQ123), disminuyen el flujo tanto en células tumorales como en las normales. Estos resultados sugieren que las arterias que irrigan la células del cáncer colorrectal, son más sensibles a la ET-1, debido a una mayor actividad en sus receptores (Ferrero y cols., 2008).

3. MELATONINA

En 1958, Lenner y colaboradores lograron aislar la hormona N-acetil-5-metoxitriptamina o melatonina (Lerner y cols., 1959). Más tarde, gracias a los trabajos de Axelrod se comprobó que la glándula pineal poseía todos los enzimas necesarios para su síntesis a partir de la serotonina (Axerold, 1962). La melatonina, además de sintetizarse en la glándula pineal, es producida por otros órganos como el cerebro, el epitelio pigmentario de la retina, el tracto gastrointestinal, médula ósea, linfocitos y piel (Pandi-Perumal y cols., 2008; Slominski y cols., 2008).

3.1. Síntesis y catabolismo de la melatonina

En humanos la glándula pineal contiene dos tipos de células: pinealocitos, que predominan y producen indolaminas (sobre todo melatonina) y péptidos (como arginina, vasotocina), y células de neuroglia.

Estudios realizados *in vitro* y en animales han aclarado los mecanismos relacionados con la regulación de la síntesis de melatonina por la glándula pineal (Reiter 1991b), en la que pueden diferenciarse dos etapas:

1. Síntesis de serotonina a partir de triptófano (Figura 6) (Carpentier y cols., 2012). En esta etapa intervienen dos enzimas, el enzima triptófano hidroxilasa (que cataliza el paso de triptófano a 5-hidroxitriptófano) y la L-aromático-aminoácido descarboxilasa (convierte el 5-hidroxitriptófano en 5 hidroxitriptamina o serotonina).

II. Conversión de la serotonina en melatonina y otros indoles, a través de la serotonina N-acetiltransferasa (AANAT) (Figura 6) (Carpentier y cols., 2012). La serotonina es convertida en N-acetilserotonina por el enzima citosólico N-acetiltransferasa (NAT). Se ha comprobado que la actividad de la NAT está sometida a los cambios de luz-oscuridad, siendo de entre 30 a 70 veces más activa por la noche. El siguiente paso sería la metilación sufrida por la N-acetilserotonina gracias a la hidroxindol-O-metiltransferasa (HIOMT) para convertirse en la N-acetil-5-metoxitriptamina o melatonina, (Reiter, 1991a). La designación correcta de la HIOMT es la serotonina N-acetiltransferasa (ASMT) (Stehle y col, 2011).

Se cree que un aumento en la concentración de N-acetilserotonina provoca un aumento en la producción de la melatonina; por lo tanto, la biosíntesis de melatonina en la glándula pineal es controlada principalmente por la actividad de la AANAT que actuaría como enzima limitante. Además se ha demostrado que algunos factores nutricionales, como la disponibilidad de triptófano, ácido fólico y vitamina B6, pueden influir en la producción de melatonina (Fournier y cols, 2002).

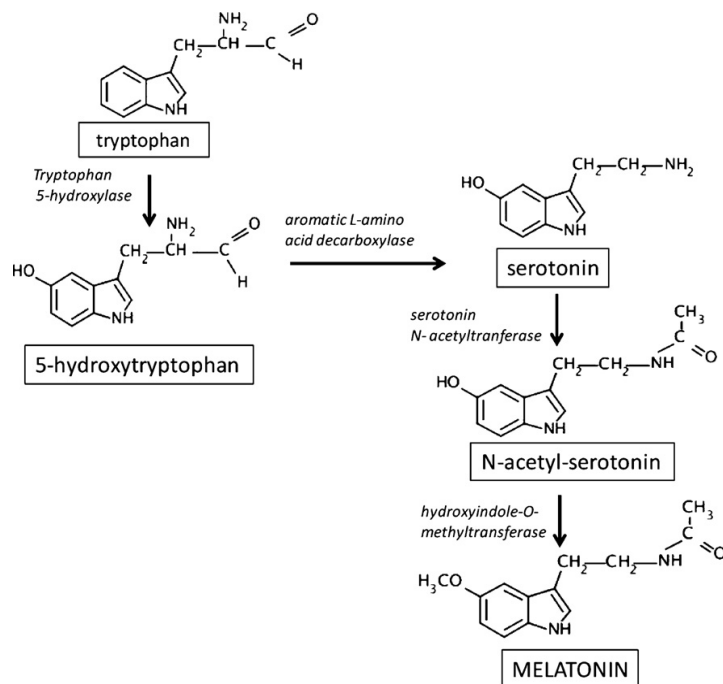


Figura 6. Ruta biosintética de la melatonina en la glándula pineal

* Extraído de Carpentieri A, Díaz de Barboza G, Areco V, Peralta López M, Tolosa de Talamoni N. New perspectives in melatonin uses. Pharmacol Res. 2012; 65(4):437-44.

La melatonina producida en la glándula pineal es liberada al torrente circulatorio y se acumula en determinados tejidos celulares. Sin embargo, no se almacena en la glándula pineal, siendo los niveles plasmáticos de melatonina los que reflejan la actividad hormonal de la glándula (Arendt, 2006).

El 90% de la hormona circulante se desactiva a nivel hepático al ser hidroxilada, y posteriormente se elimina por la orina. Así, la excreción urinaria de la 6-hidroximelatonina es un reflejo de los niveles de melatonina en plasma y se utilizan para valorar los niveles de la hormona en sangre (Arendt y cols., 2006). El metabolismo de la melatonina es rápido, y su vida media en humanos, tras su administración exógena, oscila entre 10 y 60 minutos (Fourtillan y cols., 2000).

3.2. Regulación de la síntesis de melatonina

Las características más importantes en la síntesis de melatonina, son su oscilación diaria y la sensibilidad a la luz, que suprime su actividad. Así, independientemente de si una especie presenta actividad durante el día o durante la noche, en todas se produce un aumento de secreción de melatonina durante la noche. Esto hace de la melatonina un marcador endocrino nocturno (Reiter, 1991c).

Con respecto al control intracelular, la síntesis de melatonina se inicia por el acoplamiento de noradrenalina (NA), liberada desde las fibras postganglionares a los receptores β_1 adrenérgicos de los pinealocitos, que estimulan una proteína Gs localizada en la cara interna de la membrana, que lleva acoplado un GPT y que induce un aumento de la actividad adenil-ciclasa, con la consiguiente síntesis intracelular de AMPc, el cual estimula y activa la AANAT. El estímulo β adrenérgico se ve incrementado por la acción de la NA sobre los receptores α_1 adrenérgicos que estimula una proteína G conectada a la cascada de los fosfatidilinositoles, cuyo último mecanismo es activar la PKC calcio dependiente. Esta activación provoca un aumento rápido de la concentración de AMPc, que activa a la AANAT (Kokkola y cols., 2003; Schomerus y Korf, 2005). El potente gen represor de la transcripción inducido por AMPc (ICER), es activado junto con la AANAT y representa el mecanismo que limita la producción nocturna de melatonina (Stehle y cols, 1993).

3.3. Mecanismos de acción de la melatonina

En los vertebrados, el papel de la melatonina es variado e incluye: la regulación del ritmo circadiano y la modificación de determinadas respuestas biológicas (Man y col, 2011; Reiter, 1991c, d). También actúa a nivel cerebral, inmunológico, gastrointestinal, cardiovascular, renal, óseo, endocrino, como oncostático y antienvjecimiento (Celinski y cols., 2011; Leja-Szpak y cols., 2010; Slominski y cols., 2008). Todos estos efectos de la melatonina están mediadas por distintos mecanismos: dependientes de receptores (de membrana o nuclear) e

independientes de receptor (acción antioxidante y depuradora de radicales libres e interacción con proteínas citosólicas) (Rodríguez y col, 2004, Gómez-Moreno y col, 2010). Algunos de estos efectos protectores los ejerce a través de su metabolito AFMK (Tan y col, 2007).

3.3.1. Receptores de membrana de melatonina

Se han identificado dos sitios de unión de la melatonina a la membrana celular en mamíferos diferentes farmacológica y cinéticamente: MT1 (alta afinidad [picomolar]) y MT2 (baja afinidad [nanomolar]). Ambos tipos de receptores pertenecen a la familia de receptores de membrana asociados a proteínas G (Dubocovich y col, 2003). La existencia de un tercer tipo de receptor de membrana, el MT3, fue investigado en su momento (Dubocovich, 1995), sin embargo se ha encontrado que este tipo de receptor realmente es un enzima citosólico, la quinona reductasa 2, NQO2 (Nosjean y col, 2000; Vincent y col, 2010).

MT1 está formado por 350 aminoácidos, mientras que MT2 está formada por 363 aminoácidos y muestra un 60% de homología con el receptor MT1 (Reppert y col, 1996a).

Morgan y colaboradores establecieron que la unión de la melatonina a sus receptores de membrana, se realiza mediante proteínas G en la “*pars tuberalis*” y el núcleo supraquiasmático (los supuestos sitios de las acciones reproductiva y circadiana de la melatonina, respectivamente) (Morgan y col., 1989). Sin embargo, Abe y col, fueron los primeros en demostrar que la melatonina inhibe la acción de los melanocitos a través de la hormona estimulante de melanocitos (MSH) e inhibe la formación de AMPc (Abe y col., 1969).

Tanto los receptores MT1 y MT2, son receptores acoplados a proteínas G (Jockers y col., 2008). Concretamente, el MT1 está acoplado a las subunidades Gi2, Gi3 y Gq/11 (Brydon y col., 1999). Y el MT1 acoplado a la proteína Gi, disminuye los niveles de AMPc (Capsoni y col., 1994), previa inhibición de la adenociclasa. MT3 tiene baja afinidad por la 125-yodomelatonina, no está acoplado a proteínas G, y no es sensible a iones como el Na⁺, Mg⁺⁺ o Ca⁺⁺ (Dubocovich, 1995).

En algunas células, cuando se acopla a la proteína Gq/11, da lugar a la activación de la fosfolipasa C, que a su vez aumenta los niveles de calcio, y activan a la calmodulina (CaM), calmodulina quinasas y calreticulina (Witt-Enderby y cols., 2003), (Figura 7) (Slominski y cols., 2012).

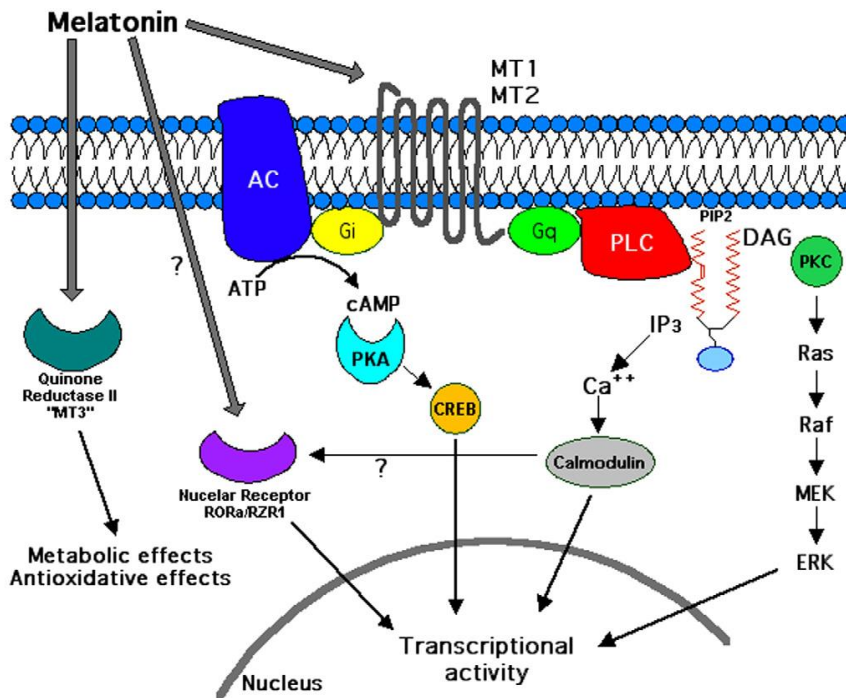


Figura 7. Esquema de los subtipos de receptores de melatonina.

* Extraído de Slominski RM, Reiter RJ, Schlabritz-Loutsevitch N, Ostrom RS, Slominski AT. Melatonin membrane receptors in peripheral tissues: distribution and functions. *Mol Cell Endocrinol.* 2012; 351(2): 152-66.

3.3.2. Receptores nucleares

A principios de los años 90 se acuñó el término "receptor nuclear huérfano" para describir al primero de lo que sería una gran familia de nuevos productos génicos que por homología, pertenecen a la familia de los receptores nucleares para los cuales no hay ligando conocido. Hoy se sabe que algunas de estas proteínas no son dependientes de ligando. Hay descritas unas 30 subfamilias de receptores nucleares huérfanos, de las cuales, la melatonina se une a: RZR α , ROR α , ROR α 2, RZR β . (receptor Z de retinoides (RZR) y receptor del ácido retinoico relacionado con los receptores huérfanos (ROR) (Becker-Andrey col, 1994; Carrillo-Vico y col, 2005).

Por otro lado, existe controversia en relación a si la melatonina interactúa directamente con los receptores nucleares. Becker-Andre y colaboradores, establecieron la teoría que la melatonina interactúa con los receptores nucleares del subtipo RZR (Becker-Andre y cols., 1994). Al mismo tiempo, Carlberg y colaboradores, encontraron que la melatonina podía interactuar con los receptores ROR α / RZR (Carlberg y cols., 1994). Un año más tarde, Wiesenber y colaboradores, confirman que la melatonina puede unirse también a RZR α y

ROR α 1 (Wiesenberg y cols., 1995). No obstante, algunos investigadores cuestionan la capacidad de la melatonina para unirse al receptor ROR α y activarlo directamente (Dai y col., 2001; Kallen y col., 2004; Bitsch y col., 2003). Otros, proponen que la melatonina regula indirectamente los receptores nucleares a través del receptor de membrana MT1, que si es activado por la melatonina (Dai y col., 2001; Ram y col., 2002). Actualmente, existen otras investigaciones que cuestionan la hipótesis de que la melatonina es un ligando nativo para el ROR (Jetten, 2009).

3.3.3. Eliminación de radicales libres

Estudios "in vitro" e "in vivo" han demostrado que la melatonina es un potente eliminador de radicales hidroxilo altamente tóxicos y otros radicales oxidativos (Reiter, 1995, Tan y cols., 2007)). Se ha demostrado que la melatonina parece ser más efectiva que otros antioxidantes conocidos (por ejemplo, manitol, glutatión, y vitamina E) en la protección contra el daño oxidativo (Reiter, 1995).

Además, la melatonina regula la expresión de varios genes, como los de la superóxido dismutasa (SOD) y glutatión peroxidasa (GPx) (Rodríguez y cols., 2004).

Por otro lado, el óxido nítrico (NO), es un radical libre que atraviesa fácilmente las membranas celulares; se genera a partir de L-arginina a partir de la enzima óxido nítrico sintasa neuronal (nNOS) y la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS). A bajas concentraciones y durante períodos cortos, el NO actúa como neurotransmisor y regula la vasodilatación y agregación plaquetaria, sin embargo, los altos niveles de NO producidos por la isoforma iNOS, pueden producir daño celular. Se ha demostrado que la melatonina parece proteger a la célula del daño oxidativo limitando la pérdida de GSH mitocondrial y mejorando la cadena de transporte de electrones, reduciendo así el daño en el ADN mitocondrial. (Carpentieri y cols., 2012).

Los beneficios de las propiedades antioxidantes de la melatonina se han demostrado en numerosos estudios como por ejemplo, en pacientes con artritis reumatoide (Forrest y cols., 2007), en mujeres con infertilidad (Tamura y cols., 2008) y en pacientes de edad avanzada con hipertensión arterial (Kedziora-Kornatowska y cols., 2008).

3.4. Melatonina y cáncer

Los efectos de la melatonina se han estudiado en numerosos tipos de cáncer, como el de próstata, mama, sarcoma, hepatocarcinoma, colon, tumores neurales, melanoma, ovario y cérvix. La mayoría de estos estudios se han llevado a cabo *in vitro*, mediante el uso de líneas celulares derivadas de tumores humanos, aunque también hay estudios en modelos murinos (Mediavilla, 2010) y ensayos clínicos en humanos (Wang y cols., 2012).

Los mecanismos que pueden estar implicados en su capacidad para inhibir el crecimiento tumoral son variados, entre lo que se incluyen (Mediavilla, 2010):

- Efecto antioxidante
- Regulación en la expresión de receptores de estrógenos
- Inhibición de la actividad de la telomerasa
- Modulación del ciclo celular e inducción de la apoptosis
- Inhibición de la angiogénesis
- Activación del sistema inmune
- Regulación del ritmo circadiano
- Otros mecanismos

3.4.1. Efecto antioxidante

El estrés oxidativo se define como una alteración en el equilibrio entre la producción de especies de oxígeno reactivas (ROS), y su inactivación por los sistemas antioxidantes. Por tanto, está implicado en la etiología de muchas enfermedades, incluyendo las neoplasias (Dreher, 1996). Y dado que el estrés oxidativo puede participar en las tres etapas de la carcinogénesis (iniciación, progresión y metástasis), los antioxidantes pueden proteger contra el cáncer en todas las etapas de su desarrollo (Peyrot y Ducrocq, 2008).

Con respecto a las propiedades antioxidantes de la melatonina, se ha visto que está implicada en tumores estrógenos dependientes, como los de mama y endometrio. Así, los efectos cancerígenos de los estrógenos, que están relacionados con la oxidación de algunos de sus metabolitos, son inhibidos por la melatonina (Karbownik y cols., 2001). El efecto antioxidante de la indolamina también se ha relacionado con su capacidad para inhibir el crecimiento de células de glioblastoma *in vitro*. En este caso, se han estudiado los factores de transcripción NF- κ B y el AP-1, los cuales están implicados en la regulación del crecimiento, diferenciación y muerte celular. Martín y cols., han evaluado los efectos de la melatonina en la activación del NF- κ B y el AP-1, así,

concentraciones de 1 mM de melatonina durante 48 horas, inhibe al NF- κ B y no al AP-1 (Martín y cols., 2010).

Otro aspecto importante, es el papel de la melatonina como coadyuvante en tratamientos de quimioterapia y radioterapia. Muchos fármacos empelados en estas terapias, inducen la formación de especies reactivas de oxígeno o radicales libres, que son responsables de algunos efectos secundarios. Un reciente metaanálisis que incluye 33 estudios realizados entre 1996 y 2007, y que comprende una población de 2.446 casos, demuestra que la melatonina, como antioxidante, disminuye la neurotoxicidad, mielosupresión, astenia, caquexia y diarrea, que producen algunos quimioterápicos (Block y cols, 2008). También la melatonina protege contra el daño causado por los radicales libres que generan las radiaciones ionizantes y agentes terapéuticos como la adriamicina, el cisplatino o la citarabina (Reiter, 2002).

3.4.2. Regulación en la expresión de receptores de estrógenos y andrógenos

Los efectos oncostáticos de la melatonina, son especialmente importantes en los tumores hormono-dependientes, como los que afectan a la mama, próstata y ovarios. Así, las propiedades antiestrogénicas de la melatonina, son la base de su acción oncostática en el cáncer de mama (Hill, 2009).

Cohen y cols., introdujeron la idea de la posible relación de la glándula pineal en la etiología del cáncer de mama (Cohen, 1978). Actualmente sabemos que la melatonina interactúa con el receptor de estrógenos (ER), comportándose como modulador selectivo del receptor de estrógenos (SERM). Sin embargo, a diferencia de otros SERMs como el tamoxifeno, la melatonina no interfiere con el sitio de unión de los estrógenos a su receptor (Molis, 1994), sino que las propiedades antiestrogénicas de la melatonina dependen de su capacidad para inhibir la expresión del ER α y de la unión del complejo E2-ER al ERE (elemento de respuesta a estrógenos) al ADN (Mediavilla, 2010). Estos efectos se ejercen a través de la unión de la melatonina a receptores de membrana MT1 (Treck, 2006).

En experimentos llevados a cabo *in vitro* en células MCF-7 humanas de cáncer de mama con receptores estrógeno positivos, se ha demostrado que la melatonina modula el ciclo celular, de tal manera que aumenta la expresión de las proteínas p53 y p21 (p21/WAF1), y disminuye su capacidad de metástasis debido a una mayor expresión de las proteínas E-cadherina y β 1- integrina. Este efecto se lleva a cabo porque la melatonina inhibe la unión del estrógeno a su receptor (concretamente, al complejo estrógeno-estradiol). Por otro lado, moduladores de receptores de estrógenos como el tamoxifeno, o antiestrógenos

como el ICI 182,780 son una opción de tratamiento para tumores ginecológicos hormono-dependientes, y su efecto está aumentado cuando se añade al medio melatonina a concentraciones entre 1 y 100 nM (Treeck, 2006).

Otra vía en la que actúa la melatonina, es aquella en la que participa la enzima aromatasa, que transforma los andrógenos en estrógenos (Simpson, 2000). La melatonina inhibe la enzima aromatasa en las células del cáncer de mama a través de su receptor MT1 (Martínez-Campa, 2009). Este efecto también se ha demostrado *in vivo*, en ratas que llevan inducidos tumores de mama (Cos, 2006). Por otro lado, las células tumorales secretan citoquinas (TNF α , IL-11 e IL-6), que inhiben la diferenciación de los fibroblastos que rodean a los adipocitos maduros, y también estimulan la expresión de la aromatasa. La melatonina, también disminuye la actividad de los fibroblastos en las células del cáncer de mama MCF-17 y 3T3-L1, a través de inhibición de las citoquinas anteriormente citadas (Alvarez-García, 2012).

Por otra parte, la melatonina inhibe el crecimiento de las células tumorales en el cáncer de próstata, mediante la regulación del receptor de andrógenos. Se han realizado estudios en líneas celulares tumorales de próstata, dependientes de receptores de andrógenos (LNCaP) e independientes de receptores de andrógenos (PC3), y se ha visto que la melatonina disminuye el crecimiento en ambas líneas celulares. Este mecanismo no está mediado por los receptores de membrana de melatonina ni por la activación de la PKA, sino por un aumento transitorio de los niveles de AMPc intracelular. Así, la pérdida de melatonina con la edad, puede estar relacionada con el cáncer de próstata, ya que puede inhibir el crecimiento de células tumorales (Sainz y cols., 2004).

3.4.3. Modulación en la actividad de la telomerasa

La activación de la telomerasa tiene un papel importante en la carcinogénesis, porque esta enzima es la responsable del crecimiento ilimitado de las células neoplásicas. Así, en el cáncer de mama, la activación esta enzima constituye un evento relativamente temprano en el proceso de crecimiento de las células tumorales. La melatonina tiene propiedades antiestrogénicas y parece ser que regula la expresión de la telomerasa en células del cáncer de mama receptor estrogénico positivas, de manera que inhibe la expresión del ARNm del gen de la telomerasa (concretamente la subunidad hRET) de forma dosis dependiente en células MCF-7 del cáncer de mama (Martínez-Campa, 2008).

3.4.4. Modulación del ciclo celular y apoptosis

El crecimiento tumoral es el resultado del equilibrio entre la proliferación celular y la muerte celular. Por tanto, la modulación del ciclo celular y la inducción de la apoptosis, son dos objetivos en el control del crecimiento de tumores (Mediavilla, 2010).

La melatonina aumenta la duración del ciclo celular en células humanas MCF-7 del cáncer de mama (Cos, 1991), células humanas HL-60 mieloides (Bejarano, 2009), y células de la línea HepG2 del hepatocarcinoma (Martín-Renedo, 2008), mediante una prolongación de la fase G1, y un retraso en la entrada de la célula a la fase S del ciclo, lo que permitiría una posible reparación del ADN celular dañado.

Por otra parte, la melatonina induce la diferenciación celular en diferentes tipos de células normales y tumorales, como las células del neuroblastoma (Cos, 1996), células MCF-7 del cáncer de mama (Crespo, 1994), células del cáncer de próstata (Sainz, 2005), células madre adultas mesenquimales (Radio, 2006), y células madre neuronales (Sharma, 2008). Así, mediante la prolongación de la fase GO-G1 del ciclo celular, y el consecuente retraso de la entrada a la fase S, la melatonina permite lograr una mejor diferenciación celular (los tumores bien diferenciados, tienen mejor pronóstico) (Mediavilla, 2010). Por otro lado, se ha demostrado, en células de glioma de rata (C6), que el 70% de las células después de 72 horas de tratamiento con melatonina a concentraciones milimolares, se inhibe la progresión del ciclo celular (de la fase G1 a S). En este estudio también se observó que la administración de melatonina intraperitoneal en los roedores, disminuía el crecimiento tumoral de las células C6 en un 50%, transcurridas 2 semanas del inóculo (Martín, 2006). Además, este efecto de la melatonina, puede ser considerado como un posible mecanismo por el cual la indolamina aumenta la supervivencia y la calidad de vida en pacientes con glioblastoma tratados con radioterapia (Lissoni, 1996).

Con respecto a la apoptosis, la melatonina actúa induciendo apoptosis en líneas celulares mieloides (Bejarano, 2009), células del cáncer de mama (Cucina, 2009), del cáncer colorrectal humano (García-Navarro, 2007), cáncer de próstata (Joo, 2009), hepatocarcinoma humano (Martín-Renedo, 2008) y células B de linfoma humano (Trubiani y cols., 2005). También, la melatonina detiene el ciclo celular y promueve la apoptosis en las células tumorales implicadas en el linfoma relacionado con el Virus de Epstein Barr, en el linfoma folicular B no Hodgkin y en la leucemia aguda de células T, gracias a la activación de caspasas mediante un mecanismo independiente de sus receptores de membrana MT1 y MT2 (Sánchez-Hidalgo, 2012).

La melatonina tiene efectos sinérgicos con fármacos antitumorales que inducen la apoptosis. Como el sarcoma de Ewing, en el que la combinación de melatonina con vincristina o ifosfamida, aumenta la actividad de las caspasas y potencia la apoptosis celular (Casado-Zapico y cols., 2010). También, en las células A172 y U87 de glioma humano, la melatonina aumenta la apoptosis a través de la regulación de la PKC, que disminuye la activación de la Akt, aumenta los niveles de receptor DR5 (receptor de muerte celular) y disminuye los niveles de Bcl-2 (Martín y cols., 2010).

Por otro lado, la melatonina también inhibe el crecimiento del cáncer de mama, al actuar junto con el ácido retinoico. Así, en células MCF-7 del cáncer de mama estudiadas *in vitro*, se ha demostrado, que la administración de melatonina, seguida de ácido transretinóico (ATRA), produce un cese total del crecimiento celular. Este efecto se produce mediante la activación de vías que conducen a la apoptosis, concretamente se produce una disminución de los ER y del Bcl-2, además aumenta el Bax y el TGF β 1 (factor de crecimiento β 1). Este efecto se produce en células tumorales con receptores de estrógenos positivos (Eck y cols., 1998)

3.4.5. Melatonina y angiogénesis

La angiogénesis es uno de los principales mecanismos biológicos responsables de la diseminación tumoral. El factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), es uno de los factores angiogénicos más importantes y se encuentra anormalmente elevado en sangre en pacientes con cáncer o con peor pronóstico del mismo (Lissoni, 2001). Lissoni y cols., realizaron un estudio en 20 pacientes con enfermedad metastásica, a los que le administraron 20 mg vía oral de melatonina durante 2 meses, y midieron los niveles de séricos de VEGF cada 15 días. Observaron que en aquellos pacientes en los que disminuían los niveles de VEGF, presentaban una mejor evolución de su enfermedad (Lissoni y cols., 2003).

Por otro lado, el factor regulador clave de la angiogénesis es la hipoxia celular, a través del HIF-1, (Factor Inducible por Hipoxia). Así, el HIF-1, en condiciones de hipoxia celular, aumenta la expresión de varios tipos de genes, entre ellos el gen activador del VEGF (Melillo, 2007). En estudios *in vitro*, se ha encontrado que la melatonina desestabiliza la hipoxia producida por el HIF-1 en células HCT116 del cáncer de colon humano, porque inhibe al HIF-1, lo que dá lugar a una disminución en la producción de VEGF (Shi-Young Park y cols., 2010).

3.4.6. Melatonina y sistema inmune

Una estrategia alternativa importante en la terapia del cáncer, es activar el sistema inmune para inducir una mejor respuesta antitumoral. El sistema inmunológico está formado por células innatas que median respuestas rápidas (monocitos, macrófagos, células NK, etc) y células responsables de una respuesta adaptativa del organismo y de memoria (células T y B). Por otro lado, la melatonina no se sintetiza exclusivamente en la glándula pineal, también es sintetizada en tejido linfoide de medula ósea, timo y linfocitos (Carrillo-Vico y cols., 2004), que están implicados en la regulación de la inmunidad humoral y celular (Srinivasan y cols., 2008).

La melatonina mediante la regulación del ritmo circadiano, parece que modula el sistema inmune (Ravindra, 2006). Así, la pinealectomía está relacionada con fenómenos de involución y desorganización precoz de la glándula tímica, por tanto, la melatonina endógena participa en mecanismos de respuesta humoral y celular del sistema inmune (Guerrero, 2002). Por otro lado, existe evidencia de la existencia de sitios de unión específicos en la membrana de las células inmunes para la melatonina (Guerrero, 2001), concretamente en la membrana de los linfocitos T helper, lo que produce un aumento en la producción de interferón gamma e interleuquina 1, 2, 6 y 12, que hace mejorar la respuesta inmune del organismo (Ravindra, 2006).

En consecuencia, la melatonina se considera un agente inmunomodulador (Lardone, 2009), aunque en algunos modelos experimentales, como en modelos transgénicos que sobreexpresan el protooncogen N-ras, la melatonina produce una atrofia del tejido linfoide mamario (Mediavilla y cols., 1991). No hay estudios experimentales centrados específicamente en el potencial oncostático de la melatonina basado en sus propiedades inmunomoduladoras, sin embargo, existe evidencia para justificar la relación entre el sistema endocrino y el inmune (Mediavilla, 2010).

3.4.7. Melatonina y ritmos circadianos

Las oscilaciones diarias en el metabolismo, fisiología y comportamiento de prácticamente todos los organismos vivos están reguladas por los relojes biológicos. Los procesos biológicos rítmicos con un periodo cercano a las 24 horas se denominan ritmos circadianos. En mamíferos, el control del ritmo circadiano es ejercido por el reloj endógeno principal que reside en el núcleo supraquiasmático (NSQ) del hipotálamo, que a su vez sincroniza al resto del organismo con las alteraciones del ciclo luz/oscuridad del entorno. Desde un punto de vista molecular, los ritmos circadianos se generan por ciclos oscilantes retroalimentados

de transcripción-traslación. Las proteínas Clock y Bmal1 son factores de transcripción que aumentan la expresión de Per1/2, Cry1/2 y otros genes durante el día. Cuando llega la noche y su concentración alcanza un máximo, las proteínas Per1/2/3 y Cry1/2 dimerizan e inhiben la transcripción de CLOCK y BMAL1. Este ciclo principal está modulado por otro ciclo de retroalimentación formado por ROR y REV-ERBa, que regulan la transcripción de BMAL1 (Dardente y Cermakian, 2007).

A su vez, los diferentes niveles de proteínas generados de forma circadiana controlan los niveles de expresión de otros genes y, de esta forma, controlan diversas funciones tales como el ciclo sueño-vigilia, la temperatura corporal y el metabolismo (Dardente y Cermakian, 2007) y otras funciones fisiológicas muy importantes para el organismo como son la división celular, la respuesta al daño inducido al ADN y la remodelización de la cromatina (Canaple y cols., 2003).

La presencia de alteraciones en la expresión de genes que controlan los ritmos circadianos se ha asociado con la presencia de tumores. Los estudios realizados hasta el momento han identificado cambios tanto genéticos como epigenéticos en los genes *Period* en tumores (Wood y cols., 2009). La ausencia de Per2, pero no de Clock o Bmal1, predispone a ratones sufrir cáncer (Wood y cols., 2009). No obstante, Bmal1 parece estar también implicado en crecimiento tumoral y resistencia a quimioterapia en cáncer de colon (Zeng y cols., 2010). La sobreexpresión de Per1 o Per2 en células tumorales induce inhibición de la proliferación (Hua y cols., 2006). En condiciones normales, se han observado oscilaciones de Per1 y Per2, independientes del NSQ, en las células de las criptas del colon (Pardini y cols., 2006). Sin embargo, en casos de CCR avanzado, se observa una pérdida de ritmo en Per1 y un descenso de su expresión, lo que se ha correlacionado a su vez con un descenso en la expresión de dihidropirimidina deshidrogenasa, enzima que cataboliza al 5-fluorouracilo. Esto podría explicar la toxicidad a este tratamiento en muchos casos (Krugluger y cols., 2007).

También regula la expresión de células tumorales en el cáncer de próstata humano, de manera que aumenta la expresión del gen Per2 y disminuye la del Bmal1 (Jung-Hynes, 2010). De acuerdo con este estudio, la melatonina a través de su receptor ROR α , también disminuye la expresión del gen Bmal1 en el cáncer de mama en humanos (Greene, 2012).

3.4.8. Melatonina y p53

En condiciones normales, la p53 es una proteína que se encuentra a bajas concentraciones en el organismo. En condiciones de estrés, se produce daño en el genoma y la activación de la p53 dentro de la célula; esto produce cambios que van desde una detención transitoria del crecimiento celular, hasta la muerte

celular por apoptosis (Oren, 2003). Como hemos visto anteriormente, son muchos los estudios epidemiológicos que demuestran que niveles elevados de melatonina, disminuyen los riesgos de desarrollar cáncer. Así, la melatonina desencadena la activación de genes supresores de tumores, que previenen la transformación maligna de las células (Santoro, 2012).

Previamente, Mediavilla y cols, en 1999, demostraron que la melatonina produce la fosforilación de la p53 y p21WAF1, proteínas relacionadas con la transformación maligna de células humanas MCF-7 en el cáncer de mama, (Mediavilla, 1999). Actualmente, se ha demostrado que la melatonina previene el daño del ADN mediante la activación de la fosforilación de la p53, que requiere la expresión de la proteína PML (Proteína de la Leucemia Promielocítica), que fosforila a la proteína en el residuo de Ser-15 (Santoro y cols., 2012) (Figura 8) (Santoro y cols., 2012).

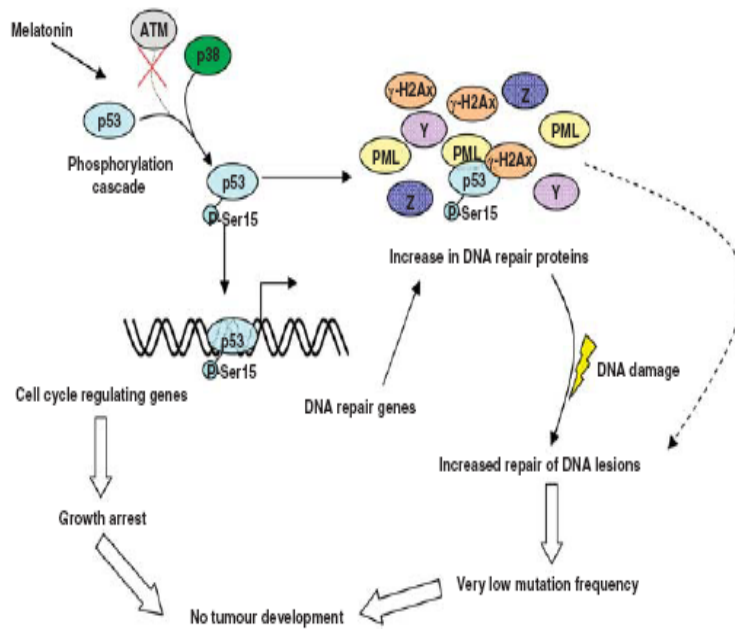


Figura 8. Modelo que representa el mecanismo de acción de la melatonina. La melatonina activa la fosforilación de la p38, p53 y otras proteínas reparadoras del daño celular; el resultado es una disminución en la frecuencia de mutaciones.

* Extraído de Santoro R, Marani M, Blandino G, Mui P, Strano S. Melatonin triggers p53Ser phosphorylation and prevents DNA damage accumulation. *Oncogene* 2012; 31 (24): 2931–2942

3.5. Melatonina y cáncer de colon

La melatonina, participa en la regulación de múltiples funciones del tracto gastrointestinal en condiciones fisiológicas y patológicas. Estas funciones, las ejerce principalmente a través de los receptores MT1, MT2 y MT3, que se expresan a lo

largo de todo el tracto gastrointestinal en roedores y humanos (Tabla 5) (Messner, 2001, Chen y cols., 2011).

Tabla 4. Localización de receptores de membrana de melatonina en íleon y colon de roedores. MT: receptor de melatonina; i: íleon; c: colon

	MT1	MT2	MT3
Íleon	+	+	+
Colon	+	+	+
Mucosa	+	Sin datos	Sin datos
Muscular mucosa		+ (i); + (c)	
Submucosa		+ (i); + (c)	
Muscular propia		+ (c)	

*Extraído de Chen CQ, Fichna J, Bashashati M, Li YY, Storr M. Distribution, function and physiological role of melatonin in the lower gut. *World J Gastroenterol.* 2011; 17(34): 3888-3898.

En el tracto gastrointestinal, la melatonina es sintetizada por las células enteroendocrinas de la mucosa, siendo esta cantidad unas 400 veces superior a la cantidad de melatonina de la glándula pineal (Bubenik, 2008). Esta síntesis no sigue un ritmo circadiano, sino que responde a la periodicidad de la ingesta de alimentos ricos en triptófano (Bubenik, 2000). Además, parece ser que la melatonina producida en el intestino, que ejerce su función como hormona paracrina, puede ser secretada de forma continua o bien de forma cíclica (Chen CQ y cols., 2011). Por otra parte, las principales enzimas de síntesis de melatonina (AANT y HIOMT), se han detectado en la mucosa del tracto gastrointestinal, lo que sostiene la hipótesis de que en el intestino, la melatonina se sintetiza a partir del triptófano presente en los alimentos (Stefulj y cols., 2001).

Aunque, en condiciones fisiológicas, la función de la melatonina en el tracto gastrointestinal no está del todo clara, parece ser que disminuye la motilidad del colon (Lu y cols., 2009), participa en la inflamación y el dolor (Chen CQ, 2011), y aumenta el flujo sanguíneo en la mucosa del tracto gastrointestinal en general (Bubenik, 2008). Y, aunque ejerce sus efectos fisiológicos a través de los receptores MT1, MT2 y MT3 (Chen CQ, 2011; Carpentieri, 2012), Matheus y cols., han demostrado que a altas concentraciones, la melatonina inhibe la actividad del transportador de serotonina en células Caco-2, sin la mediación de los receptores MT1 y MT2, o de la vía de la PKC (Matheus y cols., 2010).

Tras la identificación de los sitios de unión de la melatonina en el tejido colónico en humanos, de pacientes con carcinoma colorrectal, el posible papel de la melatonina en este tipo de cáncer se ha tratado en varios estudios (Chu-Qiu y cols., 2011). Así, en pacientes control sin cáncer colorrectal, se han detectado

receptores con afinidad picomolar para la melatonina, en concentraciones de melatonina en la mucosa y submucosa de colon de 467 ± 99 pg/g, mientras que las concentraciones diurnas en pacientes con cáncer colorrectal son de 3147 ± 87.8 pg/g de tejido (Poon y cols., 1996). La importancia de la variación diurna de los niveles de melatonina para el cáncer de colon todavía no se ha determinado. Pacientes con cáncer colorrectal, muestran una importante disminución en la amplitud en el pico de secreción de melatonina, así como una disminución en la producción de melatonina en general (Kos-Kudla y cols., 2002). Como se ha explicado anteriormente, algunos estudios sugieren que la melatonina puede estar implicada en el riesgo de padecer cáncer o ser un factor de protección frente al mismo (Hrushesky y cols., 2009). Por ejemplo, en ratas pinealectomizadas, se produce un aumento en la producción de células de las criptas del colon, lo que sugiere que la melatonina está implicada en la carcinogénesis del CCR (Dallo y cols., 2006). Otro estudio en ratas, demostró que se produce una hiperplasia en la cripta intestinal varias semanas después de la pinealectomía, pero los mecanismos exactos no fueron identificados (Callaghan, 1995).

La mucosa del colon expresa receptores de estrógenos α y β (ER α y ER β) y receptores de andrógenos (AR), y una pérdida de su expresión, se relaciona con la progresión del tumor en el CRC (Castagnetta y cols., 2002). Por tanto, dado que la expresión de MT1 y MT2, se puede ver modificada por los estrógenos (Clemens y cols., 2001) y andrógenos (Ahmad y cols., 2010), los receptores de membrana de melatonina pueden ser mediadores potenciales de las diferencias relacionadas con el género en el cáncer de colon (León y cols., 2012). Al analizar la expresión de receptores de andrógenos (AR) y receptores de estrógenos (ER α y ER β) en las muestras de pacientes varones con CCR, se observó una disminución de AR, ER α y ER β , tanto en etapas iniciales del tumor, como en etapas avanzadas. También parece existir una correlación positiva entre la expresión de MT2 y la de ER α y ER β , tanto en hombres como en mujeres. Además, la expresión de AR se correlaciona con MT2 y MT1, pero sólo en hombres (León y cols., 2012). Todo esto está en consonancia con las diferencias de comportamiento del cáncer de colon según el género demostradas con anterioridad (Campbell-Thompson, 2001; Castagnetta y cols., 2002).

De hecho, los efectos antiproliferativos de la melatonina en el cáncer de colon, se han estudiado en modelos *in vivo* e *in vitro* (Farriol, 2000), e implica la inhibición de la angiogénesis tumoral, la modulación de los índices entre mitosis y apoptosis, y el mantenimiento del nivel intracelular de glutatión (Chen CQ y cols., 2011).

Por otro lado, los mecanismos por los cuales la melatonina lleva a cabo su función oncostática en cáncer de colon, también han sido estudiados por diversos

autores. García- Navarro y cols., estudiaron células HT-29 del cáncer de colon *in vitro*, tratados con diferentes agonistas y antagonistas de los receptores de membrana y nuclear de melatonina, y observaron que son los receptores nucleares de la melatonina los que participan en la actividad antiproliferativa de la misma. También, el efecto antioxidante y la actividad antiinflamatoria, ya que disminuye la producción de óxido nítrico en las células HT-29 (García-Navarro y cols., 2007).

Otro estudio *in vitro*, analiza el papel de la gastrina y de la colecistoquinina en la proliferación de la línea celular HT-29, correspondiente a cáncer de colon humano, y su relación con la melatonina, concluyendo que la melatonina y los antagonistas de la CCK-A, son útiles para controlar el crecimiento de las células del cáncer de colon en cultivo, y la terapia combinada con ambas, aumenta significativamente su eficiencia (González- Puga y cols., 2005).

Por otra parte, en el cáncer de colon, estudios recientes sugieren que la melatonina modula la actividad en procesos de autofagia e interactúa con las sirtuinas (con efecto pleiotópico en el desarrollo del cáncer), lo que demostraría una acción antioncogénica de la molécula (Motilva y cols., 2011).

Otros estudios sugieren que los receptores de melatonina, tanto de membrana como nucleares, están implicados en las acciones oncostáticas de la melatonina. Así, la indolamina se une a receptores de las células T helper y monocitos, estimulando la producción de IFN γ e interleuquinas 1, 2, 6 y 12, que a su vez regulan la respuesta inmune en situaciones de inmunodeficiencia. La melatonina en este contexto también modula la expresión de NF- κ B, TNF- α , IL-1 β y STAT3. Y la activación de linfocitos y monocitos/macrófagos por la melatonina, es uno de los mecanismos por los que la indolamina inhibe el crecimiento tumoral (Chen CQ y cols., 2011).

En la Tabla 5, se muestran ensayos clínicos en los que pueden estar implicados en el aumento de la eficacia de la quimioterapia en el tratamiento del cáncer y en el aumento de la supervivencia. El co-tratamiento con melatonina, también reduce la toxicidad del tratamiento de quimioterapia y radioterapia en pacientes con CCR (Chen CQ y cols., 2011).

Tabla 5. Ensayos clínicos en lo que se ha empleado melatonina para el tratamiento del cáncer colorrectal

AUTOR	n	ENFERMEDAD	ESTUDIO	DOSIS (mg/día)	RESULTADOS
Lissoni y cols.	18	Cáncer rectal	Aleatorizado con melatonina, melatonina+5-metoxitriptamina o melatonina+IL-2,5wk	20	Melatonina no tuvo efecto sobre la linfocitopenia inducida por la radiación
Lissoni	152	CRC	Aleatorizado con oxalaplatina/5-Fu o CPT-11/FS/5-Fu con o sin melatonina	20	Melatonina disminuye significativamente la incidencia de caquexia, trombocitopenia, neurotoxicidad y astenia
Persson y cols.	8	CRC	Aleatorizado con aceite de pescado o melatonina (4semanas)	18	Melatonina no tiene efectos en los marcadores serológicos inflamatorios
Correa y cols	30	CRC	Aleatorizado con CPT-11 o CPT-11 con melatonina	20	Mayor control de la enfermedad en el grupo CPT-11 con melatonina
Lissoni y cols.	7	CRC	Medición diaria de melatonina durante al menos 2 mo	20	Melatonina puede controlar el crecimiento del tumor, disminuyendo la secreción de VEGF
Lissoni y cols.	25	CRC	Aleatorizado con 5Fu/FS o 5Fu/FS+melatonina; 5 ciclos de 28 días	20	Melatonina disminuye la toxicidad y aumenta la eficacia de 5Fu/FS en quimioterapia
Lissoni y cols.	8	CRC	Aleatorizado con melatonina o melatonina + aloe vera	20	Melatonina+aloe vera, estabilizan la enfermedad y aumentan la supervivencia en pacientes terminales
Barni y cols.	50	CRC	Aleatorizado con BSC o BSC combinado con bajas dosis de IL-2+melatonina; 2wk	40	Bajas dosis de melatonina+IL-2, inducen regresión tumoral y prolonga la supervivencia como segunda línea de tratamiento
Lissoni y cols.	19	CRC	Aleatorizado con IL-2 o IL-2 con melatonina; 4 wk	40	Melatonina enlentece la actividad de IL-2, induce la regresión tumoral, y prolonga la supervivencia

*Extraído de Chen CQ, Fichna J, Bashashati M, Li YY, Storr M. Distribution, function and physiological role of melatonin in the lower gut. *World J Gastroenterol.* 2011; 17(34): 3888-3898.

OBJETIVOS

Como se ha citado en el apartado de *Introducción*, la ET-1 está implicada en el crecimiento tumoral en diversos tipos de cáncer. Se trata de un péptido que se encuentra elevado en el plasma de pacientes con tumores sólidos, y es un potente mitógeno en una amplia variedad de células cancerígenas, especialmente en tumores epiteliales (Reiter 2004).

En trabajos realizados en modelos de estudio no relacionados con cáncer, se ha demostrado que la melatonina inhibe la expresión de ECE-1 (Kilic et al., 2003). Otras investigaciones han mostrado una clara implicación de la ET-1 en los efectos beneficiosos de la melatonina sobre la disfunción vascular durante el envejecimiento (Rodella et al., 2011). Así mismo, la melatonina ejerce un papel protector ante fenómenos de isquemia a nivel hepático, mejorando la reperusión del tejido al mejorar el equilibrio entre el NO (aumenta su biodisponibilidad) y la ET-1 (disminuye su expresión) (Zhang y cols., 2006).

Por lo tanto, la ET-1 podría ser un mediador de los efectos oncostáticos de la melatonina en el cáncer de colon. Es por ello, que nos propusimos abordar en este estudio los siguientes objetivos:

1. Estudiar si la melatonina es capaz de inhibir el crecimiento e induce citotoxicidad en líneas celulares establecidas de cáncer de colon.
2. Determinar la implicación del sistema endotelina-1 en este proceso, concretamente de *edn-1* y ECE-1.
3. Averiguar, si fuese el caso, el mecanismo por el que la melatonina regula la expresión de *edn1*, teniendo en cuenta, tal y como se ha expuesto anteriormente, que es capaz de regular en, determinadas condiciones, la activación de factores de transcripción relacionados con el gen *edn1*, como NF- κ B, AP-1 y FOXO1.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Cultivos Celulares

Para este estudio se han utilizado dos líneas celulares establecidas de colon: Caco-2 y T84, ambas tumorales. Todas ellas se han obtenido de la ATCC, a través del Servicio de Cultivos Celulares del Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada.

Para su mantenimiento y propagación, las células Caco-2, con código ATCC® HTB-37™, se han obtenido a partir de un varón adulto de 72 años de edad y raza caucásica. Esta línea celular expresa la enterotoxina termoestable (*Stx*, *E.coli*) y el factor de crecimiento epidérmico (EGFR). Por otro lado, los genes que expresan son para la queratina, proteína de unión ácido retinoico 1 (RABP1) y proteína de unión a ácido retinoico 2 (RABP2) (Levin y Davis, 1997); además, es una línea celular tumorigénica que forma adenocarcinomas moderadamente bien diferenciados en ratones desnudos equivalentes a los adenocarcinomas primarios de colon (grado II) en humanos. Es además susceptible al virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1.

Las células T84, con código ATCC® CCL-248™, se han obtenido a partir del tejido metastásico de pulmón de un varón de 72 años de edad con cáncer colorrectal. La morfología de estas células es epitelial y se han cultivado gracias a sus propiedades adherentes. Por otro lado, las células T84, se caracterizan porque son células trasplantables vía subcutánea en ratones desnudos y pueden utilizarse para transfección. Estas células expresan receptores de varios neurotransmisores y hormonas peptídicas, el antígeno carcinoembrionario (CEA) y queratina.

Las líneas celulares Caco-2 y T84 sufren diferenciación espontánea a enterocitos una vez que alcanzan confluencia y se incrementa con la duración del cultivo (Madara y cols., 1987; Hidalgo y cols., 1989). La mayoría de los estudios relativos a las propiedades funcionales de estas dos líneas celulares, se realizaron entre siete hasta trece días después de haber alcanzado la confluencia en monocapa (Grasset y cols., 1984;; Madara y cols., 1988; Matter y cols., 1990; Jumarie y Malo, 1991; Hauri y cols., 1994). Debido a esto, en nuestro caso hemos trabajado siempre con cultivos no confluentes.

En el caso de la línea Caco-2, varios autores han demostrado que el número de pases en cultivo influye en diferentes funciones y actividades de esta línea. La expresión de marcadores típicos de diferenciación tales como la sucrosa-isomaltasa y el transportador de glucosa GLUT-5 aumenta en los pases tardíos. La expresión del transportador PepT1 disminuye entre los pases 33-43. También se ha

encontrado variabilidad en la expresión del ARNm de CYP3A4 entre los países 36-88 (Sambuy y cols., 2005). En nuestro caso, hemos trabajado entre los países 25-35.

Aunque inicialmente, estas líneas derivan de cáncer de colon no mucinoso, pueden sintetizar y segregar mucina, hayan alcanzado o no diferenciación espontánea en cultivo. Por ello, estas líneas celulares pueden servir como modelos *in vitro* para el estudio de la heterogenicidad y el control de la expresión de genes de mucina/apomucina (Niv y cols., 1992).

Las células Caco-2 cancerosas se cultivaron en medio MEN suplementado con aminoácidos no esenciales al 5% (NEAA). Las células cancerosas T84 se cultivaron en medio DMEN: F12 1:1. Cada suero contenía un 10% de suero bovino fetal (FBS) y un 1% de antibióticos (penicilina y estreptomycin). Todos los reactivos del cultivo celular fueron adquiridos de Gibco-BRL (Gibco; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Las células se cultivaron a 37°C en un ambiente humidificado al 5% de CO₂.

2. Preparación de melatonina y tratamientos

La melatonina de alto grado de pureza se obtuvo comercialmente de Helsinn Química (Biasca, Suiza). Inicialmente se preparó una disolución madre 400 mM en DMSO. El resto de diluciones se prepararon en medio de cultivo. En todos los casos se han utilizado concentraciones comprendidas entre 0.1-1 mM (concentración final en cultivo).

3. Estimación de la viabilidad celular

Para determinar la viabilidad celular, tras someter a las células a los distintos tratamientos, se emplearon dos técnicas diferentes: a) Ensayo colorimétrico de MTT (Denizot y Lang, 1986); y b) Exclusión de azul tripán.

3.1. Ensayo MTT

Este ensayo de viabilidad se basa en la reducción de la sal de tetrazolio (MTT) en azul formazán por parte del enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa. La conversión sólo tiene lugar cuando las células están vivas y la cantidad de formazán producida es proporcional al número de células presentes.

Para llevar a cabo el ensayo, las células se sembraron en placas de 96 pocillos a una densidad de 30.000 células/ml en el caso de las células tipo Caco-2 y a una densidad de 40.000 células/ml en el caso de T84 y FHC. Al día siguiente, las

células se trataron según el protocolo correspondiente, de modo que el volumen final de incubación siempre fue de 100 μ l. Acabado el tratamiento, se añadieron 10 μ l de una disolución 5 mg/ml de MTT en PBS estéril y se incubaron 4 horas a 37°C en atmósfera húmeda al 5% de CO₂. Pasado este tiempo, se añadieron 100 μ l de Tampón de Lisis (20% SDS en 50% formamida, pH = 4.7) y la placa se mantuvo a 37°C en atmósfera húmeda al 5% de CO₂ toda la noche. Posteriormente, se evaluó la absorbancia respecto al control a 570 nm en un lector de placas (Triad multimode reader).

3.2. Ensayo Azul Tripán

Las células se sembraron en placas de 6 pocillos a una densidad de 300.000 células/ml. Transcurrido el tratamiento, las células se recogieron por tripsinización, se lavaron y resuspendieron en 50 μ l de PBS. A las células resuspendidas se les añadió el mismo volumen de una disolución de Azul Tripán al 0.4% y se incubaron durante 5 minutos. Pasado este tiempo, las células se contaron en un hemocitómetro.

Las células que aparecen teñidas de azul poseen roturas en la membrana plasmática que permiten la difusión del colorante al interior de la célula, mientras que las células vivas aparecen no teñidas.

4. Determinación del ciclo celular

El análisis del ciclo celular se realizó mediante la solución de PI/RNase (Immunostep, Salamanca, Spain). El Yoduro de Propidio (PI) es la tinción que más se utiliza para la molécula de ADN y que permite el análisis del ciclo celular mediante citometría de flujo. El PI también se une a las moléculas de ARN, que son eliminadas mediante la adición de nucleasas (ARNasas). De esta manera, la cuantificación del contenido del ADN, nos permitió conocer la distribución de una población de células a lo largo de las diferentes fases del ciclo celular, de manera que la cantidad de IP es directamente proporcional a la cantidad de ADN. El análisis del ciclo celular se representó en histogramas de intensidad de fluorescencia para sondas específicas de ADN.

Además de la solución de PI/RNase, se ha utilizado 100 ml de PBS y 0,09% de NaN₃, a un pH de 7,2.

El protocolo consistió, en primer lugar, en centrifugar una población de 2x10⁵ a 1x10⁶ células durante 5 minutos a 300 g, a continuación se retiró el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en el líquido residual. Posteriormente se fijaron las células mediante la adición de 200 μ l al 70% de etanol, agitando

lentamente. Se dejaron las células en el etanol a -4°C durante 30 minutos. A continuación, se lavaron en 2 ml de solución de PBS con un 2% de BSA. Se centrifugaron las células durante 5 minutos a 300 g y se eliminó el sobrenadante. Igualmente, se resuspendió el precipitado en el líquido residual. Finalmente se añadió 0,5 ml de solución de PI/RNase, se mezcló y se incubó durante 15 minutos a la temperatura previa al análisis. Después de la incubación, se analizó el contenido mediante citometría.

5. Extracción de ARN

El ARN total de las muestras de tejido, se preparó usando el RNeasy Mini Kit (QIAGEN). El procedimiento es el siguiente:

- a) Las células se cultivaron en placas de 6 pocillos a una densidad de 300.000 células/pocillo. Transcurrido el tratamiento, se aspiró completamente el medio de cultivo, se realizó un lavado con PBS y se lisaron directamente en los pocillos con 500 μl de tampón RLT. El producto de lisis se arrastró con rasqueta y se recogió con una pipeta en un tubo eppendorf (1.5 ml) asegurándonos que no se producían grumos.
- b) Al lisado anterior se le añadieron 500 μl de etanol al 70% para homogenizar el lisado, mezclando suavemente con la pipeta.
- c) Seguidamente, se transfirieron 700 μl de la mezcla en una mini columna con un tubo recolector de 2 ml y se centrifugó durante 15 segundos a 10,000 rpm. El líquido recogido en el tubo de 2 ml se desechó.
- d) A la columna se le añadieron 700 μl de tampón RW1 y se centrifugó durante 15 segundos a 10.000 rpm para lavar la membrana de la columna. Desechar el líquido recogido en el tubo colector.
- e) Se añadieron 500 μl de tampón RPE (al 80% de etanol) a la columna y se centrifugó durante 15 segundos a 10,000 rpm, para lavar la membrana de la columna.
- f) Posteriormente, se reemplazó el tubo colector por uno nuevo y se eluyó el ARNm retenido en la columna con 30-50 μl de agua ultrapura mediante centrifugación durante 1 minuto a 10.000 rpm.

La cantidad de ARN total se determinó por espectrofometría UV en un nanodrop (IMPLEN).

6. Síntesis de ADNc

El ADNc de cadena simple se preparó mediante transcripción inversa con primers oligo-dT, utilizando 2 µg del total de ARN en 50 µl de volumen total y empleando un kit comercial (AccuScript™ High Fidelity 1st Strand cDNA Synthesis Kit, Stratagene). La integridad del ADN se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa.

7. PCR a tiempo real

Unos 5 µl de ADNc se amplificaron durante 40 ciclos con primers específicos para ubiquitina C (UBC), *edn-1*, ECE-1, AA-NAT y ASMT (Tabla 6). Las reacciones de PCR que contienen la molécula SYBR-green fueron amplificadas en un equipo de PCR a tiempo real (Mx3000P QPCR System, Stratagene). Los datos fueron adquiridos como valor de ciclo umbral (Ct). La amplificación de UBC se utilizó como estándar interno de ARNm para normalizar las diferencias en concentración de la muestra y de la carga. Se construyeron curvas de calibración para cada uno de los genes de estudio mediante el trazado de los valores de Ct frente a diluciones de ADNc conocidas. Después de cada experimento se realizó electroforesis en gel de agarosa de cada muestra, para descartar los productos de PCR no específicos y los dímeros de los primers.

Tabla 6. Cebadores utilizados en este estudio

GEN	CEBADOR SENTIDO	CEBADOR ANTISENTIDO	TAMAÑO PRODUCTO PCR (PB)
PpET1	aaaggaagccctccagagagcgttatgtg	tctgctgagaggtccattgtcatcccag	309
ECE-1	accagaactgggtgaagaagaacg	ttaccagactcgcacttgtga	269
AA-NAT	tccctgccagttagttcgctgcctcac	tgtcccagagcgagccgatgatgaaggc	206
ASMT	catgactgggcagacggaaa	gttagtccaggtcacaagaacagtt	300
UBC	tgggatgcaaatctctggaagaccctgac	accaagtgcagagtggactcttctggatg	213

8. Determinación de concentración de proteínas

La concentración de proteínas de las muestras se determinó siguiendo el método colorimétrico de Bradford. Se basa en la formación de un compuesto coloreado entre el azul comassie y las proteínas, que se caracteriza por presentar un máximo de absorción a 595 nm y un alto coeficiente de extinción molar, lo que permite una elevada sensibilidad en la determinación.

El reactivo de Bradford se preparó disolviendo 100 mg de azul comassie G 250 en 50 ml de etanol 96% y añadiendo 100 ml de ácido ortofosfórico 85% y cantidad suficiente de agua destilada hasta un volumen final de 1 litro.

8.1. Preparación de la muestra

Se preparó una disolución patrón de albúmina en agua destilada y distintos estándares de concentración creciente de albúmina (0-250 $\mu\text{g/ml}$). Paralelamente las muestras problema se prepararon con una dilución adecuada. Se añadió a todos los tubos (estándares y muestras) 1 ml de reactivo de Bradford, diluido 1:5. Se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente y se leyó la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro con lector de microplacas (Bio-Tec-PowerWave_x).

La concentración de proteínas de la muestra problema se obtuvo interpolando su valor de absorbancia en la curva patrón obtenida (coeficiente correlación 0.99 +/- 0.01) y multiplicando posteriormente por el factor de dilución aplicado en cada caso. Los valores de concentración de proteínas se expresan en mg/ml.

9. Western Blotting

Las células fueron despegadas mediante raspado mecánico y se lavaron con una disolución de PBS a 4°C. Posteriormente se resuspendieron en 50 μl de tampón de lisis por cada 500.000 células (tampón RIPA e inhibidores de fosfatasa y proteasas), durante 30 minutos a 4°C. Los restos membranosos y de ADN se eliminaron por centrifugación y en el sobrenadante se cuantificaron la concentración de proteínas mediante el método de Bradford. Una vez igualada la concentración a 50 μg para cada muestra, se añadió tampón de carga de proteínas (50 mM Tris-HCL pH 6.8, 6M urea, 6% β -mercaptoetanol, 3DS, 0.003% azul de bromofenol) y las muestras se calentaron a 95°C durante 3-5 minutos. Posteriormente se realizó una electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida para

separar las proteínas, que después se transfirieron a una membrana de PVDF (Immobilon, Millipore) mediante la técnica de transferencia semiseca con el sistema Trans-Blot SD (Bio-Rad) a 100 mA durante 45 minutos. Para disminuir la fijación inespecífica de anticuerpos, la membrana fue bloqueada con una solución de leche en polvo al 5% en tampón TBS al 0.1% de Tween-20 durante 30 minutos y posteriormente incubada durante toda la noche a 4°C con el anticuerpo correspondiente: ECE-1 (1:1000, Abcam), ETRA (1:1000, Abcam), ETRB (1:200, Abcam), NF- κ B (1:200, Santa Cruz Biotechnology), pNF- κ B (1:1000; Becton Dickinson), FoxO1 (1:1000, Cell Signaling), pFoxO1 (1:200, Santa Cruz Biotechnology), AP-1 (1:200, Santa Cruz Biotechnology), pAP-1 (1:200, Santa Cruz Biotechnology), p38-MAPK (1:000, Cell Signaling), Akt (1:1000, Becton Dickinson), Erk (1:1000, Cell Signaling), Src (1:1000, Cell Signaling), pp38-MAPK (1:2000, Cell Signaling), pAkt (1:2000, Cell Signaling), pErk (1:2000, Cell Signaling), pSrc (1:1000, Cell Signaling) y β -actin (1:200, Santa Cruz Biotechnology). Tras esta incubación, se retiró el anticuerpo primario y la membrana se lavó 3 veces durante 5 minutos con tampón TBS/Tween 0.1%. Finalmente, la membrana se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario correspondiente marcado con peroxidasa HRP (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA). Posteriormente se procedió a un ciclo de tres lavados con tampón TBS/Tween 0.1%, y las bandas fueron visualizadas usando el programa Quantity One 4.6.8 (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA).

10. Medida de los niveles de ET-1

Los niveles de ET-1 se midió con Kits de inmunoensayo de ELISA (Enzo Life Sciences Inc., referencias ADI-900-020A y ADI-900-022, respectivamente), que permite la determinación cuantitativa de ET-1 en medio condicionado.

Las muestras y los patrones (0.78-100 pg/ml) se añadieron a los pocillos de una placa de ELISA recubiertos con un Ac monoclonal específico y a continuación, se incubó toda la noche a 4°C. Tras lavar la placa con disolución de lavado, se incubó con el anticuerpo monoclonal específico para ET-1, pero ahora unido a HRP. Una vez eliminado el exceso de anticuerpo, para el revelado de la placa se añadió una disolución de sustrato TMB (tetrametilbenzidina), que generó un color azulado. Por último se añadió la disolución de parada (ácido sulfúrico 1N) para detener la reacción del sustrato y el color amarillo resultante se leyó a 450 nm. La cantidad de señal es directamente proporcional al nivel de ET-1 de la muestra.

11. Inmunofluorescencia

Las células se cultivaron en placas de seis pocillos y se fijaron con metanol y acetona en hielo (1:1) durante 15 minutos después de los tratamientos. Las células fijadas, fueron lavadas 3 veces con PBS Tween 20 al 0,1%, y se incubaron durante la noche a 4°C con anticuerpos de conejos policlonales primarios (dilución 1:200) contra fosfo-FoxO1 (Santa Cruz Biotechnology), FoxO1 (Tecnología de Señalización Celular), NF- κ B (p65) (Santa Cruz de Biotecnología) y fosfo- NF- κ B p65 (Becton-Dickinson, NJ, USA). Al día siguiente, las células se lavaron 3 veces con PBS Tween 20 al 0,1%, y se incubaron con anticuerpos secundarios (Alexa Fluor 586-conjugated IgG; Molecular Probes, Eugene, OR) durante 1 hora, a temperatura ambiente. La tinción nuclear se realizó mediante la incubación de las células con IP (Molecular Probes). La inmunotinción se visualizó con microscopio láser con focal Espectra Leica.

12. Medida de los niveles de AMPc

Los niveles de AMPc, se midieron mediante un Kit de inmunoensayo de ELISA (Assay Designs Inc., Ann Harbor, MI) competitivo que permitió su determinación cuantitativa mediante el uso de patrones adecuados (0-20 pmol/ml). Para ello, las células se sembraron en placas de 6 pocillos a una densidad de 300.000 células/pocillo. Una vez tratadas, se lisaron con 250 μ l de HCl 0.1 N durante 1 hora a 37°C. Para asegurar una lisis uniforme las células se inspeccionaron al microscopio. Posteriormente, las células se centrifugaron a 600 g para sedimentar los restos celulares y el sobrenadante se utilizó directamente para su posterior análisis.

Para conseguir la cuantificación de los niveles intracelulares de AMPc, se procedió a la acetilación de muestras, patrones y blancos, con una disolución al 33% de anhídrido acético en trietilamina, lo que aumentó la sensibilidad del ensayo unas 10 veces. La reacción de acetilación es muy rápida, por lo que las muestras acetiladas se usaron inmediatamente.

Para la realización del ensayo, los patrones y las muestras se añadieron a una placa de ELISA con los pocillos recubiertos con un anticuerpo IgG GXR anti-conejo.

A continuación se añadió una disolución azul de AMPc conjugado con fosfatasa alcalina, seguido de una disolución amarilla con anticuerpo policlonal de conejo para AMPc. Después de 2 horas de incubación a temperatura ambiente, la

placa se lavó adecuadamente y después se añadió el sustrato pNPP que formó un color amarillo.

La placa se leyó en un lector de placas (Triad multimode reader) a 405 nm. La cantidad de AMPc se estimó por interpolación de los datos de absorbancia de las muestras en la recta de calibrado.

13. Medida de la actividad de PKA y PKC

La determinación cualitativa de la proteína quinasa C (PKC) y de la proteína quinasa A (PKA), se realizó utilizando el kit denominado Calbiochem® Proteína Ensayo de quinasa, no radiactivo. Es importante tener en cuenta que la traslocación de PKC desde el citosol a la membrana, es una característica de la activación de PKC para la mayoría de sus isoformas. Desde este kit, medimos la PKC citosólica, en lugar la PKC asociada a membrana.

Para la realización del ensayo las células se cultivaron en placas Petri que tras los tratamientos se recogieron el PBS frío. Se utilizaron al menos 1.0×10^7 células por ensayo, aunque para la determinación de la actividad específica final, los resultados se normalizaron mediante medida de la concentración de proteínas por el método Bradford descrito anteriormente. La lisis celular se realizó rápidamente mediante tratamiento con ultrasonidos (Bandelin sonoplus, Bandelin Electronics, Berlin) durante 4-5 veces, durante 10 segundos cada uno. Tras centrifugación, a 100.000 g durante 60 minutos a 4°C , para la obtención del citoplasma puro, se recogió el sobrenadante. En este paso es importante no congelar el sobrenadante, que puede utilizarse dentro de las 72 horas tras su obtención sin pérdida de calcio.

El tampón de reacción para la determinación de PKA consistió en 50 mM de Tris-HCl, 50 mM de β -mercaptoetanol, 3 mM MgCl_2 , 0.1 mM ATP, 2 mM AMPc, 10 mM de EGTA, 10 mM de benzamidina, 5 mM de EDTA, 1 mM de PMSF, pH 7. En el caso de la PKC el tampón de reacción consistió en 50 mM de Tris-HCl, 50 mM de β -mercaptoetanol, 3 mM MgCl_2 , 2 mM CaCl_2 , 0.1 mM ATP, 50 $\mu\text{g/ml}$ fosfatidilserina, 10 mM de EGTA, 10 mM de benzamidina, 5 mM de EDTA, 1 mM de PMSF, pH 7. En ambos casos se realizó un blanco de reacción para cada muestra sin AMPc en el caso de la PKA y sin CaCl_2 ni fosfatidilserina en el caso de la PKC.

El método de detección final se basa en la técnica de ELISA. En una placa de 96 pocillos se añadieron las muestras mezcladas previamente con el tampón de reacción apropiado para cada determinación. La mezcla se transfirió a una placa de ELISA con los pocillos recubiertos de un pseudosustrato susceptible de ser fosforilado por las enzimas activas. Posteriormente se añadió, un anticuerpo

monoclonal biotinilado, que reconoce la forma fosforilada del pseudosustrato, y que se detectó utilizando estreptavidina conjugada con HRP. El revelado se realizó añadiendo una disolución de o-fenilendiamina a cada pocillo. El color resultante tras la reacción se midió a 492 nm. Y la actividad de PKC y PKA resultante es directamente proporcional a la intensidad del color.

14. Muestras humanas de CCR

El Comité de Ética del Hospital Universitario San Cecilio, aprobó el estudio de muestras humanas de CCR, y todos los pacientes dieron su consentimiento informado (Apéndice I) por escrito para el almacenamiento de las muestras después de la cirugía en la Red de Banco de Tumores de Andalucía (RBTA), y para su posterior utilización en la investigación biomédica.

Todas las muestras se obtuvieron entre las 9 horas a.m. y las 12 horas del mismo día (3 horas), y los tejidos tumorales viables y los tejidos normales adyacentes, fueron diseccionados de forma inmediata y congelados en fresco en Tissue-Tek¹ (Optimal Corte compuesto Temperatura, Sakura Finetek Europa B.V., Zouterwoude, Países Bajos), por métodos estándar.

Los ARNm de NAT, END1 y ECE-1, se evaluaron en el tejido tumoral y mucosa normal adyacentes de 119 pacientes (edad media 71 ± 14 años) que se sometieron a cirugía para tratamiento de CCR primario esporádico. Las características de los pacientes se muestran en la tabla 3. La normalización de resultados se realizó utilizando los genes TBP y UBC como housekeeping. La extracción de ARNm se realizó de acuerdo a la sección 5 de este apartado. Los valores de Ct obtenidos mediante PCR a tiempo real (Sección 6 de este apartado de *Materiales y Métodos*) mediante curvas patrón realizadas a tal efecto para cada gen.

En relación con la estadificación del tumor (clasificados de acuerdo con la nomenclatura TNM), las muestras se agruparon en precoces (estadios I y II) y tumores avanzados (estadios III y IV), porque no se encontraron diferencias en los parámetros analizados para cada grupo por separado.

Tabla 7. Características de los pacientes

Características	N (%)
Género	
<i>Hombre</i>	53 (44.4)
<i>Mujer</i>	66 (55.6)
Localización	
<i>Colon</i>	110 (92.6)
<i>Recto</i>	9 (7.4)
Tipo histológico	
<i>Bien diferenciado</i>	26 (22.2)
<i>Moderadamente diferenciado</i>	53 (44.4)
<i>Pobremente diferenciado</i>	40 (33.3)
Estadio pTNM	
<i>I</i>	15 (13.0)
<i>II</i>	51 (42.6)
<i>III</i>	48 (40.7)
<i>IV</i>	4 (3.7)
Número de ganglios linfáticos extirpados	
<i><12</i>	46 (38.9)
<i>>12</i>	39 (61.1)

RESULTADOS

1. Efecto de la melatonina sobre la viabilidad celular en líneas establecidas de cáncer de colon en cultivo

Para este estudio se han utilizado dos líneas tumorales establecidas de cáncer de colon, Caco-2 y T84, que se han cultivado en presencia de concentraciones crecientes de melatonina (0-1 mM) durante tres días. Mediante ensayo MTT se observa que la melatonina inhibe el crecimiento de estas células tumorales en cultivo (Figura 9).

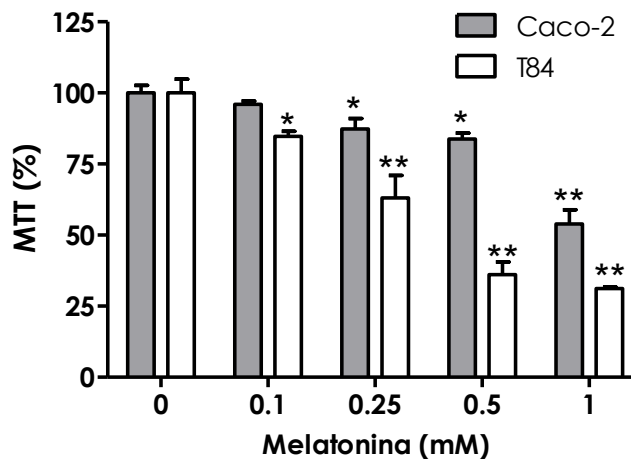


Figura 9. La melatonina inhibe el crecimiento de las células de cáncer de colon Caco-2 y T84. Para estos estudios de crecimiento celular, las células se trataron con DMSO o concentraciones crecientes de melatonina (desde 0.1 hasta 1 mM, concentraciones finales en el medio de cultivo) en DMSO. Tras 72 horas de tratamiento, se realizó el ensayo MTT, tal y como se ha descrito en la sección Materiales y Métodos. Los datos representan media \pm EEM de tres experimentos por cuadruplicado. * $P < 0,01$ vs control; ** $P < 0,001$ vs control.

En Caco-2, se observa efecto inhibitor a partir de 0.25 mM y a la máxima concentración (1 mM) la inhibición es inferior al 50%. En T84, sin embargo, aparece un efecto significativo a partir de 0.1 mM y a la máxima concentración de melatonina la inhibición llega a ser del 68.81%. Por lo tanto, las células T84 mostraron la mayor sensibilidad a la melatonina, pero, también, las células Caco-2 son sensibles a concentraciones farmacológicas del indol.

Existe, además, un efecto dosis-respuesta claro en ambas líneas celulares, sin signos de citotoxicidad después del tratamiento con melatonina, como se

observa tras el ensayo de exclusión con azul tripán (Figura 10). El número de células viables fue similar en todas las dosis de melatonina analizadas, tanto en células Caco-2 ($95,42 \pm 0,85\%$ en 0,5 mM de melatonina; $93,36 \pm 0,98\%$ a 1 mM de melatonina), como en T84 ($92,95 \pm 0,76\%$ en 0,5 mM de melatonina; $94,28 \pm 0,88\%$ a 1 mM de melatonina).

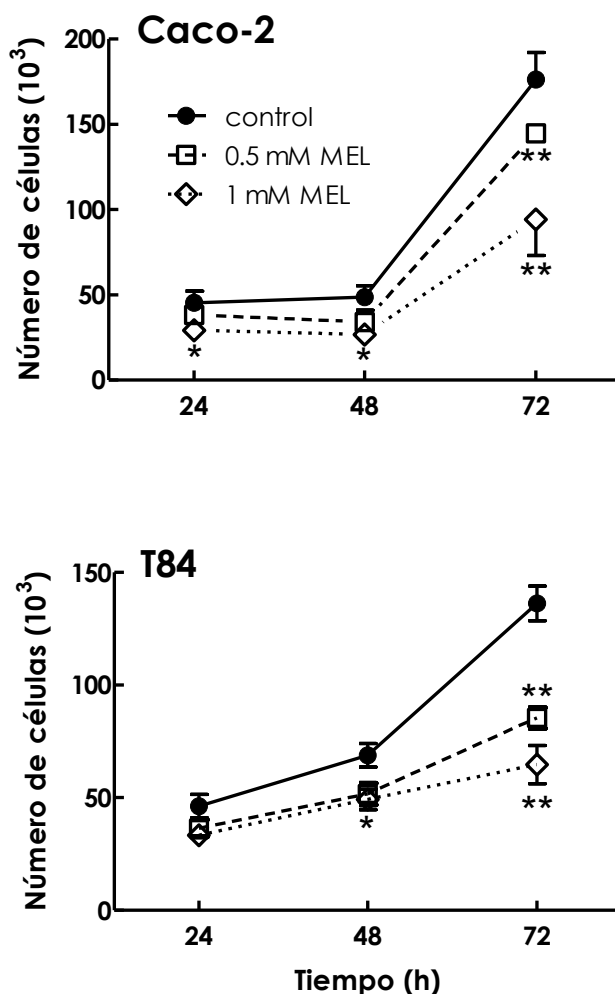


Figura 10. Análisis de la viabilidad de las células Caco-2 y T84 por tripan blue tras el tratamiento con dosis crecientes de melatonina. Para estos estudios de crecimiento celular, las células se trataron con DMSO o concentraciones crecientes de melatonina (desde 0.5 hasta 1 mM, concentraciones finales en el medio de cultivo) en DMSO. Tras 72 horas de tratamiento, se realizó el ensayo Tripan Blue, tal y como se ha descrito en la sección Materiales y Métodos. Los datos representan media \pm EEM de tres experimentos por duplicado. * $P < 0.01$ vs control; ** $P < 0.001$ vs control".

La distribución del ciclo celular tras el tratamiento con melatonina se ha evaluado mediante citometría de flujo (Figura 11). El tratamiento con melatonina 1 mM durante 72 horas induce la acumulación en fase G2/M del ciclo en Caco-2 ($24.25 \pm 0.85\%$ de las células tratadas con melatonina en G2/M frente a $15.30 \pm 0.21\%$ de las células control en la misma fase) y T84 ($27.25 \pm 1.62\%$ de las células tratadas con melatonina en G2/M frente a $16.55 \pm 1.76\%$ de las células control en la misma fase). El tratamiento con melatonina también produjo un descenso del número de células en fase S en Caco-2 ($7.20 \pm 0.84\%$ en el grupo tratado con melatonina frente a $12.50 \pm 0.13\%$ en las células control) y T84 ($13.9 \pm 0.25\%$ en el grupo tratado con melatonina frente a $19.45 \pm 0.61\%$ en las células control). Otras concentraciones de melatonina no produjeron ninguna variación en la distribución del ciclo celular. Estos resultados indican que el tratamiento con melatonina 1 mM inhibe la progresión celular desde la fase G2/M hacia la fase G1, o lo que es lo mismo, provoca parada en la fase G2/M.

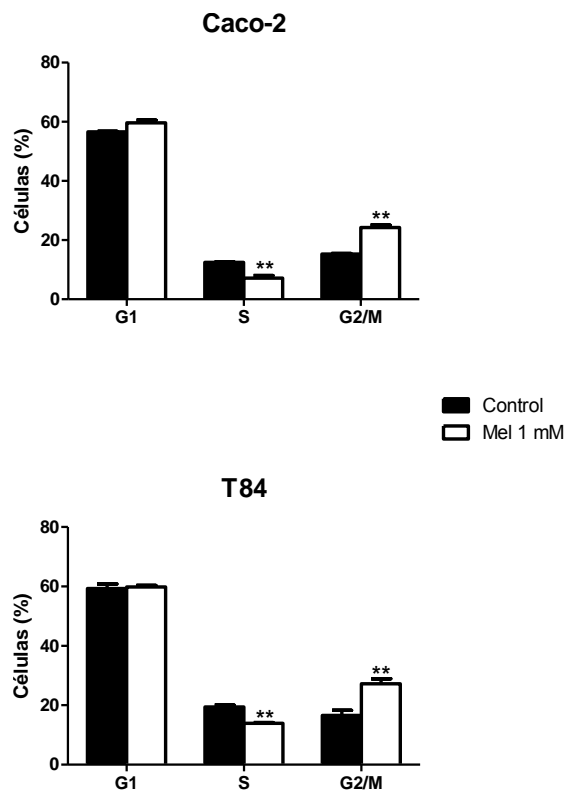


Figura 11. El ciclo celular se analizó mediante citometría de flujo. Los resultados representan la distribución celular en las diferentes fases del ciclo celular tras el tratamiento con melatonina 1 mM durante 72 horas y representan la media \pm EEM de dos experimentos realizados por duplicado. ** $P < 0.001$ vs Control.

2. Efecto de la melatonina sobre el eje endotelina-1 en líneas celulares establecidas de cáncer de colon

Para estudiar el efecto de la melatonina sobre el eje endotelina, hemos examinado la expresión de *edn-1* y ECE-1 y los niveles de ET-1 en las líneas celulares Caco-2 y T84 tras el tratamiento con diferentes concentraciones de melatonina (0-1 mM). El RNA total, los lisados de proteínas o el medio condicionado se recogieron tras el tratamiento con melatonina durante distintos tiempo (0-72 horas). Antes de los tratamientos, las células se mantuvieron toda la noche en cultivo con medio sin suero. Todos los tratamientos se realizaron en medio sin suero. Como puede verse en la Figura 12, la melatonina induce inhibición transitoria de la expresión del ARNm de *edn-1* en las dos líneas celulares estudiadas. En Caco-2, la inhibición resultó significativa desde 1 hora de tratamiento hasta las 48 horas, mientras que en T84 la inhibición fue significativa a partir de los 15 minutos y hasta 1 hora de tratamiento.

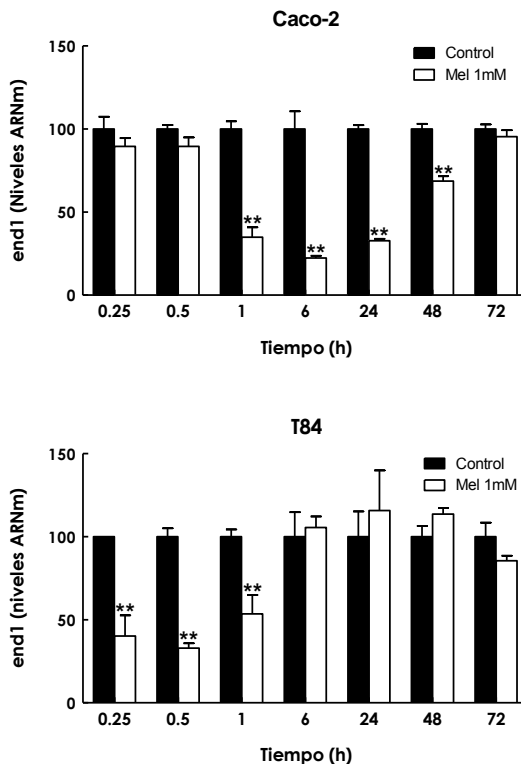


Figura 12. Expresión de *edn-1* de las células Caco-2 y T84 tras el tratamiento con melatonin. Cells se sembraron en placas de 6 pocillos, cultivadas en medio sin suero durante toda la noche e incubadas con melatonina 1 mM hasta 72 h. Los lisados se utilizaron para analizar los niveles del ARNm de *edn-1* frente a las células no tratadas. ** $P < 0.001$ vs a las células no tratadas.

La inhibición de la expresión del ARNm de *end1* por la melatonina es también dosis-dependiente (Figura 13). Las células Caco-2 se incubaron con diferentes dosis de melatonina (0.1-1 mM) durante 6 horas. La inhibición empieza a ser significativa a partir de 0.25 mM de melatonina ($P < 0.05$).

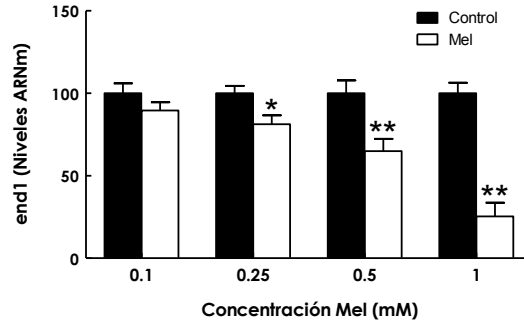


Figura 13. Efecto de dosis crecientes de melatonina sobre la expresión del ARNm de *end1* en células Caco-2. Los datos representan la media \pm SEM de tres experimentos por duplicado. * $P < 0.05$ vs control; ** $P < 0.01$ vs control.

En las mismas condiciones de trabajo, no se observa inhibición de la expresión del ARNm de ECE-1 a ninguno de los tiempos estudiados ni en Caco-2 ni en T84 (Figura 14).

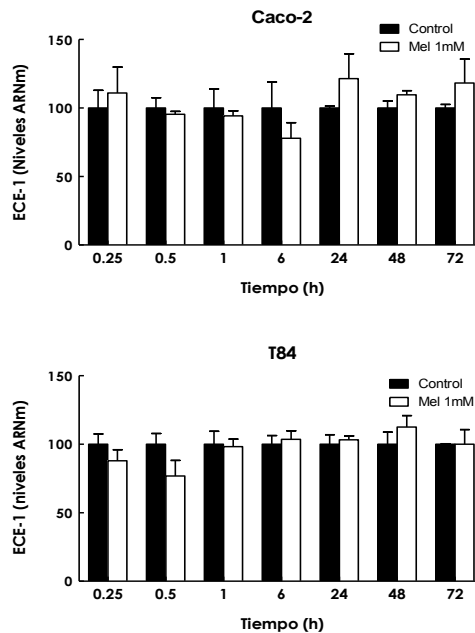


Figura 14. Efecto de la melatonina sobre la expresión del ARNm en células Caco-2 y en T84. Las barras verticales representan la media de tres experimentos por duplicado \pm EEM.

No obstante, la melatonina inhibe la expresión de la proteína ECE-1 en las dos líneas celulares de una forma tiempo-dependiente a la concentración de 1 mM (Figura 15A). En el caso de la línea Caco-2, la inhibición de la expresión de la proteína puede verse a partir de las 24 horas de tratamiento, mientras que en el caso de la línea T84, la inhibición comienza a partir de las 6 horas (Figura 15A). El efecto de la melatonina sobre la expresión de ECE-1 es, además, dosis-dependiente (Figura 15B), siendo efectiva tal inhibición a partir de la concentración 0.25 mM de melatonina.

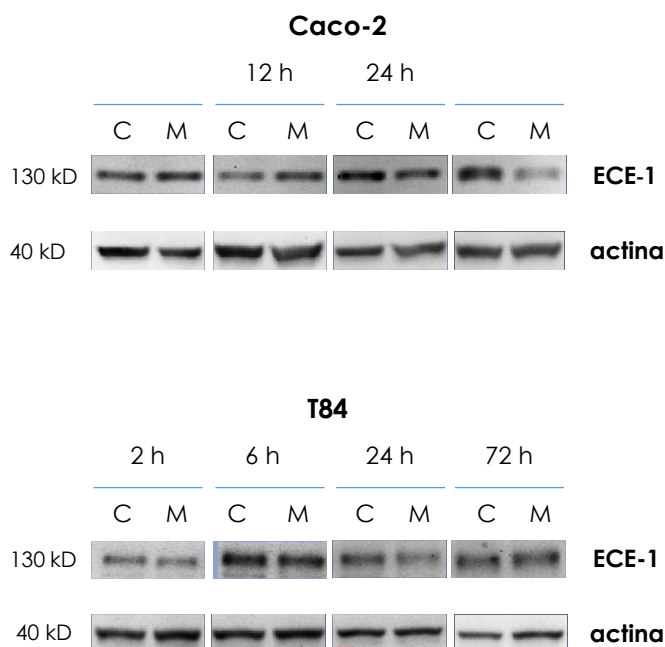


Figura 15A. Expresión de ECE-1 en Caco-2 y T84 a diferentes tiempos tras el tratamiento con melatonina 1 mM. C: control; M: melatonina 1 mM.

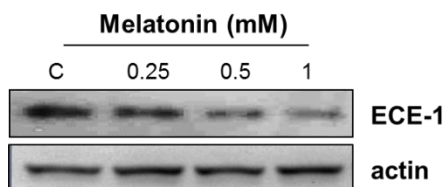


Figura 15B. Expresión de ECE-1 en Caco-2 a las 72h tras el tratamiento con diferentes dosis de melatonina

El tratamiento con melatonina también condujo a una inhibición tiempo-dependiente de los niveles de ET-1 en medio condicionado en las dos líneas celulares analizadas (Figura 16). La ET-1 presenta el mismo patrón de inhibición que el ARNm de *edn-1* en Caco-2 y T84, a pesar de que la melatonina inhibe la expresión de la proteína de ECE-1, lo que indica que el procesamiento de la big-ET-1 en nuestro modelo de estudio se debe a otra endopeptidasa diferente de ECE-1, lo que se discutirá más adelante.

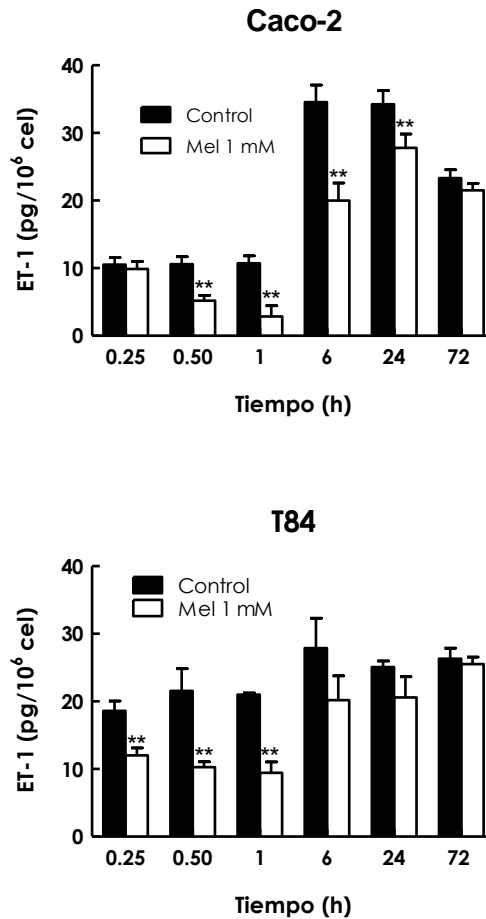


Figura 16. Los niveles de ET-1 se analizaron en medio condicionado tras el tratamiento con melatonina 1 mM durante diferentes tiempos. **P<0.001 vs control.

3. Mecanismo de inhibición del gen *edn1* por la melatonina

Debido a que los niveles de ET-1 en medio condicionado dependen de la expresión de *edn-1* tras el tratamiento con melatonina, hemos estudiado el mecanismo por el que la melatonina induce este efecto.

FoxO-1, NF- κ B y AP-1 son factores de transcripción implicados en la regulación de la expresión de *edn-1*, tal y como se ha detallado en la introducción, que se han visto regulados en diferentes modelos de cáncer y toxicidad por la melatonina (Liu S y cols., 2013; García-Santos G y cols., 2012; Koh PO 2012).

3.1. FoxO-1

Se han determinado los niveles de fosforilación de FoxO1 en lisados totales de ambas líneas celulares. El tratamiento con melatonina 1 mM aumentó significativamente la fosforilación de FoxO1 en la posición Ser256 de forma tiempo dependiente con un efecto máximo a los 60 minutos en Caco-2 y a los 15 minutos in T84 (Figura 17).

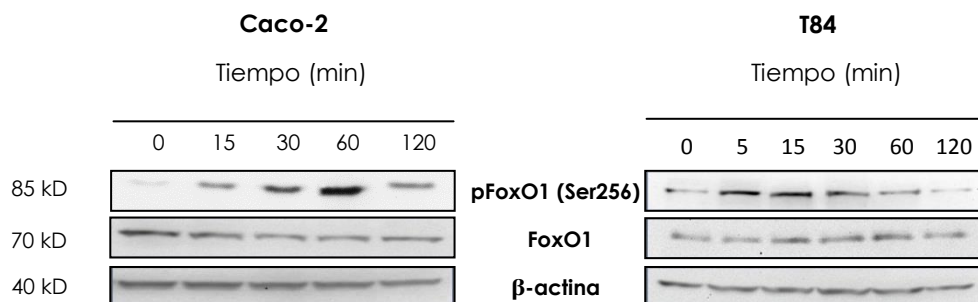


Figura 17. Imágenes de western blotting de FoxO1 y pFoxO1 (Ser256) en lisados celulares de Caco-2 y T84 tras el tratamiento con melatonina 1 mM a diferentes tiempos.

Uno de los mecanismos que regulan la función de FoxO1 implica su exclusión nuclear en respuesta a la fosforilación de los residuos Ser256, Ser319 y Thr24 por Akt, SGK o PKA (Accili y Arden, 2004; Park y cols., 1999; Lee y cols., 2011). Por ello, hemos analizado el efecto del tratamiento con melatonina sobre la localización subcelular de FoxO1 utilizando la técnica de inmunohistoquímica. El tratamiento de Caco-2 (Figura 18) y T84 (Figura 19) con melatonina 1 mM durante 60 o 15 minutos, respectivamente, aumenta significativamente la cantidad de FoxO1

fosforilado en el citoplasma de las células y provoca la exclusión nuclear de FoxO1 en las dos líneas celulares analizadas.

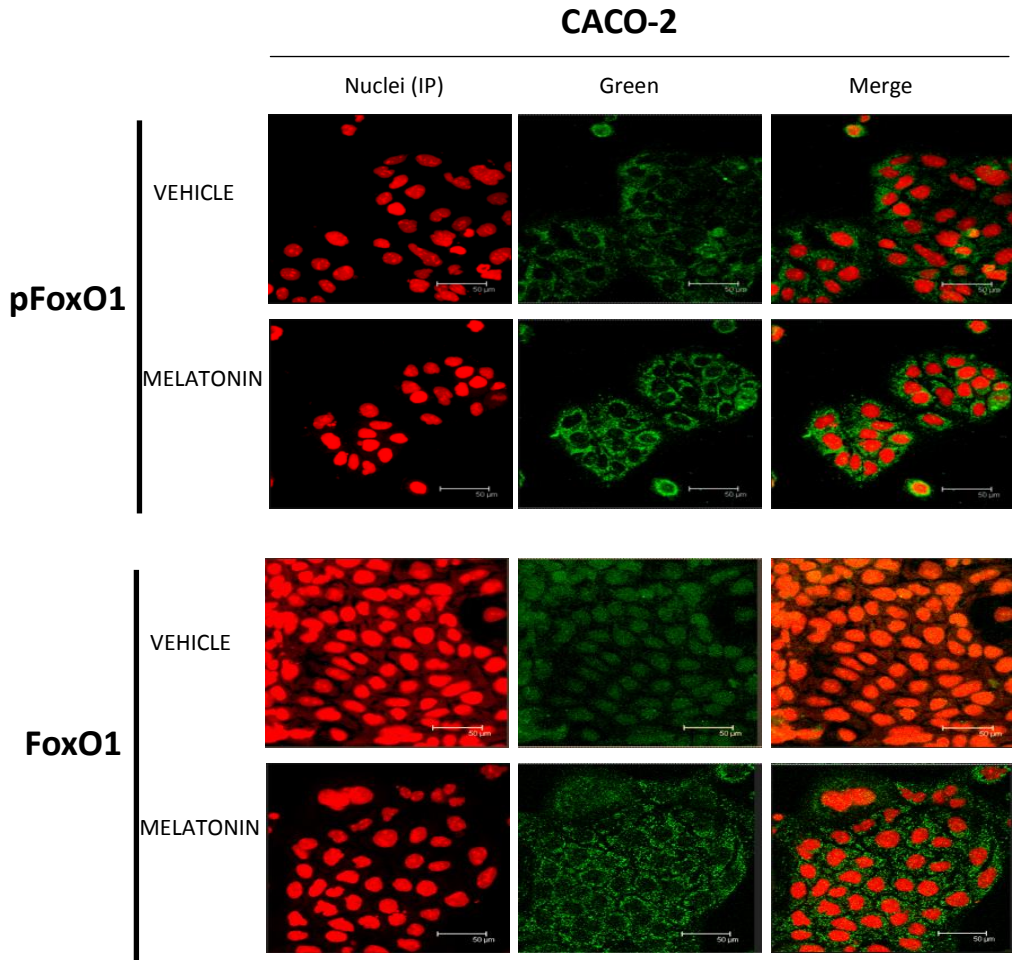


Figura 18. Las células Caco-2 se trataron con vehículo o melatonina 1 mM durante 60 minutos. Después las células se incubaron con un anticuerpo frente a fosfo-FoxO1 o frente a FoxO1, como se ha descrito en Materiales y Métodos.

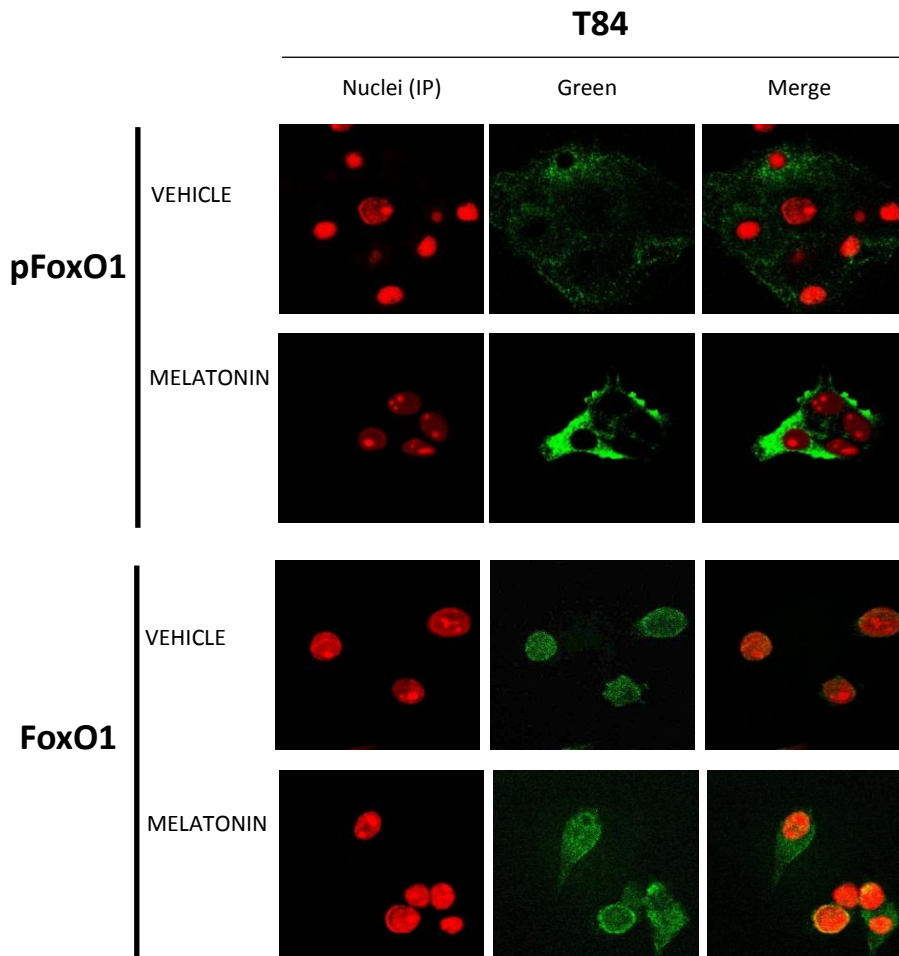


Figura 19. Las células T84 se trataron con vehículo o melatonina 1 mM durante 5 minutos. Después las células se incubaron con un anticuerpo frente a fosfo-FoxO1 o frente a FoxO1, como se ha descrito en Materiales y Métodos.

Para determinar las vías intracelulares implicadas en la fosforilación de FoxO1 por la melatonina, las células Caco-2 se trataron durante 1 hora con diferentes inhibidores químicos antes del tratamiento con melatonina 1 mM durante 60 minutos. Los inhibidores que se utilizaron fueron:

- Worthmanina (inhibidor de PI 3-quinasas/Akt) 100 nM.
- H89 (inhibidor de PKA) 25 μ M.
- SB203580 (inhibidor de p38 MAPK) 10 μ M.
- PD98059 (inhibidor de Erk) 25 μ M.
- PP2 (inhibidor de Src) 1 μ M.

Como se observa en la Figura 20, el pretratamiento con H89 o PP2 bloquea la fosforilación de FoxO1 por la melatonina. Por el contrario, el pretratamiento con PD98059, Worthmanina o SB203580, no afectó a la capacidad de la melatonina para estimular la fosforilación de FoxO1.

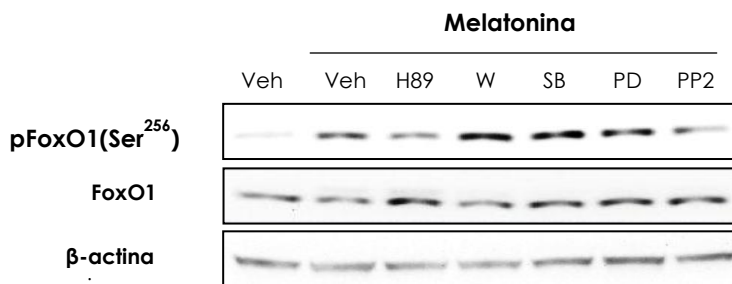


Figura 20. Western blotting de de FoxO1 y pFoxO1 (Ser256) de los lisados totales celulares de Caco-2

La exclusión nuclear de FoxO1 inducida por el tratamiento con melatonina 1 mM durante 60 minutos también puede ser bloqueada por el pretratamiento de las células Caco-2 con H89 o PP2 (Figura 21).

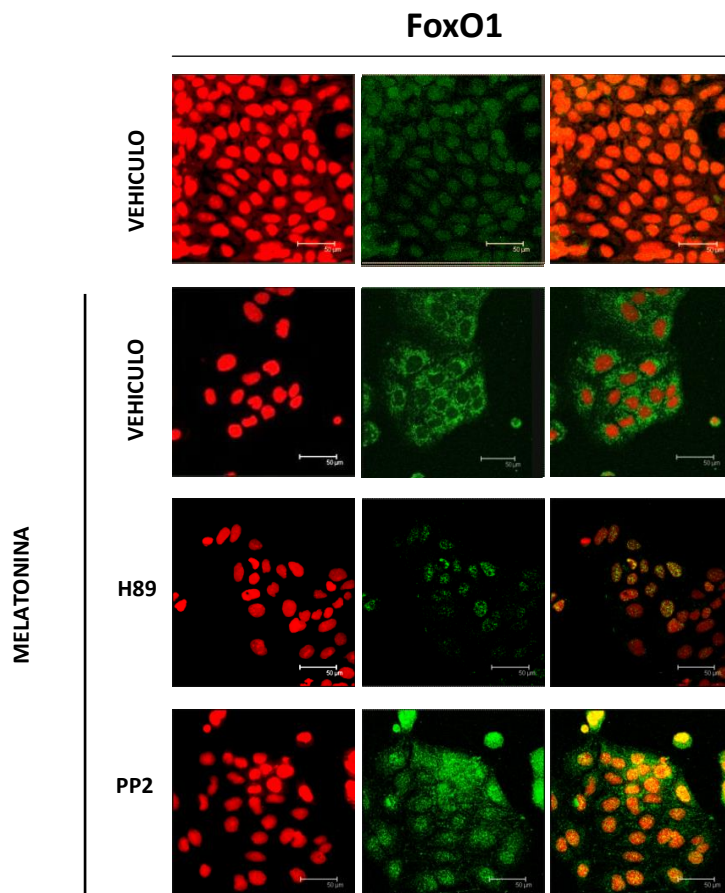


Figura 21. Las células Caco-2 se trataron con 1 mM de melatonina durante 60 minutos. Algunas células se trataron previamente durante 1 hora con H89 (25 μ M) o PP2 (1 μ M). Las células se incubaron frente a un anticuerpo anti- pFoxO1 o anti- FoxO1 como se describe en "Materiales y Métodos".

Debido a que el inhibidor H89 puede tener otras acciones no específicas, además de la inhibición de la PKA, se determinó la actividad de PKA en las fracciones citosólicas de Caco-2 y T84 tratadas con melatonina 1 mM durante diferentes tiempos. Mediante la técnica de ELISA y con un sustrato específico de PKA, se encontró que el tratamiento con melatonina induce un aumento tiempo-dependiente en la actividad de PKA basal (Figura 22A). Dado que el AMPc intracelular es un activador de la PKA, también se evaluó la capacidad de la melatonina para aumentar los niveles de AMPc (Figura 22B).

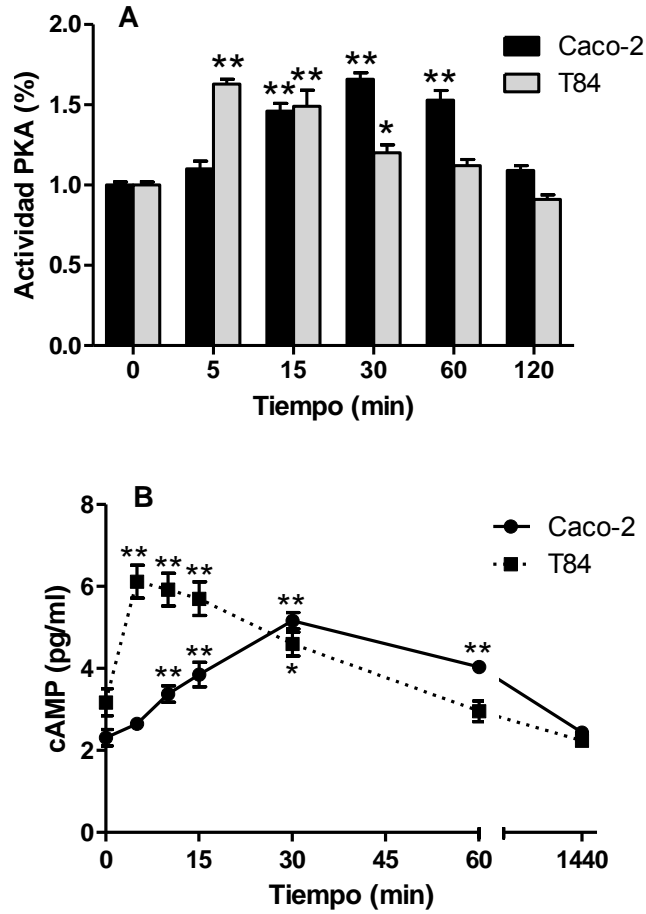


Figura 22. Niveles de PKA y actividad AMPc tras el tratamiento con melatonina en células Caco-2 y T84.

Cuando las células Caco2 y T84 se trataron con melatonina 1 mM, se observó un aumento de los niveles de AMPc intracelular de forma tiempo dependiente en ambas líneas celulares. El tratamiento con IBMX 0.5 mM se usó como control positivo (datos no mostrados) en el análisis de PKA y AMPc.

Todos los datos anteriores, sugieren que la melatonina estimula la activación de PKA en células de cáncer de colon a través de un mecanismo que probablemente implica un aumento de las concentraciones intracelulares de AMPc.

A pesar de que PP2 se utiliza como inhibidor de selectivo de la ruta Src, recientemente se ha demostrado que puede inhibir otras kinasas con una afinidad similar (Brandvold y cols., 2012). Para determinar si la vía Src está implicada en el mecanismo de fosforilación de FoxO1 por la melatonina, hemos medido, mediante western blotting, Src fosforilado tras el tratamiento. Efectivamente, se induce un aumento de la fosforilación de Src tiempo dependiente en ambas líneas celulares. El tiempo en el que se produce dicho aumento está relacionado con los tiempos en los que se produce un aumento de la fosforilación de FoxO1 en ambas líneas celulares (Figura 23).

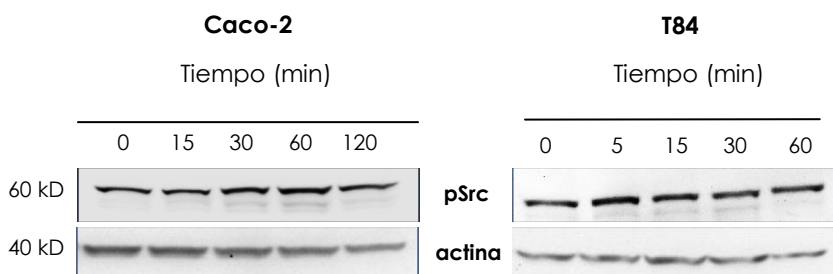


Figura 23. Expresión de pSrc tras el tratamiento con melatonina 1 mM en Caco-2 y T84.

Se ha descrito que pSrc puede actuar a través de AKT o ERK (Zang and Yu, 2012). En nuestro caso, ambas vías se inhiben tras el tratamiento con melatonina (Figura 24), lo que implica que pSrc podría actuar a través de una cascada diferente, como ya ha sido descrito (JBC 2000).

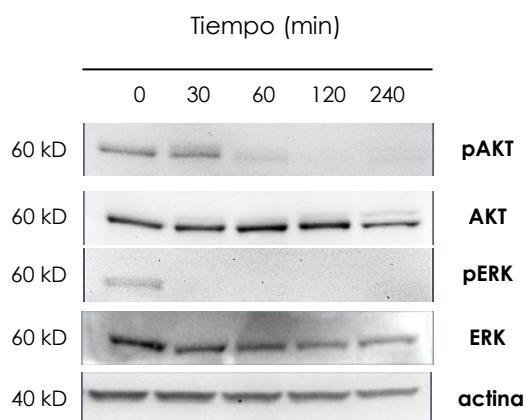


Figura 24. Imagen de Western blotting en Caco-2 de la expresión de AKT, Pakt, ERK y pERK tras el tratamiento con melatonina 1 mM en Caco-2.

Aunque la PKA puede fosforilar directamente a FoxO1 (Lee y cols., 2011), algunos autores han postulado que Src podría activarse directamente por la vía cAMP/PKA (Fredriksson y cols., 2000). De acuerdo con esto, hemos estudiado si la melatonina fosforila FoxO1 a través de la vía cAMP/PKA/Src incubando las células Caco-2 con melatonina y H89 al mismo tiempo. Analizando la expresión de pSrc en estas condiciones (Figura 25), se observa que el pretratamiento con H89 produce menor expresión de pSrc que el encontrado en células tratadas con melatonina sola. Por lo tanto, podemos concluir que la melatonina fosforila FoxO1 a través de la vía cAMP/PKA/pSrc.

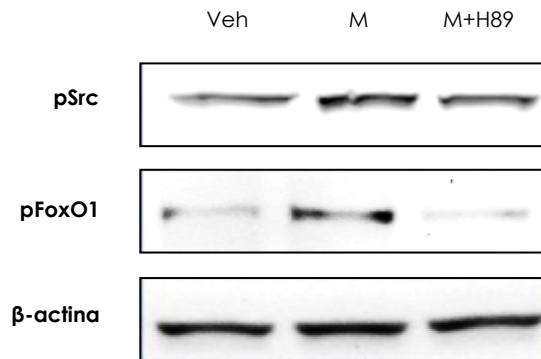


Figura 25. Western blotting de la expresión de pSrc, pFoxO y β -actina en células Caco-2 tratadas con melatonina 1 mM durante 60 minutos, con o sin pretratamiento durante otros 60 minutos con H89 5 μ M. Veh, vehículo.

3.2. NF-KB Y AP-1

Hemos estudiado la implicación de los factores de transcripción NF- κ B y AP-1 en el mecanismo de inhibición del gen *edn-1* por la melatonina, ya que se ha visto que están implicados en las acciones oncoestáticas y neuroprotectoras de la indolamina (Martín y cols., 2006; Luchetti y cols., 2010).

El tratamiento con melatonina 1 mM en células Caco2, produce una disminución de la expresión de NF- κ B (p65) fosforilado en la posición Ser256, de manera tiempo dependiente, siendo visible desde la media hora de tratamiento hasta las 24 horas. Sin embargo, la expresión de AP-1 (c-jun) fosforilado, en la posición Ser243, no se ve afectada (Figura 26).

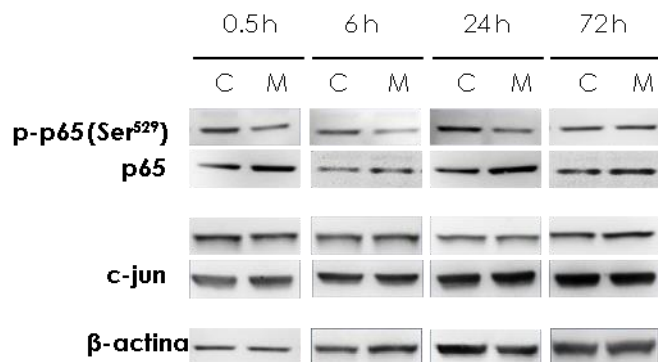


Figura 26. Western blotting que muestra los niveles de proteínas NF- κ B (p65), pNF- κ B (p65 en Ser 529), AP-1 (c-jun), pAP-1 (pc-jun en Ser243) y β -actina (house keeping), en células Caco-2. Las células se privaron de suero durante la noche y se trataron con 1mM de melatonina durante 72 horas.

Por técnicas de inmunofluorescencia, se ha estudiado también la distribución subcelular de NF- κ B y AP-1 tras el tratamiento con melatonina en nuestro modelo de estudio. La dosis de melatonina de 1 mM, durante 6 horas, induce un aumento de los niveles de NF- κ B a nivel citoplasmático, mientras que las concentraciones nucleares de NF- κ B fosforilado disminuyen (Figura 27). En el caso de Ap-1, no se produce ningún cambio en su distribución tras el tratamiento con melatonina a las 6 horas, ni tampoco en la distribución de la forma fosforilada en el residuo Ser243. Este mismo experimento se repitió a otros tiempos, en los que tampoco se observó ningún cambio, aunque los datos no aparecen mostrados.

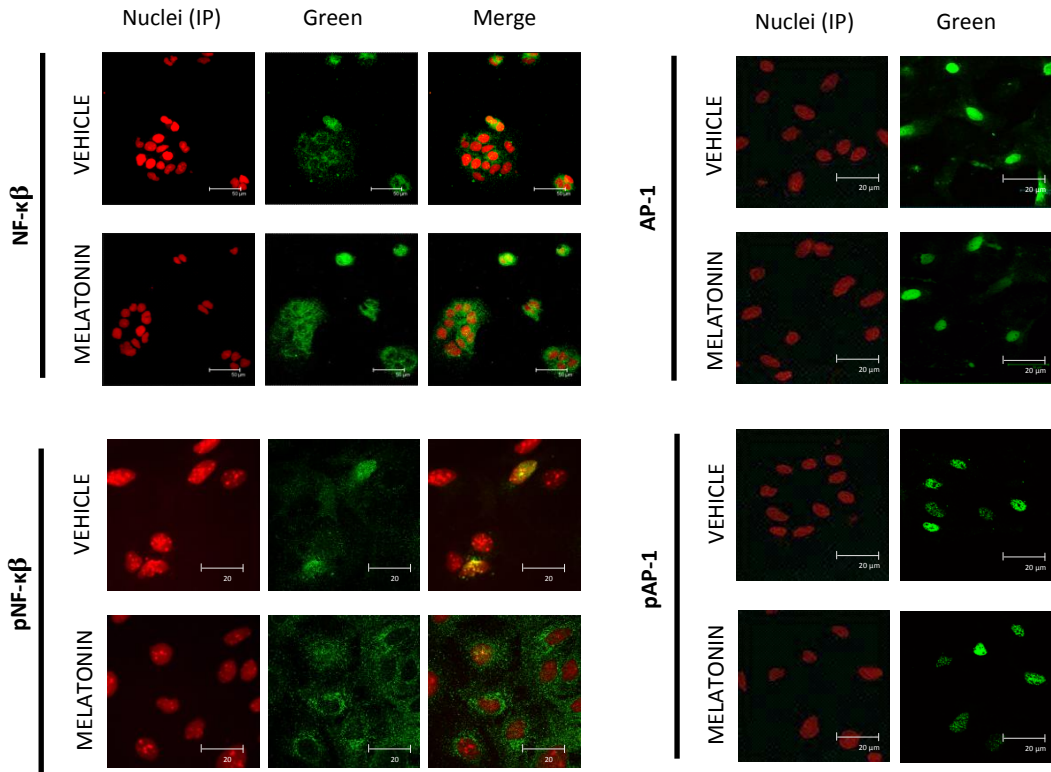


Figura 27. Células Caco-2, tratadas con melatonina 1mM durante 6 horas y tras inmunotinción con Ac anti NF-κβ (p65), pNF-κβ (p65 en Ser 529), AP-1 (c-jun), pAP-1 (pc-jun en Ser243) como se describe en "Materiales y Métodos"

Para comprender mejor el mecanismo implicado en la inactivación de NF-κβ por la melatonina, se estudiaron los niveles de ERK fosforilado y Akt, puesto que se ha descrito que la actividad de NF-κβ puede estar modulada por ambas quinasas en el cáncer colorrectal (Zhang y cols., 2011). El tratamiento con melatonina a concentraciones de 1 mM, inhibió tanto a la forma fosforilada de ERK como a la forma fosforilada de Akt, en el mismo momento en que la indolamina inhibe también la fosforilación de NF-κβ (Figura 28).

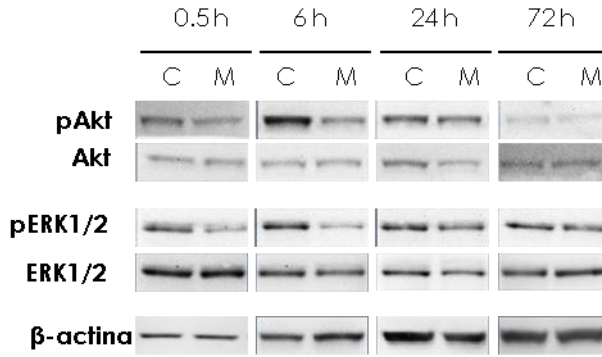


Figura 28. Western blotting que muestra los niveles de proteínas de Akt, pAkt, ERK1/2, pERK1/2 y β-actina (house keeping), en células Caco-2.

Estudios anteriores han descrito que la melatonina inhibe la fosforilación de ERK y Akt a través de la inhibición de la PKC (Martín y cols., 2007; Cui y cols., 2008). En nuestro caso, el tratamiento con melatonina 1mM inhibió la actividad de PKC (Figura 29), y tal inhibición mostró el mismo patrón que el encontrado para pNF-κβ, pERK y pAkt.

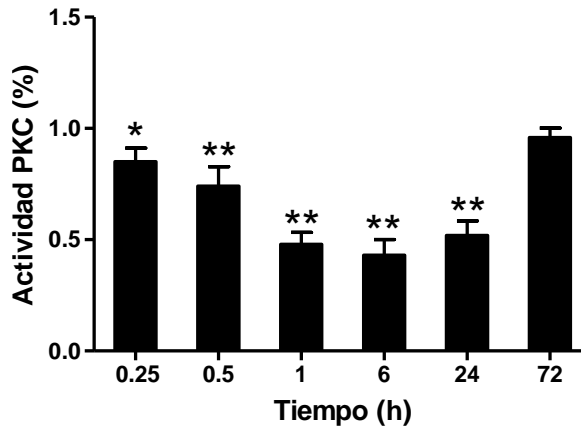


Figura 29. Para determinar la actividad de PKC se utilizó un kit de ensayo de quinasas no radioactivas frente a las fracciones citosólicas. Los resultados de la actividad de PKC se presentan como porcentaje basal (media±EEM de cuatro experimentos realizados por duplicado).

Al realizar una preincubación con 100 nM de TPA, obtuvimos una inhibición parcial de la melatonina sobre NF- κ B, ERK y Akt (Figura 30). Tras estos resultados, podemos concluir que la melatonina inhibe a NF- κ B a través de la activación de las vías PKC/Akt y PKC/ERK.

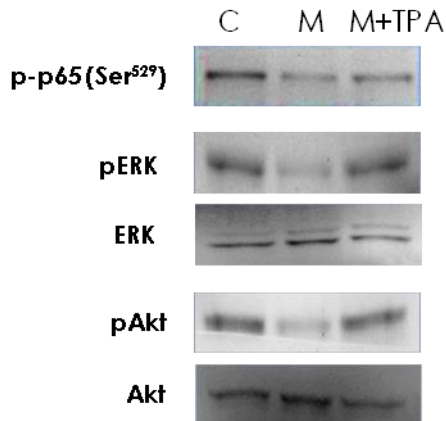


Figura 30. Western blotting que muestra los niveles de proteínas de pNF- κ B (p65 en Ser 529), Akt, pAkt, ERK1/2, pERK1/2 y β -actina (house keeping), en células Caco-2, tratadas con 1mM de melatonina durante 6 horas. Algunas células se trataron con 100 mM de TPA durante 1 hora previa al tratamiento con melatonina.

4. Promotor

Para determinar si la melatonina regula la actividad del promotor del *edn1* a través de FoxO1 y NF- κ B, se evaluó la activación de un indicador de luciferasa del promotor del *edn1* en células Caco2 transfectadas con plásmidos, que contienen las regiones mutadas o no mutadas de ambos factores de transcripción, tras el tratamiento con melatonina durante 6 horas (Figura 31).

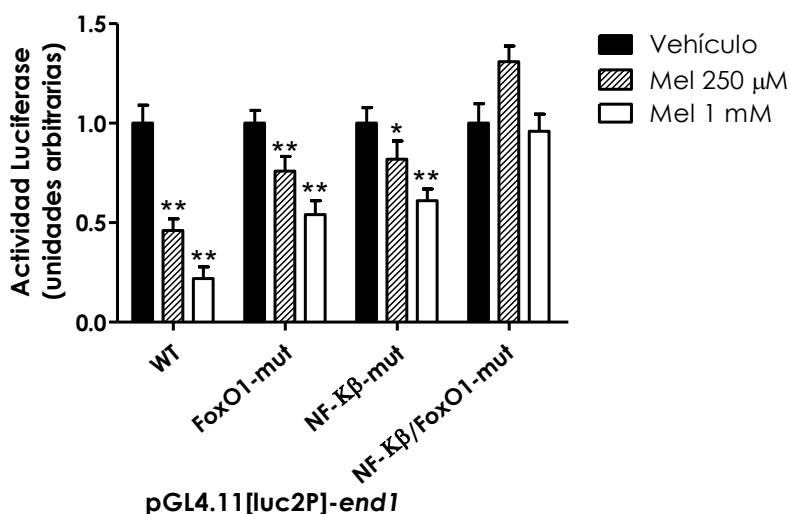


Figura 31. hET-1 promoter regulation by melatonin through FoxO1 and NF- κ B binding domains. Caco-2 cells were transfected with various hET-1-luciferase reporter constructs for either WT, mutant FoxO1 DNA binding domain (FoxO1-mut), mutant NF- κ B DNA binding domain (NF- κ B-mut) and both mutant FoxO1 DNA binding domain and NF- κ B DNA binding domain (FoxO1/NF- κ B-mut). Luciferase activity was measured as described in Materials and Methods. * P < 0.01 vs control, ** P < 0.001 vs control of 3 experiments performed in triplicate.

La capacidad de la melatonina para inhibir el promotor del *end1*, es mayor en células transfectadas con el tipo salvaje del promotor del *end1*. Las mutaciones en cualquiera de los sitios tanto de Foxo1 como de NF- κ B o de ambos, disminuyen la inhibición en la actividad del promotor del *edn1*, tras el tratamiento con melatonina a las dosis ensayadas. Por tanto, podemos decir que la inactivación de FoxO1 y NF- κ B, en respuesta al tratamiento con melatonina, regula negativamente la actividad del promotor del *edn1*.

5. Estudios en tumores procedentes de pacientes

Según resultados anteriores y como se ha descrito en la bibliografía reciente, los niveles de *edn1* y de ECE1 están elevados de forma significativa en el cáncer colorrectal en humanos (Egidy y cols., 2000; Kim y cols., 2005). Además, como se ha comentado en el apartado de Objetivos, la melatonina se sintetiza a altas concentraciones en el tejido de colon humano, lo que indica un posible papel de la indolamina en la inhibición del desarrollo del tumor (León y cols., 2012). Por tanto, para estudiar el significado fisiopatológico de la regulación del *edn1* por la melatonina en el CCR humano, se estudiaron una cohorte de 119 muestras de

pacientes con CCR, y se analizaron mediante RT-PCR para *edn1*, *ECE1*, *NAT* y expresión de *HIOMT*.

En todos los pacientes se registró una disminución en la expresión del ARNm de *NAT* ($p < 0,05$) y un aumento en la expresión de *edn1* ($p < 0,01$) (ARNm). No se encontraron diferencias en la expresión del ARNm de *HIOMT*, ni de *ECE1* (Figura 32).

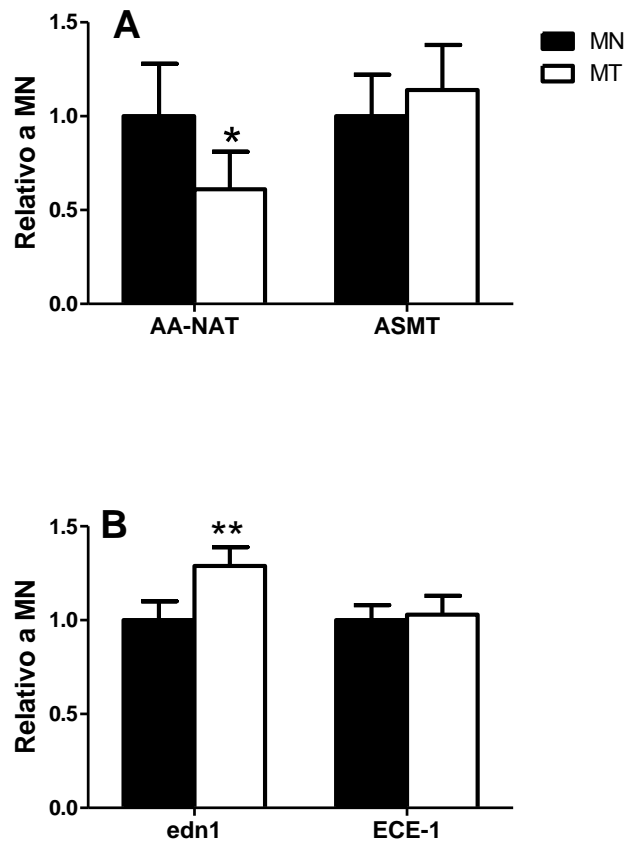


Figura 32. Cambio relativo en (A) *NAT* y *HIOMT*, y (B) niveles de expresión de ARNm de *edn1* y de *ECE1* en tejido de tumor colorectal y en mucosa normal (NM). * $P < 0,01$ vs NM, ** $P < 0,001$ vs NM.

Con respecto a la estadificación tumoral, la expresión de *NAT* disminuyó en las muestras tumorales, en comparación con mucosa normal, en los grados 3 y 4 ($p < 0,05$; Figura 21), mientras que la expresión del *edn1* aumentó en muestras tumorales de estadios avanzados (grado 3 y 4), también en comparación con mucosa normal ($p < 0,05$; Figura 33).

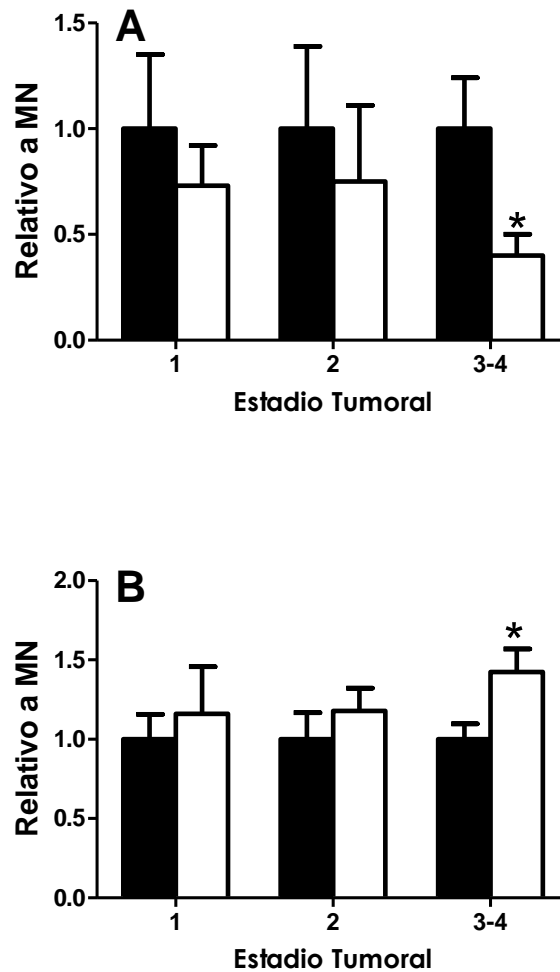


Figura 33. Cambio relativo en niveles de ARNm de (A) *end1* y (B) *NAT* en estadios 1, estadio 2 y estadio 3-4 de tejido de tumor colorrectal, en comparación con mucosa normal (NM), * $P < 0.01$ vs NM, ** $P < 0.001$.

De acuerdo con nuestras observaciones en cultivos celulares, la expresión de *end1* se correlaciona significativamente con la baja regulación de *NAT* ($p < 0.05$), mientras que con la expresión de *ECE1* no se encontró tal relación (Tabla 8).

Tabla 8. Relación entre la expresión de ARNm de NAT y expresión de ARNm de *edn1* y *ECE1* en tejido de tumor colorrectal en humanos

	NAT expression		P
	Negative N (%)	Positive N (%)	
End1 expression			0,039
Negative	20 (45,5)	24 (55,5)	
Positive	49 (65,3)	26 (34,7)	
ECE-1 expression			NS
Negative	36 (50)	36 (50)	
Positive	26 (55,3)	21 (44,7)	

DISCUSIÓN

Aunque la relación de la glándula pineal con el crecimiento y la extensión del cáncer se conoce desde hace más de 80 años, no fue hasta 1977 cuando se establecieron las bases científicas de esa relación (Mediavilla MD y cols., 2010). En 1978 se teorizó que el estado de hiperestrogenismo producido por la disminución de la función de la glándula pineal, con la (consiguiente disminución de la melatonina, podía participar en la carcinogénesis de la glándula mamaria (Cohen M y cols., 1978). Desde entonces numerosos estudios han sugerido la asociación de bajos niveles de melatonina con la progresión de varios cánceres (Mediavilla MD y cols., 2010; Jung B y cols., 2006; Mills E y cols., 2005). Los tumores en los que más se han estudiado los efectos de la melatonina son mama, próstata y colorrectal, aunque también hay estudios en cáncer de ovario, endometrio, linfomas y leucemia, pulmón, melanoma, sarcomas, hepato-carcinomas, carcinoma de piel, tumores neurales, cuello uterino y carcinomas laríngeos (Mediavilla y cols., 2010). La mayoría de estos estudios se han llevado a cabo *in vitro* (Mediavilla y cols., 2010), aunque también se han realizado ensayos clínicos en humanos (Wang y cols., 2012).

En este trabajo, se ha estudiado el efecto de la melatonina sobre el crecimiento del cáncer colorrectal *in vitro*. Para ello, hemos utilizado dos líneas celulares establecidas de cáncer colorrectal: Caco-2 y T-84. En la línea Caco-2, con concentraciones de melatonina inferiores a 0.5 mM, no se ha obtenido inhibición de crecimiento celular, pero con concentraciones de melatonina de 0.5 mM y 1 mM, obtenemos un porcentaje de inhibición de un 16.15% y de un 46.06% respectivamente, siendo ambos valores estadísticamente significativos. Con respecto al cultivo de las células T84, hemos obtenido resultados estadísticamente significativos con concentraciones de melatonina de 0.25 mM; así a esa concentración, el porcentaje de inhibición ha sido del 36.96, a concentraciones de 0.5 mM, el porcentaje ha sido del 63.89% y a concentraciones de 1mM, del 68.81%.

El efecto inhibitor de la melatonina sobre el crecimiento y las propiedades invasivas y metastásicas de las células tumorales en cultivos, principalmente de tumores endocrinos, se ha demostrado a concentraciones nanomolares (Hill SM y Blask DE 1998; Cos S y cols., 1998; Moretti M y cols., 2000). En células MCF-7 en cultivo de cáncer de mama, concentraciones de melatonina de 1nM y 10 pM, inhiben la proliferación celular entre un 60 a un 78%, así como los efectos estimulantes del estradiol sobre la proliferación celular (Hill y Blask, 1988). Otros estudios han demostrado que en células MCF-7 tratadas con concentraciones de melatonina de 1nM, se producía una disminución en la proliferación celular de las mismas, con un aumento en la expresión de p21 y p53, (Cos y cols., 2002; González A. y cols., 2008) debido a una disminución en la expresión y actividad de la enzima aromática, en condiciones basales y también

cuando la actividad de la aromasa es estimulada por AMPc (100 nM) o cortisol (100 nM) (Cos y cols., 2005). En cáncer de endometrio, se han realizado estudios en células Ishikawa (estrógeno positivas) tumorales humanas, que expresan el receptor de MT1, pero no el MT2, y con concentraciones de melatonina de 1 nM, atenúa la expresión de ERα y mejora los efectos antitumorales del paclitaxel (Watanabe y cols., 2008). Con respecto al cáncer de ovario, estudios en líneas celulares BG1 de adenocarcinoma de ovario tratadas con melatonina a concentraciones de 10 μM-1 nM, produce una atenuación en la proliferación celular en >20%, en ausencia de estrógenos, pero no inhibe a la enzima estradiol que induce la proliferación celular (Baldwin y cols., 1998). Otro estudio en líneas celulares HTOA y OVCAR-3 de cáncer de ovario humano, con dosis de melatonina de 1 pM - 1 μM, no tienen ningún efecto sobre cualquiera de los tipos celulares de cáncer de ovario, pero si se ha visto que mejora los efectos antiproliferativos del cis-diaminodicloroplatino (CDDP) (Futagami y cols., 2001).

Durante los últimos diez años, numerosas publicaciones han demostrado una reducción de la proliferación de células tumorales y una inducción de diferenciación tumoral tras el tratamiento con concentraciones de melatonina del orden de milimolar (Sainz y cols., 2005; Sainz TM y cols., 2003). En el caso concreto del cáncer colorrectal, un estudio realizado en células HT-29 en cultivo demuestra que la melatonina presenta una IC₅₀ de 1.5 mM (García Navarro y cols., 2007).

En nuestro estudio, el tratamiento con melatonina no resultó ser citotóxico y el porcentaje de células viables tras el tratamiento resultó ser similar a los controles. Otros autores han demostrado muerte celular por apoptosis de células tumorales de colon en cultivo, sin embargo las dosis utilizadas en estos casos fueron hasta cuatro veces superiores (González Puga y cols., 2005). El tratamiento con melatonina (sola o en combinación con otros fármacos) induce muerte celular por apoptosis en varios tipos de tumores, mientras que en otros el tratamiento con la indolamina a concentraciones del orden de milimolar únicamente induce inhibición del crecimiento celular (Wenzel y cols., 2005; Kim y cols., 2005; Joo y Yoo, 2009; Carbajo-Pescador y cols., 2009; Trubiani y cols., 2005; Casado-Zapico y cols., 2010; García Navarro y cols., 2007; Melen-Muha y cols., 1998; González A y cols., 2010; Bejarano y cols., 2009). Además, se ha comprobado que los agonistas de los receptores de membrana de melatonina tipo MT1 y MT2, inhiben la proliferación celular de forma más potente que la melatonina, mientras que el agonista de los receptores de membrana tipo MT3, lo hace con una potencia similar a la de la melatonina (García Navarro y cols., 2007).

En nuestro estudio, el tratamiento con melatonina 1 mM durante 72 horas induce acumulación en fase G₂/M y un descenso del número de células en fase S en las dos líneas celulares estudiadas. Otros estudios realizados en líneas celulares de cáncer de colon en cultivo han encontrado que el tratamiento con melatonina

induce un descenso del porcentaje de células en fase S y parada del ciclo celular en fase G1 (Hong Y y cols., 2014).

Los mecanismos que pueden estar implicados en la capacidad de la melatonina para inhibir el crecimiento tumoral son variados, entre los que se incluyen el efecto antioxidante (Martín y cols., 2006), la regulación en la expresión de receptores de estrógenos y andrógenos (Treck, 2006; Sainz RM y cols., 2004), la modulación en la actividad de la telomerasa (Martínez-Campa, 2008), la modulación del ciclo celular y la apoptosis (Martín, 2006), la inhibición de la angiogénesis ((Shi-Young Park y cols., 2010), la activación del sistema inmune (Lardone, 2009), y la regulación del ritmo circadiano (Greene, 2012). Existen también otros mecanismos, como la activación de genes supresores de tumores, que previene la transformación maligna celular (Santoro, 2012).

En el cáncer de colon se han descrito varios mecanismos por los cuales la melatonina inhibe el crecimiento tumoral, como la inhibición en la angiogénesis tumoral, la modulación en la mitosis y en los índices de apoptosis y el mantenimiento de los niveles de glutatión intracelular (Lissoni y cols., 2001), la modulación en los receptores de estrógenos, los efectos directos sobre el ciclo celular, la influencia sobre factores de crecimiento y la mejora en el nivel de antioxidantes (Wenzel y cols., 2005). Así, el estrés oxidativo presente en células HT-29 de cáncer de colon en cultivo, parece estar relacionado con su capacidad proliferativa; la melatonina y el CGP52608, aumentan el glutatión reducido y la actividad de los enzimas redox del glutatión, la glutatión peroxidasa y reductasa (García Navarro y cols., 2005). Otros estudios sugieren que son los receptores de melatonina unidos a la membrana nuclear, los responsables de la acción oncoestática de la melatonina (Winczyk y cols., 2009). Por otro lado, la activación de los linfocitos y de los monocitos/macrófagos por la melatonina, es otro de los mecanismos por los que la melatonina inhibe el crecimiento tumoral (Miller y cols., 2006). Y nosotros demostramos que un posible mecanismo de acción es la inhibición en la liberación de ET-1.

Los datos presentados en este trabajo demuestran que la melatonina inhibe transitoriamente la liberación de ET-1 de células de carcinoma colorrectal *in vitro*.

La ET-1 participa, principalmente a través de su receptor $ETRA$, en el crecimiento del cáncer colón, la angiogénesis y la metástasis (Asham y cols., 2001; Knowles y cols., 2012; Nie y cols., 2013), lo que sugiere que la inhibición del eje ET-1, puede mejorar el tratamiento del cáncer de colon (Rosano y cols., 2013). La ET-1 también se asocia con resistencia a la muerte por apoptosis, y el bloqueo del receptor de la endotelina potencia la apoptosis inducida por FasL en las células del carcinoma de colón, a través de la vía de protein Kinasa C (Eberl y cols., 2000).

En nuestro modelo *in vitro*, la melatonina inhibe el crecimiento celular y da lugar a parada del ciclo celular, pero no induce muerte celular, probablemente debido a que la indolamina induce una inhibición transitoria de la síntesis de ET-1. Recientemente se ha descubierto un efecto antitumoral sinérgico de la melatonina con varios fármacos quimioterapéuticos sobre células de cáncer de sarcoma de Ewing en humanos, a través de la potenciación de la vía extrínseca de la apoptosis por la melatonina (Casado-Zapico y cols., 2010). Estos efectos de la indolamina, podrían deberse en parte, a su capacidad para inhibir la síntesis de ET-1.

Los efectos de la melatonina sobre la expresión de *edn1* y *ECE-1*, y los niveles de ET-1, en medio condicionado tras el tratamiento con melatonina, no es un efecto que sólo se da en células Caco-2, sino también tiene lugar en células T-84. En nuestro estudio, el efecto de la melatonina sobre la inhibición de la viabilidad celular es mayor en células T-84, sin embargo, la disminución en la expresión del ARNm de *edn1* y *ECE-1*, es mayor en células Caco-2, lo que indica que otro u otros mecanismos deben estar implicados. El efecto antioxidante y antiinflamatorio de la melatonina, que contrarrestan el estado oxidativo, y la reducción en la producción de óxido nítrico, parecen estar involucrados directamente en las propiedades oncostáticas de la melatonina en el crecimiento celular en modelos de cáncer de colon en cultivo (García-Navarro y cols., 2007). Otros estudios muestran que la activación de la vía p53 en células tumorales, es un mediador fundamental en el efecto oncostático de la melatonina (Santoro y cols., 2012), y, curiosamente, las células T84 contienen el gen p53 salvaje, mientras que las células Caco-2 contienen el gen de p53 mutado.

La *ECE-1* es la endopeptidasa responsable del paso de bigET-1 a ET-1 (Turner y cols., 1988). Se han identificado cuatro isoformas de la *ECE-1* (denominadas *ECE-1a*, *ECE-1b*, *ECE-1c*, *ECE-1d*), cada una de las cuales posee un nivel de importancia diferente a la hora de la síntesis endógena de ET-1 (Kawanabe Y Nauli, 2011). El silenciamiento del gen *ECE-1* para generar ratones *ECE-1*^{-/-}, dio lugar a animales capaces de sintetizar ET-1. En animales heterocigotos *ECE-1*^{+/-}, no se producen cambios significativos en los niveles plasmáticos de ET-1, a pesar de que si se produce una inhibición del 27% de la actividad enzimática de *ECE-1* (Yanagisawa et al., 1998, 2000). Así, el hecho de que existan niveles de ET-1 después del silenciamiento del gen del enzima *ECE-1* se debe a que pueden existir otras proteasas responsables de la producción de ET-1 *in vivo* (Yanagisawa y cols., 1998). En modelos *in vitro* de cáncer también mostraron aumentos en los niveles de ET-1 después de ser tratadas con TGFβ-1, EGF e IL1-α, mientras que no se observó variación en los niveles de *ECE-1* (Granchi y cols., 2001). De acuerdo con esto, en nuestro estudio, los niveles de ET-1 en medio condicionado, cambiaron al mismo tiempo que los niveles en la expresión del *edn1* e independientemente de la expresión de la proteína de la *ECE-1*. Se ha propuesto una vía alternativa para la síntesis de ET-1 que implica una quinasa, una proteasa de serina presente en los

mastocitos de la pared de los vasos sanguíneos, que son capaces de generar péptidos intermedios de ET-1 (1-31), ET-2 (1-31) (Maguire y cols., 2001; Takai y cols., 1998), que a su vez transforma a los péptidos en maduros por un mecanismo aún no caracterizado. Sin embargo, hasta la fecha, no está claro si esta vía de síntesis de péptidos tiene importancia patológica (Ling y cols., 2013).

La regulación del *edn1* se encuentra principalmente a nivel de la transcripción, la cual es inducida por diferentes estímulos y regulada por diferentes factores de transcripción (Stow y cols., 2011). Así, la fosforilación de FoxO1 en determinadas regiones reguladoras, provocan la traslocación de FoxO1 desde el núcleo hacia el citosol celular, con el consecuente deterioro en su actividad de realizar la transcripción (Accili y Ardem, 2004). En el presente estudio, hemos demostrado que el tratamiento con melatonina de las células de cáncer de colon, provoca la fosforilación de la Src y aumenta la actividad de la PKA de manera tiempo dependiente, provocando la fosforilación de FoxO1 y su exclusión nuclear. El tratamiento con melatonina también produce una inactivación del factor de transcripción NF- κ B, a través de la inhibición de la actividad de la PKC y la desfosforilación de Akt y ERK. La expresión de un sitio de unión al DNA de FoxO1 mutado disminuye la transactivación del promotor de *edn1*. Además, las células transfectadas con plásmidos que albergan una secuencia mutante de NF- κ B en su dominio de unión al ADN, mostraron niveles similares de actividad de la luciferasa después del tratamiento con melatonina, lo que indica que ambos factores de transcripción son igualmente importantes para la inhibición inducida por la melatonina en la expresión del *edn1*. Por otro lado, la actividad de luciferasa fue menor en las células transfectadas con el ADN inactivo mutante de FoxO1 y NF- κ B. En definitiva, nuestros resultados sugieren que la melatonina regula negativamente la zona de promotor de ET-1 a través de la fosforilación de FoxO1 por un mecanismo de AMPc/PKA/Src y desfosforilación de NF- κ B por un mecanismo de PKC/Akt y PKC/ERK.

En el presente estudio mostramos que la enzima limitante en la expresión para la síntesis de melatonina, es decir, la expresión de NAT, disminuyó en los tumores colorrectales frente a mucosa normal de los pacientes analizados, mientras que la expresión de HIOMT no varió. Estudios previos, han puesto de manifiesto un contenido de melatonina similar en muestras tumorales y en la mucosa normal de pacientes con CRC, aunque sólo se analizaron 19 pacientes (Vician y cols., 1999). Fisiológicamente, la melatonina está presente en el colon a concentraciones muy altas. Se han detectado los sitios de unión de la melatonina en la mucosa/submucosa del colon, y mediante radioinmunoensayo, se ha visto que las concentraciones son 10 veces superior que en plasma (Poon y cols., 1996, Vician y cols., 1999). Estas altas concentraciones de melatonina podrían indicar un posible papel de la melatonina en la inhibición del desarrollo del CRC (León y cols., 2012). Esta observación podría ser compatible con el perfil de expresión del ARNm

del NAT, de la cohorte de pacientes analizados, lo que indica que la expresión de NAT se correlaciona con la expresión de *edn1* en tumores con estadios avanzados. Estos hallazgos complementan y amplían los estudios recientes en los que el gen de ET-1 ha sido identificada como un gen clave que activa la señalización celular y controla la migración, propagación e invasión celular (Asham et al., 2001; Knowles et al., 2012; Nie et al., 2013).

Se han detectado un aumento de los niveles de ECE-1, ET-1 y ETA en células de adenocarcinoma de colon y no en células no tumorales (Egidy y cols., 2000). *In vitro*, la ET-1, a través de su receptor ETA, actúa como un agente mitógeno en el cáncer colorrectal. Concretamente, la unión al receptor ETA por la ET-1, fue mayor en las células tumorales relacionadas con vasos sanguíneos y fibroblastos, y en menor medida, en las células cancerosas epiteliales. Por el contrario, el ETB, es el receptor predominante en células no tumorales, así la ET-1 puede favorecer a través de su receptor ETA, la neovascularización y el crecimiento tumoral. Esto puede ser la base para el empleo de antagonistas específicos del receptor ETA, como tratamiento adyuvante del cáncer colorrectal (Hoosein y cols., 2007).

Por otro lado, la ET-1 puede inhibir el crecimiento y la apoptosis de las células tumorales del cáncer de colon, mediante la inhibición en la señalización de la β -catenina, que produce una disminución en la expresión del gen de ET-1. Por ello, en el cáncer de colon humano, el gen de ET-1 se encuentra elevado (Kim y cols., 2005).

En el cáncer de colon, la ET-1 puede actuar como un factor de crecimiento autocrino/paracrino o un factor antiapoptótico. Eberl y cols., estudiaron células de cáncer de colon humano HT-29 y SW480, y demostraron que la unión de la ET-1 a los sitios de alta afinidad, inhibe la apoptosis inducida por FasL, mientras que la unión de la ET-1 a sitios de baja afinidad, promueve la apoptosis inducida por FasL (Eberl y cols., 2003).

Se conoce menos en papel de la ET-2 y la ET-3, pero recientemente Wang y cols., han demostrado en tumores de colon humano, que la expresión del ARNm de la ET-2 y ET-3, está disminuido en comparación con células normales. Concluyen que la inactivación epigenética de ET-2 y ET-3, ocurre con frecuencia en células del cáncer de colon humano, actuando entonces como antagonistas naturales de la ET-1 en el cáncer de colon (Wang y cols., 2012).

Con respecto a la interacción entre melatonina y endotelina, en el cáncer de colon, Killic y cols., han demostrado que la ejerce una importante inhibición en la síntesis de ET-1, de tal manera que inhibe a la ECE-1 (Killic y cols., año).

Con respecto a la interacción de la melatonina con determinados factores de transcripción, hoy sabemos que la melatonina puede actuar sobre el *envejecimiento celular*; este mecanismo de acción lo lleva a cabo a través de unas proteínas de la familia de las sirtuinas dasacetilasas, concretamente, las Sirtuin 1, que actúan como mediadores en la prolongación de la vida celular en determinados modelos. La inducción en estas proteínas también atenúa la muerte celular en determinados modelos animales de enfermedad de Alzheimer y de Huntington. La melatonina es capaz de aumentar los niveles de sirtuin 1 tanto en neuronas jóvenes como en aquellas de mayor edad. Además aumenta la desacetilación de varios sustratos de la sirtuin 1, tales como la p53, PGC1 α , FOXO-1, ADAM10 y NFK- β . Por lo tanto, la melatonina ejerce un papel protector de la célula a través de la sirtuin 1 (Tajes y cols., 2009a). Este efecto neuroprotector, también se ha estudiado en células granulares del cerebro, y se ha visto un aumento en la activación del Akt, una inhibición del GSK3 β y un aumento del p-FOXO1, que produce un efecto antiapoptótico en la célula (Tajes y cols., 2009b). Así, la melatonina a través de la vía de señalización de la Akt, no sólo ejerce efectos protectores en el *tejido cerebral*, también a nivel *hepático* tiene efecto protector. Así, en células de ratones adultos, sometidos a 1 hora de isquemia hepática y 3 horas de reperfusión, tras la administración de 10 mg/kg de melatonina antes de la isquemia y antes de la reperfusión, se produce un mantenimiento en la unión de p-Bad y 14-3-3 y de p-FOXO1 y de 14-3-3, lo que previene la muerte celular por apoptosis (Koh 2011).

Como sabemos, la melatonina tiene *efecto antiinflamatorio*; esta función la lleva a cabo a través de la inhibición de iNOS (isoforma inducible de la oxido nítrico sintasa). Así, la melatonina a concentración 1 μ M-1nM, producen una disminución en la producción de nitritos, nitratos y de iNOS. A concentraciones de 10 nM, la inhibición que produce es más leve. Esto se ha demostrado en macrófagos de modelo murino, llegando a la conclusión que el efecto de la melatonina antiinflamatorio, lo realiza a través de la inhibición de la activación del factor NFK- β , que su vez inhibe la transcripción de iNOS (Gliaud y cols., 1998).

Por otro lado, al administrar en humanos la melatonina como antioxidante, durante 6 semanas en el agua de bebida a concentraciones de 10 mg/100 ml, y compararlo con un grupo control, se observó una mejora de las cifras tensionales, al producirse una disminución en la filtración renal de linfocitos, macrófagos y angiotensina II, es decir, se produce una disminución de la inflamación renal intersticial, y este efecto se lleva a cabo a través de la disminución en la activación del NFK- β (Nava y cols., 2003).

El efecto antioxidante de la melatonina, también se ha estudiado en el *hígado*, concretamente en ratas. Así, en un modelo de ratas, se produce daño

hepático mediante la inyección de tioacetamida (dos inyecciones a intervalos de 24 horas); 24 horas antes de la primera inyección, se introduce melatonina a concentraciones de 3 mg/kg/día. Se comprobó que la melatonina inhibe la unión del factor NFκ-β, que produce una inhibición de la oxido nítrico sintasa, una disminución del estrés oxidativo y de la inflamación en el tejido hepático dañado (Bruck y cols., 2004). Por otro lado, Jung y cols., en tejido hepático de ratas, demostraron que la melatonina administrada a concentraciones de 50 mg/kg/día, (y tras la administración de dimetilnitrosamina que provoca lesión hepática), disminuye la infiltración de células inflamatorias mediante la inhibición del factor NFκ-β, que disminuye la expresión de mediadores inflamatorios (Jung y cols., 2009).

En el cerebro, la melatonina ejerce su acción antioxidante y neuroprotectora, administrada una hora después tras el traumatismo cerebral en ratas, y a concentraciones de 5 mg/kg (tiene efecto campana, no tiene esta acción neuroprotectora a concentraciones de 1 o de 10 mg/kg), y también a través de la inhibición de la activación del NFκ-β y del AP-1 (Beni y cols., 2004). También en células de la glía de ratón, la melatonina inhibe la activación del factor NFκ-β, por lo que se mejora la expresión de bcl-2 y también actuaría como neuroprotector (Jang y cols., 2005). Por otro lado, en células de glioma de roedores, la melatonina a concentraciones milimolares, reduce el crecimiento de esas células, a través de la inhibición en la fase S del ciclo celular (tras 72 horas de tratamiento con la indolamina); la administración intraperitoneal de 15 mg/kg de melatonina a ratas, previamente inyectadas con células C6 de glioma, reduce el crecimiento del tumor en un 50% dos semanas después del implante. Esta inhibición del crecimiento celular es llevada a cabo a través de la melatonina y su acción antioxidante, que realiza a través de la inactivación de la vía receptor tirosin quinasa-fosfoquinasa-Akt-NFκ-β (Martín y cols., 2006).

A nivel vascular, concretamente en células endoteliales de ratas, la melatonina a concentración micromolar (pero no en rango nanomolar), inhibe la producción de oxido nítrico, y este efecto no depende de receptores de melatonina, sino de la inhibición de la melatonina del factor NFκ-β (Tamura y cols., 2009).

En la actualidad, sabemos que el factor de transcripción NFκ-β modula la síntesis de melatonina en la glándula pineal en ratas; así durante la fase lumínica, el NFκ-β aumenta, y se produce una disminución del mismo en la oscuridad. Y debido a que la melatonina reduce la activación del NFκ-β en cultivos de glándula pineal, parece que esta indolamina regula a este factor de transcripción en la glándula pineal de ratas (Cecon y cols., 2010).

Además la melatonina tiene efecto protector en la neuropatía diabética. A dosis de 3 y 10 mg/kg, disminuye la expresión del NFκ-β y del estrés oxidativo por

el aumento en la expresión de Nrf2 (Negi y cols., 2011). Existe recientemente un estudio en células endoteliales de vena *umbilical en humanos*, que muestra que la melatonina como antioxidante y antiinflamatorio, ejerce un efecto protector en la vena umbilical, también a través de la inhibición en la activación del NFκ-β (Qin y cols., 2012).

En relación a patología tumoral, la melatonina en el *sarcoma de Ewing*, induce la muerte celular de células tumorales mediante la activación de la apoptosis; esta acción la realiza mediante el aumento en la expresión de Fas y su ligando Fas L, que produce, entre otras acciones, una inactivación del NFκ-β (García Santos y cols., 2012).

Otro factor de transcripción que interactúa con la melatonina en diferentes tejidos, es el AP-1. Ross y cols., que en la *pars tubularis* de ovinos, la melatonina inhibe la activación del AP-1 (Ross y cols., 1996). En células endoteliales humanas, la melatonina activa a la enzima gamma glutamilcisteína sintetasa (gamma-GCS), que es la enzima limitante de la glutatión sintasa. Esto lo realiza a dosis de 1 micromolar, a y través de la inhibición del AP-1. Esto sugiere que la activación de la melatonina de la gamma-GCS, protege a las células del estrés oxidativo y regula la proliferación de células (Urata y cols., 1999).

La melatonina también actúa en enfermedades como la endometriosis. Esta enfermedad está relacionada con metaloproteinasas de la matriz, concretamente con la MMP-3, de manera que un aumento significativo de la MMP-3, está relacionado con la severidad de la endometriosis. Se ha estudiado que la melatonina disminuye la actividad de la MMP-3, a través de la inhibición de la actividad del factor AP-1, y por tanto disminuye la apoptosis celular, lo que favorece la regresión a un epitelio normal (Paul y cols., 2010).

Las metaloproteinasas también están relacionadas con otros procesos, como la úlcera péptica. El estrés oxidativo, precede a la fase de inflamación crónica que aumenta la expresión de las MMP-9 y MMP-3; la melatonina, en ratones, inhibe la actividad de ambas enzimas, mediante la reducción de la actividad del AP-1, de manera que ejerce una protección en la formación de la úlcera (Ganguly y Swarnakar, 2012).

La melatonina ejerce un efecto protector contra la nefrotoxicidad ejercida por determinados antineoplásicos, como el cisplatino. Recientemente se ha realizado un estudio en ratas, sometidas a tratamiento con melatonina (4mg/kg durante 10 días) y cisplatino (7 mg/kg), y se observó que los niveles de AP-1, p65 y NFκ-β, aumentan en los riñones de las ratas tratadas con cisplatino, y que la melatonina mejora la nefrotoxicidad modulando la vía Nrf2/HO-1 (kilic y cols., 2013).

En definitiva parece que la melatonina ejerce su efecto protector a nivel celular, gracias a sus propiedades antiinflamatorias y antioxidantes, y mediante la modulación de determinados factores de transcripción como el NF κ - β , AP-1 y Nrf2 (Luchetti y cols., 2010). Con respecto a las vías de inhibición de fosforilación del NF κ - β , actualmente se sabe que puede actuar a través de vías Kinasas dependientes; así en células de glioma C6, disminuyen el crecimiento celular por medio de la activación del RTK (receptor tirosin kinasa), que activa a la fosfoquinasa C (PKC), que activa a la proteína AKT, que produce finalmente, la activación del NF κ - β (Martín y cols., 2006); también en tejido hepático la melatonina produce la fosforilación de de FOXO-1, a través de la fosforilación de AKT, y esto produce, evitando así la muerte celular por apoptosis (Koh y cols., 2011). También, en cultivos de células neuronales, se ha comprobado, que la melatonina ejerce su efecto protector, mediante la fosforilación de la kinasa AKT, que produce un aumento de la forma p-FOXO1 (Tajes Orduña y cols., 2009).

CONCLUSIONES

- 1.** La melatonina inhibe el crecimiento e induce parada de ciclo en las células de cáncer de colon *in vitro*, aunque no induce muerte en las mismas.
- 2.** La melatonina inhibe la expresión del gen *end1*, lo que induce a su vez la inhibición de la producción de ET-1. Este parece ser, al menos en parte, el mecanismo por el que inhibe el crecimiento de las líneas tumorales de cáncer de colon en cultivo.
- 3.** La melatonina también induce inhibición de la expresión del Mrna y de la proteína de ECE-1, aunque en este modelo parece no ser la responsable de la síntesis final de ET-1.
- 4.** La melatonina inhibe la expresión del gen *end1* mediante un mecanismo que implica la inactivación de los factores de transcripción FoxO1 y NF- κ B a través de vías diferentes. En el caso de FoxO1 se produce su inactivación por fosforilación debido a la activación de la vía AMPc/PKA/Src. En el caso de NF- κ B, su inactivación se produce por inhibición de la vía PKC/Akt y PKC/ERK, lo que impide su fosforilación.
- 5.** La melatonina podría utilizarse como tratamiento en el cáncer de colon y en otros tipos de tumores en los que se sobre-exprese la ET-1.
- 6.** En el cáncer de colon se produce un descenso de la expresión de NAT, que se asocia con un aumento de la expresión de *edn1*.

BIBLIOGRAFÍA

Abe K, Robison GA, Liddle GW, Butcher RW, Nicholson WE, Baird CE. Role of cyclic AMP in mediating the effects of MSH, norepinephrine, and melatonin on frog skin color. *Endocrinology* 1969; 85 (4): 674–682.

Accili D, Arden KC. FoxOs at the crossroads of cellular metabolism, differentiation, and transformation. *Cell*. 2004; 117(4):421–6.

Acuña-Castroviejo D, Escames G, Macías M, Muñoz Hoyos A, Molina Carballo A, Arauzo M, Montes R. Cell protective role of melatonin in the brain. *J Pineal Res* 1995; 19 (2):57–63.

Aharinejad S, Krenn K, Paulus P, Schafer R, Zuckermann A, Grimm M, Abraham D. Differential role of TGF- β 1/bFGF and ET-1 in graft fibrosis in heart failure patients. *Am. J. Transplant.* 2005; 5 (9): 2185–2192.

Ahmad R, Haldar C. Melatonin and androgen receptor expression interplay modulates cell mediated immunity in tropical rodent *Funambulus pennanti*: An in-vivo and in-vitro study. *Scand J Immunol* 2010; 71:420–430.

Aitsebaomo J, Wennerberg K, Der CJ, Zhang C, Kedar V, Moser M, Kingsley-Kallesen ML, Zeng GQ, Patterson C. p68RacGAP is a novel GTPase-activating protein that interacts with vascular endothelial zinc finger-1 and modulates endothelial cell capillary formation. *J. Biol. Chem.* 2004; 279 (17): 17963–17972.

Ali H, Loizidou M, Dashwood M, Savage F, Sheard C, Taylor I. Stimulation of colorectal cancer cell line growth by ET-1 and its inhibition by ET(A) antagonists. *Gut*. 2000; 47(5):685–8.

Ali R, Toh HC, Chia WK. The utility of Aspirin in Dukes C and High Risk Dukes B Colorectal cancer - The ASCOLT study: Study Protocol for a randomized controlled trial. *Trials*. 2011; 12(1):261.

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

Álvarez K, Hurtado C, Hevia Ma, Wielandt Am, De La Fuente M, Church J, Carvallo P, López-Köstner F. Spectrum of MLH1 and MSH2 mutations in Chilean families with suspected Lynch syndrome. *Dis Colon Rectum* 2010; 53 (4): 450–459.

Arendt J: Melatonin and human rhythms. *Chronobiol Int.* 2006; 23 (1-2): 21–37.

Asham E, Shankar A, Loizidou M, Fredericks S, Miller K, Boulos PB, Burnstock G, Taylor I. Increased endothelin-1 in colorectal cancer and reduction of tumour growth by ET(A) receptor antagonism. *Br. J. Cancer* 2001; 85 (11):1759–1763.

Aune D, Chan DS, Lau R, Vieira R, Greenwood DC, Kampman E, Norat T. Dietary fibre, whole grains, and risk of colorectal cancer: systematic review and dose-response meta-analysis of prospective studies *BMJ*. 2011; 10; 343:d6617.

Axerold, J. Purifications and properties of phenylethanolamine-N-metyl transferase. *J Biol Chem*. 1962; 237:1657-1660.

Bagnato A, Catt KJ. Endothelin as autocrine regulators of tumor cell growth. *Trends Endocr. Metab*. 1998; 9 (9): 378–383.

Bagnato A, Salani D, Di Castro V, Wu-Wong JR, Tecce R, Nicotra MR, Venuti A, Natali PG: Expression of endothelin 1 and endothelin A receptor in ovarian carcinoma: evidence for an autocrine role in tumor growth. *Cancer Res*. 1999, 59 (3): 720-727.

Bagnato A, Natali PG. Endothelin receptors as novel targets in tumor therapy. *J Transl Med*. 2004; 2(1): 16.

Bagnato A, Spinella F, Rosan`o L. Emerging role of the endothelin axis in ovarian tumor progression. *Endocr Relat Cancer* 2005; 12 (4): 761–772.

Bagnato A, Spinella F, Rosan`o L. Emerging role of the endothelin axis in ovarian tumor progression. *Endocr Relat Cancer* 2005; 12 (4): 761–772.

Bagnato A, Rosano, L. The endothelin axis in cancer. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology IJBCB*. 2008; 40 (8): 1443–1451.

Baldwin WS, Travlos GS, Risinger JI, Barrett JC. Melatonin does not inhibit estradiol-stimulated proliferation in MCF-7 and BG-1 cells. *Carcinogenesis* 1998; 19; 1895-1900.

Baltazares Lipp M, Rodríguez Crespo H, Ortega Martínez J, Sotres-Vega A, Baltazares Lipp MA. Sistema Endotelina. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex*. 2005; 18 (4): 308-320.

Bartsch C, Bartsch H. Melatonin in cancer patients and in tumor-bearing animals. *Adv Exp Med Biol*. 1999; 467: 247–264.

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

Bejarano I, Redondo PC, Espino J, Rosado JA, Paredes SD, Barriga C, Reiter RJ, Pariente JA, Rodríguez AB. Melatonin induces mitochondrial- mediated apoptosis in human myeloid HL-60 cells. *J. Pineal Res*. 2009; 46 (4): 392- 400.

Belaid E, Joyeux-Faure M, Ribuot C, Launois SH, Levy P, Godin-Ribuot D. Major role for hypoxia inducible factor-1 and the endothelin system in promoting myocardial infarction and hypertension in an animal model of obstructive sleep apnea. *J. Am. Coll. Cardiol*. 2009; 53 (15): 1309–1317.

Beni SM, Kohen R, Reiter RJ, Tan DX, Shohami E. Melatonin-induced neuroprotection after closed head injury is associated with increased brain antioxidants and attenuated late-phase activation of NF-kappaB and AP-1. *FASEB J*. 2004; 18(1):149-51.

Bhalla A, Haque S, Taylor I, Winslet M, Loizidou M. Endothelin receptor antagonism and cancer. *Eur J Clin Invest* 2009; 39 (2):74-77.

Bitsch F, Aichholz R, Kallen J, Geisse S, Fournier B, Schlaeppi JM. Identification of natural ligands of retinoic acid receptor-related orphan receptor alpha ligand-binding domain expressed in Sf9 cells – a mass spectrometry approach. *Anal Biochem*. 2003; 323 (1): 139–149.

Blask DE, Hill SM. Effects of melatonin on cancer: studies on MCF-7 human breast cancer cells in culture. *J Neural Transm Suppl*. 1986; 21: 433–449.

Blask DE, Brainard GC, Dauchy RT, Hanifin JP, Davidson LK, Krause JA, Sauer LA, Rivera-Bermudez MA, Dubocovich ML, Jasser SA, Lynch DT, Rollag MD, Zalatan F. Melatonin-depleted blood from premenopausal women exposed to light at night stimulates growth of human breast cancer xenografts in nude rats. *Cancer Research*. 2005; 65 (23): 11174–11184.

Block KI, Koch AC, Mead MN, Tothy PK, Newman RA, Gyllenhaal C. Impact of antioxidant supplementation on chemotherapeutic toxicity: a systematic review of the evidence from randomized controlled trials. *Int. J. Cancer* 2008; 123: 1227-1239.

Bo Boesen EI, Sasser JM, Saleh MA, Potter WA, Woods M, Warner TD, Pollock JS, Pollock D. Interleukin-1 β , but not interleukin-6, enhances renal and systemic endothelin production *in vivo*. *Am. J. Physiol. Renal Physiol*. 2008; 295 (2): F446–F453.

Bonin EA, Baron TH. Update on the indications and use of colonic stents. *Curr Gastroenterol Rep.* 2010; 12(5):374-382.

Boutin JA, Audinot V, Ferry G, Delagrance P. Molecular tools to study melatonin pathways and actions. *Trends Pharmacol Sci.* 2005; 26 (8): 412–419.

Brozek W, Kriwanek S, Bonner E, Peterlik M, Cross HS. Mutual associations between malignancy, age, gender, and subsite incidence of colorectal cancer. *Anticancer Res.* 2009; 29: 3721–3726.

Brydon L, Roka F, Petit L, de Coppet P, Tissot M, Barrett P, Morgan PJ, Nanoff C, Strosberg AD, Jockers R. Dual signaling of human Mel1a melatonin receptors via G(i2), G(i3), and G(q/11) proteins. *Mol Endocrinol.* 1999; 13 (12): 2025–2038.

Bruck R, Aeed H, Avni Y, Shirin H, Matas Z, Shahmurov M, Avinoach I, Zozulya G, Weizman N, Hochman A. Melatonin inhibits nuclear factor kappa B activation and oxidative stress and protects against thioacetamide induced liver damage in rats. *J Hepatol.* 2004; 40(1):86-93.

Bubenik GA, Pang SF, Cockshut JR, Smith PS, Grovum LW, Friendship RM, et al. Circadian variations of potent arterial and venous blood levels of melatonin in pigs and its relationship to food intake and sleep. *J Pineal Res.* 2000; 28: 9–15.

Bubenik GA. Thirty four years since the discovery of gastrointestinal melatonin. *J Physiol Pharmacol.* 2008; 59: 33–51.

Burn J, Gerdes AM, Macrae F, Mecklin JP, Moeslein G, Olschwang S, et al. Long-term effect of aspirin on cancer risk in carriers of hereditary colorectal cancer: an analysis from the CAPP2 randomised controlled trial. *Lancet.* 2011; 17; 378(9809): 2081-7.

Callaghan BD. The long-term effect of pinealectomy on the crypts of the rat gastrointestinal tract. *J Pineal Res* 1995; 18: 191-196.

Campbell-Thompson M, Lynch IJ, Bhardwaj B. Expression of estrogen receptor (ER) subtypes and ERbeta isoforms in colon cancer. *Cancer Res.* 2001; 61 (2):632–640.

Capsoni S, Viswanathan M, De Oliveira AM, Saavedra JM. Characterization of melatonin receptors and signal transduction system in rat arteries forming the circle of Willis. *Endocrinology* 1994; 135 (1): 373–378.

Carbajo-Pescador S, Martín-Renedo J, García-Palomo A, Tuñón MJ, Mauriz JL, González-Gallego J. Changes in the expression of melatonin receptors induced by

melatonin treatment in hepatocarcinoma HepG2 cells. *J Pineal Res.* 2009; 47(4): 330-338.

Carlberg C, Hooff van Huijsduijnen R, Staple JK, DeLamarter JF, Becker-Andre M. RZR_s, a new family of retinoid-related orphan receptors that function as both monomers and homodimers. *Mol Endocrinol.* 1994; 8 (6): 757–770.

Carpentieri A, Díaz de Barboza G, Areco V, Peralta López M, Tolosa de Talamoni N. New perspectives in melatonin uses. *Pharmacol Res.* 2012; 65(4):437-44.

Carrillo-Vico A, Calvo J.R, Abreu P, Lardone P.J, Garcia-Maurino S, Reiter R.J, Guerrero J.M. Evidence of melatonin synthesis by human lymphocytes and its physiological significance: possible role as intracrine, autocrine, and/or paracrine substance. *FASEB J.* 2004; 18 (3): 537-539.

Carrillo-Vico A, Guerrero JM, Lardone PJ, Reiter RJ. A review of the multiple actions of melatonin on the immune system. *Endocrine* 2005; 27 (2): 189–200.

Casado-Zapico S, Rodriguez-Blanco J, García-Santos G, Martín V, Sánchez-Sánchez AM, Antolín I, Rodríguez C. Synergistic antitumor effect of melatonin with several chemotherapeutic drugs on human Ewing sarcoma cancer cells: potentiation of the extrinsic apoptotic pathway. *J. Pineal Res.* 2010; 48 (1): 72-80.

Castagnetta L, Traina A, Campisi I, Calabro M, Maratta A, Saetta A, Agostara B, Mezzatesta N. Androgen receptor status in nontumoral and malignant human colorectal tissues. *Ann N Y Acad Sci.* 2002; 963: 322–325.

Castanares C, Redondo-Horcajo M, Magan-Marchal N, ten Dijke P, Lamas S, Rodríguez-Pascual F. Signaling by ALK5 mediates TGF-beta-induced ET-1 expression in endothelial cells: a role for migration and proliferation. *J. Cell Sci.* 2007; 120 (Pt 7): 1256–1266.

Castro MG, Rodríguez-Pascual F, Magan-Marchal N, Reguero JR, Alonso-Montes C, Moris C, Alvarez V, Lamas S, Coto E. Screening of the endothelin1 gene (EDN1) in a cohort of patients with essential left ventricular hypertrophy. *Ann. Hum. Genet.* 2007; 71 (Pt 5): 601–610.

Cecon E, Fernandes PA, Pinato L, Ferreira ZS, Markus RP. Daily variation of constitutively activated nuclear factor kappa B (NFkB) in rat pineal gland. *Chronobiol Int.* 2010; 27(1):52-67.

Celinski K, Konturek SJ, Konturek PC, Brzozowski T, Cichoż-Lach H, Slomka M, Malgorzata P, Bielanski W, Reiter RJ. Melatonin or L-tryptophan accelerates healing

of gastroduodenal ulcers in patients treated with omeprazole. *J Pineal Res.* 2011; 50 (4): 389–394.

Cernacek P, Stewart DJ, Monge JC, Rouleau JL. The endothelin system and its role in acute myocardial infarction. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 2003; 81 (6): 598–606.

Chao HH, Hong HJ, Liu JC, Lin JW, Chen YL, Chiu WT, Wu CH, Shyu KG, Cheng TH. Leptin stimulates endothelin-1 expression via extracellular signal-regulated kinase by epidermal growth factor receptor transactivation in rat aortic smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol.* 2007; 573 (1-3): 49–54.

Charron F, Tsimiklis G, Arcand M, Robitaille L, Liang Q, Molkenin J D, Meloche S, Nemer M. Tissue specific GATA factors are transcriptional effectors of the small GTPase RhoA. *Genes Dev.* 2001; 15 (20): 2702–2719.

Chen CQ, Fichna J, Bashashati M, Li YY, Storr M. Distribution, function and physiological role of melatonin in the lower gut. *World J Gastroenterol.* 2011; 17(34): 3888-3898.

Chen S, Feng B, George B, Chakrabarti R, Chen M, Chakrabarti S. Transcriptional co-activator p300 regulates glucose induced gene expression in the endothelial cells. *Am. J. Physiol. Endocrinol Metab.* 2010; 298 (1): E127–E137.

Chiao JW, Moonga BS, Yang YM, Kancharla R, Mittelman A, Wu-Wong JR, Ahmed T. Endothelin-1 from prostate cancer cells is enhanced by bone contact which blocks osteoclastic bone resorption. *Br J Cancer* 2000; 83 (3): 360–365.

Cho E, Smith-Warner SA, Spiegelman D, Beeson WL, van den Brandt PA, Colditz GA, Folsom AR, Fraser GE, Freudenheim JL, Giovannucci E, Goldbohm RA, Graham S, Miller AB, Pietinen P, Potter JD, Rohan TE, Terry P, Toniolo P, Virtanen MJ, Willett WC, Wolk A, Wu K, Yaun SS, Zeleniuch-Jacquotte A, Hunter DJ. Dairy foods, calcium, and colorectal cancer: a pooled analysis of 10 cohort studies. *J Natl Cancer Inst.* 2004; 96 (22):1015-1022.

Cho S, Joh TH, Bails HH, Dibinis C, Volpe BT. Melatonin administration protects CA1 hippocampal neurons after transient forebrain ischemia in rats. *Brain Res.* 1997; 755(2): 335–33.

Cohen M, Lippman M, Chabner B. Role of pineal gland in a etiology and treatment of breast cancer. *Lancet* 1978; 14: 814-816.

Clemens JW, Jarzynka MJ, Witt-Enderby PA. Down-regulation of mt1 melatonin receptors in rat ovary following estrogen exposure. *Life Sci.* 2001; 69: 27-35.

Cohen JJ. Programmed cell death in the immune system. *Adv Immunol.* 1991; 50: 55–85.

Cole BF, Logan RF, Halabi S, Benamouzig R, Sandler RS, Grainge MJ, Chaussade S, Baron JA. Aspirin for the chemoprevention of colorectal adenomas: meta-analysis of the randomized trials. *J Natl Cancer Inst.* 2009; 101(4):256-66.

Cos S, Blask DE, Lemus-Wilson A, Hill AB. Effects of melatonin on the cell cycle kinetics and "estrogen-rescue" of MCF-7 human breast cancer cells in culture. *J. Pineal Res.* 1991; 10 (1): 36-42.

Cos S, Verduga R, Fernández-Viadero C, Megías M, Crespo D. Effects of melatonin on the proliferation and differentiation of human neuroblastoma cells in culture. *Neurosci. Lett.* 1996; 216 (2): 113-116.

Cos S, Fernández R, Güézmés A, Sánchez-Barceló EJ. Influence of melatonin on invasive and metastatic properties of MCF-7 human breast cancer cells. *Cancer Res.* 1998; 58 (19): 4383–4390.

Cos S, Mediavilla MD, Fernández R, González-Lamuño D, Sánchez-Barceló EJ. Does melatonin induce apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells *in vitro*? *J Pineal Res.*, 2002; 32(2): 90-96.

Cos S, Martínez-Campa C, Mediavilla MD, Sánchez-Barceló EJ. Melatonin modulates aromatase activity in MCF-7 human breast cancer cells. *J Pineal Res.* 2005; 38(2): 136-142.

Cos S, González A, Güézmés A, Mediavilla MD, Martínez-Campa C, Alonso-González C, Sánchez-Barceló EJ. Melatonin inhibits the growth of DMBA-induced mammary tumors by decreasing the local biosynthesis of estrogens through the modulation of aromatase activity. *Int J Cancer* 2006; 118 (2):274–278.

Crespo D, Fernandez-Viadero R, Verduga R, Ovejero V, Cos S. Interaction between melatonin and estradiol on morphological and morphometric features of MCF-7 human breast cancer cells. *J. Pineal Res.* 1994; 16 (4): 215-222.

Cui P, Yu M, Luo Z, Dai M, Han J, Xiu R, Yang Z. Intracellular signaling pathways involved in cell growth inhibition of human umbilical vein endothelial cells by melatonin. *J Pineal Res.* 2008; 44(1):107-14

Cucina A, Proietti S, D'Anselmi F, Coluccia P, Dinicola S, Frati L, Bizzarri M. Evidence for a biphasic apoptotic pathway induced by melatonin in MCF-7 breast cancer cells. *J. Pineal Res.* 2009; 46 (2): 172-80.

Dai J, Ram PT, Yuan L, Spriggs LL, Hill SM. Transcriptional repression of RORalpha activity in human breast cancer cells by melatonin. *Mol Cell Endocrinol.* 2001; 176 (1-2): 111–120.

Dalio MB, Haikel Júnior LF, Dalio RB, Pinto AP, Silva JC, Vespúcio MV, Guimarães MA, Garcia SB. A study of the effects of pinealectomy on intestinal cell proliferation in infant newborn rats. *Acta Cir Bras* 2006; 21: 16-20.

DeAngelis LM. Brain tumors. *N Engl J Med.* 2001; 344 (2): 114–23.

Del Río B, García Pedrero JM, Martínez-Campa C, Zuazua P, Lazo PS, Ramos S. Melatonin, an endogenous-specific inhibitor of estrogen receptor alpha via calmodulin. *J. Biol. Chem.* 2004; 279 (37): 38294-38302.

Denkert C, Kobel M, Pest S, Koch I, Berger S, Schwabe M, Siegert A, Reles A, Klosterhalfen B, Hauptmann S: Expression of cyclooxygenase- 2 is an independent prognostic factor in human ovarian carcinoma. *Am J Pathol.* 2002; 160 (3): 893-903.

Dickson J, Gowher H, Strogantsev R, Gaszner M, Hair A, Felsenfeld G, West AG. VEZF1 elements mediate protection from DNA methylation. *PLoS Genet.* 2010; 6 (1): e1000804.

Doi T, Sakoda T, Akagami T, Naka T, Mori Y, Tsujino T, Masuyama T, Ohyanagi M. Aldosterone induces interleukin-18 through endothelin-1, angiotensin II, Rho/ Rho-kinase, and PPARs in cardiomyocytes. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2008; 295 (3): H1279–H1287.

Dorfman D M, Wilson DB, Bruns GA, Orkin SH. Human transcription factor GATA-2. Evidence for regulation of preproendothelin-1 gene expression in endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 1992; 267 (2): 1279–1285.

Douglas ML, Richardson MM, Nicol DL. Endothelin axis expression is markedly different in the two main subtypes of renal cell carcinoma. *Cancer* 2004; 100 (10): 2118–2124.

Dreher D, Junod AF. Role of oxygen free radicals in cancer development. *Eur J Cancer* 1996, 32A (1): 30-38.

Dubocovich ML. Melatonin receptors: are there multiple subtypes? *Trends Pharmacol Sci.* 1995; 16 (2): 50–56.

Dubocovich ML, Rivera-Bermudez MA, Gerdin MJ, Masana MI. Molecular pharmacology, regulation and function of mammalian melatonin receptors. *Front Biosci.* 2003; 8: d1093–d1108.

Dubocovich ML, Markowska M. Functional MT1 and MT2 melatonin receptors in mammals. *Endocrine* 2005a; 27 (2): 101–110.

Dubocovich ML, Hudson RL, Sumaya IC, Masana MI, Manna E. Effect of MT1 melatonin receptor deletion on melatonin-mediated phase shift of circadian rhythms in the C57BL/6 mouse. *J. Pineal Res.* 2005b; 39 (2): 113–12.

Dubocovich ML, Delagrangre P, Krause DN, Sugden D, Cardinali DP, Olcese J. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXV. Nomenclature, classification, and pharmacology of G protein-coupled melatonin receptors. *Pharmacol Rev.* 2010; 62 (3): 343–380.

Dupuis J, Jasmin JF, Prie S, Cernacek P. Importance of local production of endothelin-1 and of the ET(B) receptor in the regulation of pulmonary vascular tone. *Pulm Pharmacol Ther.* 2000; 13 (3): 135-140.

Eberl LP, Egidy G, Pinet F, Juillerat-Jeanneret L. Endothelin receptor blockade potentiates FasL-induced apoptosis in colon carcinoma cells via the protein kinase C pathway. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2000; 36 (suppl 1): 354–356.

Eberl L, Bovey R, Juillerat-Jeanneret. Endothelin-receptor antagonists are proapoptotic and antiproliferative in human colon cancer cells. *Br J Cancer* 2003; 88 (5):788-95.

Eck KM, Yuan L, Duffy L, Ram PT, Ayettey S, Chen I, Cohn CS, Reed JC, Hill SM. A sequential treatment regimen with melatonin and *all-trans* retinoic acid induces apoptosis in MCF-7 tumour cells. *Br J Cancer* 1998; 77 (12): 2129–2137.

Edwards BK, Ward E, Kohler BA, Ehemann C, Zauber AG, Anderson RN, Jemal A, Schymura MJ, Lansdorf-Vogelaar I, Seeff LC, van Ballegooijen M, Goede SL, Ries LA. 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* 2010; 116 (3): 544-573.

Egeberg R, Olsen A, Loft S, Christensen J, Johnsen NF, Overvad K, Tjønneland A. Intake of wholegrain products and risk of colorectal cancers in the Diet, Cancer and Health cohort study. *Br J Cancer* 2010; 103 (5):730-734.

Egidy G, Juillerat-Jeanneret L, Jeannin JF, Korth P, Bosman FT, Pinet F. Modulation of human colon tumor-stromal interactions by the endothelin system. *Am J Pathol* 2000; 157: 1863-74.

Emori T, Hirata Y, Ohta K, Kanno K, Eguchi S, Imai T, Shichiri M, Marumo F. Cellular mechanism of endothelin-1 release by angiotensin and vasopressin. *Hypertension* 1991; 18:165-170.

Ergul A. Endothelin-1 and endothelin receptor antagonists as potential cardiovascular therapeutic agents. *Pharmacotherapy* 2002; 22 (1): 54-65.

Escames G, León J, Macías M, Khaldy H, Acuña-Castroviejo D. Melatonin counteracts lipopolysaccharide-induced expression and activity of mitochondrial NO synthase in rats. *FASEB J.* 2003; 17 (8): 932-934.

Fagan KA, McMurtry IF, Rodman DM. Role of endothelin- 1 in lung disease. *Respir Res.* 2001; 2 (2): 90-101.

Farriol M, Venereo Y, Orta X, Castellanos JM, Segovia-Silvestre T. *In vitro* effects of melatonin on cell proliferation in a colon adenocarcinoma line. *J Appl Toxicol.* 2000; 20 (1): 21-24.

Fearnhead NS, Wilding JL, Bodmer WF. Genetics of colorectal cancer: hereditary aspects and overview of colorectal tumorigenesis. *Br Med Bull.* 2002; 64: 27-43.

Fearon ER, Vogelstein B: A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell.* 1990; 61 (5): 759-767.

Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer* 2010; 127 (12): 2893-917.

Fernandez E, La Vecchia C, Balducci A, Chatenoud L, Franceschi S, Negri E. Oral contraceptives and colorectal cancer risk: a meta-analysis. *Br J Cancer* 2001; 84 (5):722-7.

Ferrero E, Labalde M, Fernández N, Monge L, Salcedo A, Narvaez-Sanchez R, Hidalgo M, Dieguez G, García-Villalon AL. Response to Endothelin-1 in Arteries from Human Colorectal Tumours: Role of Endothelin Receptors. *Exp Biol Med.* (Maywood). 2008; 233 (12):1602-1607.

Ferry G, Hecht S, Berger S, Moulharat N, Coge F, Guillaumet G, Leclerc V, Yous S, Delagrangre P, Boutin JA. Old and new inhibitors of quinine reductase 2. *Chem Biol Interact.* 2010; 186 (2): 103-109.

Fischer TW, Zmijewski MA, Zbytek B, Sweatman TW, Slominski RM, Wortsman J, Slominski A. Oncostatic effects of the indole melatonin and expression of its cytosolic and nuclear receptors in cultured human melanoma cell lines. *Int J Oncol.* 2006; 29(3): 665-672.

Forrest CM, Mackay GM, Stoy N, Stone TW, Darlington LG. Inflammatory status and kynurenine metabolism in rheumatoid arthritis treated with melatonin. *Br J Clin Pharmacol.* 2007; 64 (4): 517-526.

Fournier I, Ploye F, Cottet-Emard JM, Brun J, Claustrat B: Folate deficiency alters melatonin secretion in rats. *J Nutr.* 2002; 132 (9): 2781-2784.

Fourtillan JB, Brisson AM, Gobin P, Ingrand I, Decourt JP, Girault J. Bioavailability of melatonin in humans after day-time administration of D(7) melatonin. *Biopharm Drug Dispos.* 2000; 21 (1):15-22.

Fukunaga M, Fujiwara Y, Ochi S, Yokoyama K, Fujibayashi M, Orita Y, Fukuhara Y, Ueda N, Kamada T. Stimulatory effect of thrombin on endothelin-1 production in isolated glomeruli and cultured mesangial cells of rats. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1991; 17 (suppl 7): 411-413.

Futagami M, Sato S, Sakamoto T, Yokoyama, Y, Saito Y. Effects of melatonin on the proliferation and cisdiaminedichloroplatinum (CDDP) sensitivity of cultured human ovarian cancer cells. *Gynecol Oncol.* 2001; 82: 544-549.

Galie N, Manes A, Branzi A. The endothelin system in pulmonary arterial hypertension. *Cardiovasc Res.* 2004; 61 (2): 227-237.

Ganguly K, Swarnakar S. Chronic gastric ulceration causes matrix metalloproteinases-9 and -3 augmentation: alleviation by melatonin. *Biochimie.* 2012; 94(12):2687-98.

García-Navarro A, González-Puga C, Escames G, López LC, López A, López-Cantarero M, Camacho E, Espinosa A, Gallo MA, Acuña-Castroviejo D. Cellular mechanisms involved in the melatonin inhibition of HT-29 human colon cancer cell proliferation in cultura. *J. Pineal Res* 2007; 43 (2):195-205.

García-Santos G, Martín V, Rodríguez-Blanco J, Herrera F, Casado-Zapico S, Sánchez-Sánchez AM, Antolín I, Rodríguez C. Fas/Fas ligand regulation mediates cell death in human Ewing's sarcoma cells treated with melatonin. *Br J Cancer.* 2012; 106(7):1288-96.

Glenn DJ, Rahmutula D, Nishimoto M, Liang F, Gardner DG. Atrial natriuretic peptide suppresses endothelin gene expression and proliferation in cardiac fibroblasts through a GATA4-dependent mechanism. *Cardiovasc. Res.* 2009; 84 (2): 209–217.

Gilad E, Wong HR, Zingarelli B, Virág L, O'Connor M, Salzman AL, Szabó C. Melatonin inhibits expression of the inducible isoform of nitric oxide synthase in murine macrophages: role of inhibition of NFkappaB activation. *FASEB J.* 1998; 12(9):685-93.

Gonçalves AR, Ferreira C, Marques A, Carrilho Ribeiro L, Velosa J. Assessment of quality in screening colonoscopy for colorectal cancer. *Clinical and Experimental Gastroenterology* 2011; 4: 277–281.

Gonzalez A, Cos S, Martinez-Campa C, Alonso-Gonzalez C, Sanchez-Mateos S, Mediavilla MD, Sanchez-Barcelo EJ. Selective estrogen enzyme modulator actions of melatonin in human breast cancer cells. *J Pineal Res.* 2008; 45(1): 86-92.

González A, Martínez-Campa C, Mediavilla MD, Alonso-González V, Alvarez-García V, Sanchez-Barceló EJ, Cos S. Inhibitory effects of melatonin on sulfatase and 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase activity and expression in glioma cells. *Oncol Rep.* 2010; 23:1173-1178.

González A, Alvarez-García V, Martínez-Campa C, Alonso-González C, Cos S. Melatonin promotes differentiation of 3T3-L1 fibroblasts. *J Pineal Res.* 2011; 52 (1):12–20.

González-Puga C, García-Navarro A, Escames G, León J, López-Cantarero M, Ros E, Acuña-Castroviejo D.. Selective CCK-A but not CCK-B receptor antagonists inhibit HT-29 cell proliferation: synergism with pharmacological levels of melatonin. *J. Pineal Res.* 2005; 39 (3):243–250.

Granchi S, Brocchi S, Bonaccorsi L, Baldi E, Vinci MC, Forti G, Serio M, Maggi M. Endothelin-1 production by prostate cancer cell lines is up-regulated by factors involved in cancer progression and down-regulated by androgens. *Prostate.* 2001; 49(4):267-77

Grant K, Knowles J, Dawas K, Taylor I, Burnstock G, Loizidou M. Mitogenic mechanisms of endothelin-1 in colorectal cancer cells. *Br. J. Surg.* 2007; 94 (1):106–112.

Greene MW. Circadian rhythms and tumor growth. *Cancer Letters* 2012; 318 (2): 115–123.

Grodstein F, Newcomb PA, Stampfer MJ. Postmenopausal hormone therapy and the risk of colorectal cancer: a review and meta-analysis. *Am J Med.* 1999; 106 (5): 574-82.

Gumz ML, Popp MP, Wingo CS, Cain BD. Early transcriptional effects of aldosterone in a mouse inner medullary collecting duct cell line. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 2003; 285 (4): F664–F673.

Gupta RA, Tejada LV, Tong BJ, Das SK, Morrow JD, Dey SK, Dubois RN: Cyclooxygenase-1 is overexpressed and promotes angiogenic growth factor production in ovarian cancer. *Cancer Res.* 2003; 63 (5): 906-911.

Guerrero JM, Garcia-Maurino S, Pozo D. Mechanisms involved in the immunomodulatory effects of melatonin on the human immune system, in Bartsch C, Bartsch H, Blask D, editors. *The pineal gland and cancer.* Springer-Verlag: Heidelberg, Germany; 2001. p. 408-16.

Guerrero JM, Reiter RJ. Melatonin-immune system relationships. *Curr Topics Med Chem.* 2002; 2 (2): 167–180.

Haynes WG, Ferro CE, Webb DJ. Physiologic role of endothelin in maintenance of vascular tone in humans. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1995; 26 (Suppl 3): 183-185.

Herrera M, Garvin JL. A high-salt diet stimulates thick ascending limb eNOS expression by raising medullary osmolality and increasing release of endothelin-1. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 2005; 288 (1): F58–F64.

Hill S, Blask DE. Effects of the pineal hormone melatonin on the proliferation and morphological characteristics of human breast cancer cells (MCF-7) in culture. *Cancer Res.* 1998; 48 (21): 6121–6126.

Hill SM, Frasch T, Xiang S, Yuan L, Duplessis T, Mao L. Molecular mechanisms of melatonin anticancer effects. *Integr. Cancer Ther.* 2009; 8 (4): 337-346

Hill SM, Blask DE, Xiang S, Yuan L, Mao L, Dauchy RT, Dauchy EM, Frasch T, Duplessis T. Melatonin and associated signaling pathways that control normal breast epithelium and breast cancer. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia.* 2011; 16 (3): 235–245.

Howard PG, Plumpton C, Davenport AP. Anatomical localization and pharmacological activity of mature endothelins and their precursors in human vascular tissue. *J Hypertens.* 1992; 10 (11): 1379-1386.

Hrushesky WJ, Grutsch J, Wood P, Yang X, Oh EY, Ansell C, Kidder S, Ferrans C, Quiton DF, Reynolds J, Du-Quiton J, Levin R, Lis C, Braun D. Circadian clock manipulation for cancer prevention and control and the relief of cancer symptoms. *Integr Cancer Ther* 2009; 8: 387-397.

Inoue A, Yanagisawa M, Kimura S, Kasuya Y, Miyachi T, Goto K, Masaki T. The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1989a; 86 (8): 2864-2867.

Inoue A, Yanagisawa M, Takawa Y, Mitsui Y, Kobayashi M, Masaki T. The human preproendothelin-1 gene. Complete nucleotide sequence and regulation of expression. *J. Biol. Chem*. 1989b; 264 (25): 14954-14959.

Internacional Agency for Research on Cancer (IARC), 2010. Available at: <http://www-dep.iarc.fr/>.

Ivey ME, Osman N, Little PJ. Endothelin-1 signalling in vascular smooth muscle: pathways controlling cellular functions associated with atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2008; 199 (2): 237-247.

Jang MH, Jung SB, Lee MH, Kim CJ, Oh YT, Kang I, Kim J, Kim EH. Melatonin attenuates amyloid beta25-35-induced apoptosis in mouse microglial BV2 cells. *Neurosci Lett*. 2005; 380(1-2):26-31.

Jetten AM. Retinoid-related orphan receptors (RORs): critical roles in development, immunity, circadian rhythm, and cellular metabolism. *Nucl Recept Signal*. 2009; 7: e003.

Jockers R, Maurice P, Boutin JA, Delagrangé P. Melatonin receptors, heterodimerization, signal transduction and binding sites: what's new? *Br J Pharmacol*. 2008; 154 (6): 1182-1195.

Joo SS, Yoo YM. Melatonin induces apoptotic death in LNCaP cells via p38 and JNK pathways: therapeutic implications for prostate cancer. *J. Pineal Res*. 2009; 47 (1): 8-14.

Josko J, Gwozdz B, Hendryk S, Jedrzejowska-Szypulka H, Slowinski J, Jochem J. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in rat brain after subarachnoid haemorrhage and endothelin receptor blockade with BQ-123. *Folia Neuropathol*. 2001; 39 (4): 243-251.

Jung B, Ahmad N. Melatonin in Cancer Management: Progress and Promise. *Cancer Res.* 2006; 66(20):9789-93

Jung KH, Hong SW, Zheng HM, Lee DH, Hong SS. Melatonin downregulates nuclear erythroid 2-related factor 2 and nuclear factor-kappaB during prevention of oxidative liver injury in a dimethylnitrosamine model. *J Pineal Res.* 2009; 47(2):173-83.

Jung-Hynes B, Huang W, Reiter RJ., Ahmad N. Melatonin resynchronizes dysregulated circadian rhythm circuitry in human prostate cancer cells. *J Pineal Res.* 2010; 49 (1): 60–68.

Kallen J, Schlaeppi JM, Bitsch F, Delhon I, Fournier B. Crystal structure of the human RORalpha ligand binding domain in complex with cholesterol sulfate at 2.2 Å. *J Biol Chem.* 2004; 279 (14): 14033–14038.

Kawanabe Y, Nauli SM. Endothelin. *Cell Mol Life Sci.* 2011; 68(2):195-203

Karasek M, Winczyk K, Kunert-Radk J, Wiesenberg I, Pawlikowski M. Antiproliferative effects of melatonin and CGP52608 on the murine colon 38 adenocarcinoma *in vitro* and *in vivo*. *Neuroendocrinol Lett.* 1998; 19: 71–78.

Karbownik M, Reiter RJ, Burkhardt S, Gitto E, Tan DX, Lewinski A. Melatonin attenuates estradiol-induced oxidative damage to DNA: relevance for cancer prevention. *Exp. Biol. Med.* 2001; 226 (7): 707-712.

Kawaguchi Y, Suzuki K, Hara M, Hidaka T, Ishizuka T, Kawagoe, M., and Nakamura, H. Increased endothelin-1 production in fibroblasts derived from patients with systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis.* 1994; 53 (8): 506–510.

Kawana M, Lee ME, Quertermous EE, Quertermous T. Cooperative interaction of GATA-2 and AP1 regulates transcription of the endothelin-1 gene. *Mol. Cell. Biol.* 1995; 15 (8): 4225–4231.

Kedziora-Kornatowska K, Szewczyk-Golec K, Czuczejko J, Pawluk H, Van Marke de Lumen K, Kozakiewicz M, Bartosz G, Kedziora J. Antioxidative effects of melatonin administration in elderly primary essential hypertension patients. *J Pineal Res.* 2008; 45 (3): 312–317.

Kerr JF, Wyllie A H, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26 (4): 239–257.

- Kilic E, Kilic U, Reiter RJ, Bassetti CL, Hermann DM. Prophylactic use of melatonin protects against focal cerebral ischemia in mice: role of endothelin converting enzyme-1. *J Pineal Res.* 2004; 37(4):247-51.
- Kim TH, Xiong H, Zhang Z, Ren B. beta-Catenin activates the growth factor endothelin-1 in colon cancer cells. *Oncogene* 2005; 24(4):597-604.
- Kim C, Kim N, Joo H, Youm JB, Park WS, Cuong DV, Park YS, Kim E, Min CK, Han J. Modulation by melatonin of the cardiotoxic and antitumor activities of adriamycin. *J Cardiovasc Pharmacol.*, 2005; 46(2): 200-210.
- Kilic U, Kilic E, Tuzcu Z, Tuzcu M, Ozercan IH, Yilmaz O, Sahin F, Sahin K. Melatonin suppresses cisplatin-induced nephrotoxicity via activation of Nrf-2/HO-1 pathway. *Nutr Metab.* 2013; 10(1):7
- Kitazumi K, Tasaka K. The role of c-Jun protein in thrombin-stimulated expression of preproendothelin-1 mRNA in porcine aortic endothelial cells. *Biochem. Pharmacol.* 1993; 46 (3): 455-464.
- Knowles JP, Shi-Wen X, Haque SU, Bhalla A, Dashwood MR, Yang S, Taylor I, Winslet MC, Abraham DJ, Loizidou M. Endothelin-1 stimulates colon cancer adjacent fibroblasts. *Int J Cancer.* 2012; 130(6):1264-72.
- Koh PO. Melatonin prevents hepatic injury-induced decrease in Akt downstream targets phosphorylations. *J Pineal Res.* 2011; 51 (2):214-219.
- Kokkola T, Foord SM, Watson MA, Vakkuri O, Laitinen JT: Important amino acids for the function of the human MT1 melatonin receptor. *Biochem Pharmacol.* 2003; 65 (9):1463-1471.
- Konturek PC, Konturek SJ, Majka J, Zembala M, Hahn EG. Melatonin affords protection against gastric lesions induced by ischemia-reperfusion possibly due to its antioxidant and mucosal microcirculatory effects. *Eur J Pharmacol.* 1997; 322 (1): 73-77.
- Kos-Kudla B, Ostrowska Z, Kozłowski A, Marek B, Ciesielska-Kopacz N, Kudla M, Kajdaniuk D, Strzelczyk J, Staszewicz P. Circadian rhythm of melatonin in patients with colorectal carcinoma. *Neuro Endocrinol Lett* 2002; 23: 239-242
- Kugelmeier P, Nett PC, Zullig R, Lehmann R, Weber M, Moritz W. Expression and hypoxic regulation of the endothelin system in endocrine cells of human and rat pancreatic islets. *JOP.* 2008; 9 (2): 133-149.

Lacroix A, Lippman ME. Binding of retinoids to human breast cancer cell lines and their effects on cell growth. *J Clin Invest.* 1980; 65 (3): 586–591.

Lardone PJ, Carrillo-Vico A, Molinero P, Rubio A, Guerrero J.M. A novel interplay between membrane and nuclear melatonin receptors in human lymphocytes: significance in IL-2 production. *Cell Mol. Life Sci.* 2009; 66 (3): 516-525.

Larsson SC, Orsini N, Wolk A. Diabetes mellitus and risk of colorectal cancer: a meta-analysis. *J Natl Cancer Inst.* 2005; 97 (22):1679-1687.

Larsson SC, Wolk A. Obesity and colon and rectal cancer risk: a metaanalysis of prospective studies. *Am J Clin Nutr.* 2007; 86 (3):556-565.

Lee ME, Dhadyly M S, Temizer DH, Clifford JA, Yoshizumi M, Quertermous T. (1991) Regulation of endothelin-1 gene expression by Fos and Jun. *J. Biol. Chem.*1991; 266 (28); 19034–19039.

Lefebvre P, Baub MP, Tahayato A, Rochette-Egly C, Formstcher P. Protein phosphatases I and 2A regulate the transcriptional and DNA binding activities of retinoic acid receptors. *J Biol Chem.* 1995; 270 (18): 10806–10816.

Lehrke I, Waldherr R, Ritz E, Wagner J. Renal endothelin-1 and endothelin receptor type B expression in glomerular diseases with proteinuria. *J Am Soc Nephrol.* 2001; 12 (11): 2321–2329.

Leja-Szpak A, Jaworek J, Pierzchalski P, Reiter RJ. Melatonin induces proapoptotic signaling pathway in human pancreatic carcinoma cells (PANC-1). *J Pineal Res.* 2010; 49 (3): 248–255.

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. Gender-related invasion differences associated with mRNA expression levels of melatonin membrane receptors in colorectal cancer. *Mol Carcinog.* 2012; 51 (8):608-618.

Lerman A, Edwards BS, Hallett JW, Heublein DM, Sandberg SM, Burnett JC Jr. Circulating and tissue endothelin immunoreactivity in advanced atherosclerosis. *N Engl J Med.* 1991; 325 (14): 997-1001.

Lerner AB, Case JD, Heinzelman RV. Structure of melatonin. *J Am Chem Soc.* 1959; 81: 6084-6092.

Levin B, Lieberman DA, McFarland B, Andrews KS, Brooks D, Bond J, Dash C, Giardiello FM, Glick S, Johnson D, Johnson CD, Levin TR, Pickhardt PJ, Rex DK, Smith

RA, Thorson A, Winawer SJ; American Cancer Society Colorectal Cancer Advisory Group; US Multi-Society Task Force; American College of Radiology Colon Cancer Committee. Screening and surveillance for the early detection of colorectal cancer and adenomatous polyps, 2008: a joint guidelines from the American Cancer Society, the US Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer and the American College of Radiology. *Gastroenterology* 2008; 134 (5): 1570-1595 *CA Cancer J Clin.* 2008; 58: 130-160.

Ling L, Maguire JJ, Davenport AP. Endothelin-2, the forgotten isoform: emerging role in the cardiovascular system, ovarian development, immunology and cancer. *Br J Pharmacol.* 2013; 168(2):283-95.

Lissoni P, Meregalli S, Nosetto L, Barni S, Tancini G, Fossati V, Maestroni G. Increased survival time in brain glioblastomas by a radioneuroendocrine strategy with radiotherapy plus melatonin compared to radiotherapy alone. *Oncology* 1996; 53 (1): 43-46.

Lissoni P, Rovelli F, Malugani F, Bucovec R, Conti A, Maestroni Georges JM. Anti-angiogenic activity of melatonin in advanced cancer patients. *Neuroendocrinology Letters* 2001; 22 (1):45-47.

Lissoni P, Chilelli M, Villa S, Cerizza L, Tancini G. Five years survival in metastatic non-small cell lung cancer patients treated with chemotherapy alone or chemotherapy and melatonin: a randomized trial. *J Pineal Res.* 2003; 35 (1):12-15.

Liu S, Wang F, Yan L, Zhang L, Song Y, Xi S, Jia J, Sun G. Oxidative stress and MAPK involved into ATF2 expression in immortalized human urothelial cells treated by arsenic. *Arch Toxicol.* 2013; 87(6):981-9.

Lu WZ, Song GH, Gwee KA, Ho KY. The effects of melatonin on colonic transit time in normal controls and IBS patients. *Dig Dis Sci.* 2009; 54: 1087-93.

Luchetti F, Canonico B, Betti M, Arcangeletti M, Pilolli F, Piroddi M, Canesi L, Papa S, Galli F. Melatonin signaling and cell protection function. *FASEB J.* 2010; 24(10):3603-24.

Luscher TF, Barton M. Endothelins and endothelin receptor antagonists: therapeutic considerations for a novel class of cardiovascular drugs. *Circulation* 2000; 102 (19): 2434-2440.

Luscher TF, Enseleit F, Pacher R, Mitrovic V, Schulze MR, Willenbrock R, Dietz R, Rousson V, Hürlimann D, Philipp S, Natter T, Noll G, Ruschitzka F. Hemodynamic and neurohumoral effects of selective endothelin A (ET(A)) receptor blockade in chronic

heart failure: the heart failure ET(A) Receptor Blockade Trial (HEAT). *Circulation* 2002; 106 (21): 2666-2672.

Lynch HT, De La Chapelle A. Hereditary colorectal cáncer. *N Engl J Med.* 2003; 348 (10): 919-932.

Maestroni GJ, Covacci V, Conti A. Hematopoietic rescue via T-cell-dependent, endogenous granulocytemacrophage colony-stimulating factor induced by the pineal neurohormone melatonin in tumor-bearing mice. *Cancer Res.* 1994; 54 (9): 2429-2432.

Man, GC, Wong JH, Wang WW, Sun GQ, Yeung BH, Ng TB, Lee SK, Ng BK, Qiu Y, Cheng JC. Abnormal melatonin receptor 1B expression in osteoblasts from girls with adolescent idiopathic scoliosis. *J Pineal Res.* 2010; 49 (1): 69-77.

Marsen TA, Simonson MS, Dunn MJ. Thrombin induces the preproendothelin-1 gene in endothelial cells by a protein tyrosine kinase-linked mechanism. *Circ Res.* 1995; 76 (6): 987-995.

Martín V, Herrera F, Carrera-Gonzalez P, García-Santos G, Antolín I, Rodríguez-Blanco J, Rodríguez C. Intracellular Signaling Pathways Involved in the Cell Growth Inhibition of Glioma Cells by Melatonin. *Cancer Res.* 2006; 66(2): 1081-1088.

Martín V, Herrera F, García-Santos G, Antolín I, Rodríguez-Blanco J, Medina M, Rodríguez C. Involvement of protein kinase C in melatonin's oncostatic effect in C6 glioma cells. *J Pineal Res.* 2007; 43(3):239-44.

Martín V, García-Santos G, Rodríguez-Blanco J, Casado-Zapico S, Sanchez-Sanchez, A, Antolín I, Medina M, Rodríguez C. Melatonin sensitizes human malignant glioma cells against TRAIL-induced cell death. *Cancer Lett.* 2010; 287 (2): 216-223.

Martín-Renedo J, Mauriz JL, Jorquera F, Ruiz-Andrés O, González P, González-Gallego J. Melatonin induces cell cycle arrest and apoptosis in hepatocarcinoma HepG2 cell line. *J. Pineal Res.* 2008; 45 (4): 532-540.

Martínez-Campa CM, Alonso-González C, Mediavilla MD, Cos S, González A, Sanchez-Barcelo EJ. Melatonin down-regulates hTERT expression induced by either natural estrogens (17 β -estradiol) or metalloestrogens (cadmium) in MCF-7 human breast cancer cells. *Cancer Letters* 2008; 268 (2): 272-277.

Martínez-Campa C, González A, Mediavilla M, Alonso-González C, Álvarez-García V, Sánchez-Barceló EJ, Cos S. Melatonin inhibits aromatase promoter expression by

regulating cyclooxygenases expression and activity in breast cancer cells. *Br J Cancer* 2009; 101 (9):1613–1619.

Masaki T. The endothelin family: An overview. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2000; 35 (4 Suppl 2): S3–S5.

Masaki T. Historical review: Endothelin. *Trends Pharmacol Sci.* 2004; 25 (4): 219–224.

Masana MI, Doolen S, Ersahin C, Al-Ghoul WM, Duckles SP, Dubocovich ML, Krause DN. MT(2) melatonin receptors are present and functional in rat caudal artery. *J Pharmacol Exp Ther.* 2002; 302 (3): 1295–1302.

Matheus N, Mendoza C, Iceta R, Mesonero JE, Alcalde AI. Melatonin inhibits serotonin transporter activity in intestinal epithelial cells. *J Pineal Res* 2010; 48:332–9.

Mediavilla M.D, Güezmez A, Ramos S, Kothari L, Garijo F, Sánchez-Barceló E.J. Effects of melatonin on mammary gland lesions in transgenic mice overexpressing N-ras proto-oncogene. *J. Pineal Res.* 1997; 22 (2): 86-94

Mediavilla MD, Cos S, Sanchez-Barcelo EJ. Melatonin increases p53 and p21WAF1 expression in MCF-7 human breast cancer cells *in vitro*. *Life Sci.* 1999; 65(4):415-20.

Mediavilla MD, Sanchez-Barcelo EJ, Tan DX, Manchester L, Reiter RJ. Basic mechanisms involved in the anti-cancer effects of melatonin. *Curr Med Chem* 2010; 17 (36): 4462-81.

Melillo G. Targeting hypoxia cell signaling for cancer therapy. *Cancer Metastasis Rev.* 2007; 26 (2):341–352.

Melen-Mucha G, Winczyk K, Pawlikowski M. Somatostatin analogue octreotide and melatonin inhibit bromodeoxyuridine incorporation into cell nuclei and enhance apoptosis in the transplantable murine colon 38 cancer. *Anticancer Res.* 1998; 18 (5A):3615-9.

Messner M, Huether G, Lorf T, Ramadori G, Schworer H. Presence of melatonin in the human hepatobiliary-gastrointestinal tract. *Life Sci.* 2001; 69 (5): 543-551.

Miller RL, Kohan DE. Hypoxia regulates endothelin-1 production by the inner medullary collecting duct. *J. Lab. Clin. Med.* 1998; 131 (1): 45–48.

Miller SC, Pandi-Perumal SR, Esquifino AI, Cardinali DP, Maestroni GJ. The role of melatonin in immuno-enhancement: potential application in cancer. *Int J Exp Pathol* 2006; 87: 81-87.

Mills E, Wu P, Seely D, Guyatt G. Melatonin in the treatment of cancer. A systematic review of randomized controlled trials and meta-analysis. *J Pineal Res* 2005; 39: 360-6.

Moinuddin M, Hoosein, Michael R, Dashwoodb, Khaled Dawasa, Haythem MMDA, Ali, Katherine Grant, Felicity Savage, Irving Taylor, Marilena Loizidou. Altered endothelin receptor subtypes in colorectal cancer. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2007; 19 (9): 775-782.

Molis TM, Spriggs LL, Hill SM. Modulation of estrogen receptor mRNA expression by melatonin in MCF-7 human breast cancer cells. *Mol Endocrinol*. 1994; 8 (12): 1681-1690.

Morawietz H, Talanow R, Szibor M, Rueckschloss U, Schubert A, Bartling B, Darmer D, Holtz J. Regulation of the endothelin system by shear stress in human endothelial cells. *J Physiol*. 2000; 525 (Pt 3): 761-770.

Morgan PJ, Lawson W, Davidson G, Howell HE. Guanine nucleotides regulate the affinity of melatonin receptors on the ovine pars tuberalis. *Neuroendocrinology* 1989; 50 (3): 359-362.

Moretti MM, Limonta P, Maggi R, Motta M, Moretti RM. Growth-inhibitory activity of melatonin on human androgen-independent DU 145 prostate cancer cells. *Prostate* 2000; 45: 238-44.

Moretti S, Fabbri P, Baroni G, Berti S, Bani D, Berti E, Nassini R, Lotti T, Massi D. Keratinocyte dysfunction in vitiligo epidermis: cytokine microenvironment and correlation to keratinocyte apoptosis. *Histol. Histopathol*. 2009; 24 (7): 849-857.

Motilva V, García-Mauriño S, Talero E, Illanes M. New paradigms in chronic intestinal inflammation and colon cancer: role of melatonin. *J Pineal Res*. 2011; 51(1):44-60.

Mundy GR. Metastasis to bone: causes, consequences and therapeutic opportunities. *Nature Rev Cancer* 2002; 2 (8): 584-593.

Nava M, Quiroz Y, Vaziri N, Rodriguez-Iturbe B. Melatonin reduces renal interstitial inflammation and improves hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2003; 284(3): F447-54.

Negi G, Kumar A, Sharma SS. Melatonin modulates neuroinflammation and oxidative stress in experimental diabetic neuropathy: effects on NF- κ B and Nrf2 cascades. *J Pineal Res*. 2011; 50 (2):124-31.

Nelson JB, Hedican SP, George DJ, Reddi AH, Piantadosi S, Eisenberger MA, Simons JW. Identification of endothelin-1 in the pathophysiology of metastatic adenocarcinoma of the prostate. *Nature Med.* 1995; 1 (9): 944–949.

Nelson JB, Chan-Tack K, Hedican SP, Magnuson SR, Opgenorth TJ, Bova GS, Simons JW. Endothelin-1 production and decreased endothelin B receptor expression in advanced prostate cancer. *Cancer Res.* 1996; 56 (4): 663–668.

Nelson JB, Nguyen SH, Wu-Wong JR, Opgenorth TJ, Dixon DB, Chung LW, Inoue N. New bone formation in an osteoblastic tumor model is increased by endothelin-1 overexpression and decreased by endothelin A receptor blockade. *Urology* 1999; 53 (5): 1063–1069.

Nelson JB, Bagnato A, Battistini B, Nisen P. The endothelin axis: Emerging role in cancer. *Nature Review Cancer* 2003; 3 (2): 110–116.

Nie S, Zhou J, Bai F, Jiang B, Chen J, Zhou J. Role of endothelin a receptor in colon cancer metastasis: *In vitro* and *in vivo* evidence. *Mol Carcinog.* 2013 Jul 2. doi: 10.1002/mc.22036.

Nieuwenhuis MH, Lefevre JH, Bülow S, Järvinen H, Bertario L, Kernéis S, Parc Y, Vasen HF. Family history, surgery, and APC mutation are risk factors for desmoid tumors in familial adenomatous polyposis: an international cohort study. *Dis Colon Rectum.* 2011; 54(10):1229-34.

Nock NL, Patrick-Melin A, Cook M, Thompson C, Kirwan JP, Li L. Higher bone mineral density is associated with a decreased risk of colorectal adenomas. *Int J Cancer* 2011; 129(4):956-64.

Nosjean O, Ferro M, Coge F, Beauverger P, Henlin JM, Lefoulon F, Fauchere JL, Delagrang P, Canet E, Boutin JA. Identification of the melatoninbinding site MT3 as the quinone reductase 2. *J Biol Chem.* 2000; 275 (40): 31311–31317.

Nosjean O, Nicolas JP, Klupsch F, Delagrang P, Canet E, Boutin JA. Comparative pharmacological studies of melatonin receptors: MT1, MT2 and MT3/QR2. Tissue distribution of MT3/QR2. *Biochem Pharmacol.* 2001; 61 (11): 1369–1379.

Oren M. Decision making by p53: life, death and cancer. *Cell Death Differ* 2003; 10 (4): 431–442.

Orlando L, Schiavone P, Fedele P, Calvani N, Nacci A, Rizzo P, Marino A, D'Amico M, Sponziello F, Mazzoni E, Cinefra M, Fazio N, Maiello E, Silvestris N, Colucci G, Cinieri S.

Molecularly targeted endocrine therapies for breast cancer. *Cancer Treat Rev.* 2010; 36 (3): S67–S71.

Pandi-Perumal SR, Srinivasan V, Maestroni GJ, Cardinali DP, Poeggeler B, Hardeland R. Melatonin: nature's most versatile biological signal. *FEBS J.* 2006; 273 (13): 2813–2838.

Pandi-Perumal SR, Trakht I, Srinivasan V, Spence DW, Maestroni GJ, Zisapel N, Cardinali DP. Physiological effects of melatonin: role of melatonin receptors and signal transduction pathways. *Prog Neurobiol.* 2008; 85 (3): 335–353.

Pao MM, Tsutsumi M, Liang G, Uzvolgyi E, Gonzales FA, Jones PA. The endothelin receptor B (EDNRB) promoter displays heterogeneous, site specific methylation patterns in normal and tumor cells. *Hum. Mol. Genet.* 2001; 10 (9): 903–910.

Papandreou CN, Usmani B, Geng Y, Bogenrieder T, Freeman R, Wilk S, Finstad CL, Reuter VE, Powell CT, Scheinberg D, Magill C, Scher HI, Albino AP, Nanus DM. Neutral endopeptidase 24.11 loss in metastatic human prostate cancer contributes to androgenindependent progression. *Nature Med.* 1998; 4 (1): 50–57.

Park JY, Kim YM, Song HS, Park KY, Kim MS, Pak YK, Lee IK, Lee JD, Park SJ, Lee KU. Oleic acid induces endothelin-1 expression through activation of protein kinase C and NF- κ B. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003; 303 (3): 891–895.

Park SY, Jang WJ, Yi EY, Jang JY, Jung Y, Jeong JW, Kim YJ. Melatonin suppresses tumor angiogenesis by inhibiting HIF-1 α stabilization under hypoxia. *J Pineal Res.* 2010; 48 (2):178–184.

Parkin DM, Olsen AH, Sasieni P. The potential for prevention of colorectal cancer in the UK. *Eur J Cancer Prev.* 2009; 18 (3):179-90.

Parrilla Paricio P, Landa García JL. En: *Cáncer Colrectal: Aspectos generales y lesiones precancerosas. Cirugía AEC 2º Ed:* 500-518. 2009.

Patel N, Gonsalves CS, Malik P, Kalra VK. Placenta growth factor augments endothelin-1 and endothelin-B receptor expression via hypoxia-inducible factor-1 alpha. *Blood* 2008; 112 (3): 856–865.

Paternoster L, Radogna F, Accorsi A, Cristina Albertini M, Gualandi G, Ghibelli L. Melatonin as a modulator of apoptosis in B-lymphoma cells. *Ann N Y Acad Sci.* 2009; 1171: 345-349.

Pégorier S, Arouche N, Dombret MC, Aubier M, Pretolani M. Augmented epithelial endothelin-1 expression in refractory asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2007; 120 (6): 1301–1307.

Paul S, Bhattacharya P, Das Mahapatra P, Swarnakar S. Melatonin protects against endometriosis via regulation of matrix metalloproteinase-3 and an apoptotic pathway. *J Pineal Res.* 2010; 49(2):156-68.

Pérez del Villar C, García Alonso CJ, Feldstein CA, Juncos LA, Romero JC. Role of endothelin in the pathogenesis of hypertension. *Mayo Clin Proc.* 2005; 80 (1): 84-96.

Peyrot F, Ducrocq C. Potential role of tryptophan derivatives in stress responses characterized by the generation of reactive oxygen and nitrogen species. *J. Pineal Res.* 2008; 45 (3): 235-246.

Pintor J, Martin L, Pelaez T, Hoyle CH, Peral A. Involvement of melatonin MT(3) receptors in the regulation of intraocular pressure in rabbits. *Eur J Pharmacol.* 2001; 416: 251–254.

Piihola J, Szokodi I, Kinnunen P, Ilves M, deChâtel R, Vuolteenaho O, Ruskoaho H. Endothelin-1 contributes to the Frank-Starling response in hypertrophic rat hearts. *Hypertension* 2003; 41 (1): 93-98.

Poon AM, Mak AS, Luk HT. Melatonin and 2[125I]iodomelatonin binding sites in the human colon. *Endocr Res* 1996; 22: 77-94.

Pristivishalil G, Nelson JB. Endothelium-derived factors as paracrine mediators of prostate cancer progression. *Prostate* 2000; 44 (1): 44–77.

Propuesta de Recomendación del Consejo sobre cribado del cáncer. Comisión de las Comunidades Europeas, 2003. En: <http://www.who.int/cancer/nccp/en/ecproposalforcouncilrecommendations>. Pdf 122. Plan Integral del Cáncer. Detección precoz. Dirección General.

Qin W, Lu W, Li H, Yuan X, Li B, Zhang Q, Xiu R. Melatonin inhibits IL1 β -induced MMP9 expression and activity in human umbilical vein endothelial cells by suppressing NF- κ B activation. *J Endocrinol.* 2012; 214(2):145-53.

Quehenberger P, Bierhaus A, Fasching P, Muellner C, Klevesath M, Hong M, Stier G, Sattler M, Schleicher E, Speiser W, Nawroth PP. Endothelin 1 transcription is controlled by nuclear factor- κ B in AGE-stimulated cultured endothelial cells. *Diabetes* 2000; 49 (9): 1561–1570.

Radio NM, Doctor JS, Witt-Enderby PA. Melatonin enhances alkaline phosphatase activity in differentiating human adult mesenchymal stem cells grown in osteogenic medium via MT2 melatonin receptors and the MEK/ERK (1/2) signaling cascade. *J. Pineal Res.* 2006; 40(4): 332-342

Ram PT, Dai J, Yuan L, Dong C, Kiefer TL, Lai L, Hill SM. Involvement of the mt1 melatonin receptor in human breast cancer. *Cancer Lett.* 2002; 179 (2): 141–150.

Ravindra T, Lakshmi NK, Ahuja YR. Melatonin in pathogenesis and therapy of cancer. *Indian J Med Sci.* 2006; 60(12): 523-35.

Reiter JR. Melatonin: that ubiquously Acting pineal Hormone. *New Physiol Sci.* 1991a; 6: 223-227.

Reiter JR. Pineal Melatonin: Cell Biology of Its Synthesis and of Its Physiological Interactions. *Endocrinol Rev* 1991b; 12 (2): 151-180.

Reiter RJ. Melatonin: the chemical expression of darkness. *Mol Cell Endocrinol.* 1991c; 79 (1-3): C153–C158.

Reiter RJ: Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. *Endocr Rev.* 1991c; 12 (2): 151–180.

Reiter RJ. Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and its physiological interaction. *Endocr Rev.* 2000; 12(2): 151–180.

Reiter RJ, Tan DX, Osuna C, Gitto E. Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress. *J Biomed Sci.* 2000; 7(6): 444–458.

Reiter RJ, Tan DX, Manchester LC, Calvo JR. (2002) Antioxidant capacity of melatonin. In: *Handbook of Antioxidants*, pp. 565–613, Cadenes E. and Packer L. (eds), Marcel Dekker, NY.

Reiter RJ, Tan DX, Allegra M. Melatonin: reducing toxicity and increasing the efficacy of drugs. *J. Phar Pharmacol.* 2002; 54 (10): 1299-1321.

Reiter RJ. Mechanisms of cancer inhibition by melatonin. *J Pineal Res.* 2004; 37(3): 213-214.

Reiter RJ, Tan DX, Korkmaz A, Erren TC, Piekarski C, Tamura H, Manchester LC. Light at night, chronodisruption, melatonin suppression, and cancer risk: a review. *Crit Rev Oncog.* 2007; 13 (4): 303–328.

Reiter CE, Kim JA, Quon MJ. Green tea polyphenol epigallocatechin gallate reduces endothelin-1 expression and secretion in vascular endothelial cells: roles for AMP-activated protein kinase, Akt, and FOXO1. *Endocrinology* 2010; 151 (1): 103–114.

Renehan AG, O'Dwyer ST, Whynes DK. Cost effectiveness analysis of intensive versus conventional follow up after curative resection for colorectal cancer. **BMJ**. 2004; 328(7431): 81.

Reppert SM, Godson C, Mahle CD, Weaver DR, Slaugenhaupt SA, Gusella JF. Molecular characterization of a second melatonin receptor expressed in human retina and brain: the Mel1b melatonin receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995; 92 (19): 8734–8738.

Reppert SM, Weaver DR, Ebisawa T, Mahle CD, Kolakowski Jr LF. Cloning of a melatonin-related receptor from human pituitary. *FEBS Lett*. 1996a; 386 (2-3): 219–224.

Reppert SM, Weaver DR, Godson C. Melatonin receptors step into the light: cloning and classification of subtypes. *Trends Pharmacol Sci*. 1996b; 17 (3): 100–102.

Rinella E, Bankaitis E, Threadgill D. Dietary calcium supplementation enhances efficacy but also toxicity of EGFR inhibitor therapy for colon cancer. *Cancer Biol Ther*. 2012; 13 (3): 130-137.

Rizzo A, Pallone F, Monteleone G, Fantini MC. Intestinal inflammation and colorectal cancer: a double-edged sword? *World J Gastroenterol*. 2011; 17(26):3092-100.

Rodriguez C, Mayo JC, Sainz RM, Antolin I, Herrera F, Martin V, Reiter RJ. Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. *J Pineal Res*. 2004; 36 (1): 1–9.

Rodríguez-Pascual F, Redondo-Horcajo M, Lamas S. Functional cooperation between Smad proteins and activator protein-1 regulates transforming growth factor-beta-mediated induction of endothelin-1 expression. *Circ Res*. 2003; 92 (12): 1288–1295.

Rodríguez-Pascual F, Redondo-Horcajo M, Magan-Marchal N, Lagares D, Martínez-Ruiz A, Kleinert H, Lamas S. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase regulates endothelin-1 expression by a novel, redox-sensitive mechanism involving mRNA stability. *Mol. Cell. Biol*. 2008; 28 (23): 7139–7155.

Ronnberg L, Kauppila A, Leppaluoto J, Martikainen H, Vakkuri O. Circadian and seasonal variation in human preovulatory follicular fluid melatonin concentration. *J Clin Endocrinol Metab.* 1990; 71 (2): 492–496.

Ross AW, Barrett P, Mercer JG, Morgan PJ. Melatonin suppresses the induction of AP-1 transcription factor components in the pars tuberalis of the pituitary. *Mol Cell Endocrinol.* 1996; 123(1):71-80.

Rosanò L, Varmi M, Salani D, Di Castro V, Spinella F, Natali PG, Bagnato A. Endothelin-1 induces tumor proteinase activation and invasiveness of ovarian carcinoma cells. *Cancer Res.* 2001; 61 (22):8340-8346.

Rosanò L, Spinella F, Salani D, Di Castro V, Venuti A, Nicotra MR, Natali PG, Bagnato A. Therapeutic targeting of the endothelin A receptor in human ovarian carcinoma. *Cancer Res.* 2003a; 63 (10): 2447–2453

Rosanò L, Di Castro V, Spinella F, Nicotra MR, Natali PG, Bagnato A. ZD4054, a specific antagonist of the endothelin A receptor, inhibits tumor growth and enhances paclitaxel activity in human ovarian carcinoma *in vitro* and *in vivo*. *Mol Cancer Ther.* 2007; 6 (7): 2003–11.

Rosanò L, Spinella F, Bagnato A. The importance of endothelin axis in initiation, progression, and therapy of ovarian cancer. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2010; 299 (2): R395–R404.

Rosanò L, Spinella F, Bagnato A. Endothelin 1 in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cancer.* 2013; 13(9):637-51.

Rozengurt E. Mitogenic signaling pathways induced by G protein-coupled receptors. *Journal of Cell Physiology.* 2007; 213 (3): 589–602.

Sainz RM, Mayo JC, Rodriguez C, Tan DX, Lopez-Burillo S, Reiter RJ. Melatonin and cell death: differential actions on apoptosis in normal and cancer cells. *Cell Mol Life Sci.* 2003; 60(7): 1407-26.

Sainz RM, Mayo JC, Tan DX, León J, Manchester L, Reiter RJ. Melatonin reduces prostate cancer cell growth leading to neuroendocrine differentiation via a receptor and PKA independent mechanism. *Prostate* 2005; 63 (1): 29-43.

Sainz TM, Mayo JC, Tan DX, Lopez-Burillo S, Natarajan M, Reiter RJ. Antioxidant activity of melatonin in Chinese hamster ovarian cells: changes in cellular proliferation and differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 302: 625–34.

Salani D, Di Castro V, Nicotra MR, Rosanò L, Tecce R, Venuti A, Natali PG, Bagnato A. Role of endothelin-1 in neovascularization of ovarian carcinoma. *Am J Pathol.* 2000; 157 (5):1537-1547.

Sánchez-Hidalgo M, Lee M, de la Lastra CA, Guerrero JM, Packham G. Melatonin inhibits cell proliferation and induces caspase activation and apoptosis in human malignant lymphoid cell lines. *J Pineal Res.* 2012; 53(4):366-73.

Salani D, Taraboletti G, Rosanò L, Di Castro V, Borsotti P, Giavazzi R, Bagnato A: Endothelin-1 induces an angiogenic phenotype in cultured endothelial cells and stimulates neovascularization in vivo. *Am J Pathol.* 2000; 157 (5): 1703-1711.

Salani D, Di Castro V, Nicotra MR, Rosanò L, Tecce R, Venuti A, Natali PG, Bagnato A: Role of endothelin-1 in neovascularization of ovarian carcinoma. *Am J Pathol.* 2000; 157 (5): 1537-1547.

Santoro R, Marani M, Blandino G, Muti P, Strano S. Melatonin triggers p53Ser phosphorylation and prevents DNA damage accumulation. *Oncogene* 2012; 31 (24): 2931–2942

Schernhammer ES, Razavi P, Li TY, Qureshi AA, Han J. Rotating night shifts and risk of skin cancer in the nurses' health study. *J Natl Cancer Inst.* 2011; 103 (7): 602–6.

Schomerus C, Korf HW: Mechanisms regulating melatonin synthesis in the mammalian pineal organ. *Ann NY Acad Sci.* 2005; 1057: 372–383.

Sharma R, Ottenhof T, Rzeczowska PA, Niles LP. Epigenetic targets for melatonin: induction of histone H3 hyperacetylation and gene expression in C17.2 neural stem cells. *J Pineal Res.* 2008; 45 (3): 277-284.

Simpson ER. Role of aromatase in sex steroid action. *J Mol Endocrinol.* 2000; 25 (2):149–156.

Slominski A, Fischer TW, Zmijewski MA, Wortsman J, Semak I, Zbytek B, Slominski RM, Tobin DJ. On the role of melatonin in skin physiology and pathology. *Endocrine* 2005; 27: 137–148.

Slominski RM, Reiter RJ, Schlabritz-Loutsevitch N, Ostrom RS, Slominski AT. Melatonin membrane receptors in peripheral tissues: distribution and functions. *Mol Cell Endocrinol.* 2012; 351(2): 152-66.

Smith RA, Cokkinides V, Brooks D, Saslow D, Brawley OW. Cancer screening in the United States, 2010: a review of current American Cancer Society guidelines and issues in cancer screening. *CA Cancer J Clin.* 2010; 60(2):99-119.

Smirnov AN. Nuclear melatonin receptors. *Biochemistry (Moscow)* 2001; 66 (1): 19–26.

Smollich M, Götte M, Kersting C, Fischgräbe J, Kiesel L, Wülfing P. Selective ETAR antagonist atrasentan inhibits hypoxia-induced breast cancer cell invasion. *Breast Cancer Res. Treat.* 2008; 108 (2):175–82.

Spinella F, Rosanò L, Di Castro V, Nicotra MR, Natali PG, Bagnato A: Inhibition of cyclooxygenase-1 and -2 expression by targeting the endothelin A receptor in human ovarian carcinoma cells. *Clin Cancer Res.* 2004; 10(14): 4670-4679.

Srinivasan V, Spence D.W, Trakht I, Pandi-Perumal S.R, Cardinali D.P, Maestroni G.J. Immunomodulation by melatonin: its significance for seasonally occurring diseases. *Neuroimmunomodulation* 2008; 15 (2): 93-101.

Stehle J. H. M Fouljes N. S., Molina CA., Simonneaux V, Pévvet P, Sassone-Corsi P. Adrenergic signals direct expression of transcriptional repressor CREM in the pineal gland, *Nature* 1993; 365 (6444): 314-320.

Stefulj J, Hörtner M, Ghosh M, Schauenstein K, Rinner I, Wölfler A, et al. Gene expression of the key enzymes of melatonin synthesis in extrapineal tissues of the rat. *J Pineal Res.* 2001; 30: 243–7.

Stehle JH, Saade A, Rawashdeh O, Ackermann K, Jilg A, Sebesteny ., Maronde E. A survey of molecular details in the human pineal gland in the light of phylogeny, structure, function and chronobiological diseases. *J Pineal Res.* 2011; 51 (1):17–43.

Stow LR, Gumz ML, Lynch IJ, Greenlee MM, Rudin A, Cain BD, Wingo CS. Aldosterone modulates steroid receptor binding to the endothelin-1 gene (edn1). *J. Biol. Chem.* 2009; 284 (44): 30087–30096.

Stow LR, Jacobs ME, Wingo CS, Cain BD. Endothelin-1 gene regulation. *FASEB J.* 2011; 25 (1): 16-28.

Strait KA, Stricklett PK, Kohan JL, Miller MB, Kohan DE. Calcium regulation of endothelin-1 synthesis in rat inner medullary collecting duct. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 2007; 293 (2): F601–F606.

Strzalka-Mrozik B, Nowak A, Gola J, Kowalczyk M, Kapral M, Mazurek U. Factors associated with changes in endothelin-1 gene expression in patients with diabetic retinopathy in type 2 diabetes mellitus. *Mol Vis*. 2010; 16: 1272–1279.

Takanashi M, Miyauchi T, Kakinuma Y, Goto K, Yamaguchi L. Establishment of hypoxia inducible factor-1 α overexpressing cells that produce endothelin-1. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2004; 44(1): S268–S273.

Tajes M, Gutierrez-Cuesta J, Ortuño-Sahagun D, Camins A, Pallàs M. Anti-aging properties of melatonin in an *in vitro* murine senescence model: involvement of the sirtuin 1 pathway. *J Pineal Res*. 2009; 47(3): 228–237.

Tajes Orduña M, Pelegrí Gabalda C, Vilaplana Hortensi J, Pallàs Lliberia M, Camins Espuny A. An evaluation of the neuroprotective effects of melatonin in an *in vitro* experimental model of age-induced neuronal apoptosis. *J Pineal Res*. 2009; 46(3):262–267.

Tamura H, Takasaki A, Miwa I, Taniguchi K, Maekawa R, Asada H, Taketani T, Matsuoka A, Yamagata Y, Shimamura K, Morioka H, Ishikawa H, Reiter RJ, Sugino N. Oxidative stress impairs oocyte quality and melatonin protects oocytes from free radical damage and improves fertilization rate. *J Pineal Res*. 2008; 44 (3): 280–287.

Tamura EK, Cecon E, Monteiro AW, Silva CL, Markus RP. Melatonin inhibits LPS-induced NO production in rat endothelial cells. *J Pineal Res*. 2009; 46(3):268–74.

Tan DX, Manchester LC, Reiter RJ, Qi W, Kim SJ, El-Sokkary G. Ischemia/reperfusion-induced arrhythmias in the isolated rat heart: prevention by melatonin. *J Pineal Res*. 1998; 25 (3): 184–191.

Tan DX, Manchester LC, Hardeland R, Lopez-Burillo S, Mayo JC, Sainz, RM, Reiter RJ. Melatonin: a hormone, a tissue factor, an autocoid, a paracoid, and an antioxidant vitamin. *J Pineal Res*. 2003; 34 (1): 75–78.

Tan DX, Manchester LC, Fuentes-Broto L, Paredes SD, Reiter RJ. Significance and application of melatonin in the regulation of brown adipose tissue metabolism: relation to human obesity. *Obes Rev*. 2011; 12 (3): 167–188.

Tanaka T, Yasuia Y, Mayu Tanakab, Tanakac T, Oyamaa T, Rahmand KM. Melatonin suppresses AOM/DSS-induced large bowel oncogenesis in rats. *Chemico-Biol. Interact* 2009; 177: 128–36.

Terragni J, Graham JR, Adams KW, Schaffer ME, Tullai JW, Cooper GM. Phosphatidylinositol 3-kinase signaling in proliferating cells maintains an

antiapoptotic transcriptional program mediated by inhibition of FOXO and non-canonical activation of NF κ B transcription factors. *BMC Cell Biol.* 2008; 9: 6.

Thaete LG, Jilling T, Synowiec S, Khan S, Neerhof MG. Expression of endothelin 1 and its receptors in the hypoxic pregnant rat. *Biol Reprod.* 2007; 77 (3): 526–532.

Thompson CL, Larkin EK, Patel S, Berger NA, Redline S, Li L. Short duration of sleep increases risk of colorectal adenoma. *Cancer* 2011; 117(4): 841-847.

Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science* 1998; 281(5381):1312–1326.

Treeck O, Haldar C, Ortmann O. Antiestrogens modulate MT1 melatonin receptor expression in breast and ovarian cancer cell lines. *Oncology reports* 2006; 15 (1): 231-235.

Townsend CM, Beauchamp RD, Evers BM, Mattox KL. En: *Colon y Recto, Sabiston Tratado de Cirugía*: 1401-1483. 2009.

Trubiani O, Recchioni R, Moroni F, Pizzicannella J, Caputi S, Di Primio R. Melatonin provokes cell death in human Blymphoma cells by mitochondrial-dependent apoptotic pathway activation. *J. Pineal Res.* 2005; 39 (4): 425-31.

Tsai YH, Ohkita M, Garipey CE. Chronic high-sodium diet increases aortic wall endothelin-1 expression in a blood pressure-independent fashion in rats. *Exp. Biol. Med.* (Maywood) 2006; 231(6): 813–817.

Turner AJ, Barnes K, Schweizer A, Valdenaire O. Isoforms of endothelin-converting enzyme: why and where? *Trends Pharmacol Sci.* 1998; 19(12):483-6.

Urata Y, Honma S, Goto S, Todoroki S, Iida T, Cho S, Honma K, Kondo T. Melatonin induces gamma-glutamylcysteine synthetase mediated by activator protein-1 in human vascular endothelial cells. *Free Radic Biol Med.* 1999; 27(7-8):838-47.

Vacca F, Bagnato A, Catt KJ, Tecce R. Transactivation of the epidermal growth factor receptor in endothelin-1-induced mitogenic signaling in human ovarian carcinoma cells. *Cancer Res.* 2000; 60 (18): 5310–5317.

Vallender TW, Lahn BT. Localized methylation in the key regulator gene endothelin-1 is associated with cell type-specific transcriptional silencing. *FEBS Lett.* 2006; 580 (18): 4560–4566.

Vasen HF, Moslein G, Alonso A et al. Guidelines for the clinical management of Lynch Syndrome (HNPCC). *J Med Genetic* 2007; 44(6): 353-362.

Vician M, Zeman M, Herichová I, Juráni M, Blazíček P, Matis P. Melatonin content in plasma and large intestine of patients with colorectal carcinoma before and after surgery. *J Pineal Res* 1999; 27: 164-9.

Vieux-Rochas M, Coen L, Sato T, Kurihara Y, Gitton Y, Barbieri O, Le Blay K, Merlo G, Ekker M, Kurihara H, Janvier P, Levi G. Molecular dynamics of retinoic acid-induced craniofacial malformations: implications for the origin of gnathostome jaws. *PLoS One* 2007; 2 (6): e510.

Viger RS, Guittot SM, Anttonen M, Wilson DB, Heikinheimo M. Role of the GATA family of transcription factors in endocrine development, function, and disease. *Mol Endocrinol.* 2008; 22 (4): 781–798.

Vijayalaxmi, Thomas CR Jr, Reiter RJ, Herman TS. Melatonin: From basic research to cancer treatment clinics. *J Clin Oncol.* 2002; 20 (10): 2575-601.

Vincent L, Cohen W, Delagrangé P, Boufin JA, Nosjean O. Molecular and cellular pharmacological properties of 5-methoxycarbonylamino-Nacetyltryptamine (MCA-NAT): a nonspecific MT3 ligand. *J Pineal Res.* 2010; 48 (3): 222–229.

Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smits AM, Bos JL. Genetic alteration during colorectal tumor development. *N Eng J Med.* 1988; 319 (9): 525-532.

Wang YM, Jin BZ, Ai F, Duan CH, Lu YZ, Dong TF, Fu QL. The efficacy and safety of melatonin in concurrent chemotherapy or radiotherapy for solid tumors: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2012; 69(5):1213-20.

Wang R, Löhr CV, Fischer K, Dashwood WM, Greenwood JA, Ho E, Williams DE, Ashktorab H, Dashwood MR, Dashwood RH. Epigenetic inactivation of endothelin-2 and endothelin-3 in colon cancer. *Int J Cancer.* 2013; 132 (5): 1004-1012.

Watanabe M, Kobayashi Y, Takahashi N, Kiguchi K, Ishizuka B. Expression of melatonin receptor (MT1) and interaction between melatonin and estrogen in endometrial cancer cell line. *J Obstet Gynaecol Res.* 2008; 34: 567-73.

Weitz J, Koch M, Debus J, Höhler T, Galle PR, Büchler MW. Colorectal cancer. *Lancet* 2005; 365 (9454): 153-165.

Wenzel, U.; Nickel, A.; Daniel, H. Melatonin potentiates flavone induced apoptosis in human colon cancer cells by increasing the level of glycolytic end products. *Int. J. Cancer*, 2005, 116, 236-242.

Wiesenberg I, Missbach M, Kahlen JP, Schrader M, Carlberg C. Transcriptional activation of the nuclear receptor RZR alpha by the pineal gland hormone melatonin and identification of CGP 52608 as a synthetic ligand. *Nucleic Acids Res.* 1995; 23 (3): 327-333.

Winczyk K, Pawlikowski M, Karasek M. Melatonin and RZR/ROR receptor ligand CGP52608 induce apoptosis in the murine colonic cancer. *J Pineal Res.* 2001; 31 (2): 179-182.

Winczyk K, Pawlikowski M, Lawnicka H, Kunert-Radek J, Spadoni G, Tarzia G, et al. Effects of melatonin and melatonin receptors ligand N-[(4-methoxy-1H-indol-2yl) methyl] propanamide on murine Colon 38 cancer growth *in vitro* and *in vivo*. *Neuroendocrinol Lett.* 2002; 23 (1): 50-54.

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.

Witt-Enderby PA, Bennett J, Jarzynka MJ, Firestine S, Melan MA. Melatonin receptors and their regulation: biochemical and structural mechanisms. *Life Sci.* 2003; 72 (20): 2183-2198.

Wolf SC, Schultze M, Risler T, Rieg T, Lang F, Schulze-Osthoff K, Brehm BR. Stimulation of serum and glucocorticoid-regulated kinase-1 gene expression by endothelin-1. *Biochem Pharmacol.* 2006; 71 (8): 1175-1183.

Wolfler A, Caluba HC, Abuja PM, Dohr G, Schauenstein K, Liebmann PM. Prooxidant activity of melatonin promotes fas-induced cell death in human leukemic Jurkat cells. *FEBS Lett.* 2001; 502 (3): 127-131.

Wu YZ, Li B, Wang T, Wang SJ, Zhou YM. Radiofrequency ablation vs hepatic resection for solitary colorectal liver metastasis: a meta-analysis. *World J Gastroenterol.* 2011; 17(36):4143-8.

Wülfing P, Tio J, Kersting C, Sonntag B, Buerger H, Wülfing C, Euler U, Boecker W, Tulusan AH, Kiesel L. Expression of endothelin-A-receptor predicts unfavourable response to neoadjuvant chemotherapy in locally advanced breast cancer. *Br. J. Cancer* 2004; 91 (3):434-440.

Wülfing P, Kersting C, Tio J, Fischer RJ, Wülfing C, Poremba C, Diallo R, Böcker W, Kiesel L. Endothelin-1-, endothelin-A-, and endothelin-B-receptor expression is correlated with vascular endothelial growth factor expression and angiogenesis in breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2004; 10 (7):2393–400.

Wyllie A.H, Kerr J.F.R, Currie A.R. Cell death: the significance of apoptosis. *Int. Rev. Cytol.* 1998; 68: 251-273.

Xiong JW, Leahy A, Lee HH, Stuhlmann H. Vezf1: A Zn finger transcription factor restricted to endothelial cells and their precursors. *Dev. Biol* 1999; 206 (2): 123-141.

Yamashita K, Discher DJ, Hu J, Bishopric NH, Webster KA. Molecular regulation of the endothelin-1 gene by hypoxia. Contributions of hypoxia-inducible factor-1, activator protein-1, GATA-2, AND p300/CBP. *J. Biol. Chem.* 2001; 276 (16): 12645–12653.

Yanagisawa M, Masaki T. Endothelin, a novel endothelium- derived peptide. Pharmacological activities, regulation and possible roles in cardiovascular control. *Biochem Pharmacol* 1989; 38: 1877-1883.

Yanagisawa H, Yanagisawa M, Kapur RP, Richardson JA, Williams SC, Clouthier DE, de Wit D, Emoto N, Hammer RE. Dual genetic pathways of endothelin-mediated intercellular signaling revealed by targeted disruption of endothelin converting enzyme-1 gene. *Development.* 1998; 125(5):825-36.

Yanagisawa H, Hammer RE, Richardson JA, Emoto N, Williams SC, Takeda Si, Clouthier DE, Yanagisawa M. Disruption of ECE-1 and ECE-2 reveals a role for endothelin-converting enzyme-2 in murine cardiac development. *J Clin Invest.* 2000; 105(10):1373-82.

Yang Z, Li JC. Stimulation of endothelin-1 gene expression by insulin via phosphoinositide-3 kinase-glycogen synthase kinase-3beta signaling in endothelial cells. *Life Sci.* 2008; 82 (9-10): 512–518.

Yeligar S, Tsukamoto H, Kalra VK. Ethanolinduced expression of ET-1 and ET-BR in liver sinusoidal endothelial cells and human endothelial cells involves hypoxia-inducible factor-1alpha and microrNA-199. *J. Immunol.* 2009; 183 (8): 5232–5243.

Yokota J, Kawana M, Hidai C, Aoka Y, Ichikawa K, Iguchi N, Okada M, Kasanuki H. Retinoic acid suppresses endothelin-1 gene expression at the transcription level in endothelial cells. *Atherosclerosis* 2001; 159 (2): 491–496.

Zhang J, Narayan VM, Juedes N, Patel JM. Hypoxic upregulation of preproendothelin-1 gene expression is associated with protein tyrosine kinase-PI3K signaling in cultured lung vascular endothelial cells. *Int. J. Clin. Exp. Med.* 2009; 2 (1): 87–94.

Zhang Y, Li Y, Totsune K, Kikuchi K, Murakami O, Shibahara S, Takahashi K. Hypoxia increases endothelin-1 mRNA expression but not immunoreactive endothelin in the medium of T98G glioblastoma cells under cytokine treatment. *Peptides* 2006; 27 (11): 3003–3006.

Zhang Z, Xu Y, Li L, Han J, Zheng L, Liu P, Li Y. Prevention of retinoic acid-induced early craniofacial abnormalities by folinic acid and expression of endothelin-1/dHAND in the branchial arches in mouse. *Br. J. Nutr.* 2006; 96 (3), 418–425.

Zhang WH, Li JY, Zhou Y. Melatonin abates liver ischemia/reperfusion injury by improving the balance between nitric oxide and endothelin. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.* 2006; 5(4): 574-9.

Zhang H, Zhang S, He H, Zhao W, Ren K, Chen J, Shao RG. RasGAP-derived peptide 38GAP potentiates the cytotoxicity of cisplatin through inhibitions of Akt, ERK and NF- κ B in colon carcinoma HCT116 cells. *Cancer Lett.* 2011; 308(1):62-70.

Zhou X, Huang SY, Feng JX, Gao YY, Zhao L, Lu J, Huang BQ, Zhang Y. SOX7 is involved in aspirin-mediated growth inhibition of human colorectal cancer cells. *World J Gastroenterol.* 2011; 17(44):4922-7.

Zhu G, Carlsen K, Carlsen KH, Lenney W, Silverman M, Whyte MK, Hosking L, Helms P, Roses AD, Hay DW, Barnes MR, Anderson WH, Pillai SG. Polymorphisms in the endothelin-1 (EDN1) are associated with asthma in two populations. *Genes Immun.* 2008; 9 (1): 23–29.

ANEXOS

Listado de abreviaturas

AANAT: Serotonina N-acetiltransferasa

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

ADNc: Ácido Desoxirribonucleico Complementario

AFMK: N1-acetil-N2-formil-5-metoxikinurenamina

Akt: serine/threonine protein kinase Akt

AMK: N1-acetil-5-metoxikinurenamina

AMPc: Adenosín Monofosfato Cíclico

AP1: Proteína Activadora 1 (activator protein)

AR: Receptores de Andrógenos

ARN: Ácido Ribonucleico

ATRA: Ácido Transretinóico

Bax: Bcl-2-associated X protein

Bcl-2: B-cell lymphoma 2

Big-ET-1: Big-endotelina 1

bFGF: Factor de Crecimiento de Fibroblastos

Bmal1: Receptor nuclear translocador de aril hidrocarburos en cerebro y músculo

BSA: Albúmina Sérica Bovina

BSC: mejor atención y apoyo

CA 19-9: Antígeno Carbohidratado

CaCl₂: Cloruro de Calcio

- CaM:** Calmodulina
- CCHNP:** Cáncer Colorrectal Hereditario No Polipósico
- CCR:** Carcinoma colorrectal
- CEA:** Antígeno Carcinoembrionario
- ChIP:** Ensayo de Inmunoprecipitación con Cromatina
- Clock:** Circadian Locomotor Output Cycles Kaput
- CML:** Células del Músculo Liso
- COX-1:** Ciclooxygenasa 1
- COX-2:** Ciclooxygenasa 2. Cry 1/2: Genes del criptocromo 1/2
- Ct:** Valor de ciclo umbral
- CU:** Colitis Ulcerosa
- DMSO:** Dimetilsulfóxido
- DR5:** Death Receptor 5
- DTT:** Dithiothreitol
- EC:** Enfermedad de Crohn
- ECE:** Enzima Convertidora de Endotelina
- edn1:** Gen de Endotelina 1
- EDTA:** Ácido Etilendiaminotetraacético
- EGF:** Factor de Crecimiento Epidérmico
- EGFR:** Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico
- EGTA:** Ácido Etilenglicoltetraacético
- EII:** Enfermedad Inflamatoria Intestinal
- ELISA:** Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas
- ER:** Receptor de Estrógenos
- ER α :** Receptor de Estrógenos α

ER β : Receptor de Estrógeno β

ERE: Elemento de Respuesta a Estrógenos

ET: Endotelina

ET-1: Endotelina 1

ET-2: Endotelina 2

ET-3: Endotelina 3

ETRA: Receptor de Endotelina A

ETRB: Receptor de Endotelina B

E2: Estradiol

FBS: Suero bovino fetal

FGF1: Factor de Crecimiento de Fibroblastos tipo 1

FGF2: Factor de Crecimiento de Fibroblastos tipo 2

FOXO: Forkhead box, sub-group O

GAPDH: Gliceraldehido 3 Fosfato Deshidrogenasa

GATA2: GATA binding protein 2

GPCR: Sistema de Receptores Acoplados a Proteínas G

GPx: Glutación Peroxidasa

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

HAP: Hipertensión Arterial Pulmonar

HCL: Ácido Clorhídrico

HEPES: 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid

HepG2: Línea celular derivada de adenocarcinoma hepatocelular bien diferenciado de tejido hepático humano

HIF1: Factor Inducible por Hipoxia 1

HIOMT: Hidroxindol-O-metiltransferasa

HL60: Human promyelocytic leukemia cells

HRE1: Ethylene-responsive transcription factor ERF073

HRE2: Ethylene-responsive transcription factor ERF071

hRET: Telomerasa Transcriptasa Inversa

HRP: horseradish peroxidase

IFN γ : Interferón gamma

IGF: Factor de Crecimiento Insulínico

IL-2: Interleuquina 2

IL-6: Interleuquina 6

IL-11: Interleuquina 11

IMC: Índice de Masa Corporal

iNOS: Óxido Nítrico Sintasa Inducible

LNCaP: Líneas celulares tumorales de próstata, dependientes de receptores de andrógenos (clonadas de ganglios linfáticos supraclaviculares de un paciente con cáncer de próstata metastásico)

MAPK: Proteín Quinasas Activadas por Mitógenos

MCF-7: Michigan Cancer Foundation – 7

MEN: Minimum Essential Media

MgCl₂: Cloruro de Magnesio

mM: Milimolar

MSH: Hormona Estimulante de Melanocitos

MT1: Receptor de Membrana de Melatonina 1

MT2: Receptor de Membrana de Melatonina 2

MT3: Receptor de Membrana de Melatonina 3

MTT: (3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio)

NA: Noradrenalina

NAT: N-acetiltransferasa

NEP: Neprilisina

NE1: Nuclear Extract 1

NE2: Nuclear Extract 2

NF- κ B: factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas

NK: Natural Killer

nNOS: Óxido Nítrico Sintasa Neuronal

NO: Óxido Nítrico

NQO2: Quinona Reductasa 2

NSQ: Núcleo Supraquiasmático

PAF: Poliposis Adenomatosa Familiar

pb: pares de bases

PBS: Phosphate Buffered Saline (tampón)

PC3: Líneas celulares tumorales de próstata independientes de receptores de andrógenos (aisladas de metástasis óseas de adenocarcinoma de próstata grado IV) humano

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

PDGF: Factor de Crecimiento de Plaquetas

PepT1: peptide transporter 1

Per1/2: genes Period 1/2

PGE2: Dinoprostona

PG: Prostaglandinas

PGI2: Prostaglandina I2

PI: Yoduro de propidio

PIK3: Fosfatidilinositol 3 kinasa

PKA: Proteína Quinasa A

PKC: Proteína Quinasa C

PLC: Fosfolipasa C

PMSF: Fluoruro de Fenilmetilsulfonilo

PML: Proteína de la Leucemia Promielocítica

pNPP: p-nitrofenilfosfato

PSA: Antígeno Prostático Específico

RABP1: Proteína de Unión Ácido Retinoico 1

RABP2: Proteína de Unión a Ácido Retinoico 2

RBTa: Red de Banco de Tumores de Andalucía

REV-ERBa: NR1D1 (nuclear receptor subfamily 1, group D, member 1)

RM: Resonancia Magnética

ROR: Receptor del Ácido Retinoico relacionado con los receptores huérfanos

ROS: Especies de Oxígeno Reactivas

RZR: Receptor Z de Retinoides

SDS: Dodecilsulfato sódico

SDS- poliacrilamida: sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

SERM: Modulador Selectivo del Receptor de Estrógenos

SMAD: Factores de transcripción SMAD. Son las proteínas principales transductoras de las vías de señalización TGF- β (*transforming growth factor-beta*) y BMP (*bone morphogenic protein*)

SOD: Superóxido Dismutasa

TBS buffer: Tris-buffered solution

TBS/Tween buffer: Tris-tween 20-buffered solution

TGF: Factor de Crecimiento Transformante

TMB: Tetrametilbenzidina

TSOH: Test de Sangre Oculta en heces

TSOH-I: Test de Sangre Oculta en heces Inmunológico

TC: Tomografía Axial Computerizada

TGF β : Factor de Crecimiento Transformante β

TGF β 1: Factor de Crecimiento Transformante β 1

TNF α : Factor de Necrosis Tumoral α

Tris-HCL: tris (hidroximetil) aminometano- HCL

UBC: Ubiquinina C

uPA: Uroquinasa Activadora de Plasminógeno

UIC: Unión Internacional contra el Cáncer

VEGF: Factor de Crecimiento Endotelial Vascular

Vezf1: Vascular endothelial zinc finger 1

CONSENTIMIENTO INFORMADO – INFORMACIÓN AL PACIENTE

Antes de proceder a la firma de este consentimiento informado, lea atentamente la información que a continuación se le facilita y realice las preguntas que considere oportunas.

Naturaleza:

Importancia:

Implicaciones para el donante/paciente:

- La donación/participación es totalmente voluntaria.
- El donante/paciente puede retirarse del estudio cuando así lo manifieste, sin dar explicaciones y sin que esto repercuta en sus cuidados médicos.
- Todos los datos carácter personal, obtenidos en este estudio son confidenciales y se tratarán conforme a la Ley Orgánica de Protección de Datos de Carácter Personal 15/99.
- La donación/información obtenida se utilizará exclusivamente para los fines específicos de este estudio.

Riesgos de la investigación para el donante/paciente:

Si requiere información adicional se puede poner en contacto con nuestro personal de XXXXXX en el teléfono: XXX XXX XXX o en el correo electrónico: XXXX@XXXX.XX

CONSENTIMIENTO INFORMADO – CONSENTIMIENTO POR ESCRITO DEL PACIENTE

IMPLICACIÓN DE LA ENDOTELINA 1 EN EL MECANISMO DE INHIBICIÓN DE LA MELATONINA EN EL CÁNCER DE COLON

Yo _____ (Nombre _____ y
Apellidos):.....

- He leído el documento informativo que acompaña a este consentimiento (Información al Paciente)
- He podido hacer preguntas sobre el estudio <TÍTULO>
- He recibido suficiente información sobre el estudio <TÍTULO> He hablado con el profesional sanitario informador:
- Comprendo que mi participación es voluntaria y soy libre de participar o no en el estudio.
- Se me ha informado que todos los datos obtenidos en este estudio serán confidenciales y se tratarán conforme establece la Ley Orgánica de Protección de Datos de Carácter Personal 15/99.
- Se me ha informado de que la donación/información obtenida sólo se utilizará para los fines específicos del estudio.
- **Deseo** ser informado/a de mis datos genéticos y otros de carácter personal que se obtengan en el curso de la investigación, incluidos los descubrimientos inesperados que se puedan producir, siempre que esta información sea necesaria para evitar un grave perjuicio para mi salud o la de mis familiares biológicos.

Si No

Comprendo que puedo retirarme del estudio:

- Cuando quiera
- Sin tener que dar explicaciones
- Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos

Presto libremente mi conformidad para participar en el *proyecto titulado*
IMPLICACIÓN DE LA ENDOTELINA 1 EN EL MECANISMO DE INHIBICIÓN DE LA
MELATONINA EN EL CÁNCER DE COLON

Firma del paciente
(o representante legal en su caso)

Nombre y apellidos:.....
Fecha:

Firma del profesional
sanitario informador

Nombre y apellidos.....
Fecha: