



**UNIVERSIDAD DE GRANADA  
FACULTAD DE MEDICINA  
DEPARTAMENTO DE MEDICINA**

*Relación entre los niveles de expresión de  
los receptores de membrana de la  
melatonina y las diferencias de género en  
la progresión del cáncer colorrectal*

*Ana Maté Ambélez*

*Granada 2015*

Editorial: Universidad de Granada. Tesis Doctorales  
Autora: Ana Maté Ambélez  
ISBN: 978-84-9125-261-0  
URI: <http://hdl.handle.net/10481/41094>

Dr. FRANCISCO JAVIER SALMERÓN ESCOBAR, CATEDRÁTICO DE DIGESTIVO  
DEL DEPARTAMENTO DE MEDICINA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA  
UNIVERSIDAD DE GRANADA

CERTIFICA:

Que la Tesis Doctoral que presenta al superior juicio del Tribunal Dña. Ana Maté Ambélez sobre el tema *“Relación entre los niveles de expresión de los receptores de membrana de la melatonina y las diferencias de género en la progresión del cáncer colorrectal”* ha sido realizada bajo mi dirección, siendo expresión de la capacidad técnica y científica de su autor, en condiciones tan aventajadas que le hacen acreedor del título de Doctor, siempre que así lo considere el citado Tribunal.

Granada, a 29 de junio de 2015

Fdo. Dr. Javier Salmerón Escobar.



Dra. JOSEFA LEÓN LÓPEZ, TÉCNICO SUPERIOR DE APOYO A LA INVESTIGACIÓN DE LA UNIDAD DE INVESTIGACIONES MÉDICAS MORA LARA DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO SAN CECILIO DE GRANADA

CERTIFICA:

Que la Tesis Doctoral que presenta al superior juicio del Tribunal Dña. Ana Maté Ambélez sobre el tema *“Relación entre los niveles de expresión de los receptores de membrana de la melatonina y las diferencias de género en la progresión del cáncer colorrectal”* ha sido realizada bajo mi dirección, siendo expresión de la capacidad técnica y científica de su autor, en condiciones tan aventajadas que le hacen acreedor del título de Doctor, siempre que así lo considere el citado Tribunal.

Granada, a 29 de junio de 2015

Fdo. Dra. Josefa León López.



Dra. MARÍA ROSA QUILES PÉREZ, TÉCNICO SUPERIOR DE APOYO A LA INVESTIGACIÓN DE LA UNIDAD DE INVESTIGACIONES MÉDICAS MORA LARA DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO SAN CECILIO DE GRANADA

CERTIFICA:

Que la Tesis Doctoral que presenta al superior juicio del Tribunal Dña. Ana Maté Ambélez sobre el tema *“Relación entre los niveles de expresión de los receptores de membrana de la melatonina y las diferencias de género en la progresión del cáncer colorrectal”* ha sido realizada bajo mi dirección, siendo expresión de la capacidad técnica y científica de su autor, en condiciones tan aventajadas que le hacen acreedor del título de Doctor, siempre que así lo considere el citado Tribunal.

Granada, a 29 de junio de 2015

Fdo. Dra. María Rosa Quiles Pérez.





El doctorando, **Ana Maté Ambélez**, y los directores de la tesis, **Javier Salmerón Escobar**, **Josefa León López** y **Rosa Quiles Pérez**, 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, 19 de Junio de 2015

Director/es de la Tesis



Fdo.: Javier Salmerón Escobar



Fdo.: Josefa León López



Fdo.: Rosa Quiles Pérez

Doctorando



Fdo.: Ana Maté Ambélez



# *Agradecimientos*



Me gustaría dedicar la realización de esta tesis a mi familia.



# *Índice*





# ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	17
1. 1. CÁNCER COLORRECTAL.....	19
1.1.1. Epidemiología y generalidades.....	19
1.1.2. Etiopatogenia. Factores de riesgo.....	20
1.1.3. Diagnóstico.....	23
1.1.4. Clasificación. Estadíaaje.....	25
1.1.5. Factores pronóstico.....	27
1.1.6. Cribado.....	29
1.1.7. Tratamiento.....	31
1.2. MELATONINA.....	34
1.2.1. Biosíntesis.....	34
1.2.2. Distribución y metabolismo.....	37
1.2.3. Mecanismos de acción de la melatonina.....	38
1.2.3.1. Receptores de membrana.....	40
1.2.3.2. Receptores nucleares.....	42
1.2.3.3. Interacción con proteínas intracelulares.....	43
1.2.4. Melatonina y tracto gastrointestinal.....	45
1.2.5. Melatonina y cáncer.....	47
1.2.6. Melatonina y cáncer colorrectal.....	51
1.3. RECEPTORES HORMONALES Y C. COLORRECTAL.....	54
<b>2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b> .....	59
2.1. Hipótesis.....	61
2.2. Objetivos.....	62
<b>3. PACIENTES Y METODOLOGÍA</b> .....	63
3.1. Muestras de células tumorales colorrectales humanas.....	65
3.2. Cultivos celulares y reactivos.....	66
3.3. Extracción de ARN y síntesis de primera cadena de ADNc.....	67

3.4. Reacción transcripción inversa y PCR tiempo real (RT-PCR).....	68
3.5. Determinación de la concentración de proteínas.....	69
3.5.1. Método Bradford.....	69
3.5.2. Western Blotting.....	69
3.6. Ensayo de invasión <i>in vitro</i> .....	70
3.7. Ensayo MTT.....	71
3.8. Análisis estadístico.....	71
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>73</b>
4.1. Evaluación de la expresión del ARNm y proteínas de MT1, MT2 y ROR $\alpha$ en muestras de tumores colorrectales humanos.....	75
4.2. Evaluación de la expresión del ARNm y proteínas de ER $\alpha$ , ER $\beta$ y AR en muestras de tumores colorrectales humanos.....	77
4.3. Correlación de los niveles de ARNm de ER $\alpha$ , ER $\beta$ y AR con los niveles de MT1, MT2 ó ROR $\alpha$ .....	80
4.4. Expresión de MT1, MT2, ROR $\alpha$ , ER $\alpha$ , ER $\beta$ y AR en líneas celulares normales y de cáncer de colon, así como su relación con la capacidad invasiva de las células cancerígenas <i>in vitro</i> .....	82
4.5. Los agonistas MT1 y MT2 no selectivos inhiben el crecimiento celular y la capacidad invasiva de las células de cáncer de colon <i>in vitro</i> .....	85
<b>5. DISCUSIÓN.....</b>	<b>87</b>
<b>6. CONCLUSIONES.....</b>	<b>95</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>99</b>
<b>8. ANEXO.....</b>	<b>135</b>

# *Introducción*



## **1.1. CÁNCER COLORRECTAL**

### **1.1.1. Epidemiología y generalidades.**

El cáncer colorrectal (CCR) es una de las neoplasias más frecuentes en nuestro medio. En la actualidad, constituye la segunda neoplasia tanto en varones como en mujeres, tras el cáncer de pulmón y de mama, respectivamente. Cuando se consideran ambos sexos conjuntamente, ocupa el primer lugar en incidencia y representa la segunda causa de muerte por cáncer (Castells et al, 2009).

El riesgo de desarrollar un CCR a lo largo de la vida en un país desarrollado se ha estimado en 3,2% para las mujeres y 4,6% para los hombres (Chu et al, 1994). El relativo buen pronóstico del CCR lo sitúa, según las estimaciones mundiales citadas para el año 2000 (Parkin et al, 2001), en el segundo cáncer más prevalente en el mundo después del cáncer de mama.

España siempre ha estado situada entre los países con tasas intermedias de CCR, si bien es cierto que existen diferencias entre las distintas regiones (Parkin et al, 1992; Parkin et al, 1997; Parkin et al, 2002).

Se puede afirmar que la alta incidencia bruta del CCR en el mundo occidental es debida tanto a factores ambientales (la dieta rica en grasas y proteínas y pobre en fibra y vegetales, fundamentalmente) como al progresivo envejecimiento de la población (Ershler y Longo, 1997). Los estudios de emigrantes indican que el traslado desde un país de baja incidencia a uno de alta de CCR está asociado con un aumento del riesgo, y que la incidencia en los emigrantes masculinos tiende a aumentar más rápidamente que en las emigrantes femeninas, en ambos ya en la primera generación (Steinitz et al, 1989). Esta observación clásica es parte de la evidencia que demuestra que los factores ambientales juegan un papel importante en la etiología del CCR. En general, las tasas de CCR son más altas en los hombres que en las mujeres para todos los países (Parkin et al, 2002). El motivo de esta mayor incidencia en el sexo masculino con respecto al femenino ha llevado a diversos autores a emitir hipótesis sobre un posible papel protector de las hormonas femeninas, tanto endógenas como exógenas (Potter et al, 1993; Dos Santos y Swerdlow, 1996). La distribución por edades muestra un aumento de la incidencia del

CCR con la edad, fundamentalmente a partir de los 50 años. Según los diferentes registros de cáncer, hasta el 90% de los casos aparecen a partir de esta edad (Parkin et al, 1992; Parkin et al, 1997; Parkin et al, 2002; Ponz de León et al, 1999).

En la mayoría de países europeos la supervivencia del CCR en términos generales se sitúa entre el 50%-55% (Parkin et al, 2002), observando grandes diferencias con los registros estadounidenses, que muestran supervivencias de hasta un 65% (Altekruse, 2009), lo que hace dudar de su comparabilidad. Se ha observado que las tasas de supervivencia a 5 años aumentan en aquellas sociedades en las que se realizan de manera activa programas de prevención secundaria o cribado.

Por tanto, podemos afirmar que el CCR supone un gran problema de salud tanto a nivel social como individual y se hace patente la necesidad de aportar nuevos conocimientos que permitan la mejora de las actuaciones que se llevan a cabo para combatirlo. Dada la elevada incidencia del CCR, la mayoría de los esfuerzos se centran en el diagnóstico precoz llevado a cabo en los grupos de riesgo y, fundamentalmente, en la determinación de factores pronósticos que permitan predecir la evolución del tumor, así como nuevas terapias que consigan mayores tasas de curación.

### **1.1.2. Etiopatogenia. Factores de riesgo**

La etiología del CCR es compleja y multifactorial, estando implicados tanto factores ambientales como genéticos. La forma de CCR más frecuente es el de tipo esporádico (90%), existiendo casos con componentes hereditarios. Dentro del grupo de tumores de causa genética, entre un 5-10% se deben a una mutación de herencia autosómica dominante (Tomlinson et al, 2010). Las dos entidades más importantes son el síndrome de Lynch o cáncer colorrectal hereditario no polipósico (HNPCC) (5-10%) (Winawer et al, 1990) y la poliposisadenomatosa familiar (FAP) (0,01%), si bien existen otras como la poliposis hamartomatosa (síndrome de PeutzJeghers y el síndrome de poliposis juvenil) y la historia personal o familiar de adenomas previos. Para la población general el riesgo de padecer un CCR a lo largo de toda la vida es del 5% mientras que para los pacientes con FAP es de más del 95% y para los HNPCC del orden del 70% (Kinzler y Vogelstein, 1998).

El CCR predomina en el sexo masculino y la edad es un factor de riesgo fundamental, objetivándose un incremento brusco de la incidencia a partir de los 50 años. Sólo el 5% de los casos aparecen antes de los 40 años. El 40% de los tumores se diagnostican por encima de los 75 años y la incidencia se incrementa con la edad, duplicándose cada 7 años a partir de los 50 (Landherr, 2010). La raza también influye y así lo reflejan distintos estudios poblacionales que analizan las diferencias entre distintas razas en la población de EE.UU. o las diferencias geográficas entre unos países y otros, siendo 10 veces más frecuente en los países desarrollados frente a países en vías de desarrollo, pudiendo explicarse en parte esto último por la dieta y estilos de vida (Axon, 2008; Jass, 2002).

En cuanto a los factores ambientales se han descrito como factores de riesgo el mayor consumo de carne y grasas animales y menor consumo de fibra. En este sentido, una dieta baja en grasas no se asocia con una reducción del riesgo de CCR en la población de riesgo medio y elevado, sin embargo el consumo de carne roja y carne procesada sí se asocia con un mayor riesgo de CCR (Sandhu et al, 2001; Norat et al, 2002a; Norat et al, 2002b). La asociación de entre ingesta de fibra y CCR es controvertida, ya que en diversos estudios de casos y controles se ha mostrado una asociación inversa entre el consumo de fibra y el riesgo de CCR, que no se ha demostrado en la mayoría de estudios prospectivos (Riboli y Norat, 2003). En la población de riesgo medio, el efecto protector desaparece al ajustar por otros factores de riesgo dietético, mientras que en la población de riesgo elevado, la asociación podría ser significativa en varones (Jacobs et al, 2006). La ingesta de fruta y verduras se asocia, aunque no de forma significativa, con una reducción del CCR en la población de riesgo medio y elevado (Millen et al, 2007). Así mismo, la ingesta moderada-alta de leche y productos lácteos muestra un efecto protector en el colon distal (Cho et al, 2004). Teniendo en cuenta la importancia de la dieta en la génesis de este tumor, los datos de mortalidad en España sugieren unos hábitos dietéticos más saludables en las mujeres. Esta diferencia sería menos marcada en España en las generaciones más jóvenes.

La dieta rica en folato, en calcio y en vitamina D se asocia con la reducción de riesgo de CCR, aunque no es así en forma de suplementos. Una revisión Cochrane recientemente actualizada muestra que la administración de antioxidantes, en comparación con placebo, no modifica la incidencia de CCR (Bjelakovic et al, 2008) y, por tanto, tampoco se deben administrar suplementos de los mismos como prevención del CCR.

Existe evidencia de que la obesidad y una baja actividad física duplican el riesgo de presentar CCR (Slattery, 2004; Calle et al, 2003). El ejercicio físico ocupacional y recreativo en varones y el ejercicio físico recreativo en mujeres reduce el riesgo de CCR (Samad et al, 2005). La obesidad se asocia con un mayor riesgo de CCR, sobre todo en varones (Moghaddam et al, 2007) y la obesidad abdominal se asocia con riesgo de CCR en ambos sexos (Pischon et al, 2006).

Diversos estudios relacionan de igual forma la aparición de CCR con el consumo de alcohol y tabaco, por lo que también deben de ser considerados factores de riesgo (Tsoi et al, 2009; Toriola et al, 2008) . Por el contrario, el consumo de café parece disminuir el riesgo de padecer CCR, debido a su contenido de sustancias antimutagénicas y compuestos fenólicos, además aumenta la motilidad intestinal (Larsson et al, 2006).

El uso de antiinflamatorios no esteroideos (AINE) se asocia con una disminución del riesgo de CCR, los estudios epidemiológicos reportan disminución en la incidencia de adenomas, CCR y muerte por CCR (Clevers, 2006). En poblaciones de riesgo medio, la administración de ácido acetil salicílico (AAS) se asocia de forma consistente con la reducción de CCR, especialmente tras utilizarse durante 10 o más años, pero aunque la administración de AINE reduce el riesgo, también incrementa el riesgo de efectos adversos cardiovasculares, gastrointestinales y renales (Rostom et al, 2007)

Aunque inicialmente se sugirió una disminución del riesgo de CCR en mujeres posmenopáusicas que están bajo tratamiento de restitución hormonal (Kampman et al, 1997), estudios más recientes muestran que este efecto desaparece a los 3 años del cese del tratamiento, e incluso incrementa la incidencia de adenomas colorrectales y el riesgo de CCR (Heiss et al, 2008).

La enfermedad inflamatoria intestinal aumenta el riesgo de padecer CCR, multiplicando el riesgo por 10 respecto a la población general, proporcional al tiempo de evolución y extensión de la misma (Triantafyllidis et al, 2009; Leong et al, 2009; Vagefi y Longo, 2005).

La diabetes mellitus también se ha asociado a un aumento relativo del riesgo de presentar CCR, estimado en 1,5 veces en comparación con la población no diabética (Larsson et al, 2005). En un metaanálisis de estudios de cohortes se muestra un exceso de riesgo de CCR asociado con valores de péptido C, insulina circulante y marcadores de glucemia (Pisani, 2008).



### 1.1.3. Diagnóstico

Un porcentaje significativo de pacientes se diagnostica a raíz de presentar manifestaciones clínicas relacionadas con esta neoplasia, por lo tanto es importante identificar los síntomas y signos de sospecha con el fin de realizar las pruebas diagnósticas necesarias. Los síntomas y signos con valor predictivo positivo (VPP) elevado son la rectorragia con cambio en el ritmo de las deposiciones (frecuencia aumentada o menor consistencia), rectorragia sin síntomas anales, masa abdominal o rectal palpable y la oclusión intestinal. La anemia ferropénica también puede ser una forma de presentación del CCR (Helfand et al, 1997), aunque generalmente se asocia a retraso en el diagnóstico (Goodman et al, 1993). La edad es un factor que modifica de manera significativa el VPP de todos los síntomas y signos de sospecha de CCR. Mientras que el VPP de la rectorragia se estima en un 2% para el grupo de edad entre 40-59 años, en el grupo de 70-79 años se sitúa en el 21% (Hamilton et al, 2005; Fijten et al, 1995).

Ante la sospecha clínica es fundamental la realización de una completa anamnesis y exploración física, recogiendo los datos de la historia clínica y familiar de interés como los antecedentes familiares de cáncer y de poliposis, así como la presencia de síntomas como rectorragia, cambios de ritmo intestinal, tenesmo rectal, dolor, sensación de masa abdominal o pélvica y existencia de cuadro constitucional.

La prueba definitiva es la colonoscopia, que permite visualizar, localizar y caracterizar el tumor mediante la toma de biopsia. Permite de igual modo descartar la presencia de lesiones sincrónicas.

La ecografía endorrectal está indicada en los casos de tumoración rectal con el fin de determinar la afectación transmural (T) y la eventual presencia de adenopatías locorregionales (N). La analítica sanguínea (hematimetría y bioquímica básica) permite detectar la presencia de anemia. Los marcadores tumorales que suelen incrementarse en el CCR son el antígeno carcinoembrionario (CEA) y el Ca 19.9 que se eleva también en otras neoplasias de origen digestivo. Los valores de CEA tienen valor pronóstico al diagnóstico y son de utilidad en el seguimiento post tratamiento.

Las distintas pruebas de imagen completarán la caracterización de la tumoración primaria así como permitirán estudiar la diseminación tumoral

estableciendo el estadio TNM. Las técnicas más adecuadas para la estadificación del cáncer rectal serían:

- Radiografía de tórax: detecta posibles metástasis pulmonares y/o pleurales.
- Ecografía abdominal: puede ser útil en el caso de valorar lesiones ocupantes de espacio hepática visualizadas mediante TC, para confirmar su carácter quístico.
- Tomografía computerizada (TC): es útil para la valoración de la extensión regional del tumor, metástasis linfáticas regionales y a distancia, invasión de estructuras vasculares, y complicaciones secundarias al crecimiento tumoral (obstrucción, perforación, fistulas). La sensibilidad para la detección de metástasis viscerales es mayor (75-87%) que para las adenopatías (45-75%) o la invasión transmural (50%). Por tanto, para el estadiaje estaría indicada sobre todo para valoración de MTS a distancia (hepáticas y pulmonares fundamentalmente) aunque también puede realizar estadificación local regional. Con los nuevos escáneres multicorte la precisión diagnóstica según las diferentes series para la estadificación de la T y de la N es de hasta un 87% y 85% respectivamente. Presenta algunas deficiencias sobre todo a la hora de diferenciar las capas de la pared rectal, valorar la afectación de la fascia mesorrectal, así como en la valoración ganglionar de los ganglios mesorrectales frente otras técnicas como la resonancia magnética nuclear (RMN) y la ecoendoscopia. Además su sensibilidad y especificidad para la valoración de los márgenes tumorales disminuye con los tumores más distales (recto medio-bajo).
- RMN: La RMN de alta resolución es la mejor técnica para predecir los márgenes de resección circunferenciales previo a la cirugía, por ejemplo, en los tumores que infiltran el mesorrecto. Es el “goldstandard” para la valoración de la afectación transmural, determinar los márgenes de resección e identificar los ganglios mesorrectales afectados, independientemente de la distancia al margen anal del tumor. Presenta una precisión diagnóstica para la estadificación de T y N según las diferentes series del 75-85% y del 57-85% respectivamente. Además es la única técnica que consigue detectar afectación vascular extramural, que está asociada a una alta tasa de recurrencia y mortalidad.
- Ecoendoscopia: La principal indicación de la ultrasonografía endoscópica (USE) en la estadificación precisa de los tumores poco invasivos, es decir, T0, T1 y T2, así como para valorar la afectación esfinteriana en los tumores de recto inferior. La precisión de la USE para la estadificación para T y N es de 80-95% y 61-82%, respectivamente, superior a la de la TC y la RM en algunas series. Así

mismo descarta la afectación de planos profundos y adenopatías en el caso de pólipos neoplásicos extirpados. También tiene utilidad en el seguimiento post tratamiento, ya que junto con colonoscopias de control y determinaciones de CEA consigue una mayor detección de recidivas, ya que la USE es una técnica muy sensible en la detección precoz de recidivas, aunque el seguimiento mediante USE todavía no está establecido. Como limitaciones de la USE estarían: disminución de la sensibilidad para la re-estadificación post-tratamiento neoadyuvante (sobre todo en aquellos que responden a tratamiento) debido a la dificultad para diferenciar cambios inflamatorios de persistencia de tejido tumoral y la necesidad de ser realizada por personal entrenado (sensibilidad y especificidad del 93% y 83% en un ecoendoscopista experto frente a 75% y 46% en ecoendoscopistas poco entrenados). Esta técnica puede verse afectada por la localización del tumor, de manera que tumores en recto alto presenten mayores dificultades técnicas.

- La tomografía por emisión de positrones (PET) es una técnica que no aporta más información que la TC en la estadificación prequirúrgica. Su utilidad viene determinada para la localización de enfermedad recurrente en pacientes con CEA elevado. Es capaz de distinguir entre recurrencia local y cambios postquirúrgicos. En aquellos pacientes con CEA elevado y sospecha de metástasis con diagnóstico de imagen por otras técnicas negativo, la PET puede localizar la enfermedad oculta, permitiendo la selección de aquellos pacientes que se beneficiarían de laparotomía exploradora. Además el PET-TC es superior a la TC y a la RM a la hora de valorar respuesta al tratamiento neoadyuvante, con una sensibilidad del 100% a la hora de valorar respuesta comparado con un 71% para la RM y un 54% en el caso de la TC. Los cambios posttratamiento no interfieren con esta técnica.

#### **1.1.4. Clasificación. Estadiaje**

Una vez se ha establecido el diagnóstico de CCR es necesario evaluar la extensión local y a distancia para determinar el estadio tumoral y poder valorar el pronóstico y las estrategias terapéuticas a seguir.

En el momento actual, la clasificación de elección es la TNM (tablas 1 y 2), cuya última actualización en 2010 (Edge et al, 2010) incluye como modificación sobre la anterior de 2002 la subdivisión de T4, N1, N2 y M1 en subcategorías para una mejor estadificación.

***Tumor primario***

Tx	No se puede determinar
T0	No evidencia de tumor primario
Tis	Carcinoma in situ: intraepitelial o invasión de la lámina propia
T1	Tumor infiltra la submucosa
T2	Tumor infiltra la muscular propia
T3	Tumor invade la muscular propia hasta los tejidos pericorectales
T4a	Tumor infiltra superficie de peritoneo visceral
T4b	Tumor infiltra o está en estrecho contacto con órganos/ estructuras vecinas

***Afectación ganglionar***

Nx	No se puede determinar
N0	No hay adenopatías metastásicas
N1	Metástasis en 1-3 ganglios regionales
N1a	Metástasis en 1 ganglio regional
N1b	Metástasis en 2-3 ganglios regionales
N1c	Implantes tumorales en la subserosa, mesenterio, tejido pericorectal no recubierto de peritoneo sin metástasis ganglionares regionales
N2	Metástasis en 4 o más ganglios regionales
N2a	Metástasis en 4-6 ganglios regionales
N2b	Metástasis en 7 o más ganglios regionales

***Metástasis a distancia***

M0	No existen metástasis a distancia
M1	Metástasis a distancia
M1a	Metástasis en 1 órgano (hígado, pulmón, ovario, ganglios no regionales)
M1b	Metástasis en más de un órgano o en peritoneo

**Tabla 1.** Estadificación TNM, 2010.

<b>Estadio</b>	<b>T</b>	<b>N</b>	<b>M</b>
<b>0</b>	Tis	N0	M0
<b>I</b>	T1	N0	M0
	T2	N0	M0
<b>IIA</b>	T3	N0	M0
<b>IIB</b>	T4a	N0	M0
<b>IIC</b>	T4b	N0	M0
<b>IIIA</b>	T1-2	N1/N1c	M0
	T1	N2a	M0
<b>IIIB</b>	T3-T4a	N1/N1c	M0
	T2-T3	N2a	M0
	T1-T2	N2b	M0
<b>IIIC</b>	T4a	N2a	M0
	T3-T4a	N2b	M0
	T4b	N1-N2	M0
<b>IVA</b>	Cualquier T	Cualquier N	M1a
<b>IVB</b>	Cualquier T	Cualquier N	M1b

**Tabla 2.** Grupos pronóstico, 2010.

### 1.1.5. Factores pronóstico

La supervivencia de los pacientes con cáncer, medida como proporción de casos que logran sobrevivir un tiempo preestablecido (uno, tres, cinco años, por ejemplo) es el indicador más importante de la eficacia del sistema asistencial en la lucha contra el cáncer. Este indicador refleja en qué medida, los casos son diagnosticados en un estadio potencialmente curable y el grado de eficacia de los procedimientos terapéuticos (Cabanes Domenech, 2009). El pronóstico de cualquier enfermedad neoplásica generalmente viene definido como la supervivencia a los 5 años. Se consideran factores pronósticos o marcadores de riesgo las variables que nos informan acerca del comportamiento biológico del tumor y que nos permiten tomar una actitud más o menos agresiva en cuanto al seguimiento y tratamiento del mismo

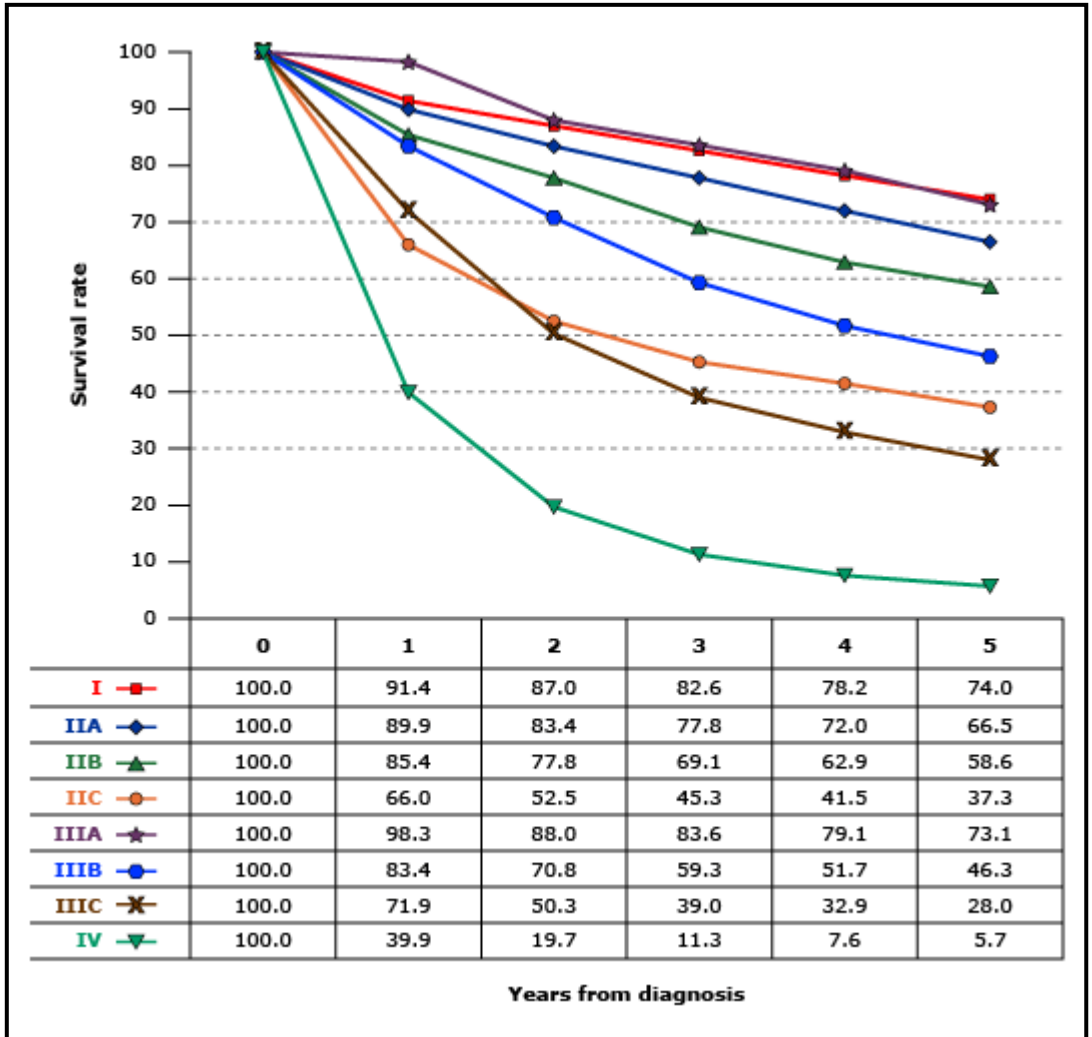
(Maestro de las Casas et al, 1997). En el CCR son fundamentales ya que dada la elevada incidencia de recurrencia posoperatoria es necesario identificar los subgrupos de pacientes con peor pronóstico con el fin de proporcionarles quimioterapia adyuvante (Gennari et al, 2000; Abad et al, 1997).

Los factores que influirán de forma determinante en el pronóstico de la enfermedad son el momento evolutivo del proceso (estadificación), el tratamiento recibido, el estado clínico y las características intrínsecas del tumor. El mejor indicador pronóstico es la combinación del grado de invasión tumoral local y la afectación ganglionar a distancia. El pronóstico individual de cada paciente se puede evaluar partiendo de los datos clínicos, biológicos y de respuesta al tratamiento (Casado et al, 2005; Mehrkhani et al, 2009).

El factor pronóstico más importante tras la resección tumoral es la estadificación tumoral en el momento de presentación (Edge et al, 2010; Chen et al, 2014). Actualmente la estadificación de elección es la última clasificación TNM (tablas 1 y 2 en el apartado de clasificación).

Otros marcadores de mal pronóstico serían la invasión linfovascular y la existencia de tumor residual tras la resección. Los niveles del marcador tumoral antígeno carcinoembrionario (CEA) preoperatorios son también indicador pronóstico ya que valores  $\geq 5\text{ng/mL}$  indican un mal pronóstico, independientemente del estadio tumoral (Park et al, 2009). La implicación clínica de los niveles preoperatorios de CEA está todavía por determinar y aunque todavía no está recogida en la nueva clasificación TNM de 2010, sí se recomienda su medición como factor pronóstico, así como se indica la posibilidad de incluirla en futuras clasificaciones de estadificación (Compton et al, 2000; Chen et al, 2014).

La supervivencia a 1, 2, 3, 4 y 5 años según la última clasificación TNM viene representada en la figura 1, con datos de pacientes entre 1975 y 2000 de la American Joint Committee on Cancer (AJCC) de 2010.



**Figura 1.** Data from the SEER 1973-2005 Public Use File diagnosed in years 1998-2000. Stage I includes 7417; Stage IIA, 9956; Stage IIB, 997; Stage IIC, 725; Stage IIIA, 868; Stage IIIB, 1492; Stage IIIC, 2000; and Stage IV, 5036.

### 1.1.6. Cribado

El CCR es una entidad susceptible de cribado ya que constituye un problema de salud importante por su elevada incidencia y morbilidad asociada, se conoce su historia natural, se dispone de pruebas de cribado que

permiten detectar la enfermedad en fases iniciales y el tratamiento es más efectivo cuando la lesión se diagnostica en un estadio temprano. El objetivo del cribado es, por tanto, reducir la incidencia y la mortalidad por esta causa.

Una vez establecidas las tasas de incidencia poblacionales de CCR se ha comprobado que las tasas de supervivencia a 5 años aumentan en aquellas sociedades donde se realizan de manera activa programas de prevención secundaria o cribado. Basándonos en datos americanos posteriores a 1987 se observa que el screening consigue una disminución de la mortalidad del 53% (Edwards et al, 2010; Centers for Disease Control and Prevention, 2008).

Además de realizar prevención primaria, principalmente con cambios en la dieta y modificaciones en hábitos de conducta, los programas de prevención secundaria (cribado poblacional) son las herramientas más eficaces en la reducción de la morbimortalidad del CCR.

Cuando un individuo presenta síntomas o signos que indican la sospecha de un CCR no se considera tributario de medidas de cribado. En esta circunstancia debe efectuarse una exploración diagnóstica adecuada con el fin de confirmar o descartar esta enfermedad. Para la valoración del riesgo de un individuo en relación con el desarrollo de CCR es fundamental la evaluación de los antecedentes personales y/o familiares. Para ello, debe realizarse una correcta historia clínica que recoja los antecedentes de CCR o adenomas colorrectales en el propio individuo y en familiares de primer (padres, hermanos e hijos), segundo (abuelos, tíos y sobrinos) y tercer grado (bisabuelos y primos). En ausencia de antecedentes personales y/o familiares, la edad del individuo es la condición más determinante del riesgo de CCR. Los individuos menores de 50 años sin factores de riesgo adicionales presentan un riesgo de CCR bajo y no se consideran tributarios de intervenciones de cribado para esta neoplasia. Por el contrario, se considera población de riesgo medio en relación con el CCR a los individuos de edad  $\geq$  50 años sin factores de riesgo adicionales. En esta situación debe recomendarse el cribado de CCR mediante detección de sangre oculta en heces anual o bianual y/o sigmoidoscopia cada 5 años, o colonoscopia cada 10 años. Los individuos con factores de riesgo personal y/o familiar para el desarrollo de CCR se consideran de riesgo elevado y son tributarios de programas de cribado o vigilancia específicos. Cuando en un determinado individuo coexistan ambos tipos de factores, la estrategia de prevención del CCR deberá ir dirigida a la situación de mayor riesgo (Grupo de trabajo de la guía de práctica clínica de prevención del cáncer colorrectal. Actualización 2009).



Se han establecido diferentes estrategias de cribado que incluyen la detección de sangre oculta en heces (SOH) con el método del guayaco, la sigmoidoscopia y la colonoscopia. Las nuevas pruebas de cribado incluyen la detección inmunológica de SOH, el análisis de ADN fecal y la colonoscopia virtual. Aún no se ha establecido la estrategia de cribado idónea, ya que según el test primario que utilicemos la eficacia puede variar por la misma capacidad diagnóstica del test así como del medio en el que se aplica. El grupo de trabajo para la práctica clínica de prevención del cáncer colorrectal establece algunas recomendaciones en base a la evidencia científica de los distintos métodos de cribado. Dentro de estas recomendaciones se establece que la detección de SOH es una prueba eficaz y debe ser considerada en el cribado de CCR mientras que el enema opaco de doble contraste no debería ser considerado en el cribado de CCR. Así mismo, la sigmoidoscopia flexible es una prueba eficaz, aunque la detección de un pólipo adenomatoso distal requiere la realización de una colonoscopia completa. La colonoscopia es una prueba eficaz y el intervalo entre colonoscopias debería ser, por lo menos, de 10 años, siempre y cuando la colonoscopia se realice bajo sedación, en condiciones de limpieza correcta, alcanzando polo cecal y con un tiempo de retirada igual o superior a 6-8 minutos. Por otro lado la colonografía TC precisa de más evaluaciones sobre los beneficios, costes y aceptabilidad antes de ser incluida en protocolos de cribado.

### **1.1.7. Tratamiento**

El tratamiento del CCR va a depender de si la enfermedad está confinada al colon-recto, o si presenta enfermedad diseminada.

#### **CCR localizado**

*Cirugía:* El pilar fundamental del tratamiento es la cirugía, que debe realizarse siempre que las condiciones del paciente lo permitan. Debe de incluir unos requisitos mínimos para que técnicamente sea correcta: que los márgenes de seguridad sean amplios, que se extirpen al menos 12 ganglios y realizar la excisión total del mesorrecto en el caso del cáncer de colon.

La técnica quirúrgica a emplear dependerá de la localización del tumor primario: hemicolectomía derecha o izquierda más o menos ampliadas. En el caso de que el tumor se localice en el recto superior y medio, se realizará una resección anterior, dejando la amputación abdominoperineal para cuando se localice en el tercio inferior. En los casos que el tumor produce un cuadro obstructivo intestinal hay que realizar una resección del tumor en bloque con colostomía del muñón cólico proximal y cierre del muñón distal (intervención de Hartmann), con posibilidad de realizar la anastomosis intestinal en un segundo tiempo.

*Tratamiento adyuvante y neoadyuvante:* A pesar de un adecuado tratamiento quirúrgico, existe una elevada tasa de recaídas, llegando incluso al 30-40% en los casos N0. Por otro lado, la proporción de pacientes intervenidos de CCR que desarrollarán enfermedad metastásica o localmente avanzada es mayor del 50%. Estas cifras justifican sobradamente el empleo del tratamiento quimioterápico adyuvante (Wolpin et al, 2007; Carrato, 2008), basado en el empleo de terapias combinadas (FOLFOX-4, XELOX, XELODA, etc) de los diferentes agentes quimioterápicos (5-fluoracilo, oxiplatino, leucovorin, irinotecan y fluoropirimidinas orales). El papel de la quimioterapia adyuvante en pacientes en estadio III está plenamente demostrado, estando los criterios de aplicación en pacientes con estadio II en continua revisión (de Gramont et al, 2007; André et al, 2009; Morris et al 2007). Lo que sí parece claro es que la mayoría de los oncólogos opta por el tratamiento adyuvante en pacientes en estadio II de alto riesgo (perforación, obstrucción intestinal, lesiones T4, alto grado histológico, CEA elevado, invasión vascular o neural, menos de 12 ganglios analizados). En el caso particular del cáncer de recto se administra radioterapia adyuvante debido al elevado riesgo de recidiva local.

Muchos de los esfuerzos que se están llevando a cabo hoy en día en la investigación oncológica van encaminados a encontrar factores predictivos de una buena respuesta al tratamiento quimioterápico, que permita seleccionar mejor a los pacientes a los que se les va a administrar el tratamiento. Entre otros se encuentran las mutaciones del gen k-ras, la presencia de inestabilidad de microsatélites y las pérdidas de heterocigosidad en los cromosomas 8p y 18q, así como la búsqueda nuevos fármacos que potencien el tratamiento quimioterápico como es el caso de la melatonina (Lissoni et al, 1999; Vijayalaxmi et al, 2002; Hong et al, 2014).

Existe otra modalidad de tratamiento que es la terapia neoadyuvante, aplicada en el caso de carcinoma rectal, mediante quimio y radioterapia en los pacientes a partir de estadios IIIA.

### **CCR metastásico**

*Tratamiento sistémico quimioterápico:* entre el 25-50% de los pacientes que inicialmente tenían enfermedad localizada desarrollarán metástasis a lo largo de su evolución, siendo la localización hepática la más frecuente. Los avances terapéuticos desarrollados en la actualidad permiten considerar a muchos de estos pacientes en estadio IV subsidiarios de un tratamiento curativo con regímenes de terapia sistémica combinada (Poston et al, 2005; Okines et al, 2009).

Existen en el momento actual varios regímenes de terapia sistémica basados en la combinación de los agentes quimioterápicos (5 fluoracilo, oxaliplatino, irinotecán, capecitabina, bevacizumab y cetuximab) con indicaciones aprobadas y que han conseguido doblar las tasas de supervivencia global, consiguiendo respuesta en hasta un 50% de los pacientes, siendo la supervivencia libre de progresión de cerca de un año en algunos casos.

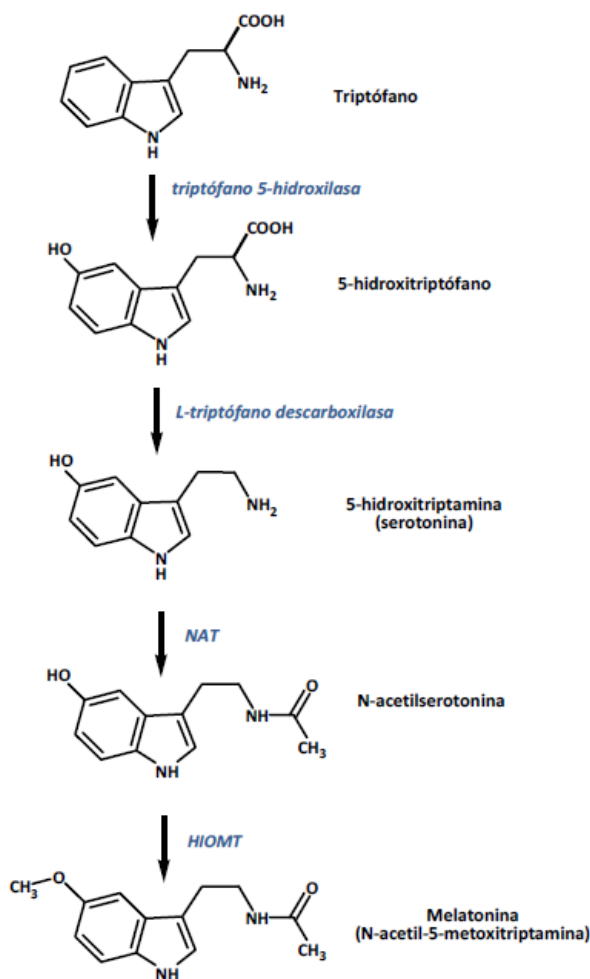
*Tratamiento quirúrgico:* a pesar de tratarse de pacientes en estadio IV, la cirugía cobra cada vez más un importante papel en el tratamiento del CCR. La resección de las metástasis hepáticas cuando son la única localización de la enfermedad diseminada produce tasas de supervivencia a los cinco años de hasta el 58% (Smith et al, 2009). El tratamiento neoadyuvante puede convertir en resecables hasta el 20% de los pacientes que inicialmente no lo eran, alcanzando una supervivencia a los diez años del 23% (Poston et al, 2005; Chun et al, 2007; Abad et al, 2008; Adam et al, 2004; Fusai et al, 2003). A nivel local se puede realizar tratamiento quirúrgico de las complicaciones tumorales como son la estenosis intestinal, mediante el implante de prótesis metálicas autoexpandibles, estando contraindicadas si existe perforación o una distancia menor de 5 cm con el margen anal.

*Radioterapia:* el tratamiento radioterápico queda reservado como tratamiento paliativo del dolor en caso de metástasis óseas o en caso de diseminación cerebral sintomática (Aprile et al, 2009), así como tratamiento paliativo local en el cáncer de recto.

## 1.2. MELATONINA

### 1.2.1. Biosíntesis

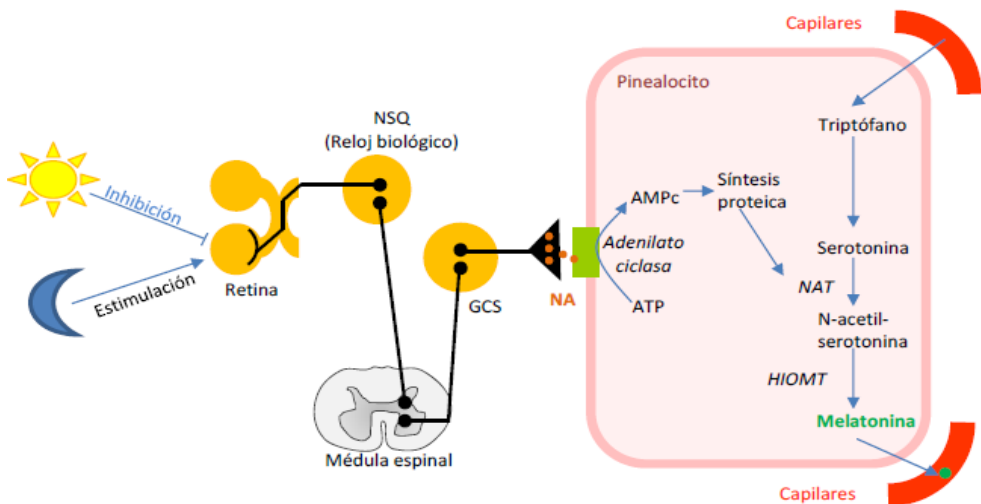
La melatonina o N-acetil-5-metoxitriptamina es una indolamina descrita por primera vez por McCord y Allen en 1917 y aislada por Lerner en 1958 a partir de extractos de la glándula pineal. Su síntesis, en el pinealocito, depende de las condiciones lumínicas (con valores mínimos diurnos y máximos nocturnos) y se desarrolla en cuatro reacciones. El triptófano entra en el pinealocito desde los capilares sanguíneos a través de un transporte activo bajo control adrenérgico y sufre una hidroxilación en posición 5 por acción de la triptófano-5-hidroxilasa. Este paso limitante en la síntesis ocurre en la mitocondria y requiere de una pteridina como cofactor, posiblemente la tetrahidrobiopterina, molécula que alcanza concentraciones elevadas en la glándula pineal (Sitaram y Lees, 1978). Se ha descrito una pequeña variación circadiana de la actividad de la triptófano-5-hidroxilasa, ligeramente mayor durante la noche (Wurtman et al, 1971). Además la cantidad de sustrato también puede ser un factor clave en la síntesis del 5-hidroxitriptófano (5-HTP). La mayor parte del 5-HTP se convierte en serotonina o 5-hidrotriptamina gracias a la intervención de la L-triptófano descarboxilasa. Esta enzima está localizada en el citosol del pinealocito y de otras estirpes celulares. Su actividad está regulada por la iluminación ambiental a través de fibras simpáticas y requiere el piridoxal fosfato como cofactor (Snyder et al, 1964). Tras ello, la serotonina puede desaminarse por acción de la monoamino oxidasa (MAO) o convertirse en melatonina por la acción de dos enzimas que actúan sucesivamente: la arilalquilamina-N-acetiltransferasa (AA-NAT), que presenta un marcado ritmo circadiano y que al transferir a la serotonina un grupo acetilo del cofactor acetil coenzima A da lugar a la N-acetilserotonina. A continuación la enzima hidroxindol-O-metiltransferasa (HIOMT) transfiere un grupo metilo de un cofactor S-adenosil-metionina, dando como resultado la N-acetil-5-metoxi-triptamina o melatonina (Figura 2).



**Figura 2.** Biosíntesis de melatonina a partir de triptófano. NAT: N-acetil-transferasa, HIOMT: hidroxil-O-metiltransferasa (Fuentes, 2008)

La actividad de la AA-NAT determina el ritmo pineal de producción hormonal y puede regularse mediante su expresión génica o mediante la activación y estabilidad de la enzima (Hardeland, 2008). La expresión de la enzima está controlada por el núcleo supraquiasmático del hipotálamo, a través del tracto retinohipotalámico. Esta vía comienza en la retina y continúa a través de los axones de las células ganglionares (Lewy et al, 1980; Smith et al, 1981). En el quiasma óptico estas fibras se separan del tracto óptico

principal para dirigirse al núcleo supraquiasmático. Este núcleo proyecta al núcleo paraventricular del hipotálamo, desde donde se dirige a la columna intermediolateral de la médula espinal torácica, origen de las terminaciones pregangliónicas que alcanzan al ganglio cervical superior (Cardinali et al, 1981). Finalmente las fibras postganglionares se introducen en el parénquima pineal y llegan a los pinealocitos en una relación anatómica que recuerda a una estructura sináptica (Figura 3).



**Figura 3.** Vía nerviosa de regulación de la síntesis de melatonina. NSQ: Núcleo supraquiasmático, GCS: Gangliocervical superior, NA: Noradrenalina, NAT: N-acetil-transferasa, HIOMT: hidroxiindol-O-metiltransferasa (Fuentes, 2008)

El estímulo lumínico durante el día mantiene hiperpolarizados a los fotorreceptores, lo que impide la liberación al final de la vía nerviosa de noradrenalina. En ausencia de luz, los fotorreceptores generan potenciales de acción conducidos por esta vía neuronal hasta los terminales simpáticos que liberan noradrenalina que se une a receptores adrenérgicos  $\alpha_1$  y  $\beta_2$  del pinealocito (Reiter, 1991a). Esta unión desencadena una reacción bioquímica intracelular que se traduce en un incremento de la expresión y actividad de la AA-NAT, con la consecuente elevación de las concentraciones de N-acetilserotonina y melatonina (Hardeland et al, 1993).

### 1.2.1. Distribución y metabolismo

La estructura indólica de la melatonina la hace una molécula bastante liposoluble, que atraviesa fácilmente por difusión simple la bicapa de la membrana del pinealocito. Esto determina que el estímulo de la síntesis de melatonina en la glándula pineal eleve rápidamente sus niveles en plasma y en todos los compartimentos del organismo (Reiter, 1991b).

La melatonina se libera al torrente vascular alcanzando fluidos, tejidos y compartimentos celulares, como el cerebro, la saliva, orina, folículos preovulatorios, semen, líquido amniótico y leche materna. La melatonina se transporta en el plasma, en parte unida a la albúmina (70%) y en parte en forma libre (30%). Su vida media en plasma oscila entre 20 y 40 minutos, aunque los niveles plasmáticos de melatonina están condicionados por la duración del ciclo luz/oscuridad siguiendo un ritmo circadiano, con concentraciones altas durante la noche y basales durante el día (Pang et al, 1980; Aimoto et al, 1985; Menéndez-Peláez et al, 1987; Reiter, 1991a). Además del ritmo circadiano, los niveles de la melatonina también dependen de la edad de manera que su producción no es constante a lo largo de toda la vida sino que comienza a los tres o cuatro meses de edad, aumentado hasta alcanzar su máximo entre los ocho y diez años, para posteriormente volver a disminuir bruscamente con los cambios puberales y ya en el individuo adulto la concentración nocturna de melatonina va descendiendo paulatinamente hasta que por encima de los setenta años los niveles de hormona no superan el 10% de los prepuberales (Guerrero et al, 2007).

La melatonina se metaboliza principalmente en el hígado donde se transforma en 6-hidroximelatonina, gracias a la acción de las enzimas del citocromo P450, como CYP1A2, CYP1A1 o CYP1B1 (Ma et al, 2005) y se elimina por la orina al hacerse más hidrosoluble tras la conjugación hepática con anión sulfato o con ácido glucurónico (Hardeland et al, 1993), siendo su principal metabolito la 6- sulfatoximelatonina (50-80%) mientras que tan solo un 5-30% es derivado glucurónico (Ma et al, 2008). Estos metabolitos pueden encontrarse en sangre y orina (Guerrero et al, 2007).

La melatonina también puede seguir otras rutas catabólicas, como la desacetilación, principalmente en la retina, aunque también en el hígado (Galzin et al, 1988; Grace et al, 1991). Es posible su transformación en kinureninas mediante la ruptura oxidativa de su anillo pirrólico, lo que ocurre

en la glándula pineal y el cerebro donde da lugar a N1-acetil-N2-formil-5-metoxikinurenamina (AFMK) y a N1-acetil-5-metoxikinurenamina (AMK), molécula estable que se puede eliminar por la orina (Seever y Hardeland, 2008). Estos productos resultantes del metabolismo de la melatonina en el cerebro son también productos secundarios cuando la melatonina actúa como depurador de radicales libres (Hirata et al, 1974). Es interesante el hecho de que los principales metabolitos de melatonina en cerebro, AFMK y AMK, también manifiestan importantes propiedades antioxidantes (Tan et al, 2001; Tan et al, 2003; Mayo et al, 2005), por lo tanto no sólo la melatonina, como veremos más adelante, sino también sus metabolitos son altamente eficientes en reducir el daño producido por los radicales libres. Nos referimos a ésta como la “cascada antioxidante de la melatonina”, un proceso que incrementa mucho la eficiencia de su ubicua actividad como depurador de radicales libres y antioxidante.

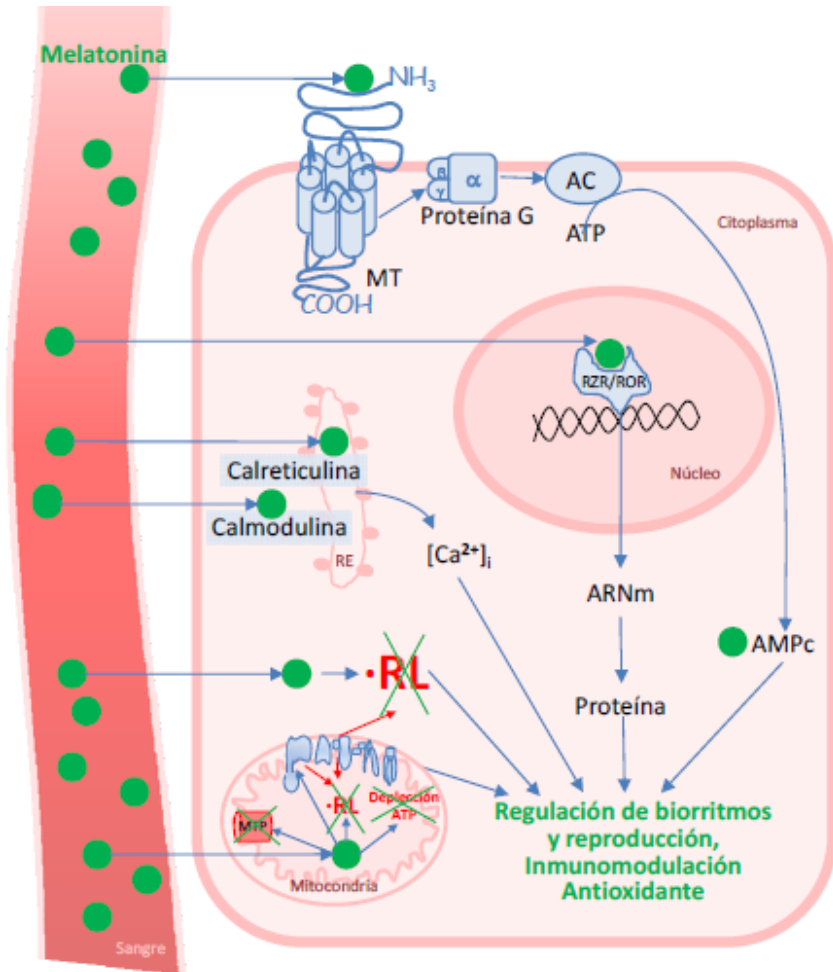
### **1.2.3. Mecanismos de acción de la melatonina**

La melatonina realiza múltiples funciones, como la sincronización del metabolismo con el ritmo circadiano, la inducción al sueño, acciones vasorreguladoras e incluso tiene efectos inmunomoduladores. Entre todos cabe destacar su efecto antioxidante y antitumoral. También interviene en la maduración sexual y en el envejecimiento, de manera que su producción no es constante a lo largo de toda la vida sino que como ya se ha comentado varía a lo largo de la vida, con su máximo sobre los 8-10 años, descendiendo posteriormente y manteniendo un ritmo circadiano hasta que en la época adulta, entre los 45 y 65 años, decae de manera que se igualan progresivamente los niveles séricos diurnos y nocturnos (Reiter, 1995).

Salvo su efecto antioxidante, la mayoría de sus efectos están mediados a través de receptores pertenecientes a la superfamilia de receptores de 7 dominios transmembrana acoplados a proteína G y a través de receptores nucleares pertenecientes a la subfamilia de los receptores retinoicos RZR/ROR (Guerrero et al, 2007). Además, debido a que se trata de una molécula liposoluble, la melatonina atraviesa con facilidad la membrana plasmática, pudiendo interactuar directamente sobre proteínas citosólicas como la calmodulina, la proteína C quinasa y la proteína MT3, así como sobre radicales libres (Guerrero et al, 2007).



Así, los mecanismos de acción de la melatonina pueden dividirse en dos, aquéllos que están mediados por su unión a un receptor, ya sea de membrana o nuclear, y aquéllos que se realizan de forma independiente de receptor, como la interacción con proteínas intracelulares y la actividad antioxidante (Figura 4).



**Figura 4.** Resumen de los principales mecanismos de acción y funciones de melatonina. MT: Receptor de membrana de melatonina, AC: Adenilatociclasa, RZR/ROR: Receptores nucleares de melatonina, ·RL: Radicales libres, MTP: Poro de permeabilidad transitoria mitocondrial, RE: Reticulo endoplásmico (Fuentes, 2008).

### **1.2.3.1. Receptores de membrana**

Se han clonado ya tres receptores de membrana de la melatonina; los receptores MT1, MT2 y MT3. El receptor MT1 consta de 350 aminoácidos y el receptor MT2 de 362 y presentan un 60% de homología en su secuencia de aminoácidos, mientras que el receptor MT3 presenta 420. A pesar de esta homología, los receptores MT1 y MT2 activan vías de señalización diferentes (von Gall et al, 2002; Witt-Enderby et al, 2003); mientras que los receptores MT1 están acoplados a proteínas G que median la inhibición de la adenilatociclasa y la activación de la fosfolipasa C beta, los receptores MT2 se acoplan a numerosas vías de transducción de señales, incluyendo la producción de inositoltrifosfato, la inhibición de la adenilatociclasa y la inhibición de la vía soluble de la guanilatociclasa (Bondi et al, 2008; Chan et al, 2002; Ho et al, 2001; Boutin et al, 2005).

Los receptores MT1 se expresan en cerebro, abundantemente en el núcleo supraquiasmático, el hipotálamo mediobasal, y la porción tuberal de la adenohipófisis (Vanecek, 1988; Williams y Morgan, 1988; Weaver et al, 1989). Además están presentes en otras regiones del sistema nervioso central, en la vasculatura de ciertos órganos y en las células del sistema inmunitario (Martín et al, 1982; Laudon et al, 1988; Vanecek, 1988; Williams y Morgan, 1988; Duncan et al, 1989; Weaver et al, 1989; Bittman y Weaver, 1990; Weaver y Reppert, 1990; Blazynski y Dubocovich, 1991; Stankov et al, 1991; Lindroos et al, 1993; Pang et al, 1995; Song et al, 1997; García-Perganeda et al, 1999). Así como también en el sistema gastrointestinal (Poon et al, 1996; Poon et al, 1997; Sjöblom et al, 2001, Sjöblom et al, 2003; Flemström et al, 2010).

Los MT2 se hallan en la retina y otras estructuras cerebrales de mamíferos (Reppert et al, 1995; Reppert et al, 1996; Mor et al, 1999), además de en el sistema gastrointestinal (Chen et al, 2011).

El receptor MT3 no está claro que cumpla todos los criterios de receptor acoplado a proteína G, aunque su activación estimula la hidrólisis de fosfoinositol (Dubocovich et al, 2003). El lugar de unión del receptor MT3 es una enzima denominada quinona reductasa 2 (QR2). La activación del complejo MT3/QR2 por la melatonina podría explicar el papel protector de la melatonina frente al estrés oxidativo en diferentes modelos animales, ya que

el complejo MT3/QR2 tiene potentes propiedades antioxidantes (Chen et al, 2011).

Los tres tipos de receptores de membrana de la melatonina MT1, MT2 y MT3 pueden encontrarse en el intestino (Tabla 3).

	MT1	MT2	MT3
Ileum	+	+	+
Colon	+	+	+
Mucosa	+	No data	No data
Muscularis mucosae		+ (i); + (c)	
Submucosa		+ (i); + (c)	
Muscularis propria		+ (c)	

MT: Melatonin receptor; i: Ileum; c: Colon.

**Tabla 3.** Localización de los receptores de membrana en el ileo y en el colon de roedores (Chen et al, 2011)

El ARNm del receptor de membrana MT1 se ha detectado en el intestino delgado y grueso de ratas. La mayor expresión de ARNm de MT1 se encontró en el duodeno, con menor expresión a nivel de yeyuno e íleon. No se han observado cambios circadianos en la expresión del ARNm de MT1 a nivel intestinal, aunque si se han observado variaciones con la ingesta, produciéndose un aumento de la expresión de MT1 en los periodos cortos de ayuno a nivel de la capa subepitelial en el intestino delgado y grueso. En periodos largos de ayuno este incremento en la expresión tan solo ocurre en el colon distal (Sallinen et al, 2005; Soták et al, 2006; Poirel et al, 2003).

Un estudio en tejidos de páncreas, estómago, duodeno y colon de ratas encontró mediante análisis por Western Blot que los mayores niveles de MT2 se encontraban en el colon (Stebelová et al, 2010). En ese mismo estudio la inmunorreactividad del receptor MT2 es más intensa a nivel de la *muscularis mucosa* y en la capa circular y longitudinal de la muscular propia, lo que sugiere una implicación de los receptores MT2 en la motilidad intestinal. A diferencia de los receptores MT1, la expresión de los receptores MT2 no varía con la ingesta de alimentos (Chen et al, 2011).

Se han desarrollado diversos agonistas y antagonistas melatoninérgicos que se utilizan en investigación. La mayoría de los ligandos de los receptores sintetizados son poco selectivos entre MT1 y MT2, salvo la 6-cloromelatonina y el Luzindole que son más selectivos para los receptores MT2 (Mao et al, 2010). Entre los múltiples agonistas se encuentran la 6-cloromelatonina y el ramelteon (Rozerem®), fármaco aprobado por la Food and Drug Administration (FDA) estadounidense para el tratamiento del insomnio (Pandi-Perumal et al, 2007), así como la agomelatina (Valdoxan® y Thymanax®) para el tratamiento de los trastornos de ansiedad generalizada y la depresión mayor (Stein et al, 2012; Lôo et al, 2002; Kennedy et al, 2006; Olié et al, 2007). Entre los antagonistas está el Luzindole, que fue el primer ligando algo más selectivo para los receptores M2, y el S20928 (Charton et al, 2000; Dubocovich et al, 1997).

### **1.2.3.2. Receptores nucleares**

La melatonina tiene funciones en tejidos en los que no se han descrito receptores de membrana, como el corazón y el tiroides (Buzzell et al, 1989; Reiter, 1991b; Chen et al, 1993). Los receptores nucleares son proteínas localizadas en el interior del núcleo, capaces de unirse a la región reguladora de algunos genes. Estas proteínas, cuando se unen a su ligando específico se activan, de forma que junto con factores de transcripción generales regulan la actividad de la ARN polimerasa II, necesaria para la expresión génica. Se conocen varias familias de receptores nucleares para hormonas esteroideas, tiroideas, vitamina D3 y retinoides.

Se han clonado seis receptores nucleares de melatonina, miembros de la subfamilia de los receptores retinoicos RZR/ROR. Se denominan ROR $\alpha$ 1, ROR $\alpha$ 2, ROR $\alpha$ 3, RZR $\alpha$ , RZR $\beta$ , RZR $\gamma$  (Becker-Andre et al, 1993; Carlberg et al, 1994; Giguere et al, 1994; Hirose et al, 1994). RZR $\alpha$  y ROR $\alpha$  son nombres diferentes para el mismo receptor nuclear, que presenta al menos cuatro isoformas distintas generadas por el procesamiento diferencial de un ARNm precursor común (Giguere et al, 1994).

La expresión de los miembros de la subfamilia muestra una gran variabilidad entre tejidos. Las isoformas ROR $\alpha$  se expresan en un gran número de tejidos, tanto a nivel central como periférico. La expresión de RZR $\beta$  es la más restringida; se la detecta casi exclusivamente en estructuras

del sistema nervioso central implicadas en el procesamiento de la información sensorial y en el sistema de sincronización circadiano, así RZR $\beta$  se encuentra en el núcleo supraquiasmático, retina y glándula pineal y sus niveles de expresión siguen ritmos circadianos, con niveles más altos durante la noche, mecanismo regulado por AMPc (Baler et al, 1996; Andre et al, 1998). El receptor RZR $\gamma$  se encuentra fundamentalmente en el músculo esquelético, aunque también se ha localizado en el timo y en cantidades más bajas en páncreas, próstata, testículo, corazón e hígado (Hirose et al, 1994).

Mientras que la expresión de los receptores de membrana a nivel intestinal está bien documentada, la presencia de lugares de unión nucleares de la melatonina a este nivel no está tan clara. Un estudio sugirió la presencia de receptores nucleares a nivel de células murinas de colon tumorales, aunque no está clara la relevancia de este hallazgo (Winczyk et al, 2002).

En el caso de la melatonina, mientras que sus efectos mediados a través de receptores de membrana están en relación con la regulación de los ritmos circadianos, los efectos tales como inmunomodulación, efectos antiproliferativos y de diferenciación ósea, parecen estar mediados principalmente por RZR/ROR $\alpha$ . La unión de la melatonina a los receptores nucleares RZR/ROR produce la estimulación de de citoquinas por parte de los linfocitos, incluidas IL-2 e IL-6, modulando de esta manera la actividad del sistema inmunitario (Slominski et al, 2012; Matriz et al, 2013). La melatonina parece influir en el estado de fosforilación, y, por tanto, en la actividad constitutiva de RZR/ROR $\alpha$ . Este efecto podría estar mediado, a su vez, por los receptores de membrana de la indolamina (Carlberg, 2000), aunque esto no explicaría los efectos de melatonina a través de RZR/ROR $\alpha$  en los tejidos en los que no se han descrito receptores de membrana.

### **1.2.3.3. Interacción con proteínas intracelulares**

Se ha descrito la unión de la melatonina con proteínas intracelulares, como calmodulina, calreticulina y proteinquinasa C (PKC) (Romero et al, 1998; Guerrero et al, 2007).

La calmodulina es una proteína ubicua y multifuncional, cuya función principal es quelar calcio, lo que le permite modular la actividad de muchas enzimas. Posee cuatro sitios de unión (Teo y Wang, 1973). La calmodulina interactúa con una gran cantidad de proteínas y péptidos citosólicos (Manalan

y Klee, 1984). Entre las enzimas que regula se encuentra la fosfodiesterasa de los nucleóticos cíclicos y la adenilatociclase necesaria para la formación del AMPc intracelular (Cheung, 1970; Cheung et al, 1975). Además puede interactuar con la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa de eritrocitos y sinaptosomas, la quinasa de la cadena ligera de miosina, la NAD quinasa, la fosforilasa quinasa, la  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -ATPasa y la NOS (Schmidt et al, 1992). También se une a otras proteínas del citoesqueleto, como la proteína 2 asociada al microtúbulo, tubulina, miosina y troponina. Cuando la melatonina interactúa con la calmodulina, inhibe la actividad fosfodiesterasa de forma concentración-dependiente, lo que permite modular directamente las señales intracelulares de calcio (Benitez-King et al, 1993; Benitez-King et al, 1996; Ouyang y Vogel, 1998). Tras su interacción con el complejo calcio-calmodulina, la melatonina y sus metabolitos cerebrales inhiben la actividad de la óxido nítrico sintasa neuronal (León et al, 2000; León et al, 2006).

La calreticulina es una proteína del retículo endoplasmático que también une calcio. Se trata de una proteína con varias funciones, entre las que se incluyen la actividad de los chaperones, la homeostasis intracelular del  $\text{Ca}^{2+}$  y la regulación de la adhesión intercelular por interacción con las integrinas de la membrana (Macías et al, 2003). Hay varias evidencias que sugieren su localización citosólica (Jethmalani et al, 1997; Yoon et al, 2000; Holaska et al, 2001) y nuclear (Roderick et al, 1997). Así, se describen interacciones de la calreticulina con la transducción de la señal hormonal de los glucocorticoides y los estrógenos (Platet et al, 2000; Holaska et al, 2001). La unión de la melatonina a la calreticulina es altamente específica y se produce con una afinidad en el rango nanomolar (Macías et al, 2003).

La proteinquinasa C (PKC) es una quinasa de serina y treonina activada por calcio. Esta enzima fosforila diversos sustratos y modifica la estructura del citoesqueleto (Aderem, 1992). Se ha comprobado que la melatonina activa la PKC, con una  $\text{IC}_{50}$  de 1 nM, de forma dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  (Benítez-King et al, 1996).

Los resultados obtenidos de la interacción de melatonina con calmodulina, calreticulina y PKC, respaldan la idea de que la melatonina puede contribuir a modular la estructura del citoesqueleto. Además, como las tres proteínas son dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$ , es posible que otras proteínas con dominios de unión al calcio también puedan estar influidas por la melatonina. Los efectos de la melatonina en estos procesos de fosforilación/desfosforilación pueden ser el mecanismo por el que esta indolamina module numerosas respuestas biológicas.

Otro lugar de unión de la melatonina parece encontrarse en la mitocondria (Hardeland y Poeggeler, 2007). Se postula que la proteína de unión se localiza en la rampa anfipática del complejo I de la cadena de transporte electrónico mitocondrial (Hardeland, 2008).

La unión de la melatonina a sitios de unión no mediados por receptor, propuestos previamente, permitiría explicar por qué la melatonina a pesar de ser capaz de atravesar todas las membranas biológicas no se libera en grandes cantidades al torrente circulatorio, sino que permanece en los tejidos a mayor concentración que en el plasma (Hardeland, 2008), con ausencia de ritmo circadiano de los niveles de melatonina en aquellos tejidos donde se acumula.

#### **1.2.4. Melatonina y tracto gastrointestinal**

Además de en la glándula pineal, la melatonina se sintetiza en diversos órganos extrapineales no endocrinos, como el cerebelo, el sistema inmunitario y el tracto gastrointestinal (Lee et al, 1995). En esta última localización la melatonina se produce en grandes cantidades, parece estar implicada en la secreción de bicarbonato y tener efectos preventivos en la formación de úlceras debido a su capacidad antioxidante. El intestino contiene 400 veces más melatonina que la glándula pineal y valores estables de melatonina en el colon tras pinealectomía sugieren una importante producción a nivel local, independiente de la glándula pineal. Estudios de radioinmunoensayo han demostrado concentraciones de melatonina a nivel de la mucosa y submucosa de colon humano diez veces mayores que en plasma (Vician et al, 1999; Poon et al, 1996). Se sabe que los niveles de melatonina en sangre durante la noche tiene un origen principalmente pineal mientras que las concentraciones diurnas de melatonina provienen mayormente del tracto gastrointestinal (Bubenik et al, 1996; Hueter et al, 1992). A diferencia de la producción pineal, la melatonina gastrointestinal además de acción endocrina tiene acciones paracrina o luminales y puede secretarse tanto de manera continua como cíclica.

La melatonina se sintetiza en las células enterocromafines a lo largo del intestino, siendo el L-triptófano un crucial precursor de la síntesis intestinal de melatonina (Chen et al, 2011), donde parece tener un papel importante en la regulación de la motilidad intestinal, en el sistema inmunitario, en las secreciones gastrointestinales y en la liberación de

péptidos involucrados en el balance energético como el péptido Y. También ha mostrado un papel protector en diferentes entidades fisiopatológicas por su capacidad antioxidante y eliminadora de radicales libres. Debido a su alta lipofilia puede difundir a capas más profundas a través de la mucosa y la submucosa para finalmente actuar sobre la *muscularis mucosae* o el plexo mioentérico, teniendo efectos de contractilidad y relajación sobre el tracto digestivo. En esta acción parecen estar implicados los receptores MT<sub>2</sub>, ya que estudios animales *in vivo* demostraron que bajas dosis de melatonina aceleraban el tránsito gastrointestinal mientras que altas dosis revertían este efecto. Estos efectos se bloqueaban con la administración de Luzindole (Drago et al, 2002). Diferentes estudios han implicado a los complejos migratorios mioeléctricos, los canales nicotínicos y los receptores 5-HT como posibles dianas donde la melatonina ejerce su efecto sobre la motilidad intestinal.

La melatonina también está implicada en la regulación intestinal del transporte iónico. En el colon se piensa que juega un papel importante en la regulación de la secreción de Cl<sup>-</sup>. Puede afectar a la expresión de la COX-2 y la iNOS, y regula la secreción provocada por la prostaglandina E<sub>2</sub> y el nitroprusiato de sodio en el colon distal de ratas. Así ha sido probada clínicamente para la prevención o el tratamiento de diferentes patologías del tracto digestivo, como enfermedades de la cavidad oral (Czesnikiewicz-Guzik et al, 2007), lesiones esofágicas (Konturek et al, 2007; de Souza Pereira et al, 2006), duodenales (Konturek et al, 2004), gástricas (Brzozowska et al, 2002), pancreáticas (Jaworek et al, 2005) y de colon (Pentney y Bubenik, 1995).

Algunos estudios han sugerido la implicación de la melatonina en entidades como el síndrome de intestino irritable y un estudio con estos pacientes encontraba un efecto beneficioso en el alivio sintomático de estos pacientes tras la administración de melatonina (Thor et al, 2007). Sin embargo, a pesar de los numerosos estudios animales que muestran un efecto protector de la melatonina en modelos de colitis hay disponibles únicamente datos clínicos limitados en el papel terapéutico de la melatonina en la enfermedad inflamatoria intestinal, siendo la literatura disponible actualmente no concluyente, por lo que son necesarios más estudios en este sentido (Chen et al, 2011).



### 1.2.5. Melatonina y cáncer

Los estudios más antiguos se remontan a la década de 1960 (Jung y Ahmad, 2006), aunque este área de investigación comenzó a recibir más atención a raíz de que se estableciese un posible papel de la glándula pineal en la etiología del cáncer de mama (Cohen et al, 1978). Estos autores sugerían que una disminución en la función de la glándula pineal, y por tanto una reducción en la secreción de melatonina, podía inducir a un estado de hiperestrogenismo relativo, y esta precoz y prolongada exposición del tejido mamario a los estrógenos podía estar involucrada en la etiología de la carcinogénesis de la mama. A partir de ese momento numerosos estudios han sugerido una asociación entre los niveles de melatonina y la progresión tumoral (Mills et al, 2005). Se han relacionado con la melatonina numerosos tipos de cáncer: próstata, sarcoma, carcinoma de pulmón no de células pequeñas, melanoma, tumores neurológicos, carcinoma de laringe, mama, ovario, cérvix, hepatocarcinoma y cáncer colorrectal (Mediavilla et al, 2010; Srinivasan et al, 2011)

Durante los últimos 20 años números ensayos clínicos han estudiado la utilidad terapéutica de la melatonina en diferentes campos de la medicina, incluido el tratamiento del cáncer (Sánchez-Barceló et al, 2010). Los efectos de la melatonina han sido estudiados en múltiples estudios *in vitro*. Los efectos oncostáticos y/o citotóxicos frente a diferentes cánceres han sido investigados en modelos de cultivos celulares. Los resultados sugieren que la melatonina posee efecto antiproliferativo frente a diferentes cánceres (Vijayalaxmi et al, 2002). Los estudios *in vivo* se han realizado para determinar la efectividad de la melatonina frente a carcinomas de mama, próstata, tumores de la pituitaria, melanomas, cáncer de colon y gliomas malignos, mostrando diferentes resultados, desde efectos oncostáticos hasta ningún efecto, pudiendo deberse esta variabilidad en los resultados a diferencias metodológicas incluyendo los parámetros estudiados, las condiciones de cultivo y las diferentes concentraciones de melatonina, dosis y duración de los tratamientos realizados (Jung y Ahmad, 2006). Lo que sí ha quedado claro en todos los estudios realizados *in vivo* es que la melatonina no tiene efectos secundarios indeseables (Vijayalaxmi et al, 2002; Sainz et al, 2003) y los estudios más recientes parecen confirmar sus propiedades anticancerígenas (Mediavilla et al, 2010; Srinivasan et al, 2011).

Debido al amplio espectro de las acciones de la melatonina en el organismo los mecanismos involucrados en su efecto oncostático son múltiples. Entre los diferentes mecanismos de acción responsables de los efectos de la melatonina sobre el crecimiento tumoral se encuentran su efecto antioxidante, la regulación de la expresión y transactivación de receptores estrogénicos, la modulación del ciclo celular y la inducción a la apoptosis, la inhibición de la actividad de la telomerasa, la inhibición de las metástasis, la prevención de la alteración del ritmo circadiano, sus efectos sobre la angiogénesis, sus efectos epigenéticos, la estimulación de la diferenciación celular y la activación del sistema inmunitario (Mediavilla et al, 2010; Sainz et al, 2003; Cutando et al, 2012). A concentraciones fisiológicas (1 nM) y en presencia de estradiol la melatonina inhibe de manera reversible la proliferación celular, aumenta la expresión de las proteínas p53 y p21/WAF1 modulando la duración del ciclo celular y reduce la capacidad metastásica de las células tumorales y contrarresta el efecto del estradiol en la invasión celular. Este efecto está mediado, al menos en parte, por el aumento inducido por melatonina de la expresión de las proteínas de adhesión de la superficie celular E-caderina y beta (1)-integrina (Cutando et al, 2012).

Los efectos oncostáticos de la melatonina han sido especialmente estudiados en los tumores hormono-dependientes. Como ya hemos mencionado, la relación entre la melatonina y las vías de señalización estrogénicas se ha descrito desde hace décadas, observándose recientemente que la melatonina podía suprimir la proliferación mediada por estrógenos de las células cancerígenas de mama (Girgert et al, 2003), principalmente a través de sus acciones antiestrogénicas (Sánchez-Barceló et al, 2003). Gracias los múltiples estudios realizados sobre melatonina y cáncer de mama se han sugerido varios mecanismos potenciales de acción de la melatonina por esta vía: a) la melatonina podría disminuir las hormonas del eje reproductivo neuroendocrino, produciendo una disminución en los esteroides gonadales circulantes, b) podría actuar como antiestrogénico contrarrestando los efectos de los mismos en sus objetivos y c) disminuyendo la expresión de los receptores estrogénicos  $\alpha$  (ER  $\alpha$ ) e inhibiendo por tanto la unión del complejo estradiol-ER (E2-ER) al elemento de respuesta estrogénico (Sanchez-Barcelo et al, 2003). La melatonina puede suprimir la expresión de ER  $\alpha$  a niveles de ARNm (Molis et al, 1994) y esta inhibición preferencial de ER  $\alpha$  explica las propiedades oncostáticas de la melatonina en los tumores estrógeno-dependientes (Mediavilla et al, 2010).

La melatonina incrementa la degradación de la calmodulina debido a un efecto ligando directo y provoca una redistribución de la calmodulina

inhibiendo de esta manera la progresión del ciclo celular (Benítez-King, 2006). Esta inactivación de la calmodulina por parte de la melatonina es otro mecanismo de acción por el cual esta hormona puede actuar en la vía de señalización estrogénica (Molis et al, 1994).

Los efectos antiproliferativos de la melatonina en el cáncer de mama en humanos están mediados por receptores (Hill et al, 2009). Varios estudios describen que los efectos de la melatonina en la inhibición del crecimiento de las células cancerígenas de mama se puede revertir con antagonistas de los receptores MT1 y MT 2, y que la sobreexpresión de MT1 puede aumentar significativamente la respuesta inhibitoria de las células tumorales a la melatonina tanto *in vitro* como *in vivo* (Collins et al, 2003; Yuan et al, 2002). Así mismo, el descenso en la expresión del receptor MT1 en el CCR humano señala hacia el papel de la melatonina en esta patología (Nemeth et al, 2011), aunque la acción oncostática de la melatonina en estos tumores también parece depender de los receptores MT2 y los receptores nucleares RZR/ROR (Winczyk et al, 2002) como veremos más adelante.

El ritmo circadiano por el que se rige la producción de la melatonina también parece estar relacionado tanto a nivel del desarrollo de tumores como en su efectividad a la hora de ejercer su efecto oncostático. La alteración en el ritmo circadiano se ha relacionado con el desarrollo de diferentes cánceres, mientras que un ritmo circadiano regular y estable ha demostrado ser un factor protector frente al desarrollo de cánceres epiteliales y hematológicos (Hrushesky et al, 2009). Estudios experimentales han demostrado la relación entre genes del reloj circadiano (Per 2 y Per 1) con el desarrollo de tumores, ya que su ausencia duplica el número de tumores y la disminución de su expresión en las células tumorales duplica la tasa de crecimiento de los mismos (Yang et al, 2009a; Yang et al, 2009b).

La aparición de trastornos gastrointestinales, obesidad, diabetes, enfermedades cardiovasculares, infertilidad y algunos cánceres se ha visto que se encuentra elevada, de manera significativa, en trabajadores de turnos nocturnos, lo que afecta al menos a un 20% de la población activa (Stevens et al, 2007). Un grupo de trabajo de expertos de la *International Agency for Research on Cancer* ha determinado que los turnos de trabajo que conllevan una alteración del ritmo circadiano son carcinogénicos para los humanos (International Agency for Research on Cancer, 2007). Así, diversos estudios correlacionaron el descenso nocturno de la melatonina con el incremento en el tamaño tumoral del cáncer de mama, otros estudios han encontrado un incremento en el riesgo de cáncer de mama en sujetos que no dormían durante

los periodos de la noche donde los niveles de melatonina son más altos, como por ejemplo mujeres con turnos nocturnos de trabajo (Davis et al, 2001; 2006; Schernhammer et al, 2001). Un estudio epidemiológico que investigaba a mujeres que trabajaron en turnos nocturnos o bien turnos rotatorios con noches y las comparaba con mujeres que no tenían nunca turnos nocturnos encontró que las mujeres que trabajaban en turno rotatorio con al menos tres noches al mes durante 15 o más años podían presentar un riesgo aumentado de CCR (Schernhammer et al, 2003).

Por otro lado, debido a los efectos de la melatonina como potente antioxidante, modulador inmunológico y hormonal, se han llevado a cabo diversos estudios para determinar el papel de la melatonina en el tratamiento de diferentes tipos de cáncer asociada con los distintos tratamientos oncológicos. Se ha encontrado que la melatonina administrada en conjunto con otras drogas terapéuticas en el tratamiento del cáncer prolonga el periodo libre de enfermedad y la supervivencia global, así como mejora el sufrimiento del paciente (Seely et al, 2012). Ya en un estudio que incluía 250 pacientes con tumores sólidos metastásicos (pulmón, mama, tracto gastrointestinal, cabeza y cuello) se vio que su administración concomitante con agentes quimioterápicos mejoraba la supervivencia a un año, la tasa objetiva de regresión tumoral y disminuía significativamente la frecuencia de trombocitopenia, neurotoxicidad, cardiotoxicidad, estomatitis y astenia (Lissoni et al, 1999). Además, varios estudios muestran que la melatonina aumenta la sensibilidad citostática antiestrogénica del tamoxifeno a través de mecanismos desconocidos (Vijayalaxmi et al, 2002; Lissoni et al, 1995; Jordan et al, 1990). Un reciente metaanálisis de ocho ensayos clínicos controlados randomizados realizados hasta 2011, que incluía 761 pacientes con tumores sólidos a los que se administraba melatonina a dosis de 20mg orales diariamente como tratamiento conjunto con quimioterapia o radioterapia, mostraba una mejora estadísticamente significativa en la tasa de remisión parcial y completa [Riesgo Relativo (RR)=1,95, 95% IC=1,49-2,54),  $p < 0,00001$ ] y la tasa de supervivencia a 1 año (RR=1,90, 95% IC=1,28-2,83,  $p = 0,001$ ), así como un descenso significativo en los efectos secundarios de la radioquimioterapia como trombocitopenia, neurotoxicidad y fatiga (Wang et al, 2012).

Por lo tanto, con la evidencia de los estudios acerca de los efectos antiproliferativos, antioxidantes e inmunomoduladores de la melatonina, así como con los ensayos clínicos en los que la melatonina ha sido administrada conjuntamente con quimioradioterapia y tratamiento paliativo, podemos establecer que la melatonina puede ser considerada como una sustancia

anticancerosa fisiológica y se abre la puerta a nuevas dianas terapéuticas en el tratamiento de tumores.

### **1.2.6. Melatonina y cáncer colorrectal**

Tras el descubrimiento de los lugares de unión de la melatonina en el colon humano a partir de pacientes con carcinoma de recto y colon, el papel de la melatonina en el CCR se ha abordado en diferentes estudios. Mediante estudios de radioinmunoensayo se identificaron los lugares de unión de la melatonina en la mucosa y submucosa del colon, encontrando unas concentraciones diurnas de melatonina significativamente menores en los pacientes controles sin cáncer de colon que en aquellos que presentaban CCR (Poon et al, 1996). En otro estudio, sin embargo, los pacientes con CCR mostraron un descenso significativo en el pico de amplitud de la secreción de melatonina, así como una reducción en la producción global de melatonina (Kos-Kudla et al, 2002). Varios estudios muestran una proliferación de las células de las criptas colónicas en ratas tras realizar una pinealectomía, aunque sin identificar el mecanismo exacto (Dalio et al, 2006; Callaghan, 1995). El descenso en la expresión de los receptores MT1 en CCR también apunta hacia un papel de la melatonina en esta patología (Nemeth et al 2011), aunque la acción oncostática de la melatonina parece depender en los receptores MT2 y ROR/RZR (Winczyk et al, 2002). Estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que la melatonina ejerce un efecto antiproliferativo el cáncer intestinal (Srinivasan et al, 2011). En un estudio con CT-26, línea celular murina derivada de carcinoma de colon, la melatonina inhibía el crecimiento tumoral de manera dosis dependiente (Farriol et al, 2000).

Los mecanismos de control del cáncer de colon por parte de la melatonina son múltiples e implican la inhibición de la angiogénesis del tumor, la modulación de los índices mitóticos y apoptóticos y el mantenimiento de los niveles de glutatión intracelular (Lissoni et al, 2001; Winczyk et al, 2001; Blask et al, 1997). Se ha observado que la melatonina activa de manera temprana los programas de muerte celular e induce senescencia celular tardía en células colorrectales cancerosas HCT116, pudiendo estar mediados estos efectos a través de receptores de membrana y nucleares (Hong et al, 2014).

Las propiedades antioxidantes y antiinflamatorias de la melatonina son otras de las vías por las que la melatonina ejerce su papel antioncogénico, contrarrestando el estado oxidativo y reduciendo la producción de óxido nítrico en cultivos celulares HT-29 (García-Navarro et al, 2007).

Otro mecanismo de acción hallado recientemente es a través de la inhibición de la secreción de la endotelina 1 (ET-1) en las células tumorales colorrectales a través de la inhibición de los factores de transcripción FoxO1 y NF- $\kappa$ B (León et al, 2014), de tal manera que se contrarrestan los efectos sobre el crecimiento tumoral, la angiogénesis y el desarrollo de metástasis favorecidos por la ET-1. Este mismo estudio muestra a su vez que la enzima limitante en la expresión de la síntesis de melatonina es la AA-NAT, cuya expresión se encuentra disminuida en los tumores colorrectales frente a la mucosa normal (León et al, 2014).

Como ya hemos visto en el caso del cáncer de mama, la melatonina también puede ejercer su acción anticancerígena en el control del crecimiento tumoral mediante la modulación de los receptores estrogénicos. Tiene también un efecto directo en el ciclo celular, influye en varios factores de crecimiento, en el incremento en las uniones gap y en el aumento de los niveles de antioxidantes (Panzer et al, 1997; Wenzel et al, 2005).

Algunos estudios sugieren que en el caso del adenocarcinoma de colon los receptores de membrana y nucleares están implicados en las acciones anticancerígenas de la melatonina (Karasek et al, 2002; Winczyk et al, 2001; Winczyk et al, 2002; Winczyk et al, 2009; Nemeth et al 2011; Hong et al, 2014). El Luzindole (un antagonista MT1/MT2) disminuye el efecto inhibitorio de la melatonina sobre el crecimiento de las células cancerosas murinas 38 *in vitro* (Winczyk et al, 2009). Se ha confirmado la presencia de receptores MT1 y ROR  $\alpha$  en las células HCT 116 (Hong et al, 2014).

Otro mecanismo de acción que se ha asociado a la acción antiproliferativa de la melatonina en el cáncer de colon es su sinergismo con antagonistas de los receptores de la colecistoquinina A (CCK-A), como devazepide o lorglumide, en el caso de líneas celulares HT-29, produciendo un aumento tanto en la apoptosis como en la necrosis dependiendo del antagonista utilizado, aunque su principal efecto antiproliferativo utilizada conjuntamente con antagonistas de CCK-A se debe a una disminución del crecimiento celular (González-Puga et al, 2005).

El efecto de la melatonina exógena en la oncogénesis del colon se ha estudiado en modelos animales, observando una inhibición significativa del desarrollo tumoral tras la administración oral de melatonina en ratas. La exposición a la melatonina moduló el índice mitótico y apoptótico de los adenocarcinomas colónicos y disminuyó la expresión inmunohistoquímica del NF- $\kappa$ B, el TNF  $\alpha$ , IL 1 $\beta$  y STAT3 en los epitelios malignos (Tanaka et al, 2009). La melatonina parece tener un alto potencial en el control de las lesiones malignas del tejido colónico por una acción temprana en las células colónicas pericrípticas, posiblemente en relación con la elevada expresión de los receptores de melatonina a este nivel en animales a los que se suplementó con melatonina (Kanen et al, 2011). Estudios *in vitro* han demostrado su papel potenciador de la apoptosis iniciada por flavona en células de colon cancerígenas humanas HT-29, mediante el aumento de radicales libres a nivel mitocondrial de manera que se supera la capacidad de las proteínas antiapoptóticas, provocando la apoptosis de las células HT-29 (Wenzel et al, 2005).

Su papel como agente terapéutico en el tratamiento del cáncer colorrectal también ha sido estudiado *in vitro* y en humanos y la melatonina ha mostrado en ensayos clínicos un efecto citoprotector que podría estar implicado en el incremento de la eficacia de la terapia quimioterápica así como en el incremento de la supervivencia. La melatonina ha demostrado potenciar el tratamiento quimioterápico con una menor cardiotoxicidad que las antraciclina (Hong et al, 2014). El tratamiento conjunto con melatonina se ha demostrado beneficioso en la reducción de la toxicidad de la quimioterapia y la radioterapia en varios estudios que incluyen pacientes con CCR (Lissoni, 2007; Lissoni et al, 1999). Desde hace décadas, los efectos beneficiosos de la melatonina en el tratamiento del cáncer colorrectal metastásico han sido estudiados sugiriendo su papel como tratamiento de segunda línea conjuntamente con IL-2, para inducir la regresión tumoral y mejorar la supervivencia a un año en pacientes con CCR metastásico que han progresado bajo tratamiento con 5-FU y folatos (Barni et al, 1995; Lissoni et al, 1993), así como potenciador de la eficacia del irinotecan en pacientes con CCR metastásico pretratados (Cerea et al, 2003). Estudios recientes sobre la respuesta inmune a través vías neuroendocrinas confirman la necesidad de desarrollar nuevas estrategias inmunoterapéuticas en el tratamiento de tumores basadas en la administración concomitante de citoquinas antitumorales como la IL-2 y moléculas neuroendocrinas endógenas como la melatonina para estimular la respuesta anticancerígena (Lissoni y Rovelli, 2012).

Por lo tanto, todos estos datos orientan hacia un posible uso de la melatonina como fármaco para el tratamiento del CCR.

### **1.3. RECEPTORES HORMONALES Y CÁNCER COLORRECTAL**

El papel que desempeñan factores reproductivos y hormonales en la carcinogénesis del CCR se comenzó a plantear cuando se evidenció un aumento del CCR en monjas frente a mujeres de la población general (Fraumeni et al, 1969). McMichael y Potter fueron los primeros en sugerir un papel protector del uso de tratamientos con estrógenos más progesterona frente al CCR, en relación con la reducción de la síntesis y secreción de los ácidos biliares, que están considerados como carcinogénicos en el epitelio colónico (McMichael y Potter, 1980).

Una reciente revisión sistemática y metanálisis de 17 estudios publicados entre 1993 y 2008, de 18 poblaciones diferentes, mostraba una clara relación entre el CCR y el género (Nguyen et al, 2009). Este metanálisis muestra que los hombres tienen un mayor riesgo por edad para las neoplasias colorrectales avanzadas frente a las mujeres, siendo estos resultados consistentes en las diferentes poblaciones estudiadas y relacionando este riesgo aumentado con las diferencias hormonales.

Los hombres tienen mayor incidencia de cáncer de colon y especialmente de cáncer de recto (Cheng et al, 2001) y a partir de los 50 años el CCR aparece de 4 a 8 años antes en los hombres que en las mujeres (Brenner et al, 2007). Además los CCR avanzados se diagnostican a edades más tempranas en hombres que en mujeres (Brozek et al, 2009). Se postula que estas diferencias entre hombres y mujeres pudieran ser el resultado de la larga exposición a estrógenos previo a la menopausia, o bien al tratamiento hormonal sustitutivo posterior (McMichael et al, 1980; Grodstein et al, 1999). Además determinados factores de riesgo de la dieta asociados al CCR influyen de manera diferente en hombres y mujeres. Así, una revisión clínica reciente muestra una ligera mayor influencia en hombres de la ingesta calórica diaria, el selenio, la fibra y la obesidad, mientras que la ingesta de calcio y ácido fólico afectan por igual a ambos sexos (Jacobs et al, 2007). También se han encontrado diferencias entre hombres y mujeres en cuanto a la localización de los tumores de colon. Múltiples estudios muestran una mayor frecuencia de cánceres de colon proximales en las mujeres (Slattery et al,



1996; Coates et al, 1995; Sarli et al, 2005) y es más frecuente la presencia de inestabilidad de microsatélites en mujeres que en hombres (Breivik et al, 1997).

Todas estas diferencias en función del sexo en el CCR se han atribuido a la acción de las hormonas esteroideas (Buffill, 1990; Slattery et al, 2001).

Varios metanálisis han encontrado una relación inversa entre el uso de anticonceptivos orales y el riesgo de CCR, llegando a una reducción del riesgo del 18% en pacientes que alguna vez los hubieran utilizado (Fernández et al, 2001). Esta asociación inversa es mayor cuanto más reciente fuera su uso, aunque la duración del tratamiento no está relacionada con el riesgo de CCR (Bosetti et al, 2009).

Estudios observacionales constatan una relación entre la terapia hormonal sustitutiva (THS) en mujeres menopáusicas y una disminución del riesgo de CCR (Grodstein et al, 1999), datos que se han confirmado en diferentes estudios posteriores (Rossouw et al, 2002). Hay estudios en los que utilizan combinaciones de estrógenos y progesterona con resultados muy positivos (Newcomb et al, 2007; Rossouw et al, 2002), aunque otros no encuentran diferencias entre la duración, el tipo de THS (estrógenos más progestágenos o estrógenos únicamente) ni la vía de administración (oral o transdérmica) (Hoffmeister et al, 2009). Estudios con menos pacientes también han encontrado asociación entre la THS y una reducción del riesgo de las neoplasias avanzadas (Terry et al, 2002). Sin embargo, otros autores difieren y encuentran que a pesar de un papel protector del tratamiento con estrógenos más progesterona en el desarrollo de CCR, los cánceres se diagnostican en estadios más avanzados en mujeres que han seguido THS (Chlebowski et al, 2004). Es más, un estudio clínico y observacional reciente no encuentra relevancia clínica importante en el beneficio frente al CCR ni con el uso de THS con estrógenos ni con el uso de estrógenos más progesterona durante un seguimiento de 7-8 años (Prentice et al, 2009). Así mismo ocurre en el caso de los tumores asociados a inestabilidad de microsatélites, en el que los estudios sobre el uso de THS son discordantes (Newcomb et al, 2007; Slattery et al, 2001).

El efecto protector de los estrógenos se ha relacionado con el descenso inducido de los ácidos biliares secundarios y del factor de crecimiento insulinoide-1 (IGF-1), así como a un efecto directo sobre la proliferación del epitelio colorrectal, o una combinación de estos mecanismos (Jänne y Mayer, 2000). Recientemente se ha establecido como posible mecanismo de acción

anticanceroso de los estrógenos su papel regulador del sistema MMR (*Mismatchrepair* o sistema de reparación de bases desapareadas), concretamente a través de su acción reguladora sobre el gen hMLH1, cuyo silenciamiento epigenético se relaciona con un 10 -15% de los CCR esporádicos (Jin et al, 2010). El estradiol (E2) *in vitro* y, a través de un mecanismo mediado por el receptor estrogénico  $\beta$  (ER $\beta$ ), influye en los estadios iniciales del desarrollo del cáncer, actuando sobre los colonocitos no cancerosos y previniendo el desarrollo de lesiones pre-neoplásicas mediante el aumento de la actividad apoptótica (Weige et al, 2009). Sin embargo, los estudios de cultivos celulares muestran la no reducción o el aumento del crecimiento de células de cáncer de colon que ya se han transformado completamente en respuesta al estradiol (Arai et al, 2000; Singh et al, 1994; Di Domenico et al, 1996; Gilad et al, 2005; Nakayama et al, 2000; Qui et al, 2002). Esta diferencia de los efectos del estradiol se relaciona con la pérdida de la expresión de ER $\beta$  según va avanzando el estadio tumoral y por lo tanto establece un papel fundamental del receptor estrogénico  $\beta$  en la carcinogénesis de CCR, como veremos a continuación.

La mayoría de las acciones de los estrógenos y los andrógenos se realizan a través de sus respectivos receptores (Katzenellenbogen et al, 2000a; Katzenellenbogen et al, 2000b), de manera que cabe pensar que los receptores hormonales representan un papel relevante en la regulación del riesgo de CCR asociado a estas hormonas. La presencia de receptores hormonales en el colon, incluida la expresión de isoformas alteradas se ha descrito por diferentes grupos (Catalano et al, 2000; Castagnetta et al, 1992, Waliszewski et al, 1997). Además, se ha descrito la presencia tanto de receptores estrogénicos, como de receptores androgénicos (Slattery et al, 2005).

Existen dos isoformas del receptor estrogénico (ER),  $\alpha$  y  $\beta$  (Katzenellenbogen et al, 2000a; Katzenellenbogen et al, 2000b). Forman parte de la familia de receptores hormonales nucleares y son factores de transcripción inducibles mediante ligandos. Diferentes estudios sugieren una especificidad de tejido para la expresión de los dos genes de ER, con una expresión mayor del ER $\beta$  que del ER $\alpha$  en el tejido colónico (Witte et al, 2001; Fiorelli et al, 1999; Qiu et al, 2002). El ER $\beta$  se expresa de manera elevada en la mucosa colónica normal en el endotelio y el músculo liso vascular, en las neuronas entéricas, en los linfocitos y en las células musculares lisas de la *muscularis mucosa* y de la *propia*. En la mucosa colónica normal la expresión de ER $\beta$  es mayor en la superficie epitelial que en la base de las criptas, sobre todo a nivel de colon derecho. Además, la expresión de ER $\beta$  es mayor en la superficie del epitelio del colon derecho que en el colon izquierdo (Papaxoinis

et al, 2010). La expresión de ER $\beta$  está muy disminuida en la mucosa tumoral, independientemente de la localización del tumor, tanto en los tumores proximales como en los de colon izquierdo (Konstantinopoulos et al, 2003).

Los receptores estrogénicos y androgénicos actúan como factores de transcripción mediados por ligandos que regulan la síntesis de ARNs específicos y proteínas de diferentes vías de señalización celular que a, su vez, regulan la expresión de otros genes y la proliferación celular (Tutton y Barkla, 1988).

ER $\beta$  está involucrado en numerosas funciones que pueden influir de manera importante en el riesgo de CCR. Este receptor media en la regulación de glutatión-S-transferasa y activa transcripcionalmente otras enzimas antioxidantes, de manera que juega un papel importante en la protección celular frente al estrés oxidativo (Montano et al, 2004). También se ha descrito su papel en los procesos inflamatorios por su interacción con la IL-6 (Stein y Yang, 1995). Aunque el mecanismo exacto por el cual ejerce su papel antiproliferativo no se conoce, se sabe que es independiente de ligando y que no está en relación con un aumento de la muerte celular programada. En las células tumorales humanas, ER $\beta$  está regulado por el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y el factor de crecimiento insulinoide I (IGF-I) y no a través de ligandos, aunque estos factores no regulan la actividad moduladora de la proliferación celular que ejerce ER $\beta$  (Martinete et al, 2005). Otro mecanismo de acción inhibitorio de la proliferación de células cancerosas es su regulación del ciclo celular a través de su acción sobre protooncogenes como *c-Myc* y otros componentes del ciclo celular como ciclina D1, p21CIP1 y la ciclina E/cdk2, deteniendo el ciclo celular en la fase G1 (Sutter et al, 1997).

Los niveles de expresión del ARNm de ER $\beta$  están significativamente disminuidos en los tumores de colon con respecto a la mucosa sana en mujeres. Además los niveles de ARNm de las isoformas ER $\beta$ 1 y ER $\beta$ 2 se encuentran significativamente disminuidos en los tumores de pacientes femeninas, por lo que se sugiere que los mecanismos protectores de la THS frente al CCR en mujeres deben estar relacionados con procesos mediados por la activación de ER $\beta$  (Campbell-Thompson et al, 2001). La expresión de ER $\beta$  descende en correlación con el grado tumoral, de manera que presenta una mayor expresión en los estadios más iniciales disminuyendo de manera paralela a la desdiferenciación tumoral (Castiglione et al, 2008; Konstantinopoulos et al, 2003). En cambio los niveles de ER $\alpha$  no varían sustancialmente en la mucosa colónica normal y el tejido tumoral (Foley et al, 2000; Campbell-Thompson et al, 2001). El cociente ER $\alpha$ :ER $\beta$  podría ser un

determinante de la susceptibilidad de un tejido a la carcinogénesis inducida por estrógenos, de manera que los ligandos de los receptores  $\alpha$  provoquen una respuesta protumoral, mientras que los ligandos de los receptores  $\beta$  ejerzan un efecto protector (Weyant et al, 2001).

Se sabe menos sobre el papel de los andrógenos en el desarrollo del CCR, y algunos resultados al respecto son contradictorios. Por ejemplo, estudios realizados en ratas sugieren que los andrógenos funcionan como promotores en el desarrollo del CCR (Izbicki et al, 1983; Stebbings et al, 1985). Sin embargo, un estudio retrospectivo mostraba la expresión disminuida de receptores androgénicos en tejido tumoral frente al tejido colorrectal sano en pacientes intervenidos de CCR (Castagnetta et al, 2002).

Las células tumorales de cáncer de colon expresan de manera funcional receptores androgénicos de membrana (mAR), mientras que estos receptores son indetectables en el tejido colónico sano (Gu et al, 2009). No se ha observado expresión del AR intracelular (iAR) en las células tumorales de colon. El mAR es un potente detonante de diferentes efectos antitumorales en cánceres de próstata y mama (Papadopoulou et al, 2009) y también en los tumores de colon, observándose que su activación a través de esteroides unidos a albúmina induce potentes respuestas pro-apoptóticas reguladas por reajustes del citoesqueleto, lo que conlleva una regresión tumoral. Se piensa que a pesar de que estos receptores de membrana se expresan predominantemente en el tejido tumoral y que su activación conlleva un aumento en la apoptosis, las células tumorales podrían compensar sus efectos antitumorales, aunque no se sabe bien a través de qué mecanismos (Gu et al, 2009). Si bien todavía se necesitan más estudios para conocer con exactitud los mecanismos posteriores a la activación del mAR que regulan la expresión y la función de determinados mediadores que aumentan la supervivencia celular en los tumores de colon, la activación de mAR con conjugados testosterona-albúmina inhibe la vía de señalización PI-3K/Akt, fundamental en la capacidad invasiva de las células tumorales, además de producir la fosforilación/activación de la vinculina, regulando e inhibiendo la migración potencial de las células tumorales (Gu et al, 2011).

Todos estos datos abren la puerta a nuevas dianas terapéuticas como el uso de agonistas específicos del ER $\beta$  y fitoestrógenos como las isoflavonas en la prevención del CCR (Schleipen et al, 2011; Lechner et al, 2005), así como activadores de los mAR (Gu et al, 2009; Gu et al, 2011).

# *Hipótesis y Objetivos*



## 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

### 2.1. Hipótesis

El cáncer colorrectal es la tercera neoplasia más frecuente en el mundo, con un millón de casos nuevos estimados y medio millón de muertes anuales. Sin embargo únicamente el 60% de los casos diagnosticados llegan a controlarse con las terapias actuales.

La melatonina es una indolamina que actúa como una hormona endocrina, paracrina y autocrina, realizando múltiples funciones como la regulación del ritmo circadiano, tiene propiedades antioxidantes y ejerce efectos inmunomoduladores y oncostáticos. Además de en la glándula pineal se sintetiza también en otros órganos como el intestino, donde se han demostrado concentraciones diez veces mayores que en el plasma.

Desde las últimas dos décadas se vienen estudiando las propiedades de la melatonina en la inhibición del crecimiento celular, en el control de la capacidad invasiva y metastática de diversos tumores, así como en la inducción de la diferenciación celular. Los mecanismos implicados en estas acciones no son del todo conocidos, aunque se sabe de la implicación de los receptores de membrana y nucleares en las acciones de la melatonina en el CCR.

Hay una clara evidencia de la existencia de diferencias de género en el desarrollo y progresión de los CCR, presentando las mujeres una menor incidencia de formas agresivas. Los colonocitos normales expresan receptores estrogénicos (ER  $\alpha$  y ER  $\beta$ ) y androgénicos (AR), relacionándose la pérdida de su expresión con la progresión del CCR. La regulación tanto de ER como de AR se ha relacionado con los efectos oncostáticos de la melatonina en el cáncer de mama y en el cáncer de próstata respectivamente y los receptores de melatonina MT1 y MT2 podrían estar implicados en este proceso. Ya que la expresión de los receptores de membrana de la melatonina está afectada tanto por estrógenos como por andrógenos, los receptores de membrana podrían estar implicados en las diferencias de género presentes en el CCR.

## 2.2. Objetivos

### Principales:

- Analizar las posibles diferencias asociadas al género en la progresión tumoral en relación a la expresión de los receptores de membrana y nucleares de la melatonina (MT1, MT2, RZR/ROR) en pacientes con CCR.
- Estudiar la posible relación entre los receptores de melatonina y los receptores hormonales ER  $\alpha$ , ER $\beta$  y AR en pacientes con CCR.
- Corroborar los resultados obtenidos en las muestras de pacientes mediante la realización de estudios *in vitro* en células de colon tumorales y normales.

### Secundarios:

- Estudiar la posible utilidad de algunos agonistas/antagonistas de los receptores de membrana de la melatonina como posibles tratamientos del CCR al haber encontrado un descenso de la expresión de los receptores MT1 y MT2 asociado al sexo masculino en las muestras tumorales respecto a la mucosa de colon normal.



# *Pacientes y Metodología*



### 3. PACIENTES Y METODOLOGÍA

#### 3.1. Muestras de células tumorales colorrectales humanas

La Red de Banco de Tumores Andaluza (RBTA) ha suministrado las muestras utilizadas. El proyecto fue aprobado por el comité de ética del Hospital Universitario San Cecilio de Granada y todos los pacientes dieron su consentimiento informado de manera escrita tanto para el almacenamiento de las muestras posquirúrgicas en la RBTA como para su posterior uso en la investigación biomédica (Anexo).

Los criterios de inclusión fueron:

- Pacientes con CCR de cualquier edad sometidos a cirugía en el Hospital Universitario San Cecilio de Granada

Los criterios de exclusión fueron:

- Pacientes con CCR sometidos a terapia neoadyuvante
- Pacientes con antecedentes de neoplasia
- Pacientes con antecedentes de neoplasia sometidos a tratamiento.

Todas las muestras se obtuvieron entre las 9.00 am y las 12.00 am del mismo día (3 horas), y tanto las muestras de tejido tumoral viable como de tejido sano adyacente fueron diseccionadas y congeladas frescas en Tissue-Tek® (OptimalCuttingTemperaturecompound, SakuraFinetekEurope B.V., Zoeterwoude, Netherlands) mediante métodos estándar.

MT1, MT2, ROR $\alpha$ , ER $\alpha$ , ER $\beta$  y AR ARNm fueron analizados en el tejido tumoral y adyacente en una muestra de 54 pacientes, con una edad media de  $72 \pm 11$  años, que habían sido sometidos a cirugía por un cáncer colorrectal primario esporádico. Las características de los pacientes se muestran en la tabla 1.

Según la última clasificación TNM de 2010, las muestras se agruparon en tumores en estadio precoz (estadios I y II) y tumores en estadio

avanzado (III y IV), ya que no se encontraron diferencias en los parámetros analizados en cada grupo de forma independiente.

<i>Características</i>	<i>N (%)</i>
Sexo	
Femenino	24 (44,4)
Masculino	30 (55,6)
Localización	
Colon	50 (92,6)
Recto	4 (7,4)
Tipo histológico	
Bien diferenciado	12 (22,2)
Mod. Diferenciado	24 (44,4)
Poco diferenciado	18 (33,3)
Estadio pTNM	
I	7 (13,0)
II	23 (42,6)
III	22 (40,7)
IV	2 (3,7)
Estadio y sexo	
Estadio I + II	
Femenino	12 (50)
Masculino	12 (50)
Estadio III + IV	
Femenino	12 (40)
Masculino	18 (60)
Nº ganglios extirpados	
<12	21 (38,9)
>12	33 (61,1)

**Tabla 1.** Características de los pacientes.

### 3.2. Cultivos celulares y reactivos

Las líneas celulares de colon humanas FHC, Caco-2, DLD-1 y HT-29 han sido obtenidas de la American Type Culture Collection (Rockville, MD). Las células MCF7 han sido donadas por la Dra. María Isabel Núñez

(Departamento de Radiología y Medicina Física de la Universidad de Granada, España). Las células Caco-2 se han cultivado en MEM suplementado con 5% de aminoácidos no esenciales (NEAA). Las células cancerígenas HT-29 y DLD-1 se cultivaron en RPMI 1640, mientras que las células no tumorales FHC se cultivaron en el medio Ham's F12 45%/DMEM 45% suplementado con 10 ng/mL de toxina del cólera, 0,005 mg/mL de insulina, 0,005 mg/mL de transferrina y 100 ng/mL de hidrocortisona. Las células MCF-7 se cultivaron en medio DEMEM. Cada medio contenía un 10% de suero fetal bovino (SFB) y un 1% de cóctel antibiótico-antifúngico (constituido por penicilina, estreptomina y anfotericina B). Todos los reactivos de cultivos celulares se obtuvieron de Gibco-BRL (Rocville, MD). Las células se cultivaron a 37°C en un ambiente humidificado al 5% de atmósfera de CO<sub>2</sub>.

La melatonina ultrapura se obtuvo de Helsinn Chemicals (Biasca, Switzerland). La melatonina se preparó diariamente en una solución de 1000mM de DMSO y se diluyó posteriormente a la concentración deseada directamente en el medio de cultivo. Se obtuvo 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolin bromuro (MTT) de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). Los agonistas de la melatonina 6-cloromelatonina y ramelteon se obtuvieron de Santa Cruz Biotectnología, Inc, (Santa Cruz, CA). Ambos reactivos se disolvieron en DMSO a la concentración de 100mM y se conservaron a -20°C hasta su uso. Los antagonistas de la melatonina utilizados han sido Luzindol y S20928. Luzindole ha sido obtenido de Tocris Bioscience (Bristol, UK), disuelto en DMSO a la concentración de 25mM y almacenado en pequeñas alícuotas a -20°C hasta su uso. S20928 se obtuvo de Servier (Neuilly, Francia), y así mismo se conservó en una solución de almacenamiento (100mM en DMSO), conservándose en pequeñas alícuotas a -20°C. Las concentraciones apropiadas de estos reactivos se obtuvieron mediante diluciones de las soluciones de almacenamiento en el medio completo. Todos los demás reactivos se obtuvieron de Sigma Chemical Co.

### **3.3. Extracción del ARN y síntesis de primera cadena de ADNc**

Se preparó ARN total de las muestras de tejido mediante el reactivo TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA). La cantidad total de ARN se determinó

mediante espectrometría UV, y la integridad del ARN se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa.

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.

### 3.4. Reacción de transcripción inversa y PCR a tiempo real (RT-PCR)

Unos 5 µl de ADNc se amplificaron durante 40 ciclos con primers específicos para ubiquitina C (UBC), MT1, MT2, ROR $\alpha$ , ER $\alpha$ , ER $\beta$  y AR (Tabla 2). 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 una electroforesis en gel de agarosa de cada muestra, para descartar los productos de PCR no específicos y los dímeros de los primers.

GEN	CEBADOR SENTIDO	CEBADOR ANTISENTIDO	TAMAÑO PROD. PCR (PB)
UBC	tgggatgcaaatcttcgtgaagaccctgac	accaagtgcagagtggactctttctggatg	213
MT1	ttgctcttttgccattgctgggctctc	gtcatcagtgagagcggttccattaacc	289
MT2	gtggtgtttgtgatcttgcctctgctgg	agcatctgcctggtgctgcacaccaatgat	321
ROR $\alpha$	ttgtactgatgtagcagatcgctcatggc	gctggctcaaattctgaagtgaacaactcc	277
ER $\alpha$	aattatgagatggactgtgggtactgggag	ttgctccagttgagagtaagtttcagggg	232
ER $\beta$	tgcagtcaatccatcttaccctggagcac	gcgatggaccactaaaggagaaaggtgcc	228
AR	agctccgggacactgaactgccgtctacc	aagagagtgtgccaggatgaggaagcgcg	314

**Tabla 2.** Cebadores

### **3.5. Determinación de la concentración de proteínas**

#### **3.5.1. Método Bradford**

La concentración de proteínas de las muestras se determinó siguiendo el método de reacción colorimétrica de Bradford, basado 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.

Para su realización, primeramente se hizo una curva patrón de concentraciones crecientes de BSA (albúmina sérica bovina; Sigma) (0-250 µg/ml) en agua destilada. 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-PowerWavex).

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.

#### **3.5.2. 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: MT1 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.), MT2 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.), ROR $\alpha$  (Santa Cruz Biotechnology, Inc.), ER $\alpha$  (Abcam, Cambridge, MA), ER $\beta$  (Santa Cruz Biotechnology, Inc.), y AR (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) y  $\beta$ -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).

### **3.6. Ensayo de invasión *in vitro***

Los ensayos de invasión *in vitro* se realizaron usando Bio Coat Matrigel Invasion Chambers (Betcon Dickinson, Bedford, MA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Resumidamente, se sembraron células de cáncer de colon ( $10^5$  células) en cámaras transwell de Matrigel revestidas, consistente en membranas con poros de 8 $\mu$ m. Posteriormente se colocaron las cámaras en placas de 24 pocillos, que contenían medio basal. Tras 24 horas de incubación las células invasoras estaban fijas e impregnadas con la solución Giemsa. Se contaron las células en cinco campos microscópicos aleatorios.



### **3.7. 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 40.000 células/ml. Al día siguiente, las células se trataron según el protocolo correspondiente, de modo que el volumen final de incubación siempre fue de 100  $\mu$ l. Acabado el tratamiento, se añadieron 10  $\mu$ 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 CO<sub>2</sub>. Pasado este tiempo, se añadieron 100  $\mu$ 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 CO<sub>2</sub> toda la noche. Posteriormente, se evaluó la absorbancia respecto al control a 570 nm en un lector de placas (Triad multimode reader).

### **3.8. Análisis estadístico**

Los niveles de ARNm de mucosa normal y tejido tumoral se compararon utilizando el test de la t de Studen para muestras pareadas. El análisis bivariado se realizó utilizando el test de Chi<sup>2</sup> y el test exacto de Fisher. Los valores de P mayores de 0.05 se consideraron no significativos. Todos los cálculos estadísticos se realizaron con el software SPSS 15.0 (IBM Corporation, NY, USA). Los resultados del análisis de correlación están expresados como coeficiente de correlación de Sperman. Se han considerado como significativos valores de P inferiores o iguales a 0,05.



# *Resultados*



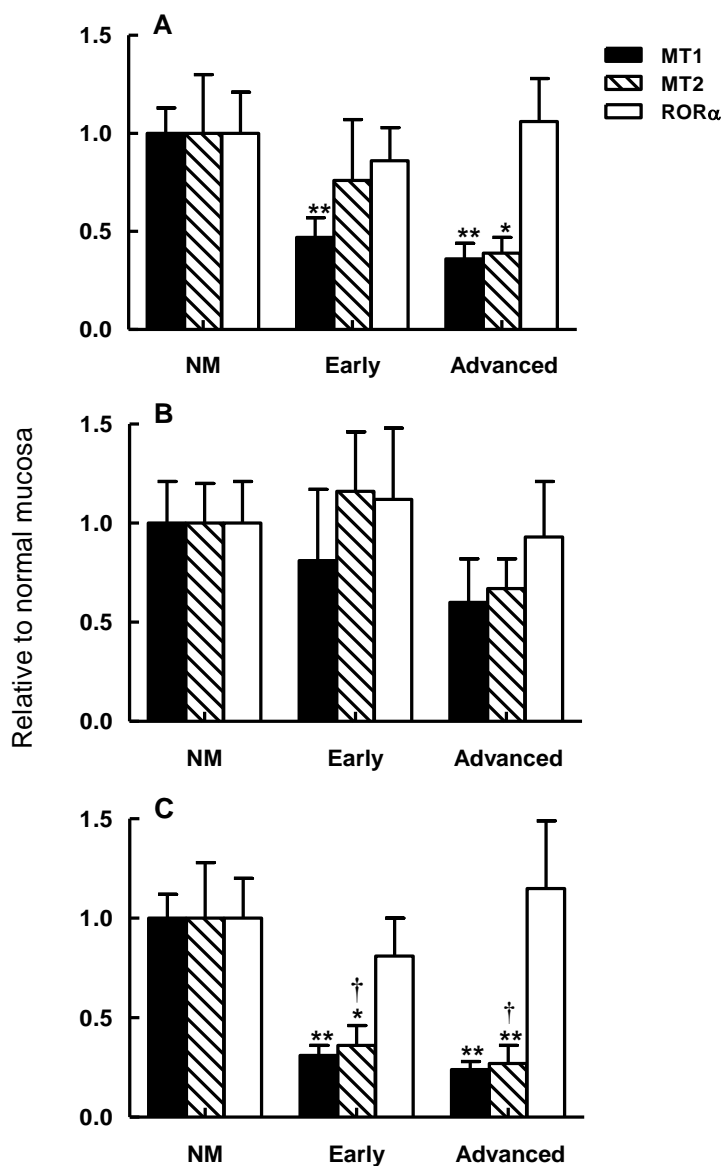
## 4. RESULTADOS

### 4.1. Evaluación de la expresión del ARNm y proteínas de MT1, MT2 y ROR $\alpha$ en muestras de tumores colorrectales humanos

En todos los pacientes se detectó un descenso en los niveles de expresión de ARNm de MT1 ( $40\pm 7$  fg/pg UQC *vs.*  $94\pm 12$  fg/pg UQC;  $P < 0.001$ ) y MT2 ( $32\pm 9$  fg/pg UQC *vs.*  $54\pm 12$  fg/pg UQC;  $P < 0.001$ ) en las muestras de tejido tumoral en comparación con las muestras pareadas de mucosa normal. No se detectaron diferencias en los niveles de expresión de ROR $\alpha$  ( $188\pm 26$  fg/pgUQC *vs.*  $198\pm 29$  fg/pg UQC).

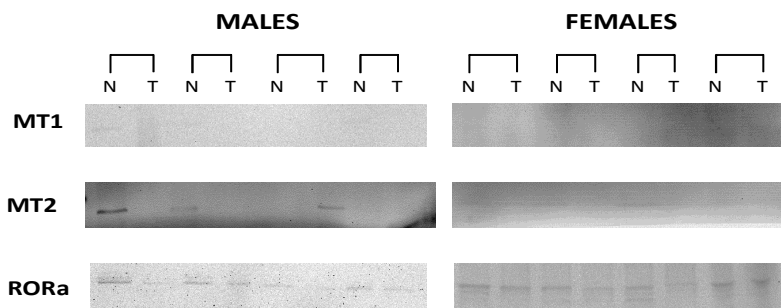
En relación al estadio tumoral, las muestras se agruparon en 30 pares de tejido tumoral/mucosa normal procedentes de tumores colorrectales en estadio precoz (estadios I y II) y 24 pares de tejido tumoral/mucosa normal de tumores colorrectales de estadio avanzado (estadios III y IV). Los niveles de ARNm MT1 fueron significativamente menores en el tejido tumoral tanto en el estadio precoz como en el estadio avanzado comparados con la mucosa normal de control (Figura 1A). En el caso de los niveles de ARNm MT2 se encontró un descenso en tejido tumoral frente a mucosa normal significativo únicamente en los estadios avanzados (Figura 1A). No se observaron cambios en el caso de los niveles de ARNm ROR $\alpha$  (Figura 1A).

En lo que se refiere a las diferencias asociadas al sexo, no se encontraron diferencias significativas en los niveles de ARNm MT1 y MT2 en el sexo femenino, tanto en los casos de estadio precoz como en los casos de estadio avanzado (Figura 1B). Sin embargo, en el caso del sexo masculino los niveles de expresión de MT1 y MT2 disminuyen en ambos estadios (Figura 1C). Comparando los niveles de expresión de MT1 y MT2 entre hombres y mujeres en el mismo estadio, se encontraron diferencias significativas en la expresión de ARNm MT2 tanto en tumores en estadio precoz ( $P < 0,05$ ) como en los de estadio avanzado ( $P < 0,05$ ).



**Figura 1.** Cambios relativos en los niveles de expresión de ARNm MT1, MT2 y ROR $\alpha$  en tumores colorrectales en estadio precoz (estadios I y II) y estadio avanzado (estadios III y IV) en comparación con mucosa normal (MN). (A) Todos los pacientes, (B) pacientes femeninas y (C) pacientes masculinos. Los datos representan foldchange  $\pm$ DS. \* $P < 0,05$  frente a MN; \*\* $P < 0,01$  frente a MN; † $P < 0,05$  frente a mujeres.

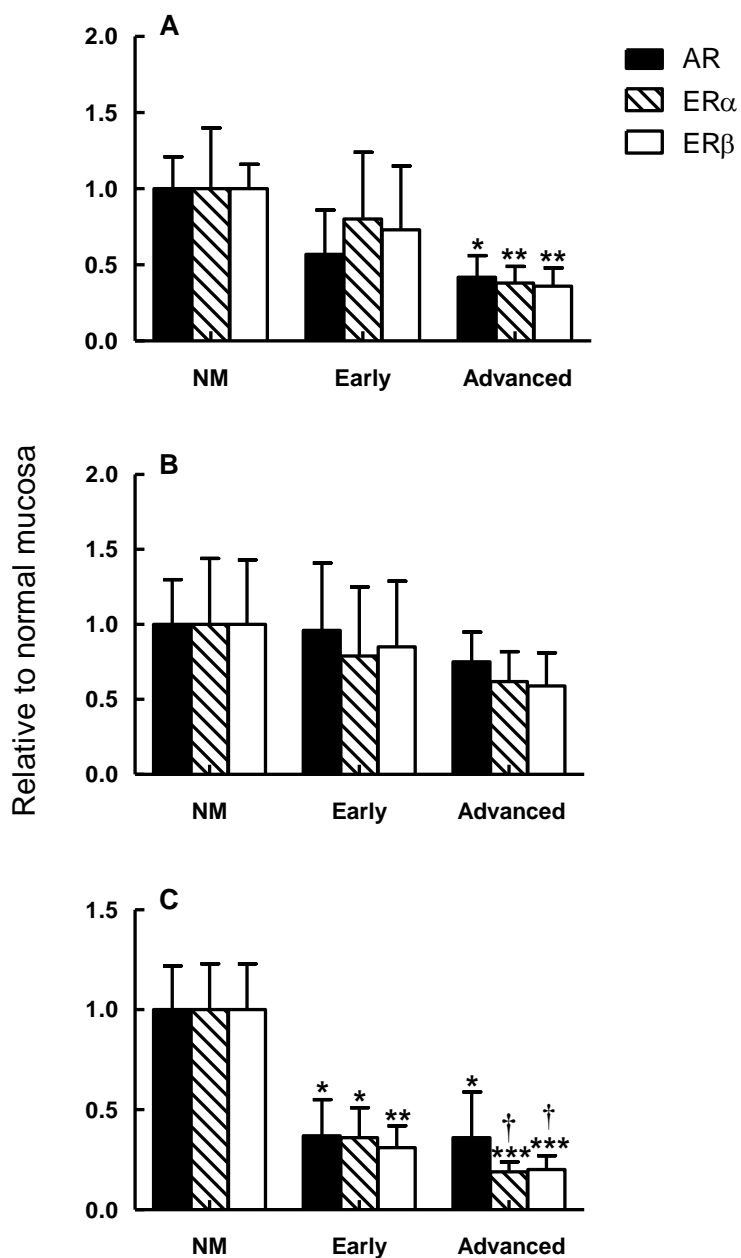
La expresión de proteínas de MT1, MT2 y ROR $\alpha$  se analizó en algunas muestras de hombres y mujeres. La proteína MT1 se detectó en escasa cantidad en las muestras de varones, mientras que en las muestras de mujeres no se detectó. Los niveles de proteínas de MT2 y ROR $\alpha$  se correlacionaron con los niveles de ARNm en ambos sexos (Figura2).



**Figura 2.** Western blotting de tejido de colon normal (líneas N) y maligno (líneas T) de 4 hombres y 4 mujeres usando anticuerpos específicos para MT1, MT2 y ROR $\alpha$ .

#### **4.2. Evaluación de la expresión del ARNm y proteínas de ER $\alpha$ , ER $\beta$ y AR en muestras de tumores colorrectales humanos**

Teniendo en cuenta todos los casos, se observó un descenso significativo en la expresión de ER $\alpha$  ( $9\pm 3.27$  fg/pg UQC vs.  $16\pm 3$  fg/pg UQC;  $P < 0.01$ ), ER $\beta$  ( $17\pm 6$  fg/pg UQC vs.  $32\pm 5$  fg/pg UQC;  $P < 0.01$ ) y AR ( $5\pm 2$  pg/pg UQC vs.  $10\pm 2$  pg/pg UQC;  $P < 0.05$ ) en las muestras de tejido tumoral frente a las de mucosa normal. Estas diferencias estaban restringidas a los tumores en estadio avanzado (Figura 3A).

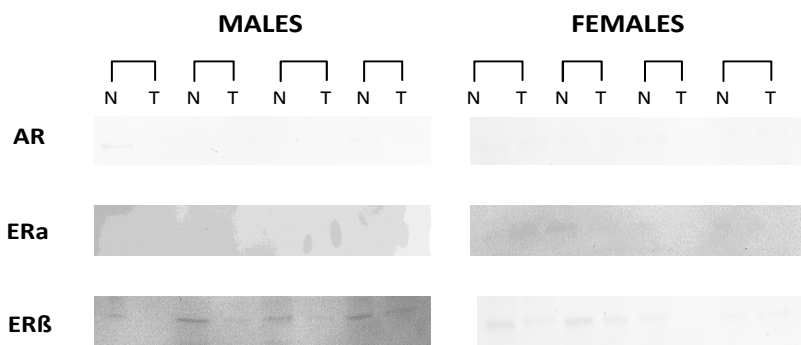


**Figura 3.** Cambio relativo de los niveles de expresión de AR, ER $\alpha$  y ER $\beta$  en tumores colorrectales en estadio precoz (estadio I y II) y estadio avanzado (estadio III y IV) frente a mucosa normal (MN). (A) Todos los pacientes, (B) sexo femenino, (C) sexo masculino. Los datos representan foldchange $\pm$ SD. \*  $P < 0,05$  frente MN; \*\*  $P < 0,01$  frente a MN; \*\*\*  $P < 0,001$  frente a MN; +  $P < 0,05$  frente a mujeres.



En mujeres, la expresión de ER $\alpha$ , ER $\beta$  y AR fue similar en ambos estadios en comparación con la muestra total de pacientes mujeres (Figura 3B). En el caso de los hombres, los niveles de expresión de ER $\alpha$ , ER $\beta$  y AR disminuyeron en ambos estadios (Figura 3C). Al comparar la expresión de ER $\alpha$ , ER $\beta$  y AR entre ambos sexos en el mismo estadio, se encontraron diferencias significativas en la expresión de ARNm de ER $\alpha$  ( $P < 0,05$ ) y ER $\beta$  ( $P < 0,05$ ) únicamente en los tumores en estadio avanzado.

La expresión de proteínas de AR fue escasamente detectada en mujeres. En hombres se correlacionó con la expresión de ARNm en aquellos casos en los que se detectó. La expresión de proteína ER $\alpha$  se detectó débilmente en mujeres y no se detectó en hombres. Por último, la expresión de proteína ER $\beta$  se detectó en ambos sexos en correlación con los niveles de ARNm (Figura 4).

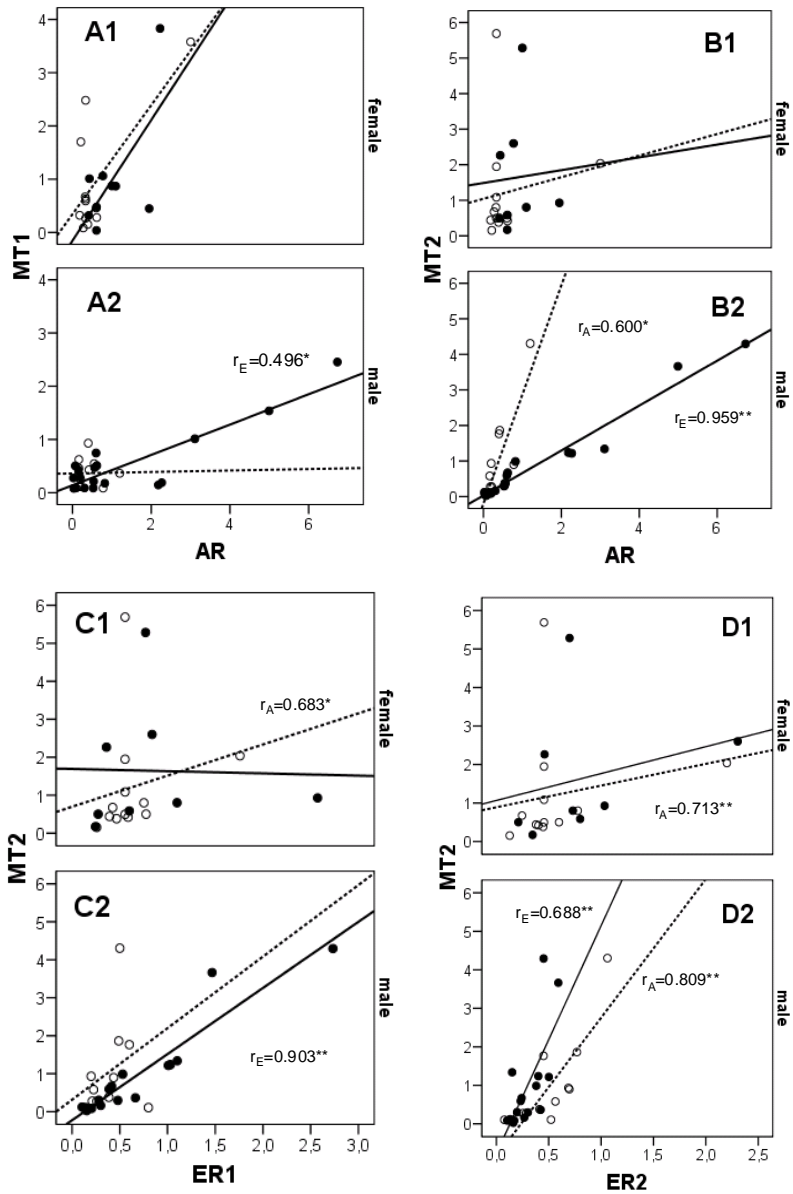


**Figura 4.** Western blotting de tejido de colon normal (líneas N) y maligno (líneas T) de 4 hombres y 4 mujeres usando anticuerpos específicos para ER $\alpha$ , ER $\beta$  y AR.

#### **4.3. Correlación de los niveles de ARNm de ER $\alpha$ , ER $\beta$ y AR con los niveles de MT1, MT2 ó ROR $\alpha$**

El análisis de los cambios de MT1, MT2, ROR $\alpha$ , ER $\alpha$ , ER $\beta$  y AR en tejido tumoral frente a mucosa normal (MN) en función del estadio tumoral y del sexo mostró una correlación positiva significativa de MT2 con ER $\alpha$ , ER $\beta$  y AR en los casos de estadio precoz en varones, mientras que en las mujeres solo se observó una correlación positiva con ER $\alpha$ . En el caso de los tumores colorrectales en estadio avanzado se apreció una correlación positiva de MT2 con ER $\beta$  y AR en el caso de varones, y solamente con ER $\beta$  en el caso de mujeres (Figura 5).

Así mismo se encontró que únicamente en el caso de tumores en estadio precoz en hombres MT1 se correlacionaba positivamente con AR. Curiosamente, no se encontraron correlaciones entre la expresión de AR y la expresión de MT1 y MT2 en el caso de mujeres (Figura 5).



**Figura 5.** Correlación de foldchange de la expresión de ARNm de los receptores de membrana de la melatonina en tejido tumoral frente a mucosa normal (MN) y foldchange de la expresión de los receptores hormonales esteroideos en tejido tumoral frente a MN, estratificándolo por sexo y en estadio precoz (—) y avanzado (-----). Coeficiente de correlación de Pearson: rE (tumores en estadio precoz-early stage tumors) y rA (tumores en estadio avanzado-advanced stage tumors). \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ .

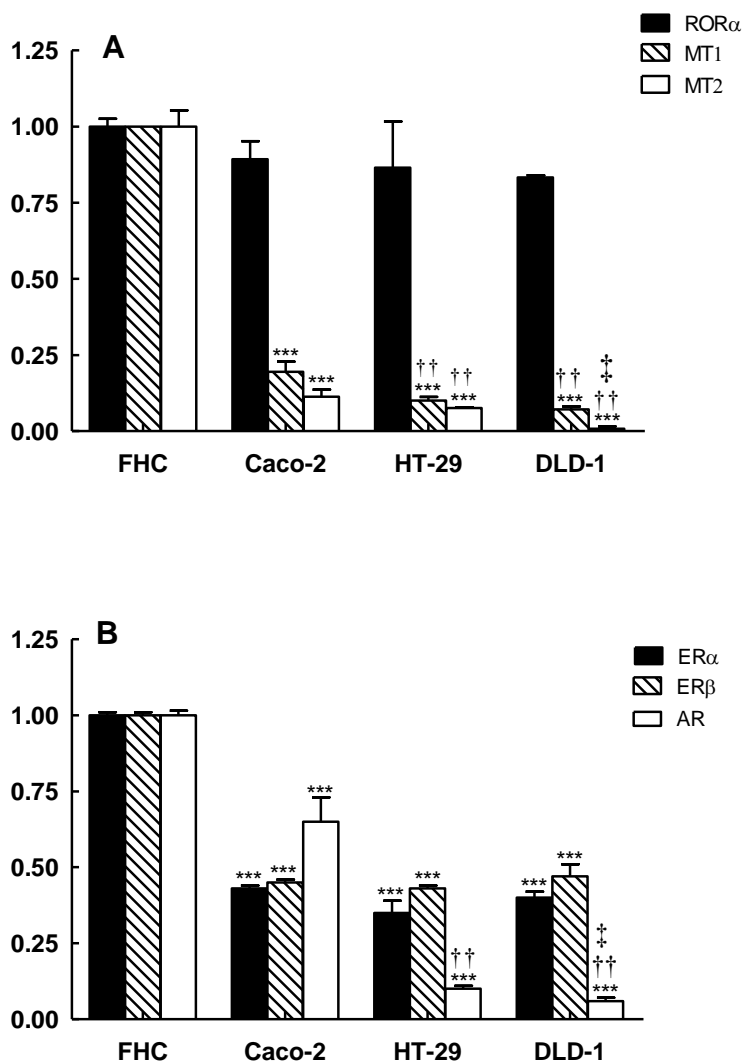
#### 4.4. Expresión de MT1, MT2, ROR $\alpha$ , ER $\alpha$ , ER $\beta$ y AR en líneas celulares normales y de cáncer de colon, así como su relación con la capacidad invasiva de las células cancerígenas *in vitro*

Se observó una mayor expresión de ARNm y proteína de MT1 y MT2 en células FHC normales que en cualquier otra línea celular colónica analizada (Figura 6A). Así mismo, los niveles de ARNm y proteína de ROR $\alpha$  fueron mayores en las células FHC normales, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas entre las células normales y el resto de las líneas celulares de colon tumorales (Figura 6A). Al comparar las líneas celulares cancerígenas se encontró la secuencia Caco-2 > HT-29  $\approx$  DLD-1 para la expresión de ARNm y proteína de MT1, mientras que para la expresión de ARNm y proteína de MT2 la secuencia fue Caco-2 > HT-29 > DLD-1 (Figura 6A).

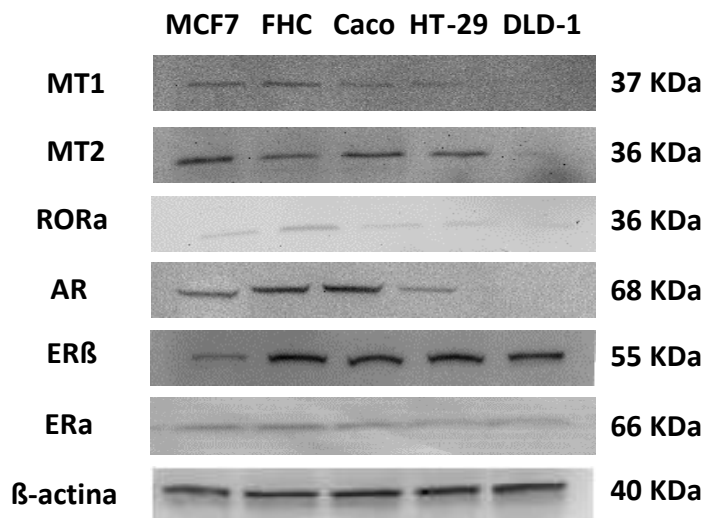
En lo que se refiere a AR, ER $\alpha$  y ER $\beta$ , las células FHC mostraron unos niveles de expresión de ARNm y proteína mayores que las líneas celulares cancerígenas. Sin embargo, las tres líneas celulares cancerígenas presentaron niveles similares de expresión de ER $\alpha$  y ER  $\beta$  (Figura 6B), mientras que la expresión de AR varió de una línea celular a otra, siendo la secuencia encontrada Caco-2 > HT-29 > DLD-1 (Figura 6B).

Mediante Western Blotting se evaluó la expresión de las proteínas MT1, MT2, ROR $\alpha$ , ER $\alpha$ , ER $\beta$  y AR en las mismas líneas celulares y condiciones de cultivo con el objetivo de evaluar si existe correlación con la expresión del ARNm (Figura 7), encontrando una correlación positiva entre ambas.

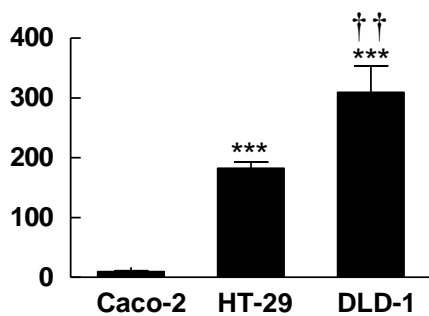
Mediante un test *in vitro*, también se evaluó la capacidad invasiva de las líneas celulares Caco-2, HT-29 y DLD-1. El número de células invasivas fue mayor en las células DLD-1, seguido de HT-29 y posteriormente las células Caco-2 (Figura 8). Según estos resultados, la capacidad invasiva de las células de cáncer de colon es mayor en aquellas células con menor expresión de MT1, MT2 y AR.



**Figura 6.** (A) Cambio relativo de los niveles de expresión de ARNm de MT1, MT2 y ROR $\alpha$  en Caco-2, HT-29 y DLD-1 en comparación con células FHC. Los datos representan foldchange $\pm$ SD de los tres experimentos por duplicado. \*\*\*  $P < 0,001$  frente a FHC; <sup>††</sup>  $P < 0,01$  frente a Caco-2; <sup>‡</sup>  $P < 0,05$  frente a HT-29. (B) Cambio relativo de ER $\alpha$ , ER $\beta$  y AR y los niveles de expresión de ARNm en Caco-2, HT-29 y DLD-1 en comparación con células FHC. \*\*\*  $P < 0,001$  frente a FHC; <sup>††</sup>  $P < 0,01$  frente a Caco-2; <sup>‡</sup>  $P < 0,05$  frente a HT-29. Los datos representan foldchange $\pm$ SD de los tres experimentos por duplicado.



**Figura 7.** Expresión de la proteína de MT1, MT2, ROR $\alpha$ , ER $\alpha$ , ER $\beta$  y AR en líneas celulares normales (FHC) y tumorales (Caco-2, HT-29 y DLD-1) de colon. La línea MCF-7 se usó como control positivo. La  $\beta$ -actina se utilizó como housekeeping.

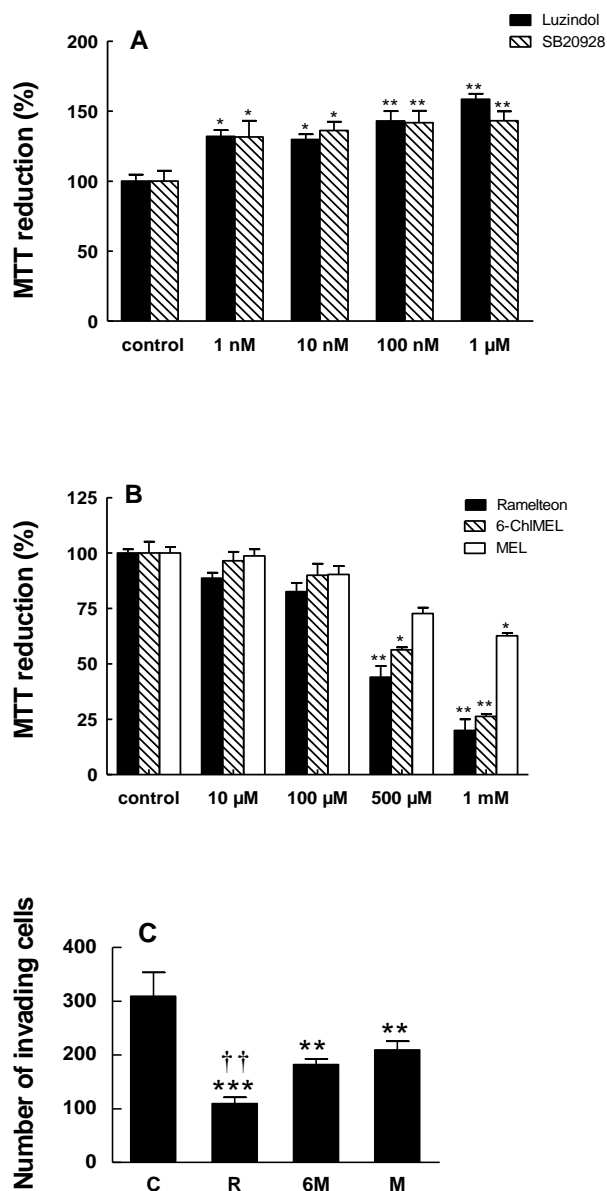


**Figura 8.** Capacidad invasora *in vitro* de las células de colon tumorales Caco.2, HT-29 y DLD-1 utilizando un ensayo con matri-gel. \*\*\* $P < 0,001$  frente a Caco-2; †† $P < 0,01$  frente a HT-29.

#### **4.5. Los agonistas MT1 y MT2 no selectivos inhiben el crecimiento celular y la capacidad invasiva de las células de cáncer de colon *in vitro***

Se analizó la posibilidad de uso de agonistas MT1 y MT2 como tratamiento para el cáncer de colon. Para ello se cultivaron células DLD-1 en presencia de 1 nM-1  $\mu$ M de Luzindole y SB20928 (dos antagonistas no selectivos de MT1/MT2), en 10  $\mu$ M-1 mM de ramelteon y 6-cloromelatonina (dos agonistas no selectivos de MT1/MT2) y en 10  $\mu$ M-1 mM de melatonina y se estudiaron sus efectos *in vitro* en el crecimiento y la invasión celular.

El tratamiento con luzindole y SB20928 produjo un incremento dosis dependiente en el crecimiento celular (Figura 9A), siendo el luzindole el más potente (IC50 luzindol  $\frac{1}{4}$  540 nM vs. IC50 SB20928 > 1 mM). Al contrario, ramelteon, 6-cloromelatonina y melatonina disminuyeron el crecimiento celular también de manera dosis dependiente. En este caso, el más potente en sus efectos fue el ramelteon (IC50 ramelteon  $\frac{1}{4}$  425 mM; IC50 6-cloromelatonina  $\frac{1}{4}$  700 mM; IC50 melatonina > 1 mM) (Figura 9B). Los agonistas MT1/MT2 también redujeron la invasión celular, siendo igualmente más potente en este efecto el ramelteon frente a 6-cloromelatonina a la melatonina (Figura 9C).



**Figura 9.** Crecimiento celular estimado mediante ensayo de reducción MTT en células DLD-1 tratadas con los antagonistas de MT1/MT2 luzindole y S20928 (0-1  $\mu$ M) (A) o con los agonistas MT1/MT2 Ramelteon, 6-cloromelatonina y melatonina (0-1  $\mu$ M) (B). \*  $P < 0,05$  frente a control; \*\*  $P < 0,01$  frente a control; \*\*\*  $P < 0,001$  frente a control. (C) Efecto de Ramelteon (R), 6-cloromelatonina (6M) y melatonina (M) en la capacidad invasiva de las células DLD-1 determinada mediante ensayo *in vitro* en matri-gel. \*\*  $P < 0,01$  frente a control; \*\*\*  $P < 0,001$  frente a control; ++  $P < 0,01$  frente a M.



# *Discusión*



## 5. 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 esta relación (Mediavilla et al, 2010). En 1978 se formuló la teoría de que el estado de hiperestrogenismo producido por la disminución de la función de la glándula pineal, con la consiguiente disminución de los niveles séricos de melatonina, podía participar en la carcinogénesis de la glándula mamaria (Cohen et al, 1978). Desde entonces numerosos estudios han sugerido la asociación de bajos niveles de melatonina con la progresión de varios cánceres (Mediavilla et al, 2010; Jung y Ahmed, 2006; Mills et al, 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 otros tipos de cáncer como el de ovario, endometrio, linfomas y leucemia, pulmón, melanoma, sarcomas, hepatocarcinoma, carcinoma de piel, tumores neurales, de cuello uterino y carcinoma laríngeo (Mediavilla et al, 2010). La mayoría de estos estudios se han llevado a cabo *in vitro* o en animales de experimentación (Mediavilla et al, 2010), aunque también se han realizado ensayos clínicos en humanos (Wang et al, 2012; Sánchez-Barcelo et al, 2010; Mills et al, 2005) encontrando que la melatonina como tratamiento adyuvante mejora la remisión tumoral, la supervivencia a 1 año y disminuye los efectos adversos de la radioterapia.

La melatonina ha demostrado inhibir el desarrollo tumoral en condiciones tanto *in vitro* como *in vivo*. Las acciones oncostáticas de la melatonina se deben a distintos mecanismos que intervienen en las diferentes etapas del proceso carcinogénico, desde modificaciones epigenéticas hasta acciones en el ciclo celular o en la inducción de la apoptosis (Mediavilla et al 2010). Estos mecanismos incluyen: a) propiedades pro-apoptóticas directas, mediadas genéticamente, sobre las células tumorales; b) actividad antioxidante; c) reducción de la captación de factores clave en el crecimiento celular y para las moléculas de señalización del crecimiento tumoral; d) estimulación de los mecanismos inmunes del organismo y e) efectos antiangiogénicos (Srinivasan et al, 2011; León et al, 2014; Xin et al, 2015).

Se ha descrito que la melatonina inhibe la proliferación celular debido a que disminuye la síntesis de ADN, de manera dosis dependiente (Farriol et al, 2000), y estimula la diferenciación celular (Xin et al, 2015). Otra vía de actuación es a través de su capacidad de modular el calcio intracelular y la actividad de la calmodulina, aumentando su degradación e inhibiendo, por

tanto, la progresión del ciclo celular (Srinivasan et al, 2011). La melatonina también actúa induciendo directamente la muerte de las células tumorales mediante apoptosis (Xin et al, 2015), aumentando la expresión de p-16 y p-21 (lo que produce una detención del ciclo celular y una activación de los programas de muerte celular prematura) e inhibiendo la expresión de la endotelina-1 (León et al, 2014) que produce un efecto proapoptótico y antiangiogénico. Las acciones antioxidantes y antiinflamatorias de la melatonina que contrarrestan el estado oxidativo y reducen la producción de óxido nítrico, podrían estar involucradas también en la inducción de la apoptosis de las células tumorales (Srinivasan et al, 2011; Cutando, 2007).

Los receptores de membrana de la melatonina se han implicado en los mecanismos de inhibición de la proliferación celular inducida por melatonina en el caso de los tumores de mama, próstata, melanoma y CCR (Pandi-Perumal et al, 2008; Srinivasan et al, 2008), mientras que los receptores nucleares se han implicado en el cáncer de mama y de colon (Pandi-Perumal et al, 2008; Winczyk et al 2001; Winczyk et al, 2002; García Navarro et al, 2007). Entre los diferentes mecanismos de acción oncostática de la melatonina se encuentran también la inhibición de la captación de ácido linoleico (y por tanto, un descenso de la producción de AMPc como fuente de energía para el crecimiento tumoral y las vías moleculares de crecimiento tumoral), mediado a través de sus receptores de membrana MT1 y MT2 (Jung y Ahmad, 2006). También a través de la unión a sus receptores nucleares (ROR/RZR) la melatonina altera la transcripción de diferentes genes que participan en la proliferación celular como 5-lipoxigenasa, p21 o sialoproteína ósea. Además, la sobreexpresión de los receptores MT1 en las células del cáncer de mama aumenta los efectos antiproliferativos de la melatonina añadida de manera externa e incluso disminuye la incidencia de los mismos (González et al, 2007; Yuan et al, 2002; Collins et al, 2003). La activación de los receptores MT1 inhibe la proliferación celular en los cánceres de próstata (Xi et al, 2000) y se ha encontrado un aumento en la expresión de proteínas de MT1 en las células de hepatocarcinoma HepG2 tras el tratamiento con melatonina (Carbajo-Pescador et al, 2009).

En nuestro trabajo la expresión de MT1 y MT2 estaba disminuida en los tumores colorrectales frente a mucosa normal, mientras que no encontramos diferencias en la expresión de ROR $\alpha$ . Estos resultados son similares a estudios previos en pacientes con CCR (Vician et al, 1999; Nemeth et al, 2011). El desarrollo del CCR es un proceso con múltiples estadios, que tiene lugar debido a la acumulación de varios eventos genéticos

aislados, cada uno de los cuales proporciona una ventaja selectiva para el crecimiento de las células tumorales (Fearon y Vogelstein, 1990). Ya que la melatonina presenta importantes actividades bloqueadoras en el desarrollo y crecimiento tumoral, y que existe una implicación de los receptores de melatonina en las propiedades anticancerígenas de la misma, un descenso en la expresión de los receptores de membrana de la melatonina podría suponer un detrimento de sus mecanismos protectores y, por tanto, una mayor susceptibilidad para desarrollar tumores (Jung y Ahmad, 2006). Estudios recientes han encontrado una disminución de los niveles de MT1 en el tejido tumoral colorectal frente a la mucosa colónica adyacente (Nemeth et al, 2011) y una disminución en la expresión de MT1 tras el tratamiento con melatonina (Hong et al, 2014). En consonancia con estos resultados hemos encontrado una mayor capacidad invasiva en aquellas líneas celulares tumorales con menor expresión de MT1 y MT2. Contrariamente a nuestros hallazgos otros estudios en humanos han encontrado alteraciones en la expresión de MT1 en el cáncer de mama (Lai et al, 2009) y cáncer óseo (Toma et al, 2007), con una mayor expresión de ARNm MT1 en las muestras tumorales frente a la mucosa normal. Estas discrepancias podrían deberse a la especificidad dependiente de tejidos de las acciones de la melatonina (Cardinali et al, 2003). Además también encontramos estudios que explican las actividades oncostáticas de la melatonina mediadas a través de un aumento de los receptores nucleares (Winczyk et al, 2002; Hong et al 2014), sin embargo en nuestro estudio no hemos encontrado diferencias significativas en la expresión de ROR $\alpha$ .

Las acciones antioncogénicas de la melatonina son especialmente relevantes en los tumores hormonodependientes como los de mama, ovario y próstata. La relación de la melatonina con las vías de señalización estrogénicas ha sido ampliamente estudiada, fundamentalmente en el cáncer de mama tras encontrarse que un descenso en los niveles de melatonina producían un estado de hiperestrogenismo relativo lo que provocaría una exposición temprana y prolognada del tejido mamario a los estrógenos contribuyendo al desarrollo del cáncer de mama (Cohen et al, 1978).

Sabemos que la melatonina interactúa con los receptores estrogénicos (ER) como un modulador selectivo del receptor estrogénico, aunque no se une al receptor estrogénico ni interfiere con la unión de los estrógenos a su receptor, sino que sus propiedades antiestrogénicas se deben a su capacidad de disminuir la expresión de ER $\alpha$ , así como a su capacidad de inhibir la unión del complejo E2-ER con el elemento de respuesta estrogénico (ERE) en el ADN

(Mediavilla et al, 2010). Estos mecanismos se realizan a través de la unión específica de la melatonina a su receptor de membrana MT1.

La asociación de la calmodulina con el complejo E2-ER facilita su unión al ERE, de manera que la calmodulina actúa como un modulador de la actividad transcripcional de ER $\alpha$ , aunque no es así en el caso de ER $\beta$ . El hecho de que la melatonina se una a la calmodulina inactivando el complejo Ca<sup>2+</sup>/Calmodulina cobra especial importancia en este contexto ya que esta inactivación de la calmodulina es otro de los mecanismos por el que la melatonina interactúa con la vía de señalización estrogénica (Mediavilla et al, 2010).

En nuestro estudio describimos un descenso de la expresión de los receptores de membrana de la melatonina entre los pacientes de sexo masculino, indicando la posible implicación de MT1 y MT2 en la mayor malignidad del cáncer de colon en los hombres. En los CCR se ha observado que la pérdida de la expresión de ER $\alpha$ , ER $\beta$  y AR se correlaciona con la progresión tumoral (Castagnetta et al, 2002; Konstantinopoulos et al, 2003; Cho et al, 2007; Marugo et al, 1992) y que existe una reducción específica según sexo de la expresión de ER $\beta$  (Campbell-Thompson et al, 2001). Por tanto, evaluamos la expresión de ER $\alpha$ , ER $\beta$  y AR en los CCR así como en mucosa sana adyacente, observando que la expresión de ER $\alpha$ , ER $\beta$  y AR también disminuye de manera significativa en hombres, tanto en estadios precoces como en estadios avanzados. También encontramos una correlación positiva entre la expresión de MT2 y la expresión de ER $\alpha$  y ER $\beta$  en ambos sexos. Curiosamente, en la muestra total de pacientes y en hombres la expresión de AR se correlacionan principalmente con MT2, aunque también con la expresión de MT1, pero no se encontró esta correlación en las muestras de sexo femenino. Según los resultados obtenidos en las muestras humanas la expresión de melatonina y de receptores esteroideos es mayor en las células de colon normales que en las tres líneas celulares de cáncer de colon estudiadas. Sin embargo, si consideramos únicamente las líneas celulares tumorales, su capacidad invasiva aumenta cuando la expresión de MT1, MT2 y AR disminuye, pero este hecho no está relacionado con la expresión de ER $\alpha$  y ER $\beta$ . Esta discrepancia con respecto al estudio realizado con muestras humanas se podría deber al pequeño número de muestras analizadas, lo que constituye una importante limitación de nuestro estudio.

Estudiados en su conjunto, los resultados podrían indicar una disminución en la señalización de la melatonina en ambos sexos, principalmente a través de MT2, seguida de una reducción en la expresión de

ARNm de ER $\alpha$  y ER $\beta$ , o al revés. Por otro lado, una interacción con AR podría tener lugar solo en el sexo masculino. Otra explicación para el descenso concomitante de la expresión de AR, ER $\alpha$ , ER $\beta$ , MT1 y MT2 podría ser la influencia de mecanismos epigenéticos similares. Así, el análisis de muestras de tumores de células escamosas orales ha mostrado que el gen de MT1 humano podría tener implicación en este tipo de tumores con un papel diana del silenciamiento epigenético debido a la hipermetilación de islas CpG (citosina y guanina separadas por fosfato) en su región promotora, estando por tanto implicado en la vía CIMP (CpG island methylation phenotype) de la carcinogénesis (Nakamura et al, 2008). Además, se ha mostrado que la metilación de las islas CpG provoca la inactivación de los genes de AR, ER $\alpha$  y ER $\beta$  en los carcinomas de colon y próstata (Nojima et al, 2001; Zhu et al, 2004). Sin embargo, son necesarios más estudios para entender la interacción entre los receptores esteroideos y los receptores de melatonina en el CCR.

Se ha sugerido que la melatonina podría actuar sobre la inhibición de la proliferación induciendo apoptosis en las células de cáncer de colon, no solo a través de los receptores de membrana, sino también a través de la vía de los receptores nucleares (Winczyk et al, 2002). En nuestra cohorte, la expresión de ARNm de ROR $\alpha$  fue la misma en las muestras tumorales que en la mucosa normal en la muestra total de pacientes, tanto en estadios precoces como en estadios avanzados. *In vitro*, la capacidad de invasión de las células cultivadas no estaba relacionada con la expresión de ROR $\alpha$ . Estos resultados reflejan la necesidad de realizar más estudios para dilucidar la implicación de los receptores nucleares en el CCR.

Se ha comprobado que la melatonina administrada de forma exógena en tumores digestivos avanzados mejora la eficacia y disminuye la toxicidad de los tratamientos convencionales como la quimioterapia y la radioterapia, además de mejorar la astenia y la caquexia utilizada como terapia paliativa (Lissoni et al, 2003; Lissoni, 2002; Lissoni et al 1995). Un metanálisis reciente encuentra una mejora significativa en las tasas de remisión parcial o completa tras la administración de 20mg de melatonina como tratamiento adyuvante a la quimioterapia o radioterapia en tumores sólidos avanzados, además de evidenciar una disminución significativa en los efectos adversos de la quimioradioterapia como la trombocitopenia, la neurotoxicidad y la astenia (Wang et al, 2012). La administración subcutánea de bajas dosis de IL-2 junto con melatonina puede ser una segunda línea terapéutica efectiva en los tumores metastáticos de colon que progresan a pesar de tratamiento con 5-fluororacilo (5-FU), ya que induce la regresión tumoral y mejora la

supervivencia global al año (Barni et al, 1995). La melatonina también aumenta la eficacia de otros tratamientos del cáncer colorrectal metastático como el irinotecan (Cerea et al, 2003).

El ramelteon es un análogo de la melatonina con mayor afinidad que el ligando natural para los receptores de membrana, aprobado por la FDA para el tratamiento del insomnio que ha demostrado incrementar los niveles de producción de citoquinas proinflamatorias como la interleuquina 2 (IL-2) por parte de los linfocitos y que sería, por tanto, útil en el tratamiento de los cánceres metastásicos que expresen receptores de membrana de la melatonina (Kast y Altschuler, 2006; Kast, 2015). Por otro lado, los antagonistas de la melatonina como el Luzindol han demostrado que contrarrestan los efectos inhibitorios de la melatonina sobre el desarrollo tumoral en el cáncer de mama y colorrectal en líneas celulares cancerígenas murinas en ensayos *in vitro* (Umit et al, 2012; Winczyk et al 2009).

En las células cultivadas, la melatonina y otros agonistas de los receptores MT1 y MT2, como ramelteon y 6-cloromelatonina inhiben el crecimiento celular y la invasión, siendo estas últimas más potentes incluso que la melatonina. A pesar de que serían necesarios más estudios *in vivo*, estas dos sustancias podrían considerarse como nuevas alternativas terapéuticas debido a su efecto inhibitorio de sobre el crecimiento de las células tumorales y la invasión, y al descenso de los niveles de expresión de MT1 y MT2 en los tumores colorrectales avanzados en hombres.



# *Conclusiones*



## 6. CONCLUSIONES

1. La expresión del ARNm de MT1 y MT2 se encuentra disminuida en tejido tumoral frente a mucosa colónica normal (MN) en pacientes con CCR, sin embargo la expresión de ROR $\alpha$  no presenta diferencias entre tejido tumoral y MN.
2. La disminución en la expresión de ambos receptores de membrana de melatonina en tejido tumoral es significativa en el caso de hombres y se correlaciona positivamente con la expresión de ER $\alpha$ , ER $\beta$  y AR, tanto en estadios precoces como avanzados, revelando una posible interacción entre ambas vías de señalización en el desarrollo de los tumores colorrectales. Estos resultados explicarían las diferencias clínicas y patológicas entre ambos sexos en el CCR.
3. En los ensayos *in vitro* la capacidad invasiva de las líneas celulares tumorales de colon se correlaciona de manera inversamente proporcional con la expresión de MT1, MT2 y AR, apoyando la hipótesis sobre la implicación de la vía de señalización de la melatonina en el desarrollo de estos tumores y la interacción con AR, al menos en el sexo masculino. La ausencia de relación con la expresión de ER $\alpha$  y ER $\beta$  puede deberse al pequeño número de muestras analizadas.
4. La capacidad de inhibir la progresión tumoral de los agonistas no selectivos de la melatonina *in vitro* es mayor incluso que la de la propia melatonina, por lo que estos compuestos podrían considerarse en el futuro para ensayos clínicos como posibles alternativas terapéuticas para el tratamiento de este tipo de cáncer.



# *Bibliografía*



A

Abad A, Martín C. Factores pronósticos del cáncer de colon y recto. *Rev Cancer*. 2007; 11: 25-31.

Abad A, Massuti B, Antón A, Vega ME, Yuste AL, Marcuello E, Manzano JL, Alonso V, Carrato A, Martínez-Villacampa M, Tabernero J, Aranda E, Rivera F, Díaz-Rubio E; Spanish Cooperative Group for Digestive Tumor Therapy. Colorectal cancer metastasis resectability after treatment with the combination of oxaliplatin, irinotecan and 5-fluorouracil. Final results of a phase II study. *Acta Oncol*. 2008; 47(2): 286-92.

Adam R, Delvart V, Pascal G, Valeanu A, Castaing D, Azoulay D, Giacchetti S, Paule B, Kunstlinger F, Ghémard O, Levi F, Bismuth H. Rescue surgery for unresectable colorectal liver metastases downstaged by chemotherapy: a model to predict long-term survival. *Ann Surg*. 2004 Oct; 240(4): 644-57.

Aderem A. Signal transduction and the actin cytoskeleton: the roles of MARCKS and profilin. *Trends Biochem Sci*. 1992; 17: 438-443.

Aimoto T, Rohde BH, Chiou GC y Lauber JK. N-acetyltransferase activity and melatonin level in the eyes of glaucomatous chickens. *J Ocul Pharmacol*. 1985; 1: 149-160.

André T, Boni C, Navarro M, Tabernero J, Hickish T, Topham C, Bonetti A, Clingan P, Bridgewater J, Rivera F, de Gramont A. Improved overall survival with oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment in stage II or III colon cancer in the MOSAIC trial. *J Clin Oncol*. 2009 Jul 1; 27(19): 3109-16.

Andre E, Conquet F, Steinmayr M, Stratton SC, Porciatti V, Becker-Andre M. Disruption of retinoid-related orphan receptor beta changes circadian behavior, causes retinal degeneration and leads to vacillans phenotype in mice. *EMBO J*. 1998; 17: 3867-3877.

Aprile G, Zanon E, Tuniz F, Iaiza E, De Pauli F, Pella N, Pizzolitto S, Buffoli A, Piga A, Skrap M, Fasola G. Neurosurgical management and postoperative whole-brain radiotherapy for colorectal cancer patients with symptomatic brain metastases. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2009 Mar; 135(3): 451-7.

Arai N, Strom A, Rafter JJ, Gustafsson JA. Estrogen receptor  $\beta$  mRNA in colon cancer cells: growth effects of estrogen and genistein. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000; 270: 425–31.

Axon AT. The pathogenesis of colorectal cancer. Foreword. *Gastrointest Endosc.* 2008; 68 (4 Suppl): S2.

## B

Baler R, Coon S, Klein DC. Orphan nuclear receptor RZRbeta: cyclic AMP regulates expression in the pineal gland. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996; 220: 975-978.

Barni S, Lissoni P, Cazzaniga M, Ardizzoia A, Meregalli S, Fossati V, Fumagalli L, Brivio F, Tancini G. A randomized study of low-dose subcutaneous interleukin-2 plus melatonin versus supportive care alone in metastatic colorectal cancer patients progressing under 5-fluorouracil and folates. *Oncology.* 1995 May-Jun; 52(3): 243-5.

Becker-Andre M, Andre E, DeLamarter JF. Identification of nuclear receptor mRNAs by RT-PCR amplification of conserved zinc-finger motif sequences. *Biochem Biophys Res Commun.* 1993; 194: 1371-1379.

Benítez-King G. Melatonin as a cytoskeletal modulator: implications for cell physiology and disease. *J Pineal Res.* 2006 Jan; 40(1): 1-9.

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

Benítez-King G, Rios A, Martínez A, Anton-Tay F. *In vitro* inhibition of Ca<sup>2+</sup>/calmodulindependent kinase II activity by melatonin. *Biochim Biophys Acta.* 1996; 1290: 191-196.

Bjelakovic G, Nikolova D, Simonetti RG, Gluud C. Antioxidant supplements for preventing gastrointestinal cancers. *Cochrane database Syst Rev.* 2008 Jul; 16(3): CD004183.

Bittman EL, Weaver DR. The distribution of melatonin binding sites in neuroendocrine tissues of the ewe. *Biol Reprod.* 1990; 43: 986-993.

Blask DE, Wilson ST, Zalatan F. Physiological melatonin inhibition of human breast cancer cell growth *in vitro*: evidence for a glutathione-mediated pathway. *Cancer Res.* 1997; 57: 1909-1914.



Blazynski C, Dubocovich ML. Localization of 2-[125I]iodomelatonin binding sites in mammalian retina. *J Neurochem.* 1991; 56: 1873-1880.

Bondi CD, McKeon RM, Bennett JM, Ignatius PF, Brydon L, Jockers R, Melan MA, Witt-Enderby PA. MT1 melatonin receptor internalization underlies melatonin-induced morphologic changes in Chinese hamster ovary cells and these processes are dependent on Gi proteins, MEK 1/2 and microtubule modulation. *J Pineal Res.* 2008; 44: 288-298.

Bosetti C, Bravi F, Negri E, La Vecchia C. Oral contraceptives and colorectal cancer risk: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update.* 2009 Sep-Oct; 15(5): 489-98.

Boutin JA, Audinot V, Ferry G, Delagrangre P. Molecular tools to study melatonin pathways and actions. *Trends Pharmacol Sci.* 2005; 26, 412-419.

Breivik J, Lothe RA, Meling GI, Rognum TO, Borresen-Dale AL, Gaudernack G. Different genetic pathways to proximal and distal colorectal cancer influenced by sex-related factors. *Int J Cancer.* 1997; 74: 664-669.

Brenner H, Hoffmeister M, Arndt V, et al. Gender differences in colorectal cancer: implications for age at initiation of screening. *Br J Cancer.* 2007; 96: 828-831.

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 Sep; 29(9):3721-6.

Brzozowska I, Konturek PC, Brzozowski T. Role of prostaglandins, nitric oxide, sensory nerves and gastrin in acceleration of ulcer healing by melatonin and its precursor, L-tryptophan. *J Pineal Res.* 2002; 32: 149-162.

Bubenik GA, Pang SF, Hacker RR, Smith PS. Melatonin concentrations in serum and tissues of porcine gastrointestinal tract and their relationship to the intake and passage of food. *J Pineal Res.* 1996; 21: 251-256.

Bufill JA. Colorectal cancer: evidence for distinct genetic categories based on proximal or distal tumor location. *Ann Intern Med.* 1990; 1134: 779-788.

Buzzell GR, Chen Z, Vaughan MK, Reiter RJ. Effects of inhibition of thyroid function and of cold on melatonin synthesis and porphyrin content in the Harderian glands of male Syrian hamsters, *Mesocricetus auratus*. *Comp Biochem Physiol A.* 1989; 94: 427-429.

C

Cabanes Domenech A, Pérez-Gómez B, Aragonés N, Pollán M, López-Abente G. La situación del cáncer en España, 1975-2006. Madrid: Instituto de Salud Carlos III, 2009.

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

Calle EE, Rodriguez C, Walker-Thurmond K, Thun MJ. Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. *N Engl J Med.* 2003; 348(17): 1625-38

Campbell-Thompson M, Lynch IJ, Bhardwaj B. Expression of estrogen receptor (ER) subtypes and ERbeta isoforms in colon cancer. *Cancer Res.* 2001 Jan 15; 61(2): 632-40.

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 Nov; 47(4): 330-8.

Carlberg C, Hooft van Huijsduijnen R, Staple JK, DeLamarter JF y Becker-Andre M. RZR<sub>s</sub>, a new family of retinoid-related orphan receptors that function as both monomers and homodimers. *Mol Endocrinol.* 1994; 8: 757-770.

Cardinali DP, Ladizesky MG, Boggio V, Cutrera RA, Mautalen C. Melatonin effects on bone: Experimental facts and clinical perspectives. *J Pineal Res.* 2003; 34: 81– 87.

Cardinali DP, Vacas MI y Gejman PV. The sympathetic superior cervical ganglia as peripheral neuroendocrine centers. *J Neural Transm.* 1981; 52: 1-21.

Carlberg C. Gene regulation by melatonin. *Ann N Y Acad Sci.* 2000; 917: 387-96.

Carrato A. Adjuvant treatment of colorectal cancer. *Gastrointest Cancer Res.* 2008 Jul; 2(4 Suppl): S42-6.

Casado E, Sánchez B, Seremo M, Castelo B. Factores pronósticos en el cáncer colorrectal. En González Barón M, Espinosa E, Felín J, Ordóñez A, Casado E, de Castro J. Factores pronósticos en Oncología. 2º Edición. Madrid: Mc Graw Hill Interamericana; 2005; p 109-20.

Castagnetta L, Carruba G, Fecarotta E, Lo Casto M, Cusimano R, Pavone-Macaluso M. Soluble and nuclear type I and II androgen-binding sites in benign hyperplasia and cancer of the human prostate. *Urol Res.* 1992; 20(2):127-32.

Castagnetta L, Traina A, Campsis I, Calabro M, Maratta A, Saetta A, Agostara, Mezzatesta N. Androgen Receptor Status in Nontumoral and Malignant Human Colorectal Tissues. *Ann N Y Acad Sci.* 2002; 963: 322-325.

Castells A, Marzo M, Bellas B, Amador FJ, Lanás A, Mascort JJ, Ferrándiz J, Alonso P, Piñol V, Fernández M, Bonfill X, Piqué JM. Guía clínica de prevención del cáncer colorrectal. *Gastroenterol Hepatol.* 2009; 27: 573-634.

Castiglione F, Taddei A, Rossi Degl'Innocenti D, Buccoliero AM, Bechi P, Garbini F, Chiara FG, Moncini D, Cavallina G, Marascio L, Freschi G, Gian LT. Expression of estrogen receptor beta in colon cancer progression. *Diagn Mol Pathol.* 2008 Dec; 17(4): 231-6.

Catalano MG, Pfeffer U, Raineri M, Ferro P, Curto A, Capuzzi P, Corno F, Berta L, Fortunati N. Altered expression of androgen-receptor isoforms in human colon-cancer tissues. *Int J Cancer.* 2000 May 1; 86(3): 325-30.

Centro Nacional de Epidemiología, 2000. Mortalidad por cáncer y otras causas en España, año 2000. En: <http://193.146.50.130/cancer/cancer1.htm>

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Use of colorectal cancer tests -United States, 2002, 2004, and 2006. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2008; 57:253.

Cerea G, Vaghi M, Ardizzoia A, Villa S, Bucovec R, Mengo S, Gardani G, Tancini G, Lissoni P. Biomodulation of cancer chemotherapy for metastatic colorectal cancer: a randomized study of weekly low-dose irinotecan alone versus irinotecan plus the oncostatic pineal hormone

melatonin in metastatic colorectal cancer patients progressing on 5-fluorouracil-containing combinations. *Anticancer Res.* 2003 Mar-Apr; 23(2C): 1951-4.

Chan ASL, Lai FPL, Lo RKH, Voyno-Yasenetskaya TA, Stanbridge EJ, Wong YH. Melatonin mt1 and MT2 receptors stimulate c-Jun N-terminal kinase via pertussis toxin-sensitive and -insensitive G proteins. *Cell Signal.* 2002; 14: 249-257.

Charton I, Mamai A, Bennejean C, Renard P, Howell EH, Guardiola-Lemaître B, Delagrangé P, Morgan PJ, Viaud MC, Guillaumet G. Substitutedoxygenatedheterocycles and thio-analogues: synthesis and biological evaluation as melatonin ligands. *Bioorg Med Chem.* 2000 Jan; 8(1): 105-14.

Chen VW, Hsieh MC, Charlton ME, Ruiz BA, Karlitz J, Altekruze SF, Ries LA, Jessup JM. Analysis of stage and clinical/prognostic factors for colon and rectal cancer from SEER registries: AJCC and collaborative stage data collection system. *Cancer* 2014 Dec 1;120 Suppl 23: 3793-806.

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 Sep 14; 17(34): 3888-3898.

Chen LD, Tan DX, Reiter RJ, Yaga K, Poeggeler B, Kumar P, Manchester LC, Chambers JP. *In vivo* and *in vitro* effects of the pineal gland and melatonin on [Ca<sup>2+</sup>] + Mg<sup>2+</sup>]-dependent ATPase in cardiac sarcolemma. *J Pineal Res.* 1993; 14: 178-183.

Cheng X, Chen VW, Steele B, Ruiz B, Fulton J, Liu L, Carozza SE, Greenlee R. Subsite-specific incidence rate and stage of disease in colorectal cancer by race, gender, and age group in the United States, 1992-1997. *Cancer.* 2001 Nov 15; 92(10): 2547-54.

Cheung WY. Cyclic 3',5'-nucleotide phosphodiesterase. Demonstration of an activator. *Biochem Biophys Res Commun.* 1970; 38: 533-538.

Cheung WY, Bradham LS, Lynch TJ, Lin YM, Tallant EA. Protein activator of cyclic 3':5'-nucleotide phosphodiesterase of bovine or rat brain also activates its adenylate cyclase. *Biochem Biophys Res Commun.* 1975; 66: 1055-1062.

Chlebowski RT, Wactawski-Wende J, Ritenbaugh C, Hubbell FA, Ascensao J, Rodabough RJ, Rosenberg CA, Taylor VM, Harris R, Chen C, Adams-Campbell LL, White E; Women's Health Initiative Investigators. Estrogen plus progestin and colorectal cancer in postmenopausal women. *N Engl J Med.* 2004 Mar 4; 350(10): 991-1004.

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: 1015-22.

Cho NL, Javid SH, Carothers AM, Redston M, Bertagnolli MM. Estrogen receptors alpha and beta are inhibitory modifiers of Apc-dependent tumorigenesis in the proximal colon of Min/p mice. *Cancer Res.* 2007; 67: 2366-2372.

Chu KC, Tarone RE, Chow WH, Hankey BF, Ries LAG. Temporal patterns in colorectal cancer incidence, survival, and mortality from 1950 through 1990. *J Natl Cancer Inst* 1994; 86 (13): 997-1006.

Chun YS, Vauthey JN. Extending the frontiers of resectability in advanced colorectal cancer. *Eur J Surg Oncol.* 2007 Dec; 33 Suppl 2: S52-8.

Clevers H. Colon cancer--understanding how NSAIDs work. *N Engl J Med.* 2006; 354(7): 761-3.

Coates RJ, Groeninger RS, Liu MT, et al. Anatomic site distribution of colon cancer by race and other colon cancer risk factors. *Dis Colon Rectum.* 1995; 38: 42-50.

Cohen M, Lippman M, Chanber B. Role of pineal gland in aetiology and treatment of breast cancer. *Lancet.* 1978; 28: 814-6.

Collins A, Yuan K, Kiefer T, Chang Q, Hill SM. Overexpression of the MT1 melatonin receptor in MCF-7 human breast cancer cells inhibits mammary tumor formation in nude mice. *Cancer Lett.* 2003; 189(1): 49-57.

Compton CC, Fielding LP, Burgart LJ, Conley B, Cooper HS, Hamilton SR, Hammond ME, Henson DE, Hutter RV, Nagle RB, Nielsen ML, Sargent DJ, Taylor CR, Welton M, Willett C. Prognostic factors in

colorectal cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch Pathol Lab Med.* 2000; 124(7): 979-94.

Cutando A, López-Valverde A, Arias-Santiago S, DE Vicente J, DE Diego RG. Role of melatonin in cancer treatment. *Anticancer Res.* 2012 Jul; 32(7): 2747-53.

Czesnikiewicz-Guzik M, Konturek SJ, Loster B, Wisniewska S, Majewski S. Melatonin and its role in oxidative stress related diseases of oral cavity. *J Physiol Pharmacol.* 2007; 58: Suppl. 3: 5-19.

## D

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.

David S, Mirick DK, Stevens RG. Night shift work, light at night, and risk of breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2001; 93: 1557-62.

David S, Mirick DK. Circadian disruption, shift work, and the risk of cancer: a summary of the evidence and studies in Seattle. *Cancer Causes Control.* 2006; 17: 539-45.

di Domenico M, Castoria G, Bilancio A, Migliaccio A, Auricchio F. Estradiol activation of human colon carcinoma- derived Caco-2 cell growth. *Cancer Res.* 1996; 56: 4516-21.

Dos Santos I, Swerdlow AJ. Sex differences in time trends of colorectal cancer in England and Wales: the possible effect of female hormonal factors. *Br J Cancer.* 1996; 73: 692-697.

Drago F, Macaуда S, Salehi S. Small doses of melatonin increase intestinal motility in rats. *Dig Dis Sci.* 2002; 47: 1969-1974.

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, Masana MI, Iacob S, Sauri DM. Melatonin receptor antagonists that differentiate between the human Mella and

Mellbrecombinantsubtypes are used to assess the pharmacological profile of the rabbit retina ML1 presynaptic heteroreceptor. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1997 Mar; 355(3): 365-75.

Duncan MJ, Takahashi JS, Dubocovich ML. Characteristics and autoradiographic localization of 2-[125I]iodomelatonin binding sites in Djungarian hamster brain. *Endocrinology.* 1989;125: 1011-1018.

## E

Edge SB, Byrd DR, Compton CC, Fritz AG, Greene FL, Trotti A, editors. *AJCC cancer staging manual (7th ed).* New York Springer. 2010; p: 133.

Edwards BK, Ward E, Kohler BA, et al. 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: 544.

## F

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 Jan-Feb; 20(1): 21-4.

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

Fernández E, La Vecchia C, González JR, Lucchini F, Negri E, Levi F. Converging patterns of colorectal cancer mortality in Europe. *Eur J Cancer.* 2005 Feb; 41(3): 430-7.

Fijten GH, Starmans R, Muris JW, Schouten HJ, Blijham GH, Knottnerus JA. Predictive value of signs and symptoms for colorectal cancer in patients with rectal bleeding in general practice. *Fam Pract.* 1995; 12:279-86.

Fiorelli G, Picariello L, Martinetti V, Tonelli F, Brandi ML. Functional estrogen receptor h in colon cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999; 261: 521-7.

Flemström G, Bengtsson MW, Mäkelä K, Herzig KH. Effects of short-term food deprivation on orexin-A-induced intestinal bicarbonate secretion in comparison with related secretagogues. *Acta Physiol (Oxf)*. 2010 Mar; 198(3): 373-80.

Foley EF, Jazaeri AA, Shupnik MA, Jazaeri O, Rice LW. Selective loss of estrogen receptor beta in malignant human colon. *Cancer Res*. 2000 Jan 15; 60(2): 245-8.

Fraumeni JF Jr, Lloyd JW, Smith EM, Wagoner JK. Cancer mortality among nuns: role of marital status in etiology of neoplastic disease in women. *J Natl Cancer Inst*. 1969 Mar; 42(3): 455-68.

Fuentes Broto L. Melatonina como protector frente a los radicales libres en la hepatotoxicidad por ácidos biliares (Tesis Doctoral). Zaragoza: Facultad de Medicina, Departamento de Farmacología y Fisiología, Universidad de Zaragoza 2008.

Fusai G, Davidson BR. Strategies to increase the resectability of liver metastases from colorectal cancer. *Dig Surg*. 2003; 20(6): 481-96.

## G

von Gall C, Stehle JH, Weaver DR. Mammalian melatonin receptors: molecular biology and signal transduction. *Cell Tissue Res*. 2002; 309: 151-162.

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 culture. *J Pineal Res*. 2007; 43: 195-205.

García-Perganeda A, Guerrero JM, Rafii-El-Idrissi M, Paz Romero M, Pozo D, Calvo JR. Characterization of membrane melatonin receptor in mouse peritoneal macrophages: inhibition of adenylyl cyclase by a pertussis toxin-sensitive G protein. *J Neuroimmunol*. 1999; 95: 85-94.

Gennari L, Doci R, Rossetti C. Prognostic factors in colorectal cancer. *Hepatogastroenterology*. 2000; 47: 310-314.



Giguere V, Tini M, Flock G, Ong E, Evans RM, Otulakowski G. Isoform-specific amino-terminal domains dictate DNA-binding properties of ROR alpha, a novel family of orphan hormone nuclear receptors. *Genes Dev.* 1994; 8: 538-553.

Gilad LA, Bresler T, Gnainsky J, Smirnoff P, Schwartz B. Regulation of vitamin D receptor expression via estrogen- induced activation of the ERK 1/2 signaling pathway in colon and breast cancer cells. *J Endocrinol.* 2005; 185: 577-92.

Girgert R, Bartsch C, Hill SM, Kreienberg R, Hanf V. Tracking the elusive antiestrogen effect of melatonin: a new methodological approach. *Neuro Endocrinol Lett.* 2003; 6: 440-444.

González A, Martínez-Campa C, Mediavilla MD, Alonso-González C, Sánchez-Mateos S, Hill SM, Sánchez-Barceló EJ, Cos S. Effects of MT1 melatonin receptor overexpression on the aromatase-suppressive effect of melatonin in MCF-7 human breast cancer cells. *Oncol Rep.* 2007; 17: 947–953.

de Gramont A, Tournigand C, André T, Larsen AK, Louvet C. Adjuvant therapy for stage II and III colorectal cancer. *Semin Oncol.* 2007 Apr; 34(2 Suppl 1): S37-40.

Grace MS, Cahill GM y Besharse JC. Melatonin deacetylation: retinal vertebrate class distribution and *Xenopus laevis* tissue distribution. *Brain Res.* 1991; 559: 56-63.

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: 574-582.

Grupo de trabajo de la guía de práctica clínica de prevención del cáncer colorrectal. Actualización 2009. Guía de práctica clínica. Barcelona: Asociación Española de Gastroenterología, Sociedad Española de Medicina de Familia y Comunitaria y Centro Cochrane Iberoamericano 2009. B-16. 902-2009.

González-Puga C, García-Navarro A, Germaine E, 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: 243-250.

Goodman D, Irvin TT. Delay in the diagnosis and prognosis of carcinoma of the right colon. *Br J Surg.* 1993; 80:1327.

Gu S, Papadopoulou N, Gehring EM, Nasir O, Dimas K, Bhavsar SK, Föller M, Alevizopoulos K, Lang F, Stournaras C. Functional membrane androgen receptors in colon tumors trigger pro-apoptotic responses *in vitro* and reduce drastically tumor incidence *in vivo*. *Mol Cancer.* 2009 Dec 1; 8: 114.

Gu S, Papadopoulou N, Nasir O, Föller M, Alevizopoulos K, Lang F, Stournaras C. Activation of membrane androgen receptors in colon cancer inhibits the prosurvival signals Akt/Bad *in vitro* and *in vivo* and blocks migration via vinculin/actin signaling. *Mol Med.* 2011; 17(1-2): 48-58.

Guerrero JM, Carrillo-Vico A, Lardome PJ. La melatonina. *Investigación y Ciencia.* 2007; 30-38.

## H

Hamilton W, Round A, Sharp D, Peters TJ. Clinical features of colorectal cancer before diagnosis: a population-based case-control study. *Br J Cancer.* 2005; 93: 399-405.

Hardeland R. Melatonin, hormone of darkness and more: occurrence, control mechanisms, actions and bioactive metabolites. *Cell Mol Life Sci.* 2008 Jul; 65(13): 2001-18.

Hardeland R, Poeggeler B. Actions of Melatonin, Its Structural and Functional Analogs in the Central Nervous System and the Significance of Metabolism. *Cent Nerv Syst Agents Med Chem.* 2007; 7: 289-303.

Hardeland R, Reiter RJ, Poeggeler B y Tan DX. The significance of the metabolism of the neurohormone melatonin: antioxidative protection and formation of bioactive substances. *Neurosci Biobehav Rev.* 1993; 17: 347-357.

Helfand M, Marton KI, Zimmer-Gembeck MJ, Sox HC, Jr. History of visible rectal bleeding in a primary care population. Initial assessment and 10-year follow-up. *JAMA.* 1997; 277: 44-8.

Heiss G, Wallace R, Anderson GL, Aragaki A, Beresford SA, Brzyski R, Chlebowski RT, Gass M, LaCroix A, Manson JE, Prentice RL, Rossouw J, Stefanick ML; WHI Investigators. Health risks and benefits 3 years after

stopping randomized treatment with estrogen and progestin. JAMA. 2008; 299: 1036-45.

Hill SM, Frasch T, Xiang S, Yuan L, Duplessis T, Mao L. Molecular mechanisms of melatonin anticancer effects. Integr Cancer Ther. 2009 Dec; 8(4): 337-46.

Hirata F, Hayaishi O, Tokuyama T, Seno S. *In vitro* and *in vivo* formation of two new metabolites of melatonin. J Biol Chem. 1974; 249: 1311-1313.

Hirose T, Smith RJ, Jetten AM. ROR gamma: the third member of ROR/RZR orphan receptor subfamily that is highly expressed in skeletal muscle. Biochem Biophys Res Commun. 1994; 205: 1976-1983.

Ho MK, Yung LY, Chan JS, Chan JH, Wong CS, Wong YH. G $\alpha$ (14) links a variety of G(i)- and G(s)-coupled receptors to the stimulation of phospholipase C. Br J Pharmacol. 2001; 132: 1431-1440.

Hoffmeister M, Raum E, Krtischil A, Chang-Claude J, Brenner H. No evidence for variation in colorectal cancer risk associated with different types of postmenopausal hormone therapy. Clin Pharmacol Ther. 2009 Oct; 86(4): 416-24.

Holaska JM, Black BE, Love DC, Hanover JA, Leszyk J, Paschal BM. Calreticulin is a receptor for nuclear export. J Cell Biol. 2001; 152: 127-140.

Hong Y, Won J, Lee Y, Lee S, Park K, Chang KT, Hong Y. Melatonin treatment induces interplay of apoptosis, autophagy, and senescence in human colorectal cancer cells. J Pineal Res. 2014 Apr; 56(3): 264-74.

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.

Huether G, Poeggeler B, Reimer A, George A. Effect of tryptophan administration on circulating melatonin levels in chicks and rats: evidence for stimulation of melatonin synthesis and release in the gastrointestinal tract. Life Sci. 1992; 51(12): 945-53.

**I**

International Agency for Research on Cancer. IARC Monographs Programme finds cancer hazards associated with shiftwork, painting and firefighting. Press release no. 180, 5 December 2007. <http://www.iarc.fr/en/media-centre/pr/2007/pr180.html>

Izbicki JR, Schimitz R, Kamran D, Izbicki W. Androgens as promoters of colon carcinogenesis. *Cancer Detect Prev*. 1983; 6: 355-62.

**J**

Jänne PA, Mayer RJ. Chemoprevention of colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2000 Jun 29; 342(26): 1960-8.

Jacobs ET, Thompson PA, Martínez ME. Diet, gender, and colorectal neoplasia. *J Clin Gastroenterol*. 2007; 41: 731-746.

Jass JR. Pathogenesis of colorectal cancer. *Surg Clin North Am*. 2002; 82(5): 891-904.

Jaworek J, Brzozowski T, Konturek SJ. Melatonin as an organoprotector in the stomach and the pancreas. *J Pineal Res*. 2005; 38: 73-83.

Jethmalani SM, Henle KJ, Gazitt Y, Walker PD, Wang SY. Intracellular distribution of heat-induced stress glycoproteins. *J CellBiochem*. 1997; 66: 98-111.

Jin P, Lu XJ, Sheng JQ, Fu L, Meng XM, Wang X, Shi TP, Li SR, Rao J. Estrogen stimulates the expression of mismatch repair gene hMLH1 in colonic epithelial cells. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2010 Aug; 3(8): 910-6.

Jordan VC, Murphy CS. Endocrine pharmacology of antiestrogens as antitumor agents. *Endocr Rev*. 1990; 11: 578-610.

Jung B, Ahmad N. Melatonin in cancer management: progress and promise. *Cancer Res*. 2006 Oct 15; 66(20): 9789-93.

**K**

Kampman E, Potter JD, Slattery ML, Caan BJ, Edwards S. Hormone replacement therapy, reproductive history, and colon cancer: a multicenter,

case-control study in the United States. *Cancer Causes Control*. 1997; 8(2): 146-58.

Kannen V, Marini T, Zanette DL, Frajacomo FT, Silva GE, Silva WA Jr, Garcia SB. The melatonin action on stromal stem cells within pericryptal area in colon cancer model under constant light. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011 Feb 25; 405(4): 593-598.

Karasek M, Carrillo-Vico A, Guerrero JM, Winczyk K, Pawlikowski M. Expression of melatonin MT(1) and MT(2) receptors, and ROR alpha(1) receptor in transplantable murine Colon 38 cancer. *Neuro Endocrinol Lett*. 2002; 23 Suppl 1: 55-60.

Kast RE, Altschuler EL. Co-administration of ramelteon and fluvoxamine to increase levels of interleukin-2. *Med Hypotheses*. 2006; 67(6): 1389-1390.

Kast RE. Agomelatine or ramelteon as treatment adjuncts in glioblastoma and other M1- or M2-expressing cancers. *Contemp Oncol (Pozn)*. 2015; 19(2): 157-162.

Katzenellenbogen BS, Montano MM, Ediger TR, et al. Estrogen receptors: selective ligands, partners, and distinctive pharmacology. *Recent Prog Horm Res*. 2000; 55:163 – 93; discussion 194-195. (A)

Katzenellenbogen BS, Choi I, Delage-Mourroux R, Ediger TR, Martini PG, Montano M, Sun J, Weis K, Katzenellenbogen JA. Molecular mechanisms of estrogen action: selective ligands and receptor pharmacology. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2000; 74: 279-285. (B)

Kennedy SH, Emsley R. Placebo-controlled trial of agomelatina in the treatment of major depressive disorder. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2006; 16: 93-100.

Kinzler KW, Vogelstein B. Landscaping the cancer terrain. *Science*. 1998; 280: 1036-1037.

Konstantinopoulos PA, Kominea A, Vandroos G, Sykiotis GP, Andricopoulos P, Varakis I, Sotiropoulou-Bonikou G, Papavassiliou AG. Oestrogen receptor beta (ERbeta) is abundantly expressed in normal colonic mucosa, but declines in colon adenocarcinoma paralleling the tumour's dedifferentiation. *Eur J Cancer*. 2003 Jun; 39(9): 1251-8.

Konturek SJ, Zayachkivska O, Havryluk XO, Brzozowski T, Sliwowski Z, Pawlik M, Konturek PC, Cześnikiewicz-Guzik M, Gzhegotsky MR, Pawlik WW. Protective influence of melatonin against acute esophageal lesions involves prostaglandins, nitric oxide and sensory nerves. *J Physiol Pharmacol.* 2007; 58: 361-377.

Konturek SJ, Konturek PC, Pawlik T, Sliwowski Z, Hahn EG. Duodenal mucosal protection by bicarbonate secretion and its mechanisms. *J Physiol Pharmacol.* 2004; 55: Suppl. 2: 5-17.

Kos-Kudła B, Ostrowska Z, Kozłowski A, Marek B, Ciesielska-Kopacz N, Kudła M, Kajdaniuk D, Strzelczyk J, Staszewicz P. Circadian rhythm of melatonin in patients with colorectal carcinoma. *Neuro Endocrinol Lett.* 2002; 23: 239-242.

## L

Lai L, Yuan L, Cheng Q, Dong C, Mao L, Hill SM. Alteration of the MT1 melatonin receptor gene and its expression in primary human breast tumors and breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res Treat.* 2009; 118: 293–305.

Landherr L. Predictive and prognostic factors in the complex treatment of patients with colorectal cancer. *Magyar Onkologia.* 2010; 54: 383-394.

Larsson SC, Orsini N and Wolk A. Diabetes mellitus and risk of colorectal cancer: a meta-analysis. *J Natl Cancer Inst.* 2005; 97(22): 1679-87.

Larsson SC, Bergkvist L, Giovannucci E, Wolk A. Coffee consumption and incidence of colorectal cancer in two prospective cohort studies of Swedish women and men. *Am J Epidemiol.* 2006; 163(7): 638-644.

Laudon M, Nir I, Zisapel N. Melatonin receptors in discrete brain areas of the male rat. Impact of aging on density and on circadian rhythmicity. *Neuroendocrinology.* 1988; 48: 577-583.

Lechner D, Kállay E, Cross HS. Phytoestrogens and colorectal cancer prevention. *Vitam Horm.* 2005; 70: 169-98.

Lee PP, Shiu SY, Chow PH, Pang SF. Regional and diurnal studies of melatonin and melatonin binding sites in the duck gastro-intestinal tract. *Biol Signals.* 1995 Jul-Aug; 4(4): 212-24.

León J, Casado J, Jiménez Ruiz SM, Zurita MS, González-Puga C, Rejón JD, Gila A, Muñoz de Rueda P, Pavón EJ, Reiter RJ, Ruiz-Extremera A, Salmerón J. Melatonin reduces endothelin-1 expression and secretion in colon cancer cells through the inactivation of FoxO-1 and NF- $\kappa$ B. *J Pineal Res.* 2014 May; 56(4): 415-26.

León J, Escames G, Rodríguez MI, López LC, Tapias V, Entrena A, Camacho E, Carrión MD, Gallo MA, Espinosa A, Tan DX, Reiter RJ, Acuña-Castroviejo D. Inhibition of neuronal nitric oxide synthase activity by N1-acetyl-5-methoxykynuramine, a brain metabolite of melatonin. *J Neurochem.* 2006 Sep; 98(6): 2023-33.

León J, Macías M, Escames G, Camacho E, Khaldy H, Martín M, Espinosa A, Gallo MA, Acuña-Castroviejo D. Structure-related inhibition of calmodulin-dependent neuronal nitric-oxide synthase activity by melatonin and synthetic kynurenines. *Mol Pharmacol.* 2000 Nov; 58(5): 967-75.

Leong RW, Koo JH. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol Hepatol.* 2009; 24(4): 503-505.

Lewy AJ, Wehr TA, Goodwin FK, Newsome DA y Markey SP. Light suppresses melatonin secretion in humans. *Science.* 1980; 210: 1267-1269.

Lindroos OF, Veilanti J, Leinonen LM, Laakso ML. Characterization of melatonin binding to the anteroventral and anterodorsal thalamic nuclei of the rat. *Eur J Pharmacol.* 1993; 250: 161-163.

Lissoni P. Biochemotherapy with standard chemotherapies plus the pineal hormone melatonin in the treatment of advanced solid neoplasms. *Pathol Biol. (Paris)* 2007; 55: 201-204.

Lissoni P. Is there a role for melatonin in supportive care? *Support Care Cancer.* 2002 Mar; 10(2): 110-6.

Lissoni P, Ardizzoia A, Barni S, Paolorossi F, Tancini G, Meregalli S, Esposti D, Zubelewicz B and Braczowski R: A randomized study of tamoxifen alone versus tamoxifen plus melatonin in estrogen receptor-negative heavily pretreated metastatic breast-cancer patients. *Oncol Rep.* 1995; 2: 871-873.

Lissoni P, Barni S, Ardizzoia A, Andres M, Scardino E, Cardellini P, Della Bitta R, Tancini G. A randomized study of low-dose interleukin-2 subcutaneous immunotherapy versus interleukin-2 plus interferon-alpha as

first line therapy for metastatic renal cell carcinoma. *Tumori*. 1993 Dec 31; 79(6): 397-400.

Lissoni P, Barni S, Mandala M, et al. Decreased toxicity and increase efficacy of cancer chemotherapy using the pineal hormone melatonin in metastatic solid tumour patients with poor clinical status. *Eur J Cancer*. 1999; 35: 1688-92.

Lissoni P, Rovelli F. Principles of psycho-neuroendocrinology-immunotherapy of cancer. *Immunotherapy*. 2012 Jan; 4(1): 77-86.

Lissoni P, Rovelli F, Malugani F, Bucovec R, Conti A, Maestroni GJ. Anti-angiogenic activity of melatonin in advanced cancer patients. *Neuro Endocrinol Lett*. 2001; 22: 45-47.

Lôo H, Hale A, D'Haenen H. Determination of the dose of agomelatine, a melatonergic agonist and selective 5-HT<sub>2c</sub> antagonist, in the treatment of major depressive disorder: a placebo-controlled dose range study. *Int Clin Psychopharmacol*. 2002; 17: 239-247.

## M

Ma X, Chen C, Krausz KW, Idle JR, and Gonzalez FJ. A metabolomic perspective of melatonin metabolism in the mouse. *Endocrinology*. 2008; 149:1869–1879.

Ma X, Idle JR, Krausz KW y González FJ. Metabolism of melatonin by human cytochromes p450. *Drug Metab Dispos*. 2005; 33(4): 489-494.

Macías M, Escames G, León J, Coto A, Sbihi Y, Osuna A, Acuña-Castroviejo D. Calreticulin-melatonin. An unexpected relationship. *Eur J Biochem*. 2003; 270: 832-840.

McMichael AJ, McCall MG, Hartshorne JM, Woodings TL. Patterns of gastro-intestinal cancer in European migrants to Australia: the role of dietary change. *Int J Cancer*. 1980 Apr 15; 25(4): 431-437.

McMichael AJ, Potter JD. Reproduction, endogenous and exogenous sex hormones, and colon cancer: a review and hypothesis. *J Natl Cancer Inst*. 1980 Dec; 65(6): 1201-1207.



Maestro de las Casas ML, Rodriguez R. Marcadores tumorales en cáncer de colon. *Rev Cancer*. 2007; 11: 13-24.

Manalan AS, Klee CB. Calmodulin. *Adv Cyclic Nucleotide Protein Phosphorylation Res*. 1984; 18: 227-278.

Mao L, Cheng Q, Guardiola-Lemaître B, Schuster-Klein C, Dong C, Lai L, Hill SM. *In vitro* and *in vivo* antitumor activity of melatonin receptor agonists. *J Pineal Res*. 2010 Oct; 49(3): 210-21.

Martín JE, McKeel DW, Jr., Sattler C. Melatonin directly inhibits rat gonadotroph cells. *Endocrinology*. 1982; 110: 1079-1084.

Martinetti V, Picariello L, Tognarini I, Carbonell Sala S, Gozzini A, Azzari C, Mavilia C, Tanini A, Falchetti A, Fiorelli G, Tonelli F, Brandi ML. ERbeta is a potent inhibitor of cell proliferation in the HCT8 human colon cancer cell line through regulation of cell cycle components. *Endocr Relat Cancer*. 2005 Jun; 12(2): 455-69.

Marugo M, Aste H, Bernasconi D, Fazzuoli L, Conio M, Cuva A, Meozzi M. Cytosolic and nuclear androgen receptors in colorectal adenomas. *Anticancer Res*. 1992; 12: 705-708.

Mauriz JL, Collado PS, Veneroso C, Reiter RJ, González-Gallego J. A review of the molecular aspects of melatonin's anti-inflammatory actions: recent insights and new perspectives. *J Pineal Res*. 2013 Jan; 54(1): 1-14.

Mayo JC, Sainz RM, Tan DX, Hardeland R, Leon J, Rodriguez C, Reiter RJ. Anti-inflammatory actions of melatonin and its metabolites, N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine (AFMK) and N1-acetyl-5-methoxykynuramine (AMK), in macrophages. *J Neuroimmunol*. 2005 Aug; 165(1-2):139-149.

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): 4462-4481.

Mehrkhani F, Nasiri S, Donboli K, Meysamie A, Hedayat A. Prognostic factors in survival of colorectal cancer patients after surgery. *Colorectal Dis*. 2009; 11(2): 157-61.

Menéndez-Peláez A, Howes KA, González-Brito A y Reiter RJ. N-acetyltransferase activity, hydroxyindole-O-methyltransferase activity, and melatonin levels in the Harderian glands of the female Syrian hamster: changes during the light:dark cycle and the effect of 6-parachlorophenylalanine administration. *Biochem Biophys Res Commun*. 1987; 145: 1231-1238.

Millen AE1, Subar AF, Graubard BI, Peters U, Hayes RB, Weissfeld JL, Yokochi LA, Ziegler RG; PLCO Cancer Screening Trial Project Team. Fruit and vegetable intake and prevalence of colorectal adenoma in a cancer screening trial. *Am J Clin Nutr.* 2007; 86: 1754-64.

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 Nov; 39(4): 360-366.

Moghaddam AA, Woodward M, Huxley R. Obesity and risk of colorectal cancer: a meta-analysis of 31 studies with 70,000 events. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2007; 16: 2533-2547.

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

Montano MM, Deng H, Liu M, Sun X, Singal R. Transcriptional regulation by the estrogen receptor of antioxidative stress enzymes and its functional implications. *Oncogene.* 2004; 23: 2442-2453.

Mor M, Plazzi PV, Spadoni G, Tarzia G. Melatonin. *Curr Med Chem.* 1999; 6: 501-518.

Morris EJ, Maughan NJ, Forman D, Quirke P. Who to treat with adjuvant therapy in Dukes B/stage II colorectal cancer? The need for high quality pathology. *Gut.* 2007 Oct; 56(10): 1419-1425.

## N

Nakamura E, Kozaki K, Tsuda H, Suzuki E, Pimkhaokham A, Yamamoto G, Irie T, Tachikawa T, Amagasa T, Inazawa J, Imoto I. Frequent silencing of a putative tumor suppressor gene melatonin receptor 1A (MTNR1A) in oral squamous-cell carcinoma. *Cancer Sci.* 2008; 99: 1390-1400.

Nakayama Y, Sakamoto H, Satoh K, Yamamoto T. Tamoxifen and gonadal steroids inhibit colon cancer growth in association with inhibition of thymidylate synthase, survivin and telomerase expression through estrogen receptor  $\beta$  mediated system. *Cancer Lett.* 2000; 161: 63-71.

Nemeth C, Humpeler S, Kallay E, Mesteri I, Svoboda M, Rögelsperger O, Klammer N, Thalhammer T, Ekmekcioglu C. Decreased expression of the melatonin receptor 1 in human colorectal adenocarcinomas. *J Biol Regul Homeost Agents*. 2011 Oct-Dec; 25(4): 531-542.

Newcomb PA, Zheng Y, Chia VM, Morimoto LM, Doria-Rose VP, Templeton A, Thibodeau SN, Potter JD. Estrogen plus progestin use, microsatellite instability, and the risk of colorectal cancer in women. *Cancer Res*. 2007; 67: 7534–7539.

Nguyen SP, Bent S, Chen YH, Terdiman JP. Gender as a risk factor for advanced neoplasia and colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2009 Jun; 7(6): 676-681.

Nojima D, Li LC, Dharia A, et al. CpG hypermethylation of the promoter region inactivates the estrogen receptor beta gene in patients with prostate carcinoma. *Cancer*. 2001; 92: 2076–2083.

Norat T, Lukanova A, Ferrari P, Riboli E. Meat consumption and colorectal cancer risk: dose-response meta-analysis of epidemiological studies. *Int J Cancer*. 2002; 98: 241-256. (A)

Norat T, Lukanova A, Ferrari P, Riboli E. Meat consumption and colorectal cancer risk: an estimate of attributable and preventable fractions. *IARC Sci Publ*. 2002; 156: 223-225. (B)

## O

Okines A, Puerto OD, Cunningham D, Chau I, Van Cutsem E, Saltz L, Cassidy J. Surgery with curative-intent in patients treated with first-line chemotherapy plus bevacizumab for metastatic colorectal cancer First BEAT and the randomised phase-III NO16966 trial. *Br J Cancer*. 2009 Oct 6; 101(7): 1033-1038.

Olié JP, Kasper S. Efficacy of agomelatine, a MT1/MT2 receptor agonist with 5-HT<sub>2c</sub> antagonist properties, in major depressive disorder. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2007; 10: 661-673.

**P**

Pandi-Perumal SR, Srinivasan V, Spence DW, Cardinali DP. Role of the melatonin system in the control of sleep: therapeutic implications. *CNS Drugs*. 2007; 21(12): 995-1018.

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 Jul; 85(3): 335-53.

Pang CS, Tang PL, Pang SF, Brown GM. Comparison of the pharmacological characteristics of 2-[125I]iodomelatonin binding sites in the lung, spleen, brain and kidney of chicken. *Biol Signals*. 1995; 4: 311-324.

Pang SF, Yu HS, Suen HC y Brown GM. Melatonin in the retina of rats: a diurnal rhythm. *J Endocrinol*. 1980; 87: 89-93.

Panzer A, Viljoen M. The validity of melatonin as an oncostatic agent. *J Pineal Res*. 1997; 22: 184-202.

Papadopoulou N, Papakonstanti EA, Kallergi G, Alevizopoulos K, Stournaras C. Membrane androgen receptor activation in prostate and breast tumor cells: molecular signaling and clinical impact. *IUBMB Life*. 2009; 61(1): 56-61.

Papaxoinis K, Triantafyllou K, Sasco AJ, Nicolopoulou-Stamati P, Ladas SD. Subsite-specific differences of estrogen receptor beta expression in the normal colonic epithelium: implications for carcinogenesis and colorectal cancer epidemiology. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2010 May; 22(5): 614-619.

Park IJ, Choi GS, Lim KH, Kang BM, Jun SH. Serum carcinoembryonic antigen monitoring after curative resection for colorectal cancer: clinical significance of the preoperative level. *Ann Surg Oncol*. 2009; 16(11): 3087-3093.

Parkin DM. Global cancer statistics in the year 2000. *Lancet Oncol*. 2001; 2: 533-543.

Parkin DM, Muir CS, Whelan SL, Gao Y-T, Ferlay J, Powell J. *Cancer Incidence in Five Continents. Volumen VI. IARC Scientific Publication n° 120* Lyon: IARC Scientific Publications; 1992.

Parkin DM, Whelan SL, Ferlay J, Raymond L, Young J. Cancer Incidence in Five Continents. Volumen VII. IARC Scientific Publication n° 143. Lyon: IARC Scientific Publications; 1997.

Parkin DM, Whelan SL, Ferlay J, Teppo L, Thomas DB. Cancer Incidence in Five Continents, Volumen VIII. IARC Scientific Publications, n° 145. Lyon, 2002.

Pentney P, Bubenik GA. Melatonin reduces the severity of dextran-induced colitis in mice. *J Pineal Res.* 1995; 19: 31-39.

Pisani P. Hyper-insulinaemia and cancer, meta-analysis of epidemiological studies. *Arch Physiol Biochem.* 2008; 11: 63-70.

Pischon T, Lahmann PH, Boeing H, Friedenreich C, Norat T, Tjønneland A, Halkjaer J, Overvad K, Clavel-Chapelon F, Boutron-Ruault MC, Guerne G, Bergmann MM, Linseisen J, Becker N, Trichopoulou A, Trichopoulos D, Sieri S, Palli D, Tumino R, Vineis P, Panico S, Peeters PH, Bueno-de-Mesquita HB, Boshuizen HC, Van Guelpen B, Palmqvist R, Berglund G, Gonzalez CA, Dorronsoro M, Barricarte A, Navarro C, Martinez C, Quirós JR, Roddam A, Allen N, Bingham S, Khaw KT, Ferrari P, Kaaks R, Slimani N, Riboli E. Body size and risk of colon and rectal cancer in the European Prospective Investigation Into Cancer and Nutrition (EPIC). *J Natl Cancer Inst.* 2006; 98: 920-31..

Poirel VJ, Cailotto C, Streicher D, Pévet P, Masson-Pévet M, Gauer F. MT1 melatonin receptor mRNA tissular localization by PCR amplification. *Neuro Endocrinol Lett.* 2003; 24: 33-38.

Ponz de Leon M, Benatti P, Percesepe A, Di Gregorio C, Fante R, Losi L y cols. Epidemiology of cancer of the large bowel: the 12-year experience of a specialized registry in northern Italy. *Ital J Gastroenterol Hepatol.* 1999; 31 (1): 10-18.

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

Poon AM, Chow PH, Mak AS, Pang SF. Autoradiographic localization of 2[125I]iodomelatonin binding sites in the gastrointestinal tract of mammals including humans and birds. *J Pineal Res.* 1997 Aug; 23(1): 5-14.

Poston GJ, Adam R, Alberts S, Curley S, Figueras J, Haller D, Kunstlinger F, Mentha G, Nordlinger B, Patt Y, Primrose J, Roh M, Rougier P, Ruers T, Schmoll HJ, Valls C, Vauthey NJ, Cornelis M, Kahan JP. OncoSurge: a strategy for improving resectability with curative intent in metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2005 Oct 1; 23(28): 7125-7134.

Potter JD, Slattery ML, Bostick RM, Gapstur SM. Colon cancer: a review of the epidemiology. *Epidemiol Rev*. 1993; 15 (2): 499-545.

Prentice RL, Pettinger M, Beresford SA, Wactawski-Wende J, Hubbell FA, Stefanick ML, Chlebowski RT. Colorectal cancer in relation to postmenopausal estrogen and estrogen plus progestin in the Women's Health Initiative clinical trial and observational study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2009 May; 18(5):1531-1537.

## Q

Qiu Y, Waters CE, Lewis AE, Langman MJ, Eggo MC. Oestrogen-induced apoptosis in colonocytes expressing oestrogen receptor h. *J Endocrinol*. 2002; 174: 369-377.

## R

Reiter RJ. The role of the neurohormone melatonin as a buffer against macromolecular oxidative damage. *Neurochem Int*. 1995 Dec; 27(6):453-460.

Reiter RJ. Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. *Endocr Rev*. 1991a;12: 151-180.

Reiter RJ. Melatonin: That ubiquitously acting pineal hormone. *NIPS*. 1991b; 223-227.

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*. 1995; 92: 8734-8738.

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

Riboli E, Norat T. Epidemiologic evidence of the protective effect of fruit and vegetables on cancer risk. *Am J Clin Nutr.* 2003; 78: 559S-69S.

Risques Fernández, RA. Papel del daño genómico en el cáncer colorrectal (Tesis Doctoral). Barcelona. Departamento de biología celular, fisiología e inmunología. Facultad de Medicina. Universidad Autónoma de Barcelona. 2001.

Roderick HL, Campbell AK, Llewellyn DH. Nuclear localisation of calreticulin *in vivo* is enhanced by its interaction with glucocorticoid receptors. *FEBS Lett.* 1997; 405: 181-185.

Romero MP, García-Pergadena A, Guerrero JM, Osuna C. Membrane-bound calmodulin in *X. laevis* oocytes as a novel binding site for melatonin. *FASEB J.* 1998; 12: 1401-1408.

Rostom A, Dubé C, Lewin G, Tsertsvadze A, Barrowman N, Code C, Sampson M, Moher D; U.S. Preventive Services Task Force. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and cyclooxygenase-2 inhibitors for primary prevention of colorectal cancer: a systematic review prepared for the U.S. Preventive Services Task Force. *Ann Intern Med.* 2007; 146: 376-389.

Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, LaCroix AZ, Kooperberg C, Stefanick ML, Jackson RD, Beresford SA, Howard BV, Johnson KC, Kotchen JM, Ockene J; Writing Group for the Women's Health Initiative Investigators. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results from the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA.* 2002; 288:321-333.

## S

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 Jul; 60(7):1407-1426.

Sallinen P, Saarela S, Ilves M, Vakkuri O, Leppäluoto J. The expression of MT1 and MT2 melatonin receptor mRNA in several rat tissues. *Life Sci.* 2005; 76: 1123-1134.

Samad AK, Taylor RS, Marshall T, Chapman MA. A meta-analysis of the association of physical activity with reduced risk of colorectal cancer. *Colorectal Dis.* 2005; 7: 204-213.

Sánchez-Barceló EJ, Mediavilla MD, Tan DX, Reiter RJ. Clinical uses of melatonin: evaluation of human trials. *Curr Med Chem.* 2010; 17(19):2070-2095.

Sandhu MS, White IR, McPherson K. Systematic review of the prospective cohort studies on meat consumption and colorectal cancer risk: a meta-analytical approach. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2001; 10: 439-446.

Sarli L, Michiara M, Sgargi P, Iusco D, De Lisi V, Leonardi F, Bella MA, Sgobba G, Roncoroni L. The changing distribution and survival of colorectal carcinoma: an epidemiological study in an area of northern Italy. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2005; 17: 567-572.

Schernhammer ES, Laden F, Speizer FE, et al. Night-shift work and risk of colorectal cancer in the nurses' health study. *J Natl Cancer Inst.* 2003; 95: 825-828.

Schernhammer ES, Laden F, Speizer FE, et al. Rotating night shifts and risk of breast cancer in women participating in the nurses' health study. *J Natl Cancer Inst.* 2001; 93: 1563-1568.

Schleipen B, Hertrampf T, Fritzscheier KH, Kluxen FM, Lorenz A, Molzberger A, Velders M, Diel P. ER $\beta$ -specific agonists and genistein inhibit proliferation and induce apoptosis in the large and small intestine. *Carcinogenesis.* 2011 Nov; 32(11): 1675-1683.

Schmidt HH, Pollock JS, Nakane M, Forstermann U, Murad F. Ca<sup>2+</sup>/calmodulina-regulated nitric oxide synthases. *Cell Calcium.* 1992; 13: 427-434.

Seely D, Wu P, Fritz H, Kennedy DA, Tsui T, Seely AJ, Mills E. Melatonin as adjuvant cancer care with and without chemotherapy: a systematic review and meta-analysis of randomized trials. *Integr Cancer Ther.* 2012 Dec; 11(4): 293-303.

Seever K, Hardeland R. Novel pathway for N1-acetyl-5-methoxykynuramine: UVB-induced liberation of carbon monoxide from



precursor N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine. *J Pineal Res.* 2008 May; 44(4):450-455.

Singh S, Paraskeva C, Gallimore PH, Sheppard MC, Langman MJ. Differential growth response to oestrogen of premalignant and malignant colonic cell lines. *Anticancer Res.* 1994; 14: 1037-1041.

Sitaram BR, Lees GJ. Diurnal rhythm and turnover of tryptophan hydroxylase in the pineal gland of the rat. *J Neurochem.* 1978; Oct; 31(4): 1021-1026.

Sjöblom M, Jedstedt G, Flemström G. Peripheralmelatoninmediates neural stimulation of duodenal mucosal bicarbonate secretion. *J Clin Invest.* 2001 Aug; 108(4): 625-633.

Sjöblom M, Säfsten B, Flemström G. Melatonin-induced calcium signaling in clusters of human and rat duodenal enterocytes. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2003 Jun; 284(6): G1034-1044.

Slattery ML. Physical activity and colorectal cancer. *Sports Med* 2004; 34(4): 239-252.

Slattery ML, Friedman GD, Potter JD. Description of age, sex, and site distribution of colon carcinoma in three geographic areas. *Cancer.* 1996; 78: 1666-1670.

Slattery ML, Potter JD, Curtin K, Edwards S, Ma KN, Anderson K, Schaffer D, Samowitz WS. Estrogens reduce and withdrawal of estrogens increase risk of microsatellite instability-positive colon cancer. *Cancer Res.* 2001 Jan 1; 61(1): 126-130.

Slattery ML, Sweeney C, Murtaugh M, Ma KN, Wolff RK, Potter JD, Caan BJ, Samowitz W. Associations between ERalpha, ERbeta, and AR genotypes and colon and rectal cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005 Dec; 14(12): 2936-2942.

Slominski RM, Reiter RJ, Schlabritz-Loutsevitch N, Ostrom RS, Slominski AT. Melatonin membrane receptors in peripheral tissues: distribution and functions. *Mol Cell Endocrinol.* 2012 Apr 4; 351(2): 152-166.

Smith MD, McCall JL. Systematic review of tumour number and outcome after radical treatment of colorectal liver metastases. *Br J Surg.* 2009 Oct; 96(10): 1101-1113.

Smith JA, O'Hara J y Schiff AA. Altered diurnal serum melatonin rhythm in blind men. *Lancet*. 1981; 2: 933.

Snyder SH, Axelrod J, Fischer JE y Wurtman RJ. Neural and Photic Regulation of 5- Hydroxytryptophan Decarboxylase in the Rat Pineal Gland. *Nature*. 1964 Aug; 29: 203: 981-982.

Snyder SH, Zweig M, Axelrod J. Control of the circadian rhythm in serotonin content of the rat pineal gland. *Life Sci*. 1964 Oct; 3: 1175-1179.

Song Y, Chan CW, Brown GM, Pang SF, Silverman M. Studies of the renal action of melatonin: evidence that the effects are mediated by 37 kDa receptors of the Mella subtype localized primarily to the basolateral membrane of the proximal tubule. *FASEB J*. 1997; 11: 93-100.

Soták M, Mrnka L, Pácha J. Heterogeneous expression of melatonin receptor MT1 mRNA in the rat intestine under control and fasting conditions. *J Pineal Res*. 2006; 41: 183-188.

de Souza Pereira R. Regression of gastroduodenal reflux disease symptoms using dietary supplementation with melatonin, vitamins and aminoacids: comparison with omeprazole. *J Pineal Res*. 2006; 41: 195-200.

Srinivasan V, Pandi-Perumal SR, Brzezinski A, Bhatnagar KP, Cardinali DP. Melatonin, immune function and cancer. *Recent Pat Endocr Metab Immune Drug Discov*. 2011 May; 5(2):109-123.

Srinivasan V, Spence DW, Pandi-Perumal SR, Trakht I, Cardinali DP. Therapeutic actions of melatonin in cancer: possible mechanisms. *Integr Cancer Ther*. 2008 Sep; 7(3): 189-203.

Stankov B, Cozzi B, Lucini V, Fumagalli P, Scaglione F, Fraschini F. Characterization and mapping of melatonin receptors in the brain of three mammalian species: rabbit, horse and sheep. A comparative *in vitro* binding study. *Neuroendocrinology*. 1991; 53: 214-221.

Stebelová K, Anttila K, Mänttari S, Saarela S, Zeman M. Immunohistochemical definition of MT(2) receptors and melatonin in the gastrointestinal tissues of rat. *Acta Histochem*. 2010; 112: 26-33.

Stebbing WSL, Farthing MJG, Vinson GP, RFM Wood. Do sex hormones affect colorectal cancer? *Br Med J (Clin Res Ed)*. 1985 July 13; 291(6488): 138.

Stein B, Yang MX. Repression of the interleukin-6 promoter by estrogen receptor is mediated by NF- $\kappa$ B and C/EBP $\beta$ . *Mol Cell Biol*. 1995; 15: 4971-4979.

Stein DJ, Ahokas A, Albarran C, Olivier V, Allgulander C. Agomelatine prevents relapse in generalized anxiety disorder: a 6-month randomized, double-blind, placebo-controlled discontinuation study. *J Clin Psychiatry*. 2012 Jul; 73(7): 1002-1008.

Steinitz R, Parkin DM, Young JL, Bieber CA, Katz L. Cancer incidence in jewish migrants to Israel 1961-1981. IARC Scientific Publication n° 98. Lyon: IARC Scientific Publications; 1989.

Stevens RG, Blask DE, Brainar GC, et al. Meeting report: the role of environmental lighting and circadian disruption in cancer and other diseases. *Env Health Perspect* .2007; 115: 1357-1362.

Sutter T, Doi S, Carnevale KA, Arber N, Weinstein IB. Expression of cyclins D1 and E in human colon adenocarcinomas. *J Med*. 1997; 28(5-6): 285-309.

## T

Tan DX, Hardeland R, Manchester LC, Poeggeler B, López-Burillo S, Mayo JC, Sáinz RM y Reiter RJ. Mechanistic and comparative studies of melatonin and classic antioxidants in terms of their interactions with the ABTS cation radical. *J Pineal Res*. 2003; 34: 249-259.

Tan DX, Manchester LC, Burkhardt S, Sáinz RM, Mayo JC, Kohen R, Shohami E, Huo YS, Hardeland R y Reiter RJ. N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine, a biogenic amine and melatonin metabolite, functions as a potent antioxidant. *FASEB J*. 2001;15: 2294-2296.

Tanaka T, Yasui Y, Tanaka M, Tanaka T, Oyama T, Rahman KM. Melatonin suppresses AOM/DSS-induced large bowel oncogenesis in rats. *Chem Biol Interact*. 2009 Jan 27; 177(2): 128-136.

Teo TS, Wang JH. Mechanism of activation of a cyclic adenosine 3':5'-monophosphate phosphodiesterase from bovine heart by calcium ions.

Identification of the protein activator as a Ca<sup>2+</sup> binding protein. *J Biol Chem.* 1973 Sep 10; 248(17): 5950-5955.

Terry MB, Neugut AI, Bostick RM, Sandler RS, Haile RW, Jacobson JS, Fenoglio-Preiser CM, Potter JD. Risk factors for advanced colorectal adenomas: a pooled analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2002; 11: 622-629.

Thor PJ, Krolczyk G, Gil K, Zurowski D, Nowak L. Melatonin and serotonin effects on gastrointestinal motility. *J Physiol Pharmacol.* 2007; 58 Suppl 6: 97-103.

Toma CD, Svoboda M, Arrich F, Ekmekcioglu C, Assadian O, Thalhammer T. Expression of the melatonin receptor (MT) 1 in benign and malignant human bone tumors. *J Pineal Res.* 2007; 43: 206–213.

Tomlinson IP, Dunlop M, Campbell H, Zanke B, Gallinger S, Hudson T, Koessler T, Pharoah PD, Niittymäki I, Tuupainen S, Aaltonen LA, Hemminki K, Lindblom A, Försti A, Sieber O, Lipton L, van Wezel T, Morreau H, Wijnen JT, Devilee P, Matsuda K, Nakamura Y, Castellví-Bel S, Ruiz-Ponte C, Castells A, Carracedo A, Ho JW, Sham P, Hofstra RM, Vodicka P, Brenner H, Hampe J, Schafmayer C, Tepel J, Schreiber S, Völzke H, Lerch MM, Schmidt CA, Buch S, Moreno V, Villanueva CM, Peterlongo P, Radice P, Echeverry MM, Velez A, Carvajal-Carmona L, Scott R, Penegar S, Broderick P, Tenesa A, Houlston RS. COGENT (COlorectal cancer GENEtics): an international consortium to study the role of polymorphic variation on the risk of colorectal cancer. *Br J Cancer.* 2010 Jan 19; 102(2): 447-54.

Toriola AT, Kurl S, Laukanen JA, Mazengo C, Kauhanen J. Alcohol consumption and risk of colorectal cancer: the Findrink study. *Eur J Epidemiol.* 2008; 23(6): 395-401.

Triantafyllidis JK, Nasioulas G and Kosmidis PA. Colorectal cancer and inflammatory bowel disease: epidemiology, risk factors, mechanisms of carcinogenesis and prevention strategies. *Anticancer Res.* 2009; 29(7): 2727-2737.

Tsoi KK, Pau CY, Wu WK, Chan FK, Griffiths S, Sung JJ. Cigarette smoking and the risk of colorectal cancer: a meta-analysis of prospective cohort studies. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2009; 7(6): 682-688.

Tutton PJ, Barkla DH. Steroid hormones as regulators of the proliferative activity of normal and neoplastic intestinal epithelial cells (review). *Anticancer Res.* 1988 May-Jun; 8(3): 451-456.

## U

Umit UM, Berna T, Handan K, Ipek E, Berrak Y, Can E, Bahadır GM. Role of melatonin and luzindole in rat mammary cancer. *J Invest Surg.* 2012 Dec; 25(6): 345-353.

## V

Vanecek J. Melatonin binding sites. *J Neurochem.* 1988; 51: 1436-1440.

Vagefi PA, Longo WE. Colorectal cancer in patients with inflammatory bowel disease. *Clin Colorectal Cancer.* 2005; 4(5): 313-319.

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: 164-169.

Vijayalaxmi, Thomas CR Jr, Reiter RJ, Herman TS. Melatonin: from basic research to cancer treatment clinics. *J Clin Oncol.* 2002 May 15; 20(10): 2575-2601.

## W

Waliszewski P, Blaszczyk M, Wolinska-Witort E, Drews M, Snochowski M, Hurst RE. Molecular study of sex steroid receptor gene expression in human colon and in colorectal carcinomas. *J Surg Oncol.* 1997 Jan; 64(1): 3-11.

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 May; 69(5): 1213-1220.

Weaver DR, Reppert SM. Melatonin receptors are present in the ferret pars tuberalis and pars distalis, but not in brain. *Endocrinology*.1990; 127: 2607-2609.

Weaver DR, Rivkees SA, Reppert SM. Localization and characterization of melatonin receptors in rodent brain by *in vitro* autoradiography. *J Neurosci*. 1989; 9: 2581-2590.

Weige CC, Allred KF, Allred CD. Estradiol alters cell growth in nonmalignant colonocytes and reduces the formation of preneoplastic lesions in the colon. *Cancer Res*. 2009 Dec 1; 69(23): 9118-9124.

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.

Weyant MJ, Carothers AM, Mahmoud NN, Bradlow HL, Remotti H, Bilinski RT, Bertagnoli MM. Reciprocal expression of ERalpha and ERbeta is associated with estrogen-mediated modulation of intestinal tumorigenesis. *Cancer Res*. 2001 Mar 15; 61(6): 2547-2551.

Williams LM y Morgan PJ. Demonstration of melatonin-binding sites on the pars tuberalis of the rat. *J Endocrinol*. 1988; 119: R1-3.

Winawer SJ, St John J, Bond J, Hardcastle JD, Kronborg O, Flehinger B, Schottenfeld D, Blinov NN. Screening of average-risk individuals for colorectal cancer. WHO Collaborating Centre for the Prevention of Colorectal Cancer. *Bull World Health Organ*.1990; 68(4): 505-13.

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.

Winczyk K, Pawlikowski M, Guerrero JM, Karasek M. Possible involvement of the nuclear RZR/ROR-alpha receptor in the antitumor action of melatonin on murine Colon 38 cancer. *Tumour Biol*. 2002; 23: 298-302.

Winczyk K, Pawlikowski M, Karasek M. Melatonin and RZR/ROR receptor ligand CGP 52608 induce apoptosis in the murine colonic cancer. *J Pineal Res*. 2001 Sep; 31(2):179-82.

Witte D, Chirala M, Younes A, Li Y, Younes M. Estrogen receptor  $\beta$  is expressed in human colorectal adenocarcinoma. *Hum Pathol.* 2001; 32: 940-944.

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

Wolpin BM, Meyerhardt JA, Mamon HJ, Mayer RJ. Adjuvant treatment of colorectal cancer. *CA Cancer J Clin.* 2007 May-Jun; 57(3): 168-185.

Wurtman RJ, Shein HM, Larin F. Mediation by  $\alpha$ -adrenergic receptors of effect of norepinephrine on pineal synthesis of (14 C)serotonin and (14 C)melatonin. *J Neurochem.* 1971 Sep; 18(9): 1683-1687.

## X

Xi SC, Tam PC, Brown GM, Pang SF, Shiu SY. Potential involvement of mt1 receptor and attenuated sex steroid-induced calcium influx in the direct anti-proliferative action of melatonin on androgen-responsive LNCaP human prostate cancer cells. *J Pineal Res.* 2000 Oct; 29(3): 172-183.

Xin Z, Jiang S, Jiang P, Yan X, Fan C, Di S, Wu G, Yang Y, Reiter RJ, Ji G. Melatonin as a treatment for gastrointestinal cancer: a review. *J Pineal Res.* 2015 May; 58(4):375-387.

## Y

Yang X, Wood PA, Ansell CM, Quiton DF, Oh EY, Du-Quiton J, Hrshesky WJ. The circadian clockgene *Per1* suppresses cancer cell proliferation and tumor growth at specific times of day. *Chronobiol Int.* 2009 Oct; 26(7): 1323-1339. (a)

Yang X, Wood PA, Oh EY, Du-Quiton J, Ansell CM, Hrshesky WJ. Down regulation of circadian clockgene *Period 2* accelerates breast cancer growth by altering its daily growth rhythm. *Breast Cancer Res Treat.* 2009 Sep; 117(2): 423-431. (b)

Yoon GS, Lee H, Jung Y, Yu E, Moon HB, Song K, Lee I. Nuclear matrix of calreticulin in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.* 2000; 60: 1117-1120.

Yuan L, Collins AR, Dai J, Dubocovich ML, Hill SM. MT1 melatonin receptor overexpression enhances the growth suppressive effect of melatonin in human breast cancer cells. *Mol Cell Endocrinol.* 2002; 192: 147-156.

## **Z**

Zhu X, Leav I, Leung Y, Wu M, Liu Q, Gao Y, McNeal JE, Ho SM. Dynamic regulation of estrogen receptor-beta expression by DNA methylation during prostate cancer development and metastasis. *Am J Pathol.* 2004; 164: 2003-2012.



# *Anexo*



## **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:** Se trata de un estudio de investigación básica sobre los mecanismos fisiopatológicos implicados en el desarrollo y progresión de los tumores de colon y recto, así como sobre las diferencias existentes entre pacientes masculinos y femeninos en este tipo de tumores.

**Importancia:** Los resultados de este estudio ayudarán a conocer mejor el mecanismo por el cual se desarrollan y evolucionan los cánceres de colon y, por tanto, a encontrar nuevas posibilidades terapéuticas para su tratamiento.

### **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:** usted se va a someter a cirugía de colon cuyos riesgos le han sido debidamente informados por su médico. Su participación como paciente en este estudio no conlleva ningún riesgo sobreañadido a los de la cirugía que se le va a practicar. Tras la misma, la pieza quirúrgica será analizada en el servicio de Anatomía Patológica. Además, si usted decide participar en este estudio una muestra de tejido de esa pieza quirúrgica (una biopsia de la zona tumoral y otra de la zona de mucosa de colon normal) serán analizadas para nuestro estudio.

Si requiere información adicional se puede poner en contacto con nuestro personal de Aparato Digestivo (Josefa León López/ Ana Maté Ambélez) en el teléfono: 958023655 o en el correo electrónico: [pepileon@ugr.es](mailto:pepileon@ugr.es) / [anamateambelez@gmail.com](mailto:anamateambelez@gmail.com)

## CONSENTIMIENTO INFORMADO – CONSENTIMIENTO POR ESCRITO DEL PACIENTE

RELACIÓN ENTRE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE LOS RECEPTORES DE MEMBRANA DE LA MELATONINA Y LAS DIFERENCIAS DE GÉNERO EN LA PROGRESIÓN DEL CÁNCER COLORRECTAL

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

- He leído el documento informativo que acompaña a este consentimiento (Información al Paciente)
- He podido hacer preguntas sobre el estudio RELACIÓN ENTRE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE LOS RECEPTORES DE MEMBRANA DE LA MELATONINA Y LAS DIFERENCIAS DE GÉNERO EN LA PROGRESIÓN DEL CÁNCER COLORRECTAL
- He recibido suficiente información sobre el estudio RELACIÓN ENTRE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE LOS RECEPTORES DE MEMBRANA DE LA MELATONINA Y LAS DIFERENCIAS DE GÉNERO EN LA PROGRESIÓN DEL CÁNCER COLORRECTAL. 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* RELACIÓN ENTRE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE LOS RECEPTORES DE MEMBRANA DE LA MELATONINA Y LAS DIFERENCIAS DE GÉNERO EN LA PROGRESIÓN DEL CÁNCER COLORRECTAL

Firma del paciente

(o representante legal en su caso)

Firma del profesional

sanitario informador

Nombre y apellidos:

Nombre y apellidos:

Fecha:

Fecha: