

**LA MELATONINA INCREMENTA LA
CITOTOXICIDAD DE LA RADIOTERAPIA Y DEL
CISPLATINO EN UN MODELO DE CÁNCER DE
CABEZA Y CUELLO ESTIMULANDO LA
GENERACIÓN DE ROS MITOCONDRIALES, LA
APOPTOSIS Y LA AUTOFAGIA**



GRUPO DE INVESTIGACIÓN CTS-101: COMUNICACIÓN INTERCELULAR

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

CENTRO DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA

PARQUE TECNOLÓGICO DE CIENCIAS DE LA SALUD

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA. FACULTAD DE MEDICINA

UNIVERSIDAD DE GRANADA

BEATRIZ IRENE FERNÁNDEZ GIL

TESIS DOCTORAL

Programa de Doctorado en Biomedicina

Granada, 2019

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Beatriz Irene Fernández Gil
ISBN: 978-84-1306-162-7
URI: <http://hdl.handle.net/10481/55495>

CERTIFICACIONES

Este trabajo de Tesis Doctoral ha sido realizado en el Grupo de Investigación CTS-101: Comunicación Intercelular, del Instituto de Biotecnología, en el Centro de Investigación Biomédica (CIBM) de la Universidad de Granada.

Durante la realización del siguiente trabajo, la Lda. Beatriz Irene Fernández Gil fue financiada por el siguiente contrato predoctoral:

- **Tipo de contrato:** Contratada predoctoral adscrita al Proyecto de Investigación del Ministerio de Economía y Competitividad (SAF2013-49019-P). Desde 15/04/2015 al 14/12/2016.
- **Organismo.** Universidad de Granada.
- **Centro:** Centro de Investigación Biomédica y Facultad de Medicina.
- Departamento: Fisiología.

Proyecto de investigación que ha financiado este estudio:

- **Título del proyecto:** Un gel de melatonina que previene y cura la mucositis: Evaluación de su interacción con los efectos citotóxicos de la radio y de la quimioterapia.
- **Entidad Financiadora:** Ministerio de Economía y Competitividad
- Entidades de realización: Universidad de Granada
- Referencia del proyecto: SAF2013-49019-P
- **Duración:** 01-01-2014 al 31-12-2016
- Investigador Principal: Germaine Escames Rosa

Parte de los resultados presentados en esta Tesis Doctoral han sido publicados en revistas internacionales:

Fernandez-Gil BI, Guerra-Librero A, Shen YQ, Florido J, Martínez-Ruiz L, García-López S, Adán C, Rodríguez-Santana C, Acuña-Castroviejo D, Quinones A, Fernández-Martínez J, Abdel Moneim AE, Lopez LC, Rodriguez-Ferrer JM, Escames G. Melatonin enhances cisplatin and radiation cytotoxicity in head and neck squamous cell carcinoma by stimulating mitochondrial ROS generation, apoptosis and autophagy. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. March 2019. In press

Otras publicaciones relacionadas con esta Tesis Doctoral:

Fernandez-Gil BI, Abdel Moneim AE, Ortiz F, Shen YQ, Soto-Mercado V, Mendivil-Perez M, Guerra-Librero A, Acuña-Castroviejo D, Molina-Navarro MM, Garcia-Verdugo JM, Sayed RKA, Florido J, Luna JD, López LC, Escames G. Melatonin protects rats from radiotherapy-induced small intestine toxicity. *PONE*, 2017, doi: 10.1371/journal.pone.0174474

Shen YQ, Guerra-Librero A, Fernandez-Gil BI, Florido J, García-López S, Martínez-Ruiz L, Mendivil-Perez M, Soto-Mercado V, Acuña-Castroviejo D, Ortega-Arellano H, Carriel V, Díaz-Casado ME, Reiter RJ, Rusanova I, Nieto A, López LC, Escames G. Combination of melatonin and rapamycin for head and neck cancer therapy: Suppression of AKT/mTOR pathway activation, and activation of mitophagy and apoptosis via mitochondrial function regulation. *J Pineal Res.*, 2018, doi: 10.1111/jpi.12461

Díaz-Casado ME, Rusanova I, Aranda P, Fernandez-Ortiz M, Sayed RKA, Fernandez-Gil BI, Hidalgo-Gutierrez A, Escames G, López LC, Acuña-Castroviejo D. In Vivo Determination of Mitochondrial Respiration in 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridine-Treated Zebrafish Reveals the Efficacy of Melatonin in Restoring Mitochondrial Normalcy. *Zebrafish* 2018, doi: 10.1089/zeb.2017.1479

Abdel Moneim AE, Guerra-Librero A, Florido J, Shen YQ, Fernandez-Gil BI, Acuña-Castroviejo D, Escames G. Oral Mucositis: Melatonin Gel an Effective New Treatment. *International Journal of Molecular Sciences* 2014, doi: 10.3390/ijms18051003

Mendivil-Perez M, Soto-Mercado V, Guerra-Librero A, Fernandez-Gil BI, Florido J, Shen YQ, Tejada MA, Capilla-Gonzalez V, Rusanova I, Garcia-Verdugo JM, Acuña-Castroviejo D, López LC, Velez-Pardo C, Jimenez-Del-Rio M, Ferrer JM, Escames G. Melatonin enhances neural stem cell differentiation and engraftment by increasing mitochondrial function. *J Pineal Res.*, 2017, doi: 10.1111/jpi.12415

Rahim I, Djerdjouri B, Sayed RKA, Fernandez-Ortiz M, Fernandez-Gil BI, Hidalgo-Gutierrez A, López LC, Escames G, Reiter RJ, Acuña-Castroviejo D. Melatonin administration to wild-type mice and non-treated NLRP3 mutant mice share similar inhibition of the inflammatory response during sepsis. *J Pineal Res.*, 2017, doi: 10.1111/jpi.12410

Lopez A, Ortiz F, Doerrier C, Venegas C, Fernandez-Ortiz M, Aranda P, Díaz-Casado ME, Fernandez-Gil BI, Barriocanal-Casado E, Escames G, López LC, Acuña-Castroviejo D. Mitochondrial impairment and melatonin protection in parkinsonian mice do not depend of inducible or neuronal nitric oxide synthases. *PONE*, 2017, doi: 10.1371/journal.pone.0183090

Doerrier C, García JA, Volt H, Díaz-Casado ME, Luna-Sánchez M, Fernández-Gil BI, Escames G, López LC, Acuña-Castroviejo D. Permeabilized myocardial fibers as model to detect mitochondrial dysfunction during sepsis and melatonin effects without

disruption of mitochondrial network. Mitochondrion 2016, doi: 10.1016/J.mito2015.12.010

Cardinali D, Escames G, Acuña-Castroviejo D, Ortiz F, Fernandez-Gil BI, Guerra-Librero A, García-López S, Shen YQ, Florido J. Melatonin-Induced Oncostasis, Mechanisms and Clinical Relevance Journal of Integrative Oncology, 2016, doi: 10.4172/2329-6771.S1-006

Ortiz F, Fernandez-Gil BI, Guerra-Librero A, López LC, Acuña-Castroviejo D, Escames. Preliminary evidence suggesting that nonmetallic and metallic nanoparticle devices protect against the effects of environmental electromagnetic radiation by reducing oxidative stress and inflammatory status. European journal of Integrative Medicine, 2016, doi: 10.1016/j.eujim.2016.06.009

Aportaciones a congresos relacionados con la presente Tesis Doctoral:

Comunicaciones Orales

Florida Translational Cell Biology Symposium. Melatonin reduces GBM cancer malignancy by targeting tumor cell metabolism. 2018. Gainesville, Florida (USA). **Fernandez-Gil BI**; Schiapparelli P; Vazquez-Ramos C; Sarabia-Estrada R; Escames G; Quiñones-Hinojosa A

I Jornadas Científicas del Centro de Investigación Biomédica. Combination of melatonin and rapamycin as a potential therapeutic strategy for head and neck cancer: melatonin protects normal cells from rapamycin associated toxicity but acts as a prooxidant agent inducing cancer cells apoptosis. 2017. Granada (España). YingQiang Shen; Ana Guerra-Librero; **Beatriz Irene Fernandez Gil**; Javier Florido; Laura Martinez Ruiz; Hector F Ortega Arellano; Germaine Escames.

Beatriz Irene Fernández Gil

I Jornadas Científicas del Centro de Investigación Biomédica. Enhancement of chemotherapy by high melatonin concentration in Head and Neck Cancer Cells. 2017. Granada (España). Javier Florido; **Beatriz Irene Fernandez Gil**; Ana Guerra-Librero; YingQiang Shen; Laura Martinez Ruiz; Sergio Garcia Lopez; Migel Angel Medivil Perez; Viviana M Soto; Dario Acuña Castroviejo; Germaine Escames.

I Jornadas Científicas del Centro de Investigación Biomédica. Metabolic switch produced by melatonin at high concentration induces apoptosis in cancer. 2017. Granada (España). Ana Guerra-Librero; **Beatriz Irene Fernandez-Gil**; Javier Florido; YingQiang Shen; Laura Martinez-Ruiz; Sergio Garcia-Lopez; Maria Micaela Molina-Navarro; Jose Manuel Garcia-Verdugo; Dario Acuña-Castroviejo; Germaine Escames

I Jornadas Científicas del Centro de Investigación Biomédica. Toxicity of radiotherapy is enhanced by high concentration of melatonin in Head and Neck Cancer Cells. 2017. Granada (España). **Beatriz Irene Fernandez Gil**; Ana Guerra-Librero; YingQiang Shen; Javier Florido; Ramy K Sayed; Miguel Angel Medivil Perez; Viviana M Soto; Laura Martinez Ruiz; Christian Adan; Manuel Gonzalez Diez; Dario Acuña Castroviejo; Germaine Escames

IV Workshop de Jóvenes Biotecnólogos. Enhancement of radio- and chemotherapy by high melatonin concentration in head and neck cancer. 2017. Granada (España). Javier Florido; **Beatriz I Fernandez-Gil**; Ana Guerra-Librero; Ying-Qiang Shen; Laura Martinez-Ruiz; Sergio Garcia-Lopez; Ramy K Sayed; Miguel Mendivil-Perez; Viviana Soto-Mercado; Manuel Gonzalez-Diez; Dario Acuña-Castroviejo; Germaine Escames.

IV Workshop de Jóvenes Biotecnólogos. Metabolic switch produced by melatonin at high concentration induces apoptosis in cancer. 2017. Granada (España). Ana Guerra-Librero; **Beatriz I Fernandez-Gil**; Sergio Garcia-Lopez; Ying-Qiang Shen; Javier Florido; Laura Martinez-Ruiz; Ramy K Sayed; Maria Micaela Molina-Navarro; Jose Manuel Garcia-Verdugo; Manuel Gonzalez-Diez; Luis Carlos Lopez; Dario Acuña-Castroviejo; Germaine Escames.

III Congreso de Estudiantes de Investigación Biosanitaria. Efecto de la melatonina en ratones tratados con quimio-radioterapia. 2017. Granada (España). Christian Adán-Díaz; Ana Guerra-Librero; **Beatriz I Fernandez Gil**; Javier Florido; Laura Martinez-Ruiz; Manuel González-Diez; Ramy K Sayed; Germaine Escames

7th European Conference on Head and Neck Oncology (ECHNO). High concentration of melatonin potentiates the toxicity of irradiation in head and neck cancer cells. 2016. Budapest (Hungría). **Beatriz I Fernandez-Gil**; Ana Guerra-Librero; Ying-Qiang Shen; Sergio Garcia-Lopez; Javier Florido; Manuel Gonzalez-Diez; Dario Acuña-Castroviejo; Jose Exposito-Hernandez; Isabel Tovar-Martin; Germaine Escames.

7th European Conference on Head and Neck Oncology (ECHNO). Efficacy of a New Pharmaceutical Formulation of Melatonin in Preventing Radiotherapy-Induced Mucositis. 2016. Budapest (Hungría). Germaine Escames, Francisco Ortiz, **Beatriz Irene Fernández Gil**, Ana Guerra-Librero, Ying Q Shen, Sergio García López, Javier Florido, Manuel González-Diez, Darío Acuña-Castroviejo, José Expósito-Hernández, Isabel Tovar-Martín, Antonio Martínez-Única.

The 2016 Controlling Cancer Summit. Efficacy of a new pharmaceutical formulation of melatonin in preventing radiotherapy-induced mucositis. 2016. Londres (Reino unido). Germaine Escames; Francis Ortiz; Ying Q Shen; **Beatriz I Fernández Gil**; Ana Guerra-Librero; Sergio Garcia López; Javier Florido; Manuel González Diez; Dario Acuña Castroviejo.

The 2016 Controlling Cancer Summit. High concentration of melatonin potentiates the toxicity of radio- and chemotherapy in Head and Neck Cancer Cells in culture and in vivo. 2016. Londres (Reino unido). **Beatriz I Fernández Gil**; Ana Guerra-Librero; Ying Q Shen; Sergio Garcia López; Javier Florido; Manuel González Diez; Ramy K Sayed; Luis Carlos López; Dario Acuña Castroviejo; Germaine Escames.

Beatriz Irene Fernández Gil

The 2016 Controlling Cancer Summit. Oncostatic effects of melatonin: role of mitochondrial function. 2016. Londres (Reino Unido). Ana Guerra-Librero; **Beatriz I Fernández Gil**; Sergio García López; Ying Q Shen; Javier Florido; Ramy K Sayed; Micaela Molina Navarro; Jose Manuel García Verdugo; Manuel González Díez; Luis Carlos López; Dario Acuña Castroviejo; Germaine Escames.

II Congreso de Estudiantes de Investigación Biosanitaria. High concentration of melatonin potentiates the toxicity of irradiation and chemotherapeutic agents such as CDDP and Rapamycin in head and neck cancer. 2016. Granada (España). Manuel González Díez; Antonio Pareja Rosa; Ana Guerra-Librero; **Beatriz I Fernández Gil**; Germaine Escames.

Melatonin Biology: Actions and Therapeutics. Clinical application of melatonin gel against radiotherapy induced mucositis. 2015. Lisboa (Portugal). Ana Guerra-Librero; **Beatriz I Fernández-Gil**; Ying-Qiang Shen; Sergio García López; Darío Acuña Castroviejo; Germaine Escames

I Congreso de Estudiantes de Investigación Biosanitaria. Melatonin's oncostatic effect in head and neck cancer cells: clonogenic assay. 2015. Granada (España). Manuel González Díez; Ana Guerra-Librero; **Beatriz I Fernández Gil**; Germaine Escames.

Pósters

3rd CNS Anticancer Drug Discovery and Development Conference. Melatonin: Targeting the cell's powerhouse to fight Glioblastoma. 2018. Nueva Orleans, Luisiana (USA). **Fernandez-Gil BI**, Schiapparelli P, Vazquez-Ramos C, Sarabia-Estrada R, Escames G, Quiñones-Hinojosa A. E-poster con presentación.

Neuroscience and Oncology Innovation Summit. Melatonin regulates metabolic switch to reduce GBM tumor burden. 2018. Key Biscayne, Florida (USA). **Fernandez-Gil BI**, Schiapparelli P, Vazquez-Ramos C, Sarabia-Estrada R, Escames G, Quiñones-Hinojosa A. E-poster con presentación.

6th International Conference on Innovative Approaches in Head and Neck Oncology (ICHNO). Effects of melatonin oral gel to prevent radiation-induced mucositis model in rat. 2017. Barcelona (España). Germaine Escames; C Tarrago; Francisco Ortiz; **Beatriz I Fernández-Gil**; N Lluch; Ana Guerra-Librero; Ying-Qiang Shen; Javier Florido; Dario Acuña-Castroviejo; R Bosser.

6th International Conference on Innovative Approaches in Head and Neck Oncology (ICHNO). Melatonin enhances the toxicity of radio- and chemotherapy in head and neck cancer cells. 2017. Barcelona (España). Germaine Escames; **Beatriz I Fernández-Gil**; Ana Guerra-Librero; Ying-Qiang Shen; Sergio García-López; Javier Florido; Ramy K Sayed; Dario Acuña-Castroviejo; José Expósito-Hernández.

6th International Conference on Innovative Approaches in Head and Neck Oncology (ICHNO). Melatonin gel protects the mitochondria from radiation damage preventing mucositis. 2017. Barcelona (España). Germaine Escames; Francisco Ortiz; **Beatriz I Fernández-Gil**; Ana Guerra-Librero; Ying-Qiang Shen; Javier Florido; Dario Acuña-Castroviejo.

Translational research in cancer cell metabolism. Metabolic switch produced by melatonin in head and neck cancer cells. 2016. Bilbao (España). Ana Guerra-Librero; **Beatriz I Fernandez-Gil**; Sergio Garcia-Lopez; Ying-Qiang Shen; Javier Florido; Ramy K Sayed; Maria Micaela Molina-Navarro; Jose Manuel Garcia-Verdugo; Manuel Gonzalez-Diez; Luis Carlos Lopez; Dario Acuña-Castroviejo; Isabel Tovar; Germaine Escames.

7th European Conference on Head and Neck Oncology (ECHNO). High concentration of melatonin potentiates the toxicity of irradiation in head and neck cancer cells. 2016.

Beatriz Irene Fernández Gil

Budapest (Hungría). E-poster seleccionado entre los 7 mejores de 243. **Beatriz I Fernandez-Gil**; Ana Guerra-Librero; Ying-Qiang Shen; Sergio Garcia-Lopez; Javier Florido; Manuel Gonzalez-Diez; Dario Acuña-Castroviejo; Jose Exposito-Hernandez; Isabel Tovar-Martin; Germaine Escames.

XI Reunión del Grupo Español de Investigación en Radicales Libres. Melatonin at high concentration enhances the toxicity of radio- and chemotherapy in tongue cancer cells. 2016. Granada (España). **Beatriz I Fernandez-Gil**; Ying-Qiang Shen; Ana Guerra-Librero; Javier Florido; Miguel Mendivil-Perez; Viviana Soto-Mercado; Ramy K Sayed; Manuel Gonzalez-Diez; Dario Acuña-Castroviejo; Germaine Escames.

XVIII Congreso de la Sociedad Española de Oncología Radioterápica (SEOR). Synergistic antitumor effects of melatonin plus irradiation in head and neck cancer cells in culture. 2015. Granada (España). A. Guerra-Librero; **B. I Fernández-Gil**; Y.Q. Shen; S. García-López; L.C. López; D. Acuña-Castroviejo; Germaine Escames.

XVIII Congreso de la Sociedad Española de Oncología Radioterápica (SEOR).. Efficacy of a melatonin gel in preventing gut mucositis. 2015. Granada (España). **B I Fernández-Gil**; A. Guerra-Librero; Y.Q. Shen; S. García-López; L.C. López; D. Acuña-Castroviejo; Germaine Escames.

XIX Congreso Sociedad Andaluza de Cancerología. Mucositis inducida por radioterapia: ensayo clínico de tratamiento con melatonina. 2014. Granada (España). Cristina Prieto Prieto; Isabel Tovar Martín; Isabel Linares Galiana; Antonio Martínez Únic; **Beatriz I Fernández Gil**; Ana Guerra-Librero; José Expósito Hernández; Germaine Escames.

Patentes relacionadas con la presente Tesis Doctoral:

Escames-Rosa G, Acuña-Castroviejo D, Guerra-Librero A, Fernandez-Gil BI, Florido-Ruiz J. Uso de melatonina para el tratamiento de tumores. *ES*. Nº de publicación: WO/2018/178497. Fecha de publicación 04/10/2018

AGRADECIMIENTOS

Agradecimientos

Llega el momento de dar las gracias. Gracias a todas esas personas que a lo largo de estos años han estado ahí, de una manera u otra, guiándome, apoyándome, porque a veces el camino se hace más largo o más complicado de lo que nos gustaría, pero al final, todo llega.

En primer lugar, gracias a mi directora de tesis, Germaine, por darme la oportunidad. Una oportunidad de crecer como científica, pero también como persona. Por enseñarme mucho más que ciencia. Que la experiencia es un grado, que hay que ser paciente, que el que la sigue la consigue y que con trabajo salen las cosas.

A Darío, por hacerme sentir como una más del equipo, por sus consejos y por supuesto, por su sorna gallega.

A Ana. Al final hemos llegado hasta vivas después de todo. Hemos compartido muchos momentos, buenos, malos, mejores... mucho trabajo, fiestas, viajes, muchas risas y algún que otro llanto. Pero lo hemos conseguido. Sobrevivimos a Gibraltar, a las horas interminables de cultivos, a las contaminaciones y hasta a nosotras mismas. Gracias porque hemos aprendido un montón juntas, de melatonina y también de la vida.

A Javi, por esa alegría que llevas a donde estas, ya sea a las horas infinitas de lab, con los ratones, de fiesta o en la playa. Por tu espontaneidad desde el primer día. Por esas ganas de hacer cosas. Gracias por estar siempre ahí, por tu ayuda y tu apoyo.

Al resto del CaCe Team, la pequeña familia que formamos tras horas y horas en el lab: A Sergio, Por los momentos de coreografías en el lab, por las horas en la campana compartiendo confidencias, por esos paseos por Madrid y por siempre tener tu casa abierta para mí. Gracias a Ying, por las horas que pasaste enseñándome a decir

Beatriz Irene Fernández Gil

servilleta en chino (Zhǐjīn). Por la paciencia en los días más complicados. Por confiar en mí. A Christian, Laura y Cesar gracias por completar el equipo, por estar siempre disponibles y con ganas de aprender.

Al resto del CTS-101: A Luis Carlos por atender mis dudas e intentar buscar siempre una solución. A Iryna, por facilitarnos el día a día en el lab, aunque a veces eso conllevase algún que otro tirón de orejas. A Eli y a Agus, por todos los momentos compartidos, los consejos y las risas. Por formar la pequeña *family* con Yosu en el piso, compartiendo sobre todo un montón de comidas y confidencias. A Elena, por estar siempre dispuesta a escuchar. A Paula y a Julia por tener siempre una sonrisa. A los EDLC, Jose, Erika, Julito, Crispi por todos esos momentos inolvidables compartidos en el lab y fuera de él. A Marisol, Ibtí, Rammy, Hanene y todos los miembros que han pasado por el lab en algún momento, porque siempre habéis estado disponibles para echar una mano.

A todos los compañeros del CIBM: Gracias a Virginea por todos sus consejos y ayuda (aunque algunos no les hice caso, como aprender LaTeX). Por ser el gurú de los ordenadores y el material de oficina. Contigo aprendí como trabajar en el lab y gané una amiga. A Jesús, siempre con una palabra de ánimo. A Ali. No estaríamos aquí hoy si no fuese por ti. Fuiste la primera persona que conocí en la UGR y desde ese día nos hicimos amigas y compañeras. Gracias. También a Gloria Perazzolli, y todos esos compañeros con los que en algún momento hemos compartido una comida de *timer*. A los gemelos por aguantarnos con hambre (que somos muy malos de aguantar).

A todos los amigos de los años en Granada. Mis MAPS, con los que tantas risas compartimos, a Antía y mis galeguiñas *granaínas*, por todas esas noches de morriña

Agradecimientos

compartida, que se lleva mejor. A Migue por las excursiones y los tés en San Miguel Alto, como lo echo de menos. A Me y a Sabi (y a Toxo), que creo que son de las que más me han aguantado. Momentos buenos y otros que no tanto, pero nada que no se pudiese solucionar con una Estrella Galicia o un ribeiro y un pulpo en el Godello o un brindis con LK en casa. A Antoñito, por traer siempre ese desparpajo y esa alegría, y por no haber cambiado nada desde que nos conocimos allá por 2007, en nuestro querido Bordeaux.

Gracias a Sierra y Saba por siempre, siempre, tener un huequito para vernos cuando coincidimos en nuestra Galicia natal. Son muchos años desde que empezamos esta andadura por la Biología juntos y ahí seguimos, al pie del cañón. Lo mismo a Jose, que aunque los caminos nos separaron en lo profesional, te apuntas a ponernos al día aunque solo lo logremos cada 4 años.

Gracias a Vitu, a Josinho, a Mosco, a Adri porque tan diferentes pero siempre tan pendientes de cuidarme.

Gracias a Laus, a Yoli, a Andres, a Raque, Lore, Luis, Die. Por estar siempre ahí, por hacerme sentir como si no me hubiese ido cada vez que vuelvo. Gracias a Raque especialmente por esa *peazo* de portada. Mil, mil gracias. Gracias a Mou, Dco, a Boquete y a Daisy, porque hay cosas que nunca cambian.

Gracias a Sofi y a Yayi por ser mis mejores amigas. Por estar ahí siempre, haga sol, llueva o truene. Por vuestra generosidad y por vuestra cercanía a pesar de tener un océano de por medio. Gracias a Nano, mi mejor amigo. Por todo tu apoyo, por tus consejos a los que nunca hago caso a pesar de saber que llevas razón. Por tantos momentos que hemos compartido los cuatro y por los que vendrán.

Beatriz Irene Fernández Gil

Gracias papa, gracias mama. Gracias Ro. Gracias Di.

Gracias por estar siempre orgullosos de mí, por apoyarme en todo, siempre. Por animarme a perseguir mis sueños, que tenía claro ya desde el día de la sandía, con apenas 6 años. Llegar hasta aquí hubiese sido imposible sin vosotros. Por el todos a una, por todos los esfuerzos y sacrificios. Gracias Mencía, Álvaro y Carlota. Porque sois la alegría de la casa, por quererme tanto como yo a vosotros. Porque un abrazo vuestro recarga de energías para todo un año. Gracias Eloy, no se puede tener un cuñado mejor. Gracias al resto de la familia, especialmente a los tíos Kusky y Pepe y al primo Ale. Gracias por vuestro apoyo incondicional. Gracias abuelos, esto es por vosotros. Os quiero.

También quiero agradecer al Dr, Q, por la oportunidad de poder formar parte de su equipo en esta nueva etapa en Jacksonville.

Thanks to all the team for having me as one more since I got here the first time. Thank you all guys for the support, and also because I learn from you everyday.

Hugo, gracias por los consejos. Rachel y Pau, gracias por confiar en mi. Señora Pau, Carla, Alex, que os voy a decir que no sepáis ya. Gracias por ser mi familia aquí. Steph, te echo de menos. Haydee, gracias por todo. Anna, thanks to be always so kind with me. Pierrecinis, gracias por ser como eres, no cambies nunca. Emiliana, and Rawan thanks for the support. Montse, Keila sois las siguientes!

Por último, Mayra y Héctor, gracias por hacerme sentir como en casa.

ABREVIATURAS

HNSCC: Head and Neck Squamous cell carcinoma (Cáncer de cabeza y cuello de células escamosas)

OMS: Organización Mundial de la Salud

HPV: Virus del papilloma humano

RT: radioterapia

TME: Microambiente tumoral

EM: electromagnética

Gy: Gray

ADN: ácido desoxirribonucleico

SSB: rotura de cadena sencilla

DSB: rotura de cadena doble

BER: reparación por escisión de bases

e⁻aq: electrón hidratado

PUFAs: ácidos grasos poliinsaturados

TEM: transición epitelio mesénquima

ARN: ácido ribonucleico

OER: ratio por aumento por oxígeno

BMRs: Modificadores de Respuesta Biológica (BRMs)

COX: ciclooxigenasa

FDA: *Food and Drug Administration* (Agencia Americana del Medicamento)

CDDP: cisplatino

ADNn: ADN nuclear

ADNmt: ADN mitocondrial

NER: reparación por escisión de nucleótido

MMR: Reparación por *mismatch*

ROS: especies reactivas del oxígeno

LPO: peroxidación lipídica

ETC: cadena de transporte de electrones

REDOX: Reacciones de oxidación-reducción

DDR: respuestas al daño en el ADN

NFκB: factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas

Beatriz Irene Fernández Gil

MMP: Permeabilización de la membrana mitocondrial

PTPm: poro de transición de permeabilidad mitocondrial

5-HTP: 5-hidroxi-triptofano

TPH: triptófano-5-hidroxilasa

DOPA: L-Aminoácido aromático descarboxilasa

AANAT: arilalquilamina N-acetiltransferasa

NAS: N-acetilserotonina

ASMT: acetilserotonina metiltransferasa

RNS: especies reactivas del nitrógeno

AMPc: 3', 5'-monofosfato de adenosina cíclica

C-3HOM: 3-hidroximetilatonina cíclica

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

AMK: N-acetil-5-metoxi-knuramina

GPx: glutatión peroxidasa

GRd: glutatión peroxidasa reductasa

SOD: superóxido dismutasa

CAT: catalasa

G-6-PDH: glucosa-6-fosfato deshidrogenasa

GSH: glutatión

OMM: membrana mitocondrial externa

UCP: proteínas de desacoplamiento

HDAC: histonas deacetilasas

Th: linfocitos T CD4+

IL: interleuquina

5-FU: 5-Fluoracilo

PG: propilenglicol

PBS: tampón fosfato salino

DMEM: Dulbecco's modified Eagle's medium

FITC: Isotiocianato de fluoresceína

PI: yoduro de propidio

Listado de abreviaturas

BSA: albúmina de suero bovino

ETS: electron transfer system capacity

FCCP: carbonyl cyanide p-trifluoromethoxyphenylhydrazone

NAO: 10-n-Nonyl-Acridine Orange

RT-qPCR: reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real

DCFH-DA: 2'7'diclorohidrofluoresceína diacetato

DCFH: 2'7'diclorohidrofluoresceína

DCF: 2', 7'diclorofluoresceína

GSSG: glutathion disulfito

GRd: glutatión reductasa

s.c.: subcutáneo

i.p.: intraperitoneal

HE: hematoxilina eosina

PS: picosirius

PAS: ácido periódico de Schiff

TCA: ácido tricloracético

OPA: o-phthalaldehído etanólico

NEM: N-etilmaleimida

HPLC: cromatografía líquida de alta resolución

GBM: glioblastoma multiforme

TMZ: Temozolomida

BTICs: Células iniciadoras de tumores

*“La vida es una unión simbiótica y cooperativa que permite triunfar a los que se
asocian”*

Lynn Margulis

A mi familia

RESUMEN

El cáncer de cabeza y cuello (HNSCC) es uno de los cánceres más comunes a nivel mundial. Desafortunadamente, la resistencia a los fármacos y la recurrencia son las principales limitaciones en la oncología clínica para muchos pacientes, y el fallo de los tratamientos convencionales supone una experiencia demoledora. Por tanto, es crucial encontrar nuevas dianas terapéuticas y fármacos que mejoren los efectos citotóxicos de los tratamientos convencionales sin potenciar los efectos secundarios. La melatonina tiene efectos oncostáticos, aunque los mecanismos implicados y las dosis requeridas permanecen poco claras.

El objetivo de este estudio es determinar de forma precisa los mecanismos mitocondriales subyacentes de la melatonina, que incrementan la citotoxicidad de los tratamientos oncológicos, y también proponer nuevos tratamientos de la melatonina para aliviar o revertir los procesos de radio- o quimiorresistencia.

En este trabajo, analizamos los efectos de la melatonina en las líneas celulares de cáncer de cabeza y cuello HNSCC, Cal-27 y SCC-9. Las células se trataron con melatonina a diferentes concentraciones (0.1, 0.5, 1 and 1,5 mM), combinada con irradiación a una dosis de 8 Gy o con cisplatino (CDDP) a 10 μ M. También estudiamos los efectos de los tratamientos combinados utilizados en los estudios *in vitro*, en en ratones *nude* atímicos con xenoinjertos de CAL-27.

Para determinar la citotoxicidad de los tratamientos en las células tumorales, se llevaron a cabo ensayos de clonogenicidad y de MTT. También se estudiaron los niveles de apoptosis y de autofagia mediante técnicas de citometría de flujo y de *western blot*. Además, se analizó la función mitocondrial midiendo la respiración mitocondrial, el contenido de ADN mitocondrial (RT-qPCR) y la masa mitocondrial (NAO). También se

Beatriz Irene Fernández Gil

cuantifico la producción de ROS, la actividad de enzimas antioxidantes y los niveles de glutatión mediante métodos espectrofotométricos.

Demostramos que altas concentraciones de melatonina potencian los efectos citotóxicos de la radioterapia y del CDDP en las células HNSCC y que estos efectos están relacionados con un incremento en la función mitocondrial de estas células. En las células HNSCC, la melatonina induce la producción de ROS intracelular cuya acumulación juega un papel muy importante en la inducción de la apoptosis. Este proceso está relacionado con un aumento de la función mitocondrial y de autofagia.

Sin embargo, *in vivo*, los efectos de la melatonina (300mg/kg s.c.) fueron menos significativos, sugiriendo que son necesarias altas concentraciones de melatonina en el tumor para potenciar los efectos citotóxicos de la irradiación (4Gy) y del CDDP (4mg/kg i.p.).

Por otra parte, también demostramos que la administración de melatonina reduce la toxicidad de los tratamientos oncostáticos en los tejidos sanos.

Nuestros resultados indican que la melatonina a altas concentraciones, combinada con CDDP o con radioterapia, es un potencial agente adyuvante, que mejora la efectividad de estos tratamientos a la vez que minimiza sus efectos secundarios.

SUMMARY

Head and neck cancer (HNSCC) is one of the most common cancers by incidence worldwide. Unfortunately, drug resistance and relapse are the principal limitations of clinical oncology for many patients, and the failure of the conventional treatments is an extremely demoralizing experience. It is therefore crucial to find new therapeutic targets and drugs to enhance the cytotoxic effects of conventional treatments without potentiating or offsetting the adverse effects. Melatonin has oncostatic effects, although the mechanisms involved and doses required remain unclear.

The purpose of this study was to determine precise underlying mitochondrial mechanisms of melatonin, which increase the cytotoxicity of oncological treatments, and also to propose new melatonin treatments in order to alleviate and reverse radio- and chemo-resistance processes.

We analyzed the effects of melatonin on head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) cell lines (Cal-27 and SCC-9), which were treated with 0.1, 0.5, 1 and 1,5 mM melatonin combined with 8 Gy irradiation or 10 μ M cisplatin (CDDP). We also examined the effects of the combined treatments on xenograft athymic nude mice.

Clonogenic and MTT assays, as well as autophagy and apoptosis, involving flow cytometry and western blot, were performed in order to determine the cytotoxic effects of the treatments. Mitochondrial function was evaluated by measuring mitochondrial respiration, mtDNA content (RT-PCR) and mitochondrial mass (NAO). ROS production, antioxidant enzyme activity and GSH/GSSG levels were analyzed using a fluorometric method.

We show that high concentrations of melatonin potentiate the cytotoxic effects of radiotherapy and CDDP in HNSCC which are associated with increased mitochondrial function in these cells. In HNSCC, melatonin induces intracellular ROS, whose accumulation plays an upstream role in mitochondria-mediated apoptosis and autophagy.

However, *in vivo*, the effects of melatonin (300mg/kg s.c.) were less significant, suggesting that high concentrations of melatonin in the tumor are required to enhance the cytotoxic effect of irradiation (4Gy) or CDDP (4mg/kg i.p.).

On the other hand, we also show that melatonin administration reduces toxicity in healthy cells.

Our findings indicate that melatonin, at high concentration, combined with cisplatin and radiotherapy to improve its effectiveness is a potential adjuvant agent, thus improving its effectiveness while minimizing its side effects.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN.....	1
1. Cáncer de cabeza y cuello.....	3
1.1. Epidemiología.....	4
1.2. Etiología: factores de riesgo.....	5
2. Tratamientos.....	7
2.1. Radioterapia:.....	7
2.2. Cisplatino.....	21
3. Melatonina.....	31
3.1. Evolución.....	32
3.2. Estructura y biosíntesis:.....	33
3.3. Mecanismo de acción.....	35
3.4. Melatonina y cáncer.....	43
II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	51
III. Material y Métodos.....	57
1. <i>Ensayos in vitro</i>	59
1.1 Células y tratamientos.....	59
1.2 Ensayo de clonogenicidad.....	61
1.3 Ensayo de proliferación celular.....	62
1.4 Análisis de la apoptosis.....	63
1.5 Determinación de la concentración de proteínas.....	65
1.6 Western Blot.....	66

1.7	Respiración mitocondrial	70
1.8	Determinación de la masa mitocondrial	73
1.9	Cuantificación del ADN mitocondrial	74
1.10	Medida de la producción de ROS.....	76
1.11	Medida de los niveles de glutatión y de glutatión disufito.....	78
1.12	Medida de la actividad del glutatión peroxidasa	79
2.	Ensayos in vivo	80
2.1	Xenoinjertos en ratones.....	80
2.2	Tratamientos	82
2.3	Histología, histopatología e inmunohistoquímica	84
2.4	Determinación de la concentración de melatonina intracelular	86
2.5	Medida de los nitritos	87
2.6	Determinacion de la lipoperoxidacion (LPO)	88
3.	Análisis estadístico	89
IV.	RESULTADOS.....	91
1.	La melatonina potencia los efectos citotóxicos de la irradiación y el CDDP en HNSCC	94
2.	La melatonina potencia los efectos apoptóticos de la irradiación y del CDDP en las células HNSCC.....	96
3.	La melatonina produce cambios en la función mitocondrial de las células HNSCC	99

4. Potenciamiento del estrés oxidativo en presencia de melatonina en las células HNSCC	102
5. Relación entre los niveles de melatonina y su efecto oncostático <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> . Estudio piloto.	105
6. La melatonina protege a los tejidos normales de la toxicidad inducida por la irradiación y por el CDDP.....	110
V. DISCUSIÓN	113
VI. PERSPECTIVAS FUTURAS	125
VII. CONCLUSIONS.....	131
VIII. BIBLIOGRAFÍA	135
10. ANEXOS	169

I. INTRODUCCIÓN

1. Cáncer de cabeza y cuello

El cáncer de cabeza y cuello engloba a un grupo de neoplasias o tumores malignos que surgen en la cabeza o en la región del cuello. Por tanto, incluye numerosas localizaciones anatómicas con múltiples sub-localizaciones, entre las que se encuentran: labios y cavidad oral, faringe (orofaringe, nasofaringe, e hipofaringe), laringe (supraglotis, glotis y subglotis), cavidad nasal y senos paranasales, ganglios cervicales (de un tumor primario desconocido), melanoma maligno del tracto aerodigestivo superior, las glándulas salivares y la glándula tiroides; excluyéndose de esta definición los cánceres de cerebro, de ojo, de esófago, así como los cánceres de músculos y huesos de la cabeza y del cuello (Brierley 2018) (Fig.1).

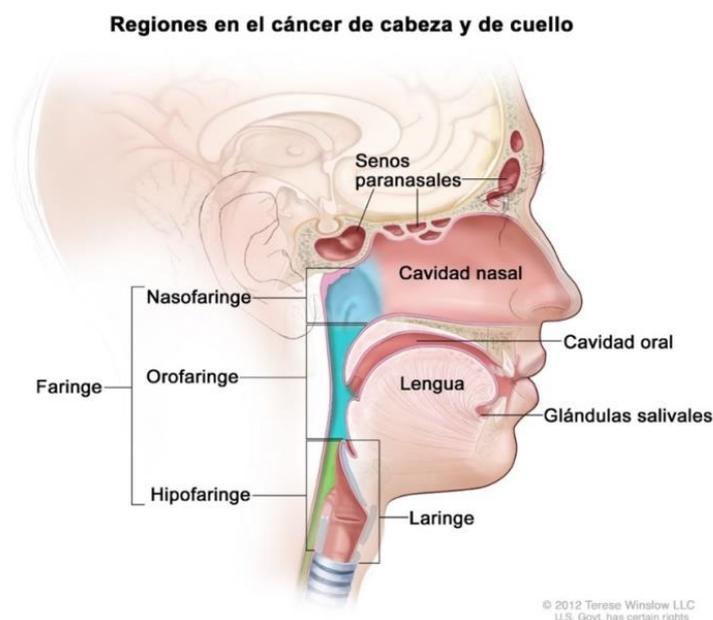


Figura 1. Localización del cáncer de cabeza y cuello. Winslow, 2012.

La mayoría de los cánceres de cabeza y cuello son carcinomas de células escamosas (HNSCC de sus siglas en inglés) que aparecen en el revestimiento epitelial de las cavidades anteriormente mencionadas (Licitra et al. 2016). El cáncer de cabeza y cuello, por sus implicaciones a diferentes niveles incluida la apariencia personal, es una enfermedad que requiere un diagnóstico exhaustivo y un tratamiento complejo, por lo que tiene que abordarse desde una visión multidisciplinar (Lo Nigro et al. 2017).

1.1.Epidemiología

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), el cáncer de cabeza y cuello es uno de los cánceres más comunes con mayor incidencia a nivel mundial. Se estima que en 2018 hubo alrededor de 800 000 nuevos casos (cerca de millón y medio si se incluyen los de tiroides) (Bray et al. 2018). Aunque el pronóstico de un paciente depende de múltiples factores, se estima que la tasa de supervivencia ronda tan solo el 60% a los 5 años. La gravedad de este tipo de cáncer radica en que 2 de cada 3 casos se detectan en estadios ya avanzados de la enfermedad, ya que en la primera fase los síntomas suelen pasar desapercibidos provocando el retraso del diagnóstico (Grupo Español de Pacientes con Cáncer (GEPAC). 2017).

Estos cánceres son más comunes en hombres que en mujeres, principalmente en pacientes de edad avanzada, casi siempre por encima de los 50 años. Esto es debido a que la mayoría se encuentran asociados con determinados factores de riesgo relacionados con los hábitos de vida como el consumo de tabaco, alcohol o algunas cepas del virus del papiloma humano (Marur and Forastiere 2016; Aminuddin and Ng 2016; Bann, Deschler, and Goyal 2016; Barczak et al. 2016; Pai SI, Pai, and Westra 2009; Pearson, Jackson, and Nor 2016).

1.2. Etiología: factores de riesgo

Las probabilidades de sufrir un cáncer de cabeza y cuello aumentan bajo determinadas condiciones a las que se expone cada individuo. Es importante identificar la etiología para poder aplicar medidas que reduzcan la incidencia de la enfermedad en la medida de lo posible, pero también es interesante describir su fisiopatología para poder entender mejor su funcionamiento y, por tanto, buscar un tratamiento adecuado. En el cáncer de cabeza y cuello cabe destacar los siguientes factores de riesgo:

1.2.1. Tabaquismo

El consumo de tabaco es el factor de riesgo más importante para este tipo de cáncer. De hecho, el 90 % de los cánceres de la cavidad oral en hombres y el 60 % en mujeres se atribuyen al tabaquismo. En el humo inspirado del tabaco existen más de 30 carcinógenos, de los cuales cabe destacar los hidrocarburos aromáticos policíclicos y las nitrosaminas. El riesgo de cáncer es directamente proporcional a la cantidad de tabaco consumido, y depende del tipo de consumo (pipa, cigarro, tabaco de mascar, puros, etc.) así como del tipo de tabaco (rubio o negro) o de cigarrillo (corto o largo, con o sin filtro). Además, existe una relación entre la distribución geográfica del cáncer de cabeza y cuello y los hábitos de consumo de cada población, que también están directamente relacionados con el sitio anatómico de la aparición del tumor. Por ejemplo, en Francia se asocia el alto índice de mortalidad por cáncer de laringe a un elevado consumo de tabaco negro. Sin embargo, en Túnez, debido al alto consumo de tabaco de mascar, hay un mayor índice de cáncer del suelo del paladar (Gallegos-Hernández 2006).

1.2.2. Consumo de alcohol

Es el segundo agente en importancia después del tabaco. El riesgo de cáncer aumenta hasta seis veces en bebedores. El principal mecanismo a través del cual actúa la carcinogénesis alcohólica es la irritación a nivel local, asociándose a los sitios anatómicos donde hay contacto directo con la mucosa durante el consumo. También actúa a través de otros mecanismos asociados a déficits nutricionales, desregulaciones metabólicas, inhibición del sistema inmune, potenciación de los carcinógenos del tabaco, incremento del daño cromosómico, e incremento de los niveles séricos de acetaldehído (principal irritante y carcinógeno de la mucosa). Al igual que en el consumo de tabaco, el incremento del riesgo de padecer cancer de cabeza y cuello por consumo de alcohol es directamente proporcional a la dosis consumida y depende del tipo de bebida alcohólica. Las diferentes bebidas presentan unas u otras sustancias que afectarán más a una u otra región anatómica en mayor o menor medida. Por ejemplo, en los consumidores de bebidas destiladas (whisky, ron, etc.) aumenta la incidencia de cáncer hipofaríngeo y de laringe. Sin embargo, en los consumidores de bebidas fermentadas (vino, cerveza, etc.) aumenta la proporción de cáncer de la cavidad oral (Gallegos-Hernández 2006).

1.2.3. Virus del papiloma humano (HPV)

En los últimos 20 años, el cambio en las conductas sexuales ha provocado un aumento de la incidencia del HPV. La infección con el HPV, especialmente de los tipos 16 y 18, es un factor de riesgo para algunos tipos de tumores de cabeza y cuello, concretamente los cánceres de orofaringe que implican las amígdalas o la base de la lengua. Estos virus tienen especial tropismo por los epitelios de células escamosas ya que su ciclo replicativo se mantiene sólo en las células epiteliales. El cáncer inducido por este virus es diferente a nivel clínico y molecular cuando se compara con otros

factores de riesgo, como el alcohol o el tabaco, y presenta una prognosis más favorable. También es importante destacar que los tumores de orofaringe relacionados con el HPV aparecen en poblaciones más jóvenes (Kobayashi et al. 2018).

2. Tratamientos

El tratamiento para el cáncer de cabeza y cuello incluye cirugía, radioterapia, quimioterapia, terapia dirigida o una combinación de tratamientos. La elección de uno u otro dependerá del historial del paciente, la histopatología del tumor, su localización y el estadio del cáncer (Barczak et al. 2016; King and Thoeny 2016; Licitra et al. 2016; Bossi and Alfieri 2016; Pearson, Jackson, and Nor 2016; Tshering Vogel and Thoeny 2016; Rischin, Ferris, and Le 2015; World Health Organization 2014)

2.1. Radioterapia:

La radioterapia (RT) es uno de los tratamientos más extendidos en la lucha contra el cáncer. Su uso como tratamiento antitumoral se extendió rápidamente a finales del siglo XIX, poco después del descubrimiento de los rayos X por Roentgen, en 1895 (Connell and Hellman 2009). Su efectividad en tumores localizados o sólidos y su bajo precio comparado con otros tratamientos, explican por qué más de la mitad de los tumores se tratan, al menos en parte, con esta técnica (Maier et al. 2016; Baskar and Itahana 2017).

La RT utiliza radiaciones ionizantes, que son aquellas que tienen la capacidad de alterar los átomos del medio con el que interaccionan mediante la deposición de

energía (ionización). Por este motivo, las radiaciones ionizantes son potencialmente lesivas. Cuando interaccionan con un medio biológico, son capaces de producir rupturas de las moléculas de las células, provocando daños que a veces son irreparables. Estos daños dependerán de la cantidad de energía depositada en el medio o, lo que es lo mismo, de la dosis de la radiación recibida.

Generalmente la RT se aplica de forma externa, aunque también existen otros tipos de administración donde la fuente de radiación se coloca dentro del cuerpo, como la braquiterapia (en el que la fuente de radiación es sólida) o la radioterapia sistémica (donde el tratamiento fluye a través de la sangre a todos los tejidos del cuerpo). El tipo de radioterapia depende de diversos factores como el tipo de cáncer, el tamaño del tumor y la ubicación del mismo, la proximidad del tumor a tejidos normales (no tumorales) sensibles a la radiación, la salud e historia clínica del paciente, la prescripción de otros tratamientos, etc.(Instituto Nacional del Cancer (NIH) 2018).

2.1.1. Dosis

Para la RT, la radiación se suministra principalmente a través de fuentes de alta energía como fotones (rayos gamma y rayos X) (Fig.2), partículas cargadas (electrones) y protones. La energía física que se transfiere a las células tumorales, altera su sensibilidad, supervivencia y metabolismo, y perturba el microambiente tumoral (TME) (Baskar and Itahana 2017).

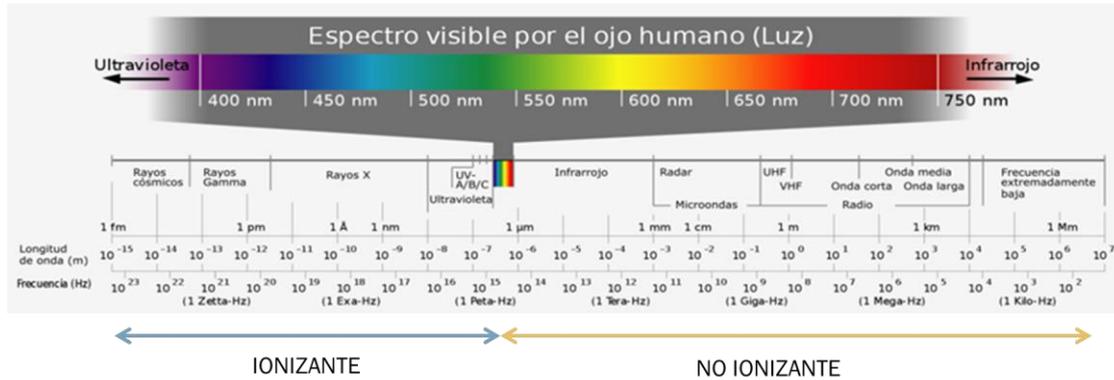


Figura 2. Espectro electromagnético. Modificado de Horst Frank, Phrood & Anony. CC via Wikimedia Commons

La cantidad total de radiación administrada se mide en unidades llamadas Gray (Gy). Un gray es la absorción de un julio de energía de radiación ionizante por kilogramo de masa irradiado. La dosis variará en función del tejido a irradiar, ya que cada tejido puede tolerar una dosis de irradiación máxima. Para fijarla, se valora la llamada relación terapéutica que compara el daño causado a las células cancerosas con el daño causado a las células sanas. Para la radiación externa, la dosis total se divide a menudo en dosis más pequeñas (llamadas fracciones) que se dan durante varias semanas. Esto aumenta al máximo la eliminación de las células cancerosas mientras se reduce al mínimo el daño al tejido sano. En estos tratamientos, se administran generalmente de 1,5 a 2 Gy diarios, 5 días a la semana, durante aproximadamente 5 a 8 semanas. Las dosis totales pueden variar de 30 a 80 Gy, dependiendo de la intención del tratamiento, es decir, si este es curativo o paliativo, y del tipo y localización del tumor.

Además del esquema tradicional de administración de radioterapia, también se utilizan otros modelos alternativos para reducir el tiempo total de tratamiento. La

aceleración del tratamiento o RT hiperfraccionada (administración de la misma dosis total en un tiempo más corto) debe reducir el crecimiento del tumor entre las sesiones, lo que resulta en un mejor control local de la enfermedad. En los regímenes hiperfraccionados, se administran de dos a tres fracciones al día, con una dosis reducida por fracción que va de 1,1 a 1,2 Gy. La reducción de la dosis por fracción puede disminuir el riesgo de toxicidad tardía, a pesar de una mayor dosis total. Por otro lado, la radiación hipofraccionada supone la administración de la radiación con menos número de dosis, de manera que cada dosis es más grande. A veces, esto podría significar que se da menos de una vez al día, lo que puede hacer que la radiación funcione mejor para algunos tumores. El tiempo total de administración disminuye, pero el lado negativo es que los efectos secundarios de la radiación se ven antes y pueden ser peores, aunque no aumenta los efectos tardíos de la radiación, descritos más adelante. Algunos estudios indican que el hiperfraccionamiento proporciona un mayor beneficio en el cáncer de cabeza y cuello (American Cancer society 2014; Baskar and Itahana 2017; Rosen, Day, and Singh 2015)

2.1.2. Mecanismo de acción y daños a nivel celular

La radiación ionizante a la que es expuesta una célula durante un tratamiento de RT, altera las moléculas dentro de ella produciendo daño celular. Esto puede producirse de forma directa, ionizando las bases del ADN; o bien indirectamente a través de la hidrólisis de las moléculas de agua, generando radicales libres que podrán reaccionar con el propio ADN, proteínas y otras biomoléculas (Kiang, Fukumoto, and Gorbunov 2012; Breen and Murphy 1995)

Los daños en el ADN podrían ser producidos por dañar una base, interrumpir un enlace azúcar-fosfato resultando en una ruptura de cadena sencilla o doble (SSB o DSB

respectivamente) o producir un entrecruzamiento de ADN. Aproximadamente se induce daño a unas 3000 bases, 1000 SSBs y 40 DSBs en una sola célula con una dosis de rayos X de 1 Gy. Los daños de las bases y de las SSBs tienen menor relevancia para la supervivencia celular ya que estas lesiones se reparan en su mayoría por el sistema de reparación por escisión de bases (BER, por sus siglas en inglés). Sin embargo, las DSBs no pueden ser reparadas debido a su complejidad y constituyen el daño más severo en el ADN tras la irradiación llevando a la muerte celular, senescencia, mutaciones o inestabilidad genómica (Fig. 3) (Maier et al. 2016).

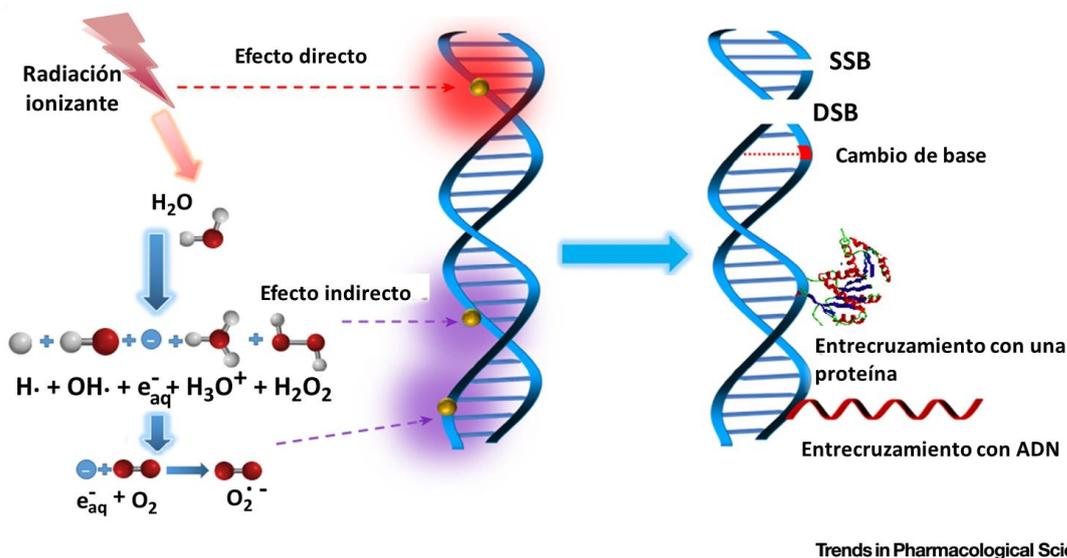


Figura 3. Mecanismo de la radiación ionizante en radioterapia. Adaptado de Wang et al. Trends in Pharmacological Sciences, 2017.

En cuanto a la radiólisis de la molécula de agua, esta produce especies químicas muy reactivas tales como el radical hidroxilo (OH^\bullet), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el electrón hidratado (e^-_{aq}) y una serie de biomoléculas derivadas de radicales con núcleo de carbono, oxígeno, azufre o nitrógeno que, a su vez, pueden conducir a la formación de peróxidos orgánicos y radicales de aniones superóxido (O_2^-) en presencia

de oxígeno molecular. El OH^\bullet es altamente electrofílico y, por tanto, se une covalentemente a moléculas como polipéptidos, aminoácidos y ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs), modificando su estructura y, en consecuencia, su función celular. Por su parte, las alteraciones causadas por los radicales peróxido y superóxido se producen indirectamente a través de reacciones de tipo Fenton (Fig. 4) (Kiang, Fukumoto, and Gorbunov 2012; Breen and Murphy 1995).

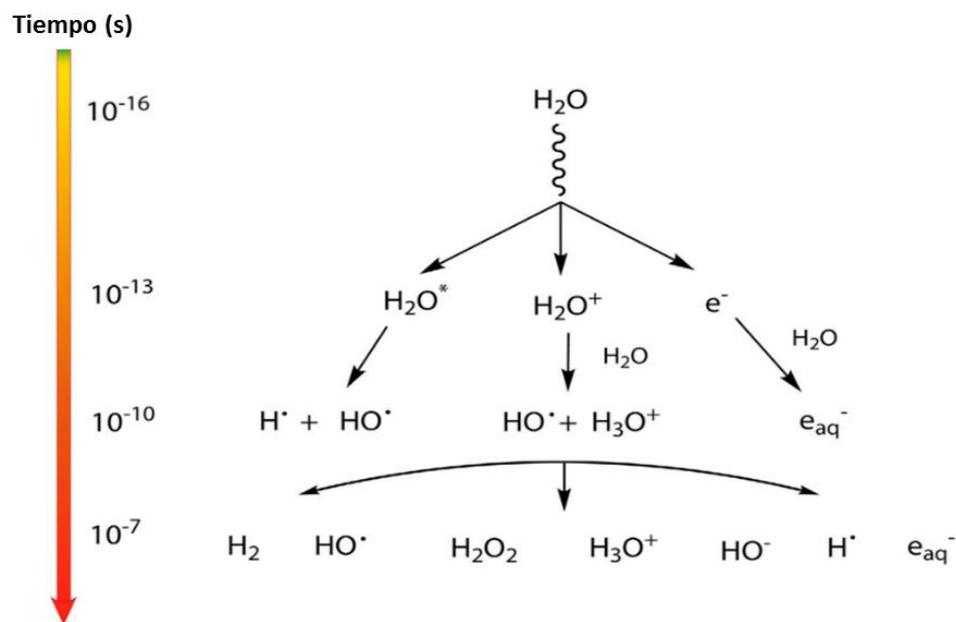


Figura 4. Escala temporal de eventos en la radiólisis del agua que conduce a productos primarios: H_2 ; HO^\bullet ; H_2O_2 ; H_3O^+ ; HO^- ; H^\bullet y e_{aq}^- . Lousada et al. *Scientific Reports*, 2016.

Todos estos procesos conllevan teóricamente a una muerte celular tras la activación de diversas vías que activan los mecanismos apoptóticos u otros mecanismos alternativos, como son la senescencia o la catástrofe mitótica (Eriksson and Stigbrand 2010).

El efecto de la radioterapia está limitado por la radiorresistencia de las células tumorales y por las reacciones adversas de los tejidos sanos que rodean al tumor. Para mejorar estas limitaciones se puede seguir dos estrategias: (1) radiosensibilización de las células tumorales sin sensibilizar las células normales del tejido; (2) radioprotección específica de las células normales del tejido (Maier et al. 2016).

2.1.3. Radiorresistencia y radiosensibilización

Son varios los mecanismos que median la radiorresistencia a nivel celular (Fig. 5). La capacidad intrínseca para reparar los daños del ADN producidos por la radioterapia determina la resistencia a la radiación de una célula tumoral dada. Las células tumorales irradiadas que presentan rupturas de doble cadena del ADN sin reparar pierden su clonogenicidad, lo que significa que estas células no pueden restaurar la masa tumoral. Además, los transportadores de iones pueden estar directamente implicados en la respuesta al estrés celular causado por el daño del ADN controlando, a su vez, el ciclo celular, las adaptaciones metabólicas o la reparación del ADN y, por tanto, contribuyen a la radiorresistencia intrínseca y a la supervivencia de la célula tumoral. (Huber et al. 2013). Asimismo, la radiorresistencia puede estar mediada a nivel genético, siendo muchos los genes que influyen en ella como, por ejemplo, los genes implicados en diferentes procesos celulares como la apoptosis (P53, Bcl2, etc.) (Muschel et al. 1998), la transición epitelio-mesénquima, TEM (SNAI1, HIF1, ZEB1, STAT3, etc.) o incluso en procesos como el metabolismo tumoral (Tang et al. 2018). Recientemente, también se ha descrito el papel de los microARNs como mediadores en la radioresistencia, afectando a diferentes vías de señalización implicadas en la reparación del daño celular, la regulación del ciclo celular, la apoptosis, neovascularización o inflamación (Ahmad et al. 2017).

Por otra parte, además de los factores intrínsecos, hay que tener en cuenta la influencia del microambiente en la radioresistencia del tumor. Con frecuencia aparecen áreas hipóxicas en los tumores sólidos como resultado de un suministro anormal de sangre al tumor, así como de un metabolismo elevado y de un crecimiento rápido de dichas células tumorales. La hipoxia tumoral se considera como una de las principales fuentes de radioresistencia. Esto se debe a que la radiación ionizante genera directa o indirectamente radicales en el residuo de desoxirribosa del esqueleto del ADN. En una atmósfera hipóxica, los tioles pueden reaccionar con los radicales de ADN mediante la donación de átomos de hidrógeno, lo que resulta en la reparación química del ADN. Sin embargo, en presencia de oxígeno, este compite con los grupos tioles, evitando la reparación y favoreciendo la fijación del daño radioinducido. Este llamado “efecto oxígeno” radiosensibiliza las células tumorales en un factor de dos a tres (ratio por aumento por oxígeno, OER) en comparación con la situación hipóxica.

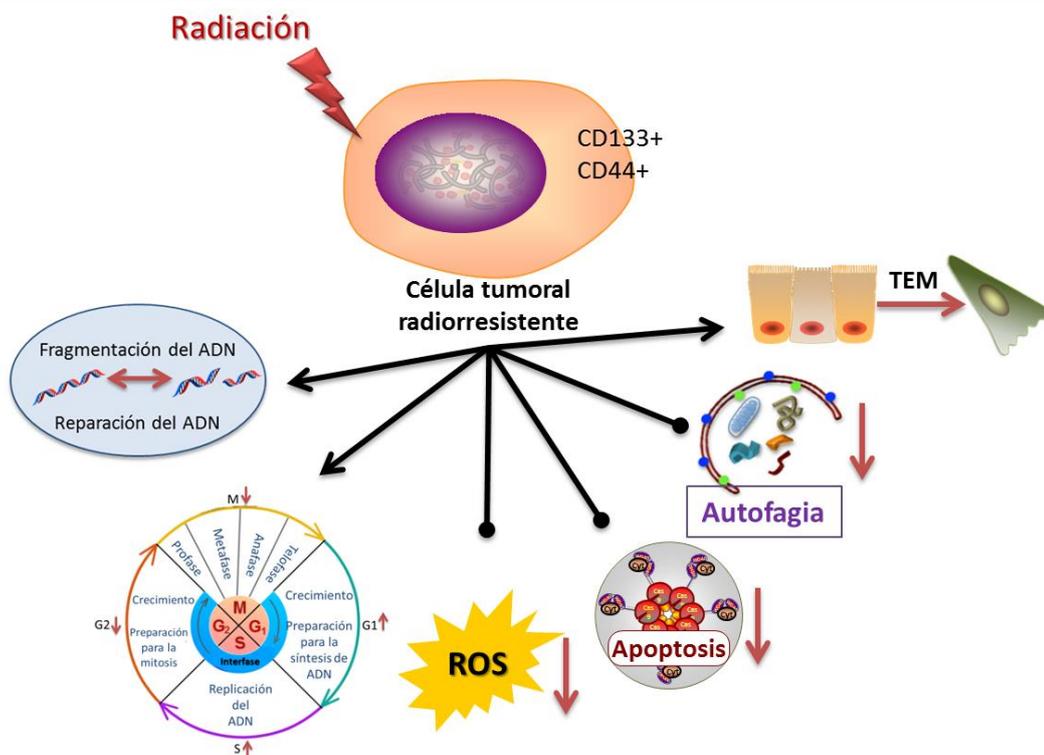


Figura 5. Mecanismos de radioresistencia. Modificado de Chang et al. Oncotarget, 2016.

La radiosensibilización es una intervención física, química o farmacológica que aumenta los efectos letales de la radiación cuando se administra conjuntamente con ella. En estudios experimentales o en la práctica clínica, el objetivo de un enfoque de radiosensibilización (o el uso de radiosensibilizadores) es hacer que las células tumorales sean más sensibles a la radioterapia. Sólo puede esperarse un beneficio clínico si se puede demostrar un efecto diferencial entre los tumores y los tejidos sanos. Hay varias maneras de mejorar la sensibilidad a la radiación. Los siguientes ejemplos describen algunas estrategias para mejorar la eficacia terapéutica de la radioterapia:

1. Actuar contra la hipoxia tumoral: muchos mecanismos están implicados en la radiosensibilización del oxígeno. Un primer enfoque para superar esta fuente de radiorresistencia dependiente del oxígeno es la eliminación selectiva de las células hipóxicas mediante el uso de citotoxinas biorreducibles. La segunda forma es aumentar la muerte celular por una reoxigenación transitoria del tumor en el momento de la irradiación, aumentando el suministro de oxígeno a los tumores o disminuyendo el consumo de oxígeno por las células tumorales. Cuando el beneficio terapéutico está mediado por un efecto del oxígeno, es improbable que se dé un efecto radiosensibilizante en los tejidos normales, ya que será más probable que el efecto radiosensibilizador sea más alto para regiones tumorales hipóxicas que para tejidos bien oxigenados.

2. Aumento del daño inicial por radiación: algunas moléculas, como las pirimidinas halogenadas (5-bromodesoxiuridina o 5-yododesoxiuridina), hacen que el ADN sea más susceptible al daño por radiación. Estos compuestos se incorporan al

ADN en lugar de las bases timidina y debilitan la molécula de ADN, haciéndola más sensible a la lesión por radiación.

3. Redistribución del ciclo celular: la sensibilidad de la célula a la irradiación depende de la posición de las células en el ciclo de división. Las células en las fases G2 y M del ciclo celular son más radiosensibles que las células en la fase S. Las estrategias de redistribución del ciclo celular pueden explotarse para radiosensibilizar tumores. Por ejemplo, los taxanos (paclitaxel, docetaxel) detienen las células en fases radiosensibles del ciclo celular. Los análogos de nucleósidos, como fludarabina o gemcitabina, eliminan específicamente las células de fase S radorresistentes.

4. Inhibición de la reparación celular: las células de mamíferos tienen la capacidad de reparar lesiones subletales y potencialmente letales inducidas por la irradiación. Cualquier fármaco que interfiera con los mecanismos de reparación celular puede mejorar la respuesta celular a la irradiación. Muchos agentes quimioterapéuticos tales como el cisplatino, la doxorubicina y los análogos de nucleósidos interactúan con mecanismos de reparación celular.

5. Superación de la repoblación acelerada: los tejidos con una rápida tasa de reposición celular responden a la lesión por radiación mediante la proliferación compensatoria de las células supervivientes. Esta repoblación acelerada por clones de células tumorales puede contrarrestarse acortando la duración del tratamiento de radioterapia (es decir, terapia de radiación acelerada hiperfraccionada). También es por esta razón por la que se usan fármacos quimioterapéuticos con radioterapia concurrente.

6. Modulación de otros determinantes biológicos de la respuesta a la radiación: los Modificadores de Respuesta Biológica (BRMs) representan un grupo diverso de agentes biológicos y dianas moleculares que modulan las respuestas celulares a la radiación ionizante de forma que pueden ser explotadas para sensibilizar a los tumores. Los BRMs pueden influir en una serie de procesos bioquímicos, incluyendo redes de citoquinas, reparación del ADN, regulación del ciclo celular, respuesta al estrés, apoptosis y metabolismo. Por ejemplo, algunos objetivos de los BRMs incluyen citoquinas, vías angiogénicas y expresión de ciclooxigenasa (COX) (Gallez 2011).

7. Regulación de genes implicados en la radiosensibilidad tumoral: dado que muchos de los oncogenes que afectan a la respuesta de la radiación también están alterados en los tumores humanos, es posible que estos oncogenes puedan ser el blanco para una radiosensibilidad activa. Este enfoque apunta al tumor y descarta a las células normales. Las estrategias pueden ser de actuación directa sobre el gen, por técnicas de transfección o modificación epigenética, o bien teniendo en cuenta las alteraciones tumorales en estos genes y actuando específicamente sobre los que están expresados de manera diferencial en el tumor (Muschel et al. 1998).

La radiosensibilización se consigue a menudo por más de un mecanismo, un hecho que contribuye significativamente al aumento de la respuesta tumoral a la radioterapia. Por ejemplo, el anticuerpo anti-EGFR C225 actúa inhibiendo las reparaciones de daños provocados por la radiación, deteniendo las células en la fase G2/M radiosensible del ciclo celular e inhibiendo la angiogénesis tumoral. Así mismo, los inhibidores de la COX-2 radiosensibilizan los tumores por múltiples mecanismos que implican la inhibición de la reparación del daño subletal de la radiación, la

inhibición de la angiogénesis tumoral y la reoxigenación de los tumores por inhibición de la cadena respiratoria (Gallez 2011).

2.1.4. Efectos adversos y radioprotección

1. Efectos adversos

Los efectos secundarios de la radioterapia se clasifican en efectos agudos, intermedios o tardíos.

Los efectos agudos ocurren durante el curso de la radioterapia, aparecen en la gran mayoría de los pacientes y se resuelven durante las 4 semanas siguientes al último tratamiento. Entre ellos se incluyen la xerostomía, radiodermatitis y la mucositis, producidas por la inflamación y las lesiones ocasionadas en las glándulas salivares, piel y mucosas, respectivamente.

La severidad de la radiodermatitis aguda depende de la dosis total recibida, de la profundidad de penetración de la radiación y de la sensibilidad individual, abarcando un espectro que va desde eritema leve y descamación seca, hasta descamación húmeda más severa y ulceración (Villanueva Ramos et al. 2012). Los últimos avances tecnológicos y los nuevos regímenes de tratamiento no han conseguido grandes progresos en limitar este efecto adverso que está ligado a retrasos en el tratamiento y disminución de la calidad de vida del paciente (Singh et al. 2016).

La mucositis es uno de los efectos secundarios más severos de la RT. Afecta a todo el tracto gastrointestinal, desde la boca hasta el ano y conlleva un descenso de la calidad de vida, ligado a disfagia, disartria, odinofagia, que incluso puede llevar a la necesidad de sonda nasogástrica en estados más avanzados, lo que va acompañado de una pérdida de peso. Además abre la puerta a infecciones oportunistas y limita la dosis

de los tratamientos, comprometiendo la cura y la supervivencia del paciente (Abdel Moneim et al. 2017; Oronsky et al. 2018).

Una reducción de estos efectos agudos aumentaría la calidad de vida del paciente ya que, en muchas ocasiones, requieren una interrupción del tratamiento que retrasa la terminación de la radioterapia (Rosen, Day, and Singh 2015).

Los efectos intermedios son menos comunes y ocurren entre 8-12 semanas después del final de la RT. Un ejemplo es la neumonitis por radiación, que refleja la inflamación del pulmón.

Los efectos tardíos ocurren al menos 9 meses después del final del tratamiento y suelen ser el factor limitante de la dosis en la radioterapia clínica. Estos efectos incluyen la lesión de tejidos y órganos específicos dentro del campo de radiación o en las vías de entrada o de salida del haz de radiación. Otros tipos de efectos tardíos debidos a la irradiación incluyen la carcinogénesis (los segundos tumores causados por la radiación), la teratogénesis (malformación del feto, que es muy rara porque las mujeres embarazadas rara vez son tratadas con radiación), y los efectos sobre el crecimiento y el desarrollo debido a la irradiación en la infancia. La probabilidad de un efecto tardío depende de la dosis total de radiación, del tamaño de la fracción irradiada, del volumen de tejido que se está tratando con RT y con otros tratamientos (por ejemplo, quimioterapia). Los efectos tardíos también dependen de la cirugía previa o subsiguiente, factores genéticos del paciente en concreto, daño vascular preexistente (por ejemplo, diabetes), hipertensión, edad y otras condiciones preexistentes (por ejemplo, enfermedad inflamatoria intestinal en pacientes que reciben irradiación abdominal). La dosis de radiación y/o volumen de tejido irradiado

está limitada debido a los efectos tardíos: por ejemplo, tumores del cerebro y médula espinal y cánceres localmente avanzados de pulmón, cuello uterino, mama y cabeza y cuello. En este caso, un protector tisular normal selectivo permitiría una dosis más alta, un volumen de tratamiento mayor así como una lesión tisular tardía reducida, aumentando así la relación terapéutica (Rosen, Day, and Singh 2015).

2. Radioprotección

Los radioprotectores son fármacos que protegen los tejidos no tumorales circundantes del daño causado por la radioterapia, promoviendo la reparación de las células normales que se ven expuestas a la radiación. Los radioprotectores, para poder ser utilizados en la clínica, tienen que cumplir ciertos criterios, principalmente no contrarrestar el efecto de la RT sobre el tumor. Además, debe conocerse perfectamente la ventana de acción del fármaco usado como radioprotector, y tiene que presentar una toxicidad aceptable para los pacientes (Andreassen, Grau, and Lindegaard 2003). La amifostina (con el nombre comercial de Ethyol) es el primer fármaco aprobado por la Agencia Americana del Medicamento (*Food and Drug Administration*, FDA) como radioprotector. Este fármaco ayuda a minimizar los efectos de la RT como la xerostomía y la mucositis, pero presenta un elevado número de efectos secundarios que dificulta su uso (Gu et al. 2014). La reducción del estrés oxidativo y de la reacción inflamatoria, tras la RT, reducen el daño en los tejidos radiosensibles mejorando la supervivencia. La supresión de las especies reactivas del oxígeno mitocondriales, y el uso de inhibidores de enzimas, como la NADPH oxidasa y la COX-2, están mostrando resultados prometedores en este aspecto (Yahyapour et al. 2018). Diversos estudios están investigando el uso de agentes antioxidantes como radioprotectores, incluyendo la N-acetilcisteína, la vitamina E, extracto foliar de

Moringa oleífera, extracto de canela, polifenol de té verde, hesperidina o melatonina (Kiang, Fukumoto, and Gorbunov 2012).

En definitiva, la importancia de los radioprotectores reside en que estos fármacos pueden mejorar los resultados de la radioterapia para el tratamiento del cáncer al permitir dosis más altas de radiación y/o reducir el daño en los tejidos sanos, mejorando potencialmente la esperanza de vida del paciente, así como la calidad de la misma.

2.2. Cisplatino

El cisplatino, también denominado cis-diaminodicloroplatino (II) o CDDP, es uno de los fármacos quimioterapéuticos más potentes, y es ampliamente utilizado para el tratamiento del cáncer.

2.2.1. Estructura y características

El CDDP es un compuesto de coordinación metálico (platino) con una geometría planar cuadrada (CAS 15663-27-1), formada por un átomo central de platino, dos grupos aminados y dos iones cloruro (Fig. 6).

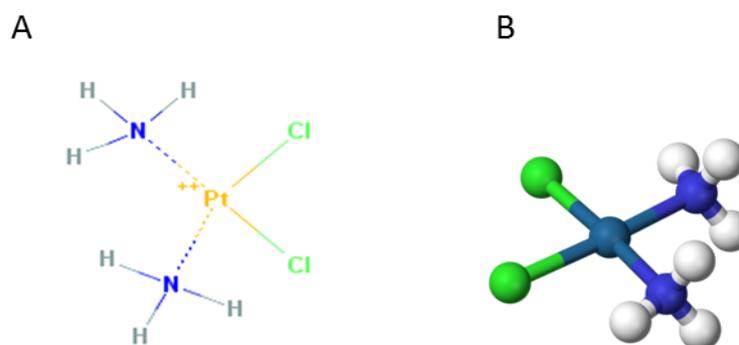


Figura 6. A. Estructura molecular bidimensional del cis-diaminodicloroplatino (II) (PubChem CID=441203 [Oct. 6, 2017]). B. Estructura tridimensional del mismo compuesto.

El CDDP es un polvo cristalino blanco o amarillo intenso a amarillo-naranja a temperatura ambiente. Es ligeramente soluble en agua y soluble en N, N-dimetilformamida. El cisplatino es estable a temperaturas y presiones normales, pero puede transformarse lentamente con el transcurso del tiempo hasta el isómero trans, que es biológicamente inactivo (National Toxicology Program 2016; Tanida et al. 2012; Florea and Büsselberg 2011).

El cisplatino se sintetizó por primera vez por Michele Peyrone en 1844 (Kauffman et al. 2010) y su estructura química fue elucidada por Alfred Werner en 1893. Sin embargo, no fue hasta la década de 1960 cuando Rosenberg realizó las primeras observaciones sobre la citotoxicidad de este compuesto (Rosenberg, Van Camp, and Krigas 1965). Rosenberg y su equipo descubrieron que la electrólisis de un electrodo de platino sumergido en una disolución tampón de cloruro amónico producía cisplatino, que inhibía la división celular de la bacteria *Escherichia coli*. La bacteria llegaba a alcanzar 300 veces su tamaño, pero era incapaz de dividirse. Posteriormente, el mismo grupo probó con éxito los efectos de varios complejos de platino en sarcomas de rata. El cisplatino es uno de los agentes anticancerígenos más eficaces y ha sido ampliamente utilizado para la curación de diferentes tipos de neoplasias incluyendo cabeza y cuello, pulmón, ovario, leucemia, mama, cerebro, riñón y cánceres testiculares. En 1971, el CDDP se aplicó por primera vez a un paciente con cáncer. El descubrimiento del cisplatino fue la piedra angular que desencadenó el interés en el platino (II), así como en otros compuestos que contienen metales como posibles fármacos contra el cáncer, ya que fue el primer compuesto de platino aprobado por la FDA para el tratamiento del cáncer en 1978, bajo el nombre de

Platinol® (Bristol-Myers Squibb) (Dasari and Tchounwou 2014; Florea and Büsselberg 2011).

2.2.2. Dosis

El cisplatino se administra por vía intravenosa a una dosis de 20 a 120 mg/m² durante 30-60 min, produciendo una concentración sérica máxima de 5 a 25 µM, con una vida media de unos 30 min (Tacka et al. 2004). La dosis estándar es de 100 mg/m² administrada cada 3 semanas. Estudios recientes sugieren que administrándolo una vez semanalmente, a una dosis más baja (40 mg/m²), la toxicidad disminuye sin afectar a la supervivencia (Bauml et al. 2019). Además, este tipo de prescripción lograría una mayor dosis acumulativa (Le and Hanna 2018). Sin embargo, el régimen de administración es todavía objeto de debate dejando la elección en función de la localización y origen del tumor y del criterio del oncólogo (Noronha et al. 2018; Kiyota 2018).

2.2.3. Mecanismo de acción

El cisplatino se encuentra principalmente en la forma dicloro neutro en el plasma, donde la concentración de cloruro es relativamente alta (100 mM aproximadamente). Sin embargo, si la concentración de cloruro es baja, como es el caso del citoplasma donde es similar a 4 mM, el fármaco se hidrata produciendo los complejos monohidratado y dihidratado, $\text{cis-}[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{H}_2\text{O})\text{Cl}]^+$ y $\text{cis-}[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ (Fig. 7). Estos compuestos pueden reaccionar con ADN, glutatión, metalotioneínas y otros componentes nucleófilos del interior celular (Tacka et al. 2004).

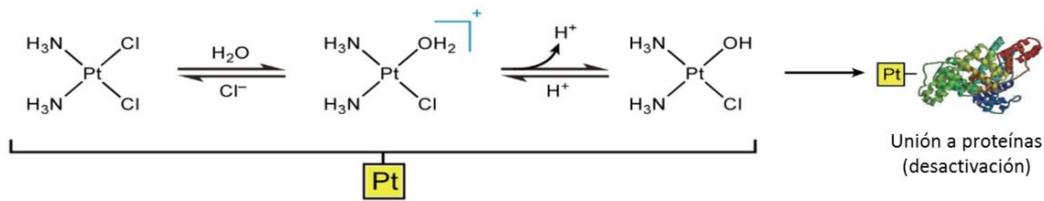


Figura 7. Comportamiento del cisplatino en el medio extracelular. Adaptado de Hall et al. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2008

En un primer momento, se pensaba que el cisplatino entraba en la célula solo por difusión pasiva. Sin embargo, hoy en día se sabe que también entra a través de mecanismos más complejos, mediante el uso de diferentes tipos de transportadores como los transportadores de cobre (CTR1) y de la bomba de sodio-potasio entre otros (Spreckelmeyer, Orvig, and Casini 2014; Dilruba and Kalayda 2016). Además, la absorción de cisplatino es dependiente de las propiedades biofísicas de las membranas celulares (Fig. 8) (Martinho et al. 2019).

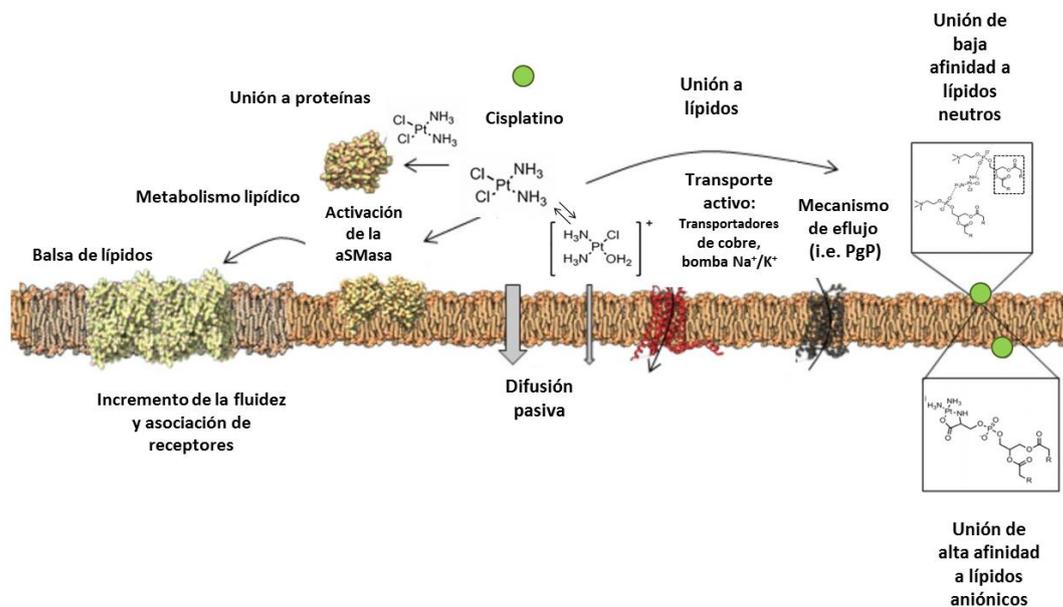


Figura 8. Interacción del cisplatino con la membrana celular y transporte al interior de la célula. Modificado de Martinho et al, *Frontiers in Physiology* 2019

El mecanismo de acción del cisplatino implica la formación de aductos covalentes en los que los ligandos de cloruro del fármaco son reemplazados por bases purínicas de ADN (Fig. 9). Los aductos inhiben la replicación y transcripción del ADN y activan el proceso de apoptosis. Al inhibir la síntesis de ADN en las células, los aductos de cisplatino-ADN ralentizan la división celular, con un efecto selectivo sobre las células tumorales que se dividen rápidamente. Además, el bloqueo de la transcripción y de la síntesis de ARN por los aductos de cisplatino-ADN también afecta selectivamente a las células tumorales que se dividen rápidamente (Yip et al. 2006). Los aductos formados con ADN nuclear (ADNn) eran considerados, hasta hace poco, los elementos primordiales que mediaban el efecto citotóxico del cisplatino.

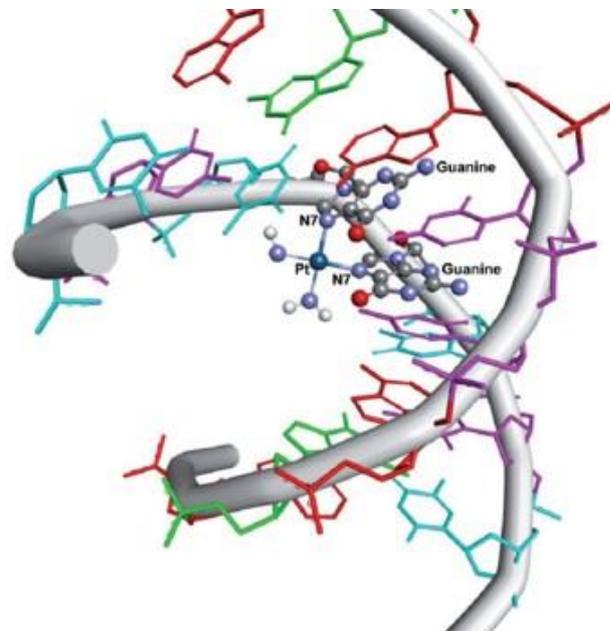


Figura 9. El CDDP forma aductos con el N7 de las bases de guanina. Garcia-Ramos et al. *J. Mex. Chem. Soc.*, 2013

Hay varias vías intracelulares que pueden reparar o resistir el daño del ADN. En particular, la reparación de la vía de escisión de nucleótidos (NER) desempeña un papel importante en la eliminación de aductos de cisplatino-ADN. Por tanto, las células con la actividad NER comprometida son extremadamente sensibles al cisplatino. Si no se repara el ADN, los aductos de ADN formados por cisplatino causan un bloqueo en la replicación y/o transcripción del ADN, lo que resulta en la activación de la apoptosis. Este mecanismo de muerte celular mediado por el daño al ADN explica la alta toxicidad del cisplatino en las células en división (Marullo et al. 2013). Es por ello que el cisplatino es más citotóxico durante la fase S (Wagner and Karnitz 2009). Sin embargo, la capacidad del cisplatino para inducir el daño del ADN *per se* no es suficiente para explicar su alto grado de efectividad, ni los efectos tóxicos ejercidos sobre los tejidos normales post-mitóticos (Marullo et al. 2013). De hecho, sólo aproximadamente el 1% del platino intracelular está unido al ADN nuclear, dejando la gran mayoría del fármaco disponible a nivel intracelular para interactuar con los sitios nucleofílicos de otras moléculas incluyendo, pero sin limitarse, fosfolípidos citosólicos, el citoesqueleto y proteínas de membrana, así como ARN y ADN mitocondrial (ADNmt) (Yang et al. 2006). Esto implica la existencia de diversos mecanismos de acción que incluyen la inducción de estrés oxidativo, la inducción de p53 y la detención del ciclo celular, la regulación negativa de protooncogenes y de proteínas antiapoptóticas, así como la activación de las vías intrínsecas y extrínsecas de la apoptosis (Cullen et al. 2007).

Algunos estudios apoyan la idea de que las mitocondrias pueden ser una diana del cisplatino y de sus análogos. Se ha demostrado que la sensibilidad del cisplatino está directamente correlacionada con la densidad mitocondrial (Cullen et al. 2007). De hecho, los aductos del cisplatino con ADNmt son significativamente más frecuentes

que los aductos con ADNn. Aunque el cisplatino se une al ADNmt tan eficientemente como el ADNn, es poco probable que estos se reparen debido a la ausencia de reparación NER en el ADNmt. En definitiva, aunque las interacciones del cisplatino con el ADNn pueden tener efectos celulares importantes que contribuyen a la apoptosis, los aductos del cisplatino con el ADNn no son necesarios para la inducción de apoptosis. Por tanto, las mitocondrias serían el objetivo principal y suficiente del cisplatino para ejercer sus efectos antitumorales (Yang et al. 2006). Además, en el 2013 ya se demostró que el aumento de los niveles de ROS inducido por el cisplatino, no se produce en respuesta a la señalización del daño del ADNn, sino que era causado por el daño directo a las mitocondrias (Marullo et al. 2013). La persistencia de los aductos de ADNmt no reparados interfiere con la transcripción del ADNmt, lo que resulta en una reducción de la síntesis de proteínas. La reducción de la expresión de los componentes codificados por el ADNmt de la cadena de transporte de electrones (ETC) inhibe la respiración mitocondrial aumentando la producción de ROS. Este aumento de ROS activa los procesos de muerte celular, lo que resulta en una mejora significativa del efecto citotóxico ejercido por el cisplatino (Fig. 10) (Plaimee et al. 2015; Choi et al. 2015). Además, se demostró que la formación de ROS dependía de la concentración y de la duración de la exposición al CDDP (Dasari and Tchounwou 2014). La contribución de la disfunción mitocondrial inducida por cisplatino varía entre las células y depende de diferentes parámetros como el estado REDOX mitocondrial, la integridad del ADNmt y la función bioenergética. Alterando estos parámetros celulares se podría mejorar la citotoxicidad del cisplatino en las células cancerosas (Marullo et al. 2013).

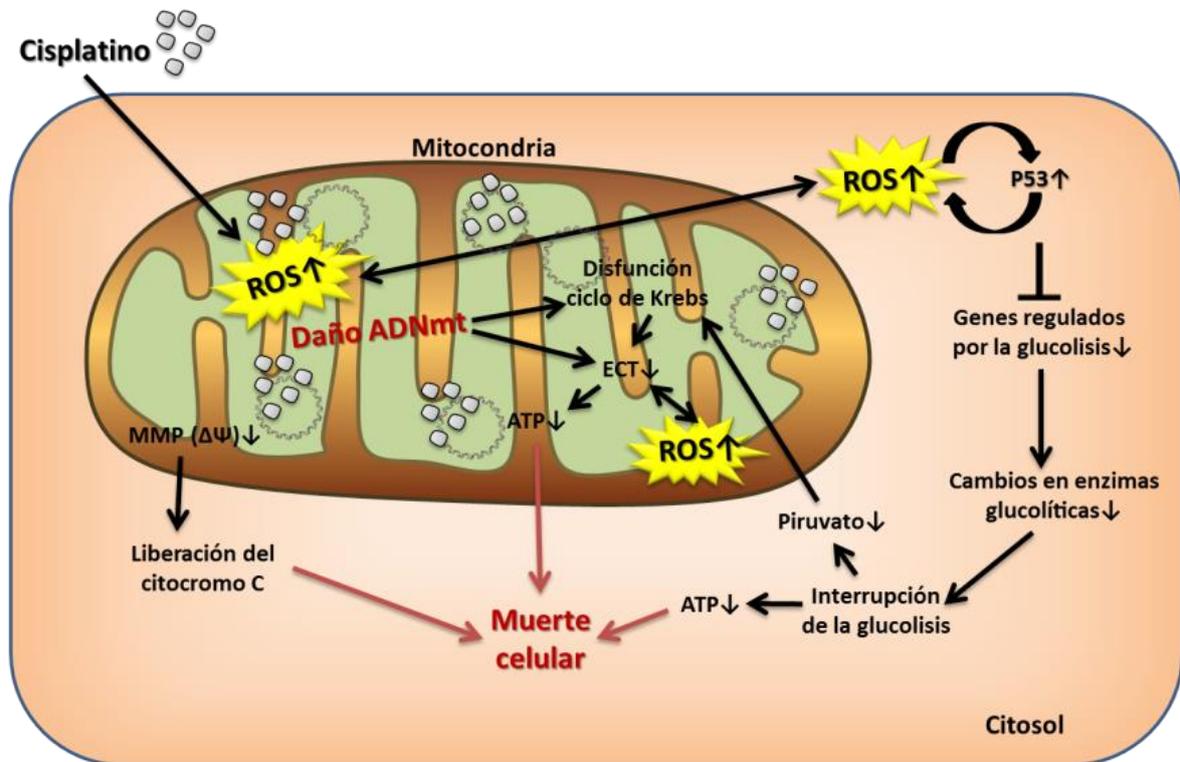


Figura 10. Mecanismo de acción del CDDP a nivel mitocondrial. Modificado de Choi et al. PONE, 2015

2.2.4. Quimiorresistencia y quimiosensibilización

La resistencia tumoral al cisplatino sigue siendo un reto importante para los pacientes con cáncer de células escamosas de cabeza y el cuello, a pesar de las nuevas técnicas quirúrgicas y de los nuevos protocolos de quimioterapia (Almeida et al. 2014).

La resistencia se produce cuando las células tumorales no responden al tratamiento. Cuando las células se vuelven resistentes al CDDP debe aumentarse la dosis, pero un aumento de dosis puede conducir a grave toxicidad multiorgánica (Florea and Büsselberg 2011).

Las dos formas principales de resistencia al cisplatino son:

- 1. La resistencia intrínseca:** células tumorales previamente no tratadas que son inherentemente insensibles al agente quimioterapéutico.
- 2. La resistencia adquirida:** las células tumorales tratadas se vuelven insensibles después de la exposición al fármaco (Yamano et al. 2010). Esta última, a pesar de que el cisplatino y la generación de anticancerígenos a base de platino han demostrado ser agentes quimioterapéuticos altamente eficaces para el tratamiento de diversos tipos de cánceres, sigue siendo uno de los principales factores limitantes en su aplicación clínica (Marques et al. 2015).

La quimiorresistencia adquirida es multifactorial, ya que implica factores del huésped, cambios genéticos y epigenéticos y numerosos eventos moleculares en la célula tumoral (Yamano et al. 2010), que pueden ser adquiridos durante los ciclos de tratamiento. Además, las células tumorales pueden eludir el tratamiento mediante el aumento de la inactivación del fármaco o eflujo, la interrupción de los genes supresores de tumores, la alteración de reparación del daño del ADN (DDR), y la activación de las vías de señalización mitogénica, de señalización *kappa* B (NFκB), que resultan en la reducción de la apoptosis (Almeida et al. 2014). La quimiorresistencia adquirida también puede deberse a la presencia en el citoplasma de compuestos que tengan preferencia por moléculas con carga positiva (nucleófilos) (Cullen et al. 2007). En particular, se sabe que los tioles endógenos, tales como el glutatión (GSH), interceptan compuestos del tipo CDDP debido a la alta reactividad de los ligandos de Pt(II) impidiendo que el agente metálico llegue al ADN en cantidades terapéuticamente significativas (Marques et al. 2015; Hu et al. 2017; L Galluzzi et al. 2014).

2.2.5. Efectos adversos y quimioprotección

La citotoxicidad no es inducida exclusivamente en las células cancerosas y, en consecuencia, el cisplatino desencadena una serie de efectos secundarios tales como toxicidad neurológica, renal, pérdida auditiva, vómitos y mielosupresión (Florea and Büsselberg 2011). La toxicidad del cisplatino no depende solamente de la cantidad de fármaco acumulado en los tejidos normales, sino también de otros factores. Estos datos sugieren que el bloqueo de la transcripción del ADNn no es el único mecanismo que determina el efecto tóxico del cisplatino. Por tanto, el daño en el ADNn provocado por el cisplatino no es suficiente para explicar la especificidad tisular de sus efectos citotóxicos en tejidos normales post-mitóticos (Marullo et al. 2013). Por ejemplo, una dosis terapéutica (40 mg/m^2) de cisplatino, comúnmente prescrita en el tratamiento de tumores, da como resultado nefrotoxicidad irreversible, siendo este el principal efecto adverso del cisplatino, que aparece entre el 20-30% de los pacientes (Karwasra et al. 2016). La nefrotoxicidad aguda es acumulativa y dosis-dependiente, y parece estar asociada con la lesión mitocondrial (Tacka et al. 2004). La disfunción mitocondrial aumenta la producción de ROS aumentando el estrés oxidativo. Esto se produce porque el cisplatino reacciona con el glutatión endógeno y lo agota o inactiva (Karwasra et al. 2016). El daño mitocondrial se estudia, cada vez más, como mediador de la toxicidad del cisplatino en tejidos normales. De hecho, la toxicidad gastrointestinal y la ototoxicidad también se atribuyen a los efectos mitocondriales del cisplatino (Yang et al. 2006; Marullo et al. 2013).

Por tanto, debido a la magnitud de los efectos tóxicos del cisplatino, resulta imprescindible identificar compuestos que aumenten la eficacia, reduzcan la toxicidad y eliminen la resistencia cruzada del cisplatino.

3. Melatonina

La melatonina (N-acetyl-5-methoxytryptamine, aMT) ha sido objeto de numerosos estudios desde su descubrimiento en 1958 por Aaron Lerner. Inicialmente se creía que se producía exclusivamente en la glándula pineal, relacionada con el control de los ritmos circadianos y circanuales. Sin embargo, las enzimas para su formación y sus derivados, así como sus receptores, se han encontrado en diversos órganos y tejidos y en muchos tipos celulares diferentes a concentraciones mucho mayores (rango micromolar) que la producida en la glándula pineal (rango pico/nanomolar) (Acuña-Castroviejo et al. 2014). Esta indolamina multifuncional no solo contribuye al control del ritmo circadiano, sino que también interviene en la modulación del sistema inmunitario, la prevención de la inflamación, la eliminación de radicales libres, la vasorregulación y, además, presenta propiedades oncostáticas (Nooshin et al. 2017). Son muchas las evidencias que sugieren roles pleiotrópicos de la melatonina en el mantenimiento de la salud. La reducción de los niveles de melatonina en la circulación, algunos polimorfismos en los genes de los receptores de la melatonina y la interrupción circadiana se asocian con numerosos trastornos fisiológicos y patológicos que incluyen el envejecimiento, el síndrome metabólico, la

diabetes tipo 2, enfermedades inmunes, la hipertensión, varios trastornos del estado de ánimo y cognitivos, así como el cáncer (Su et al. 2017).

3.1. Evolución

Filogenéticamente, la melatonina es una molécula muy antigua, ampliamente dispersa por los diferentes *taxa*. Está presente en bacterias, organismos eucariotas unicelulares, algas, plantas, hongos invertebrados y vertebrados (Fig. 11) (Carrillo-Vico et al. 2013). Esto sugiere una importante relación ancestral de esta indolamina con la fisiología y la bioquímica de las células (Pacini and Borziani 2016).

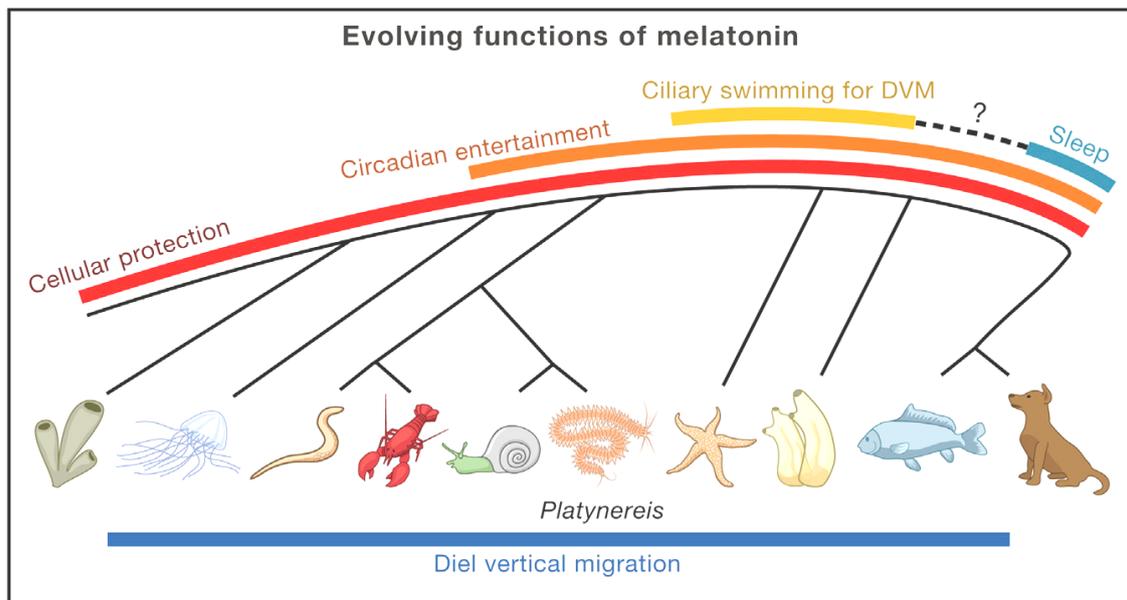


Figura 11. Evolución de las funciones de la melatonina (Schippers Cell, 2014).

Se piensa que, inicialmente, las células primitivas desarrollaron un mecanismo de defensa contra la generación de radicales libres inducida por los rayos UV, descomponiendo el triptófano, un aminoácido primitivo, en una serie de metabolitos con propiedades antioxidantes. Si estas células produjeran melatonina a una velocidad constante, sus concentraciones intracelulares probablemente disminuirían durante el

día debido a su actividad depuradora, ya que es cuando se recibe la mayor parte de la irradiación UV. Este podría ser el origen de los ritmos circadianos asociados con los cambios de concentración de melatonina a lo largo del día. Estas dos funciones, cronobiótica y de eliminación de radicales libres, se asociaron con la melatonina durante la evolución. Es probable que su eficacia en las adaptaciones del organismo al medio ambiente sea porque la melatonina actualmente cumple las mismas funciones y su estructura química no ha cambiado a lo largo de miles de millones de años de evolución (Acuña-Castroviejo et al. 2014). Por tanto, la función original y primaria de la melatonina probablemente esté relacionada con sus propiedades antioxidantes, mientras que otras funciones se han ido adquiriendo presumiblemente durante la evolución (Hevia et al. 2015). Este hecho estaría relacionado con la teoría endosimbiótica, según la cual las células eucariotas provienen del resultado de la fagocitosis de una bacteria por una Arquea que, una vez dentro de esta, establecerían relaciones simbióticas dando lugar a mitocondrias y cloroplastos (Sagan 1967). Estas bacterias producirían melatonina originariamente y, una vez fagocitadas, seguirían haciéndolo. Las células vegetales presentan contenidos más altos de melatonina que las células animales ya que tienen dos organelas productoras, cloroplastos y mitocondrias (Tan et al. 2013).

3.2. Estructura y biosíntesis:

La melatonina o N-acetil-5-metoxitriptamina es una indolamina que contiene un anillo indol sustituido con un grupo amino (Fig. 12).

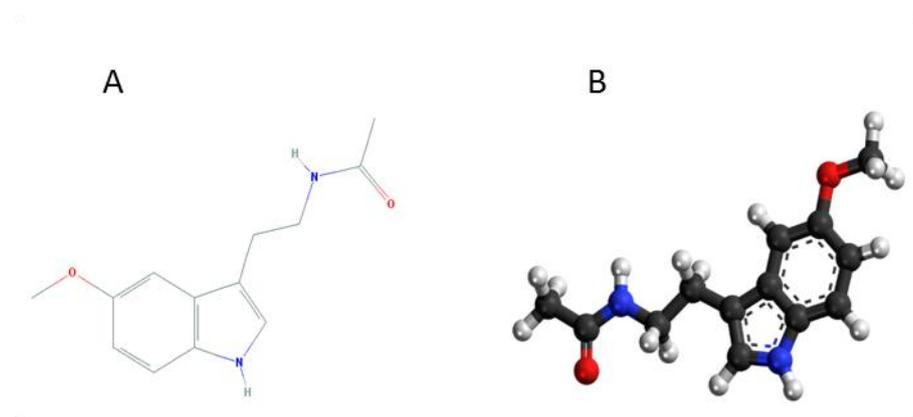


Figura 12. Estructura molecular bidimensional de la N-acetil-5-metoxitriptamina (PubChem CID= 896) [Oct. 6, 2017]. B. Estructura tridimensional del mismo compuesto

La melatonina se sintetiza a partir de triptófano. Este proceso ocurre en cuatro pasos: 1) primero el triptófano se hidroxila a 5-hidroxi-triptofano (5-HTP) mediante la triptófano-5-hidroxilasa (TPH). 2) Este producto es subsecuentemente descarboxilado a 5-hidroxitriptamina (serotonina o 5-HT) bajo la acción catalítica de la L-aminoácido aromático descarboxilasa (DOPA). 3) A continuación, la serotonina sufre una acetilación a través de la arilalquilamina N-acetiltransferasa (AANAT) resultando en N-acetilserotonina (NAS) que 4) es metilada por la acetilserotonina metiltransferasa (ASMT) para, finalmente dar lugar a la melatonina (Rath et al. 2016) (Fig. 13).

La actividad de la AANAT fue considerada durante años como la enzima limitante de la síntesis de melatonina, ya que presenta el mismo ritmo circadiano que la melatonina y su actividad se inhibe con la luz. Sin embargo, posteriormente se demostró que esta función le correspondía a la ASMT ya que la producción de melatonina no se ve afectada en gran medida por las variaciones en la actividad de la AANAT (Chattoraj et al. 2009).

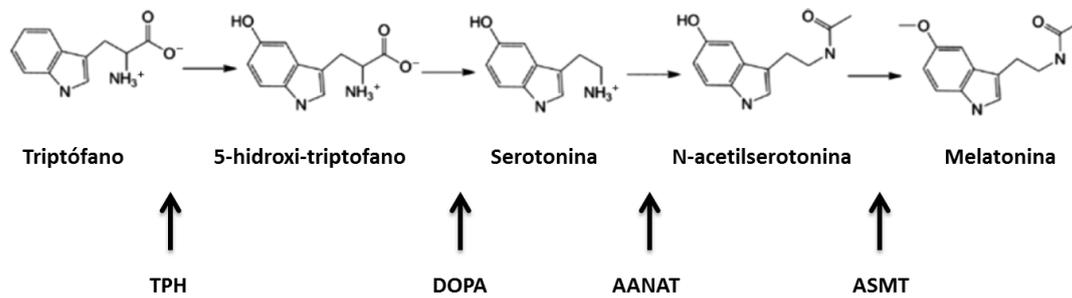


Figura 13. Proceso de síntesis de la melatonina

Una vez sintetizada, la melatonina pineal sale a la circulación y se distribuye por todo el organismo, siendo su nivel en plasma dependiente de los ritmos circadianos y, además, un indicador de la actividad pineal (R. J. Reiter 1991). Por el contrario, la melatonina sintetizada en otros órganos (extra-pineal) no sale al torrente sanguíneo, permanece en el interior de la célula y no depende de los ritmos circadianos (Venegas et al. 2012; Acuña-Castroviejo et al. 2014).

3.3. Mecanismo de acción

La melatonina es una molécula anfipática que, una vez en el plasma, se une rápidamente a la albúmina (Nooshinfar et al. 2017). La vida media de la melatonina endógena en el suero es de 30 a 60 minutos. Sin embargo, la vida media de la melatonina exógena es más corta y varía de 12 a 48 minutos (Maitra et al. 2019). Las propiedades fisicoquímicas de la melatonina permiten su paso a través de todas las barreras morfofisiológicas, incluidas las membranas celulares y la barrera hematoencefálica (Acuña-Castroviejo et al. 2014).

Los efectos de la melatonina a nivel celular están mediados por dos vías principales, e incluyen efectos mediados por receptor e independientes de receptor (Maitra et al. 2019).

3.3.1. Receptores de membrana

Los receptores de la melatonina incluyen sitios de unión a la membrana acoplados a proteínas reguladoras de la unión de nucleótidos de guanina (proteína G). Se han descrito dos tipos de receptores de membrana de melatonina, Mel 1a y Mel 1b, también conocidos como MT1 y MT2 (Acuña-Castroviejo et al. 2014) cuya activación, tras la unión del ligando, inhibe la formación de 3', 5'-monofosfato de adenosina cíclica (AMPC) (Santoro et al. 2013), conduciendo a una variedad de respuestas celulares que incluyen la regulación de las funciones reproductivas y el control de los ritmos circadianos entre otras (Hevia et al. 2015). Inicialmente caracterizados a nivel del sistema nervioso central, los receptores de membrana de melatonina se han localizado en todos los órganos y tipos de células, aunque el receptor MT2 parece estar más limitado al cerebro. Estos receptores pueden aparecer como homodímeros o dimerizados (Di Bella et al. 2013).

Además, también se ha descrito el receptor MT3, que aparece asociado a la quinona-reductasa 2 y cuyo perfil farmacológico es totalmente diferente a los receptores mencionados anteriormente. Este receptor no está acoplado a proteínas G y, a diferencia de MT1 y MT2, tiene una baja afinidad por la yodo-melatonina. Se ha sugerido que la acción inhibidora de la melatonina sobre este receptor podría estar relacionada con sus efectos terapéuticos a dosis farmacológicas (> 500 μ M) en muchas patologías, pero este hecho todavía está siendo estudiado. Se considera un receptor

de membrana ya que la quinona-reductasa 2 tiene una región de unión a dicha membrana (Slominski et al. 2012; Boutin and Ferry 2019; Pariente et al. 2017).

3.3.2. Receptores nucleares

La melatonina puede mediar sus acciones a través de los receptores nucleares ROR/RZR (receptores huérfanos retinoides/receptores retinoides Z). Las subfamilias de estos receptores que se unen a la melatonina incluyen: RZR α , ROR α , ROR α 2 y RZR β . La estructura de los receptores nucleares consiste en un dominio N-terminal, un dominio de unión al ADN que contiene un doble dedo de zinc, una región bisagra y un dominio de unión a ligando incluido en el C-terminal. Los grupos de receptores nucleares se distribuyen de acuerdo con su subtipo, encontrándose el receptor RZR β en tejidos neuronales y el RZR α en tejido adiposo, piel, testículos, cartílago e hígado (Slominski et al. 2012). Los efectos inmunomoduladores de la melatonina y algunas de sus acciones circadianas están mediados a través de estas interacciones nucleares (Su et al. 2017).

3.3.3. Interacciones citoplasmáticas

A nivel citosólico, la melatonina interactúa con diversas proteínas citosólicas como: la calmodulina, modulando la actividad del enzima fosfodiesterasa y, por tanto, las señales intracelulares del calcio (G. Benítez-King, Huerto-Delgadillo, and Antón-Tay 1993; Su et al. 2017); la calreticulina (Macías et al. 2003); la tubulina (Cardinali and Freire 1975); y la proteína quinasa C (Gloria Benítez-King et al. 1996). Todas estas proteínas participan en el metabolismo del calcio, así como en la modulación de la estructura del citoesqueleto (G. Benítez-King and Antón-Tay 1993; Benitez-King 2006).

3.3.4. Interacción con radicales libres

La melatonina es un potente regulador del estrés oxidativo que ejerce su función de diferentes maneras:

1. Efecto antioxidante directo: la melatonina depura tanto los ROS como las especies reactivas de nitrógeno (RNS), incluidos el HO^\bullet , H_2O_2 , O_2^- , el oxígeno singlete ($\text{O}_2:$), el anión de peroxinitrito (ONOO^-) y el óxido nítrico (NO^\bullet). Los productos resultantes de estas reacciones son la 3-hidroximetilatonina cíclica (C-3HOM), así como otros metabolitos de melatonina hidroxilados como el N1-acetil-N2-formil-5-metoxinuramina (AFMK) y el N-acetil-5-metoxi-knuramina (AMK). Algunos de estos metabolitos, como el AMK y el AFMK, son más potentes que la propia melatonina en cuanto a su capacidad para eliminar radicales libres (Fig. 14). Se estima que a través de la reacción en cascada una molécula de melatonina puede eliminar hasta 10 radicales libres, y esto contrasta con los efectos de los antioxidantes clásicos que depuran un radical por molécula de antioxidante (Tan et al. 2015).

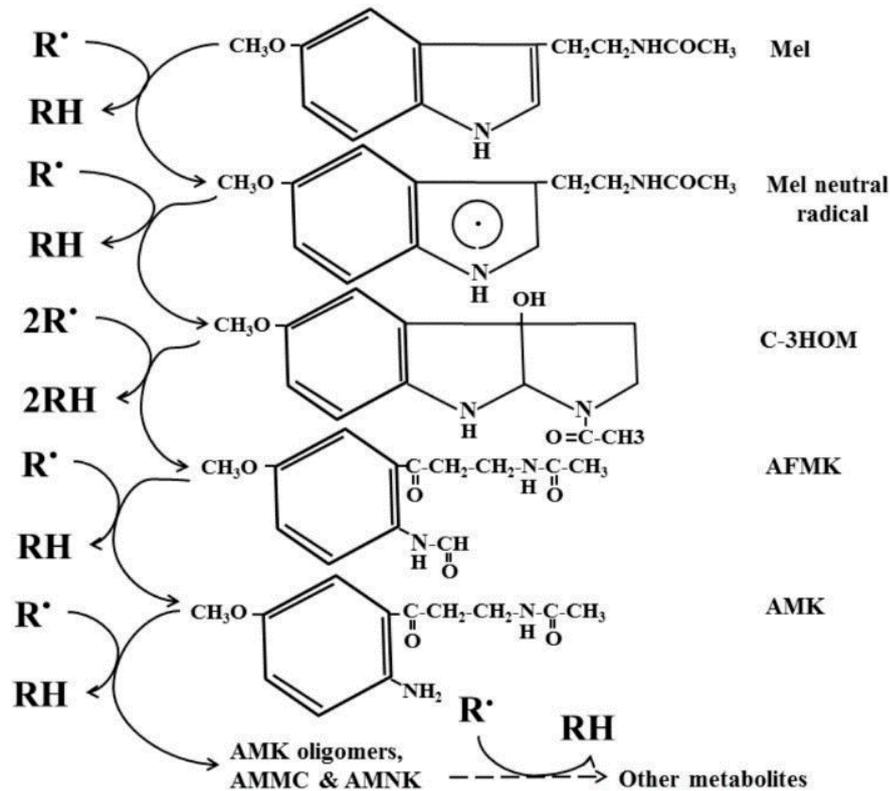


Figura 14. Reacción en cascada de la interacción de la melatonina con radicales libres y sus metabolitos. (Tan et al. *Molecules*, 2015)

Además, la melatonina interactúa con las bicapas lipídicas de las membranas celulares en base a la naturaleza anfipática del anillo del indol y de los grupos metoxi o N-acetilo (Hevia et al. 2015), limitando la peroxidación lipídica en las membranas. En la membrana interna de la mitocondria, este efecto favorece el flujo de electrones y la producción de ATP (Su et al. 2017).

2. Efecto antioxidante indirecto: la melatonina también tiene efectos antioxidantes de forma indirecta induciendo la expresión y actividad de los enzimas antioxidantes incluyendo la glutatión peroxidasa (GPx) y la reductasa (GRd), la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT) y la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G-6-PDH), así como la gammaglutamylcisteína sintasa, la enzima limitante de la

velocidad en la síntesis del glutatión (GSH), aumentando el contenido celular de GSH (Tan et al. 2015).

3. Efecto prooxidante: la melatonina presenta un efecto dual. La melatonina es un potente antioxidante y, sin embargo, en determinados casos puede producir un aumento del estrés oxidativo. La mayoría de estas situaciones ocurren en células dañadas o tumorales. Dependiendo del tipo celular, del estado REDOX y de otros factores aún desconocidos, la melatonina induce la producción de ROS (Zhang and Zhang 2014; Bizzarri et al. 2013). Este efecto dual de la melatonina serviría para controlar la supervivencia de la célula y podría explicar sus propiedades oncostáticas, promoviendo en última instancia una respuesta proapoptótica para eliminar células que, de lo contrario, son potencialmente peligrosas para el organismo (Acuña-Castroviejo et al. 2014).

3.3.5. Interacción con la mitocondria

Las mitocondrias y los cloroplastos son la principal fuente de radicales libres en los organismos vivos, ya que se generan continuamente durante la respiración celular o la fotosíntesis (Hevia et al. 2015). Debido a esto, estos orgánulos requieren una fuerte protección contra los radicales libres y el estrés oxidativo asociado. Por tanto, la melatonina podría ser la molécula crítica para preservar la integridad y la fisiología tanto mitocondrial como cloroplástica. De hecho, tal y como se venía pensando desde hace algunos años, Suofu y colaboradores (2017) han descrito la síntesis de melatonina en la mitocondria, que sería liberada al citoplasma mediante el transportador de alta afinidad MT1 localizado en la membrana mitocondrial externa (OMM) (Suofu et al. 2017), lo que encajaría con la teoría endosimbiótica. Por otra parte, gracias a las características de la melatonina (lipofílica e hidrofílica), esta puede penetrar fácilmente

en las células, llegar hasta el citosol y alcanzar el núcleo y las mitocondrias, donde alcanza concentraciones elevadas (Venegas et al. 2012).

Por tanto, la melatonina es un excelente protector mitocondrial y regula todas las funciones bioenergéticas mitocondriales, tanto *in vivo* como *in vitro*. A nivel mitocondrial, la melatonina ejerce diferentes roles, entre los que se incluyen (1) protección frente al estrés oxidativo mitocondrial e inhibición de la apoptosis; (2) aumento de la eficiencia de la producción de ATP mediante la aceleración del flujo de electrones a través de la ETC debido al incremento de las actividades de los complejos I, III y V; a su vez, permite el mantenimiento de un potencial de membrana óptimo a través de la membrana mitocondrial interna mediante la regulación del poro de transición de permeabilidad mitocondrial (PTPm) y (3) mediante la protección del ADNmt (Tan et al. 2016; Martin et al. 2002).

1. Protección frente al estrés oxidativo mitocondrial e inhibición de la apoptosis: los ROS producidos por la ETC mitocondrial constituyen un factor clave en la muerte celular y diferenciación inducida por la melatonina. El exceso de ROS contribuye a que se desencadene la permeabilización de la membrana externa mitocondrial (MOMP) que está controlada principalmente por proteínas de la familia Bcl-2, mediadores de la apoptosis intrínseca. Estudios previos han observado que la melatonina altera el equilibrio entre Bax y Bcl-2 en algunas células cancerosas regulando positivamente la expresión de Bax, resultando en la liberación del citocromo c al citosol. Sin embargo, en otras células cancerosas, la melatonina induce una disminución en Bcl-2. En dichas células, la disminución observada de la proliferación celular se debería a una acción citotóxica en lugar de una acción citostática de la melatonina (Loureiro et al. 2015).

2. Aumento de la eficiencia de la producción de ATP: en condiciones normales, la melatonina activa el PTPm y reduce levemente el potencial de membrana mitocondrial. En condiciones de estrés oxidativo que dañan la función del PTPm, la melatonina inhibe significativamente el PTPm y, por tanto, preserva el potencial de membrana para evitar el colapso mitocondrial. La melatonina actúa equilibrando el potencial de la membrana mitocondrial y manteniendo la función óptima de las mitocondrias para generar ATP tanto en condiciones favorables como desfavorables (Tan et al. 2013). Asimismo, la melatonina actúa activando las proteínas desacoplantes (UCP) que disipan protones a través de la membrana interna de las mitocondrias para producir calor, resultando en una reducción moderada del potencial de la membrana interna. Esta disminución relativa del potencial de membrana provoca un aumento significativo de las actividades de los complejos I y III, y acelera el transporte de electrones a través de la ETC. Estos cambios disminuyen la fuga de electrones de la ETC y reducen la formación de radicales libres. Además, esta regulación de la termogénesis puede reducir la producción de calor y producir un uso más eficiente de los sustratos en términos de producción de ATP (Tan et al. 2016; Tan et al. 2013).

3. Protección del ADNmt: la melatonina actúa evitando la degradación oxidativa del ADNmt. También produce una reducción de los transcritos del ADNmt en varios tejidos, incluidos el hígado, el corazón, el músculo esquelético y el cerebro (Perez-Gonzalez et al. 2018).

En resumen, la melatonina preserva las funciones fisiológicas de las mitocondrias tanto en condiciones normales como en condiciones estresantes.

3.4. Melatonina y cáncer

Desde mediados del siglo pasado, incluso antes de aislar la melatonina por primera vez, varios autores (Sander and Schmid 1952b; Sander and Schmid 1952a; Kitay and Altschule 1954; Engel and Fischl 1954) describieron los efectos beneficiosos de la inyección de extractos de la pineal en pacientes neoplásicos. Trabajos en años posteriores, como el de Drexler en 1957 (Drexler, Meaney, and McCormack 1957), describían la relación entre la disfunción pineal y la incidencia de cáncer de mama o un peor pronóstico en ratas pinealectomizadas, tal como describe Rodin en 1963 (Pacini and Borziani 2016; Nooshinfar et al. 2017; Sabzichi et al. 2016).

Estos efectos antitumorales de la melatonina se observan a muchos niveles diferentes. Por ejemplo, se ha descrito una relación entre un aumento en la incidencia de algunos tipos de tumores y las alteraciones de los ritmos circadianos en profesionales que realizan trabajos a turnos, así como una disminución en los niveles de melatonina en pacientes con cáncer (Rodriguez et al. 2013). Por otro lado, numerosos trabajos demuestran los efectos oncostáticos de la melatonina (Ma et al. 2016; Shen et al. 2018; Cheng et al. 2018; Sakatani, Sonohara, and Goel 2018; Sung et al. 2019). A nivel clínico se ha demostrado que la melatonina, como suplementación oral en pacientes con diversos tipos de cánceres avanzado y tumores metastásicos, mejora la tasa de supervivencia a un año y la tasa de regresión tumoral en comparación con aquellos pacientes que solo recibieron quimioterapia. A estos efectos se suma la mejora de los efectos secundarios (Lissoni et al. 1999).

3.4.1. Mecanismo de acción:

A pesar de todo lo descrito previamente, las vías implicadas en el mecanismo antitumoral todavía permanecen poco claras. No obstante, los posibles mecanismos que podrían explicar los efectos oncostáticos de la melatonina, son casi tan numerosos como tipos de tumores existen. Esto podría indicar que lo que se está viendo es solo un epifenómeno del mecanismo subyacente. Estos mecanismos incluyen acciones antiproliferativas, estimulación de la inmunidad contra el cáncer, modulación de la expresión de oncogenes, efectos antiinflamatorios, antioxidantes, antiangiogénicos y antimetastáticos (Colombo et al. 2016). A continuación, se clasifican algunos de los mecanismos implicados en los efectos antitumorales de la melatonina:

1. Interacción a nivel genético, epigenético y cromosómico: se ha descrito un posible vínculo de la melatonina con algunos cambios epigenéticos como son la modulación de la expresión y reclutamiento de las histonas deacetilasas (HDAC), sobreexpresadas en las células tumorales (Korkmaz, Rosales-Corral, and Reiter 2012); o mediante la inhibición de las sirtuinas. Además, Martín y colaboradores (2013) demostraron un efecto claro de la melatonina en la metilación de los transportadores dependientes de ATP (transportadores ABC, por sus siglas en inglés *ATP-binding cassette*), cuya sobreexpresión está relacionada con la quimiorresistencia (Martín et al. 2013). También se ha demostrado que la melatonina inhibe la actividad de la telomerasa (Leon-Blanco et al. 2003).

2. Modulación del ciclo celular y apoptosis: la melatonina tiene el potencial de inducir la detención del ciclo celular en G1. También se ha visto que la melatonina aumenta la diferenciación celular tanto en células madre neurales (Mendivil-Perez et al. 2017), como en células cancerosas (Su et al. 2017). Por otro lado, la melatonina

induce apoptosis alterando la relación Bax/Bcl2. De esta forma aumenta la liberación del citocromo c hacia el citosol y se activan las caspasas, aunque la sensibilidad de las células tumorales a la melatonina varía entre las distintas líneas celulares (neoplasias hematopoyéticas, leucemia, linfoma, mama, etc.). La inducción de la muerte celular programada podría estar relacionada con la inhibición de la fosfoinositol 3-quinasa (PI3K), el factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NFκB) y la inducción de la vía p53 (Sánchez-Hidalgo et al. 2012; Nooshinfar et al. 2017; Shen et al. 2018; Ortiz et al. 2015).

3. Orgánulos celulares, membranas y transportadores: la melatonina también actúa despolarizando la membrana mitocondrial, y regulando los niveles de calcio intracelular (Koşar et al. 2016), así como inhibiendo la absorción de ácidos grasos implicados en la proliferación tumoral (como el ácido linoleico) (Mills et al. 2005). Por otra parte, la activación de la respuesta al daño del ADN dependiente de p53 por parte de la melatonina, está mediada por los receptores de membrana MT1 y MT2. Cuando la melatonina se une a estos receptores de membrana, se activa la cascada de reacciones de fosforilación. Se activa p38 a través de las proteínas G que conduce a la activación de p53 (Santoro et al. 2013). Sin embargo, otros estudios muestran que es probable que los efectos de la melatonina en las células tumorales sean independientes de estos receptores, ya que MT1 y MT2 tienen valores de constante de disociación para la melatonina en el rango picomolar y nanomolar respectivamente, mientras que se requieren concentraciones mucho más altas de melatonina para los efectos antiproliferativos y proapoptóticos (milimolar). Los efectos de la melatonina independientes de los receptores de membrana incluyen los efectos sobre RORα/RORβ, alteración del equilibrio REDOX, modulación de la calmodulina y/o

inhibición de la actividad NFκB (Sánchez-Hidalgo et al. 2012). El receptor MT3 también podría estar implicado en estos mecanismos (Pariente et al. 2017).

4. *Modificación de la matriz extracelular (ECM):* la melatonina suprime las metástasis tumorales a través de la regulación de la adhesión celular, la remodelación de la ECM, la reorganización del citoesqueleto, la transición epitelio-mesénquima (EMT) y la angiogénesis a nivel molecular, celular y orgánico (Su et al. 2017). La hipoxia del tumor es una causa esencial de angiogénesis. Algunos autores han demostrado que una concentración farmacológica de melatonina puede inhibir la angiogénesis directa o indirectamente, al inhibir la proliferación de células endoteliales vasculares y actuar en la inhibición de factores pro-angiogénicos. En condiciones de hipoxia, la melatonina inhibe la actividad transcripcional del Factor Inducible de Hipoxia 1 (HIF-1), lo que resulta en la supresión de la expresión del Factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), un potente mitógeno de células endoteliales (Jardim-Perassi et al. 2014; Liu and Reiter 2016). Otros grupos han descrito que la melatonina también reduce la migración y la invasividad de las células tumorales en diversos cánceres como el glioblastoma, el de pulmón, mama o hepatocarcinoma. Este efecto podría ocurrir mediante un mecanismo molecular que implica el aumento de la expresión del inhibidor de la metaloproteinasa TIMP 1 y la disminución de la expresión y de la actividad de la metaloproteinasa MMP 9, a través de la inhibición de NFκB (Colombo et al. 2016).

5. *Regulación del metabolismo tumoral:* la habilidad de la melatonina para regular la función mitocondrial tiene implicaciones en el comportamiento metabólico de las células cancerosas, altamente glucolíticas, perturbando el efecto Warburg y

cambiando el destino de la célula tumoral (de Almeida Chuffa et al. 2018; Proietti et al. 2017).

6. Regulación del estado REDOX celular: tal y como se ha mencionado en el apartado 4.3.4, la melatonina ejerce un efecto modulador del estado REDOX intracelular en las células tumorales.

7. Modulación de la respuesta inmune: La melatonina estimula la respuesta de los linfocitos T CD4+ (Th) mediante la estimulación de la producción de interleuquinas (IL) como la IL-2, IL-6, IL-12 y del interferón gamma (INF- γ) (Srinivasan et al. 2011). Además, la melatonina aumenta el número y la actividad de las células *natural killer* (NK) que tienen un importante papel en la inmuno-vigilancia antitumoral (Talib 2018).

3.4.2. Melatonina como coadyuvante de la radio y de la quimioterapia

En diferentes tipos de tumores, se ha descrito que la melatonina aumenta la citotoxicidad de varios agentes quimioterapéuticos como la doxorrubicina, el tamoxifeno, cisplatino, etopósido, temozolamida o TNF. Por ejemplo, en tumor pancreático AR42J de rata se observa un efecto sinérgico cuando se combina la melatonina con 5-fluorouracilo (5-FU), el cisplatino y la doxorrubicina. También hay estudios en cáncer de colon o cáncer de células escamosas esofágicas en combinación con 5-FU (Gao et al. 2017), o en glioblastoma con TRAIL (Martín et al. 2013). Estos efectos también se han observado en la línea tumoral A549 de cáncer de pulmón cuando la melatonina se usa con irinotecán (Ma et al. 2016). En nuestro Grupo hemos descrito el efecto sinérgico de la melatonina con la rapamicina en las células HNSCC (Shen et al. 2018). Por otra parte, también se ha descrito un efecto sensibilizador de la

melatonina en tratamientos con radioterapia en distintos tipos de tumores como, por ejemplo, en el cáncer de mama (Alonso-González et al. 2016).

3.4.3. Dosis y efecto oncostático

La melatonina es una molécula totalmente segura. Una reducción en los niveles fisiológicos de melatonina endógena a lo largo de la vida parece causar mayores perjuicios al organismo que su exceso o uso a largo plazo (Acuña-Castroviejo et al. 2014). Las concentraciones fisiológicas en humanos varían entre 1 nM, correspondientes al pico nocturno y 10 pM, correspondientes a los valores séricos diurnos (Jardim-Perassi et al. 2014). Sin embargo, los niveles fisiológicos de la melatonina extrapineal en los diferentes tejidos, órganos o células son considerablemente más altos que en el suero. En organismos unicelulares, los niveles fisiológicos de melatonina llegan a alcanzar un rango milimolar (Tan et al. 2016). En cuanto a las dosis utilizadas, en estudios con voluntarios humanos, la administración oral de 1 a 300 mg o incluso de 1 gramo de melatonina al día durante 30 días no produjo efectos secundarios negativos observables (Ma et al. 2016). En animales, las dosis varían significativamente entre los diferentes estudios. La LD50 (dosis letal para el 50% de los sujetos) no ha podido ser establecida incluso a dosis elevadísimas (800mg/kg) (Malhotra, Sawhney, and Pandhi 2004). Algunos estudios, aunque pocos, detectan pérdida de peso, letargo o descenso de la temperatura corporal a altas dosis. Sin embargo, en la mayoría de los estudios no se observa ningún tipo de efecto indeseable (Jardim-Perassi et al. 2014; Zeman, Buyse, and Decuypere 2001).

Los efectos antitumorales de la melatonina en los diferentes modelos experimentales de cáncer se han estudiado principalmente con las concentraciones fisiológicas de melatonina plasmática, dentro del rango nanomolar. Sin embargo, la

concentración de melatonina necesaria para inhibir el crecimiento celular, en algunos tipos de tumores, es mucho más alta que las concentraciones fisiológicas de la sangre (Bizzarri et al. 2013). Dichas concentraciones varían del rango de micromolar a milimolar, y algunos autores se refieren a ellas como concentraciones "farmacológicas", ya que son más altas que las concentraciones plasmáticas (Rodríguez et al. 2013). La melatonina ejercería efectos oncostáticos a concentraciones fisiológicas (10^{-11} - 10^{-9} M) y efectos citotóxicos a concentraciones farmacológicas (10^{-8} - 10^{-3} M), tanto *in vitro* como *in vivo* (Kim, Jeong, and Kim 2014; Pacini and Borziani 2016). Es decir, si bien las concentraciones bajas o altas de melatonina pueden detener la proliferación de células tumorales, la citotoxicidad se observa exclusivamente a altas concentraciones del indol. El tipo de efecto y su potencia, sin embargo, depende en gran medida del tipo de célula y de tumor (Rodríguez et al. 2013). Por ejemplo, algunas líneas celulares cancerosas presentan poca o ninguna sensibilidad a los niveles bajos de melatonina, mientras que las mismas células responden a concentraciones más altas del indol reduciendo sus tasas de proliferación y encontrándose efectos apoptóticos en rangos milimolares (Bizzarri et al. 2013).

3.4.4. Melatonina como molécula protectora de los tejidos sanos:

Como ya se ha mencionado en el apartado anterior, la melatonina tiene pocos efectos secundarios relevantes incluso cuando se administran altas concentraciones de esta molécula en animales o humanos. Por el contrario, muchos estudios han descrito la capacidad de la melatonina para reducir los efectos secundarios de los fármacos quimioterapéuticos en animales y en pacientes. Recientemente, en nuestro Grupo de Investigación se ha descrito que un gel de melatonina a alta concentración previene y cura la mucositis radio o quimio inducida (Ortiz et al. 2015; Fernandez-Gil et al. 2017).

Por tanto, era esencial analizar los efectos de las altas dosis de melatonina sobre las células tumorales tratadas. Además, en otros estudios la combinación de melatonina con fármacos citotóxicos aumenta la citotoxicidad del tratamiento en células cancerosas (por ejemplo, células tumorales de sarcoma de Ewing) (El-Missiry et al. 2007), lo que abriría numerosas posibilidades en la aplicación del gel, permitiendo el uso de dosis más bajas del fármaco citotóxico y minimizando, por tanto, los efectos secundarios de los protocolos actualmente utilizados en el tratamiento del cáncer.

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hoy en día, el cáncer de cabeza y cuello representa un gran reto para la terapia oncológica, presentando anualmente un elevado número de nuevos casos. La resistencia a la radio y a la quimioterapia es uno de los grandes problemas que presentan este tipo de tumores, reduciendo la efectividad de los tratamientos y afectando directamente a la supervivencia de los pacientes. Otro gran problema es la aparición de efectos secundarios ligados a estos tratamientos, lo que empeora la calidad de vida de los pacientes y limita el aumento de la dosis para contrarrestar la resistencia. El estándar de tratamiento que incluye CDDP y RT basa su efectividad en el incremento del daño oxidativo. Sin embargo, además de la resistencia a los tratamientos, otro de los grandes inconvenientes es el daño celular de tejidos sanos.

Las mitocondrias juegan un papel fundamental en la resistencia de las células tumorales a los tratamientos oncostáticos ya que ocupan una posición primordial en la regulación de las vías apoptóticas, pero también son fuente de ATP y son las mayores productoras de ROS intracelular. Por todo ello, las mitocondrias son unas perfectas dianas terapéuticas.

Por otro lado, la melatonina tiene una variedad de propiedades biológicas que incluyen actividad antiinflamatoria y antioxidante, así como mecanismos de regulación del sistema inmunológico. Además, la melatonina también tiene efectos oncostáticos, aunque los mecanismos involucrados siguen sin estar claros. Nuestros estudios previos muestran que la melatonina aumenta los efectos citotóxicos de la rapamicina en las células HNSCC. Sin embargo, existen pocos datos sobre el mecanismo dual de la melatonina para aumentar la citotoxicidad en las células tumorales inducido por la quimio y la radioterapia y, al mismo tiempo, proteger las células normales de los tejidos sanos.

Además, tenemos que tener en cuenta que la melatonina regula la actividad mitocondrial y es un excelente protector frente al estrés oxidativo, propiedades que podrían ser contradictorias con sus efectos oncostáticos. Sin embargo, resultados previos de nuestro Grupo de Investigación demostraron que un aumento de la función mitocondrial estaba relacionado con un aumento de la diferenciación celular en células madre neurales.

Atendiendo a todo lo expuesto anteriormente, nuestra hipótesis de trabajo es que la melatonina podría mejorar los efectos antitumorales de la irradiación y del CDDP en las células tumorales de cáncer de cabeza y cuello HNSCC mediante un aumento de la actividad mitocondrial, induciendo un cambio en el metabolismo bioenergético de la célula, resultando en un aumento de estrés oxidativo y, por tanto, de diferenciación celular. A su vez, un aumento de la función mitocondrial estaría relacionado con una activación de los procesos de muerte celular. En consecuencia, un aumento de metabolismo aeróbico podría estar directamente involucrado en los mecanismos que mejoran los efectos citotóxicos de estos tratamientos en las células HNSCC.

Para comprobar nuestra hipótesis nos planteamos los siguientes objetivos:

1. Evaluar la capacidad de la melatonina para potenciar los efectos citotóxicos de la irradiación y del cisplatino en las células tumorales HNSCC.
2. Evaluar el efecto de la melatonina en la función mitocondrial de las células HNSCC tratadas con irradiación o con cisplatino.
3. Analizar la influencia de la melatonina sobre el estado REDOX en las células HNSCC tratadas con irradiación o con cisplatino.

4. Analizar la relación entre los niveles de melatonina y su efecto oncostático
5. Determinar el efecto protector de la melatonina en tejidos sanos tras el tratamiento con irradiación y cisplatino.

III. Material y Métodos

1. *Ensayos in vitro*

1.1 Células y tratamientos

Para los ensayos in vitro, se utilizaron células escamosas de carcinoma humano de lengua (HNSCC). Las líneas celulares HNSCC, Cal-27 y SCC-9, se obtuvieron del American Type Culture Collection (ATCC® CRL2095™ y CRL1629™ respectivamente) en el Banco de células del Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada. Las células estaban criopreservadas en nitrógeno líquido con DMSO al 5% en FBS.

El stock de melatonina (aMT) (Fagron Ibérica S.A.U., 33457-24, Terrasa, España) se preparó al 15% de propilen-glicol (PG, 24414.296, VWR) en tampón fosfato salino (PBS) y se filtró (0.2 µm, Sartorius Biotech GmbH, Gottingen, Germany) para garantizar su esterilidad.

El cisplatino (CDDP), (1134357, USP Reference Standards, Rockville, Alemania) se disolvió en PBS (1 mg/mL), se filtró y se conservó a 4° C protegido de la luz durante un máximo de 3 días desde su preparación.

Para irradiar las células se utilizó un irradiador gamma Cs-137 a una tasa de dosis de 2Gy/min a temperatura ambiente.

1.1.1 Cultivos celulares

Las células Cal-27 se cultivaron en un medio con alto contenido en glucosa *Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, high glucose, GlutaMAX™ Supplement*, Fisher Scientific, 41965039, Madrid, España) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS, Fisher Scientific, 16000044, Madrid, España) y con un 2% de solución de antibiótico/antimicótico (15240-062, LifeTechnologies).

Las células SCC-9 se cultivaron en *medio DMEM-F12 Nutrient Mixture Ham medium (1:1)* (DMEM/F-12, Fisher Scientific, 11320033, Madrid, España) con L-glutamina 2 mM (Fisher Scientific, 25030081, Madrid, España) y piruvato sódico 0.5 mM suplementado con 10% de FBS, hidrocortisona 0.4 µg/mL (Sigma Aldrich, H6909, Madrid, España) y antibiótico-antimicótico al 2%.

Las células se mantuvieron en un incubador a 37°C en presencia de 5% de CO₂ y con 95% de humedad. Se les cambió el medio cada 2-3 días hasta alcanzar una confluencia del 70-80%. En ese momento, se las privó de suero y se mantuvieron en este medio (sin suero) 24 horas antes de realizar los tratamientos.

1.1.2 Tratamiento con melatonina, CDDP e irradiación

Las células se trataron con diferentes concentraciones de melatonina (100, 500, 1000 o 1500 µM). Tras 48 horas, las células se irradiaron a una dosis de 8 Gy o se trataron con cisplatino 10 µM durante 5 horas. En ese momento, el medio de cultivo se reemplazó por medio de cultivo fresco y las células se trataron de nuevo con melatonina. Los experimentos se realizaron 48 horas después de la irradiación o del tratamiento con cisplatino (Fig. 15).

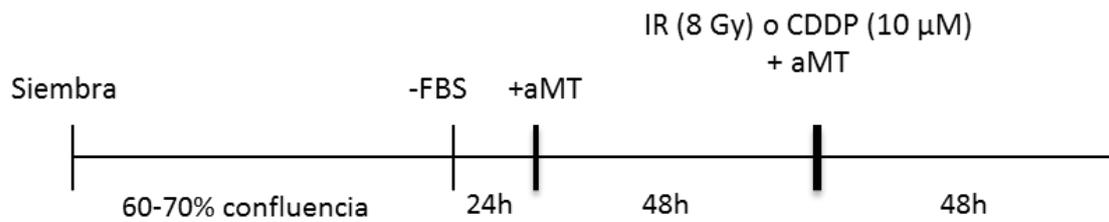


Figura 15. Esquema del tratamiento con IR, CDDP y aMT

1.2 Ensayo de clonogenicidad

El ensayo de clonogenicidad o de formación de colonias se utiliza desde hace varias décadas para analizar los efectos de la radiación y de la quimioterapia.

1.2.1 Fundamento

Es un método que se realiza *in vitro* para evaluar si una célula es capaz de dividirse y formar una colonia tras haber sido expuesta a un tratamiento con agentes citotóxicos (Franken et al. 2006).

1.2.2 Método

Se sembraron las células procedentes de un cultivo stock en placas de 6 pocillos a una densidad de 800 y 1000 células por pocillo para Cal-27 y SCC-9 respectivamente, y se dejaron durante toda la noche para que se adhiriesen. Las células se trataron entonces con diferentes concentraciones de melatonina. Tras 48 horas, las células fueron irradiadas o tratadas con CDDP. Tras el tratamiento, se les cambió el medio y se trataron de nuevo con melatonina. Las colonias se dejaron crecer durante 2 semanas para formar colonias de al menos 50 células cada una, realizando el tratamiento de melatonina cada 48 horas durante este tiempo. Finalmente, las colonias se fijaron con etanol absoluto y se tiñeron con cristal violeta. El recuento de los clones se realizó con

el software *Image J* (Schneider, Rasband, and Eliceiri 2012) tras haber tomado fotos de cada pocillo.

1.3 Ensayo de proliferación celular

Se llevó a cabo un ensayo múltiple con 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (*Vybrant® MTT Cell Proliferation Assay Kit*, V13154, LifeTechnologies, Madrid, España) siguiendo el protocolo del fabricante.

1.3.1 Fundamento

El ensayo de MTT es un método colorimétrico basado en la capacidad de las células viables para reducir la sal de tetrazolio (amarilla y soluble) a cristales de formazano (púrpuras e insolubles) gracias a las deshidrogenasas mitocondriales presentes en las células vivas (Fig.16).

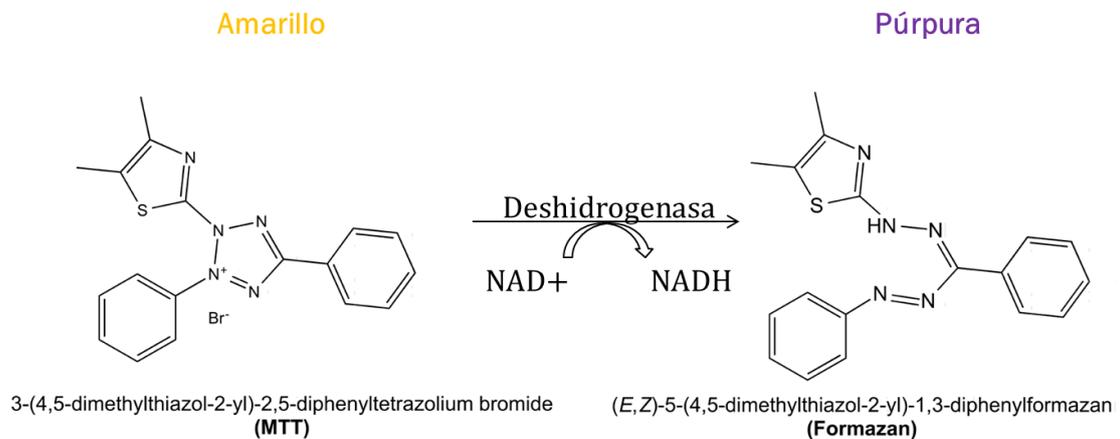


Figura 16. Estructura química del MTT y su producto tras ser metabolizado por las deshidrogenasas en las mitocondrias de las células vivas

1.3.2 Método

Las células se sembraron por triplicado en placas de 96 pocillos a una densidad de 10 000 células por pocillo. El tratamiento se realizó tal y como se describe en el

apartado 1.1.2. Para llevar a cabo el experimento, el día del ensayo se sustituyó el medio de las células por DMEM sin rojo fenol (Gibco LifeTechnologies, 21063-029) y las células se incubaron durante 4 horas con MTT a una concentración de 1,2 mM a 37° C y protegido de la luz. A continuación, se añadió SDS-HCl 50mg/ml, mezclando pocillo a pocillo con una pipeta. Las células se incubaron otras 4 horas a 37° C y, finalizado este tiempo, se procedió a leer la absorbancia a 570 nm en un espectrofotómetro de placas (*Power Wave X-1*, Bio-tek Instruments, VT, Estados Unidos).

1.4 Análisis de la apoptosis

La apoptosis es un proceso de muerte celular programada. Se analizó con un kit de Anexina V-FICT/PI (*Apoptosis detection kit FITC*, Immunostep, ANXVKF-100T, Salamanca, España), siguiendo las instrucciones del fabricante.

1.4.1 Fundamento

Una de las maneras de detectar la apoptosis en estadios tempranos es comprobar la localización de la fosfatidilserina en la membrana plasmática. La fosfatidilserina es un tipo de fosfolípido que en las células viables se mantiene en la monocapa interior de la membrana celular. Cuando se empieza a desencadenar el proceso de la apoptosis, la fosfatidilserina se transloca a la capa externa de dicha membrana por medio de flipasas, ofreciendo un mecanismo de reconocimiento para las células fagocíticas (Vermes et al. 1995; Bratton et al. 1997; Zhivotosky and Orrenius 2001; Elmore 2007). Esta localización puede ser detectada fácilmente ya que la Anexina V se une específicamente a la fosfatidilserina en una reacción dependiente de calcio. Las moléculas de Anexina V se marcan con diferentes fluoróforos como isotiocianato de fluoresceína (FITC). Las muestras son analizadas en el citómetro

brindando una cuantificación objetiva y rápida. En estadios tardíos de apoptosis, cuando la membrana plasmática ha perdido su integridad y el ADN se hace accesible, se emplean moléculas fluorescentes que actúan como agentes intercalantes en los ácidos nucleicos de doble cadena (y, por tanto, en el ADN) como el Ioduro de propidio (PI) (Fig. 17). Con los datos de ambas moléculas se pueden clasificar las células en células no apoptóticas (anexina V-FICT negativo/IP negativo), células en apoptosis temprana (anexina V-FICT positivo / IP negativo) y células necróticas (anexina V-FICT positivo/IP positivo) (Pozarowski et al. 2003; Zhivotosky and Orrenius 2001; Mukhopadhyay et al. 2007; Gasser, Hehl, and Millward 2009).

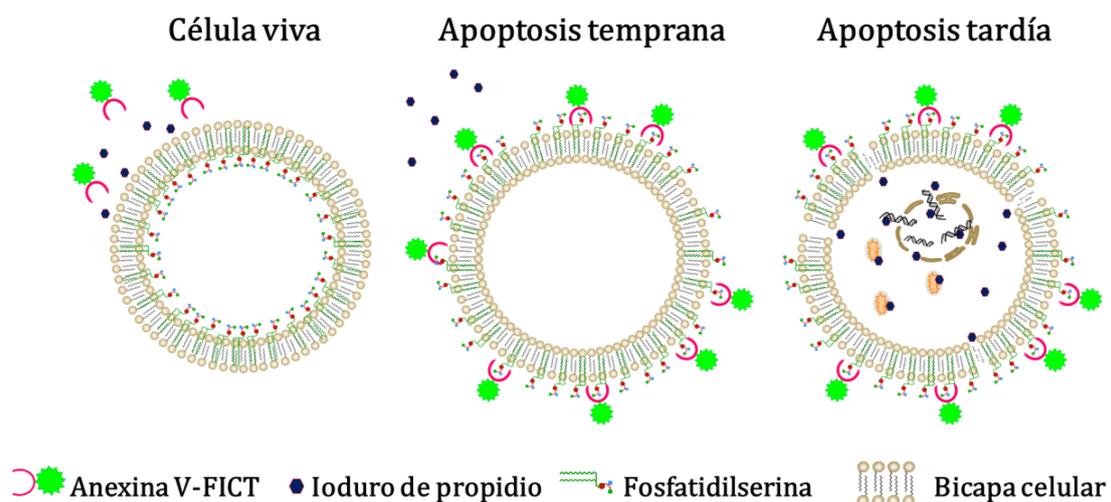


Figura 17. Detección de la apoptosis mediante Anexina V-FICT/IP

1.4.2 Método

Las células Cal-27 se trataron como se describe en el apartado 1.1.2. El día del experimento, se recogieron las células (incluyendo las muertas) y se lavaron dos veces con PBS a 37^o C. A continuación, las células se resuspendieron en 100 μ L del tampón

de unión a Anexina 1X. Se añadieron 5 μ L de Anexina V-FITC y 5 μ L de PI, y las muestras se incubaron 15 min a temperatura ambiente y protegidas de la luz. Finalmente, se añadió 400 μ L de tampón de unión a Anexina 1X. Las células se analizaron por citometría de flujo en un citómetro Becton Dickinson FACSCanto II (Madrid, España) en el CIC de la Universidad de Granada. Los controles correspondientes para determinar la compensación del citómetro de flujo y los cuadrantes se incluyeron en el ensayo (células no marcadas, células marcadas solo con Anexina V y células marcadas solo con PI).

1.5 Determinación de la concentración de proteínas

La cantidad de proteína se determinó mediante el método de Bradford (Bradford 1976).

1.5.1 Fundamento

En condiciones adecuadas, los grupos ácidos o básicos de las proteínas pueden interactuar con grupos orgánicos de determinados colorantes para dar lugar a precipitados con un color característico. Para el ensayo de Bradford se utiliza el colorante Coomassie Brilliant Blue G250. Se basa en la conversión de la forma leuco del colorante (marrón-naranja) a una de color intensamente azul cuando los grupos aniónicos del colorante interactúan con los grupos amino de las proteínas. Dicha reacción se mide por absorbancia a 595 nm. Existe una relación lineal dentro de determinadas concentraciones de proteínas. Es un método muy rápido, barato y sensible y se puede trabajar en un rango de 1 a 25 microgramos para un volumen de 1 ml. Interfieren en el ensayo detergentes y las soluciones alcalinas.

1.5.2 Método

Se preparó una recta patrón con BSA (albúmina de suero bovino) como estándar, a concentraciones crecientes comprendidas entre 0,05 - 0,6 mg/ml. Cada punto de la curva y cada muestra se midieron por duplicado en placas de 96 pocillos, donde se añadieron 200 µl de reactivo de Bradford (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) y 10 µl de cada una de las concentraciones de la curva patrón, así como de cada una de las muestras. La mezcla se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente, en suave agitación y protegida de la luz para favorecer la reacción. La medida de absorbancia se llevó a cabo en un espectrofotómetro de placas (*Power Wave X-1*, Bio-tek Instruments, VT, Estados Unidos) a una longitud de onda de 595 nm, expresándose los resultados como mg de proteína/ml.

1.6 Western Blot

El Western Blot es una técnica analítica, ampliamente utilizada, para el estudio de proteínas.

1.6.1 Fundamento

Este método, descrito por primera vez por Towbin, y colaboradores en 1979 (Towbin, H. et. al. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. PNAS, 1979), permite la detección de una sola proteína dentro de una muestra biológica. La especificidad del Western Blot se logra mediante la utilización de un anticuerpo que reconoce y se une a un epítipo único de la proteína de interés. Con la técnica de Western Blot se puede estimar el tamaño de una proteína, confirmar la presencia de modificaciones post-traduccionales como la fosforilación, y ser utilizado para comparar

cuantitativamente los niveles de proteína entre muestras (Advansta. Analisis de proteínas: Electroforesis, transferencia e inmunodetección. 2011). Esta técnica consta de los siguientes pasos, resumidos en la figura 18: preparación de las muestras,



separación de las proteínas, transferencia y detección.

Figura 18. Diagrama de flujo de Western Blot.

1.6.2 Método

En primer lugar, se extrajeron las proteínas de cada muestra sonicando los pellets en 60 μ L de un tampón de homogenización compuesto por Tris-HCl pH7.6 50 mM, DTT 7.7mg/mL, coctel de inhibidores antiproteasas y antifosfatas 100X y EDTA 100X. A continuación, se centrifugó a 3000 *rpm* durante 20 min a 4°C. Se separó una alícuota del sobrenadante para cuantificar las proteínas y el resto se transfirió a un nuevo tubo, al que se le añadió tampón de carga Laemmli (Tris-HCl 10mM, SDS 10%, 2-mercaptoethanol 20%, glicerol 20%, bromofenol azul 0.004%), y se desnaturalizó a 99°C durante 10 min. Entonces se alicuotó, y las alícuotas se conservaron a -80°C hasta su uso. Tras extraer las proteínas de los pellets de las células, se prepararon los extractos a las concentraciones adecuadas y se separaron en geles de poliacrilamida al 7,5 o 12,5% en función del peso molecular de la proteína de interés (*PhastGel homogeneous gels*, GE healthcare life, Barcelona, España). Una vez concluida la electroforesis se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (*HybondTM-ECLTM nitrocellulose membranes*, GE healthcare life, Barcelona, España) usando en ambos casos el *PhastSystem* (GE healthcare life, Barcelona, España) (Fig. 19).



Figura 19. PhastSystem, GE healthcare.

Entonces las membranas se incubaron en tampón de bloqueo (5% BSA en PBS con 0.1% Tween 20) y posteriormente se incubaron durante toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario diluido en tampón de bloqueo. Tras los lavados pertinentes, se incubó durante una hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario correspondiente. En este estudio se utilizaron los anticuerpos primarios incluidos en la tabla 1.

Tabla 1 Relación de anticuerpos primarios para Western Blot.

Anticuerpo	Concentración	Referencia
Bax	1:200	sc-526 Santa Cruz Biotechnology
Bcl2	1:200	sc-492 Santa Cruz Biotechnology
Atg12 (C6)	1:100	sc-271688, Santa Cruz Biotechnology
Nix	1:1000	N0399 Sima Aldrich
GAPDH	1:500	sc-25778 Santa Cruz Biotechnology

Los anticuerpos secundarios conjugados con HRP se utilizaron según las instrucciones del fabricante y se describen en la tabla 2:

Tabla 2 Relación de anticuerpos secundarios para Western Blot

Anticuerpo	Concentración	Referencia
Goat anti-mouse IgG-HRP	1:1000	#554002 BD Biosciences Pharmigen
Mouse anti-goat IgG-HRP	1:1000	sc-2354 Santa Cruz Biotechnology

La interacción proteína-anticuerpo se detectó por quimioluminiscencia usando el reactivo *ECLTM Prime Western Blotting Detection Reagent* (Ge Healthcare Life Sciences, UK) siguiendo las instrucciones del fabricante. La imagen se digitalizó con el equipo de imagen *Kodak Image Station 2000R* (Eastman Kodak Company, Rochester, New York, USA) y se cuantificaron las bandas mediante el uso del software *Image J*. La intensidad de las bandas obtenidas en la detección de las proteínas de interés se normalizó con respecto a GAPDH y los datos se expresaron en relación al grupo control.

1.7 Respiración mitocondrial

La tasa de consumo de oxígeno (OCR) se midió con el equipo *XF24 Extracellular Flux Analyzer* (Seahorse Bioscience, Copenhagen, Dinamarca), mediante un sistema no invasivo que nos permitió determinar la bioenergética mitocondrial de las células *in vivo*.

1.7.1 Fundamento

El oxígeno consumido por la célula puede ser utilizado a nivel mitocondrial, lo que conocemos como respiración mitocondrial o puede ser consumido sin la participación de la mitocondria, conocido como respiración no-mitocondrial. El consumo de oxígeno no mitocondrial puede tener varios orígenes, como los peroxisomas o la actividad oxidasa de la NADPH de la membrana plasmática. En lo relativo a la respiración mitocondrial, parte del oxígeno que consume la mitocondria es usado para la producción de ATP, a través de la ATP-sintasa y parte es usado para mantener el gradiente de protones entre la membrana mitocondrial interna y la matriz mitocondrial (*Proton Leak*), como se muestra en la figura 20.

Respiración mitocondrial

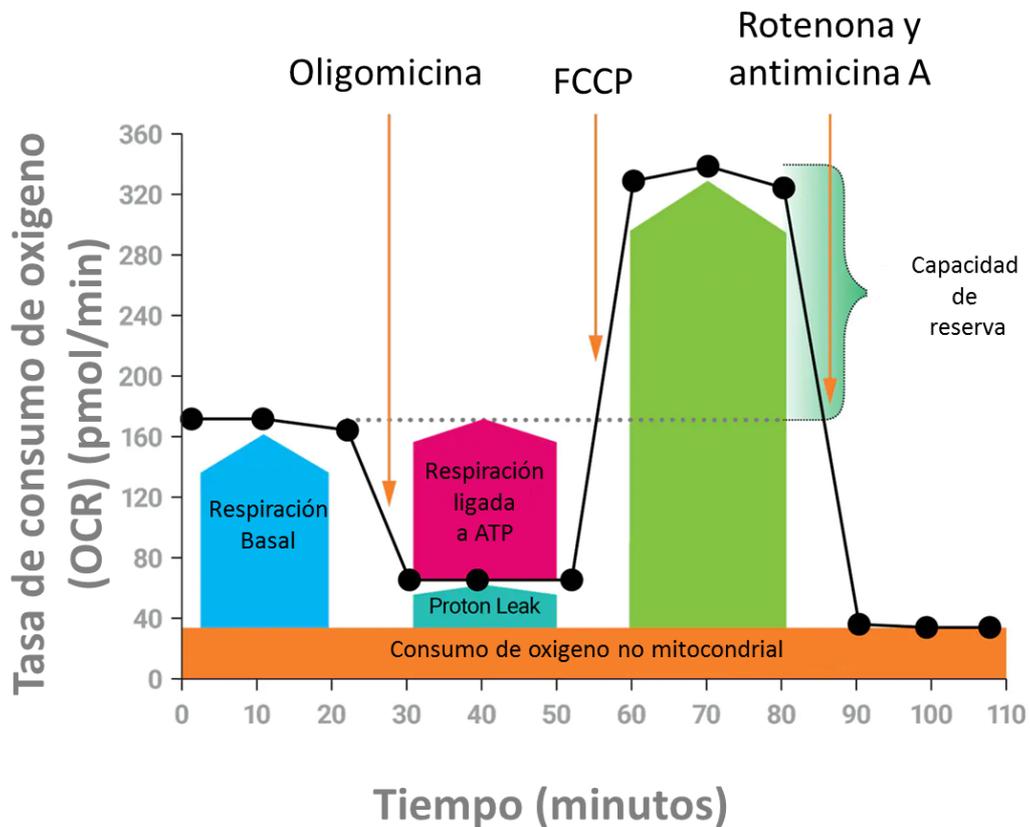


Figura 20. Esquema representativo del diseño experimental usado en los experimentos de respiración. Se muestran los parámetros fundamentales de la función mitocondrial: respiración basal, producción de ATP, escape de protones, respiración máxima y respiración no mitocondrial (Adaptado de Agilent Seahorse).

Para medir los diferentes aspectos relacionados con la bioenergética mitocondrial se tienen en cuenta los siguientes parámetros: en primer lugar, se determina el consumo basal de oxígeno sin la adición de ningún compuesto; en segundo lugar, se mide el escape de protones (*proton leak*), es decir, el consumo de oxígeno mitocondrial independiente de la fosforilación oxidativa, para lo que se inyecta oligomicina, que inhibe al complejo V mitocondrial (ATP-sintasa). A partir de

esta medida de escape de protones se estima la producción de ATP, como el porcentaje de la respiración mitocondrial basal que no es destinado al mantenimiento de dicho escape de protones. A continuación, se determina la máxima capacidad respiratoria o capacidad del sistema de transferencia de electrones (*electron transfer system capacity*, ETS), para lo que se añade un desacoplante de la fosforilación oxidativa, carbonilcianuro-p-trifluorometoxifenilhidrazona (FCCP). Por último, se determina el consumo de oxígeno no dependiente de la mitocondria, para lo que se inyectan en el pocillo antimicina A y rotenona, inhibidores del complejo III y complejo I respectivamente (Fig. 21).

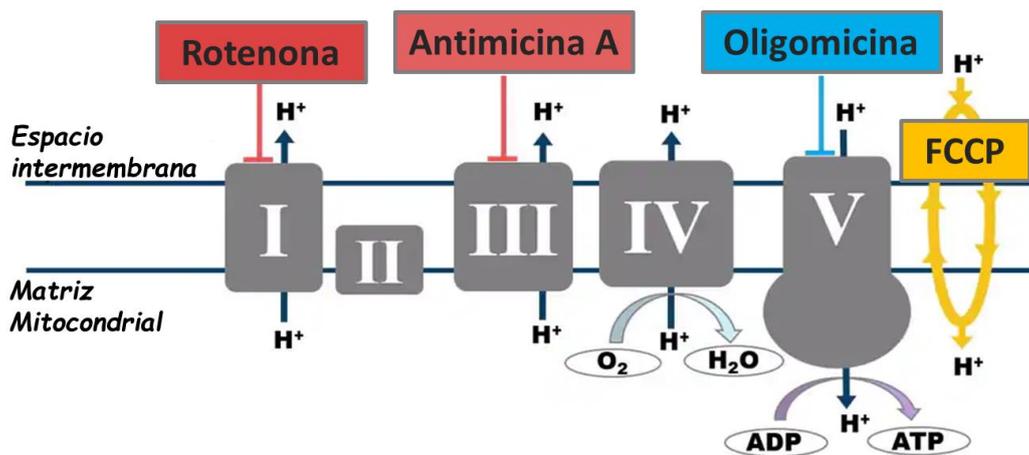


Figura 21. Diagrama representativo de la ETC y sus inhibidores (Adaptado de Agilent Seahorse).

1.7.2 Método

El día antes del experimento, las células se sembraron en una placa de 24 pocillos a una densidad de 80 000 células por pocillo para Cal-27, excepto en los pocillos destinados a las correcciones internas del *Seahorse*. A continuación, se deja

que se adhirieran durante la toda noche en 250 μ L del medio de cultivo descrito en el apartado 1.1.1. Antes del ensayo, el medio se cambió a Medio Base (Seahorse Bioscience, 102353-100, N.Billerica, MA, USA) complementado con glucosa 10 mM, piruvato 5 mM y glutamina 2 mM. Las células se dejaron durante 1 hora a 37°C sin CO₂.

Para el análisis de la respiración mitocondrial *in vivo* en las células Cal-27, en primer lugar, se realizaron 3 medidas consecutivas del consumo basal de oxígeno. A continuación, se inyectaron los diferentes inhibidores en el siguiente orden y concentración:

- 1. Puerto A:** 75 μ l de 8 μ M oligomicina para una concentración final en el pocillo de 1 μ M.
- 2. Puerto B:** 75 μ l de 4,5 μ M FCCP para una concentración final en el pocillo de 0,5 μ M.
- 3. Puerto C:** 75 μ l de 5 μ M FCCP para una concentración final en el pocillo de 0,5 μ M.
- 4. Puerto D:** 75 μ l de 11 μ M antimicina A y 11 μ M rotenona para una concentración final en el pocillo de 1 μ M.

Las medidas realizadas se expresan como tasa de oxígeno consumido (OCR, in pmol O₂/min/número de células).

1.8 Determinación de la masa mitocondrial

Para medir la masa mitocondrial se utilizó la sonda fluorescente 10-N-nonil naranja de acridina (NAO, Fisher Scientific, A1372, Madrid, España).

1.8.1 Fundamento

La NAO se une específicamente a la cardiolipina, un componente esencial de la membrana mitocondrial interna, independientemente del potencial de membrana (Maftah et al. 1989). Su acumulación está relacionada con el aumento de la masa mitocondrial

1.8.2 Método

Las células, tratadas como se describió anteriormente, se sembraron 24 horas antes del día del ensayo. Después de reemplazar el medio de cultivo por medio sin rojo de fenol (DMEM, alto contenido de glucosa, HEPES, sin rojo de fenol, 21063-029, LifeTechnologies), las células se incubaron 30 min con NAO 2,5 μ M a 37°C. La fluorescencia se leyó con un lector de fluorescencia de microplacas FLx800 (Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, VT, EE. UU.) A 485 nm de excitación y 530 nm de emisión.

1.9 Cuantificación del ADN mitocondrial

El número de copias relativo de ADN mitocondrial se cuantificó por PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR) relacionando el producto de amplificación de un fragmento de un gen mitocondrial (12 S) con respecto a un fragmento del gen nuclear (18 S).

1.9.1 Fundamento

Los sistemas de RT-qPCR se caracterizan por detectar la amplificación de la secuencia diana a medida que se produce, en lugar de medir la cantidad de producto de PCR generado tras un número determinado de ciclos. Actualmente, la RT-qPCR es uno de los métodos más sensibles para detectar y cuantificar los ácidos nucleicos. Aun teniendo una cantidad muy pequeña, el sistema garantiza una alta sensibilidad,

especificidad y eficiencia. Se utiliza, entre otras aplicaciones, para cuantificar cambios muy pequeños en la expresión génica mediante la detección de los niveles del ARNm procedente de células o tejidos.

Para el desarrollo de técnicas de PCR en tiempo real se pueden emplear moléculas fluorescentes específicas de secuencia (sondas Taqman, sondas FRET, etc) o intercaladores fluorescentes no específicos de secuencia, como SYBR® Green, que es una molécula que se une al surco menor del ADN pero no al ADN de cadena sencilla, y permite cuantificar la producción de amplicón generado (Marín de la Torre 2007).

1.9.2 Método

El ADN celular total de las células Cal-27 tratadas se aisló con fenol-cloroformo. La PCR se llevó a cabo en un termociclador Stratagene Mx3005P qPCR System (Agilent Technologies, Santa Clara, California) usando cebadores y una sonda complementaria a las secuencias del gen nuclear 18S (TaqMan Gene Expression Assays Hs99999901_s1, Applied Biosystems, Foster City, California). Los siguientes *primers forward* (5'CCACGGGAAACAGCAGTGATT3') y *reverse* (5'CTATTGACTTGGGTTAATCGTGTG A3'), y la sonda de ADN mitocondrial (12S RNA Oligo 5'TGCCAGCCACCGCG3'), todos ellos de Eurofins Fisher Scientific (Pittsburgh, Pensilvania) se utilizaron para la amplificación del contenido en ADN mitocondrial. Para la amplificación del ADN, las reacciones se llevaron a cabo de la forma siguiente: 5 minutos de desnaturalización a 95 °C seguida de 40 ciclos consistentes en 1 segundo a 95 °C, 5 segundos a 65°C y 6 segundos a 72°C (Fig.22).

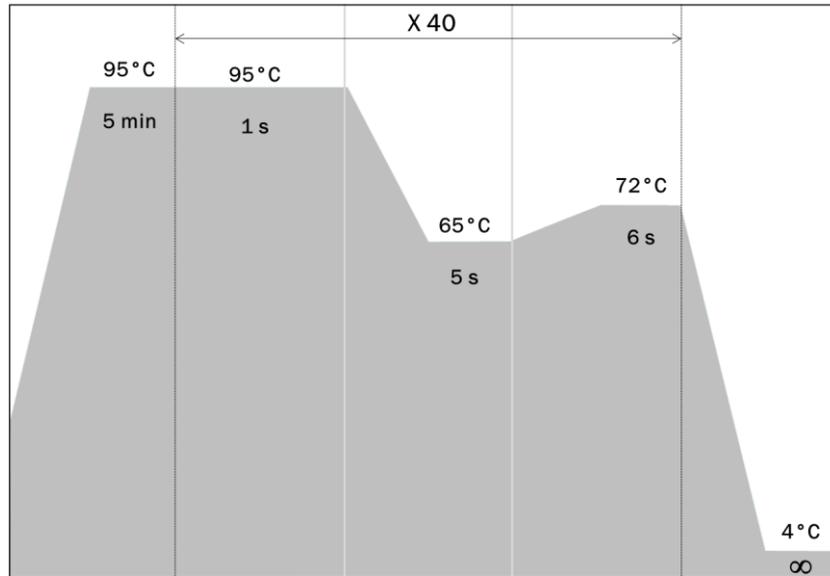


Figura 22. Condiciones de tiempo y temperaturas de la RT-q PCR.

1.10 Medida de la producción de ROS

La producción de radicales libres en las células se midió usando la sonda 2',7'-diclorohidrofluoresceína diacetato (DCFH-DA, D6883, Sigma-Aldrich, Madrid, España), mediante el método descrito por Wang y Joseph (Wang and Joseph 1999).

1.10.1 Fundamento

Este método se basa en la fluorescencia emitida por la 2', 7' diclorodihidrofluoresceína (DCFH) al oxidarse a 2', 7' diclorofluoresceína (DCF). El DCFH es un derivado de la fluoresceína incoloro y no fluorescente. La membrana celular es impermeable al DCFH debido a la polaridad de este compuesto. Sin embargo, su éster de diacetato (DCFH-DA), cuando se adiciona al medio extracelular, difunde pasivamente al interior de la célula donde sus dos grupos acetato son eliminados por las esterasas intracelulares dando lugar al DCFH, que queda atrapado en el interior de

la célula. La subsiguiente oxidación de esta molécula por los ROS intracelulares da lugar al producto altamente fluorescente DCF (Fig. 23).

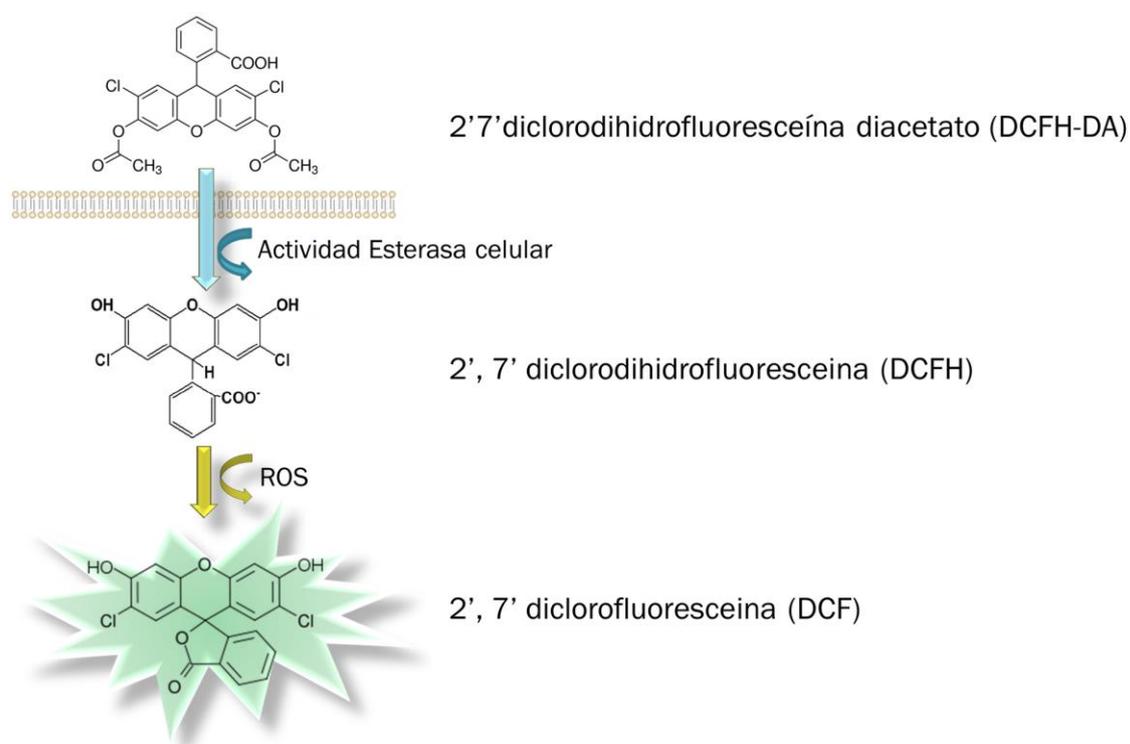


Figura 23. Fundamento del método de la sonda 2'7'diclorohidrofluoresceína diacetato para medir radicales libres.

1.10.2 Método

Las células, tratadas como se ha descrito previamente, se sembraron en placas de 96 pocillos a una densidad de 10 000 células por pocillo la tarde previa al experimento. Entonces, las células se incubaron con DCFH-DA 100 μ M en medio de cultivo sin rojo fenol durante 30 minutos a 37°C y lavadas posteriormente con PBS. Se añadió tampón bicarbonato Krebs-Ringer y los niveles de ROS se midieron en un espectrofluorímetro para microplacas FLx800 (*Power Wave X-1*, Bio-tek Instruments, VT, Estados Unidos) durante 45 minutos cada 5 minutos a 485 nm de excitación y 530 nm de emisión.

1.11 Medida de los niveles de glutatión y de glutatión disulfido

Los niveles de glutatión (GSH) y de glutatión disulfido (GSSG) se midieron utilizando un método fluorométrico establecido (Hissin and Hilf 1976) con ligeras modificaciones (Acuña-Castroviejo et al. 2012).

1.11.1 Fundamento

El GSH es un tripéptido que contiene L-cisteína, ácido L-glutámico y glicina. Puede prevenir el daño celular causado por especies reactivas de oxígeno como los radicales libres y los peróxidos. El glutatión existe en estado reducido (GSH) y oxidado (GSSG). El ratio GSSG / GSH es un magnífico indicador de estrés oxidativo.

1.11.2 Método

Los pellets de las células se desproteinizaron con ácido tricloroacético (TCA) al 10% y se centrifugaron a 20 000 g durante 15 minutos a 4°C. Para la determinación del GSH se usaron 10 µl del sobrenadante que se incubó con 10 µl de solución 1mg/ml o-phthalaldehído etanólico (OPA) y 180 µl de tampón fosfato (100 mM fosfato sódico, 5 mM EDTA-Na₂, pH 8.0) durante 15 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se midió la fluorescencia de las muestras a 340 nm de excitación y 420 nm de emisión en el lector de placas FLX800 (Bio-Teck Instruments Inc., Winooski, VT, Estados Unidos). Para la medida del GSSG, se partió de 30 µl de sobrenadante que se incubó con 12 µl de una solución de N-etilmaleimida (NEM, 5 mg/ml en agua destilada) durante 40 minutos a temperatura ambiente, para después ser alcalinizado con NaOH 0.15 N. De esta dilución se tomaron alícuotas de 45 µl que se incubaron con 10 µl de la solución OPA (1 mg/ml) y con 145 µl de NaOH 0.1 M durante 15 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se midió la fluorescencia. Las

concentraciones de GSSG y GSH se calcularon de acuerdo a una curva estándar y se expresaron como nmol/mg prot.

1.12 Medida de la actividad del glutatión peroxidasa

La enzima glutatión peroxidasa (GPx) cataliza la reducción del peróxido de hidrógeno (H_2O_2), al oxidar el glutatión reducido. Por tanto, la GPx protege la célula del daño oxidativo (Fig. 24).

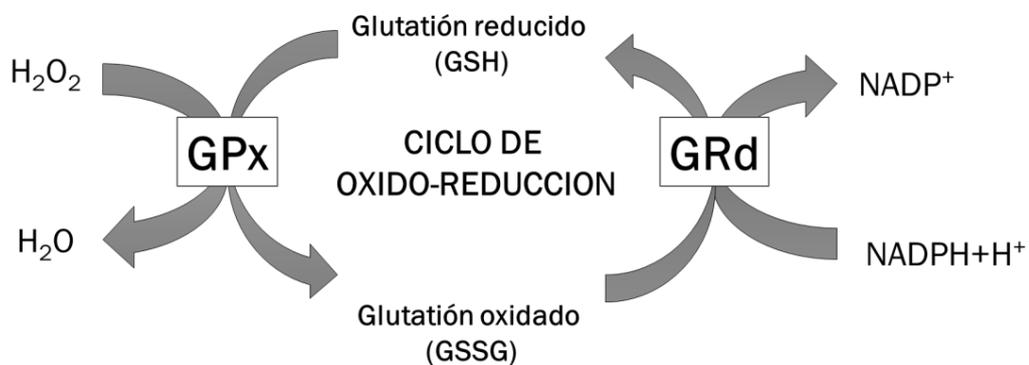


Figura 24. Ciclo de óxido-reducción del glutatión

1.12.1 Fundamento

La medición de la actividad de la GPx es de manera indirecta, por una reacción acoplada con la glutatión reductasa (GRd) que recicla el GSSG de nuevo a GSH y a NADPH. La disminución en la absorbancia de NADPH medida a 340 nm durante la oxidación de NADPH a $NADP^+$ es indicativa de la actividad de la GPx, ya que la GPx es el factor limitante de la velocidad de las reacciones acopladas (Jaskot et al. 1983).

1.12.2 Método

La actividad de la GPx se determinó incubando 10 µL de muestra en una microplaca durante 4 minutos a 37°C con 240 µL de una solución de trabajo compuesta por fosfato potásico 50 mM, EDTA dipotásico 1 mM, azida sódica 4 mM, GSH 4 mM, NADPH 0,2 mM y GRd (0,5 U/ml), pH 7,4. Tras la incubación, se añadieron 10 µL de cumeno hidropéroxido (1:250 en buffer fosfato potásico 50 mM, EDTA dipotásico 1 mM, pH 7,4) para iniciar la reacción y se midió la absorbancia a 340 nm durante 3 minutos en un espectrofotómetro de placas (*BioTek Power-Wavex Microplate Scanning Spectrophotometer*). En todas las determinaciones se restó la oxidación no enzimática del NADPH sustituyendo los 240 µL de la solución de trabajo por NADPH 0,2 mM en buffer fosfato potásico 50 mM, EDTA dipotásico 1 mM, pH 7,4. La actividad de la GPx se expresó en nmol de NADPH oxidado/min/mg de proteína en base a la siguiente ecuación:

$$\text{Actividad GPx} = \frac{\Delta \text{Abs cat.} - \Delta \text{Abs no cat.}}{0,0062} \times \frac{\text{Vol.total}}{\text{Vol.muestra}} \times \frac{1}{\text{mg prot.muestra}}$$

(nmol NADPH/min/mgprot)

2. Ensayos *in vivo*

2.1 Xenoinjertos en ratones.

Todos los experimentos se realizaron siguiendo el protocolo aprobado por el Comité Institucional de Uso y Cuidado de Animales de la Universidad de Granada

(procedimientos 11-CEEA-OH-2013), desarrollado de acuerdo a la conformidad con el Convenio Europeo para la Protección de los Animales Vertebrados utilizados en experimentos y otros fines científicos (CETS #123) y la legislación española (R.D. 53/2013). El estudio fue llevado a cabo en ratones nude atímicos (nu/nu) (Jackson Laboratory-Janvier Labs, France), de 5 a 6 semanas de edad que pesaban 30-40 g, que fueron alojados en cubetas apropiadas que se encontraban dentro de racks ventilados. La comida y el agua se les proporcionaba *ad libitum*. Estos ratones carecen de timo, lo que da lugar a una inhibición del sistema inmune, principalmente por la ausencia de linfocitos T maduros. Este debilitamiento de la respuesta inmune es lo que permite la realización de xenotrasplantes, incluyendo los de células tumorales y que estas sean toleradas por el sistema inmune del animal receptor (Zätterström et al. 1990; Chen et al. 1996).

Las células Cal-27 se cultivaron hasta el 70-80% de confluencia. En ese momento se lavaron con PBS, se tripsinizaron y se resuspendieron a una concentración de 20×10^6 células/mL de DMEM sin rojo fenol (21063-029, Life Technologies). A continuación, se inyectaron 0,2 mL de la suspensión celular (4×10^6 células) en el flanco izquierdo de cada ratón por vía subcutánea. A partir de este momento, el tamaño de los tumores se midió dos veces por semana con la ayuda de un calibre Vernier, midiendo dos diámetros perpendiculares de cada tumor por triplicado, y se calculó su volumen a través de la fórmula siguiente:

$$\text{Volumen del tumor} = (\text{longitud} \times \text{anchura}^2) / 2$$

La longitud fue la dimensión más larga y la anchura la dimensión perpendicular a la longitud. Cuando los tumores alcanzaron un volumen entre 100-150 mm³, se inició el tratamiento.

2.2 Tratamientos

Los ratones se dividieron de manera aleatoria en 3 grupos, cada uno de los cuales constaba de al menos 6 ratones: grupo de ratones control tratados con vehículo, ratones tratados con IR o CDDP, y ratones tratados con melatonina más IR o CDDP.

2.2.1 Tratamiento de IR + melatonina:

1. **Control:** ratones tratados con vehículo.
2. **IR:** ratones tratados con irradiación.
3. **IR + aMT:** ratones tratados con irradiación y melatonina.

Los animales se irradiaron a una dosis de 4 Gy. Previamente, se anestesiaron con equithesin y, a continuación, se irradiaron los tumores a través de una orificio de unos 10 mm de diámetro en una placa de plomo que protegía el resto del cuerpo del animal. La irradiación se emitió con un tubo de rayos X (YXLON, modelo Y, Tu 320-D03).

La melatonina se disolvió en PG y luego se diluyó 1:2 en solución salina isotónica. Se administró a una dosis de 300 mg/kg/día por vía subcutánea (s.c.) cada dos días desde el día antes del comienzo de la irradiación hasta el momento de su sacrificio (Fig. 25).

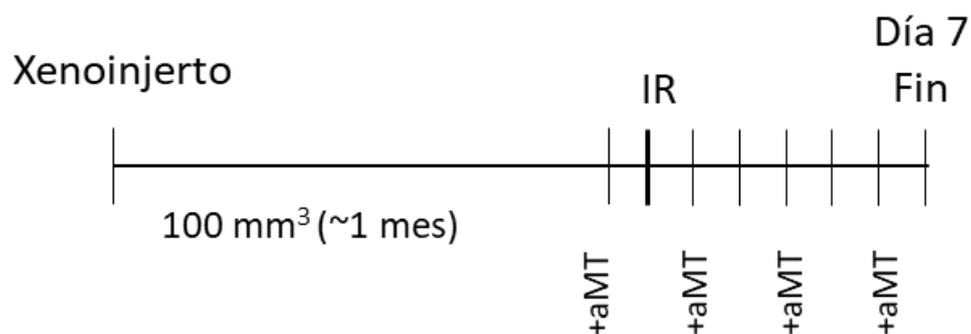


Figura 25. Tratamiento de irradiación de los ratones

El grupo control se trató exactamente de la misma manera, pero tan sólo con vehículo.

2.2.2 Tratamiento CDDP + melatonina

1. **Control:** ratones tratados con vehículo
2. **CDDP:** ratones tratados con CDDP
3. **CDDP + aMT:** ratones tratados con CDDP y melatonina

El CDDP se administró a una dosis de 4 mg/kg por vía intraperitoneal (i.p.) una vez por semana durante 21 días. La melatonina se administró a una dosis de 300 mg/kg/día por vía s.c. 6 días a la semana (Fig. 26).

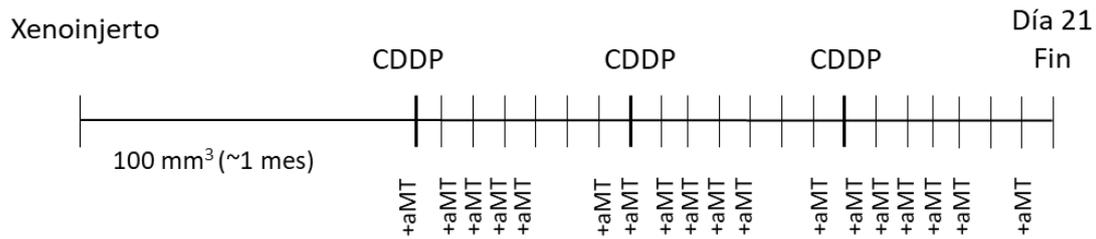


Figura 26. Tratamiento de CDDP de los ratones

El peso de los ratones y el tamaño del tumor se midieron regularmente. Finalmente, se sacrificaron los animales y se extrajo el tumor, corazón, pulmón, riñón e hígado. Los tejidos se lisaron en tampón de lisis o se fijaron y se embebieron en parafina.

Todas las cirugías se llevaron a cabo bajo anestesia de isoflurano (469860, 1000mg/g IsoVet®, Braun), o equithesin (3 ml/kg ip; 2.1 g de hidrato de cloral, de pentobarbital sódico, 1.06 g de MgSO₄, 21.4 ml de propilenglicol, 5.7 ml etanol (90%) y 3 ml de H₂O)) cuando fue necesario, minimizando al máximo el sufrimiento de los ratones.

2.3 Histología, histopatología e inmunohistoquímica

Para el análisis histológico, se llevó a cabo la perfusión de los animales, primero con solución salina y, posteriormente, con formaldehído al 4% (252931-1215, Panreac). Una vez perfundidos, se resecó el tumor, corazón, pulmones, riñones e hígado, los cuales fueron sumergidos en formaldehído durante 48 horas, en agitación y procurando que mantuvieran la forma original. Tras este tiempo, las muestras se deshidrataron, se lavaron con salino y se incluyeron en parafina. Finalmente, se

realizaron cortes de 5 μm de grosor, que se secaron, se desparafinaron e hidrataron antes de realizar las tinciones. Se realizaron diferentes tinciones:

2.3.1 Tinción hematoxilina y eosina (HE)

Permite realizar análisis morfológicos de los tejidos. Además, con esta tinción se pueden visualizar células en división, apoptosis o necrosis y así evaluar las diferencias en cuanto a estado de proliferación de los tumores. Para ello, se incubaron las muestras 3 minutos con hematoxilina y 1 minuto con eosina.

2.3.2 Tinción picosirius (PS)

Se utiliza para evaluar la reorganización de las fibras de colágeno. Esto permite analizar las cápsulas que rodean los tumores y en base a ello, determinar la agresividad de estos. En general, la encapsulación del tumor impide o dificulta su diseminación. En cambio, el debilitamiento de estas cápsulas facilita la aparición de metástasis (Lattouf et al. 2014). Para llevar a cabo esta tinción, se incubaron las muestras con Rojo Sirius durante 30-45 minutos y se contrastó con hematoxilina para la mejor visualización de los cortes.

2.3.3 Tinción ácido periódico de Schiff (PAS)

Se usa para confirmar la presencia de mucina. Dicha mucina es sintetizada en la zona glandular de los tumores y cuanto mayor sea la cantidad presente de mucina, mayor estado de diferenciación de las células tumorales. Este mayor estado de diferenciación de las células tumorales se asocia a un mejor pronóstico de los tumores (Pereira et al. 2015). En este caso, se incubaron las muestras con el reactivo de Schiff 30 minutos en oscuridad y se contrastó también con hematoxilina.

2.4 Determinación de la concentración de melatonina intracelular

La concentración de melatonina se determinó mediante HPLC.

2.4.1 Fundamento

La cromatografía líquida es una técnica utilizada para separar los componentes de una mezcla. Consiste en una fase estacionaria no polar (columna) y una fase móvil. La fase estacionaria es de sílice. La fase móvil actúa de portador de la muestra. La muestra en solución es inyectada en la fase móvil. Los componentes de la solución migran de acuerdo con las interacciones no-covalentes de los compuestos con la columna. Estas interacciones químicas, determinan la separación de los contenidos en la muestra. La utilización de los diferentes detectores dependerá de la naturaleza de los compuestos a determinar. En este caso, se usó una columna de tipo Sunfire C18 (5 μm , 4,6 x 50 mm) rellena de esferas de sílice con un tamaño de poro de 100 Å. La fluorescencia de la melatonina se midió usando un detector de fluorescencia (*Shimadzu RF-10A XL fluorescence detector*; Shimadzu Europe GmbH, Duisburg, Alemania) con unas longitudes de excitación y emisión de 275 y 345 nm respectivamente.

2.4.2 Método

La melatonina se extrajo a partir de pellet de células u homogenado de tejidos. La extracción de las muestras se realizó con cloroformo en agitación durante 10 minutos. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 3800 g durante 10 minutos y se retiró la fase acuosa por aspiración. A continuación, se procedió a otro paso de agitación de 10 minutos junto con NaOH 0.1 N, tras lo cual las muestras se centrifugaron de nuevo 10 minutos a 3800 g y la fase acuosa se aspiró. Finalmente, la

fase orgánica se evaporó en un sistema Speed Vac a una presión de 5.1 Pa durante 45 minutos (SPD 2010 Speed Vac System; Fisher Scientific, Madrid, España). Las muestras se analizaron usando un cromatógrafo de líquidos de alta resolución (HPLC, Shimadzu Europe GmbH, Duisburg, Alemania).

2.5 Medida de los nitritos

Un método comúnmente utilizado para la determinación indirecta de $\text{NO}\bullet$ es la determinación colorimétrica de los niveles de nitratos y de nitritos mediante la reacción de Griess, una reacción química que detecta la presencia de nitritos orgánicos.

2.5.1 Fundamento

El $\text{NO}\bullet$ tiene una vida media muy corta ($t = 4$ segundos), reaccionando con diferentes moléculas para formar nitrato (NO_3^-) o nitrito (NO_2^-). La reacción de diazotación de Griess, en la que se fundamenta el reactivo de Griess, se describió por primera vez en 1858 por Peter Griess. Esta reacción requiere que el nitrato (NO_3^-) primero se reduzca a nitrito (NO_2^-), por la acción de la nitrato-reductasa en una reacción en la que se acopla a la oxidación de NADPH cuya disminución en la concentración de dicha molécula se detecta a 340 nm. El nitrito se hace reaccionar entonces con sulfanilamida y N- (1-naftil) etilendiamina (NED) para producir un colorante azo detectado a 546 nm (Bryan and Grisham 2007; Acuña-Castroviejo et al. 2012) (Fig. 27).

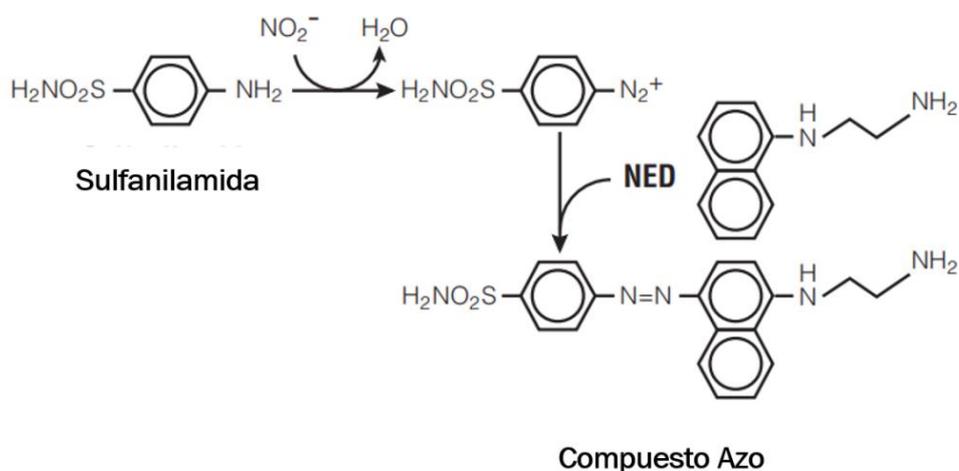


Figura 27. Reacción de Griess

2.5.2 Método

Los tejidos, una vez homogeneizados, se incubaron con una solución 1:1 de los reactivos (sulfanilamida y NED) durante 20 minutos en continua agitación. Luego se midió la absorbancia a 550 nm. Como estándar se utilizaron soluciones de nitrito sódico y los niveles de nitritos se expresaron en nmol/mg proteína tras ser normalizados por el contenido de proteína.

2.6 Determinación de la lipoperoxidación (LPO)

La medida de la LPO se llevó a cabo mediante el kit Bioxytech LPO-568 (OxisResearch, Portland, OR, USA).

2.6.1 Fundamento

La medición de la peroxidación lipídica se basa en la detección de los compuestos reactivos con el ácido tiobarbitúrico (TBA) como el malondialdehído (MDA) y el 4 hidroxialquenal (4-HDA) generado por la descomposición de los productos

de peroxidación lipídica que tiene lugar bajo estrés oxidativo (Esterbauer and Cheeseman 1990). Esta reacción, que tiene lugar en condiciones ácidas a 90-100°C, da como resultado un cromóforo estable que puede medirse colorimétricamente a 586 nm.

2.6.2 Método

Los pellets tratados se homogenizaron en tampón Tris-HCl 50 mM (pH=7,4) frío. El homogenado se centrifugó a 800 *g* durante 10 minutos a 4°C. Las muestras se incubaron en presencia de 1-metil-2-fenilindol durante 40 minutos a 45°C. La absorbancia se midió a 586 nm en presencia de ácido metasulfónico utilizando un espectrofotómetro de placas FLX800 (Bio-Teck Instruments Inc., Winooski, VT, Estados Unidos). Finalmente, los resultados se expresaron en nmol/mg de proteína.

3. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con el programa informático GraphPad Prism 6 Scientific (GraphPad Software). Los datos se expresaron como la media \pm SEM y las diferencias entre los grupos experimentales se analizaron mediante el test One-way ANOVA seguido del test de Tuckey. Se consideró como un valor estadísticamente significativo un valor de $P < 0,05$.

IV. RESULTADOS

Parte de los resultados mostrados en este apartado están

recogidos en el siguiente trabajo publicado:

*Beatriz I Fernandez-Gil, Ana Guerra-Librero, Ying-Qiang Shen,
Javier Florido, Laura Martínez-Ruiz, Sergio García-López, Christian
Adan, Cesar Rodríguez-Santana, Dario Acuña-Castroviejo, Alfredo
Quinones, José Fernández-Martínez, Ahmed E. Abdel Moneim, Luis C.*

Lopez, Jose Manuel Rodriguez-Ferrer and Germaine Escames.

*Melatonin enhances cisplatin and radiation cytotoxicity in head and
neck squamous cell carcinoma by stimulating mitochondrial ROS*

generation, apoptosis and autophagy

Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2019

1. La melatonina potencia los efectos citotóxicos de la irradiación y el CDDP en HNSCC

En primer lugar, evaluamos el papel de la melatonina para potenciar los efectos citotóxicos de la irradiación y del CDDP en las células HNSCC. Para ello se analizó la capacidad clonogénica y la viabilidad de las líneas celulares Cal-27 y SCC-9.

Como se muestra en la figura 28 A-C, el tratamiento con melatonina sola inhibe significativamente la formación de colonias, así como el diámetro de dichas colonias de una manera dosis dependiente en comparación con el control o con la irradiación sola. De hecho, la melatonina sola puede inhibir totalmente el crecimiento de las colonias. Resultados similares se observan con la combinación de melatonina e irradiación. Sin embargo, el CDDP parece tener una mayor capacidad que la IR para disminuir la clonogenicidad (Fig. 28 F-H).

También se llevaron a cabo ensayos de MTT para ambas líneas celulares, Cal-27 y SCC-9. En concordancia con la inhibición de la capacidad clonogénica, la melatonina reduce de forma significativa la viabilidad celular de las células irradiadas de una forma dosis dependiente, especialmente a las dosis de 500 y 1500 μM , en comparación con el control y con la irradiación sola (Fig. 28 D, E), aunque las células SCC-9 presentaron más resistencia a los tratamientos que las células Cal-27. Sorprendentemente, la melatonina 100 μM no redujo la viabilidad significativamente, particularmente en SCC-9 (Fig. 28D, E). Por otra parte, la melatonina redujo significativamente la viabilidad en las células tratadas con CDDP de una forma dosis dependiente en comparación con

el control y con el tratamiento de CDDP solo (Fig. 28 I-J). Las células SCC-9 también fueron más resistentes a la exposición a la melatonina que las Cal-27. Dado que los resultados fueron más significativos para las células Cal-27, decidimos utilizar estas células en el resto de los experimentos.

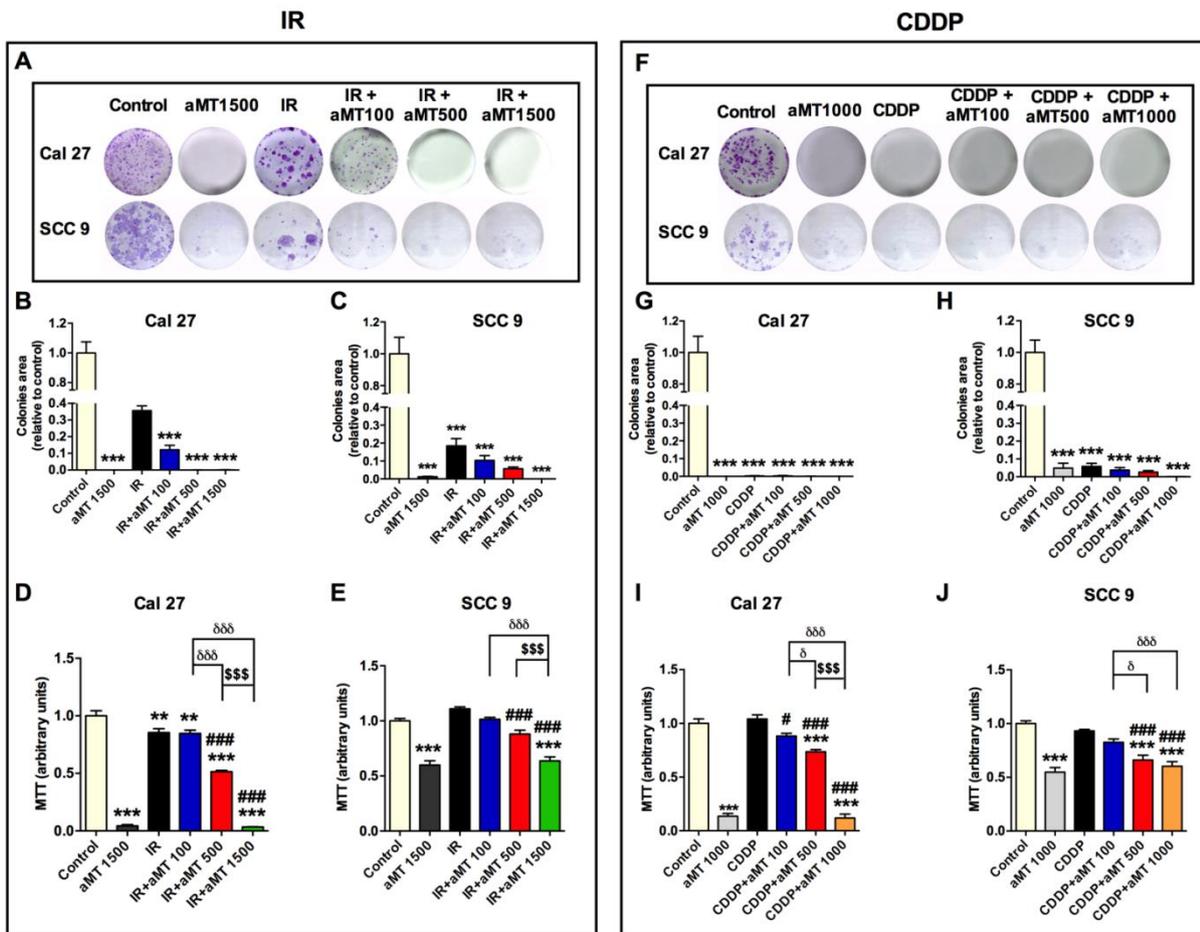


Figura 28. La melatonina incrementa los efectos citotóxicos de la irradiación (IR) y del cisplatino (CDDP) en las líneas de HNSCC Cal-27 y SCC-9. Ensayo clonogénico de las células expuestas a IR (Figures (A) – (C)) o CDDP (Figures (F) – (H)) y viabilidad de las células expuestas a IR (Figures (D) y (E)) o CDDP (Figuras (I) y (J)). Los grupos tratados incluyen control (vehículo), IR (8 Gy), CDDP 10 μ M, melatonina (aMT) 1000 o 1500 μ M y CDDP o IR con aMT 100, 500, 1000 o 1500 μ M. $n = 6$ por grupo. Los datos se presentan como media \pm SEM. ** $P < .01$, *** $P < .001$ vs. control, # $P < .05$, ### $P < .001$ vs. grupos tratados con IR o CDDP, $d P < .05$, $ddd P < .001$ vs. IR + aMT 100, $\$ P < .05$, $\$ \$ \$ P < .001$, vs. IR + aMT 500.

2. La melatonina potencia los efectos apoptóticos de la irradiación y del CDDP en las células HNSCC

Teniendo en cuenta que el ensayo de MTT es una medida cuantitativa de la proliferación celular, y que un descenso de la proliferación celular puede estar causado por un aumento de muerte celular o por una inhibición directa de la propia proliferación, a continuación decidimos evaluar la muerte celular por apoptosis.

Las células en apoptosis temprana muestran un patrón de tinción anexina V-FITC+/PI-, mientras que las células en apoptosis tardía exhiben un patrón V-FITC+/PI+ (Fig. 29) debido a la pérdida de la integridad de la membrana plasmática (Brauchle et al. 2015). En el tratamiento combinado de melatonina e irradiación, la melatonina incrementa la apoptosis temprana, alcanzando el máximo efecto a una concentración de 1500 μ M en comparación con el control (Fig. 29 A, B). Sin embargo, la irradiación sola incrementa la apoptosis tardía pero no afecta a los niveles de apoptosis temprana (Fig. 29 A, B). Esto indica que la melatonina incrementa la toxicidad aguda de la irradiación. En contraste, el tratamiento solo con CDDP no incrementa la apoptosis (Fig. 29 G, H), mientras que el tratamiento combinado con melatonina más CDDP incrementa la apoptosis tardía a una dosis de 500 μ M de melatonina (Fig. 29 H).

La iniciación de la apoptosis está asociada con la translocación de la forma inactiva de Bax desde el citoplasma a la mitocondria y la supresión de la proteína anti-apoptótica Bcl-2. Teniendo en cuenta estos factores, analizamos la expresión de las

proteínas Bax y Bcl-2 mediante *western blot*. Siguiendo en la misma línea que con los resultados obtenidos anteriormente, los niveles de Bcl-2 se ven claramente atenuados por la melatonina a 500 y 1500 μM combinada con la irradiación. El resultado es un incremento del ratio Bax/Bcl-2 con un efecto máximo a la concentración de melatonina de 1500 μM (Fig. 29 C, F). Cuando la melatonina se combina con el CDDP se observa un incremento del ratio Bax/Bcl-2 mayor que el observado cuando la melatonina se combina con la irradiación, a pesar de utilizar una menor concentración de melatonina (1000 μM vs. 1500 μM) (Fig. 29 I-L). Estos datos indican que el incremento de la citotoxicidad en las células tumorales HNSCC es mayor cuando la melatonina se combina con el CDDP que cuando se combina con la irradiación.

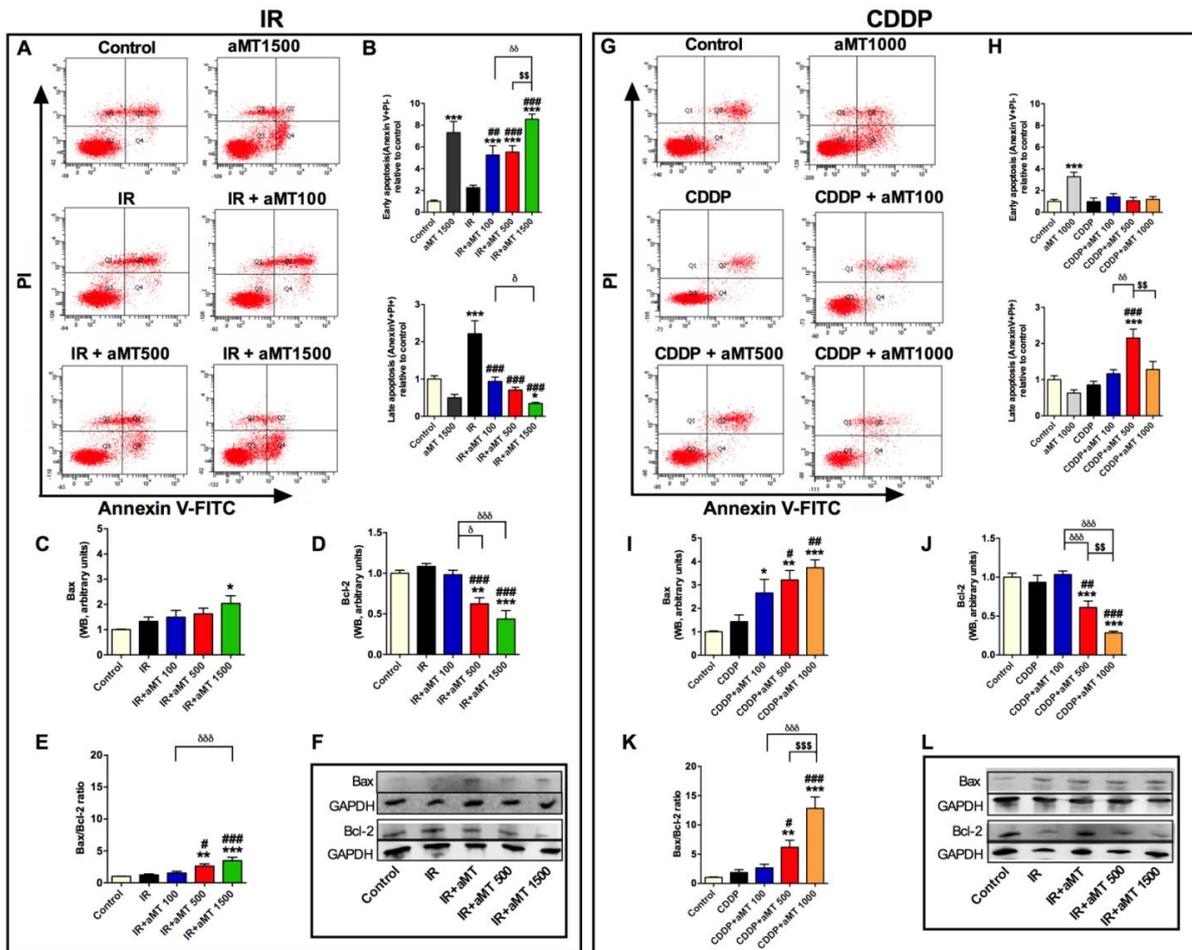


Figura 29. El tratamiento combinado con melatonina e IR o CDDP incrementa la apoptosis en la línea celular de HNSCC, Cal-27. La apoptosis se analizó por citometría de flujo. (Figuras (A) – (G)) Gráficos representativos que muestran la redistribución de la fosfatidilserina (marcada con anexina V) en presencia de ioduro de propidio (PI). El cuadrante de abajo a la derecha representa el porcentaje de células apoptóticas tempranas (Anexina V+/PI-), mientras que el cuadrante de arriba a la derecha representa el porcentaje de células apoptóticas tardías (Anexina V+/PI+). Análisis estadístico de la apoptosis temprana y tardía de las células expuestas a IR (Figura (B)) y CDDP (Figure (H)), respectivamente. Análisis de western blot (Figuras (F) – (L)) y cuantificación densitométrica de Bax (Figuras (C) – (I)) y Bcl-2 (Figuras (D) – (J)), y el ratio Bax/Bcl-2 (Figuras (E) – (K)) en células expuestas a IR o CDDP, respectivamente. Los grupos tratados incluyen control (vehículo), IR (8 Gy), CDDP 10 μ M, melatonina (aMT) 1000 o 1500 μ M y CDDP o IR con aMT 100, 500, 1000 o 1500 μ M. $n = 6$ per grupo. Los datos se presentan como media \pm SEM. * $P < .05$, ** $P < .01$, *** $P < .001$ vs. control, # $P < .05$, ## $P < .01$, ### $P < .001$ vs. grupos tratados con IR o CDDP, $d P < .05$, $dd P < .01$, $ddd P < .001$ vs. IR + aMT 100, $\$ P < .05$, $\$\$ P < .01$, $\$\$\$ P < .001$, vs. IR + aMT 500.

3. La melatonina produce cambios en la función mitocondrial de las células HNSCC

Las mitocondrias están implicadas, de forma crítica, en el control de la muerte celular programada inducida por los diferentes tratamientos antitumorales (Paolo Ettore Porporato et al. 2018). Por tanto, teniendo en cuenta que la melatonina regula la homeostasis mitocondrial (Doerrier et al. 2016; Acuña-Castroviejo et al. 2017), pensamos que la melatonina podría potenciar la citotoxicidad de los tratamientos con irradiación y con CDDP mediante una modificación de la función mitocondrial. Es por ello que primero determinamos la tasa de consumo de oxígeno (OCR), que es un indicador de la actividad de la oxidación fosforilativa mitocondrial y de la producción de ATP. Al medir la tasa de consumo de oxígeno, añadimos secuencialmente una serie de reactivos como oligomicina, FCCP y una combinación de rotenona y antimicina a las células para evaluar la integridad de la cadena de transporte de electrones (Fig. 30 A, K). Las células Cal-27 irradiadas mostraron un aumento significativo de la respiración basal (Fig. 30 B) y de la capacidad respiratoria máxima (ETS) (Fig. 30 C) con melatonina a 500 μ M, lo que se correlacionaba con un incremento en la producción de ATP (Fig. 30 D) sin cambios en la fuga de protones o *proton leak* (Fig. 30 E). Sorprendentemente, la melatonina a 1500 μ M provocó un descenso del OCR en comparación con la melatonina a 500 μ M (Fig. 30 B-D), sugiriendo una función mitocondrial defectuosa a concentraciones más altas de melatonina. Por el contrario, las células tratadas con CDDP solo o combinado con melatonina 100 μ M mostraron una disminución del OCR (Fig. 30 L-N), mientras que las dosis de melatonina de 500 y

1000 μM recuperaron el OCR en comparación con el control. Estos resultados concuerdan con el efecto directo del CDDP en las mitocondrias interfiriendo con la transcripción del ADNmt, lo que resulta en una reducción de la función mitocondrial (Marullo et al. 2013).

A continuación, y para determinar otros cambios en la mitocondria inducidos por la melatonina, analizamos la masa mitocondrial y los niveles de ADNmt (Fig. 30 F, G, P, Q). La melatonina, a concentraciones altas, aumentó significativamente la masa mitocondrial en comparación con el control, especialmente a 1500 y 1000 μM en las células expuestas a irradiación o a CDDP respectivamente (Fig. 30 F, P). Además, la melatonina, a las dosis similares en las que se observaba un aumento de masa mitocondrial, también incrementó el ratio ADNmt/ADNn (Fig. 30 G, Q). Estos resultados indican que la melatonina incrementa de forma significativa el ADN mitocondrial.

Estudios previos en nuestro Grupo de Investigación demostraron que la melatonina inducía apoptosis y autofagia en las células HNSCC (Shen et al. 2018). Determinamos los niveles de las proteínas relacionadas con la autofagia, ATG12-ATG5, mediante western blot. También analizamos NIX, un marcador de mitofagia. El tratamiento combinado de melatonina e irradiación incrementó los niveles de ATG12-ATG5 a todas las dosis estudiadas (Fig. 30 H, J) pero redujo los niveles de NIX (Fig. 30 I, J). Sin embargo, la combinación de melatonina con CDDP incrementó los niveles de ambas proteínas ATG12-ATG5 y NIX (Fig. 30 R, T). Estos datos indican que la combinación del tratamiento de melatonina y CDDP, debido a su alta toxicidad, resulta en aumento de la autofagia y de la mitofagia. Esto podría denotar una correlación

entre un incremento de la actividad mitocondrial inducido por la melatonina y la producción de ROS.

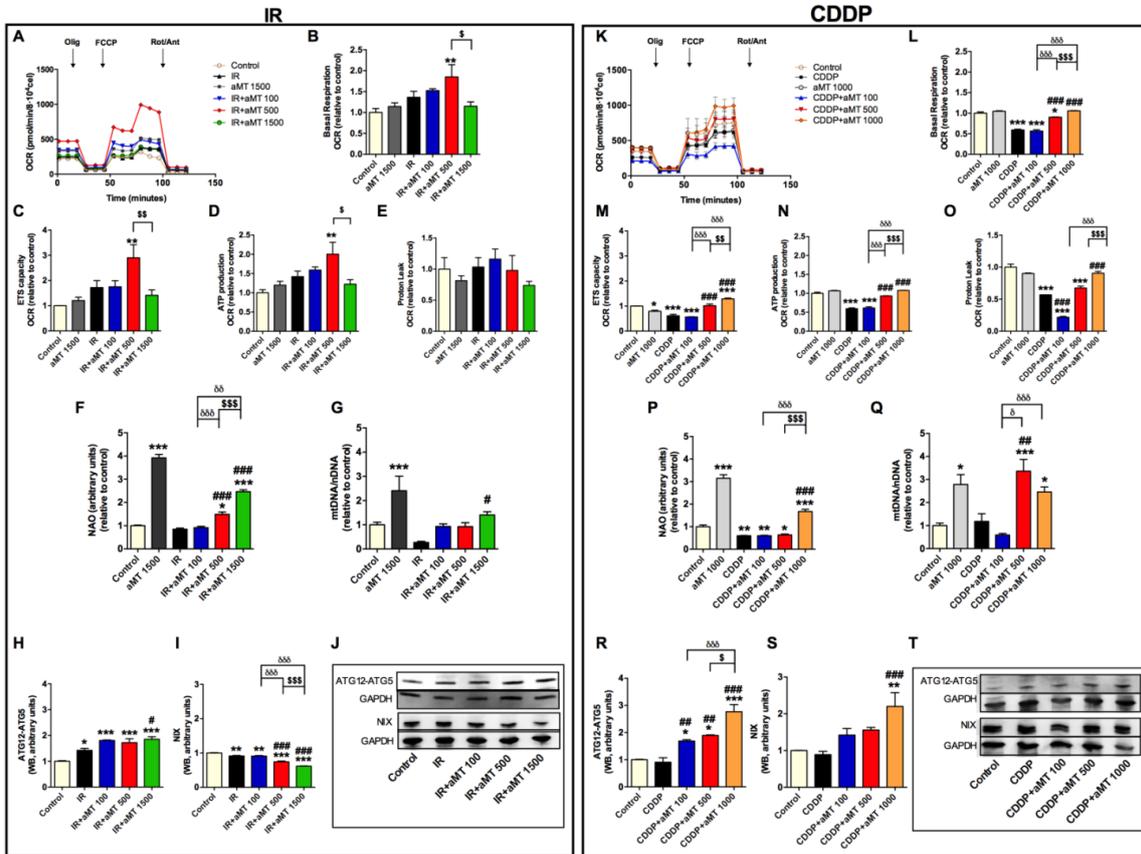


Figura 30: Efectos del tratamiento combinado con melatonina e IR o CDDP en mitocondrias de las células de HNSCC, Cal-27. Tasa de consumo de oxígeno (OCR) (Figuras (A) y (K)), respiración basal (Figuras (B) y (L)), capacidad respiratoria máxima (ETS) (Figuras (C) y (M)), producción de ATP (Figuras (D) y (N)) y proton leak (Figures (E) y (O)) en células expuestas a IR o CDDP, respectivamente. Masa mitocondrial (NAO) (Figuras (F) y (P)), ADNmt (Figuras (G) y (Q)) y análisis de western blot análisis y cuantificación densitométrica de ATG12-ATG5 (Figuras (H), (J), (R) y (T)) y Nix (Figuras (I), (J), (S) y (T)) en células expuestas a IR o CDDP, respectivamente. Los grupos tratados incluyen control (vehículo), IR (8 Gy), CDDP 10 μ M, melatonina (aMT) 1000 o 1500 μ M y CDDP o IR con aMT 100, 500, 1000 o 1500 μ M. $n = 6$ per grupo. Los datos se presentan como media \pm SEM. * $P < .05$, ** $P < .01$, *** $P < .001$ vs. control, # $P < .05$, ## $P < .01$, ### $P < .001$ vs. grupos tratados con IR o CDDP, $d P < .05$, $dd P < .01$, $ddd P < .001$ vs. IR + aMT 100, $\$ P < .05$, $\$\$ P < .01$, $\$\$\$ P < .001$, vs. IR + aMT 500.

4. Potenciamiento del estrés oxidativo en presencia de melatonina en las células HNSCC

Para determinar si los cambios mitocondriales se correlacionaban con un incremento en los niveles de ROS, medimos la producción de ROS usando la sonda DCFH-DA (Fig. 31 A). Observamos un incremento significativo en los niveles intracelulares de ROS tanto con melatonina 1500 μ M como en las células irradiadas. Estos resultados se correlacionaron con un incremento del ratio GSSG/GSH en esos mismos grupos (Fig. 31 C-E). Por otro lado, la melatonina utilizada a concentraciones de 500 y 1000 μ M provocó un severo incremento de la producción de ROS en las células expuestas a CDDP en comparación con las células irradiadas (Fig. 31 G). Sin embargo, el incremento del ratio GSSG/GSH solo se observó con la melatonina 1000 μ M (Fig. 31 I-K), indicando que altas dosis de melatonina incrementan la síntesis de glutatión (Fig. 31 F, L). A su vez, también se observó un descenso paralelo de la actividad de la GPx a la mayor concentración de melatonina utilizada, especialmente en las células tratadas con CDDP (Fig. 31 H). Sin embargo, en el grupo de células tratadas con melatonina 100 μ M combinada con irradiación, se observó un incremento de la actividad de la GPx (Fig. 31 B). Estos resultados son consistentes con los bajos niveles de ROS observados a esta concentración de melatonina de 100 μ M en comparación con los observados con melatonina 1500 μ M. Estos datos sugieren que la melatonina induce una respuesta mitocondrial resultando en un aumento de la producción de ROS en las células tumorales incrementando, por tanto, los efectos citotóxicos de la irradiación y del CDDP. Además, a pesar de ser conocida la melatonina

como un potente antioxidante, estudios previos en nuestro Grupo de Investigación han demostrado que la melatonina incrementa la producción de ROS en las células tumorales HNSCC potenciando los efectos de la rapamicina (Shen et al. 2018). Por tanto, la melatonina induce apoptosis en las células HNSCC como consecuencia de aumentar la producción de ROS a nivel intracelular debido a un aumento de la función mitocondrial. El resultado es un incremento del efecto citotóxico de la irradiación y del CDDP en las células tumorales HNSCC.

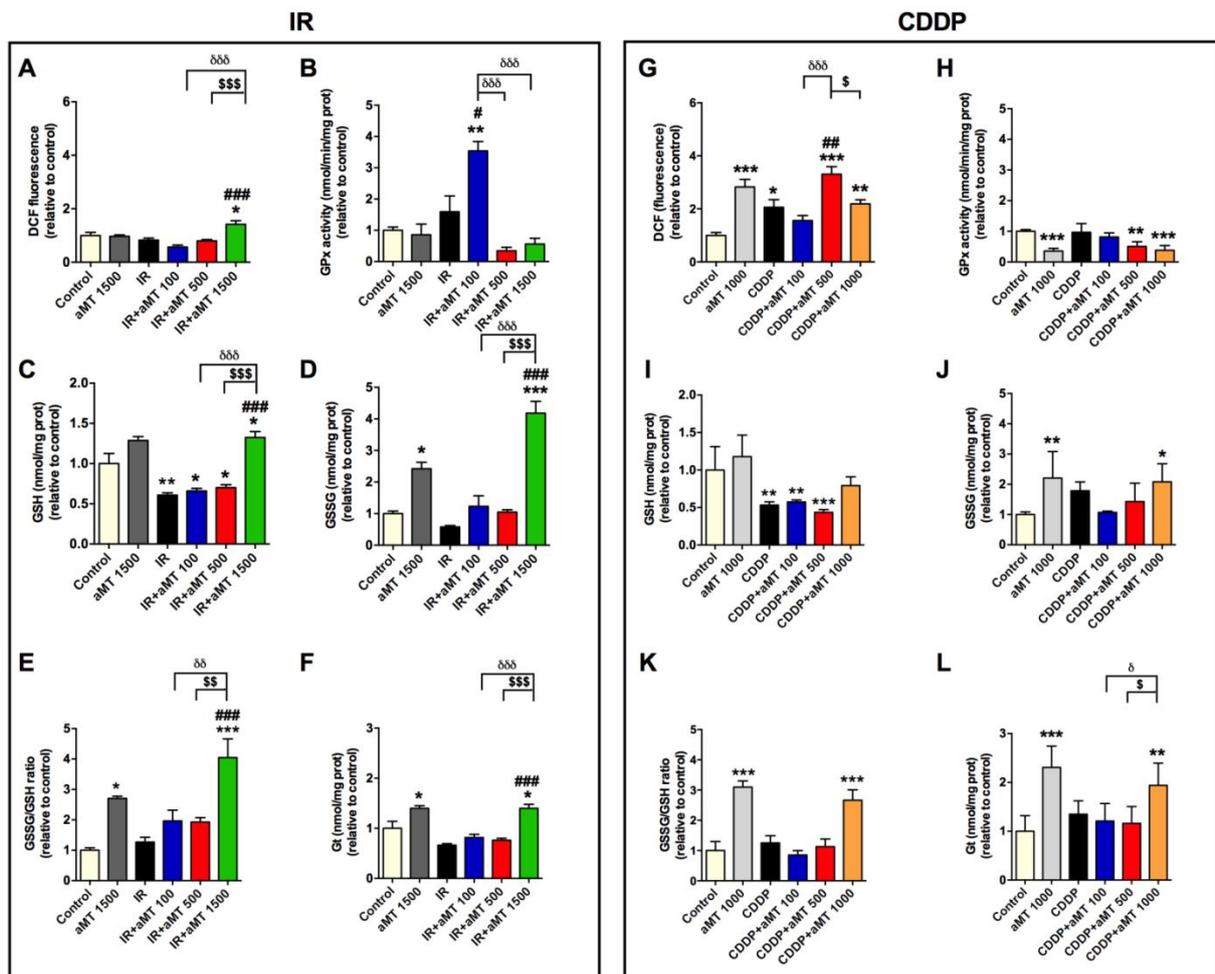


Figura 31: El tratamiento combinado de melatonina e IR o CDDP incrementa el estrés oxidativo en la línea celular de HNSCC, Cal-27. Medidas de los niveles de ROS intracelular por fluorimetría y tras el marcaje con la sonda fluorescente. DCFH-DA (Figuras (A) y (G)); Actividad GPx (Figuras (B) y (H)); contenido de GSH (Figuras (C) e (I)) y GSSG (Figuras (D) y (J)), ratio GSSG/GSH (Figuras (E) y (K)) y glutatión total (Gt) (Figuras (F) y (L)) en células expuestas a IR o CDDP, respectivamente. Los grupos tratados incluyen control (vehículo), IR (8 Gy), CDDP 10 μ M, melatonina (aMT) 1000 o 1500 μ M y CDDP o IR con aMT 100, 500, 1000 o 1500 μ M. $n = 6$ per grupo. Los datos se presentan como media \pm SEM. * $P < .05$, ** $P < .01$, *** $P < .001$ vs. control, # $P < .05$, ## $P < .01$, ### $P < .001$ vs. grupos tratados con IR o CDDP, d $P < .05$, dd $P < .01$, ddd $P < .001$ vs. IR + aMT 100, \$ $P < .05$, \$\$ $P < .01$, \$\$\$ $P < .001$, vs. IR + aMT 500.

5. Relación entre los niveles de melatonina y su efecto oncostático *in vitro* e *in vivo*. Estudio piloto.

Para determinar si la melatonina potencia los efectos de la IR y/o del CDDP, se establecieron modelos de xenoinjertos de Cal-27 en ratones atímicos nude que se dividieron en los siguientes grupos: un grupo tratado con vehículo; un grupo tratado con IR o con CDDP y otro grupo tratado con IR o CDDP más melatonina. Una vez comenzado el tratamiento, se midió el volumen de los tumores una vez por semana para evaluar el efecto de los diferentes tratamientos.

La inhibición del crecimiento tumoral *in vivo* causada por el tratamiento combinado de melatonina e irradiación fue más significativa que con la irradiación sola (Fig. 32 A). Por otra parte, los niveles intracelulares de melatonina en las células (Cal-27) expuestas a melatonina en combinación con la irradiación incrementaron 225 veces en comparación con los del control (Fig. 32 B). En contraste, el contenido de melatonina en el tumor de los ratones tratados con el tratamiento combinado, melatonina más irradiación, solo incrementó 3 veces en comparación con el control o con el tratamiento de irradiación sola (Fig. 32 C). Por el contrario, los tratamientos con CDDP solo o combinado con melatonina, resultaron en un volumen tumoral similar al de los controles (Fig. 32 D). En células tratadas con melatonina más CDDP, los niveles intracelulares de melatonina incrementaron hasta 200 veces en comparación con el control (Fig. 32 E), mientras que *in vivo* la melatonina solo alcanzó unos niveles de 1,5 veces superiores a los del control (Fig. 32 F). Curiosamente, la inducción de la muerte celular producida por melatonina fue mucho más importante *in vitro* que *in*

vivo, sugiriendo que los efectos apoptóticos de la melatonina dependen de los niveles intracelulares de dicha molécula tras su administración.

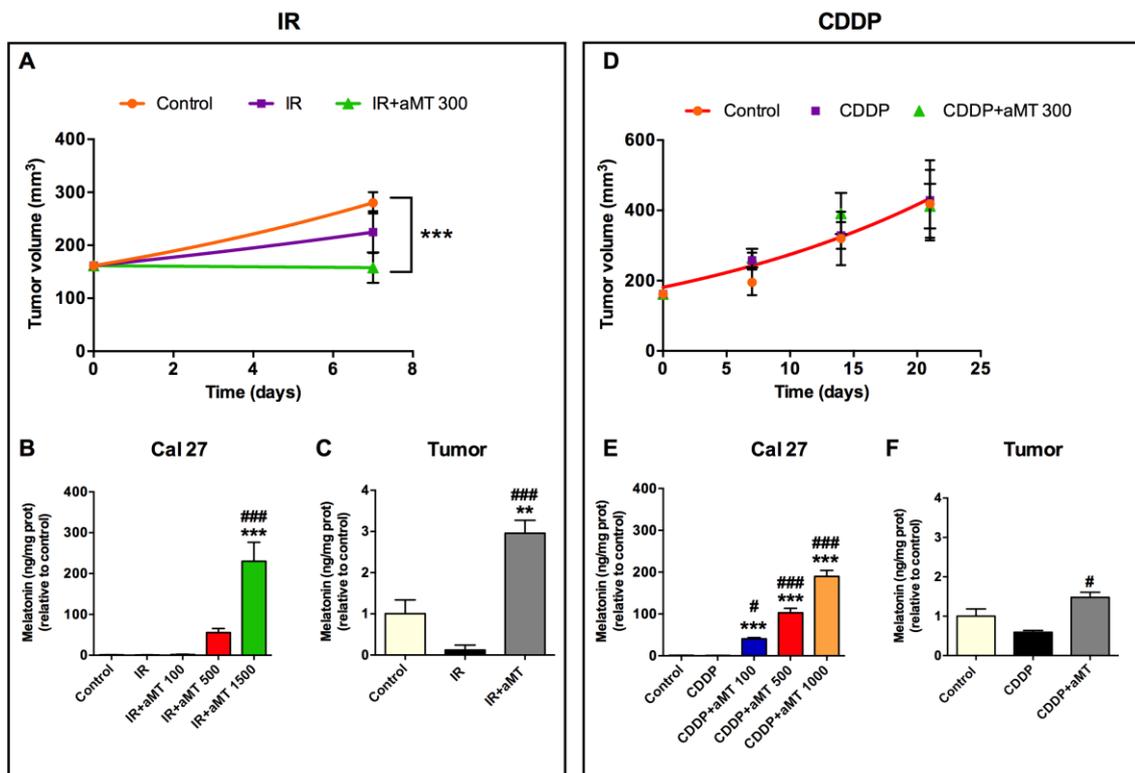


Figura 32: El nivel de melatonina intracelular afecta al resultado del tratamiento combinado con melatonina e IR o CDDP sobre un modelo de xenoinjerto de cáncer de cabeza y cuello. Diferentes curvas del crecimiento tumoral en los diferentes grupos (A, D) tras la administración *in vivo* de melatonina con IR o con CDDP, respectivamente. Niveles de melatonina Intracelular en cultivo. (B, E). Niveles de melatonina intratumoral *in vivo* (C,F). Los grupos tratados incluyen control (ratones con tumores tratados con vehículo), IR, CDDP 4 mg/kg, melatonina (aMT) 300 mg/kg y CDDP o IR con aMT $n = 6$ por grupo. Los datos se presentan como media \pm SEM. ** $P < .01$, *** $P < .001$ vs. control, # $P < .05$, ### $P < .001$ vs. grupos tratados con IR o CDDP. En cultivo celular (B, E), Los grupos tratados incluyen control (vehículo), IR (8 Gy), CDDP 10 μ M, melatonina (aMT) 1000 o 1500 μ M y CDDP o IR con aMT 100, 500, 1000 o 1500 μ M. $n = 6$ por grupo. Los datos se presentan como media \pm SEM. * $P < .05$, ** $P < .01$, *** $P < .001$ vs. control, # $P < .05$, ## $P < .01$, ### $P < .001$ vs. grupos tratados con IR o CDDP, d $P < .05$, dd $P < .01$, ddd $P < .001$ vs. IR + aMT 100, \$ $P < .05$, \$\$ $P < .01$, \$\$\$ $P < .001$, vs. IR + aMT 500.

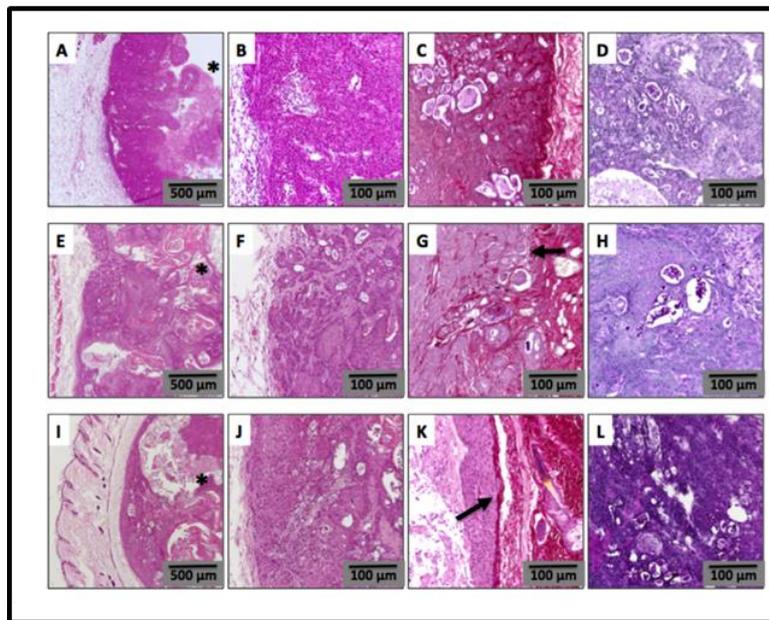
Para analizar en detalle el efecto de los tratamientos en los tumores se llevó a cabo el análisis histológico de los mismos. Este análisis permite estudiar las diferencias en cuanto a grado de diferenciación y de encapsulación de los tumores, así como la presencia de diferentes elementos en ellos. Para todas las condiciones, el análisis histológico confirmó que se trataba de tumores adenoescamosos. Los tumores de los ratones del grupo control eran tumores bien formados, con un gran quiste central con áreas necróticas. El grado de diferenciación varía entre leve y moderado y aparece mezclado con zonas pseudoglandulares (zonas PAS positivas). Además, se observan estructuras vasculares que, en algunos casos, contienen células tumorales o infiltraciones de linfocitos (Fig. 33 B). En cuanto al grado de encapsulación, la tinción con PS revela la presencia de una cápsula de colágeno abundante, aunque discontinua (Fig. 33 C). Tras el tratamiento con irradiación, los tumores irradiados presentaron un estado de diferenciación de moderado a alto, con abundantes áreas pseudoglandulares (zonas PAS-positivas) (Fig. 33 E-H). Además, la tinción con PS revela, por un lado, que la cápsula que rodea al tumor es difusa y, por otro lado, la presencia trabéculas ricas en colágeno (Fig. 33 G). La tinción con H/E muestra que las células tumorales presentan importantes alteraciones típicas de la IR, y la presencia de un número importante de mastocitos, también frecuente tras el tratamiento con IR.

En el grupo de ratones sometidos al tratamiento combinado con irradiación y melatonina se observa un tumor con un grado de diferenciación moderado-alto, con zonas pseudoglandulares (Fig. 33 I-L), al igual que en el grupo anterior. Sin embargo, en este caso encontramos un importante aumento del grosor de la cápsula que rodea al tumor, y la tinción con PS muestra que se trata de una cápsula rica en colágeno bien formada (Fig. 33 K). Además, en este caso no se detectan células inflamatorias, aunque

siguen apareciendo mastocitos en el tejido conectivo de alrededor del tumor. También se observa el daño celular producido por la IR.

Por otra parte, en el tratamiento con CDDP, se aprecian menos diferencias entre grupos. En el grupo control, en cuanto a la diferenciación se observa un predominio de las zonas pseudoglandulares (zonas PAS-positivas), y el componente escamoso presenta una diferenciación que varía entre moderada y alta. Sin embargo, la tinción con PS muestra una cápsula de colágeno poco organizada en torno al tumor e, incluso, se identifican zonas de invasión estromal (Fig. 33 M-P). Los tumores de los ratones tratados con CDDP presentan unas características histológicas similares a las comentadas para el grupo anterior. No obstante, en este caso predomina el componente escamoso frente al pseudoglandular. Además, la cápsula de colágeno, aunque es difusa, es más evidente que la observada en el control (Fig. 33 S). En el grupo de ratones tratados con la combinación de CDDP y melatonina, se observa una reducción del quiste central. Además, en estos tumores también predomina el componente escamoso, con una diferenciación de moderada a alta y la zona pseudoglandular, aunque existe, es menor que en los grupos anteriores (Fig. 33 U-X). En cuanto a la capsula peritumoral, se observa una capsula de colágeno alrededor de este (Fig. 33 W). Las principales características del análisis histológico se encuentran resumidas en la Tabla 3.

IR



CDDP

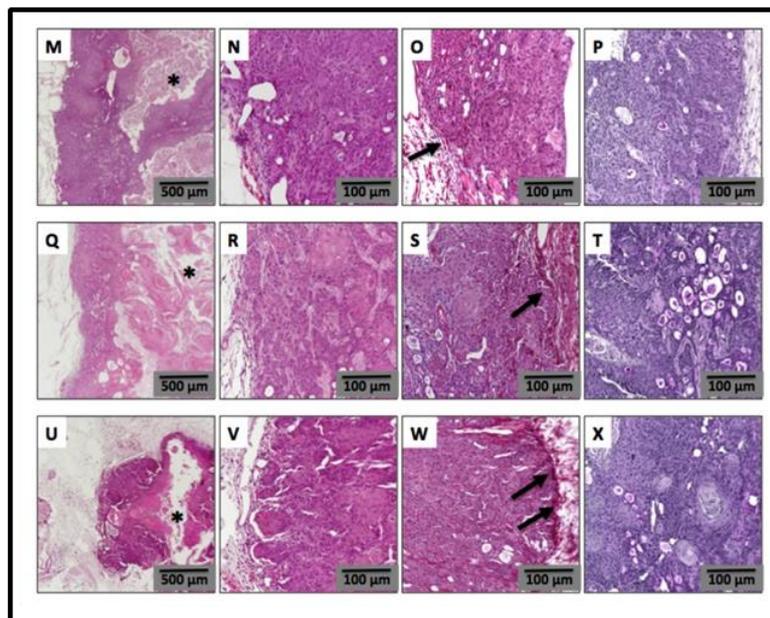


Figura 33: Estudio histológico del tratamiento combinado con melatonina e IR o CDDP en la en un modelo de xenoinjerto de cáncer de cabeza y cuello. Imágenes representativas del análisis histológico e histoquímico. Tumores teñidos con E&H, picrosirius (PS) y PAS del grupo control (ratones con tumores tratados con vehículo) (A-D) y (M-P), ratones tratados con IR (E-H) o CDDP (Q-T), y ratones tratados con IR + aMT (I-L) o CDDP + aMT (U-X). Los asteriscos indican la cavidad quística que se formó dentro de todos los tumores. Las flechas negras muestran las capsulas ricas en colágeno en la interfase entre el tumor y el estroma. Los grupos tratados incluyen control (ratones con tumores tratados con vehículo), IR, CDDP 4 mg/kg, melatonina (aMT) 300 mg/kg y CDDP o IR con aMT n = 6 por grupo. Los datos se presentan como media \pm SEM. ** $P < .01$, *** $P < .001$ vs. control, # $P < .05$, ### $P < .001$ vs. grupos tratados con IR o CDDP.

Tabla 3 Resumen comparativo de los principales elementos histológicos presentes en los tumores tras el tratamiento combinado con melatonina e IR o CDDP

Histological features	Control CDDP	CDDP	CDDP + aMT	Control IR	IR	IR + aMT
Squamous differentiation (0 - +++)	+++	+++	++	+	+++	++
Horn pearl formation	Yes	Yes	Yes	No	Yes	Yes
Glandular differentiation (0 - +++)	+	++	++	++	++	++
Cyst formation	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
Capsule formation	Poorly structured	Yes, diffuse	Yes, moderately formed	Yes, discontinued	Yes, diffuse	Yes, well-formed
Stromal invasion	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
Perivascular invasion	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
Inflammation or host reaction	Some infiltrating neutrophils	No	No	Perivascular and peritumoral lymphocytes	No inflammation Mast cells hyperplasia	No inflammation Moderate mast cells hyperplasia
Necrosis	Yes, tumoral	Yes, tumoral	Yes, tumoral	Yes, tumoral	Yes, tumoral	Yes, tumoral

6. La melatonina protege a los tejidos normales de la toxicidad inducida por la irradiación y por el CDDP

Una de las mayores limitaciones del tratamiento con RT es el desarrollo de efectos secundarios. En nuestro estudio, la melatonina disminuyó la LPO en el hígado y en los riñones (Fig. 34 A, E). También disminuyó los niveles de nitritos (NOx) en todos los tejidos analizados de los ratones tratados con IR (Fig. 34 B, D, F). En el caso del CDDP, el principal efecto adverso es la nefrotoxicidad. La melatonina contrarrestó la

citotoxicidad renal inducida por el CDDP, reduciendo la LPO y los niveles de NOx en los riñones (Fig. 34 K, L), confirmando, por tanto, que la administración de melatonina reduce el daño inducido por el CDDP en las células renales, como consecuencia de su efecto protector a nivel mitocondrial (Mukhopadhyay et al. 2012). Además, también se analizó el daño oxidativo tras el tratamiento con CDDP en el hígado (Fig. 34 G, H) y en el corazón (Fig. 34 I, J). Sin embargo, solo se encontró un aumento de los niveles de NOx en el hígado, que fue contrarrestado por la melatonina (Fig. 34 H).

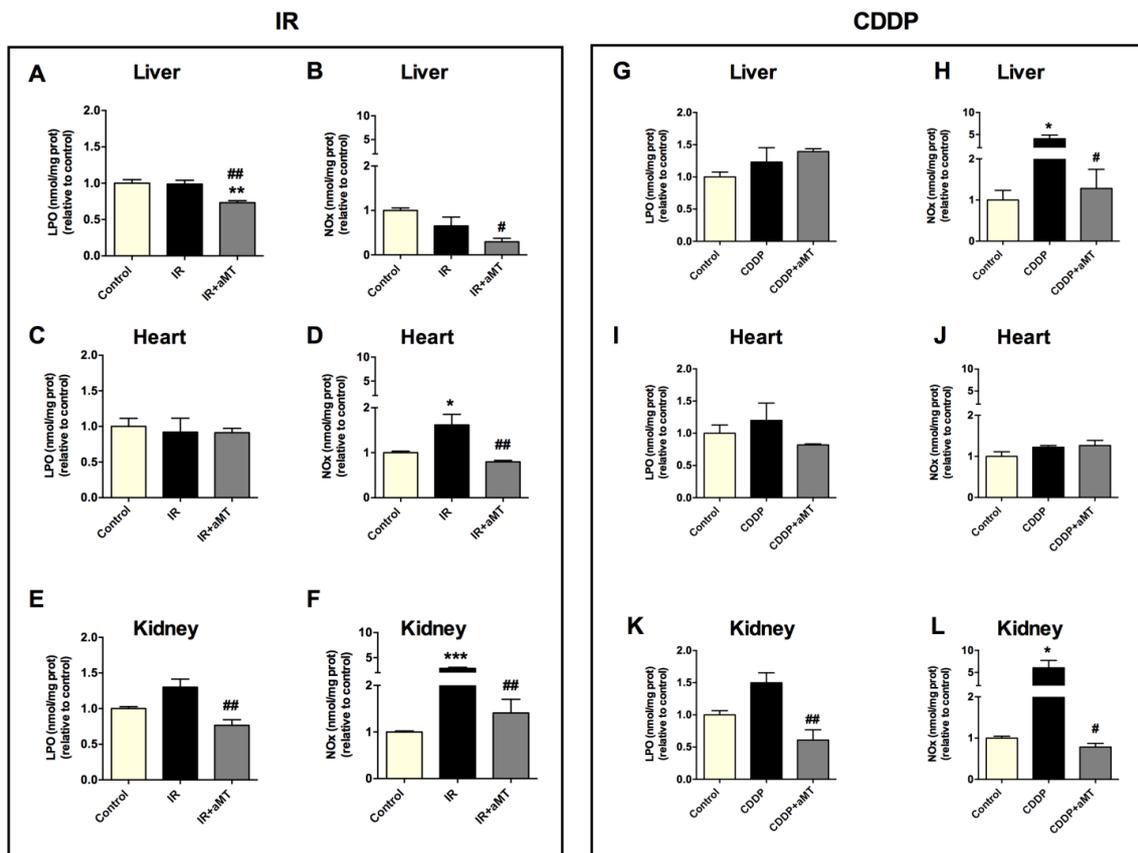


Figura 34: La melatonina protege los tejidos normales de la citotoxicidad inducida por la radiación y por el CDDP. El tratamiento con melatonina redujo los niveles de LPO en hígado (A) y contrarrestó el incremento de LPO en el corazón y riñones de los ratones irradiados (C, E). La melatonina también contrarrestó los niveles de NOx inducidos en el hígado, corazón y riñones (B, D, F). En ratones tratados con CDDP, la melatonina redujo la LPO en riñones (K) y contrarrestó los niveles de NOx en hígado y riñones (H, L). Los grupos tratados incluyen control (ratones con tumores tratados con vehículo), IR, CDDP 4 mg/kg, melatonina (aMT) 300 mg/kg y CDDP o IR con aMT n = 6 por grupo. Los datos se presentan como media \pm SEM. **P<.01, *P<.001 vs. control, #P<.05, ###P<.001 vs. grupos tratados con IR o CDDP.**

V. DISCUSIÓN

La resistencia a la radiación y a la quimioterapia continúa siendo el mayor obstáculo para una terapia citotóxica efectiva en el cáncer. El fallo de los tratamientos usuales genera situaciones de incertidumbre y de estrés en los pacientes reduciendo de manera significativa su calidad de vida. Por tanto, encontrar un tratamiento coadyuvante para suprimir o reducir esta resistencia podría representar una gran mejora, tanto para pacientes como para el sistema sanitario en su conjunto. Por otra parte, los tratamientos que se usan actualmente presentan un alto grado de toxicidad en las células sanas. En este estudio, demostramos que la melatonina aumenta significativamente la citotoxicidad de la irradiación y del CDDP en las células tumorales de cabeza y cuello, tal y como se refleja en la reducción de la proliferación celular y de la clonogenicidad, así como en la inducción de la apoptosis. Aunque la actividad antitumoral de la melatonina ha sido descrita en muchos trabajos (R. Reiter et al. 2017; Casado-Zapico et al. 2010; R. J. Reiter et al. 2016), los potenciales mecanismos implicados en estos procesos todavía permanecen poco claros. A pesar de todos los estudios desarrollados, se han descrito tantos posibles mecanismos que podrían explicar los efectos oncostáticos de la melatonina, como tipos de tumores. Esto sugiere que todos estos mecanismos descritos podrían ser meros efectos epifenómicos de un mecanismo subyacente de la melatonina desconocido hasta el momento (R. J. Reiter et al. 2016; R. J. Reiter, Tan, and Galano 2014).

En este trabajo, no solo demostramos el papel de la melatonina como potenciador de los efectos antitumorales de la irradiación y del CDDP, sino que también, y más importante si cabe, clarificamos el posible mecanismo de la melatonina implicado en la potenciación de las propiedades antitumorales de otros tratamientos.

Se ha visto que las células tumorales presentan una mayor resistencia a la muerte celular programada debido, en muchas ocasiones, a alteraciones en la función mitocondrial ya que la mitocondria controla estos procesos de muerte celular (Hanahan and Weinberg 2000). Se ha sugerido que esta resistencia a la apoptosis se debe a la plasticidad que tienen la mayoría de las células tumorales para modificar su metabolismo mitocondrial (Paolo Ettore Porporato et al. 2018). Además, recientemente hemos demostrado en nuestro Grupo de Investigación que la melatonina incrementa la diferenciación de células madre neurales, debido a un incremento en la función mitocondrial (Mendivil-Perez et al. 2017). Un mecanismo similar podría, en nuestra opinión, ocurrir en las células tumorales. De acuerdo con todo lo expuesto anteriormente, nuestra hipótesis es que la melatonina podría estar incrementando los niveles de producción de ROS mediante el aumento de la función mitocondrial en las células tumorales y, por tanto, aumentar la diferenciación celular. En consecuencia, se espera que la diferenciación celular de las células tumorales sea causada por un cambio en el metabolismo celular, lo que aumentaría la sensibilidad del tumor a otros fármacos. En este estudio demostramos, por primera vez, que el incremento de la citotoxicidad de la irradiación y del CDDP provocado por la melatonina es, en parte, debido a un incremento en la función mitocondrial.

Nuestros resultados muestran que la apoptosis inducida por la melatonina coincide con un aumento significativo de la proteína pro-apoptótica Bax y con el descenso de la proteína anti-apoptótica Bcl-2 en las células HNSCC. La sobreexpresión de Bcl-2 se asocia con una considerable resistencia celular a la apoptosis en el cáncer (Perciavalle et al. 2012). Cuando el ratio Bax/Bcl-2 aumenta, el poro de transición mitocondrial se abre y, a su vez, libera proteínas mitocondriales apoptogénicas para

activar las caspasas que inducen la apoptosis celular (Kang and Reynolds 2009). Curiosamente, el tratamiento combinado con melatonina más cisplatino provocó mayor citotoxicidad que el tratamiento combinado con melatonina e irradiación. La mayor parte de las células irradiadas puede tardar más en entrar en apoptosis que las células tratadas con CDDP. Otros autores, como Mirzayans y cols. (Mirzayans, Andrais, and Murray 2017) observaron también que diferentes tipos de líneas celulares como las HCT116, MCF7 y AT12 son marcadamente resistentes a la apoptosis en respuesta a la radiación ionizante. En este sentido, es posible clasificar ampliamente los mecanismos de muerte celular en dos clases: aquellos que ocurren relativamente pronto después de la irradiación y antes de la división celular y que conducen a la muerte celular temprana; y aquellos que ocurren tras la división celular y que llevan a una muerte celular tardía. La gran mayoría de las células normales y tumorales en proliferación mueren después de un período relativamente largo después de la irradiación, generalmente después de haber entrado en mitosis una o más veces. Como resultado, las alteraciones en un gen particular podrían alterar dramáticamente los niveles de apoptosis inducida por la radiación, sin cambiar la capacidad general de la célula para sobrevivir (Wouters 2009). En este caso, las células mueren independientemente de que la apoptosis se induzca posteriormente. Por otro lado, el efecto citotóxico es dependiente de las concentraciones del fármaco, del tiempo de exposición y del tiempo transcurrido después de la exposición (Janson et al. 2008). En general, el CDDP induce una parada del ciclo celular o induce apoptosis cuando se administra a concentraciones más bajas e induce necrosis a concentraciones más altas, aunque el efecto difiere entre las distintas líneas celulares. Dado que la exposición al cisplatino induce un deterioro mitocondrial y posteriormente promueve la muerte

celular (Santandreu, Roca, and Oliver 2010), pensamos que un aumento de la actividad metabólica mitocondrial podría aumentar la citotoxicidad del cisplatino en las células tumorales. Para explicar nuestras observaciones, investigamos el efecto de los tratamientos objeto de dicho estudio en la respiración mitocondrial. Encontramos que la melatonina combinada con la irradiación o con el CDDP incrementa la capacidad respiratoria máxima y la producción de ATP. Durante los últimos estadios de la apoptosis, los niveles de ATP disminuyeron, principalmente debido a la pérdida de la función mitocondrial y a una reducción del consumo de dicha molécula por las proteasas dependientes de ATP (Zhou et al. 2012). En concordancia con este hallazgo, observamos una disminución de los niveles de ATP tras el tratamiento combinado con irradiación más melatonina 1500 μ M en comparación con el tratamiento combinado con irradiación más melatonina 500 μ M. Estos resultados son consistentes con el aumento de la apoptosis a una concentración de melatonina 1500 μ M cuando se utiliza sola o combinada con la irradiación. Sin embargo, el tratamiento combinado de melatonina y CDDP fue más tóxico que el tratamiento combinado de melatonina e irradiación. El hecho de que la privación de ATP aparezca en todos los tipos de muerte celular sugiere que el metabolismo energético puede desempeñar un papel crítico en la supervivencia de las células tumorales en condiciones de estrés. Así mismo, demostramos que el fuerte efecto antitumoral de la irradiación o del CDDP combinados con la melatonina se debía, en parte, a un aumento de la función mitocondrial.

Las mitocondrias también contienen otras moléculas, como el ADNmt, que pueden actuar como señales de daño extracelular (Lorenzo Galluzzi, Kepp, and Kroemer 2012). Nuestros resultados muestran que la melatonina incrementa la masa

mitocondrial y el número de copias de ADNmt de una manera dosis-dependiente, al mismo tiempo que incrementa la sensibilidad de la irradiación y del CDDP.

La liberación de ADNmt, desde el núcleo hacia el citosol y hacia el espacio extracelular, se requiere para activar las respuestas autoinmunes antitumorales de forma óptima tras la quimio y la radioterapia (Vanpouille-Box et al. 2017). Por tanto, el ADNmt también funciona como una señal de peligro para conectar las respuestas de estrés intracelular a la preservación de la homeostasis extracelular (Lorenzo Galluzzi et al. 2016).

Por otro lado, la autofagia es uno de los principales mecanismos implicados en el control de la homeostasis celular (Marinković et al. 2018). Hay evidencias que sugieren que la autofagia tiene una función de pro-supervivencia, Sin embargo, un exceso de autofagia podría llevar a la muerte celular, un proceso morfológicamente diferente de la apoptosis (Kulikov et al. 2017). Además, las células tumorales con una autofagia deficiente, que sucumben a la quimio y a la radioterapia *in vivo*, pierden su habilidad para llevar a cabo la inmunidad antitumoral (Paolo Ettore Porporato et al. 2018). Hemos detectado un incremento en la expresión de ATG12-ATG5 tras el tratamiento con altas concentraciones de melatonina en comparación con la irradiación y con el CDDP cuando se administran solos. Estos marcadores de autofagia juegan un papel importante en la biogénesis y en la elongación de la membrana. Sin embargo, Nix, que es necesario para la eliminación selectiva de mitocondrias dependiente de mitofagia (Schweers et al. 2007), solo se incrementa cuando se utilizan altas concentraciones de melatonina combinadas con CDDP. El papel de la mitofagia en el cáncer es controvertido. La mitofagia puede facilitar la supervivencia a través de adaptaciones al estrés. Sin embargo, defectos en la mitofagia promueven la

diseminación metastática (Chourasia et al. 2015), probablemente debido a una sobreproducción moderada de ROS, que activa múltiples cascadas de transducción de señales asociadas con la diseminación metastática (Paolo E. Porporato et al. 2014). Por el contrario, en condiciones de estrés oxidativo severo, los ROS inhiben *de facto* la diseminación metastática, muy probablemente como consecuencia directa de un aumento de la apoptosis (Piskounova et al. 2015; Sayin et al. 2014).

Por tanto, dado que las mitocondrias son la principal fuente celular productora de ROS, nuestra hipótesis era que la melatonina podría aumentar los efectos citotóxicos de la irradiación y del CDDP debido a un incremento de la producción de ROS. Medimos los niveles de ROS y observamos que, efectivamente, la melatonina aumentaba significativamente los ROS intracelulares en las células expuestas a la irradiación o al CDDP. Sin embargo, los niveles de ROS fueron mayores en el tratamiento combinado con melatonina y CDDP que con el tratamiento combinado con melatonina e irradiación. Otros estudios llevados a cabo por otros Grupos de Investigación refuerzan nuestras conclusiones, ya que encontraron que la expresión de las enzimas antioxidantes se incrementa en células tumorales CDDP-resistentes, en comparación con las células no resistentes, y que la disfunción mitocondrial podría otorgar resistencia al CDDP debido a la ausencia o a la reducción de las respuestas de los ROS mitocondriales (Marullo et al. 2013).

Los ROS acumulados intracelularmente que dañan las proteínas de las organelas, enzimas y las membranas, activan en última instancia las vías de señalización apoptótica. Los ROS pueden causar muerte celular ya sea directamente o a través de la activación de cascadas proapoptóticas intracelulares (Redza-Dutordoir and Averill-Bates 2016). Además de desencadenar la apoptosis, el estrés celular puede

promover un arresto proliferativo permanente conocido como senescencia celular (Childs et al. 2017) (Fig. 35).

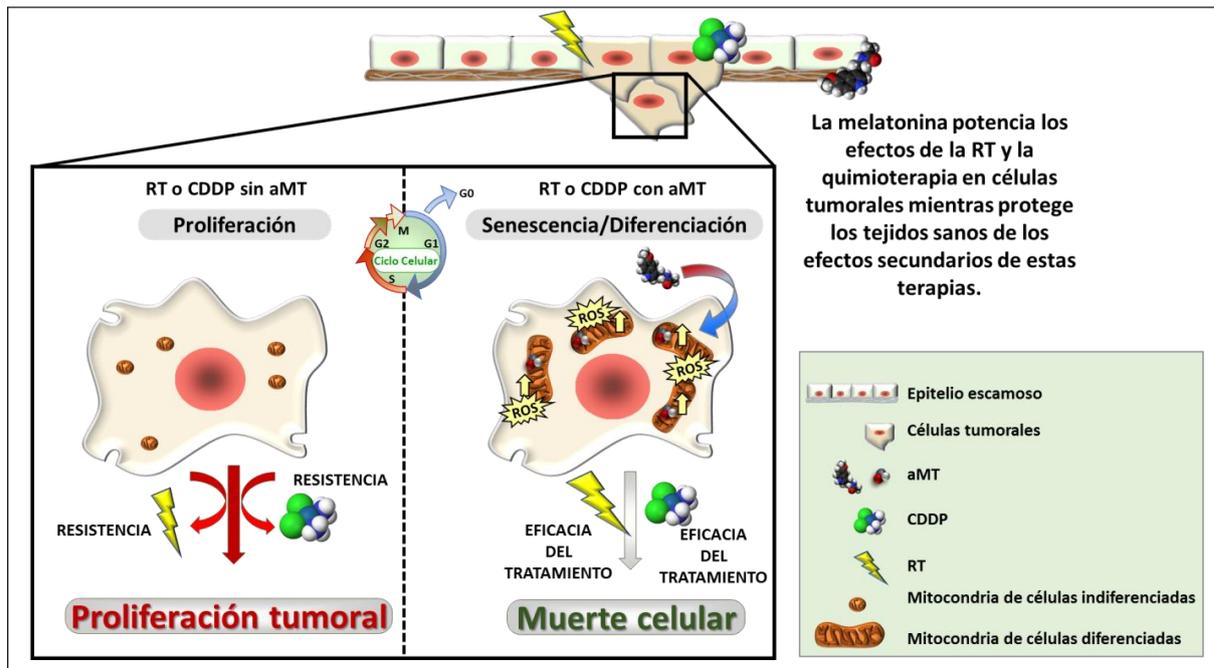


Figura 35. La melatonina potencia los efectos de la RT y la quimioterapia en células tumorales mientras protege los tejidos sanos de los efectos secundarios de estas terapias.

Por tanto, incrementar el estrés oxidativo dirigido a las mitocondrias sería una nueva estrategia terapéutica para eliminar las células tumorales selectivamente. Nuestros resultados indican claramente que la potenciación de los efectos citotóxicos y proapoptóticos de la irradiación y del CDDP ejercida por la melatonina está mediada, al menos en parte, por la activación de la función mitocondrial y, subsecuentemente, por la superproducción de ROS *in vitro* de una manera dosis-dependiente. Sin embargo, en el estudio piloto llevado a cabo *in vivo*, los efectos de la melatonina y de la irradiación o de la melatonina y del CDDP fueron menos significantes que *in vitro*. Nuestros datos sugieren que hay una correlación entre el contenido celular de

melatonina y sus efectos apoptóticos, lo que apoya la idea de que se requieren altas concentraciones de melatonina en las células tumorales para potenciar los efectos citotóxicos de la irradiación y del CDDP.

Debido a que el tumor impide la entrada de melatonina, la efectividad antitumoral de esta indoleamina es baja cuando se administra *in vivo*, lo que abre un nuevo campo de investigación para mejorar la actividad oncostática de la melatonina. No obstante, el análisis histológico reveló la presencia de células tumorales dañadas después de los tratamientos combinados con melatonina e irradiación o con melatonina y CDDP, incluso con niveles bajos de melatonina en el tumor.

Una limitación importante en el uso de la irradiación con fines terapéuticos es el desarrollo de efectos secundarios. Estudios anteriores en nuestro Grupo de Investigación se ha demostrado que la melatonina no solo mejora los efectos oncostáticos de la quimioterapia en las células tumorales (Shen et al. 2018), sino que también protege las células normales de los efectos adversos de estos tratamientos (Ortiz et al. 2015; Fernandez-Gil et al. 2017; Abdel Moneim et al. 2017). En nuestro Grupo de Investigación se ha patentado un gel de melatonina para prevenir y/o curar la mucositis, con el cual se ha completado un ensayo clínico en fase II (número EudraCT: 2015-001534-13) en 80 pacientes con cáncer de cabeza y cuello en 10 hospitales en España. Los resultados han sido muy significativos, demostrando que el gel de melatonina protege la mucosa oral previniendo la aparición de mucositis. Próximamente se va a iniciar el ensayo clínico en fase III en 300 pacientes en Europa. Todos estos datos demuestran que la melatonina constituye una estrategia adyuvante innovadora en el tratamiento del cáncer.

En conclusión, nuestro estudio sugiere que altas dosis de melatonina sensibilizan las células cancerosas al CDDP y a la irradiación al mejorar su función mitocondrial. La melatonina es un inductor de ROS en el cáncer de cabeza y cuello, y la acumulación de ROS intracelular juega un papel muy importante en la inducción de la apoptosis mediada por la mitocondria. Nuestros hallazgos indican que la melatonina tiene un gran potencial, no solo para aumentar la sensibilidad a la radio y a la quimioterapia como el cisplatino u otros quimioterápicos, sino también para reducir la toxicidad causada por los radioterápicos y quimioterápicos en pacientes con cáncer. Nuestro estudio podría proporcionar una base y pautas para la aplicación del tratamiento con melatonina combinada con radioterapia o con CDDP o con otros agentes quimioterápicos para mejorar la eficacia terapéutica de los antitumorales, especialmente para carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello.

VI. PERSPECTIVAS FUTURAS

Dados los prometedores resultados in vitro con el tratamiento combinado de melatonina con irradiación o con CDDP en el modelo de células tumorales de cáncer de cabeza y cuello, se propone continuar con el estudio en otros modelos tumorales. Actualmente, y en colaboración con el laboratorio Brain Tumor Stem Cell de la Clínica Mayo en Jacksonville en Florida bajo la dirección del Dr. Quiñones-Hinojosa (catedrático y jefe del departamento de Neurocirugía), estamos estudiando los efectos de la melatonina a altas concentraciones en un modelo de glioblastoma, el cáncer más común y más agresivo del sistema nervioso central, tanto in vitro como in vivo. El astrocitoma de grado IV, glioblastoma o glioblastoma multiforme (“multiforme” ya no forma parte de la designación de la OMS, aunque glioblastoma aún se abrevia frecuentemente como “GBM”) es el grado más alto de tumor del tipo glioma. Las características histológicas que distinguen a los glioblastomas de todos los demás grados son la presencia de necrosis y el aumento de angiogénesis circundante al tumor. Los tumores de grado IV siempre son tumores de crecimiento rápido y con un alto nivel de malignidad, y son más comunes en varones adultos de más de 45 años. Los glioblastomas se forman a partir de tejido cerebral normal, son infiltrativos y pueden invadir y migrar fuera del tumor principal dentro del cerebro; sin embargo, los glioblastomas raramente metastatizan (American Brain Tumor Association 2018).

Las estadísticas de GBM son desalentadoras. Para el 2018 se esperan alrededor de 16 000 nuevos casos de gliomas de alto grado en Estados Unidos, de los cuales la mayoría serán GBM. La supervivencia a los 5 años es menor al 5%. Tras el diagnóstico, el GBM sigue siendo un tumor incurable con una supervivencia media de solo 15 meses bajo el estándar de tratamiento y de solo 3 meses en pacientes que no se tratan (Tamimi and Juweid 2017).

El estándar de tratamiento incluye resección quirúrgica más radioterapia y quimioterapia (Temozolomida, TMZ) concomitante. A pesar de los avances, estos tratamientos solo consiguen aumentar la supervivencia unos meses (Stupp et al. 2005).

Este tipo de tumores presenta una alta población de células tipo *stem* o células iniciadoras de tumores cerebrales, conocidas como BTICs por sus siglas en inglés, *Brain Tumor Initiating Cells*. En estas células reside principalmente la resistencia a los tratamientos, por su capacidad de evadir las terapias y su capacidad para regenerar el tumor.

Los experimentos se están llevando a cabo en líneas celulares primarias, derivadas directamente del quirófano, sin inmortalizar. GBM1A y QNS120 son las 2 líneas en las que se están realizando los ensayos hasta el momento, ambas procedentes de sujetos masculinos.

En los resultados preliminares para la línea celular GBM1A, se observa que, aplicando melatonina a altas concentraciones, hay una reducción en la viabilidad, la migración y la proliferación celular (Fig. 36).

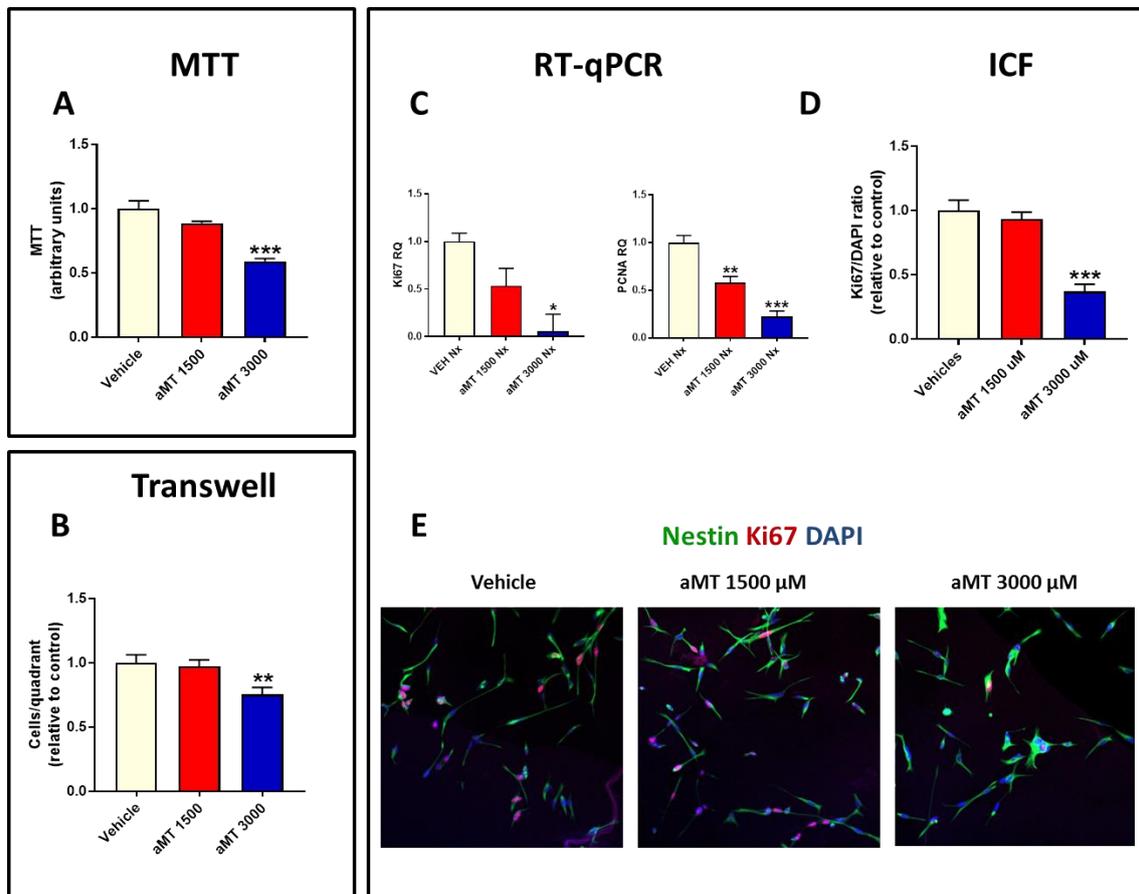


Figura 36. La melatonina a altas concentraciones reduce la viabilidad, la migración y la proliferación de las células de GBM, GBM1A. Ensayo de viabilidad de las células expuestas a aMT (Figura (A)). Ensayo de migración (transwell) (Figura (B)). Expresión de los genes PCNA y Ki67 (Figura (C)). Inmunofluorescencia para Nestina, Ki67 y DAPI. Ratio Ki67/DAPI (Figuras (D) y (E)). Los grupos tratados incluyen control (vehículo), melatonina (aMT) 1500 o 3000 μ M. $n = 3$ por grupo. Los datos se presentan como media \pm SEM. * $P < .05$, ** $P < .01$, *** $P < .001$ vs. Control.

Al igual que en las líneas celulares de cáncer de cabeza y cuello, observamos una correlación entre el aumento de ROS y estos efectos antitumorales. Los ROS inducirían una diferenciación celular que haría más vulnerables estas células a las terapias, llegando a presentar un efecto sinérgico cuando combinamos el tratamiento de melatonina con Temozolomida (Fig. 37).

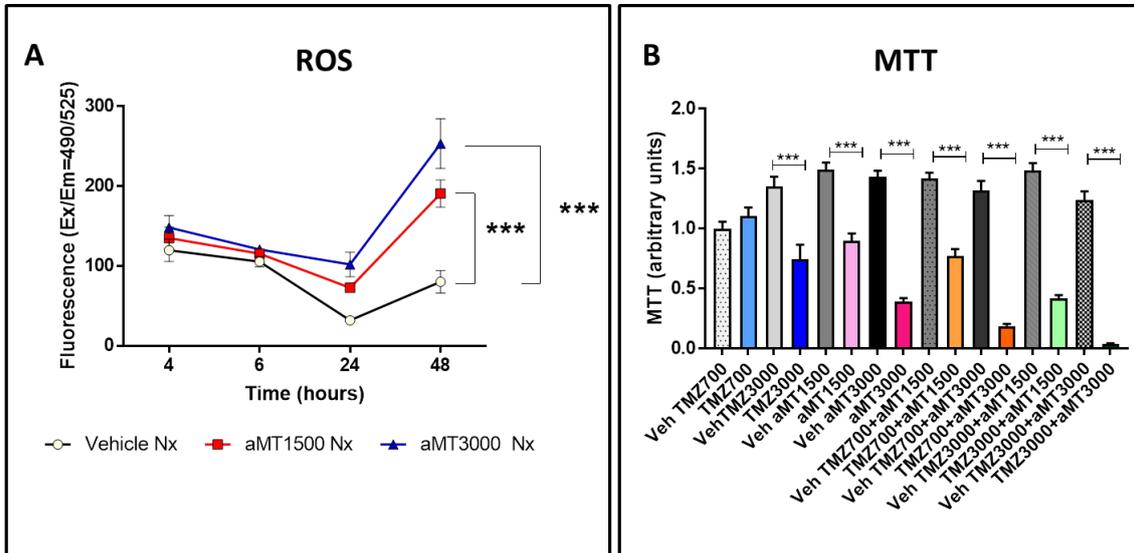


Figura 36. La melatonina a altas concentraciones produce un aumento en la producción de ROS que disminuye la viabilidad de forma sinérgica cuando se combina con TMZ en las células de GBM, GBM1A. Niveles de ROS en las células expuestas a aMT durante 48 h (Figura (A)). Ensayo de viabilidad de las células expuestas a aMT combinada con TMZ (Figura (B)). Los grupos tratados incluyen vehículos, melatonina (aMT) 1500 o 3000 μ M. $n = 3$ por grupo. Los datos se presentan como media \pm SEM. * $P < .05$, ** $P < .01$, *** $P < .001$ vs. Control.

Todos estos resultados están siendo estudiados en profundidad para su próxima publicación, y serán objeto de mi estancia posdoctoral

VII. CONCLUSIONS

According to the results obtained in this Doctoral Thesis, we can conclude:

First: High concentrations of melatonin enhance the cytotoxic effects of irradiation and cisplatin in head and neck squamous cells carcinoma cells by reducing clonogenic ability, cell viability and increasing cell apoptosis.

Second: Melatonin leads to several mitochondrial changes in HNSCC cells, affecting their function. These changes involve an increase in the mitochondrial mass, mitochondrial DNA and mitochondrial respiration.

Third: High concentrations of melatonin combined with irradiation increases autophagy. The combined treatment of melatonin with cisplatin showed higher cytotoxicity, not only inducing autophagy but also mitophagy

Fourth: Melatonin-induced mitochondrial activity enhancement leads to an increase in the ROS production which drives a rise in the oxidative stress, verified by the higher GSSG/GSH ratio and the reduction of the GPx levels at highest melatonin concentrations combined with the treatments. .

Fifth: The induction of cell death by melatonin was higher in vitro than in vivo. These results suggest that the apoptotic effects of melatonin are concentration-dependent. Therefore, enhancing the cytotoxic effects of irradiation or CDDP in combination with melatonin in vivo will require novel formulations to achieve adequate concentrations. Nevertheless, histological analysis revealed the presence of damaged tumor cells following the combined treatments.

Sixth: Melatonin protects normal tissues from radio- or chemotherapy side effects by lowering LPO and nitrite levels after combined treatment of melatonin and irradiation or cisplatin.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Abdel Moneim, A.E., A. Guerra-Librero, J. Florido, Y.-Q. Shen, B. Fernández-Gil, D. Acuña-Castroviejo, and G. Escames. 2017. "Oral Mucositis: Melatonin Gel an Effective New Treatment." *International Journal of Molecular Sciences* 18 (5). doi:10.3390/ijms18051003.
- Acuña-Castroviejo, Darío, Miguel Carretero, Carolina Doerrier, Luis C. López, Laura García-Corzo, Jesús A. Tresguerres, and Germaine Escames. 2012. "Melatonin Protects Lung Mitochondria from Aging." *AGE* 34 (3): 681–92. doi:10.1007/s11357-011-9267-8.
- Acuña-Castroviejo, Darío, Germaine Escames, Carmen Venegas, María E. Díaz-Casado, Elena Lima-Cabello, Luis C. López, Sergio Rosales-Corral, Dun-Xian Tan, and Russel J. Reiter. 2014. "Extrapineal Melatonin: Sources, Regulation, and Potential Functions." *Cellular and Molecular Life Sciences* 71 (16): 2997–3025. doi:10.1007/s00018-014-1579-2.
- Acuña-Castroviejo, Darío, Ibtissem Rahim, Carlos Acuña-Fernández, Marisol Fernández-Ortiz, Jorge Solera-Marín, Ramy K. A. Sayed, María E. Díaz-Casado, Iryna Rusanova, Luis C. López, and Germaine Escames. 2017. "Melatonin, Clock Genes and Mitochondria in Sepsis." *Cellular and Molecular Life Sciences* 74 (21). Springer International Publishing: 3965–87. doi:10.1007/s00018-017-2610-1.
- Ahmad, Parwez, Jiri Sana, Marek Slavik, Pavel Slampa, Pavel Smilek, and Ondrej Slaby. 2017. "MicroRNAs Involvement in Radioresistance of Head and Neck Cancer." *Disease Markers*. Hindawi Publishing Corporation, 1–8. doi:10.1155/2017/8245345.

Almeida, Luciana O., Aline C. Abrahao, Luciana K. Rosselli-Murai, Fernanda S. Giudice, Chiara Zagni, Andreia M. Leopoldino, Cristiane H. Squarize, and Rogerio M. Castilho. 2014. "NFκB Mediates Cisplatin Resistance through Histone Modifications in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma (HNSCC)." *FEBS Open Bio* 4 (1). Elsevier Ltd.: 96–104. doi:10.1016/j.fob.2013.12.003.

Alonso-González, Carolina, Alicia González, Carlos Martínez-Campa, Javier Menéndez-Menéndez, José Gómez-Arozamena, Angela García-Vidal, and Samuel Cos. 2016. "Melatonin Enhancement of the Radiosensitivity of Human Breast Cancer Cells Is Associated with the Modulation of Proteins Involved in Estrogen Biosynthesis." *Cancer Letters* 370 (1). Elsevier Ireland Ltd: 145–52. doi:10.1016/j.canlet.2015.10.015.

American Brain Tumor Association. 2018. "Brain Tumor Types." Accessed April 11. www.abta.org.

American Cancer society. 2014. "The Science Behind Radiation Therapy." *American Cancer Society*, 15.

Aminuddin, Amnani, and Pei Yuen Ng. 2016. "Promising Druggable Target in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: Wnt Signaling." *Frontiers in Pharmacology* 7 (AUG): 1–13. doi:10.3389/fphar.2016.00244.

Andreassen, Christian Nicolaj, Cai Grau, and Jacob Christian Lindegaard. 2003. "Chemical Radioprotection : A Critical Review of Amifostine as a Cytoprotector in Radiotherapy." *Seminars in Radiation Oncology* 13 (1): 62–72. doi:10.1053/srao.2003.50006.

Bann, Darrin V., Daniel G. Deschler, and Neerav Goyal. 2016. "Novel

- Immunotherapeutic Approaches for Head and Neck Squamous Cell Carcinoma.” *Cancers* 8 (10): 1–20. doi:10.3390/cancers8100087.
- Barczak, Wojciech, Pawel Golusinski, Lukasz Luczewski, Wiktoria M. Suchorska, Michal M. Masternak, and Wojciech Golusinski. 2016. “The Importance of Stem Cell Engineering in Head and Neck Oncology.” *Biotechnology Letters* 38 (10): 1665–72. doi:10.1007/s10529-016-2163-7.
- Baskar, Rajamanickam, and Koji Itahana. 2017. “Radiation Therapy and Cancer Control in Developing Countries: Can We Save More Lives?” *International Journal of Medical Sciences* 14 (1): 13–17. doi:10.7150/ijms.17288.
- Bauml, Joshua M, Ravi Vinnakota, Yeun-Hee Anna Park, Susan E Bates, Tito Fojo, Charu Aggarwal, Sewanti Limaye, et al. 2019. “Cisplatin Every 3 Weeks Versus Weekly With Definitive Concurrent Radiotherapy for Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck.” *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* 111 (5): 12–17. doi:10.1093/jnci/djy133.
- Benítez-King, G., and F. Antón-Tay. 1993. “Calmodulin Mediates Melatonin Cytoskeletal Effects.” *Experientia* 49 (8): 635–41. doi:10.1007/BF01923944.
- Benítez-King, G., L. Huerto-Delgadillo, and F. Antón-Tay. 1993. “Binding of 3H-Melatonin to Calmodulin.” *Life Sciences* 53 (3): 201–7. doi:10.1016/0024-3205(93)90670-X.
- Benitez-King, Gloria. 2006. “Melatonin as a Cytoskeletal Modulator: Implications for Cell Physiology and Disease.” *Journal of Pineal Research* 40 (1): 1–9. doi:10.1111/j.1600-079X.2005.00282.x.

- Benítez-King, Gloria, Amelia Ríos, Aída Martínez, and Fernando Antón-Tay. 1996. "In Vitro Inhibition of Ca²⁺/Calmodulin-Dependent Kinase II Activity by Melatonin." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1290 (2): 191–96. doi:10.1016/0304-4165(96)00025-6.
- Bizzarri, Mariano, Sara Proietti, Alessandra Cucina, and Russel J Reiter. 2013. "Molecular Mechanisms of the Pro-Apoptotic Actions of Melatonin in Cancer: A Review." *Expert Opinion on Therapeutic Targets* 17 (12). Informa UK, Ltd.: 1483–96. doi:10.1517/14728222.2013.834890.
- Bossi, Paolo, and Salvatore Alfieri. 2016. "The Benefit of a Multidisciplinary Approach to the Patient Treated with (Chemo) Radiation for Head and Neck Cancer." *Current Treatment Options in Oncology* 17 (10). Current Treatment Options in Oncology. doi:10.1007/s11864-016-0431-3.
- Boutin, Jean A, and Gilles Ferry. 2019. "Is There Sufficient Evidence That the Melatonin Binding Site MT 3 Is Quinone Reductase 2?" *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 368 (1): 59–65. doi:10.1124/jpet.118.253260.
- Bratton, D L, V A Fadok, D A Richter, J M Kailey, L A Guthrie, and P M Henson. 1997. "Appearance of Phosphatidylserine on Apoptotic Cells Requires Calcium-Mediated Nonspecific Flip-Flop and Is Enhanced by Loss of the Aminophospholipid Translocase." *The Journal of Biological Chemistry* 272 (42): 26159–65. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9334182>.
- Brauchle, Eva, Sibylle Thude, Sara Y. Brucker, and Katja Schenke-Layland. 2015. "Cell Death Stages in Single Apoptotic and Necrotic Cells Monitored by Raman Microspectroscopy." *Scientific Reports* 4 (1): 4698. doi:10.1038/srep04698.

- Bray, Freddie, Jacques Ferlay, Isabelle Soerjomataram, R Siegel, L Torre, and A Jemal. 2018. "Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries." *CA Cancer J Clin* 68: 394–424. doi:10.3322/caac.21492.
- Breen, Anthony P., and John A. Murphy. 1995. "Reactions of Oxy Radicals with DNA." *Free Radical Biology and Medicine* 18 (6): 1033–77. doi:10.1016/0891-5849(94)00209-3.
- Brierley, D; Gospodarowicz MK; Wittekind C. 2018. *TNM Classification of Malignant Tumors*. Edited by D; Gospodarowicz MK; Wittekind C Brierley. 8th ed. Oxford.
- Bryan, Nathan S, and Matthew B Grisham. 2007. "Methods to Detect Nitric Oxide and Its Metabolites in Biological Samples." *Free Radical Biology and Medicine* 43 (5): 645–57. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2007.04.026.
- Cardinali, Daniel P., and Francisco Freire. 1975. "Melatonin Effects on Brain. Interaction with Microtubule Protein, Inhibition of Fast Axoplasmic Flow and Induction of Crystalloid and Tubular Formations in the Hypothalamus." *Molecular and Cellular Endocrinology* 2 (5): 317–30. doi:10.1016/0303-7207(75)90019-2.
- Carrillo-Vico, Antonio, Patricia Lardone, Nuria Álvarez-Sánchez, Ana Rodríguez-Rodríguez, and Juan Guerrero. 2013. "Melatonin: Buffering the Immune System." *International Journal of Molecular Sciences* 14 (4): 8638–83. doi:10.3390/ijms14048638.
- Casado-Zapico, Sara, Jezabel Rodriguez-Blanco, Guillermo Garcia-Santos, Vanesa Martin, Ana M. Saez-Sanchez, Isaac Antolin, and Carmen Rodriguez. 2010. "Synergistic Antitumor Effect of Melatonin with Several Chemotherapeutic Drugs

on Human Ewing Sarcoma Cancer Cells: Potentiation of the Extrinsic Apoptotic Pathway.” *Journal of Pineal Research* 48 (1): 72–80. doi:10.1111/j.1600-079X.2009.00727.x.

Chattoraj, Asamanja, Tiecheng Liu, Liang Samantha Zhang, Zheping Huang, and Jimo Borjigin. 2009. “Melatonin Formation in Mammals: In Vivo Perspectives.” *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders* 10 (4): 237–43. doi:10.1007/s11154-009-9125-5.

Chen, J, G E Milo, C F Shuler, and D E Schuller. 1996. “Xenograft Growth and Histodifferentiation of Squamous Cell Carcinomas of the Pharynx and Larynx.” *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics* 81 (2): 197–202. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8665315>.

Cheng, Jiao, Hui-Li Yang, Chun-Jie Gu, Yu-Kai Liu, Jun Shao, Rui Zhu, Yin-Yan He, Xiao-Yong Zhu, and Ming-Qing Li. 2018. “Melatonin Restricts the Viability and Angiogenesis of Vascular Endothelial Cells by Suppressing HIF-1 α /ROS/VEGF.” *International Journal of Molecular Medicine*, December. doi:10.3892/ijmm.2018.4021.

Childs, Bennett G., Martina Gluscevic, Darren J. Baker, Remi-Martin Laberge, Dan Marquess, Jamie Dananberg, and Jan M. van Deursen. 2017. “Senescent Cells: An Emerging Target for Diseases of Ageing.” *Nature Reviews Drug Discovery* 16 (10). Nature Publishing Group: 718–35. doi:10.1038/nrd.2017.116.

Choi, Yong-min, Han-kyul Kim, Wooyoung Shim, Muhammad Ayaz Anwar, Ji-Woong Kwon, Hyuk-Kwon Kwon, Hyung Joong Kim, et al. 2015. “Mechanism of Cisplatin-Induced Cytotoxicity Is Correlated to Impaired Metabolism Due to Mitochondrial

- ROS Generation.” Edited by Partha Mukhopadhyay. *PLOS ONE* 10 (8): e0135083. doi:10.1371/journal.pone.0135083.
- Chourasia, Aparajita H., Kristin Tracy, Casey Frankenberger, Michelle L. Boland, Marina N. Sharifi, Lauren E. Drake, Joseph R. Sachleben, et al. 2015. “Mitophagy Defects Arising from BNip3 Loss Promote Mammary Tumor Progression to Metastasis.” *EMBO Reports* 16 (9): 1145–63. doi:10.15252/embr.201540759.
- Colombo, Jucimara, João Marcos Wolf Maciel, Lívia Carvalho Ferreira, Renato Ferreira Da Silva, and Debora Aparecida Pires de Campos Zuccari. 2016. “Effects of Melatonin on HIF-1 α and VEGF Expression and on the Invasive Properties of Hepatocarcinoma Cells.” *Oncology Letters* 12 (1): 231–37. doi:10.3892/ol.2016.4605.
- Connell, Philip P., and Samuel Hellman. 2009. “Advances in Radiotherapy and Implications for the next Century: A Historical Perspective.” *Cancer Research* 69 (2): 383–92. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-6871.
- Cullen, Kevin J., Zejia Yang, Lisa Schumaker, and Zhongmin Guo. 2007. “Mitochondria as a Critical Target of the Chemotherapeutic Agent Cisplatin in Head and Neck Cancer.” *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 39 (1): 43–50. doi:10.1007/s10863-006-9059-5.
- Dasari, Shaloam, and Paul Bernard Tchounwou. 2014. “Cisplatin in Cancer Therapy: Molecular Mechanisms of Action.” *European Journal of Pharmacology* 740: 364–78. doi:10.1016/j.ejphar.2014.07.025.Cisplatin.
- de Almeida Chuffa, Luiz Gustavo, Fábio Rodrigues Ferreira Seiva, Maira Smaniotto Cuciello, Henrique Spaulonci Silveira, Russel J. Reiter, and Luiz Antonio Lupi. 2018.

“Mitochondrial Functions and Melatonin: A Tour of the Reproductive Cancers.”
Cellular and Molecular Life Sciences, November. Springer International Publishing.
doi:10.1007/s00018-018-2963-0.

Di Bella, Giuseppe, Fabrizio Mascia, Luciano Gualano, and Luigi Di Bella. 2013.
“Melatonin Anticancer Effects: Review.” *International Journal of Molecular
Sciences* 14 (2): 2410–30. doi:10.3390/ijms14022410.

Dilruba, Shahana, and Ganna V Kalayda. 2016. “Platinum-Based Drugs: Past, Present
and Future.” *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 77 (6). Springer Berlin
Heidelberg: 1103–24. doi:10.1007/s00280-016-2976-z.

Doerrier, Carolina, José A. García, Huayqui Volt, María E. Díaz-Casado, Marta Luna-
Sánchez, Beatriz Fernández-Gil, Germaine Escames, Luis C. López, and Darío
Acuña-Castroviejo. 2016. “Permeabilized Myocardial Fibers as Model to Detect
Mitochondrial Dysfunction during Sepsis and Melatonin Effects without
Disruption of Mitochondrial Network.” *Mitochondrion* 27 (March). Elsevier B.V.
and Mitochondria Research Society: 56–63. doi:10.1016/j.mito.2015.12.010.

Drexler, J, TF Meaney, and LJ McCormack. 1957. “The Calcified Pineal Body and
Carcinoma.” *Send to Cleve Clin Q* 24 ((4)): 242–47.

El-Missiry, M.A., T.A. Fayed, M.R. El-Sawy, and A.A. El-Sayed. 2007. “Ameliorative
Effect of Melatonin against Gamma-Irradiation-Induced Oxidative Stress and
Tissue Injury.” *Ecotoxicology and Environmental Safety* 66 (2): 278–86.
doi:10.1016/j.ecoenv.2006.03.008.

Elmore, Susan. 2007. “Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death.” *Toxicologic
Pathology* 35 (4): 495–516. doi:10.1080/01926230701320337.

- Engel, P, and S. Fischl. 1954. "Effect of Pineal Extracts on Benzopyrene Tumors." *Send to Z Vitam Horm Fermentforsch.* 6 ((4-5)): 259–68.
- Eriksson, David, and Torgny Stigbrand. 2010. "Radiation-Induced Cell Death Mechanisms." *Tumor Biology* 31 (4): 363–72. doi:10.1007/s13277-010-0042-8.
- Esterbauer, Hermann, and Kevin H. Cheeseman. 1990. "[42] Determination of Aldehydic Lipid Peroxidation Products: Malonaldehyde and 4-Hydroxynonenal." In *Methods in Enzymology*, 186:407–21. doi:10.1016/0076-6879(90)86134-H.
- Fernandez-Gil, B., A.E. Abdel Moneim, F. Ortiz, Y.-Q. Shen, V. Soto-Mercado, M. Mendivil-Perez, A. Guerra-Librero, et al. 2017. "Melatonin Protects Rats from Radiotherapyinduced Small Intestine Toxicity." *PLoS ONE* 12 (4). doi:10.1371/journal.pone.0174474.
- Florea, AM, and D Büsselberg. 2011. "Cisplatin as an Anti-Tumor Drug: Cellular Mechanisms of Activity, Drug Resistance and Induced Side Effects." *Cancers*, no. 13: 2315–25. doi:10.1039/B820550G.
- Franken, Nicolaas A P, Hans M Rodermond, Jan Stap, Jaap Haveman, and Chris van Bree. 2006. "Clonogenic Assay of Cells in Vitro." *Nature Protocols* 1 (5): 2315–19. doi:10.1038/nprot.2006.339.
- Gallegos-Hernández, José Francisco. 2006. "El Cáncer de Cabeza y Cuello. Factores de Riesgo y Prevención Definición y Epidemiología." *Cir Ciruj* 74 (4): 287–93. <http://www.medigraphic.com/pdfs/circir/cc-2006/cc064m.pdf>.
- Gallez, Bernard. 2011. *Encyclopedia of Cancer*. Edited by Manfred Schwab. 3rd ed. Heidelberg. doi:10.1007/978-3-642-16483-5.

- Galluzzi, L, I Vitale, J Michels, C Brenner, G Szabadkai, A Harel-Bellan, M Castedo, and G Kroemer. 2014. "Systems Biology of Cisplatin Resistance: Past, Present and Future." *Cell Death & Disease* 5 (5). Nature Publishing Group: e1257–e1257. doi:10.1038/cddis.2013.428.
- Galluzzi, Lorenzo, Oliver Kepp, and Guido Kroemer. 2012. "Mitochondria: Master Regulators of Danger Signalling." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 13 (12): 780–88. doi:10.1038/nrm3479.
- Galluzzi, Lorenzo, Alejandro López-Soto, Sharad Kumar, and Guido Kroemer. 2016. "Caspases Connect Cell-Death Signaling to Organismal Homeostasis." *Immunity* 44 (2): 221–31. doi:10.1016/j.immuni.2016.01.020.
- Gao, Yue, Xiangsheng Xiao, Changlin Zhang, Wendan Yu, Wei Guo, Zhifeng Zhang, Zhenglin Li, et al. 2017. "Melatonin Synergizes the Chemotherapeutic Effect of 5-Fluorouracil in Colon Cancer by Suppressing PI3K/AKT and NF-KB/INOS Signaling Pathways." *Journal of Pineal Research* 62 (2): e12380. doi:10.1111/jpi.12380.
- Gasser, Jean-Philippe, Michaela Hehl, and Thomas A. Millward. 2009. "A Homogeneous Time-Resolved Fluorescence Resonance Energy Transfer Assay for Phosphatidylserine Exposure on Apoptotic Cells." *Analytical Biochemistry* 384 (1): 49–55. doi:10.1016/j.ab.2008.09.016.
- Grupo Español de Pacientes con Cáncer (GEPAC). 2017. "Cáncer de Cabeza y Cuello España." Accessed September 14. <http://cancercabezaycuello.org/>.
- Gu, Jundong, Siwei Zhu, Xuebing Li, Hua Wu, Yang Li, and Feng Hua. 2014. "Effect of Amifostine in Head and Neck Cancer Patients Treated with Radiotherapy: A Systematic Review and Meta-Analysis Based on Randomized Controlled Trials."

- Edited by Olivier Gires. *PLoS ONE* 9 (5): e95968.
doi:10.1371/journal.pone.0095968.
- Hanahan, D, and R A Weinberg. 2000. "The Hallmarks of Cancer." *Cell* 100 (1): 57–70.
doi:10.1007/s00262-010-0968-0.
- Hevia, David, Pedro González-Menéndez, Isabel Quiros-González, Ana Miar, Aida Rodríguez-García, Dun-Xian Tan, Russel J. Reiter, Juan C. Mayo, and Rosa M. Sainz. 2015. "Melatonin Uptake through Glucose Transporters: A New Target for Melatonin Inhibition of Cancer." *Journal of Pineal Research* 58 (2): 234–50.
doi:10.1111/jpi.12210.
- Hissin, Paul J., and Russell Hilf. 1976. "A Fluorometric Method for Determination of Oxidized and Reduced Glutathione in Tissues." *Analytical Biochemistry* 74 (1): 214–26. doi:10.1016/0003-2697(76)90326-2.
- Hu, Xi, Fangyuan Li, Nabila Noor, and Daishun Ling. 2017. "Platinum Drugs: From Pt(II) Compounds, Pt(IV) Prodrugs, to Pt Nanocrystals/Nanoclusters." *Science Bulletin* 62 (8): 589–96. doi:10.1016/j.scib.2017.03.008.
- Huber, Stephan M., Lena Butz, Benjamin Stegen, Dominik Klumpp, Norbert Braun, Peter Ruth, and Franziska Eckert. 2013. "Ionizing Radiation, Ion Transports, and Radioresistance of Cancer Cells." *Frontiers in Physiology* 4.
doi:10.3389/fphys.2013.00212.
- Instituto Nacional del Cancer (NIH). 2018. "Radioterapia Para Tratar El Cáncer."
<https://www.cancer.gov/espanol/cancer/tratamiento/tipos/radioterapia>.
- Janson, Veronica, Parviz Behnam-Motlagh, Roger Henriksson, Per Hörstedt, Karl

- Gunnar Engström, and Kjell Grankvist. 2008. "Phase-Contrast Microscopy Studies Of Early Cisplatin-Induced Morphological Changes Of Malignant Mesothelioma Cells And The Correspondence To Induced Apoptosis." *Experimental Lung Research* 34 (2): 49–67. doi:10.1080/01902140701884398.
- Jardim-Perassi, Bruna Victorasso, Ali S. Arbab, Livia Carvalho Ferreira, Thaiz Ferraz Borin, Nadimpalli R S Varma, A. S M Iskander, Adarsh Shankar, Meser M. Ali, and Debora Aparecida Pires de Campos Zuccari. 2014. "Effect of Melatonin on Tumor Growth and Angiogenesis in Xenograft Model of Breast Cancer." Edited by Sonia Rocha. *PLoS ONE* 9 (1): e85311. doi:10.1371/journal.pone.0085311.
- Jaskot, R H, E G Charlet, E C Grose, M A Grady, and J H Roycroft. 1983. "An Automated Analysis of Glutathione Peroxidase, S-Transferase, and Reductase Activity in Animal Tissue." *Journal of Analytical Toxicology* 7 (2): 86–88. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6855209>.
- Kang, Min H, and C Patrick Reynolds. 2009. "Bcl-2 Inhibitors : Targeting Mitochondrial Apoptotic Pathways in Cancer Therapy." *Clinical Cancer Research* 15 (4): 1126–33. doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-0144.
- Karwasra, Ritu, Prerna Kalra, Yogendra Kumar Gupta, Deepika Saini, Ajay Kumar, and Surender Singh. 2016. "Antioxidant and Anti-Inflammatory Potential of Pomegranate Rind Extract to Ameliorate Cisplatin-Induced Acute Kidney Injury." *Food & Function* 7 (7). Royal Society of Chemistry: 3091–3101. doi:10.1039/C6FO00188B.
- Kauffman, George B., Raffaele Pentimalli, Sandro Doldi, and Matthew D. Hall. 2010. "Michele Peyrone (1813-1883), Discoverer of Cisplatin." *Platinum Metals Review*

54 (4): 250–56. doi:10.1595/147106710X534326.

Kiang, Juliann G, Risaku Fukumoto, and Nikolai V Gorbunov. 2012. “Lipid Peroxidation After Ionizing Irradiation Leads to Apoptosis and Autophagy.” *Biochemistry, Genetics and Molecular Biology*, 261–78. doi:10.5772/48189.

Kim, Wootae, Joo-Won Jeong, and Ja-Eun Kim. 2014. “CCAR2 Deficiency Augments Genotoxic Stress-Induced Apoptosis in the Presence of Melatonin in Non-Small Cell Lung Cancer Cells.” *Tumor Biology* 35 (11): 10919–29. doi:10.1007/s13277-014-2370-6.

King, Ann D., and Harriet C. Thoeny. 2016. “Functional MRI for the Prediction of Treatment Response in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: Potential and Limitations.” *Cancer Imaging* 16 (1). *Cancer Imaging*: 1–8. doi:10.1186/s40644-016-0080-6.

Kitay, J. I., and M. D. Altschule. 1954. *The Pineal Gland. A Review of the Physiologic Literature*. Cambridge,.

Kiyota, Naomi. 2018. “Three-Weekly Cisplatin or Weekly Cisplatin Chemoradiotherapy for Locally Advanced Head and Neck Squamous Cell Carcinoma—the Jury Is Still Out.” *Therapeutic Radiology and Oncology* 2: 39–42. doi:10.21037/tro.2018.09.03.

Kobayashi, Kazuhiro, Kenji Hisamatsu, Natsuko Suzui, Akira Hara, Hiroyuki Tomita, and Tatsuhiko Miyazaki. 2018. “A Review of HPV-Related Head and Neck Cancer.” *Journal of Clinical Medicine* 7: 1–11. doi:10.3390/jcm7090241.

Korkmaz, Ahmet, Sergio Rosales-Corral, and Russel J. Reiter. 2012. “Gene Regulation by

Melatonin Linked to Epigenetic Phenomena.” *Gene* 503 (1): 1–11.
doi:10.1016/j.gene.2012.04.040.

Koşar, Pinar Aslan, Mustafa Nazıroğlu, İshak Suat Övey, and Bilal Çiğ. 2016. “Synergic Effects of Doxorubicin and Melatonin on Apoptosis and Mitochondrial Oxidative Stress in MCF-7 Breast Cancer Cells: Involvement of TRPV1 Channels.” *The Journal of Membrane Biology* 249 (1–2): 129–40. doi:10.1007/s00232-015-9855-0.

Kulikov, Andrey V., Ekaterina A. Luchkina, Vladimir Gogvadze, and Boris Zhivotovsky. 2017. “Mitophagy: Link to Cancer Development and Therapy.” *Biochemical and Biophysical Research Communications* 482 (3). Elsevier Ltd: 432–39. doi:10.1016/j.bbrc.2016.10.088.

Le, Xiuning, and Ehab Y Hanna. 2018. “Optimal Regimen of Cisplatin in Squamous Cell Carcinoma of Head and Neck yet to Be Determined.” *Annals of Translational Medicine* 6 (11): 229–33. doi:10.21037/atm.2018.05.10.

Leon-Blanco, Mercedes M., Juan M. Guerrero, Russel J. Reiter, Juan R. Calvo, and David Pozo. 2003. “Melatonin Inhibits Telomerase Activity in the MCF-7 Tumor Cell Line Both in Vivo and in Vitro.” *Journal of Pineal Research* 35 (3): 204–11. doi:10.1034/j.1600-079X.2003.00077.x.

Licitra, Lisa, Ulrich Keilholz, Makoto Tahara, Jin Ching Lin, Pauline Chomette, Philippe Ceruse, Kevin Harrington, and Ricard Mesia. 2016. “Evaluation of the Benefit and Use of Multidisciplinary Teams in the Treatment of Head and Neck Cancer.” *Oral Oncology* 59. The Author(s): 73–79. doi:10.1016/j.oraloncology.2016.06.002.

Lissoni, P, S Barni, M Mandalà, A Ardizzoia, F Paolorossi, M Vaghi, R Longarini, F Malugani, and G Tancini. 1999. “Decreased Toxicity and Increased Efficacy of

- Cancer Chemotherapy Using the Pineal Hormone Melatonin in Metastatic Solid Tumour Patients with Poor Clinical Status." *European Journal of Cancer* 35 (12): 1688–92. doi:10.1016/S0959-8049(99)00159-8.
- Liu, MT, and RJ Reiter. 2016. "Melatonin and Charged Particle Irradiation Inhibit Tumor Angiogenesis." *Nuclear Medicine and Biomedical Imaging* 1 (2): 1–10. doi:10.15761/NMBI.1000113.
- Lo Nigro, C, Denaro N, Anna Merlotti, and Marco Merlano. 2017. "Head and Neck Cancer : Improving Outcomes with a Multidisciplinary Approach." *Cancer Management and Research* 9: 363–71.
- Loureiro, Rute, Silvia Magalhães-Novais, Katia A Mesquita, Ines Baldeiras, Isabel S Sousa, Ludgero C Tavares, Ines A Barbosa, Paulo J Oliveira, and Ignacio Vega-Naredo. 2015. "Melatonin Antiproliferative Effects Require Active Mitochondrial Function in Embryonal Carcinoma Cells." *Oncotarget* 6 (19): 17081–96. doi:10.18632/oncotarget.4012.
- Ma, Zhiqiang, Yang Yang, Chongxi Fan, Jing Han, Dongjin Wang, Shouyin Di, Wei Hu, et al. 2016. "Melatonin as a Potential Anticarcinogen for Non-Small-Cell Lung Cancer." *Oncotarget* 7 (29). doi:10.18632/oncotarget.8776.
- Macías, Manuel, Germaine Escames, Josefa Leon, Ana Coto, Younes Sbihi, Antonio Osuna, and Darío Acuña-Castroviejo. 2003. "Calreticulin-Melatonin An Unexpected Relationship." *European Journal of Biochemistry* 270 (5): 832–40. doi:10.1046/j.1432-1033.2003.03430.x.
- Maftah, Abderrahman, Jean Michel Petit, Marie-Hélène Ratinaud, and Raymond Julien. 1989. "10-N Nonyl-Acridine Orange: A Fluorescent Probe Which Stains

Mitochondria Independently of Their Energetic State.” *Biochemical and Biophysical Research Communications* 164 (1): 185–90. doi:10.1016/0006-291X(89)91700-2.

Maier, Patrick, Linda Hartmann, Frederik Wenz, and Carsten Herskind. 2016. “Cellular Pathways in Response to Ionizing Radiation and Their Targetability for Tumor Radiosensitization.” *International Journal of Molecular Sciences* 17 (1): 102. doi:10.3390/ijms17010102.

Maitra, Sayantan, Debanjan Bhattacharya, Stabak Das, and Subhrajit Bhattacharya. 2019. “Melatonin and Its Anti-Glioma Functions: A Comprehensive Review.” *Reviews in the Neurosciences*, January. doi:10.1515/revneuro-2018-0041.

Malhotra, Samir, Girish Sawhney, and Promila Pandhi. 2004. “The Therapeutic Potential of Melatonin : A Review of the Science.” *MedGenMed* 6 (2): 1–19.

Marín de la Torre, Irene. 2007. “PCR EN TIEMPO REAL PARA LA DETECCIÓN CUANTITATIVA DE ADN BOVINO EN PIENSOS VEGETALES.” *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias* 1 (2): 237–45.

Marinković, Mija, Matilda Šprung, Maja Buljubašić, and Ivana Novak. 2018. “Autophagy Modulation in Cancer : Current Knowledge on Action and Therapy.” *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2018: 1–18.

Marques, M Paula M, Diego Gianolio, Giannantonio Cibin, John Tomkinson, Stewart F Parker, Rosendo Valero, R Pedro Lopes, and Luis A E Batista de Carvalho. 2015. “A Molecular View of Cisplatin’s Mode of Action: Interplay with DNA Bases and Acquired Resistance.” *Physical Chemistry Chemical Physics* 17 (7). Royal Society of Chemistry: 5155–71. doi:10.1039/C4CP05183A.

- Martin, Miguel, Manuel Macías, Josefa León, Germaine Escames, Houda Khaldy, and Daríos Acuña-Castroviejo. 2002. "Melatonin Increases the Activity of the Oxidative Phosphorylation Enzymes and the Production of ATP in Rat Brain and Liver Mitochondria." *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 34 (4): 348–57. doi:10.1016/S1357-2725(01)00138-8.
- Martín, V, A M Sanchez-Sanchez, F Herrera, C Gomez-Manzano, J Fueyo, M A Alvarez-Vega, I Antolín, and C Rodriguez. 2013. "Melatonin-Induced Methylation of the ABCG2/BCRP Promoter as a Novel Mechanism to Overcome Multidrug Resistance in Brain Tumour Stem Cells." *British Journal of Cancer* 108 (10): 2005–12. doi:10.1038/bjc.2013.188.
- Martinho, Nuno, Tânia C B Santos, Helena F Florindo, and Liana C Silva. 2019. "Cisplatin-Membrane Interactions and Their Influence on Platinum Complexes Activity and Toxicity." *Frontiers in Physiology* 9 (January): 1–15. doi:10.3389/fphys.2018.01898.
- Marullo, Rossella, Erica Werner, Natalya Degtyareva, Bryn Moore, Giuseppe Altavilla, Suresh S. Ramalingam, and Paul W. Doetsch. 2013. "Cisplatin Induces a Mitochondrial-ROS Response That Contributes to Cytotoxicity Depending on Mitochondrial Redox Status and Bioenergetic Functions." Edited by Robert W Sobol. *PLoS ONE* 8 (11): e81162. doi:10.1371/journal.pone.0081162.
- Marur, Shanthi, and Arlene A Forastiere. 2016. "Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: Update on Epidemiology, Diagnosis, and Treatment." *Mayo Clinic Proceedings* 91 (3). Mayo Foundation for Medical Education and Research: 386–96. doi:10.1016/j.mayocp.2015.12.017.

- Mendivil-Perez, M., V. Soto-Mercado, A. Guerra-Librero, B.I. Fernandez-Gil, J. Florido, Y.-Q. Shen, M.A. Tejada, et al. 2017. "Melatonin Enhances Neural Stem Cell Differentiation and Engraftment by Increasing Mitochondrial Function." *Journal of Pineal Research* 63 (2). doi:10.1111/jpi.12415.
- Mills, Edward, Ping Wu, Dugald Seely, and Gordon Guyatt. 2005. "Melatonin in the Treatment of Cancer: A Systematic Review of Randomized Controlled Trials and Meta-Analysis." *Journal of Pineal Research* 39 (4): 360–66. doi:10.1111/j.1600-079X.2005.00258.x.
- Mirzayans, Razmik, Bonnie Andrais, and David Murray. 2017. "Impact of Premature Senescence on Radiosensitivity Measured by High Throughput Cell-Based Assays." *International Journal of Molecular Sciences* 18 (7): 1460. doi:10.3390/ijms18071460.
- Mukhopadhyay, Partha, Béla Horváth, Zsuzsanna Zsengellér, Jacek Zielonka, Galin Tanchian, Eileen Holovac, Malek Kechrid, et al. 2012. "Mitochondrial-Targeted Antioxidants Represent a Promising Approach for Prevention of Cisplatin-Induced Nephropathy." *Free Radical Biology and Medicine* 52 (2). Elsevier Inc.: 497–506. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2011.11.001.
- Mukhopadhyay, Partha, Mohanraj Rajesh, György Haskó, Brian J Hawkins, Muniswamy Madesh, and Pál Pacher. 2007. "Simultaneous Detection of Apoptosis and Mitochondrial Superoxide Production in Live Cells by Flow Cytometry and Confocal Microscopy." *Nature Protocols* 2 (9): 2295–2301. doi:10.1038/nprot.2007.327.
- Muschel, Ruth J, Daniel E Soto, WG McKenna, and Eric J Bernhard. 1998.

- “Radiosensitization and Apoptosis.” *Oncogene* 17: 3359–63.
- National Toxicology Program. 2016. “Report on Carcinogens: Cisplatin.” <http://ntp.niehs.nih.gov/ntp/roc/content/profiles/tetrachlorodibenzodioxin.pdf>.
- Nooshinfar, Elaheh, Ava Safaroghli-Azar, Davood Bashash, and Mohammad Esmaeil Akbari. 2017. “Melatonin, an Inhibitory Agent in Breast Cancer.” *Breast Cancer* 24 (1). Springer Japan: 42–51. doi:10.1007/s12282-016-0690-7.
- Noronha, Vanita, Vijay Maruti Patil, Amit Joshi, and Kumar Prabhash. 2018. “Adding to the Debate on Once-a-Week versus Once-Every-3-Weeks Cisplatin Dosing in Concurrent Chemoradiotherapy for Locally Advanced Head and Neck Squamous Cell Cancer.” *Therapeutic Radiology and Oncology* 2 (December): 64–66. doi:10.21037/tro.2018.12.04.
- Oronsky, Bryan, Sharad Goyal, Michelle M Kim, Pedro Cabrales, Michelle Lybeck, Scott Caroen, Neil Oronsky, Erica Burbano, Corey Carter, and Arnold Oronsky. 2018. “A Review of Clinical Radioprotection and Chemoprotection for Oral Mucositis.” *Translational Oncology* 11 (3). The Authors: 771–78. doi:10.1016/j.tranon.2018.03.014.
- Ortiz, Francisco, Darío Acuña-Castroviejo, Carolina Doerrier, José C. Dayoub, Luis C. López, Carmen Venegas, José A. García, et al. 2015. “Melatonin Blunts the Mitochondrial/NLRP3 Connection and Protects against Radiation-Induced Oral Mucositis.” *Journal of Pineal Research* 58 (1): 34–49. doi:10.1111/jpi.12191.
- Pacini, Nicola, and Fabio Borziani. 2016. “Oncostatic-Cytoprotective Effect of Melatonin and Other Bioactive Molecules: A Common Target in Mitochondrial Respiration.” *International Journal of Molecular Sciences* 17 (3): 341.

doi:10.3390/ijms17030341.

Pai SI, Westra WH, S.I. Pai, and W.H. Westra. 2009. "Molecular Pathology of Head and Neck Cancer: Implications for Diagnosis, Prognosis and Treatment." *Annu Rev Pathol.* 4: 49–70. doi:10.1146/annurev.pathol.4.110807.092158.Molecular.

Pariante, Roberto, Ignacio Bejarano, Javier Espino, Ana B Rodríguez, and José A Pariante. 2017. "Participation of MT3 Melatonin Receptors in the Synergistic Effect of Melatonin on Cytotoxic and Apoptotic Actions Evoked by Chemotherapeutics." *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 80 (5). Springer Berlin Heidelberg: 985–98. doi:10.1007/s00280-017-3441-3.

Pearson, Alexander T., Trachette L. Jackson, and Jacques E. Nor. 2016. "Modeling Head and Neck Cancer Stem Cell-Mediated Tumorigenesis." *Cellular and Molecular Life Sciences* 73 (17): 3279–89. doi:10.1007/s00018-016-2226-x.

Perciavalle, Rhonda M., Daniel P. Stewart, Brian Koss, John Lynch, Sandra Milasta, Madhavi Bathina, Jamshid Temirov, et al. 2012. "Anti-Apoptotic MCL-1 Localizes to the Mitochondrial Matrix and Couples Mitochondrial Fusion to Respiration." *Nature Cell Biology* 14 (6): 575–83. doi:10.1038/ncb2488.

Perez-Gonzalez, Adriana, Romina Castañeda-Arriaga, Juan Raúl Álvarez-Idaboy, Russel J Reiter, and Annia Galano. 2018. "Melatonin and Its Metabolites as Chemical Agents Capable of Directly Repairing Oxidized DNA." *Journal of Pineal Research*, no. October (December): e12539. doi:10.1111/jpi.12539.

Piskounova, Elena, Michalis Agathocleous, Malea M. Murphy, Zeping Hu, Sara E. Huddlestun, Zhiyu Zhao, A. Marilyn Leitch, Timothy M. Johnson, Ralph J. DeBerardinis, and Sean J. Morrison. 2015. "Oxidative Stress Inhibits Distant

- Metastasis by Human Melanoma Cells.” *Nature* 527 (7577): 186–91. doi:10.1038/nature15726.
- Plaimee, P., N. Weerapreeyakul, S. Barusrux, and N. P. Johns. 2015. “Melatonin Potentiates Cisplatin-Induced Apoptosis and Cell Cycle Arrest in Human Lung Adenocarcinoma Cells.” *Cell Proliferation* 48 (1): 67–77. doi:10.1111/cpr.12158.
- Porporato, Paolo E., Valéry L. Payen, Jhudit Pérez-Escuredo, Christophe J. De Saedeleer, Pierre Danhier, Tamara Copetti, Suveera Dhup, et al. 2014. “A Mitochondrial Switch Promotes Tumor Metastasis.” *Cell Reports* 8 (3): 754–66. doi:10.1016/j.celrep.2014.06.043.
- Porporato, Paolo Ettore, Nicoletta Filigheddu, José Manuel Bravo-San Pedro, Guido Kroemer, and Lorenzo Galluzzi. 2018. “Mitochondrial Metabolism and Cancer.” *Cell Research* 28 (3). Nature Publishing Group: 265–80. doi:10.1038/cr.2017.155.
- Pozarowski, P., X. Huang, D. H. Halicka, B. Lee, G. Johnson, and Z. Darzynkiewicz. 2003. “Interactions of Fluorochrome-Labeled Caspase Inhibitors with Apoptotic Cells: A Caution in Data Interpretation.” *Cytometry* 55A (1): 50–60. doi:10.1002/cyto.a.10074.
- Proietti, Sara, Alessandra Cucina, Mirko Minini, and Mariano Bizzarri. 2017. “Melatonin, Mitochondria, and the Cancer Cell.” *Cellular and Molecular Life Sciences* 74 (21). Springer International Publishing: 4015–25. doi:10.1007/s00018-017-2612-z.
- Rath, Martin F., Steven L. Coon, Fernanda G. Amaral, Joan L. Weller, Morten Møller, and David C. Klein. 2016. “Melatonin Synthesis: Acetylserotonin O-Methyltransferase (ASMT) Is Strongly Expressed in a Subpopulation of

- Pinealocytes in the Male Rat Pineal Gland." *Endocrinology* 157 (5): 2028–40. doi:10.1210/en.2015-1888.
- Redza-Dutordoir, Maureen, and Diana A Averill-Bates. 2016. "Activation of Apoptosis Signalling Pathways by Reactive Oxygen Species." *Biochimica et Biophysica Acta* 1863. Elsevier B.V.: 2977–92. doi:10.1016/j.bbamcr.2016.09.012.
- Reiter, Russel J. 1991. "Pineal Melatonin: Cell Biology of Its Synthesis and of Its Physiological Interactions." *Endocrine Reviews* 12 (2): 151–80. doi:10.1210/edrv-12-2-151.
- Reiter, Russel J., Juan C. Mayo, Dun-Xian Tan, Rosa M. Sainz, Moises Alatorre-Jimenez, and Lilan Qin. 2016. "Melatonin as an Antioxidant: Under Promises but over Delivers." *Journal of Pineal Research* 61 (3): 253–78. doi:10.1111/jpi.12360.
- Reiter, Russel J, Dun Xian Tan, and Annia Galano. 2014. "Melatonin: Exceeding Expectations." *Physiology* 29: 325–33. doi:10.1152/physiol.00011.2014.
- Reiter, Russel, Sergio Rosales-Corral, Dun-Xian Tan, Dario Acuna-Castroviejo, Lilan Qin, Shun-Fa Yang, and Kexin Xu. 2017. "Melatonin, a Full Service Anti-Cancer Agent: Inhibition of Initiation, Progression and Metastasis." *International Journal of Molecular Sciences* 18 (4): 843. doi:10.3390/ijms18040843.
- Rischin, Danny, Robert L. Ferris, and Quynh Thu Le. 2015. "Overview of Advances in Head and Neck Cancer." *Journal of Clinical Oncology* 33 (29): 3225–26. doi:10.1200/JCO.2015.63.6761.
- Rodriguez, Carmen, Vanesa Martín, Federico Herrera, Guillermo García-Santos, Jezabel Rodriguez-Blanco, Sara Casado-Zapico, Ana Sánchez-Sánchez, et al. 2013.

- “Mechanisms Involved in the Pro-Apoptotic Effect of Melatonin in Cancer Cells.”
International Journal of Molecular Sciences 14 (4): 6597–6613.
doi:10.3390/ijms14046597.
- Rosen, Eliot M, Regina Day, and Vijay K Singh. 2015. “New Approaches to Radiation Protection.” *Frontiers in Oncology* 4 (January): 381. doi:10.3389/fonc.2014.00381.
- Rosenberg, Barnett, Loretta Van Camp, and Thomas Krigas. 1965. “Inhibition of Cell Division in Escherichia Coli by Electrolysis Products from a Platinum Electrode.” *Nature* 205: 698–699.
- Sabzichi, Mehdi, Nasser Samadi, Jamal Mohammadian, Hamed Hamishehkar, Maryam Akbarzadeh, and Ommoleila Molavi. 2016. “Sustained Release of Melatonin: A Novel Approach in Elevating Efficacy of Tamoxifen in Breast Cancer Treatment.” *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 145 (September). Elsevier B.V.: 64–71.
doi:10.1016/j.colsurfb.2016.04.042.
- Sagan, Lynn. 1967. “On the Origin of Mitosing Cells.” *Journal of Theoretical Biology* 14 (3): 225-IN6. doi:10.1016/0022-5193(67)90079-3.
- Sakatani, Aki, Fuminori Sonohara, and Ajay Goel. 2018. “Melatonin-Mediated Downregulation of Thymidylate Synthase as a Novel Mechanism for Overcoming 5-Fluorouracil Associated Chemoresistance in Colorectal Cancer Cells.” *Carcinogenesis*, December. doi:10.1093/carcin/bgy186.
- Sánchez-Hidalgo, Marina, Melanie Lee, Catalina A. de la Lastra, Juan M. Guerrero, and Graham Packham. 2012. “Melatonin Inhibits Cell Proliferation and Induces Caspase Activation and Apoptosis in Human Malignant Lymphoid Cell Lines.” *Journal of Pineal Research* 53 (4): 366–73. doi:10.1111/j.1600-079X.2012.01006.x.

Sander, G., and S. Schmid. 1952a. "Pineal Body and Malignant Growth." *Krebsarzt* 7: (9-10):300.

Sander, G., and S.A. Schmid. 1952b. "Effects of Implantations of Pineal Tissue and Pineal Extracts of Malignancies in Man." *Wiener Klinische Wochenschrift* 64 (28): 505–5088.

Santandreu, Francisca M, Pilar Roca, and Jordi Oliver. 2010. "Uncoupling Protein-2 Knockdown Mediates the Cytotoxic Effects of Cisplatin." *Free Radical Biology and Medicine* 49 (4). Elsevier Inc.: 658–66. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2010.05.031.

Santoro, Raffaella, Federica Mori, Marina Marani, Giuseppe Grasso, Maria Anna Cambria, Giovanni Blandino, Paola Muti, and Sabrina Strano. 2013. "Blockage of Melatonin Receptors Impairs P53-Mediated Prevention of DNA Damage Accumulation." *Carcinogenesis* 34 (5): 1051–61. doi:10.1093/carcin/bgt025.

Sayin, V. I., M. X. Ibrahim, E. Larsson, J. A. Nilsson, P. Lindahl, and M. O. Bergo. 2014. "Antioxidants Accelerate Lung Cancer Progression in Mice." *Science Translational Medicine* 6 (221): 221ra15-221ra15. doi:10.1126/scitranslmed.3007653.

Schneider, Caroline A, Wayne S Rasband, and Kevin W Eliceiri. 2012. "NIH Image to ImageJ: 25 Years of Image Analysis." *Nature Methods* 9 (7): 671–75. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5554542>.

Schweers, Rachel L, Ji Zhang, Mindy S Randall, Melanie R Loyd, Weimin Li, Frank C Dorsey, Mondira Kundu, et al. 2007. "NIX Is Required for Programmed Mitochondrial Clearance during Reticulocyte Maturation." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104 (49): 19500–505. doi:10.1073/pnas.0708818104.

- Shen, Ying-Qiang, Ana Guerra-Librero, Beatriz I. Fernandez-Gil, Javier Florido, Sergio García-López, Laura Martínez-Ruiz, Miguel Mendivil-Perez, et al. 2018. "Combination of Melatonin and Rapamycin for Head and Neck Cancer Therapy: Suppression of AKT/MTOR Pathway Activation, and Activation of Mitophagy and Apoptosis via Mitochondrial Function Regulation." *Journal of Pineal Research* 64 (3): e12461. doi:10.1111/jpi.12461.
- Singh, Mani, Afsaneh Alavi, Rebecca Wong, and Sadanori Akita. 2016. "Radiodermatitis : A Review of Our Current Understanding." *American Journal of Clinical Dermatology* 17 (3). Springer International Publishing: 277–92. doi:10.1007/s40257-016-0186-4.
- Slominski, Radomir M., Russel J. Reiter, Natalia Schlabritz-Loutsevitch, Rennolds S. Ostrom, and Andrzej T. Slominski. 2012. "Melatonin Membrane Receptors in Peripheral Tissues: Distribution and Functions." *Molecular and Cellular Endocrinology* 351 (2): 152–66. doi:10.1016/j.mce.2012.01.004.
- Spreckelmeyer, Sarah, Chris Orvig, and Angela Casini. 2014. "Cellular Transport Mechanisms of Cytotoxic Metallodrugs: An Overview beyond Cisplatin." *Molecules* 19 (10): 15584–610. doi:10.3390/molecules191015584.
- Srinivasan, Venkatramanujam, Seithikurippu R. Pandi-Perumal, Amnon Brzezinski, Kunwar P. Bhatnagar, and Daniel P. Cardinali. 2011. "Melatonin, Immune Function and Cancer." *Recent Patents on Endocrine, Metabolic & Immune Drug Discovery* 5 (2): 109–23. doi:10.2174/187221411799015408.
- Stupp, Roger, Warren P. Mason, Martin J. van den Bent, Michael Weller, Barbara Fisher, Martin J.B. Taphoorn, Karl Belanger, et al. 2005. "Radiotherapy plus

Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma.” *New England Journal of Medicine* 352 (10): 987–96. doi:10.1056/NEJMoa043330.

Su, Shih-Chi, Ming-Ju Hsieh, Wei-En Yang, Wen-Hung Chung, Russel J. Reiter, and Shun-Fa Yang. 2017. “Cancer Metastasis: Mechanisms of Inhibition by Melatonin.” *Journal of Pineal Research* 62 (1): e12370. doi:10.1111/jpi.12370.

Sung, Gi-Jun, Sung-Hak Kim, Sungmin Kwak, Seung-Ho Park, Ji-Hye Song, Ji-Hoon Jung, Hyunhee Kim, and Kyung-Chul Choi. 2019. “Inhibition of TFEB Oligomerization by Co-Treatment of Melatonin with Vorinostat Promotes the Therapeutic Sensitivity in Glioblastoma and Glioma Stem Cells.” *Journal of Pineal Research*, January, e12556. doi:10.1111/jpi.12556.

Suofu, Yalikusun, Wei Li, Frédéric G. Jean-Alphonse, Jiaoying Jia, Nicolas K Khattar, Jiatong Li, Sergei V. Baranov, et al. 2017. “Dual Role of Mitochondria in Producing Melatonin and Driving GPCR Signaling to Block Cytochrome c Release.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114 (38): E7997–8006. doi:10.1073/pnas.1705768114.

Tacka, Kirk A., James C. Dabrowiak, Jerry Goodisman, Harvey S. Penefsky, and Abdul Kader Souid. 2004. “Effects of Cisplatin on Mitochondrial Function in Jurkat Cells.” *Chemical Research in Toxicology* 17 (8): 1102–11. doi:10.1021/tx0499564.

Talib, Wamidh. 2018. “Melatonin and Cancer Hallmarks.” *Molecules* 23 (3): 518. doi:10.3390/molecules23030518.

Tamimi, Ahmad Faleh, and Malik Juweid. 2017. “Epidemiology and Outcome of Glioblastoma.” In *Glioblastoma*, edited by S De Vleeschouwer, 143–53. Brisbane: Codon Publications. doi:10.15586/codon.glioblastoma.2017.ch8.

- Tan, Dun-Xian, Lucien C. Manchester, Xiaoyan Liu, Sergio A. Rosales-Corral, Dario Acuna-Castroviejo, and Russel J. Reiter. 2013. "Mitochondria and Chloroplasts as the Original Sites of Melatonin Synthesis: A Hypothesis Related to Melatonin's Primary Function and Evolution in Eukaryotes." *Journal of Pineal Research* 54 (2): 127–38. doi:10.1111/jpi.12026.
- Tan, Dun-Xian, Lucien Manchester, Eduardo Esteban-Zubero, Zhou Zhou, and Russel Reiter. 2015. "Melatonin as a Potent and Inducible Endogenous Antioxidant: Synthesis and Metabolism." *Molecules* 20 (10): 18886–906. doi:10.3390/molecules201018886.
- Tan, Dun-Xian, Lucien Manchester, Lilan Qin, and Russel Reiter. 2016. "Melatonin: A Mitochondrial Targeting Molecule Involving Mitochondrial Protection and Dynamics." *International Journal of Molecular Sciences* 17 (12): 2124. doi:10.3390/ijms17122124.
- Tang, Le, Fang Wei, Yingfen Wu, Yi He, Lei Shi, Fang Xiong, Zhaojian Gong, et al. 2018. "Role of Metabolism in Cancer Cell Radioresistance and Radiosensitization Methods." *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 37–87. doi:/10.1186/s13046-018-0758-7.
- Tanida, Satoshi, Tsutomu Mizoshita, Keiji Ozeki, Hironobu Tsukamoto, Takeshi Kamiya, Hiromi Kataoka, Daitoku Sakamuro, and Takashi Joh. 2012. "Mechanisms of Cisplatin-Induced Apoptosis and of Cisplatin Sensitivity: Potential of BIN1 to Act as a Potent Predictor of Cisplatin Sensitivity in Gastric Cancer Treatment." *International Journal of Surgical Oncology* 2012. doi:10.1155/2012/862879.
- Tshering Vogel, Dechen Wangmo, and Harriet C. Thoeny. 2016. "Cross-Sectional

Imaging in Cancers of the Head and Neck: How We Review and Report.” *Cancer Imaging* 16 (1). Cancer Imaging: 1–15. doi:10.1186/s40644-016-0075-3.

Vanpouille-Box, Claire, Amandine Alard, Molykutty J. Aryankalayil, Yasmeen Sarfraz, Julie M. Diamond, Robert J. Schneider, Giorgio Inghirami, C. Norman Coleman, Silvia C. Formenti, and Sandra Demaria. 2017. “DNA Exonuclease Trex1 Regulates Radiotherapy-Induced Tumour Immunogenicity.” *Nature Communications* 8 (June). Nature Publishing Group: 15618. doi:10.1038/ncomms15618.

Venegas, Carmen, José A. García, Germaine Escames, Francisco Ortiz, Ana López, Carolina Doerrier, Laura García-Corzo, Luis C. López, Russel J. Reiter, and Darío Acuña-Castroviejo. 2012. “Extrapineal Melatonin: Analysis of Its Subcellular Distribution and Daily Fluctuations.” *Journal of Pineal Research* 52 (2): 217–27. doi:10.1111/j.1600-079X.2011.00931.x.

Vermes, I, C Haanen, H Steffens-Nakken, and C Reutelingsperger. 1995. “A Novel Assay for Apoptosis. Flow Cytometric Detection of Phosphatidylserine Expression on Early Apoptotic Cells Using Fluorescein Labelled Annexin V.” *Journal of Immunological Methods* 184 (1): 39–51. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7622868>.

Villanueva Ramos, Ti, Daniel Alcalá Pérez, MT Vega González, María Luisa Peralta Pedrero, Armando Medina Bojórquez, and A Barrera Cruz. 2012. “Guía de Práctica Clínica Para Prevención y Tratamiento de La Radiodermatitis Aguda.” *Dermatol Rev Mex* 56 (1): 3–13.

Wagner, Jill M, and Larry M Karnitz. 2009. “Cisplatin-Induced DNA Damage Activates Replication Checkpoint Signaling Components That Differentially Affect Tumor

- Cell Survival.” *Molecular Pharmacology* 76 (1): 208–14.
doi:10.1124/mol.109.055178.
- Wang, H, and J A Joseph. 1999. “Quantifying Cellular Oxidative Stress by Dichlorofluorescein Assay Using Microplate Reader.” *Free Radical Biology & Medicine* 27 (5–6): 612–16. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10490282>.
- World Health Organization. 2014. “Head and Neck Cancer.” *Union for International Cancer Control Review of Cancer Medicines on the WHO List of Essential Medicines*, 1–8.
- Wouters, BG. 2009. *Basic Clinical Radiobiology*. Edited by Michael C. Joiner and Albert van der Kogel. 4th ed. Vol. 4. Auflage. London: CRC Press. doi:10.1201/b15450.
- Yahyapour, Rasoul, Dheyauldeen Shabeeb, Mohsen Cheki, Ahmed Eleojo Musa, Bagher Farhood, Abolhasan Rezaeyan, Peyman Amini, Hengameh Fallah, and Masoud Najafi. 2018. “Radiation Protection and Mitigation by Natural Antioxidants and Flavonoids: Implications to Radiotherapy and Radiation Disasters.” *Current Molecular Pharmacology* 11 (4): 285–304.
doi:10.2174/1874467211666180619125653.
- Yamano, Yukio, Katsuhiko Uzawa, Kengo Saito, Dai Nakashima, Atsushi Kasamatsu, Hirofumi Koike, Yukinao Kouzu, et al. 2010. “Identification of Cisplatin-Resistance Related Genes in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma.” *International Journal of Cancer* 126 (2): 437–49. doi:10.1002/ijc.24704.
- Yang, Zejia, Lisa M. Schumaker, Merrill J. Egorin, Eleanor G. Zuhowski, Z. Guo, and Kevin J. Cullen. 2006. “Cisplatin Preferentially Binds Mitochondrial DNA and Voltage-Dependent Anion Channel Protein in the Mitochondrial Membrane of

Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: Possible Role in Apoptosis." *Clinical Cancer Research* 12 (19): 5817–25. doi:10.1158/1078-0432.CCR-06-1037.

Yip, Helena T, Rajesh Chopra, Rita Chakrabarti, Mysore S Veena, Bharathi Ramamurthy, Eri S Srivatsan, and Marilene B Wang. 2006. "Cisplatin-Induced Growth Arrest of Head and Neck Cancer Cells Correlates With Increased Expression of P16 and P53." *Archives of Otolaryngology–Head & Neck Surgery* 132 (3): 317. doi:10.1001/archotol.132.3.317.

Zätterström, U K, J Wennerberg, R Attewell, and A Ask. 1990. "Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck Heterotransplanted to Nude Mice. Take Rate in Relation to Patient Survival." *Cancer* 66 (1): 145–51. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2354400>.

Zeman, M, J Buyse, and E Decuypere. 2001. "Melatonin Decreases Heat Production in Female Broiler Chickens." *Acta Vet. BRNO* 70: 15–18. doi:10.1139/Y08-005 10.1177/107424840200700i108; Brune, S., Schmidt, T., Tebbe, U., Kreuzer, H., Influence of long-term treatment with ketanserin on blood pressure, pulmonary artery pressure, and cardiac output in patients with heart failure (1990) *Cardiovasc. Drugs Ther*, 4, pp. 85-87. , PMID:2285654, doi:10.1007/BF00053434; Cohn, J.N., Goldstein, S.O., Greenberg, B.H., Lorell, B.H., Bourge, R.C., Jaski, B.E., A dose-dependent increase in mortality with vesnarinone among patients with severe heart f.

Zhang, Hong-Mei, and Yiqiang Zhang. 2014. "Melatonin: A Well-Documented Antioxidant with Conditional pro-Oxidant Actions." *Journal of Pineal Research* 57 (2): 131–46. doi:10.1111/jpi.12162.

Zhivotosky, Boris, and Sten Orrenius. 2001. "Assessment of Apoptosis and Necrosis by DNA Fragmentation and Morphological Criteria." In *Current Protocols in Cell Biology*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc. doi:10.1002/0471143030.cb1803s12.

Zhou, Yunfei, Federico Tozzi, Jinyu Chen, Fan Fan, Ling Xia, Jinrong Wang, Guang Gao, et al. 2012. "Intracellular ATP Levels Are a Pivotal Determinant of Chemoresistance in Colon Cancer Cells." *Cancer Research* 72 (1): 304–15. doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-1674.

IX. ANEXO

Melatonin enhances cisplatin and radiation cytotoxicity in head and neck squamous cell carcinoma by stimulating mitochondrial ROS generation, apoptosis and autophagy

Beatriz I Fernandez-Gil^{1*}, Ana Guerra-Librero^{1*}, Ying-Qiang Shen¹, Javier Florido¹, Laura Martínez-Ruiz¹, Sergio García-López¹, Christian Adan¹, César Rodríguez-Santana¹, Darío Acuña-Castroviejo^{1,2,3}, Alfredo Quiñones-Hinojosa⁴, José Fernández-Martínez¹, Ahmed E Abdel Moneim⁵, Luis C López^{1,2,3}, José M Rodríguez Ferrer², Germaine Escames^{1,2,3}

¹ Instituto de Biotecnología, Centro de Investigación Biomédica, Universidad de Granada, Granada, Spain

² Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de Granada, Granada, Spain

³ CIBERFES, Ibs.Granada, Hospital Campus de la Salud, 18016 Granada, Spain

⁴ Department of Neurosurgery, Mayo Clinic, School of Medicine, Jacksonville, Florida, USA

⁵ Department of Zoology and Entomology, Faculty of Science, Helwan University, Cairo, Egypt

*These authors contributed equally to this work

Correspondence should be addressed to Germaine Escames; gescames@ugr.es

Head and neck cancer is the sixth leading cancer by incidence worldwide. Unfortunately, drug resistance and relapse are the principal limitations of clinical oncology for many patients, and the failure of conventional treatments is an extremely demoralizing experience. It is therefore crucial to find new therapeutic targets and drugs to enhance the cytotoxic effects of conventional treatments without potentiating or offsetting the adverse effects. Melatonin has oncostatic effects, although the mechanisms involved and doses required remain unclear. The purpose of this study is to determine the precise underlying mitochondrial mechanisms of melatonin, which increase the cytotoxicity of oncological treatments, and also to propose new melatonin treatments in order to alleviate and reverse radio- and chemo-resistance processes. We analyzed the effects of melatonin on head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) cell lines (Cal-27 and SCC-9), which were treated with 0.1, 0.5, 1 and 1.5 mM melatonin combined with 8 Gy irradiation or 10 μ M cisplatin. Clonogenic and MTT assays, as well as autophagy and apoptosis, involving flow cytometry and western blot, were performed in order to determine the cytotoxic effects of the treatments. Mitochondrial function was evaluated by measuring mitochondrial respiration, mtDNA content (RT-PCR) and mitochondrial mass (NAO). ROS production, antioxidant enzyme activity and GSH/GSSG levels were analyzed using a fluorometric method. We show that high concentrations of melatonin potentiate the cytotoxic effects of radiotherapy and CDDP in HNSCC, which are associated with increased mitochondrial function in these cells. In HNSCC, melatonin induces intracellular ROS, whose accumulation plays an upstream role in mitochondria-mediated apoptosis and autophagy. Our findings indicate that melatonin, at high concentrations, combined with cisplatin and radiotherapy to improve its effectiveness, is a potential adjuvant agent.

Keywords: Head and neck squamous cell carcinoma; melatonin; cisplatin; radiotherapy; mitochondria; ROS; apoptosis; autophagy.

1. Introduction

Head and neck cancer, which is the sixth leading cancer by incidence worldwide, with more than 300,000 mortalities annually [1], has become a major health burden, especially as cell resistance to radio and chemotherapy develops.

Radiotherapy (RT), which is one of the most commonly used tumor treatments [2], damages biomolecules, such as proteins and lipoids, particularly DNA, resulting in the termination of cell division and proliferation and even in cell necrosis or apoptosis. However, many unwanted effects, such as radioresistance, can complicate the prognosis [2]. One way to overcome these problems is to increase RT effectiveness by using radiosensitizers to enhance tumor cell radiosensitivity [3].

On the other hand, cisplatin (CDDP), one of the most commonly used chemotherapeutic agents, is the treatment of choice for most head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) patients. CDDP is a highly reactive molecule that binds to RNA, DNA and proteins to form different types of adducts. CDDP also induces mitochondria-dependent reactive oxygen species (ROS) formation which contributes to cell-killing processes by enhancing the damaging effect of drugs on nuclear DNA (nDNA) [4]. However, the high incidence of chemoresistance and its many side effects limit the clinical usefulness of CDDP as an anticancer treatment [5,6]. Therefore, new anticancer therapeutic strategies to attenuate cytotoxicity in normal tissues and to prevent or reverse the development of radio and chemoresistance are required.

Mitochondria have a major impact on cancer cells due to the source of ATP, their capacity to produce ROS and their central position in the apoptosis signaling pathway [7,8]. Although very low supraphysiological levels of mitochondrial ROS can promote tumor diversification by favoring mutagenesis [9], ROS overproduction, leading to severe mitochondrial dysfunction, is generally incompatible with tumor progression, which promotes cell death and cellular senescence [10]. Thus, given the impact of mitochondrial metabolism on the treatment response, a considerable effort has been devoted to developing a chemo/radiosensitization strategy involving the development of molecules to target mitochondria [9,11]. However, one of the main drawbacks of this strategy of targeting mitochondria to kill malignant cells or to increase their sensitivity to treatment is that multiple immune effector cells bear a remarkable metabolic similarity to cancer cells [9,12].

Although the indoleamine melatonin (N-acetyl-5-methoxytryptamine) is synthesized in the pineal gland, it is produced by many other organs at even higher concentrations [13]. Melatonin has a variety of biological features including anti-inflammatory and antioxidant activity, as well as immune system regulation mechanisms. It also has oncostatic effects, although the mechanisms involved remain unclear [14–17]. Our previous studies show that melatonin enhances the cytotoxic effects of rapamycin in HNSCC cells [18]. However, little data exist on the mechanisms of melatonin involved in increasing chemo and radiotherapy-induced cancer cell injury or cell death and simultaneously in decreasing its adverse effects.

In this study, we first explore the potential capacity of melatonin to enhance the antitumor effects of irradiation and CDDP on HNSCC. We then investigate the precise underlying mitochondrial mechanisms which enhance the cytotoxic effects of these treatments on HNSCC.

2. Materials and Methods

2.1. Cell culture. Human tongue squamous carcinoma cell lines Cal-27 and SCC-9, obtained from the American Type Culture Collection (ATCC® CRL2095™ and CRL1629™, respectively) in the Cell Bank of the Scientific Instrumentation Centre at the University of Granada, were cultured in a humidified atmosphere (5% CO₂ and 95% air at 37°C). The cells were cultured in high glucose Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), GlutaMAX supplemented with 10% fetal bovine serum and 2% antibiotic antimycotic (Fisher Scientific, Madrid, Spain) for Cal-27, and were grown in DMEM-F12 Nutrient Mixture Ham medium (1:1) containing 2 mM L-glutamine (Fisher Scientific, Madrid, Spain) and 0.5 mM sodium pyruvate supplemented with 10% FBS, 0.4 µg/mL hydrocortisone (Sigma Aldrich, Madrid, Spain), and 2% antibiotic-antimycotic for SCC-9.

Melatonin stock solution (Fagron Ibérica S.A.U., Terrasa, Spain) was prepared in 15% propylene glycol (PG) (VWR, Radnor, PA, USA). Cells were grown to 60%-70% confluence and serum starved for 24 hours. Then, cells were treated with and without melatonin (100, 500, 1000 and 1500 µM). After 48 hours, cells were exposed to 8 Gy irradiation using a cesium-137 gamma radiation source (8 Gy/min) or treated with 10 µM CDDP for 5 hours (Sigma Aldrich, Madrid, Spain). Cells of control group were treated with vehicle (PG 15%). Assays were performed 48 hours after irradiation and CDDP treatment.

2.2. Colony formation assay. Cells were plated into 6-well-plates and allowed to attach overnight. They were treated with melatonin and, after 48 hours, were irradiated or treated with CDDP. Colonies were allowed to grow for 2 weeks to form colonies of at least 50 cells. Finally, the medium was removed, the cells were fixed, and the colonies were then stained with 2.3% crystal violet and counted [18].

2.3. Cell proliferation assay. Cell viability was determined using an MTT assay (LifeTechnologies, Madrid, Spain) based on the reduction of yellow 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide to purple formazan by mitochondrial dehydrogenases. Cells were plated into 96-well-plates, and the assay was performed according to the manufacturer's instruction.

2.4. Apoptosis. Apoptosis was measured by flow cytometry using Annexin-V FITC staining (Immunostep, Salamanca, Spain). Cells were treated as described above. Finally, cells were collected, washed with cold PBS, and then simultaneously stained with FITC-labeled annexin V and PI and analyzed by flow cytometry in a Becton Dickinson FACSCanto II cytometer (Madrid, Spain).

2.5. Western blot analysis. Protein extraction and western blot analyses were performed as described previously [19]. Bax (sc-526), Bcl2 (sc-492), Atg12 C6 (sc-271688) and GAPDH (sc-32233) antibodies and a mouse anti-goat IgG-HRP secondary antibody (sc-2354) were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA), Nix (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) and HRP goat anti-mouse IgG (BD Pharmigen™, San Jose, CA, USA). The proteins were visualized using a Western Lightning Plus-ECL chemiluminescence kit (PerkinElmer, Billerica, MA, USA) according to the manufacturer's protocol. Images were analyzed using the Kodak Image Station 2000R (Eastman Kodak Company, Rochester, NY, USA). Protein band intensity was normalized to GAPDH, and data were expressed in percentage terms

relative to controls.

2.6. Mitochondrial respiration. The oxygen consumption rate (OCR), an indicator of mitochondrial respiration under typical *in vitro* cell culture conditions [18], was determined using the Seahorse Extracellular Flux (XFe-24) analyzer (Seahorse Bioscience, MA, USA). The day before the experiment, alive treated cells (exclusion by tripan blue) were seeded in DMEM in 24-well culture plates at a density of $8 \cdot 10^4$ cells/well and were allowed to adhere overnight in a cell culture incubator in order to minimize division or death. Cell growth and health were monitored using a microscope following the manufacturer's instructions, and the assay was only performed if the cells under all conditions formed a consistent monolayer. Subsequently, the assays were initiated by replacing the media with assay medium (Seahorse Bioscience) and the cells were equilibrated for 1h at 37°C without CO₂. The microplate was then placed into the XFe24 instrument to measure the OCR and free protons in the medium. Basal OCR was measured three times and plotted as a function of cells under the basal condition, followed by the sequential addition of oligomycin 1 mM. Subsequently, carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy) phenylhydrazone (FCCP) 0.5 mM was added in two injections (1 mM in total). Finally, rotenone/antimycin A (1mM) was injected. OCR was measured throughout the different injections of the test compounds. The progress curve was annotated to show the relative contribution of basal, ATP-linked, and maximal oxygen consumption after the addition of FCCP, and the reserve capacity of the cells. OCR values were normalized to cell number.

2.7. Determination of mitochondrial mass. We measured mitochondrial mass using acridine orange 10-nonyl bromide (NAO; Invitrogen-Life Technologies, Madrid, Spain), which specifically binds to cardiolipin at the inner mitochondrial membrane, according to the protocol described by Shen et al [18]. Fluorescence was read by a FLx800 microplate fluorescence reader (Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA) at excitation 485 nm and emission 530 nm.

2.8. Mitochondrial DNA quantification. Human mitochondrial DNA (mtDNA) was quantified by real-time PCR using the Stratagene Mx3005P Real-Time PCR System (Agilent Technologies, Inc., CA, USA). We used primers and probes for the human 12S gene (mtDNA) and 18S. The mtDNA values were normalized to nDNA data (mtDNA/nDNA ratio).

2.9. Measurement of ROS production. ROS production was measured using the 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) probe (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain). Cells were seeded in 96-well culture plates. Then, the cells were incubated with 100 μ M DCFH-DA in culture medium without phenol red for 30 min at 37°C and then rinsed with PBS and filled with Krebs-Ringer bicarbonate buffer. ROS levels were measured in a multiwell plate reader spectrofluorometer (Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA) for 45 minutes each 5 minutes at 485 nm to excitation and 530 nm to emission [18].

2.10. Measurement of GSH and GSSG levels, and GPx activity. To measure glutathione (GSH) and glutathione disulfide (GSSG), we used an established fluorometric method using a microplate fluorescence reader (Power-Wavex FLX 800; BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT) [20]. We spectrophotometrically

measured glutathione peroxidase (GPx) activity in a UV spectrophotometer (model UV-1603; Shimadzu Deutschland GmbH, Duisburg, Germany) [21].

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 6 Scientific software (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA) and one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's multiple comparison tests. Data were expressed as the mean \pm SEM of a minimum of three independent experiments. A *P* value of <0.05 was considered statistically significant.

3. Results

3.1. Melatonin enhances the cytotoxic effects of irradiation and CDDP in HNSCC. To evaluate the biological effect of melatonin on HNSCC sensitivity to irradiation and CDDP treatments, the clonogenic capacity and viability of both Cal-27 and SCC-9 were analyzed. As shown in Fig. 1(a) – 1(c), treatment with melatonin alone and in combination with irradiation significantly inhibited colony formation and resulted in a notable decrease in the colony ratio in a dose dependent manner as compared to control or to irradiation alone. In fact, melatonin alone totally blocked colony growth. However, CDDP displayed a greater capacity than irradiation to decrease clonogenic formation (Fig 1(f) – 1(h)).

MTT assays of both cell lines were also performed. In line with the inhibition of clonogenic capacity, melatonin markedly decreased cell viability in the irradiated cells in a dose dependent manner, especially at doses 500 and 1500 μ M, as compared to control and irradiation alone (Fig. 1(d) –1(e)), although SCC-9 cells were found to be more resistant than Cal-27 cells to the treatments. Surprisingly, 100 μ M melatonin did not significantly reduce viability, particularly in SCC-9 (Fig. 1(d) –1(e)). On the other hand, melatonin significantly decreased cell viability in the CDDP-treated cells in a dose dependent manner as compared to control and CDDP alone (Fig 1(i) – 1(j)). SCC-9 cells were also more resistant to melatonin exposure than Cal-27 cells. The results were more significant for Cal-27 cells, which were therefore used in subsequent experiments.

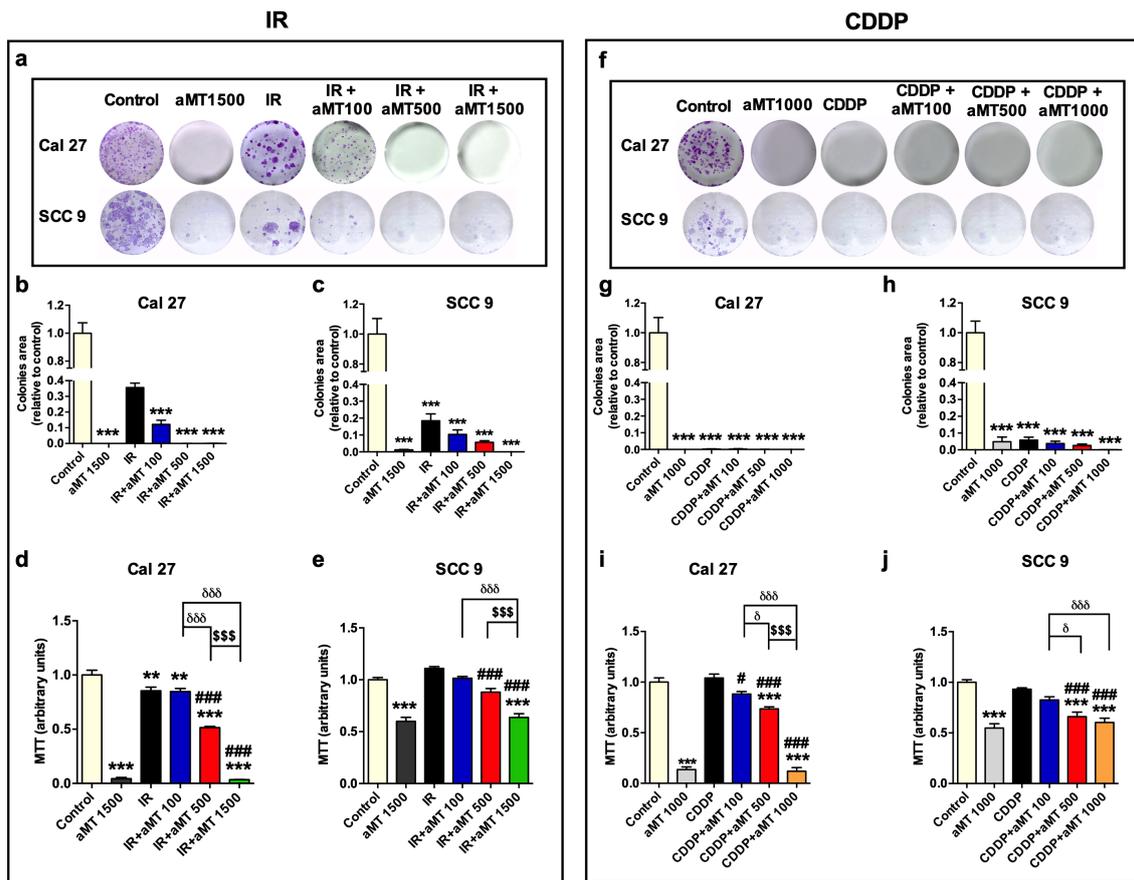


Figure 1: Melatonin increases the cytotoxic effects of irradiation (IR) and CDDP in HNSCC cell lines Cal-27 and SCC-9. Clonogenic assay of cells exposed to IR (Figures (a) – (c)) or CDDP (Figures (f) – (h)) and viability of cells exposed to IR (Figures (d) and (e)) or CDDP (Figures (i) and (j)). Treatment groups include control (vehicle), IR (8 Gy), CDDP 10 μM , melatonin (aMT) 1000 or 1500 μM and CDDP or IR plus aMT 100, 500, 1000 or 1500 μM . $n = 6$ per group. Data are presented as mean \pm SEM. $**P < .01$, $***P < .001$ vs. control, $\#P < .05$, $###P < .001$ vs. IR or CDDP-treated group, $\delta P < .05$, $\delta\delta\delta P < .001$ vs. IR + aMT 100, $\$P < .05$, $$$$P < .001$, vs. IR + aMT 500.

3.2. Melatonin enhances the apoptotic effects of irradiation and CDDP in HNSCC. Since the MTT assay is a quantitative measure of cell proliferation and a decrease in proliferating cells can be caused by either cell death or halted/slow proliferation, apoptotic cell death was therefore evaluated. Early apoptotic cells showed an annexin V-FITC+/PI- staining pattern, while late apoptotic cells exhibited an annexin V-FITC+/PI+ pattern (Fig. 2) due to plasma membrane integrity loss [22]. In the combined melatonin/irradiation treatment, melatonin increased early apoptosis, which reached a maximum level at 1500 μM as compared to control (Fig. 2(a) – 2(b)). However, irradiation alone enhanced late apoptosis but did not affect early apoptosis (Fig. 2(a) – 2(b)). This indicates that melatonin increases the acute cytotoxicity of irradiation. By contrast, treatment with CDDP alone did not increase apoptosis pathway activation (Fig. 2(g) – 2(h)), while the combined treatment increased late apoptosis at a melatonin dose of 500 μM (Fig. 2(h)).

Apoptosis initiation is associated with the translocation of the inactive form of Bax from the

cytoplasm to the mitochondria and suppression of the pro-survival protein Bcl-2. Bax and Bcl-2 protein expression was explored using western blot analysis. In line with the results above, Bcl-2 levels were clearly attenuated by 500 and 1500 μM melatonin doses combined with irradiation, which increased the Bax/Bcl-2 ratio, with a maximum effect being observed at 1500 μM (Fig. 2(c) – 2(f)). Moreover, melatonin combined with CDDP increased the Bax/Bcl-2 ratio more than when combined with irradiation despite using a lower concentration of melatonin (1000 μM vs. 1500 μM) (Fig. 2(i) – 2(l)). These data indicate that melatonin combined with CDDP increases cytotoxicity more than irradiation.

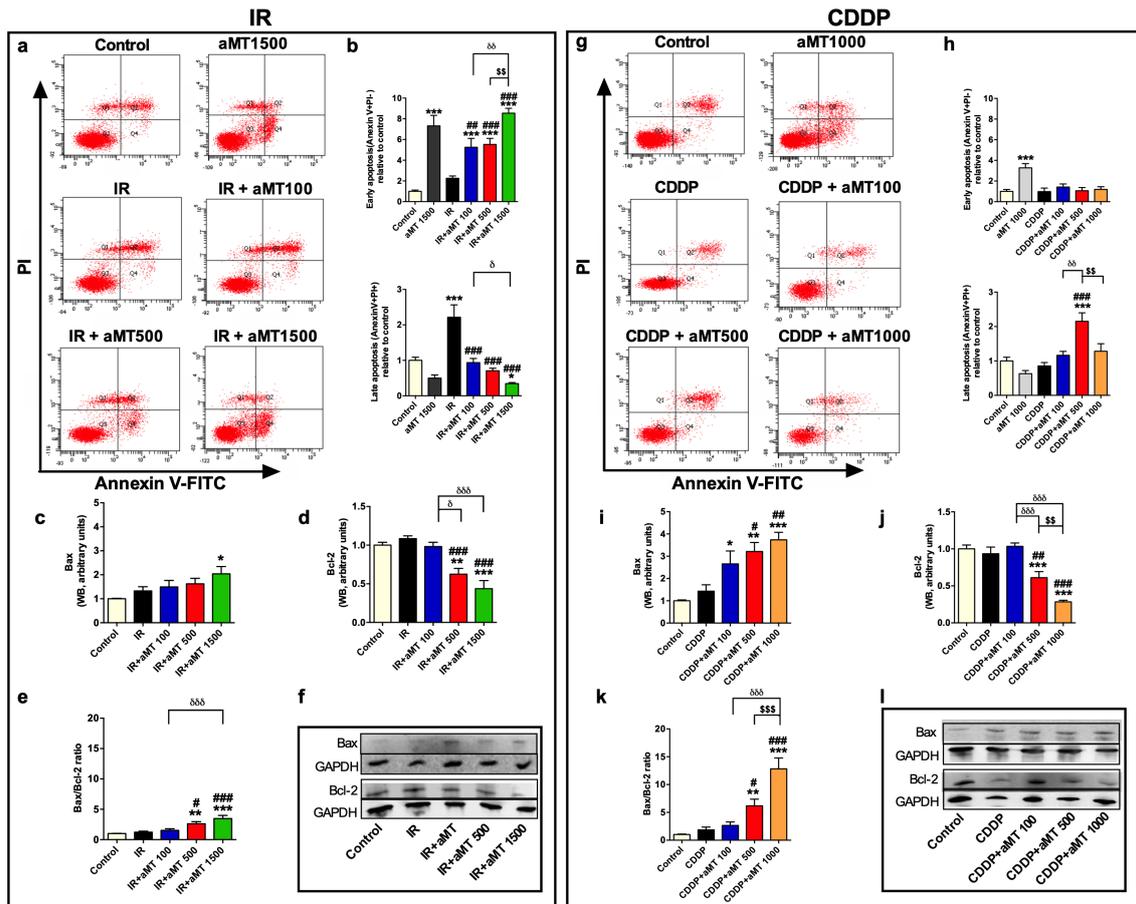


Figure 2: Combined treatment with melatonin and IR or CDDP increases apoptotic cell death in HNSCC cell line Cal-27. Apoptosis was analyzed by flow cytometry. (Figures (a) – (g)) Representative plots showing the redistribution of phosphatidylserine (annexin V staining) in the presence of propidium iodide (PI). The bottom right quadrant represents the percentage of early apoptotic cells (Annexin V+/PI-), whereas the top right quadrant represents the percentage of late apoptotic cells (Annexin V+/PI+). Statistical analysis of early and late apoptosis of cells exposed to IR (Figure (b)) and CDDP (Figure (h)), respectively. Western blot analysis (Figures (f) – (l)) and densitometric quantification of Bax (Figures (c) – (i)) and Bcl2 (Figures (d) – (j)), and the Bax/Bcl2 ratio (Figures (e) – (k)) in cells exposed to IR or CDDP, respectively. Treatment groups include control (vehicle), IR (8 Gy), CDDP 10 μM , melatonin (aMT) 1000 or 1500 μM and CDDP or IR plus aMT 100, 500, 1000 or 1500 μM . $n = 6$ per group. Data are presented as mean \pm SEM. * $P < .05$, ** $P < .01$, *** $P < .001$ vs. control, # $P < .05$, ## $P < .01$, ### $P < .001$ vs. IR or CDDP-

treated group, $\delta P < .05$, $\delta\delta P < .01$, $\delta\delta\delta P < .001$ vs. IR + aMT 100, $\$ P < .05$, $\$\$ P < .01$, $\$\$\$ P < .001$, vs. IR + aMT 500.

3.3. Enhancement of mitochondrial changes by melatonin. Mitochondria are critically involved in controlling regulated cell death triggered by different cancer treatments [9] and several metabolic aspects of the mitochondrial biology also influence therapeutic responses [23]. As melatonin regulates mitochondrial homeostasis [24,25], we hypothesized that melatonin potentiates the cytotoxicity of irradiation and CDDP treatments modifying mitochondrial function. We first determined the oxygen consumption rate (OCR), which is an indicator of mitochondrial oxidative phosphorylation activity and ATP production. While measuring oxygen consumption rates, we sequentially added oligomycin, FCCP, and a combination of rotenone and antimycin to the cells to assess electron transport chain integrity (Fig. 3(a) – 3(k)). Irradiated Cal-27 cells exhibited a significant increase in basal respiration (Fig. 3(b)) and in the maximal respiratory capacity of the electron transport system (ETS) (Fig. 3(c)) at melatonin 500 μ M, which correlated with an increase of ATP (Fig. 3(d)) with no change in proton leak (Fig. 3(e)). Surprisingly, melatonin 1500 μ M caused a decrease in the OCR as compared to melatonin 500 μ M (Fig. 3(b) – 3(d)), suggesting defective mitochondrial function at higher concentrations of melatonin. By contrast, cells treated with CDDP alone or melatonin 100 μ M showed a decrease in the OCR (Fig. 3(l) – 3(n)), while melatonin doses of 500 and 1000 μ M rescued the OCR as compared to control. These results are in line with the direct effect of CDDP on mitochondria which interferes with mtDNA transcription, resulting in reduced mitochondrial function [26].

To further determine changes in mitochondria in the presence of melatonin, we next analyzed mitochondrial mass and mtDNA (Fig. 3(f), 3(g), 3(p) and 3(q)). To examine mitochondrial mass, we used acridine orange. Fluorescence data revealed that high concentrations of melatonin significantly augmented mitochondrial mass compared to control, especially at 1500 and 1000 μ M, in cells exposed to irradiation or CDDP (Fig. 3(f) – 3(p)). Moreover, similar doses of melatonin increased the mtDNA/nDNA ratio (Fig. 3(g), 3(q)), indicating that melatonin significantly increases mtDNA.

In a previous study, we demonstrated that melatonin may induce both apoptosis and autophagy in HNSCC [18]. We determined the levels of autophagy-related proteins ATG12-ATG5, as autophagy requires the covalent attachment of protein Atg12 to protein ATG5 through an ubiquitin-like conjugation system and the mitophagic marker NIX. The combined melatonin and irradiation treatment increased ATG12-ATG5 levels at all doses (Fig. 3(h) and 3(j)) but decreased NIX levels (Fig. 3(i) and 3(j)). However, the combination of melatonin and CDDP increased both ATG12-ATG5 and NIX (Fig. 3(r) – 3(t)). These data indicate that the combined melatonin and CDDP treatment, with its higher toxicity, results in autophagy and mitophagy.

These results could denote a correlation between an increase of mitochondrial activity induced by melatonin and ROS production.

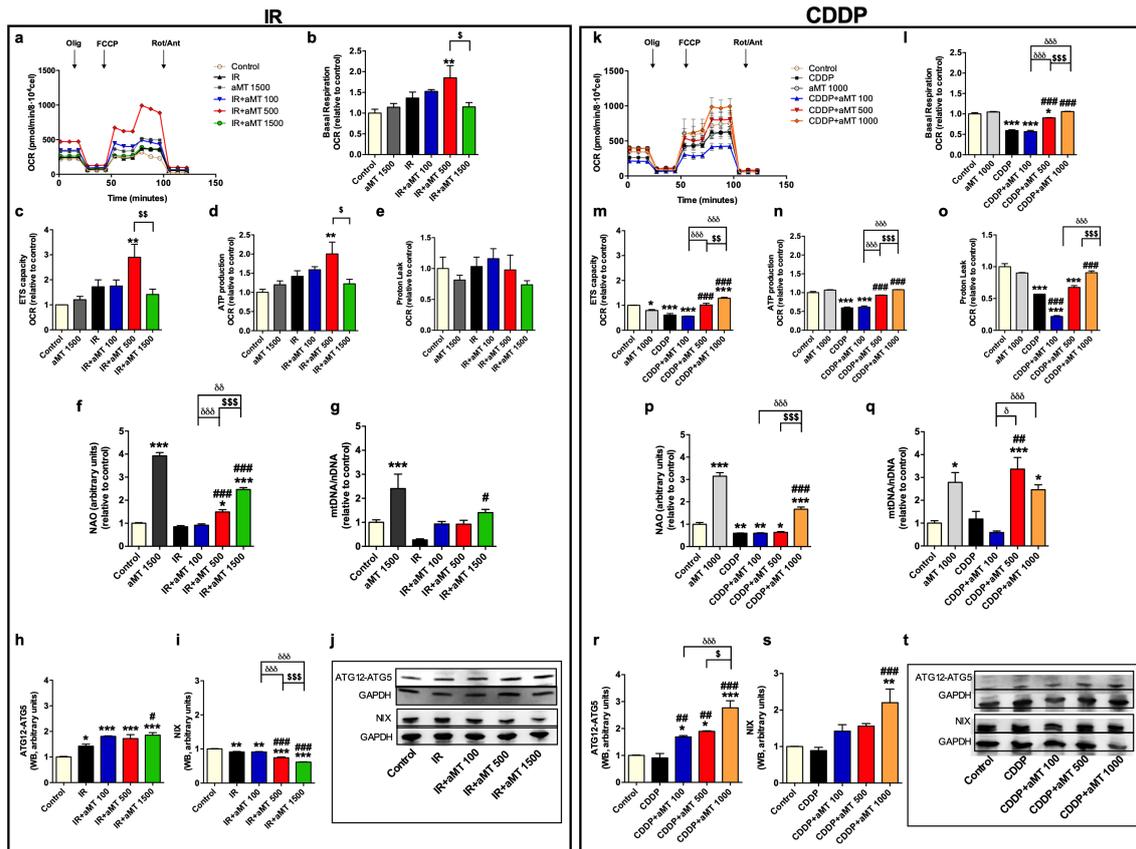


Figure 3: Effects of combined treatment with melatonin and IR or CDDP on Cal-27 HNSCC mitochondria. Oxygen consumption rate (OCR) (Figures (a) and (k)), basal respiration (Figures (b) and (l)), maximal respiratory capacity (ETS) (Figures (c) and (m)), ATP production (Figures (d) and (n)) and proton leak (Figures (e) and (o)) in cells exposed to IR or CDDP, respectively. Mitochondrial mass (NAO) (Figures (f) and (p)), mtDNA (Figures (g) and (q)) and western blot analysis and densitometric quantification of ATG12-ATG5 (Figures (h), (j), (r) and (t)) and Nix (Figures (i), (j), (s), and (t)) in cells exposed to IR or CDDP, respectively. Treatment groups include control (vehicle), IR (8 Gy), CDDP 10 μ M, melatonin (aMT) 1000 or 1500 μ M and CDDP or IR plus aMT 100, 500, 1000 or 1500 μ M. $n = 6$ per group. Data are presented as mean \pm SEM. * $P < .05$, ** $P < .01$, *** $P < .001$ vs. control, # $P < .05$, ## $P < .01$, ### $P < .001$ vs. IR or CDDP-treated group, $\delta P < .05$, $\delta\delta P < .01$, $\delta\delta\delta P < .001$ vs. IR + aMT 100, $\$ P < .05$, $\$\$ P < .01$, $\$\$\$ P < .001$, vs. IR + aMT 500.

3.4. Enhancement of oxidative stress in the presence of melatonin. To determine whether mitochondrial changes correlate with an increase in ROS, we measured ROS generation intensity using the DCFH-DA probe (Fig. 4(a)). We observed a significant increase in intracellular ROS levels at melatonin 1500 μ M in irradiated cells and, consequently, an increase in the GSSG/GSH ratio (Fig. 4(c) – 4(e)). Moreover, melatonin 500 and 1000 μ M resulted in a sharper increase in ROS production in cells exposed to CDDP as compared to irradiation (Fig. 4(g)). However, the increase in the GSSG/GSH ratio was only observed at 1000 μ M (Fig. 4(i)–4(k)), indicating that high doses of melatonin increased glutathione synthesis (Fig. 4(f) and 4(l)). A parallel decrease in GPx activity was observed at the highest concentration of melatonin,

especially in cells treated with CDDP (Fig. 4(h)). However, at melatonin 100 μM combined with irradiation, we observed an increase in GPx activity (Fig. 4(b)). These results are consistent with the lower levels of ROS observed at melatonin 100 μM as compared to 1500 μM . These data suggest that mitochondria cause a melatonin-induced ROS response in cancer cells which enhances the cytotoxic effects of irradiation and CDDP. Furthermore, despite being known to be a strong antioxidant, previous studies have shown that melatonin increases ROS production in tumor cells [18]. Thus, melatonin induces apoptosis in HNSCC by generating intracellular ROS and activating the mitochondrial pathway, thus increasing the effect of irradiation and CDDP.

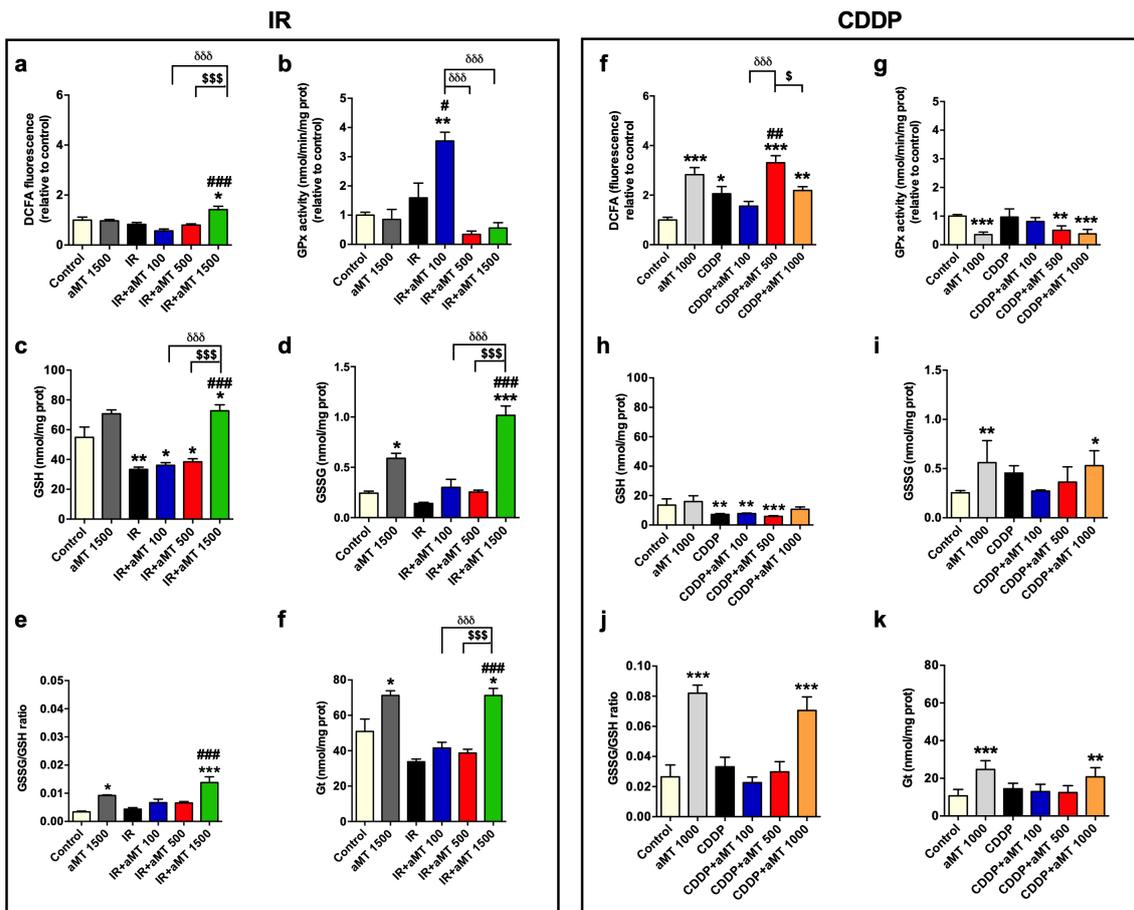


Figure 4: Combined treatment with melatonin and IR or CDDP increases oxidative stress in HNSCC cell line Cal-27. Measurements of intracellular ROS levels by fluorometry after staining with the DCF fluorescent probe (Figures (a) and (g)); GPx activity (Figures (b) and (h)); content of GSH (Figures (c) and (i)) and GSSG (Figures (d) and (j)), GSSG/GSH ratio (Figures (e) and (k)) and total glutathione (Gt) (Figures (f) and (l)) in cells exposed to IR or CDDP, respectively. Treatment groups include control (vehicle), IR (8 Gy), CDDP 10 μM , melatonin (aMT) 1000 or 1500 μM and CDDP or IR plus aMT 100, 500, 1000 or 1500 μM . $n = 6$ per group. Data are presented as mean \pm SEM. * $P < .05$, ** $P < .01$, *** $P < .001$ vs. control, # $P < .05$, ## $P < .01$, ### $P < .001$ vs. IR or CDDP-treated group, $\delta P < .05$, $\delta\delta P < .01$, $\delta\delta\delta P < .001$ vs. IR + aMT 100, \$ $P < .05$, \$\$ $P < .01$, \$\$\$ $P < .001$, vs. IR + aMT 500.

4. Discussion

Radio- and chemo-therapeutic resistance remains the major obstacle to successful cytotoxic therapy for human cancers. After the failure of the usual treatments, following chemo or radiotherapy, even more distressing situations occur. Therefore, finding a coadjuvant treatment to suppress or reduce this resistance would represent a major advance for both patients and the health system as a whole. On the other hand, the treatments currently used usually present a high degree of toxicity in healthy cells. In this study, we demonstrate that melatonin significantly affects sensitivity to irradiation and CDDP in HNSCC, as reflected by reduced cell proliferation and clonogenicity, as well as apoptosis induction. Although the antitumor activity of melatonin has been reported elsewhere [27–29], the potential mechanisms involved remain unclear. Despite all the studies carried out, there are a disconcertingly large number of possible mechanisms which could explain the oncostatic effects of melatonin, involving almost as many mechanisms as tumor types. This suggests that only epiphenomena of an, as yet, unknown underlying mechanism of melatonin have been observed [29,30].

In this study, we not only demonstrate the role of melatonin in improving the effects of irradiation and CDDP antitumor treatment, but also, more importantly, describe the possible mechanisms involved in combined treatments which enhance their anticancer properties.

Cancer cells display increased resistance to regulated cell death, often due to alterations in the mitochondrial control of this process [31]. It has been suggested that the ability of most cancer cells to flexibly rewire their mitochondrial metabolism underlies the multiple instances of chemoresistance [9]. Moreover, as melatonin has recently been shown to increase neural stem cell differentiation due to increased mitochondrial function [32], a similar mechanism could, in our view, occur in tumor cells. We therefore hypothesize that melatonin raises ROS production levels by increasing mitochondrial function in tumor cells. Consequently, cellular differentiation is expected to be caused by a change in cell metabolism, thereby increasing tumor sensitivity to other drugs. In this study, we provide, for the first time, evidence that the increase in irradiation and CDDP cytotoxicity caused by melatonin is partly due to enhanced mitochondrial function.

Our results show that melatonin-induced apoptosis coincides with a significant up-regulation of the pro-apoptotic protein Bax and a down-regulation of the anti-apoptotic protein Bcl-2 on HNSCC. Bcl-2 overexpression is often associated with considerable cancer cell resistance to apoptosis [33]. When the Bax/Bcl-2 ratio increases, the mitochondrial permeability transition pore opens which, in turn, releases apoptogenic mitochondrial proteins to activate caspases which induce cell apoptosis [34]. Interestingly, the combined melatonin and cisplatin treatment had higher cytotoxicity than the combined treatment with irradiation. The main bulk of irradiated cells may take longer to enter apoptosis than those treated with CDDP. Other authors, such as Mirzayans et al.[35], have made a similar observation that different cancer cell lines such as HCT116, MCF7 and AT12 are markedly refractory to apoptosis in response to ionizing radiation. In this regard, it is possible to broadly classify cell death mechanisms into two classes: those occurring relatively soon after irradiation and before cell division leading to early cell death; and those occurring comparatively late or after division leading to late cell death. The vast majority of proliferating normal and tumour cells die after a relatively long period following irradiation, usually after attempting

mitosis one or more times [36]. As a result, alterations in a particular gene may dramatically alter the levels of radiation-induced apoptosis, without changing the overall ability of the cell to survive [36]. In this case, cells die regardless of whether apoptosis is subsequently induced. On the other hand, the cytotoxic effect is dependent on drug concentrations, time of exposure, and time after exposure [37]. Generally, CDDP induces cell cycle arrest or apoptosis when administered at lower concentrations and induces necrosis at higher concentrations, although the effect differs between cell lines. Since CDDP exposure induces mitochondrial impairment and subsequently promotes cell death [38], high levels of mitochondrial metabolic activity are expected to enhance cisplatin cytotoxicity in cancer cells.

In order to mechanistically explain our findings, we investigated the effect of the combined treatments on mitochondrial respiration. It has been suggested that the ability of most cancer cells to flexibly rewire their mitochondrial metabolism underlies multiple instances of chemoresistance [9]. We found that melatonin combined with irradiation or CDDP increased ETS capacity and ATP production. During late-stage apoptosis, ATP levels declined, mainly due to mitochondrial function loss and reduced consumption by ATP-dependent proteases [39]. In line with this finding, we observed a decrease in ATP levels following the combined treatment with irradiation and melatonin 1500 μ M as compared to the combined treatment with melatonin 500 μ M. These results are consistent with the increase in apoptosis at melatonin 1500 μ M alone or combined with irradiation. However, the combined treatment with melatonin and CDDP was more toxic than that with irradiation. The occurrence of ATP deprivation in all types of cell death suggests that energy metabolism may play a critical role in cancer cell survival under stress conditions. Thus, we demonstrate that the strong antitumor effect of irradiation or CDDP combined with melatonin is partly due to enhanced mitochondrial function.

Mitochondria also contain other molecules such as mtDNA that can act as extracellular danger signals. In fact, head and neck tumor cells lacking mtDNA become cisplatin resistant [40]. Our results show that melatonin increases mitochondrial mass and mtDNA copy number in a dose-dependent manner and raises sensitivity to irradiation and CDDP.

The release of mtDNA promotes the secretion of type I interferon by malignant cells, which is necessary for the activation of optimal anticancer immune responses following chemo and radiation therapy [41]. Thus, mtDNA also acts as a danger signal [42] linking intracellular stress responses to the preservation of extracellular homeostasis [43].

In addition, autophagy is one of the principal mechanisms involved in controlling cellular homeostasis [44][45]. Although there is evidence to suggest that autophagy has a pro-survival function, excessive autophagy may lead to cell death, a process morphologically distinct from apoptosis [46]. Moreover, autophagy-deficient malignant cells, which succumb to *in vivo* chemotherapy and radiation therapy, lose their ability to drive anticancer immunity [9]. We detected increased expression of ATG12-ATG5, which play a critical role in the biogenesis and elongation of the autophagosomal membrane following treatment with high concentrations of melatonin combined with irradiation or CDDP. However, Nix, which is required for the selective mitophagy-dependent elimination of mitochondria [47], only increased with high concentrations of melatonin combined with CDDP. The role of mitophagy in cancers is controversial. Mitophagy can facilitate survival through adaptation to stress, and mitophagic defects also promote metastatic dissemination [48], most likely due to moderate overproduction of ROS [49], which

activate several signal transduction cascades associated with metastatic dissemination [49]. Conversely, under severe oxidative stress conditions, ROS *de facto* inhibit metastatic dissemination, most likely as a direct consequence of increased apoptosis [50,51].

Therefore, given that mitochondria are the main source of cellular ROS, we hypothesize that melatonin enhances the cytotoxic effects of irradiation and CDDP caused by increased ROS production. Our study shows that melatonin significantly increases intracellular ROS in cells exposed to irradiation or CDDP. However, ROS production levels increased following the combined treatment with CDDP as compared to treatment with irradiation. Other research, which reinforces our conclusions, has found that ROS-scavenging enzyme expression increases in CDDP-resistant cancer cells as compared to normal cells, and that mitochondrial dysfunction may bestow resistance on CDDP due to the absence of or reduction in mitochondrial ROS responses [26].

The accumulation of intracellular ROS, which damages organelle proteins, enzymes and membranes, eventually activates apoptosis signaling pathways [52]. ROS can also cause cell death either directly or through activation of intracellular pro-apoptotic pathways [52]. Besides triggering apoptosis, oxidative stress can promote permanent proliferative arrest known as cellular senescence [53].

Increasing oxidative stress targeting mitochondria is therefore a novel therapeutic strategy for selectively killing cancer cells. Our results clearly indicate that the potentiation of the cytotoxic and pro-apoptotic effects of irradiation and CDDP by melatonin is mediated, at least partially, by the activation of mitochondrial function and subsequent overproduction of ROS *in vitro* in a dose-dependent manner. Our data suggest that there is a correlation between the cell content of melatonin and its apoptotic effects, thus supporting the notion that high concentrations of melatonin in cancer cells are required to enhance the cytotoxic effect of irradiation or CDDP.

A major limitation in the use of irradiation for therapeutic purposes is the development of side-effects. Previous studies have shown that melatonin not only enhances the oncotic effects of radio- and/or chemo-therapy on tumor cells, but also protects normal cells against the adverse effects of these treatments [18,54–56]. We have patented a melatonin gel to prevent mucositis, which has completed a phase II clinical trial (EudraCT number: 2015-001534-13) in 80 patients with head and neck cancer, and have demonstrated that melatonin protects oral mucosa against the side effects of radiotherapy. All these data show that melatonin constitutes an innovative adjuvant strategy in the treatment of cancer.

5. Conclusions

Our study suggests that high doses of melatonin sensitize cancer cells to CDDP and irradiation by enhancing their mitochondrial function. Melatonin is a ROS inducer in HNSCC, and the accumulation of intracellular ROS plays an upstream role in mitochondria-mediated apoptosis. Our findings indicate that melatonin has great potential not only in augmenting radio- and chemo-sensitivity to cisplatin and other treatments, but also in reducing toxicity caused by radio- and chemo-therapeutic agents in cancer patients. Our study could provide a basis and guidelines for the application of treatment with melatonin combined with radiotherapy or CDDP or other chemotherapeutic agents to improve therapeutic efficiency for cancers, especially for

head and neck squamous cell carcinoma.

Data availability

The datasets generated during and/or analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Conflicts of Interest

The authors declared that they have no conflicts of interest to this work.

Acknowledgements

This study was partially supported by grants from Ministerio de Economía y Competitividad, Spain, and the FEDER Regional Development Fund (n° SAF2013-49019 and SAF2017-85903), from the Instituto Carlos III (n° CB/10/00238) and from the Consejería de Economía, Innovación, Ciencia y Empleo, Junta de Andalucía (CTS- 101). JF was supported by a grant from the University of Granada (ACG122/12a) and is a “FPU fellow” from the Ministerio de Educación Cultura y Deporte, Spain. AQH was supported by the Mayo Clinic Professorship and a Clinician Investigator award as well as the NIH (R43CA221490, R01CA200399, R01CA183827, R01CA195503, R01CA216855). We wish to thank Michael O’Shea for proofreading the paper and Dr. Jesús López Peñalver (University of Granada) for providing technical support.

References

- [1] World Health Organisation, Locally Advanced Squamous Carcinoma of the Head and Neck, *Union Int. Cancer Control Rev. Cancer Med. WHO List Essent. Med.* (2014) 1–8.
- [2] P. Maier, L. Hartmann, F. Wenz, C. Herskind, Cellular Pathways in Response to Ionizing Radiation and Their Targetability for Tumor Radiosensitization, *Int. J. Mol. Sci.* 17 (2016) 102. doi:10.3390/ijms17010102.
- [3] H. Wang, X. Mu, H. He, X.-D. Zhang, Cancer Radiosensitizers, *Trends Pharmacol. Sci.* 39 (2018) 24–48. doi:10.1016/j.tips.2017.11.003.
- [4] J.M. Pascoe, J.J. Roberts, Interactions between mammalian cell DNA and inorganic platinum compounds. I. DNA interstrand cross-linking and cytotoxic properties of platinum(II) compounds., *Biochem. Pharmacol.* 23 (1974) 1359–65. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0006295274903542>.
- [5] Y. Yamano, K. Uzawa, K. Saito, D. Nakashima, A. Kasamatsu, H. Koike, Y. Kouzu, K. Shinozuka, K. Nakatani, K. Negoro, S. Fujita, H. Tanzawa, Identification of cisplatin-resistance related genes in head and neck squamous cell carcinoma, *Int. J. Cancer.* 126 (2010) 437–449. doi:10.1002/ijc.24704.
- [6] Y. Benhamou, V. Picco, G. Pagès, The telomere proteins in tumorigenesis and clinical outcomes of oral squamous cell carcinoma, *Oral Oncol.* 57 (2016) 46–53. doi:10.1016/j.oraloncology.2016.04.006.
- [7] G. Kroemer, L. Senovilla, L. Galluzzi, F. André, L. Zitvogel, Natural and therapy-induced immunosurveillance

- in breast cancer, *Nat. Med.* 21 (2015) 1128–1138. doi:10.1038/nm.3944.
- [8] A. Erez, R.J. DeBerardinis, Metabolic dysregulation in monogenic disorders and cancer — finding method in madness, *Nat. Rev. Cancer.* 15 (2015) 440–448. doi:10.1038/nrc3949.
- [9] P.E. Porporato, N. Filigheddu, J.M.B.-S. Pedro, G. Kroemer, L. Galluzzi, Mitochondrial metabolism and cancer, *Cell Res.* 28 (2018) 265–280. doi:10.1038/cr.2017.155.
- [10] D.J. Hausenloy, D.M. Yellon, Ischaemic conditioning and reperfusion injury, *Nat. Rev. Cardiol.* 13 (2016) 193–209. doi:10.1038/nrcardio.2016.5.
- [11] S. Fulda, L. Galluzzi, G. Kroemer, Targeting mitochondria for cancer therapy, *Nat. Rev. Drug Discov.* 9 (2010) 447–464. doi:10.1038/nrd3137.
- [12] L. Galluzzi, O. Kepp, M.G. Vander Heiden, G. Kroemer, Metabolic targets for cancer therapy., *Nat. Rev. Drug Discov.* 12 (2013) 829–46. doi:10.1038/nrd4145.
- [13] D. Acuña-Castroviejo, G. Escames, C. Venegas, M.E. Díaz-Casado, E. Lima-Cabello, L.C. López, S. Rosales-Corral, D.-X. Tan, R.J. Reiter, Extrapineal melatonin: sources, regulation, and potential functions, *Cell. Mol. Life Sci.* 71 (2014) 2997–3025. doi:10.1007/s00018-014-1579-2.
- [14] C. Alonso-González, A. González, C. Martínez-Campa, J. Gómez-Arozamena, S. Cos, Melatonin sensitizes human breast cancer cells to ionizing radiation by downregulating proteins involved in double-strand DNA break repair, *J. Pineal Res.* 58 (2015) 189–197. doi:10.1111/jpi.12205.
- [15] P. Plamee, N. Weerapreeyakul, S. Barusrux, N.P. Johns, Melatonin potentiates cisplatin-induced apoptosis and cell cycle arrest in human lung adenocarcinoma cells, *Cell Prolif.* 48 (2015) 67–77. doi:10.1111/cpr.12158.
- [16] Z. Ma, Y. Yang, C. Fan, J. Han, D. Wang, S. Di, W. Hu, D. Liu, X. Li, R.J. Reiter, X. Yan, Melatonin as a potential anticarcinogen for non-small-cell lung cancer, *Oncotarget.* 7 (2016). doi:10.18632/oncotarget.8776.
- [17] Y.-X. Lu, D.-L. Chen, D.-S. Wang, L.-Z. Chen, H.-Y. Mo, H. Sheng, L. Bai, Q.-N. Wu, H.-E. Yu, D. Xie, J.-P. Yun, Z.-L. Zeng, F. Wang, H.-Q. Ju, R.-H. Xu, Melatonin enhances sensitivity to fluorouracil in oesophageal squamous cell carcinoma through inhibition of Erk and Akt pathway, *Cell Death Dis.* 7 (2016) e2432–e2432. doi:10.1038/cddis.2016.330.
- [18] Y.-Q. Shen, A. Guerra-Librero, B.I. Fernandez-Gil, J. Florido, S. García-López, L. Martínez-Ruiz, M. Mendivil-Perez, V. Soto-Mercado, D. Acuña-Castroviejo, H. Ortega-Arellano, V. Carriel, M.E. Diaz-Casado, R.J. Reiter, I. Rusanova, A. Nieto, L.C. López, G. Escames, Combination of melatonin and rapamycin for head and neck cancer therapy: Suppression of AKT/mTOR pathway activation, and activation of mitophagy and apoptosis via mitochondrial function regulation, *J. Pineal Res.* 64 (2018) e12461. doi:10.1111/jpi.12461.
- [19] C. Venegas, J.A. García, G. Escames, F. Ortiz, A. López, C. Doerrier, L. García-Corzo, L.C. López, R.J. Reiter, D. Acuña-Castroviejo, Extrapineal melatonin: analysis of its subcellular distribution and daily fluctuations, *J. Pineal Res.* 52 (2012) 217–227. doi:10.1111/j.1600-079X.2011.00931.x.
- [20] P.J. Hissin, R. Hilf, A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues,

- Anal. Biochem. 74 (1976) 214–226. doi:10.1016/0003-2697(76)90326-2.
- [21] R.H. Jaskot, E.G. Charlet, E.C. Grose, M.A. Grady, J.H. Roycroft, An automated analysis of glutathione peroxidase, S-transferase, and reductase activity in animal tissue., *J. Anal. Toxicol.* 7 (1983) 86–8.
- [22] E. Brauchle, S. Thude, S.Y. Brucker, K. Schenke-Layland, Cell death stages in single apoptotic and necrotic cells monitored by Raman microspectroscopy, *Sci. Rep.* 4 (2015) 4698. doi:10.1038/srep04698.
- [23] D.R. Green, L. Galluzzi, G. Kroemer, Metabolic control of cell death, *Science* (80-.). 345 (2014) 1250256–1250256. doi:10.1126/science.1250256.
- [24] C. Doerrier, J.A. García, H. Volt, M.E. Díaz-Casado, M. Luna-Sánchez, B. Fernández-Gil, G. Escames, L.C. López, D. Acuña-Castroviejo, Permeabilized myocardial fibers as model to detect mitochondrial dysfunction during sepsis and melatonin effects without disruption of mitochondrial network, *Mitochondrion.* 27 (2016) 56–63. doi:10.1016/j.mito.2015.12.010.
- [25] D. Acuña-Castroviejo, I. Rahim, C. Acuña-Fernández, M. Fernández-Ortiz, J. Solera-Marín, R.K.A. Sayed, M.E. Díaz-Casado, I. Rusanova, L.C. López, G. Escames, Melatonin, clock genes and mitochondria in sepsis, *Cell. Mol. Life Sci.* 74 (2017) 3965–3987. doi:10.1007/s00018-017-2610-1.
- [26] R. Marullo, E. Werner, N. Degtyareva, B. Moore, G. Altavilla, S.S. Ramalingam, P.W. Doetsch, Cisplatin Induces a Mitochondrial-ROS Response That Contributes to Cytotoxicity Depending on Mitochondrial Redox Status and Bioenergetic Functions, *PLoS One.* 8 (2013) e81162. doi:10.1371/journal.pone.0081162.
- [27] R. Reiter, S. Rosales-Corral, D.-X. Tan, D. Acuna-Castroviejo, L. Qin, S.-F. Yang, K. Xu, Melatonin, a Full Service Anti-Cancer Agent: Inhibition of Initiation, Progression and Metastasis, *Int. J. Mol. Sci.* 18 (2017) 843. doi:10.3390/ijms18040843.
- [28] S. Casado-Zapico, J. Rodriguez-Blanco, G. GarcÃ-a-Santos, V. MartÃ-n, A.M. SÃ¡nchez-SÃ¡nchez, I. AntolÃ-n, C. Rodriguez, Synergistic antitumor effect of melatonin with several chemotherapeutic drugs on human Ewing sarcoma cancer cells: potentiation of the extrinsic apoptotic pathway, *J. Pineal Res.* 48 (2010) 72–80. doi:10.1111/j.1600-079X.2009.00727.x.
- [29] R.J. Reiter, J.C. Mayo, D.-X. Tan, R.M. Sainz, M. Alatorre-Jimenez, L. Qin, Melatonin as an antioxidant: under promises but over delivers, *J. Pineal Res.* 61 (2016) 253–278. doi:10.1111/jpi.12360.
- [30] R.J. Reiter, D.X. Tan, A. Galano, Melatonin: Exceeding Expectations, *Physiology.* 29 (2014) 325–333. doi:10.1152/physiol.00011.2014.
- [31] D. Hanahan, R.A. Weinberg, The hallmarks of cancer., *Cell.* 100 (2000) 57–70. doi:10.1007/s00262-010-0968-0.
- [32] M. Mendivil-Perez, V. Soto-Mercado, A. Guerra-Librero, B.I. Fernandez-Gil, J. Florido, Y.-Q. Shen, M.A. Tejada, V. Capilla-Gonzalez, I. Rusanova, J.M. Garcia-Verdugo, D. Acuña-Castroviejo, L.C. López, C. Velez-Pardo, M. Jimenez-Del-Rio, J.M. Ferrer, G. Escames, Melatonin enhances neural stem cell differentiation and engraftment by increasing mitochondrial function, *J. Pineal Res.* 63 (2017). doi:10.1111/jpi.12415.

- [33] R.M. Perciavalle, D.P. Stewart, B. Koss, J. Lynch, S. Milasta, M. Bathina, J. Temirov, M.M. Cleland, S. Pelletier, J.D. Schuetz, R.J. Youle, D.R. Green, J.T. Opferman, Anti-apoptotic MCL-1 localizes to the mitochondrial matrix and couples mitochondrial fusion to respiration, *Nat. Cell Biol.* 14 (2012) 575–583. doi:10.1038/ncb2488.
- [34] M.H. Kang, C.P. Reynolds, Bcl-2 Inhibitors: Targeting Mitochondrial Apoptotic Pathways in Cancer Therapy, *Clin. Cancer Res.* 15 (2009) 1126–1132. doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-0144.
- [35] A.B. and M.D. Mirzayans R, Impact of Premature Senescence on Radiosensitivity Measured by High Throughput Cell-Based Assays, *Int. J. Mol. Sci.* 18 (2017) 1460. doi:https://doi.org/10.3390/ijms18071460.
- [36] Wouters BG, Cell death after irradiation: how, when and why cells die. *Basic Clinical Radiobiology*, 4th ed., CRC Press, London, (2009). ISBN: 9781444109610.
- [37] G.K. Janson V, Behnam-Motlagh P, Henriksson R, Hörstedt P, Engström KG, Phase-contrast microscopy studies of early cisplatin-induced morphological changes of malignant mesothelioma cells and the correspondence to induced apoptosis, *Exp. Lung Res.* 34 (2008) 49–67. doi:10.1080/01902140701884398.
- [38] F.M. Santandreu, P. Roca, J. Oliver, Uncoupling protein-2 knockdown mediates the cytotoxic effects of cisplatin, *Free Radic. Biol. Med.* 49 (2010) 658–666. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2010.05.031.
- [39] Y. Zhou, F. Tozzi, J. Chen, F. Fan, L. Xia, J. Wang, G. Gao, A. Zhang, X. Xia, H. Brasher, W. Widger, L.M. Ellis, Z. Weihua, Intracellular ATP Levels Are a Pivotal Determinant of Chemoresistance in Colon Cancer Cells, *Cancer Res.* 72 (2012) 304–315. doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-1674.
- [40] Z. Yang, L.M. Schumaker, M.J. Egorin, E.G. Zuhowski, Z. Quo, K.J. Cullen, Cisplatin preferentially binds mitochondrial DNA and voltage-dependent anion channel protein in the mitochondrial membrane of head and neck squamous cell carcinoma: Possible role in apoptosis, *Clin. Cancer Res.* 12 (2006) 5817–5825. doi:10.1158/1078-0432.CCR-06-1037.
- [41] C. Vanpouille-Box, A. Alard, M.J. Aryankalayil, Y. Sarfraz, J.M. Diamond, R.J. Schneider, G. Inghirami, C.N. Coleman, S.C. Formenti, S. Demaria, DNA exonuclease Trex1 regulates radiotherapy-induced tumour immunogenicity, *Nat. Commun.* 8 (2017) 15618. doi:10.1038/ncomms15618.
- [42] L. Galluzzi, O. Kepp, G. Kroemer, Mitochondria: master regulators of danger signalling, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13 (2012) 780–788. doi:10.1038/nrm3479.
- [43] L. Galluzzi, A. López-Soto, S. Kumar, G. Kroemer, Caspases Connect Cell-Death Signaling to Organismal Homeostasis, *Immunity.* 44 (2016) 221–231. doi:10.1016/j.immuni.2016.01.020.
- [44] M. Marinković, M. Šprung, M. Buljubašić, I. Novak, Autophagy Modulation in Cancer : Current Knowledge on Action and Therapy, *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2018 (2018) 1–18.
- [45] L. Galluzzi, E.H. Baehrecke, A. Ballabio, P. Boya, J.M. Bravo-San Pedro, F. Cecconi, A.M. Choi, C.T. Chu, P. Codogno, M.I. Colombo, A.M. Cuervo, J. Debnath, V. Deretic, I. Dikic, E. Eskelinen, G.M. Fimia, S. Fulda, D.A. Gewirtz, D.R. Green, M. Hansen, J.W. Harper, M. Jäättelä, T. Johansen, G. Juhasz, A.C. Kimmelman, C.

- Kraft, N.T. Ktistakis, S. Kumar, B. Levine, C. Lopez-Otin, F. Madeo, S. Martens, J. Martinez, A. Melendez, N. Mizushima, C. Münz, L.O. Murphy, J.M. Penninger, M. Piacentini, F. Reggiori, D.C. Rubinsztein, K.M. Ryan, L. Santambrogio, L. Scorrano, A.K. Simon, H. Simon, A. Simonsen, N. Tavernarakis, S.A. Tooze, T. Yoshimori, J. Yuan, Z. Yue, Q. Zhong, G. Kroemer, Molecular definitions of autophagy and related processes, *EMBO J.* 36 (2017) 1811–1836. doi:10.15252/embj.201796697.
- [46] A. V. Kulikov, E.A. Luchkina, V. Gogvadze, B. Zhivotovsky, Mitophagy: Link to cancer development and therapy, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 482 (2017) 432–439. doi:10.1016/j.bbrc.2016.10.088.
- [47] R.L. Schweers, J. Zhang, M.S. Randall, M.R. Loyd, W. Li, F.C. Dorsey, M. Kundu, J.T. Opferman, J.L. Cleveland, J.L. Miller, P.A. Ney, NIX is required for programmed mitochondrial clearance during reticulocyte maturation, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104 (2007) 19500–19505. doi:10.1073/pnas.0708818104.
- [48] A.H. Chourasia, K. Tracy, C. Frankenberger, M.L. Boland, M.N. Sharifi, L.E. Drake, J.R. Sachleben, J.M. Asara, J.W. Locasale, G.S. Karczmar, K.F. Macleod, Mitophagy defects arising from BNip3 loss promote mammary tumor progression to metastasis, *EMBO Rep.* 16 (2015) 1145–1163. doi:10.15252/embr.201540759.
- [49] P.E. Porporato, V.L. Payen, J. Pérez-Escuredo, C.J. De Saedeleer, P. Danhier, T. Copetti, S. Dhup, M. Tardy, T. Vazeille, C. Bouzin, O. Feron, C. Michiels, B. Gallez, P. Sonveaux, A Mitochondrial Switch Promotes Tumor Metastasis, *Cell Rep.* 8 (2014) 754–766. doi:10.1016/j.celrep.2014.06.043.
- [50] E. Piskounova, M. Agathocleous, M.M. Murphy, Z. Hu, S.E. Huddlestun, Z. Zhao, A.M. Leitch, T.M. Johnson, R.J. DeBerardinis, S.J. Morrison, Oxidative stress inhibits distant metastasis by human melanoma cells, *Nature.* 527 (2015) 186–191. doi:10.1038/nature15726.
- [51] V.I. Sayin, M.X. Ibrahim, E. Larsson, J.A. Nilsson, P. Lindahl, M.O. Bergo, Antioxidants Accelerate Lung Cancer Progression in Mice, *Sci. Transl. Med.* 6 (2014) 221ra15–221ra15. doi:10.1126/scitranslmed.3007653.
- [52] M. Redza-Dutordoir, D.A. Averill-Bates, Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species, *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1863 (2016) 2977–2992. doi:10.1016/j.bbamcr.2016.09.012.
- [53] B.G. Childs, M. Gluscevic, D.J. Baker, R.-M. Laberge, D. Marquess, J. Dananberg, J.M. van Deursen, Senescent cells: an emerging target for diseases of ageing, *Nat. Rev. Drug Discov.* 16 (2017) 718–735. doi:10.1038/nrd.2017.116.
- [54] F. Ortiz, D. Acuña-Castroviejo, C. Doerrier, J.C. Dayoub, L.C. Lopez, C. Venegas, J.A. Garcia, A. Lopez, H. Volt, M. Luna-Sanchez, G. Escames, Melatonin blunts the mitochondrial/NLRP3 connection and protects against radiation-induced oral mucositis, *J. Pineal Res.* 58 (2015) 34–49. doi:10.1111/jpi.12191.
- [55] B. Fernandez-Gil, A.E. Abdel Moneim, F. Ortiz, Y.-Q. Shen, V. Soto-Mercado, M. Mendivil-Perez, A. Guerra-Librero, D. Acuña-Castroviejo, M.M. Molina-Navarro, J.M. Garcia-Verdugo, R.K.A. Sayed, J. Florido, J.D. Luna, L. Carlos Lopez, G. Escames, Melatonin protects rats from radiotherapy-induced small intestine toxicity, *PLoS One.* 12 (2017). doi:10.1371/journal.pone.0174474.
- [56] A.E. Abdel Moneim, A. Guerra-Librero, J. Florido, Y.-Q. Shen, B. Fernández-Gil, D. Acuña-Castroviejo, G.

Escames, Oral mucositis: Melatonin gel an effective new treatment, *Int. J. Mol. Sci.* 18 (2017).
doi:10.3390/ijms18051003.