



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**FACULTAD DE QUÍMICA**

**EVALUACIÓN IN VITRO DE COMPUESTOS POLIFENÓLICOS  
DIETARIOS COMO POSIBLES AGENTES TERAPÉUTICOS PARA EL  
RABDOMIOSARCOMA ALVEOLAR PEDIÁTRICO**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA DE ALIMENTOS**

**PRESENTA**

**LIZETH ENID LÓPEZ RODRÍGUEZ**



**Ciudad Universitaria, CDMX.**

**2023**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:**      **Profesor: Inés Miranda Martínez**

**VOCAL:**              **Profesor: María Amanda Gálvez Mariscal**

**SECRETARIO:**    **Profesor: Rebeca Santes Palacios**

**1er. SUPLENTE:**   **Profesor: Juan Diego Ortiz Palma Pérez**

**2º SUPLENTE:**     **Profesor: Verónica García Saturnino**

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: LABORATORIO DE  
TOXICOLOGÍA GENÉTICA, INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA**

## **ASESOR DEL TEMA:**

**Dra. Rebeca Santes Palacios**

## **SUSTENTANTE:**

**Lizeth Enid López Rodríguez**



El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Toxicología Genética del Instituto Nacional de Pediatría bajo la dirección de la Dra. Rebeca Santes Palacios y forma parte del proyecto de investigación con número de registro INP 2021/043 “Evaluación *in vitro* de flavonoides moduladores del citocromo P450 como potenciales agentes terapéuticos para el tratamiento de sarcomas de tejido blando pediátricos” con financiamiento de los Recursos Fiscales de Presupuesto Federal para Investigación del Instituto Nacional de Pediatría.

## AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

A mi alma máter, la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Química. Instituciones que me permitieron seguir formándome como ser humano y como futura profesionista.

Al Instituto Nacional de Pediatría, por todos los servicios prestados para el desarrollo de este proyecto.

A la Dra. Rebeca Santes Palacios, mi tutora, por su invaluable ayuda, dedicación y paciencia para dirigirme durante esta investigación. Gracias por siempre estar dispuesta a compartirme sus conocimientos y permitirme formar parte de su laboratorio y de su equipo de investigación.

A la M. en C. Carmen Araceli Torres Zárate, por tantos momentos y conocimientos compartidos, por siempre hacerme sentir bienvenida en el laboratorio.

Al personal del Laboratorio de Toxicología Genética, del Instituto Nacional de Pediatría por sus enseñanzas e invaluable apoyo.

# ÍNDICE GENERAL

<b>Índice de Tablas y figuras.....</b>	<b>7</b>
<b>Abreviaturas .....</b>	<b>8</b>
<b>Resumen .....</b>	<b>9</b>
<b>1. Introducción.....</b>	<b>10</b>
<b>2. Marco teórico.....</b>	<b>11</b>
<b>2.1 Cáncer infantil .....</b>	<b>11</b>
2.1.1 Estadísticas.....	11
2.1.2 Generalidades del cáncer .....	12
2.1.3 Tumores Sólidos .....	14
<b>2.2 Sarcomas de Tejido Blando .....</b>	<b>16</b>
2.2.1 Rabdiosarcoma.....	16
2.2.2 Tratamiento .....	17
2.2.3 Agentes terapéuticos para el tratamiento del RMS.....	18
<b>2.3 Flavonoides: Alternativa a los fármacos antineoplásicos .....</b>	<b>21</b>
2.3.1 Clasificación de los flavonoides .....	21
2.3.2 Fuentes alimenticias.....	22
2.3.3 Metabolismo de los flavonoides .....	24
2.3.4 Potencial anticancerígeno de los flavonoides .....	24
<b>2.4 Citocromo P450 .....</b>	<b>26</b>
2.4.1 Papel de los citocromos P450 en cáncer .....	26
2.4.2 Interacciones CYP-flavonoides.....	27
<b>3. Planteamiento del Problema .....</b>	<b>29</b>
<b>4. Hipótesis .....</b>	<b>29</b>
<b>5. Objetivos .....</b>	<b>29</b>
Objetivo General .....	29
Objetivos Específicos.....	29
<b>6. Materiales y Métodos .....</b>	<b>30</b>
<b>6.1 Línea celular .....</b>	<b>30</b>
<b>6.2 Reactivos.....</b>	<b>30</b>
<b>6.3 Estrategia experimental .....</b>	<b>30</b>
<b>6.4 Cultivo Celular .....</b>	<b>32</b>
<b>6.5 Ensayo de citotoxicidad/viabilidad celular.....</b>	<b>32</b>
<b>6.6 Ensayo de migración celular .....</b>	<b>33</b>
<b>6.7 Evaluación de expresión génica.....</b>	<b>33</b>
6.7.1 Extracción de ARN .....	33
6.7.2 Retrotranscripción.....	34

6.7.3	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR) .....	34
<b>6.8</b>	<b>Acoplamiento molecular <i>in silico</i> .....</b>	<b>35</b>
<b>6.9</b>	<b>Análisis estadístico.....</b>	<b>35</b>
<b>7.</b>	<b>Resultados .....</b>	<b>37</b>
7.1	Ensayos de viabilidad celular .....	37
7.2	Ensayo de migración celular .....	41
7.3	Evaluación de expresión génica.....	43
7.4	Acoplamiento molecular <i>in silico</i> .....	45
<b>8.</b>	<b>Discusión .....</b>	<b>52</b>
<b>9.</b>	<b>Conclusiones .....</b>	<b>55</b>
<b>10.</b>	<b>Anexo .....</b>	<b>56</b>
10.1	Fundamento de las Técnicas Utilizadas.....	56
10.1.1	Ensayo MTT.....	56
10.1.2	Curación de Herida.....	56
10.1.3	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR) .....	57
10.1.4	Acoplamiento Molecular.....	57
<b>11.</b>	<b>Referencias.....</b>	<b>58</b>

## Índice de Tablas y figuras

Figura 1. Síntomas de cáncer infantil (Instituto de Salud para el Bienestar, 2021) <sup>14</sup> .....	12
Figura 2. Cascada Metastásica (adaptada de Hapach et al., 2019) <sup>20</sup> .....	13
Figura 3. Estructura básica de los flavonoides y subclases <sup>60</sup> .....	22
Figura 4. Estrategia Experimental.....	31
Figura 5. Estructura química de los flavonoides probados. *Flavanol; ** Flavonoles; ***Flavanona <sup>107</sup> .....	32
Figura 6. Curvas de porcentaje de viabilidad celular a diferentes concentraciones de flavonoides, tras 48 h de exposición. a. Catequina, b. Hidrato de morin, c. Hidrato de quercetina, d. Naringina. ....	38
Figura 7. Curvas de porcentaje de viabilidad celular a diferentes concentraciones de fármacos, tras 48 h de exposición. a. Ciclofosfamida, b. Doxorrubicina, c. Vincristina, d. Ifosfamida. ....	39
Figura 8. Monitoreo de cierre de herida. + Control, ++ Morin 150 µM, +++ Doxorrubicina 1.5 µM. ....	42
Figura 9. Efecto de diferentes concentraciones de hidrato de morin sobre la expresión del CYP1B1. ....	43
Figura 10. Efecto de diferentes concentraciones de hidrato de morin sobre la expresión de CYP2E1.....	43
Figura 11. Efecto de diferentes concentraciones de hidrato de morin sobre la expresión del CYP3A4 .....	44
Figura 12. Efecto de diferentes concentraciones de hidrato de morin sobre la expresión del CYP3A5 .....	44
Figura 13. Representaciones 3D (PyMOL) y 2D (Maestro) de los modelos de unión energéticamente favorecidos entre el CYP1B1 (cian) y los flavonoides D-catequina (naranja), morin (rosa) y quercetina (amarillo) .....	47
Figura 14. Representaciones 3D (PyMOL) y 2D (Maestro) de los modelos de unión energéticamente favorecidos entre el CYP2E1 (verde) y los flavonoides D-catequina (naranja), morin (rosa) y quercetina (amarillo).....	48
Figura 15. Representaciones 3D (PyMOL) y 2D (Maestro) de los modelos de unión energéticamente favorecidos entre el CYP3A4 (azul) y los flavonoides D-catequina (naranja), morin (rosa) y quercetina (amarillo).....	49
Figura 16. Representaciones 3D (PyMOL) y 2D (Maestro) de los modelos de unión energéticamente favorecidos entre el CYP3A5 (gris) y los flavonoides D-catequina (naranja), morin (rosa) y quercetina (amarillo). ....	50
Figura 17. Representaciones 3D (PyMOL) y 2D (Maestro) de los modelos de unión energéticamente favorecidos entre LOXL2 (morado) y los flavonoides D-catequina (naranja), morin (rosa) y quercetina (amarillo). ....	51
Figura 18. Reducción del MTT en Formazán (adaptada de Kamiloglu et al., 2020) <sup>138</sup> .....	56

Tabla I. Propiedades antineoplásicas de flavonoides en diferentes tipos de cáncer .....	25
Tabla II. Concentración Citotóxica Media de flavonoides y fármacos antineoplásicos sobre las células RMS13 .....	40
Tabla III. Interacciones moleculares entre enzimas-flavonoides .....	45
Tabla III (Continuación). Interacciones moleculares entre enzimas-flavonoides.....	46

## Abreviaturas

AhR: Receptor de hidrocarburos de arilo  
 CC<sub>50</sub>: Concentración Citotóxica Media  
 CeNSIA: Centro Nacional para la Salud de la Infancia y la Adolescencia  
 CYP: Citocromo P450  
 DMSO: Dimetilsulfóxido  
 EMT: Transición Epitelio-mesénquima  
 IE: Ifosfamida y Etopósido  
 IRS: Intergroup Rhabdomyosarcoma Study  
 LOXL2: Lysyl oxidase-like 2  
 LPH: Lactasa-floricina hidrolasa  
 NRMS: No Rbdomiosarcoma  
 OMS: Organización Mundial de la Salud  
 RMS: Rbdomiosarcoma  
 SGLT-1: Cotransportador Intestinal dependiente de sodio  
 SNC: Sistema Nervioso Central  
 STB: Sarcomas de Tejido Blando  
 USDA: Departamento de Agricultura de los Estados Unidos  
 VAC: Vincristina, Actinomicina y Ciclofosfamida  
 VAI: Vincristina, Actinomicina e Ifosfamida  
 VDC: Vincristina, Doxorrubicina y Ciclofosfamida  
 VIE: Vincristina, Ifosfamida y Etopósido

## Resumen

**Antecedentes.** En el Instituto Nacional de Pediatría, el rhabdomyosarcoma (RMS) es la cuarta causa de muerte asociada a cáncer con un rango de respuesta a fármacos antineoplásicos del 20-30%, lo que disminuye la eficacia de la quimioterapia.<sup>1</sup> Además, los fármacos antineoplásicos convencionales generan toxicidad en la mayoría de los pacientes.<sup>2</sup> Los flavonoides son compuestos polifenólicos de origen natural que poseen actividad antitumoral mediante varios mecanismos como son la modulación de enzimas del metabolismo hepático (citocromos P450) o inhibición de la proliferación celular<sup>3</sup>, por lo que podrían ser buenos candidatos para el tratamiento del RMS.

**Objetivo.** Evaluar las propiedades citotóxicas, de inhibición de la migración celular y de modulación de enzimas de fase I de cuatro compuestos polifenólicos sobre una línea celular de RMS pediátrico.

**Materiales y métodos.** Cultivos celulares de una línea celular de RMS (ATCC CRL-2061) fueron expuestos a diferentes concentraciones (0-2.5 mM) de hidrato de morin, catequina, hidrato de quercetina y naringina durante 48 h, de manera independiente. Se determinó la viabilidad celular (ensayo de MTT) para calcular la Concentración Citotóxica Media (CC<sub>50</sub>) de cada compuesto. El efecto citotóxico se comparó con el producido por los antineoplásicos de referencia ciclofosfamida, ifosfamida, vincristina y doxorubicina.

Para determinar el posible efecto antimetastásico de los compuestos, se realizó el ensayo de curación de herida y la repoblación de ésta se monitoreó en el microscopio durante 6 h en las células sin tratamiento y tratadas con la CC<sub>50</sub> del flavonoide más citotóxico.

Se evaluó la expresión génica de *CYP3A4*, *CYP3A5*, *CYP2E1* y *CYP1B1* por PCR en tiempo real en las células tratadas con el flavonoide más citotóxico (0-150 µM) por 48 h.

Los experimentos *in vitro* se complementaron con ensayos *in silico* para determinar las interacciones moleculares de los polifenoles con *CYP1B1*, *CYP2E1*, *CYP3A4*, *CYP3A5* y *LOXL2*.

**Resultados.** Las CC<sub>50</sub> calculadas para los compuestos polifenólicos evaluados fueron: hidrato de morin 281.0±14.2 µM, catequina ~2.5 mM, hidrato de quercetina 237.8±2.0 µM, naringina >2.5 mM; mientras que los agentes antineoplásicos más efectivos fueron doxorubicina y vincristina con CC<sub>50</sub> de 1.7 ± 0.8 µM y 287.5 ± 90.0 µM, respectivamente.

El hidrato de morin (150 µM) inhibió la migración celular en un 69% a las 6 h e incrementó los niveles de *CYP3A4*, *CYP1B1* y *CYP2E1* en 4, 34 y 16 veces, respectivamente, en comparación con las células tratadas con el vehículo tras 48 h de exposición.

El acoplamiento molecular asistido por computadora sugiere que los apilamientos tipo  $\pi$ - $\pi$  entre los compuestos polifenólicos y las fenilalaninas del sitio catalítico de los citocromos P450 son importantes para la interacción proteína-ligando.

**Conclusiones.** El hidrato de morin es citotóxico, incluso más que algunos antineoplásicos de referencia. También disminuye la migración de las células de RMS y modula la expresión de algunos citocromos P450 involucrados en la patogénesis y respuesta a la quimioterapia del RMS, por lo que podría ser un buen candidato en el tratamiento de este tipo de cáncer.

## 1. Introducción

En México, el cáncer es la principal causa de muerte de niños entre los 5 y 14 años. Entre las neoplasias más comunes en menores de 18 años y de las que peor índice de supervivencia presentan, se encuentran los sarcomas de tejido blando.<sup>4</sup>

Los sarcomas de tejido blando son un grupo de tumores malignos cuyo origen está en los tejidos que dan soporte y conexión al cuerpo, como articulaciones, huesos, tejido blando y adiposo. Para su tratamiento se utiliza la quimioterapia en combinación con la radioterapia y la cirugía.<sup>5</sup>

Entre los medicamentos quimioterapéuticos más usados en México para el tratamiento de este tipo de cáncer se encuentran la ciclofosfamida, la doxorubicina, la vincristina, el etopósido y la dactinomicina. Estos medicamentos cuentan con regulación a nivel internacional para su uso; sin embargo, debido a que las células cancerígenas han desarrollado resistencia a ellos, se buscan alternativas terapéuticas con mayor citotoxicidad sobre las células tumorales y menores efectos adversos.<sup>6</sup>

Investigaciones recientes colocan a algunos compuestos polifenólicos como compuestos con propiedades anticancerígenas. Los flavonoides interfieren con el proceso de proliferación de las células cancerígenas, tanto en la fase inicial de la enfermedad como en etapas posteriores. Además, se encuentran presentes en fuentes alimenticias comunes en la dieta como lo son los vegetales y las frutas, tales como la cebolla, la guayaba, la toronja, el higo y la manzana, por lo cual, es importante evaluar su impacto en la inhibición de la enfermedad y con ello proponerlos como una alternativa a los tratamientos quimioterapéuticos convencionales.<sup>7</sup>

Los medicamentos quimioterapéuticos, así como los flavonoides son xenobióticos cuyo metabolismo tiene en común la participación de las enzimas de fase I, los citocromos P450. A su vez, la expresión de los citocromos P450 puede ser modulada por los flavonoides, lo que puede incrementar el éxito de la quimioterapia.<sup>8</sup> Por otra parte, el diagnóstico de los sarcomas de tejido blando se da generalmente en estadios avanzados, por lo que es de gran importancia que también inhiban la migración celular para poder utilizarlos como agentes antimetastásicos.

Por ello, en este proyecto se evaluaron las propiedades citotóxicas de cuatro flavonoides (hidrato de quercetina, catequina, hidrato de morín y naringina) sobre células cancerígenas de sarcoma de tejido blando pediátrico. Se determinó su Concentración Citotóxica Media (CC<sub>50</sub>) y se comparó con la de cuatro fármacos antineoplásicos (doxorubicina, ciclofosfamida, ifosfamida y vincristina). Posteriormente, se evaluó el posible efecto antimetastásico del compuesto más citotóxico mediante ensayos *in vitro* de inhibición de la migración celular, así como su efecto en la modulación de las enzimas pertenecientes a la superfamilia de citocromo P450. Adicionalmente, se determinaron las interacciones moleculares enzima-ligando a través de ensayos *in silico*.

## 2. Marco teórico

### 2.1 Cáncer infantil

#### 2.1.1 Estadísticas

Una de las principales causas de mortalidad en la población infantil del mundo es el cáncer. Mundialmente se diagnostican aproximadamente 18 millones de casos nuevos de cáncer al año, de los cuales 400,000 son en niños y adolescentes. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima una incidencia anual mundial de cáncer en menores de 15 años de 88 casos por cada millón de habitantes, siendo Europa y América los continentes con la incidencia más alta.<sup>9</sup>

En México se diagnostican aproximadamente 5,000 casos nuevos al año de cáncer en menores de 18 años, convirtiéndolo en la segunda causa de muerte en niños y adolescentes mexicanos y en la primera por enfermedad. Aproximadamente fallecen 2,000 menores al año a causa de este padecimiento. Por otro lado, se estima que aproximadamente hay 6 decesos de neonatos por cada millón de recién nacidos debido al cáncer, siendo este el grupo etario con la mortalidad más baja en oncología pediátrica.<sup>10,11</sup>

Los datos del Centro Nacional para la Salud de la Infancia y la Adolescencia (CeNSIA), estiman una supervivencia global para todos los tipos de cáncer en menores de 18 años del 56%. Entre las causas a las cuales se debe el bajo índice de sobrevida de los pacientes infantiles con cáncer, se encuentran: los diagnósticos erróneos, la detección tardía de la enfermedad y el abandono del tratamiento. Aproximadamente el 75% de los casos de cáncer en niños y adolescentes mexicanos se detectan en estadios avanzados de la enfermedad, lo que además de incrementar el costo y tiempo del tratamiento, disminuyen la sobrevida de los pacientes.<sup>12</sup>

En la población mexicana menor de 18 años, las leucemias son el tipo de cáncer con mayor incidencia con un 48.3% del total de los casos, seguido de los linfomas (12.0%), el cáncer del Sistema Nervioso Central (9.9%), los sarcomas germinales gonadales (7.0%), los sarcomas óseos (4.7%), sarcomas de tejidos blandos (4.5%), retinoblastomas (3.9%), sarcomas renales (3.5%), neuroblastomas (2.0%), sarcomas hepáticos (2.0%) y sarcomas epiteliales (1.6%).<sup>12</sup>

Lamentablemente, algunos tipos de cáncer tienen un peor pronóstico que otros. Los censos de la Secretaría de Salud exponen que los linfomas tienen un porcentaje de sobrevida a 5 años del 71%, en contraste con los tumores sólidos cuya sobrevida a 5 años es del 26%; su baja tasa de sobrevida se debe en gran parte al estadio en el que se encuentra el cáncer al momento de su diagnóstico. Entre los años 1996 a 2006, la mayoría de los tumores sólidos detectados en adolescentes entre los 15 y 16 años se encontraban entre los estadios III o IV, lo que corresponde a etapas de cáncer en estadios avanzado y metastásico, siendo los tumores óseos, los del sistema nervioso central y los sarcomas de tejido blando, los que presentan los porcentajes de sobrevida más bajos entre todos los cánceres registrados, con 21.6%, 35.2% y 36.4%, respectivamente.<sup>12</sup>

La mortalidad por cáncer pediátrico no se ha reducido en México como en los países desarrollados. En México fallecen anualmente 57 menores de 15 años por cada millón de niños, mientras que en los países desarrollados pierden la vida de 22 a 30 menores por cada millón. Es posible que la diferencia en mortalidad se deba a falta de presupuesto necesario para la adquisición de infraestructura diagnóstica o al tiempo de referencia de la clínica de primer contacto a los centros de atención oncológica, lo que retrasa la atención médica. Por esa razón, se han implementado campañas de difusión de síntomas (*Figura 1*), así como guías de práctica clínica para la detección oportuna, útiles tanto para los padres, como para los médicos familiares y pediatras.<sup>13</sup>



*Figura 1. Síntomas de cáncer infantil (Instituto de Salud para el Bienestar, 2021)<sup>14</sup>*

Dado el alto índice de incidencia y mortalidad del cáncer infantil en México, este padecimiento debe ser considerado una prioridad en el sistema de salud pública. La enfermedad causa estragos físicos, emocionales y económicos tanto en el paciente, como en sus familiares y el sistema de salud que lo asiste. Aunado a esto, la OMS estima que cada niño que muere a causa del cáncer pierde en promedio 70 años de vida productiva. Por ello, es de vital importancia realizar un diagnóstico temprano, para poder atender oportuna, efectiva e integralmente a los pacientes.

### 2.1.2 Generalidades del cáncer

El cáncer infantil engloba a un grupo de enfermedades que si bien presentan características distintas y específicas, tienen en común que se originan a partir de la división descontrolada y autónoma de células genéticamente anormales, pueden afectar a cualquier órgano o tejido del cuerpo y además por su carácter invasivo tienen la posibilidad de dañar otros tejidos y órganos.<sup>15</sup> Tales anomalías genéticas se ven reflejadas en características fenotípicas específicas como la proliferación celular no regulada, la incapacidad para la diferenciación, la pérdida de las vías apoptóticas normales, la falta de respuesta a señales externas inhibitoras del crecimiento, la intensificación de la angiogénesis, la invasión, la metástasis, la evasión del sistema inmune y el cambio en el metabolismo celular.<sup>16</sup>

La proliferación desregulada se debe a la capacidad de las células cancerosas para evadir los puntos de control del ciclo celular. Clark y Longo (2018), mencionan que el primer punto de control y posiblemente el más importante para el desarrollo del cáncer se encuentra en la fase G1 del ciclo celular, ya que casi todos los tipos de cáncer tienen alguna lesión genética en ese punto.<sup>16,17</sup> Este es solo uno de los muchos mecanismos de control que las células cancerosas ignoran, por lo que continúan dividiéndose descontroladamente y, en consecuencia, pueden llegar a formar masas celulares denominadas tumores, cuya expansión puede destruir y sustituir a los tejidos normales.<sup>18</sup>

Además de ello, las células cancerosas son capaces de diseminarse desde un tumor primario hacia un órgano distante, para invadir otros tejidos y formar un tumor nuevo. A ese proceso se le conoce como metástasis y es la causa principal de la mortalidad del cáncer. El proceso de metástasis ha sido explicado como una serie de eventos secuenciales nombrados cascada metastásica (*Figura 2*) descrita por Welch y Hurts (2019). Su desarrollo comienza con la invasión local y migración de las células tumorales mediante diferentes mecanismos de motilidad, hacia una vía de transporte que generalmente son los sistemas vascular o linfático, donde las células tendrán que adentrarse para poder transportarse a otro órgano. Durante su trayecto por la vía circulatoria tendrán que sobrevivir al flujo de la sangre o linfa y a las células inmunitarias que se encuentren en la vía. En determinado momento las células abandonan la vía circulatoria y llegan a un nuevo tejido, donde podrán colonizar y formar un tumor secundario.<sup>19</sup>

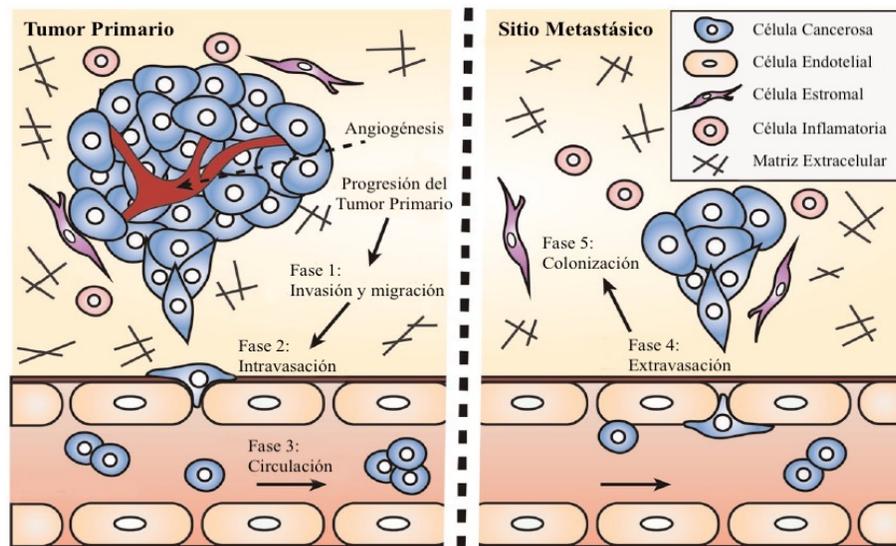


Figura 2. Cascada Metastásica (adaptada de Hapach et al., 2019)<sup>20</sup>

Es importante hacer notar que la elección de los órganos para la formación de tumores secundarios no es al azar. La hipótesis de “semilla y suelo” propuesta por el cirujano inglés Stephen Paget (1889), supone que existe afinidad específica por el microambiente de ciertos órganos. A manera de analogía, se refiere al “suelo” como el órgano o tejido que le proveerá a la “semilla” (célula tumoral con potencial metastásico) un microambiente favorable para el desarrollo de la metástasis, proceso que solo se desarrollará si tanto la “semilla” como el “suelo” son compatibles.<sup>21,22</sup>

Actualmente se sabe que, durante el crecimiento del tumor primario, hay altos niveles de inestabilidad genética y genómica que provocan la evolución de células que no tienen características normales y, por ende, deben adaptar su entorno para poder proliferar. Antes de abandonar el tumor primario y comenzar la metástasis, las células tumorales son capaces de preparar un microambiente con las condiciones necesarias para su adaptación y supervivencia en órganos secundarios, ese lugar es llamado nicho pre-metastásico.<sup>23</sup>

Se cree que el proceso de metástasis comienza mucho tiempo después de la formación del nicho pre-metastásico, y que el factor decisivo que obliga a las células a migrar es la limitación de oxígeno y nutrientes, asociado con la sobrepoblación celular.

### 2.1.3 Tumores Sólidos

Como se mencionó previamente, los tumores sólidos pertenecen a los tipos de cáncer que peor pronóstico de supervivencia tienen. Se define como un tumor sólido a cualquier masa anormal de tejido que por lo general no contiene áreas con quistes o líquidas. Estos pueden ser malignos (cancerosos) o benignos (no cancerosos). El término generalmente es utilizado para distinguir entre una masa de tejido localizado y los casos de cáncer que tienen origen en las células sanguíneas (leucemia) o linfa (linfoma).<sup>24</sup>

Se estima que los tumores sólidos representan el 60% de los diagnósticos de cáncer en niños. El 57.3% de los niños mexicanos diagnosticados con tumores sólidos se encuentran en estadios III o IV, lo que se ve reflejado en la mortalidad de estas neoplasias que para el año 2009 fue de 44.79%<sup>25</sup>; además de esto, informes de la Secretaría de Salud (2014) reportan un aumento en los casos de tumores sólidos malignos en niños de uno a cuatro y de 15 a 19 años.<sup>12</sup>

El término de tumor sólido abarca la mayoría de las neoplasias padecidas por niños, entre las que se encuentran:

#### *Tumores del Sistema Nervioso Central*

Los tumores del Sistema Nervioso Central (SNC), son las neoplasias más frecuentes después de las enfermedades linfopoyéticas. Su incidencia global en 2006 fue de 31.2 casos por cada millón de niños.<sup>26</sup>

#### *Neuroblastoma*

La neoplasia más común en menores de cinco años es el neuroblastoma, su incidencia oscila entre ocho y 10 casos por millón de niños al año. Su origen se da en las células del sistema nervioso periférico, por ello puede aparecer en cualquiera de los sitios anatómicos a lo largo de la cadena gangliolar desde el cuello a la pelvis e incluso en la glándula suprarrenal.<sup>27</sup>

#### *Tumor de Wilms*

El tumor de Wilms o nefroblastoma, es el tumor renal más común en la infancia. La incidencia anual de esta neoplasia es de uno por cada diez mil niños, y se detectan alrededor de 500 casos nuevos al año. Tiene la misma frecuencia en niños y niñas, generalmente se

diagnostica antes de los cuatro años (70%). Su tasa de sobrevivencia a dos años para niños mexicanos es del 90%, siendo similar a la tasa de sobrevivencia mundial de 96%.<sup>28</sup>

#### *Sarcomas de tejido blando*

Los tumores que crecen en tejidos blandos son muy diversos tanto en aspecto como en el grado de malignidad. En conjunto representan la sexta neoplasia más frecuente en menores de 18 años con una incidencia anual de ocho casos por cada millón de niños.<sup>29</sup> En niños, el grupo más representativo de sarcomas de tejido blando se genera en músculo, es de alta malignidad y se denomina rabdomiosarcoma.<sup>30</sup>

#### *Tumores Óseos*

Estos tumores representan el 6% de todos los tumores malignos en menores de 18 años. Su incidencia anual es de tres casos por cada millón de personas, se presenta mayormente a los 16 años y predomina en hombres.<sup>31</sup>

#### *Tumores Hepáticos*

Los tumores de hígado son los más frecuentes en el periodo neonatal, tienen una incidencia mundial anual de 0.5 a 1.5 casos por millón de niños. Su incidencia alrededor del mundo es variable, pero en las estadísticas se ha notado que este tipo de neoplasia se presenta con mayor frecuencia en niños de Asia y África y son el tercer tumor más común en niños japoneses, donde su incidencia es de aproximadamente cinco a siete casos por millón de niños.<sup>32</sup>

#### *Tumores de células germinales*

Este grupo heterogéneo engloba a neoplasias que se localizan en la zona gonadal, como ovario y testículo. Pueden aparecer en cualquier etapa de la vida. Representan el 2% de las neoplasias malignas en niños, y en países desarrollados estos casos representan 1-3% de los casos de cáncer pediátrico. Su incidencia aproximada es de dos casos por cada 100,000 menores de 15 años. En menores de dos años suelen ser benignos, después de esa edad un 50% de los casos suelen ser malignos.<sup>33</sup>

## 2.2 Sarcomas de Tejido Blando

La cuarta causa de muerte por cáncer infantil y de las que menor índice de sobrevida a cinco años presenta, son los sarcomas de tejido blando (STB). Éstos representan el 88% del total de los sarcomas, mientras que el resto corresponde a los sarcomas óseos.<sup>34</sup>

Los STB constituyen un grupo heterogéneo de neoplasias malignas que tienen su origen en el tejido mesenquimal, cuyas células normalmente maduran hasta diferenciarse en células de músculo esquelético, músculo liso, tejido adiposo, tejido conectivo y tejido nervioso periférico. Por tal razón, los STB tienen la posibilidad de aparecer en músculos voluntarios, grasa, tejido fibroso y vasos sanguíneos que irrigan a estos tejidos; es decir, en cualquier parte del cuerpo, siendo extremidades, tronco o abdomen y cabeza o cuello, las zonas más comunes con el 60, 30 y 10% de incidencia respectivamente.<sup>35,36</sup>

Este tipo de tumores se manifiestan como una masa que crece con el paso del tiempo; comúnmente aparecen en un brazo, pierna o la parte posterior del abdomen, en algunos casos puede generar dolor siendo el único síntoma.<sup>37</sup>

Debido a la ausencia de síntomas, por lo general los STB son diagnosticados en etapas avanzadas e incluso metastásicas, momento para el cual el sarcoma ya es demasiado grande y compromete funciones corporales como la movilidad, y en casos más graves causan obstrucción o sangrado en el estómago e intestinos, además de ejercer presión sobre los nervios, los vasos sanguíneos u órganos cercanos.<sup>37</sup>

Los STB tienen dos clasificaciones principales, el tipo rabdomiosarcoma (RMS) que es más frecuente, siendo el 50% de los casos de STB; el 50% restante engloba a un grupo diverso de tumores con comportamiento heterogéneo y poco comunes denominados STB no rabdomiosarcoma (NRMS).<sup>38</sup>

El grupo de los NRMS es poco definido, de comportamiento heterogéneo y poco común. Mientras el RMS tiene su origen en las células del músculo esquelético, los NRMS pueden surgir en las células de músculo liso (leiomiomasarcoma), tejido adiposo (liposarcoma), tejido conectivo (fibrosarcoma, sarcoma sinovial e histiocitoma) y tejido nervioso periférico (tumor neuroectodérmico), entre otros. La mayoría de los NRMS tienen causas desconocidas, pero algunos subtipos están asociados con factores genéticos, ambientales y enfermedades virales, como es el caso del leiomiomasarcoma que se relaciona con la infección por el virus de Epstein-Barr. Similar al RMS, los tumores NRMS pueden desarrollarse en cualquier parte del cuerpo, pero aproximadamente en la mitad de los casos surgen en extremidades.<sup>38</sup>

### 2.2.1 Rabdomiosarcoma

El rabdomiosarcoma es el STB más común en pacientes pediátricos. La incidencia es de 4.71 casos por millón de niños, de los cuales dos terceras partes se presentan en menores de siete años.<sup>39</sup> Los RMS presentan una distribución bimodal con un pico de incidencia entre los 2-5 años y 15-19 años, y son más comunes en varones que en mujeres en una proporción 2:1.<sup>40</sup> A su vez, datos del Grupo de Oncología Pediátrica (2012) destacan una supervivencia

libre de eventos a cinco años del 65-73%; en el caso de pacientes con enfermedad metastásica, la cifra es menor al 30%, aun con tratamiento oncológico.<sup>41</sup>

En México, datos recabados durante siete años por el Instituto Nacional de Pediatría ubican al RMS como la séptima neoplasia maligna de mayor incidencia, el 80% de los pacientes se encontraban en estadios avanzados (III y IV) al momento del diagnóstico. Tras el tratamiento, únicamente el 25% de los pacientes se encontraban vivos y libres de la enfermedad.<sup>35</sup>

Los RMS se derivan de células mesenquimales embrionarias, con potencial de diferenciarse en células del músculo esquelético. Tal neoplasia puede aparecer en cualquier parte del cuerpo, incluso en sitios en donde normalmente no hay músculo esquelético. Las zonas más comunes en donde se presenta el tumor son la cabeza, el cuello, las extremidades y el tracto genitourinario. Otros sitios en donde pudiera aparecer el tumor primario son el tronco, la pared torácica, el abdomen y la región de perineo.<sup>40</sup>

Se divide al RMS en cuatro grupos histológicos: embrionario, alveolar, botrioides y pleomórfico; de los cuales la variedad alveolar es la más agresiva y común, se presenta comúnmente en extremidades. La variedad botrioides se presenta únicamente en vejiga y vagina, siendo predominante en lactantes.<sup>35</sup>

Específicamente en este tipo de STB, la desregulación de enzimas que catalizan el entrecruzamiento de colágeno y elastina para remodelar y estabilizar la matriz extracelular está asociada con un mal pronóstico de sobrevida.<sup>42</sup> La sobreexpresión de una de las cuatro integrantes de la familia de las lisil oxidasas LOXL2 (lysyl oxidase-like 2) incrementa la migración de las células de RMS, la invasión celular y la metástasis. Aunado a esto, la alta expresión de LOXL2 reduce la sensibilidad de células cancerosas a la quimioterapia.<sup>42,43</sup>

### 2.2.2 Tratamiento

El tratamiento estándar de los STB es multimodal y consta de: resección tumoral (si es posible), radioterapia para el control de la enfermedad residual o tumor microscópico, y quimioterapia sistémica para la erradicación de micro o macrometástasis, que varía para cada paciente según su estadificación. La quimioterapia también puede ser utilizada para disminuir el volumen tumoral y hacerlo quirúrgicamente resecable sin comprometer órganos vitales (quimioterapia neoadyuvante). En conjunto estos procedimientos pueden generar una supervivencia a cinco años de más del 70%.<sup>35</sup>

Para proveer a los pacientes de un protocolo terapéutico idóneo, se utilizan dos sistemas de clasificación de los STB: por etapas o estadiaje. El primero es la clasificación en grupos propuesta por el *Intergroup Rhabdomyosarcoma Study* (IRS) y es específico para RMS; esa clasificación se complementa con la estadificación TNM, que es la estadificación usada para la mayoría de las neoplasias. Ambos sistemas consideran el origen del tumor, su tamaño, si está confinado a su sitio de origen, si se encuentra extendido, si esa extensión es regional o ha invadido ganglios linfáticos y finalmente si existe metástasis o no.<sup>44</sup>

Con ayuda de ambos métodos, los médicos determinan el grupo de riesgo en el cual se encuentra el paciente y con ello plantean una estrategia terapéutica personalizada. Dentro del grupo de Bajo Riesgo, se encuentran los pacientes que presentan RMS embrionario en sitios favorables o desfavorables resecaados; así como los que presentan otros grupos histológicos en sitios favorables, resecaados o con residuo macroscópico. En el grupo de Riesgo Intermedio se engloban los casos de RMS embrionario en sitios desfavorables y con residuo microscópico; además de los RMS alveolar o metastásico en pacientes mayores de 10 años. Finalmente, el grupo de Riesgo Alto comprende a los casos indiferenciados o metastásicos.<sup>44</sup>

### 2.2.3 Agentes terapéuticos para el tratamiento del RMS

Los esquemas de tratamiento utilizados para el tratamiento del RMS dependen del grupo de riesgo en el cual se encuentre el paciente. Para pacientes de Bajo Riesgo se recomienda el uso de Vincristina, Actinomicina y Ciclofosfamida (VAC), si el tumor se encuentra en un sitio favorable, se omite el uso de la ciclofosfamida debido a los efectos secundarios a largo plazo que presenta este fármaco. En pacientes de Riesgo Intermedio, se utiliza VAC, combinado con VAI (Vincristina, Actinomicina e Ifosfamida) o VIE (Vincristina, Ifosfamida y Etopósido) combinado con cirugía y con o sin radioterapia; otro esquema propuesto es el uso de VDC (Vincristina, Doxorubicina y Ciclofosfamida) alternando con IE (Ifosfamida y Etopósido), pero esto solo puede ser usado en pacientes del grupo clínico I y II y con histología alveolar. Los casos de Alto Riesgo tienen un bajo índice de sobrevivida, por lo que se emplean múltiples esquemas de tratamiento. En algunos casos se utiliza carboplatino como único fármaco a pesar de que su eficacia es moderada donde se han logrado remisiones completas o parciales hasta en el 31% de los pacientes. Otros esquemas posibles son el uso de la ifosfamida con la doxorubicina, la ifosfamida con el etopósido, la vincristina con el melfalán, el topotecán, el topotecán con la ciclofosfamida e irinotecán.<sup>45</sup>

Los fármacos antineoplásicos usados para el tratamiento del RMS tienen diferentes modos de acción, cuyas generalidades serán descritas a continuación.

#### *Agentes Alquilantes de ADN*

Los agentes alquilantes del ADN son compuestos capaces de unir un grupo alquilo con un enlace covalente a las moléculas nucleófilas del ADN (bases nitrogenadas) en condiciones fisiológicas. De esta forma, afectan la estructura y dinámica de la molécula lo que impide su replicación, afectan la transcripción de ARN o promueven la fragmentación del ADN mediante reacciones hidrolíticas. Los agentes alquilantes pueden interactuar con las células en reposo y en proliferación en cualquier fase del ciclo celular, pero son más citotóxicos durante las fases G1 y S del ciclo celular porque no hay suficiente tiempo para reparar el daño celular antes de la síntesis de ADN.<sup>46</sup>

La ciclofosfamida, la ifosfamida, el melfalán y el carboplatino son los fármacos usados para el tratamiento de RMS que pertenecen este grupo. La ciclofosfamida y su análogo ifosfamida son profármacos que requieren ser biotransformados por enzimas hepáticas en metabolitos activos para poder alquilar al ADN,<sup>47</sup> cosa que no sucede con el melfalán y el carboplatino.

### *Inhibidores de la formación de microtúbulos*

Los fármacos antineoplásicos derivados de productos naturales como los alcaloides de la vinca emplean este mecanismo de acción. Estos compuestos son extraídos originalmente de las hojas de la vinca de Madagascar (*Catharanthus roseus*) y actúan deteniendo la mitosis celular al unirse a la  $\beta$  tubulina, formando puentes de hidrógeno, provocando así un cambio conformacional que impide la polimerización de los microtúbulos de tubulina y con ello la formación del huso mitótico. Este es el mecanismo de acción de la vincristina.<sup>48</sup>

### *Inhibidores de Topoisomerasa*

Vitales para que el proceso de replicación y transcripción del ADN, las topoisomerasas son enzimas nucleares que moderan la estructura tridimensional del ADN, cambian su grado de superenrollamiento, ya sea relajando o generando torsión en la molécula para facilitar la entrada de la maquinaria de replicación y transcripción. En células eucariotas existen dos tipos de topoisomerasa; el tipo I que rompe una hebra del ADN y el tipo II que provoca la ruptura de ambas hebras.<sup>46</sup>

Los fármacos como el topotecán, el irinotecán y el etopósido tienen como diana a las topoisomerasas. El etopósido actúa sobre la topoisomerasa II, mientras que los otros antineoplásicos previamente mencionados tienen efecto sobre la topoisomerasa I. Al inhibir a estas enzimas se desencadenan mecanismos apoptóticos en las células debido a la acumulación de tensiones en las cadenas de ADN y problemas de superenrollamiento en el material genético.

### *Antibióticos antitumorales*

Derivados de diversas cepas del hongo *Streptomyces*, los antibióticos antitumorales tienen un amplio espectro de actividad contra neoplasias, en su mayoría su efecto citotóxico se debe a la unión del fármaco y la cadena del ADN al actuar como agentes intercalantes que bloquean la síntesis de ADN y ARN. Otro mecanismo es la inhibición de la topoisomerasa II, o la modificación de la fluidez de la membrana celular y transporte de iones provocada por la fijación del fármaco en membrana. Tal es el mecanismo de acción que siguen tanto la doxorubicina como la actinomicina para poder ejercer su poder citotóxico.<sup>49</sup>

No obstante, existen varios factores que reducen la factibilidad de uso de los fármacos antineoplásicos en la terapia de los STB. Por un lado, generan toxicidad en los pacientes con efectos secundarios como náuseas, vómitos y alopecia. Además, existe la posibilidad de que se desarrollen efectos secundarios a largo plazo, producto de la combinación los tratamientos, tales como cistitis hemorrágica, fallo hepático, miocardiopatía, alteraciones gastrointestinales, complicaciones en la tiroides, pérdida de la audición, alteraciones craneofaciales, reducción de la fertilidad, insuficiencia ovárica, entre otras que afectan la calidad de vida de los niños en su futura adultez.<sup>50,51</sup>

Aunado a esto, existe otra problemática y es que los RMS no tienen un alto rango de respuesta a los antineoplásicos, ya sea empleados como monoterapia o combinados en un régimen de quimioterapia. Tal es el caso de la doxorubicina, para la cual los RMS tienen un rango de respuesta del 20-30%, en el caso de las combinaciones VAC y VDC el rango de respuesta es del 12% y 21%, respectivamente.<sup>2</sup> Esta poca respuesta puede ser consecuencia de un diagnóstico tardío, lo que implica que el cáncer se encuentre en una etapa progresiva

donde las células tengan propiedades bioquímicas y genéticas diferentes y variadas entre ellas que le permitan evadir los efectos de la quimioterapia, es decir, desarrollando quimiorresistencia por medio de diversos mecanismos. Tales mecanismos pueden estar asociados con la acción de algunas proteínas transportadoras como la glicoproteína P, la proteína de resistencia a múltiples fármacos; mediante el secuestro intracelular en pseudo-vesículas citoplasmáticas, o bien por un aumento en la capacidad de reparación del ADN, entre otros.<sup>52</sup> Esta quimiorresistencia que puede ser innata o adquirida, representa un grave problema en el tratamiento del RMS, por ello es que se deben buscar nuevos agentes quimioterapéuticos que consigan disminuir la toxicidad, la aparición de neoplasias secundarias a largo plazo en los pacientes e incrementar el porcentaje de éxito de la quimioterapia.<sup>29</sup>

## 2.3 Flavonoides: Alternativa a los fármacos antineoplásicos

Pertencientes a la familia de los polifenoles, los flavonoides son compuestos de interés en la investigación clínica ya que presentan múltiples propiedades benéficas en el cuerpo humano debido a su amplia bioactividad. Pueden actuar como antioxidantes, antiinflamatorios, antiagregantes, vasodilatadores, antihemorrágicos, antineoplásicos, antiescleróticos, antibacterianos, hematoprotectores, antialérgicos, entre otros.<sup>7,53</sup>

Los flavonoides se encuentran en la mayoría de las frutas, vegetales y en algunos cereales. Son sintetizados en citoplasma a partir del metabolismo secundario de las plantas, desde donde migran hacia las vacuolas celulares disueltos en membranas, cloroplastos o el jugo vacuolar.<sup>3,54</sup> En la planta cumplen con funciones importantes como la protección de factores externos, tales como la luz UV o los depredadores; así mismo pueden fungir como atractores de polinizadores y animales dispersores de semillas y frutos; o como agentes de señalización.<sup>3</sup>

### 2.3.1 Clasificación de los flavonoides

Estos compuestos de bajo peso molecular tienen en común un esqueleto C6-C3-C6, están químicamente constituidos por dos grupos fenilo (*Figura 3a*, A y B), unidos por tres átomos de carbono que pueden o no formar un tercer anillo pirano o pirona (*Figura 3a*, C). En el reino vegetal, los flavonoides se encuentran unidos a azúcares formando glucósidos (azúcar unido a una aglicona); excepto los flavanoles que se encuentran en estado libre o como ésteres de ácido gálico. Por lo regular, los azúcares a los cuales se encuentra unida la aglicona son la D-glucosa, D-galactosa, L-ramnosa, L-arabinosa, D-xilosa y D-ácido glucurónico, principalmente; enlazándose a través de los grupos hidroxilo (en las posiciones C3, C7, con mayor frecuencia), formando O-glucósidos; o como C-glucósidos, unidos a carbonos de la aglicona (C6, C8). Tal unión hace que la molécula sea hidrosoluble y menos reactiva que el flavonoide por sí solo.<sup>55-57</sup>

La amplia posibilidad en los patrones de sustitución es la responsable de que hasta el momento se tengan identificados más de 5,000 diferentes flavonoides, que se clasifican en familias o clases (*Figura 3*) con base en el grado de saturación y los sustituyentes del anillo C. Es por esa diversidad estructural que pueden participar en múltiples procesos moleculares, mediante diversos mecanismos.<sup>58,59</sup>

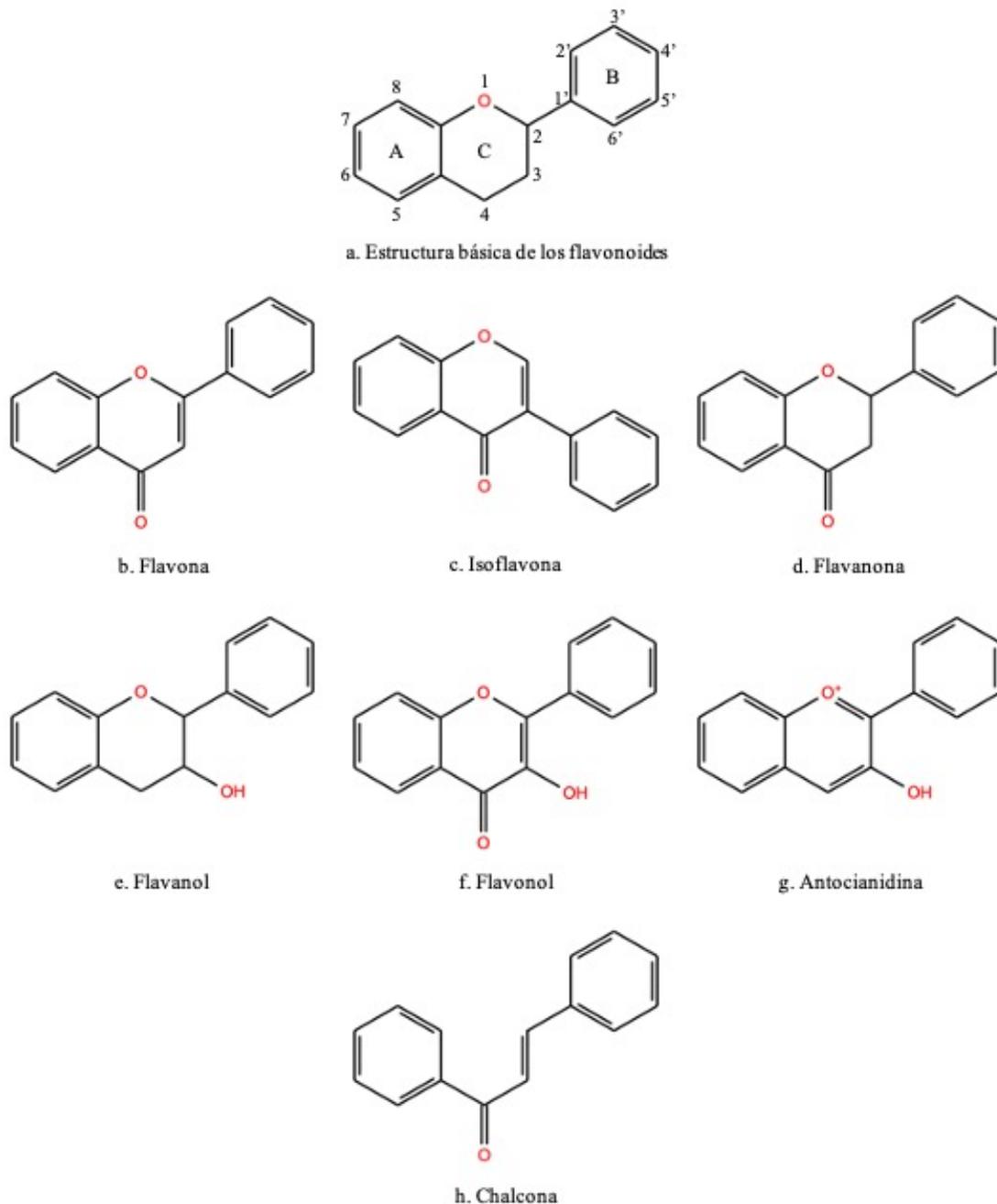


Figura 3. Estructura básica de los flavonoides y subclases <sup>60</sup>

### 2.3.2 Fuentes alimenticias

Son tan vastos los alimentos en los que se encuentran los flavonoides que es común que se incluyan en nuestra dieta. Se estima que la ingesta mundial de flavonoides oscila entre 500-1000 mg/día expresado como agliconas; sin embargo, el consumo de flavonoides es variado entre los países ya que depende de los hábitos alimenticios de la población. Los mexicanos ingerimos aproximadamente 150 mg/día de flavonoides, de todos los países que cuentan con datos de ingesta diaria de flavonoides, somos junto con Brasil los que menor cantidad de flavonoides consume. Aunque estos datos pueden estar subestimados, puesto

que no se conoce el contenido de flavonoides totales de las frutas y las verduras que se consumen en Latinoamérica, como el mamey, el zapote, la papaya, el nopal, la jícama, las tunas u otros alimentos que pudieran ser fuente importante de estos compuestos de interés.<sup>61,62</sup>

Los flavanoles (*Figura 3e*) son los flavonoides más abundantes en alimentos y por ello son los más consumidos en la dieta, representando ~80% de la ingesta diaria promedio del total de los flavonoides. Sus fuentes principales son el chabacano, el cacao, la uva roja, la manzana, los frijoles, las cerezas, las fresas, los arándanos, el vino, el té verde y negro (48% de la ingesta total), de hecho, es debido a su presencia en estos últimos que su ingesta es tan significativa a nivel global. Perteneciente a esta subclase, la catequina es el flavanol más abundante en la dieta, siendo el chabacano su fuente principal con un contenido de 100-250 mg/kg de peso fresco; mientras que en el té verde y negro su contenido es de 100-800 mg/L y 60-500 mg/L, respectivamente.<sup>63,64</sup>

En 2º lugar, respecto a los flavonoides más consumidos se encuentran las flavanonas (*Figura 3d*) (7.6% de la ingesta diaria promedio) que abundan en frutas cítricas y jugos de cítricos, de los cuales la naringina y la hesperidina son las flavanonas más comunes. Por ejemplo, en la toronja la flavanona mayoritaria es la naringina (16.6 mg aglicona/kg de peso fresco) que también es quien brinda el sabor amargo; por otro lado, en el limón y en la lima el perfil de flavonoides es dominado por la hesperidina (157.8 mg/kg de peso fresco y 156.4 mg/kg de peso fresco, respectivamente).<sup>65,66</sup>

Quien representa el 6.8% de la ingesta diaria promedio del total de los flavonoides (*Figura 3f*) son los flavonoles con una ingesta promedio que va de 20-40 mg/día. Probablemente es este grupo al que pertenecen los compuestos con mayor relevancia antitumoral, además de que están presentes en muchos alimentos. Dentro de esta familia se encuentra la quercetina, su compuesto más representativo y el principal contribuidor en la ingesta estimada de flavonoides. Este compuesto se encuentra abundantemente en el eneldo (403 mg/kg), la cebolla (240-490 mg/kg), las hojas de apio (228.9 mg/kg), el brócoli (30 mg/kg) y en menor cantidad en frutas como la grosella negra (37 mg/kg), la manzana (20-70 mg/kg) y el chabacano (25 mg/kg).<sup>67,68</sup>

Las antocianidinas, que al unirse a un azúcar mediante un enlace  $\beta$ -glucosídico, forma una antocianina, son el 4º flavonoide más consumido (*Figura 3g*), cuya ingesta diaria promedio es del 1.6%. Se hallan en vegetales y frutas rojos-azules-morados porque sus glucósidos son compuestos pigmentados. Así pues, están presentes en las berenjenas (7500 mg/kg), las uvas negras (300-7500 mg/kg), la grosella negra (1300-4000 mg/kg), las moras (1000-4000 mg/kg), los arándanos (250-5000 mg/kg), los frijoles negros (2130 mg/kg de grano entero, expresado como antocininas), en la testa de los frijoles negros (23.7 g/kg) y en menor proporción en las cerezas, las fresas, la ciruela, la col morada y el vino tinto.<sup>61,63,69</sup>

Presentes en los tés herbales y en las verduras de hoja verde principalmente, las flavonas (*Figura 3b*) representan el 0.8% de la ingesta diaria promedio de flavonoides; el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA por sus siglas en inglés) estima su ingesta diaria de 1-5 mg/día. La luteolina y la apigenina son las flavonas más detectadas en los alimentos. Ambas se encuentran en el té verde, el té negro, la manzanilla romana, el

romero, el orégano, la menta, el perejil y las hierbas que también pueden ser utilizadas para la elaboración de infusiones.<sup>70</sup>

Finalmente, las isoflavonas (*Figura 3c*) son los flavonoides menos consumidos (0.6% de la ingesta diaria promedio) y esto es justificado porque se encuentran en mayor cantidad en la soya y sus derivados, alimentos que no están presentes en la dieta mundial con regularidad. Su consumo diario es menor a 2 mg/día, a excepción de los veganos que ingieren alrededor de 18 mg/día de isoflavonas.<sup>61</sup>

### 2.3.3 Metabolismo de los flavonoides

El metabolismo de todos los flavonoides comienza con la masticación, acción que los libera de la matriz alimenticia; posteriormente, su absorción depende de las propiedades fisicoquímicas de la molécula como son el tamaño, la configuración molecular, la lipofilia, la solubilidad y el pKa.<sup>71</sup>

Continuando con el transporte hacia el intestino delgado, el glucósido puede ser absorbido por completo gracias al cotransportador intestinal dependiente de sodio (SGLT-1); o bien, puede absorberse únicamente la aglicona obtenida de la hidrólisis del glucósido por acción de la enzima LPH (Lactasa-floricina hidrolasa) presente en la pared externa del intestino delgado. La biotransformación de los flavonoides sucede en el hígado por medio de reacciones de biotransformación de fase I, proceso que puede alterar sus actividades biológicas a causa de la formación de metabolitos o conjugados.<sup>72</sup>

En caso de que el glucósido no sea sustrato de ninguna de las dos enzimas, será transportado hasta el colon, donde la microbiota existente hidrolizará al glucósido. En ese punto el colon es capaz de absorber a algunos de los compuestos obtenidos de la degradación; sin embargo, esta eficiencia de absorción es menor porque la microbiota puede incluso degradar a la aglicona, formando una gran cantidad de metabolitos, entre ellos ácidos aromáticos simples.<sup>73</sup> Los conjugados solubles en agua se pueden excretar por la orina y los que fueron degradados por la microbiota del colon se excretan por medio de las heces. Se estima que la aglicona puede tardar hasta tres horas en ser absorbida, en promedio las concentraciones pico de los flavonoides se da a las 1.75 horas después de su ingesta. Su biodisponibilidad depende de su estructura química, la absorción, la distribución y la eliminación.<sup>71</sup>

### 2.3.4 Potencial anticancerígeno de los flavonoides

En los últimos años, los flavonoides se han convertido en objeto de estudio por sus propiedades antineoplásicas. En la búsqueda de nuevos compuestos que respondan favorablemente ante el cáncer, y que puedan ser usados como parte de los regímenes de la quimioterapia, es que han evaluado los efectos anticancerígenos de los flavonoides en ensayos tanto *in vitro* como *in vivo*.

En la *Tabla I*. se enlistan diversos flavonoides que tienen propiedades anticancerígenas; algunos de ellos como la genisteína y el kaempferol logran potenciar el efecto de los fármacos antineoplásicos, sugiriendo su uso como coterapia; otros tienen efecto citotóxico por sí solos.

Tabla I. Propiedades antineoplásicas de flavonoides en diferentes tipos de cáncer

Subclase	Flavonoide	Cáncer (Línea celular)	Efectos
<b>Isoflavona</b>	Genisteína	Mama (MCF7, MDA-MB-231) <sup>74</sup>	Potencia el efecto del ormeloxifeno para inhibir el crecimiento celular e inducir apoptosis celular, además de inhibir el crecimiento tumoral en modelos murinos
<b>Flavanona</b>	Naringina	Vejiga (5637, T24) <sup>75</sup>	Inhibición de la viabilidad y la migración celular Alteración de la morfología celular
	Hesperetina	Esófago (Eca109) <sup>76</sup> Hígado (HepG2) <sup>77</sup> Mama (MCF7) <sup>78</sup>	Inducción de la apoptosis Inhibición de la proliferación celular
	Naringenina	Próstata (PC3) <sup>79</sup>	Inhibición de la proliferación, migración celular e inductor de apoptosis
<b>Flavonol</b>	Morin	Pulmón (A549) <sup>80</sup>	Inhibición de la viabilidad, el crecimiento y la migración celular
	Quercetina	Mama (MDA-MB-231) <sup>81</sup>	Inhibe la proliferación celular e induce apoptosis
	Kaempferol	Ovario (OVCAR3) <sup>82</sup>	Potencia el efecto del cisplatino para inhibir la viabilidad celular y promover la apoptosis celular
<b>Flavona</b>	Crisina	Coriocarcinoma (JAR, JEG3) <sup>83</sup>	Aumenta los niveles de peroxidación y radicales libres, provocando la muerte celular
<b>Antocianidina</b>	Cianidina	Próstata (LnCap, DU145) <sup>84</sup> Colon (LoVo) <sup>85</sup>	Inductor de apoptosis Efecto citotóxico en células metastásicas
<b>Flavanol</b>	Catequina	Colon (DLD1, HT29) <sup>86</sup>	Inhibidor de la proliferación celular, reduce la capacidad invasiva de las células tumorales Inhibidor del crecimiento tumoral en estudios <i>in vivo</i>

Los flavonoides pueden interferir en la carcinogénesis al bloquear o suprimir algunos procesos, tales como la reparación del ADN, la proliferación celular, la apoptosis, la angiogénesis o la metástasis.<sup>87</sup> Otra vía posible es mediante la modulación de enzimas que están involucradas en la activación metabólica de procarcinógenos, como el citocromo P450 (enzimas de fase I) o por la inducción de enzimas involucradas en la desintoxicación y eliminación de carcinógenos (enzimas de fase II).<sup>88</sup>

## 2.4 Citocromo P450

La familia de enzimas del citocromo P450 (CYP), son un gran grupo de hemoproteínas que catalizan muchas de las reacciones de fase I del metabolismo de xenobióticos (fármacos, contaminantes ambientales y carcinógenos). También participan en la biosíntesis de ácidos biliares, así como en la biosíntesis y el metabolismo de compuestos endógenos como hormonas esteroideas, vitaminas, ácidos grasos, entre otros.

Estructuralmente hablando, los citocromos P450 contienen entre 400 y 500 residuos de aminoácidos, y presentan un solo grupo prostético hemo, que es el sitio activo de la molécula.<sup>89</sup>

### 2.4.1 Papel de los citocromos P450 en cáncer

Los citocromos P450 son enzimas que tienen un comportamiento biológico dual porque su expresión bien puede propiciar un estado de salud o favorecer el desarrollo de enfermedades. Ejemplo de ello es su participación en el proceso de eliminación de moléculas tóxicas para evitar su acumulación en el organismo o su papel en la formación de metabolitos con actividad terapéutica; de igual manera, están involucrados en la formación de metabolitos procarcinógenos.<sup>90</sup> De las 18 familias de CYP existentes en humanos, son las familias 1, 2 y 3 las encargadas del metabolismo de la mayoría de los fármacos y otros xenobióticos.<sup>91</sup>

#### *Familia CYP1*

Las isoformas pertenecientes a esta familia tienen la capacidad de biotransformar xenobióticos y sustancias endógenas, activar compuestos procarcinógenos e inducir la fármaco-resistencia al inactivar agentes quimioterapéuticos. También existe evidencia de que los CYP de la familia 1 se encuentran sobreexpresados en muchos tipos de cáncer. La expresión de los CYP1 es regulada por el receptor de hidrocarburos de arilo (AhR), que es sensible a factores ambientales como el humo del cigarro y algunos alimentos.

Dentro de esta familia se incluyen a las subfamilias CYP1A y CYP1B, cuyos miembros (CYP1A1, CYP1A2 y CYP1B1) son de gran relevancia en la farmacología y toxicología.<sup>92,93</sup> Las isoenzimas CYP1A1 y CYP1A2 participan en el metabolismo de aproximadamente el 10% de los fármacos metabolizados por enzimas del CYP, aunque la actividad de CYP1A2 es mayoritaria. Igualmente intervienen en procesos de activación de procarcinógenos, formando metabolitos intermediarios altamente reactivos que pueden unirse al ADN generando mutaciones.<sup>94,95</sup>

CYP1B1 es constitutiva en riñón, próstata, glándula mamaria y ovario. Se ha observado que está sobreexpresada en una amplia variedad de células tumorales, en cambio su expresión en células sanas es mínima o inexistente, por lo cual se ha propuesto como un biomarcador de cáncer. En adición a ello, la sobreexpresión de CYP1B1 promueve la proliferación celular y favorece la invasión celular al inducir la transición epitelio-mesénquima (EMT).<sup>94,96</sup>

### *Familia CYP2*

A diferencia de las isoenzimas de la familia 1, los integrantes de esta familia tienen un comportamiento heterogéneo. Uno de los miembros con mayor relevancia en la carcinogénesis es el CYP2E1.

El CYP2E1 es expresado en el hígado y además de estar involucrado el metabolismo de solventes como el etanol, la acetona y el benceno, también participa en la activación de carcinógenos (hidrocarburos halogenados y nitrosaminas). A dosis elevadas de etanol, el CYP2E1 contribuye a la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) que dañan a las células hepáticas, incrementando así la probabilidad del desarrollo de cáncer. La diabetes y el ayuno son factores que causan su sobreexpresión.<sup>97</sup>

### *Familia CYP3*

En esta familia se encuentran los citocromos más importantes en el metabolismo de agentes terapéuticos, xenobióticos de relevancia toxicológica y compuestos endógenos. Expresadas en el hígado, las isoenzimas CYP3A4 y CYP3A5 son las más importantes en el metabolismo del 50% de los fármacos, incluyendo a muchos antineoplásicos como la doxorrubicina, la vincristina, la ciclofosfamida, la ifosfamida, el etopósido y la vinblastina.<sup>94</sup>

El CYP3A4 puede ser tanto benéfico como perjudicial para el metabolismo de los fármacos antitumorales. Por un lado, disminuye el efecto del paclitaxel, el docetaxel, y la vincristina porque produce un incremento de su conversión en metabolitos con pocas propiedades antitumorales y causa la rápida eliminación del fármaco. En cambio, la actividad de CYP3A4 resulta beneficiosa para profármacos como la ifosfamida y la ciclofosfamida, puesto que al metabolizarlos se produce mayor cantidad de metabolitos con propiedades antitumorales.<sup>98</sup>

## 2.4.2 Interacciones CYP-flavonoides

Existen al menos dos formas por las cuales los flavonoides establecen interacciones con los citocromos P450. La primera de ellas se debe a la naturaleza xenobiótica de los flavonoides, razón por la cual los CYP participan en su metabolismo. Por otro lado, estos compuestos polifenólicos tienen la capacidad de modular la actividad de los CYP, principalmente a la subfamilia 1A.<sup>99</sup>

### *Biotransformación de flavonoides*

El papel de los citocromos P450 en el metabolismo de fase I de los flavonoides consiste en mediar reacciones de hidroxilación o desmetilación.<sup>100</sup> Investigaciones realizadas por Otake y Walle (2002), demostraron que los flavonoles galangina y kaempferido sufren reacciones de hidroxilación y *O*-desmetilación, respectivamente, a causa del CYP1A2 dando como producto de ambas reacciones al kaempferol. Sin embargo, las reacciones de conjugación (fase II) tales como la glucoronidación, metilación y sulfatación, pueden competir con el metabolismo de fase I.<sup>101</sup>

### *Modulación de la actividad enzimática*

Los flavonoides pueden inducir, o eventualmente inhibir a los citocromos P450 (CYP1A1/1A2, CYP1B1, CYP2C9, CYP2E1, CYP3A4/3A5).<sup>102</sup> Su potencia inhibitoria

está directamente asociada con su estructura; algunos autores destacan a sus sustituyentes hidroxilo y metoxilo, en conjunto con una estructura planar como características estructurales indispensables para poder ejercer tal efecto. Tal es el caso de las flavonas y los flavonoles, cuyo doble enlace en C2 y C3, le confiere una estructura plana al anillo C; ambas subclases son potentes inhibidores del CYP1A1/1A2, CYP1B1 y CYP3A4. A modo de ejemplo, el CYP3A4 es inhibido por los flavonoles quercetina, kaempferol y miricetina; y por la flavona apigenina.<sup>102-104</sup>

Adicionalmente, muchos flavonoides pueden actuar como antagonistas del AhR, con lo cual causan un efecto quimioprotector. La quercetina actúa como agente antagonista del AhR inhibiendo así la síntesis de enzimas que participan en la activación del benzo[*a*]pireno, un importante carcinógeno producido a partir de la combustión incompleta de la materia orgánica, presente en el ambiente y en algunos alimentos que han sido sometidos a procesos térmicos.<sup>103,105</sup>

Como efecto de la modulación de la actividad los citocromos P450, los flavonoides pueden afectar las concentraciones en plasma de los fármacos, provocando una sobredosis o la pérdida del efecto terapéutico. También pueden incrementar o disminuir la capacidad de activación de los carcinógenos por interacción con estas enzimas. Debido a los efectos que ejercen los flavonoides sobre los CYP, han cobrado relevancia en la investigación clínica, convirtiéndose en moléculas con uso potencial para el tratamiento del cáncer.<sup>106</sup>

### **3. Planteamiento del Problema**

El RMS es la cuarta causa de muerte asociada a cáncer infantil en el Instituto Nacional de Pediatría. Para su tratamiento convencionalmente se recurre a la cirugía, en combinación con sesiones de radioterapia y quimioterapia. La quimioterapia es el procedimiento usado para tratar a todos los grupos de riesgo; sin embargo, el rango de respuesta de los RMS a los fármacos quimioterapéuticos está entre un 20-30%, lo que puede deberse a una quimiorresistencia adquirida por las células RMS. Por otra parte, la quimioterapia genera efectos secundarios graves en los pacientes pediátricos. Al no poder detenerse el progreso de la enfermedad, es muy probable que se desarrolle metástasis, escenario relacionado con el bajo índice de sobrevida de los pacientes.

Estas desventajas en la quimioterapia convencional invitan a buscar nuevos agentes terapéuticos que contrarresten el avance de la enfermedad. Tales compuestos candidatos deben ser citotóxicos sobre las células de RMS e inhibir el fenómeno de migración celular, que está relacionado con el desarrollo de metástasis.

Basados en las investigaciones que colocan a los flavonoides como posibles candidatos para el tratamiento de diferentes tipos de cáncer, es que se propone su uso para el tratamiento del RMS pediátrico. Dado que se encuentran abundantemente en alimentos comunes en la dieta e interactúan con enzimas importantes en el desarrollo del cáncer pueden ser fuentes potenciales de compuestos para el diseño de un régimen de quimioterapia.

### **4. Hipótesis**

Los flavonoides son agentes citotóxicos más efectivos que los antineoplásicos de uso clínico para el tratamiento de RMS pediátrico debido a su capacidad de inhibir la migración celular y modular a enzimas involucradas en la respuesta a la quimioterapia.

### **5. Objetivos**

#### Objetivo General

- Validar el uso potencial de flavonoides como agentes terapéuticos para el RMS pediátrico.

#### Objetivos Específicos

- Evaluar y comparar las propiedades citotóxicas de cuatro flavonoides y cuatro fármacos antineoplásicos de referencia sobre una línea celular de RMS pediátrico.
- Evaluar los efectos de los flavonoides en el proceso de migración celular y en la modulación de enzimas de fase I del metabolismo.
- Describir las interacciones que existen entre los flavonoides y las enzimas de fase I (CYP), así como con proteínas que median la migración celular (LOXL2).

## 6. Materiales y Métodos

### 6.1 Línea celular

Se utilizó la línea celular RMS13 [RC13, SJCRH30, SJRH30] (ATCC CRL-2061), proveniente de un sitio metastásico de médula ósea de un paciente varón de 17 años diagnosticado con rhabdomyosarcoma alveolar.

### 6.2 Reactivos

Los polifenoles (catequina, hidrato de morin, hidrato de quercetina y naringina), los fármacos antineoplásicos (doxorrubicina, vincristina, ifosfamida y ciclofosfamida) y el dimetilsulfóxido (DMSO) fueron adquiridos en Sigma-Aldrich (Darmstadt, Alemania) con una pureza mayor al 95%.

Los reactivos para la evaluación de la citotoxicidad y el cristal violeta se compraron en Merck Millipore (Darmstadt, Alemania); mientras que los reactivos empleados en la preparación de medios de cultivo celulares fueron de Gibco, Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, Estados Unidos de América).

Los consumibles empleados en las técnicas de biología molecular fueron adquiridos de Applied Biosystems e Invitrogen, Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, Estados Unidos de América).

### 6.3 Estrategia experimental

La estrategia experimental fue realizada tal como se plantea en la *Figura 4*. Inicialmente se evaluó la citotoxicidad de cuatro compuestos polifenólicos pertenecientes al grupo de los flavonoides (catequina, hidrato de morin, hidrato de quercetina y naringina) [*Figura 5*] y cuatro fármacos antineoplásicos (doxorrubicina, vincristina, ifosfamida y ciclofosfamida) sobre la línea celular RMS13 mediante ensayos de viabilidad celular, con lo que se determinó la Concentración Citotóxica Media (CC<sub>50</sub>).

A partir de ello, se eligió al compuesto más citotóxico y se determinó su capacidad de inhibición de la migración celular, así como su efecto en la modulación de la expresión génica de los citocromos *CYP1B1*, *CYP2E1*, *CYP3A4* y *CYP3A5*.

Los resultados experimentales fueron complementados con un análisis de acoplamiento molecular *in silico* para conocer las interacciones moleculares entre las enzimas de relevancia en el proceso carcinogénico del RMS (*CYP1B1*, *CYP2E1*, *CYP3A4*, *CYP3A5* y *LOXL2*) con los compuestos polifenólicos evaluados.

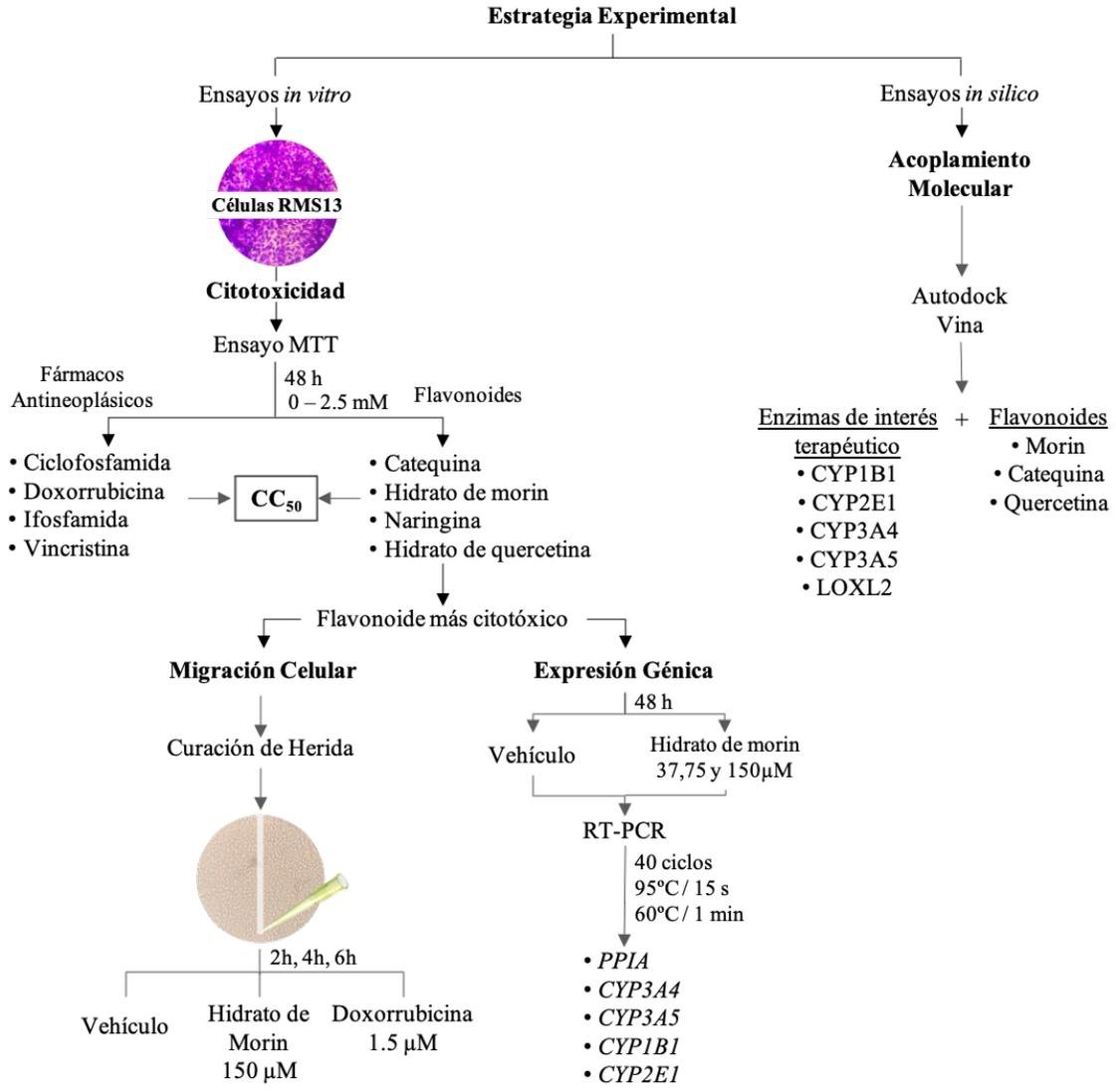


Figura 4. Estrategia Experimental

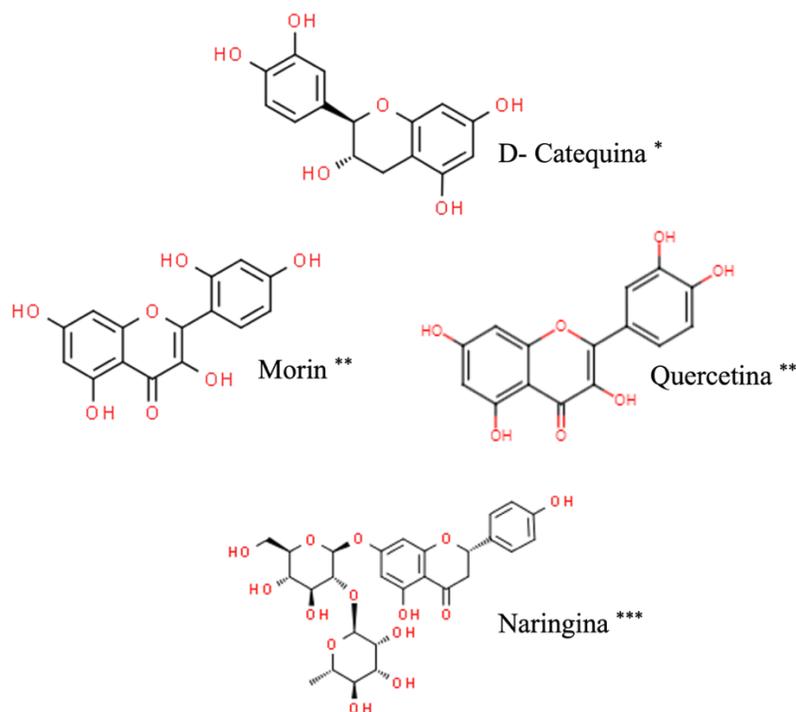


Figura 5. Estructura química de los flavonoides probados. \*Flavanol; \*\* Flavonoles; \*\*\*Flavanona<sup>107</sup>

## 6.4 Cultivo Celular

La línea celular RMS es adherente y presentan un crecimiento en monocapa. Las células se sembraron en botellones de 75 cm<sup>2</sup> con medio de cultivo RPMI-1640 suplementado con suero fetal bovino al 10% y penicilina-estreptomicina al 1%. Se incubaron a 37° C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>, se realizaron cambios de medio de cultivo cada tercer día hasta obtener una confluencia celular mayor al 80% lo que fue visualizado con un microscopio óptico. Las cosechas celulares para la resiembra se realizaron con una solución estéril de tripsina al 0.25% y EDTA al 0.02%, disueltos en PBS. Cada resiembra fue identificada con el número consecutivo al pase previo.

## 6.5 Ensayo de citotoxicidad/viabilidad celular

La viabilidad celular fue determinada siguiendo la metodología del ensayo del 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) [Anexo 10.1.11].<sup>108,109</sup> Para ello, previo al tratamiento se inocularon las células RMS13 (pase 11) en placas estériles de 24 pozos (11x10<sup>3</sup> células/pozo). Después de alcanzar una confluencia del 90%, el medio de cultivo fue retirado y se adicionaron disoluciones de catequina en DMSO (0-2.5 mM), hidrato de morin en DMSO (0-600 µM), naringina en DMSO (0-2.5 mM), hidrato de quercetina en DMSO (0-400 µM), ciclofosfamida en agua estéril (0-16 mM), doxorrubicina en DMSO (0-400 µM), ifosfamida en DMSO (0-500 µM) y vincristina en DMSO (0-500 µM). Los compuestos utilizados son estándares grado HPLC con una pureza ≥95% adquiridos de

manera comercial. La concentración de DMSO en el medio de cultivo no excedió el 0.05% v/v.

Las células tratadas fueron incubadas durante 48 h (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). Pasado el tiempo se retiró el medio de cultivo y se reemplazó con 500 µL/pozo de una disolución 0.25 mg/mL de MTT. Las células se incubaron durante 3 horas y posteriormente se adicionaron 1.5 mL de DMSO para determinar la absorbancia a 560 nm. Los resultados se expresaron como porcentaje de viabilidad celular con respecto al control para cada una de las concentraciones evaluadas.

Para cada uno de los compuestos se realizaron curvas de porcentaje de viabilidad celular en función de las concentraciones evaluadas. A partir de ellas se determinó la concentración de compuesto a la cual la viabilidad celular era del 50% (CC<sub>50</sub>) con ayuda del software GraphPad Prism versión 9.

## **6.6 Ensayo de migración celular**

La migración celular fue determinada mediante el ensayo de curación de herida (*Anexo 10.1.2*). En placas estériles de 12 pozos se inocularon 3x10<sup>4</sup> células/pozo y se incubaron a 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>. Una vez alcanzada una confluencia celular del 90%, se realizó una herida horizontal en cada uno de los pozos con una punta estéril para micropipeta de 200 µL. Subsiguientemente, las células fueron tratadas con hidrato de morin (150 µM), doxorubicina (1.5 µM) y vehículo (medio de cultivo).

Las heridas fueron monitoreadas visualizándolas en el microscopio, así como capturando imágenes de éstas tras 0, 2, 4 y 6 h de incubación. Las células se tiñeron con 200 µL de cristal violeta al 0.5% en metanol al 20%, el colorante se dejó reposar durante 5 min.

Las imágenes obtenidas fueron analizadas en el programa ImageJ versión 1.52q, obteniendo así el porcentaje de cierre de herida de acuerdo con la metodología descrita por Liang y colaboradores (2007).<sup>110</sup>

## **6.7 Evaluación de expresión génica**

### **6.7.1 Extracción de ARN**

El ARN fue extraído a partir de los cultivos de células RMS13 expuestas al hidrato de morin (0, 37, 75, 150 µM, DMSO como vehículo) durante 48 h siguiendo el método de extracción orgánica con el reactivo fenol e isocinato de guanidina (TRIzol, Invitrogen).<sup>111</sup> A la suspensión celular obtenida tras la cosecha celular se le adicionó 1 mL de TRIzol y se incubó a temperatura ambiente por 5 min. Transcurrido el tiempo se agregaron 0.2 mL de cloroformo para causar la separación de fases acuosa y orgánica, la mezcla se homogeneizó y se incubó por 3 min a temperatura ambiente. Las muestras resultantes se centrifugaron a 12,000 r.p.m a 4° C durante 15 min. A continuación, se recuperó la fase acuosa y se adicionaron 500 µL de alcohol isopropílico para precipitar el ARN. El pellet obtenido se lavó dos veces con etanol al 75%, finalmente se resuspendió en agua libre de RNAsas y fue incubado en baño María (60-65 °C) por 5 minutos.

El espectrofotómetro de microvolúmenes NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific; Waltham, Massachusetts, Estados Unidos de América) permitió cuantificar la concentración de ARN obtenido (ng/ $\mu$ L), así como evaluar su pureza con la relación de absorbancias A260/A280, esperando valores aproximados a 2.0.

La integridad del ARN fue evaluada por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, utilizando GelRed como colorante fluorescente. En cada pozo del gel se depositó cuanto bastara para tener 500 ng de ARN.

### 6.7.2 Retrotranscripción

Se obtuvo ADN complementario (ADNc) a partir del ARN extraído de los cultivos celulares. Para ello se utilizaron los reactivos de transcripción reversa del Kit TaqMan (Thermo Fisher Scientific). Para comenzar se preincubó en el termociclador (65° C/ 5 min, 4° C/ 2 min) el volumen necesario de ARN para 500 ng, 1.0  $\mu$ L de oligo d(T)<sub>16</sub> 50 $\mu$ M y cuanto bastara de agua libre de RNAsas para llegar a un volumen final de 6.0  $\mu$ L; esto para cada una de las muestras de ARN.

Seguidamente, se adicionaron 14.0  $\mu$ L de mezcla de reacción a cada una de las muestras (2.0  $\mu$ L de amortiguador de retrotranscripción 10x, 1.4  $\mu$ L de MgCl<sub>2</sub> 25 mM, 4.0  $\mu$ L de una mezcla de dNTPs 10mM, 1.0  $\mu$ L de inhibidor de RNAsas, 1.0  $\mu$ L de transcriptasa inversa MultiScribe 50 U/ $\mu$ L y 4.6  $\mu$ L de agua libre de RNAsas). Los tubos de reacción se incubaron nuevamente en el termociclador (37 °C/ 30 min, 95° C/ 5 min, 4°C /30 min).

La concentración de ADNc obtenido (ng/ $\mu$ L) fue cuantificada en el equipo NanoDrop ND-1000 con índice de pureza A260/A280 esperado de aproximadamente 1.8.

### 6.7.3 Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR)

Se evaluó la expresión génica de *CYP1B1*, *CYP2E1*, *CYP3A4* y *CYP3A5* en los cultivos tratados con hidrato de morin mediante la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR) [Anexo 10.1.3] en placas de 48 pozos. Para ello se emplearon sondas TaqMan (Thermo Fisher Scientific) y se siguió el protocolo recomendado por el fabricante. Cada reacción (15  $\mu$ L) contenía el volumen necesario para tener 600 ng de ADNc disuelto en agua libre de RNAsas y 8.25  $\mu$ L de una mezcla de reacción conteniendo la sonda correspondiente a razón de 1:10 y máster mix. El gen utilizado como referencia fue ciclofilina A (*PPIA*) ya que se expresó en todas las muestras sin cambios variables.

La reacción se llevó a cabo en un termociclador StepOne (Applied Biosystems; Waltham, Massachusetts, Estados Unidos de América), y se programaron 40 ciclos de amplificación bajo las siguientes condiciones: 95° C por 15 s y 60° C por 1 min. Se obtuvieron valores de Ct que es el ciclo umbral, es decir, el número de ciclos necesarios para que cada curva alcance un umbral en la señal de fluorescencia. Posteriormente, los niveles de expresión génica fueron calculados y normalizados con respecto al gen de referencia y a las células no tratadas siguiendo el método de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .<sup>112,113</sup>

## 6.8 Acoplamiento molecular *in silico*

Las estructuras cristalinas de los flavonoides que fungieron como ligandos fueron obtenidas de la base de datos ChemSpider: D-catequina (ChemSpider ID: 8711) y morin (ChemSpider ID: 13198271). La quercetina (PubChem ID: 5280343) fue descargada de la base de datos PubChem. La naringina fue excluida de este análisis, porque los datos experimentales de citotoxicidad obtenidos, no mostraron evidencia de su posible uso como agente terapéutico para el RMS13. Por medio del programa Autodock Tools 1.5.6, se detectó el enlace rotatable de cada estructura. Posteriormente las moléculas se guardaron en formato pdbqt.

Las estructuras cristalinas de los citocromos P450 CYP1B1 (PDB ID: 6IQ5), CYP2E1 (PDB ID: 3E6I), CYP3A4 (PDB ID: 4D7D) y CYP3A5 (PDB ID: 6MJM), así como de la proteína LOXL2 (PDB ID: 5ZE3) fueron obtenidos del Protein Data Bank (PDB). Cada una de las proteínas fueron editadas en el programa PyMOL eliminando las moléculas de agua y otros ligandos exceptuando al grupo hemo de los citocromos P450. Posteriormente, con AutoDock Tools se asignaron las cargas atómicas parciales a las moléculas usando cargas Gasteiger.

El acoplamiento molecular (*Anexo 10.1.4*) se realizó en AutoDock Vina delimitando a la proteína mediante el establecimiento de centros y dimensiones de búsqueda específicos para cada una (CYP1B1, X = 50 Å, Y = 46 Å y Z = 42 Å; CYP2E1, X = 46 Å, Y = 52 Å y Z = 40 Å; CYP3A4, X = 30 Å, Y = 30 Å y Z = 30 Å; CYP3A5, X = 40 Å, Y = 40 Å y Z = 40 Å; LOXL2, X = 58 Å, Y = 62 Å y Z = 46 Å). Se predijeron hasta nueve modelos de acoplamiento flavonoide-proteína con sus respectivas energías de unión (kcal/mol). La inspección visual de los modos de unión se realizó en PyMOL, prefiriendo el modelo con mayor energía. La validación de los ensayos *in silico* se realizó mediante la confirmación de un modo de unión ligando-proteína con una orientación similar a la del compuesto con el que se cristalizó y que presentara la mayor energía de unión del complejo.<sup>114</sup>

Una vez que se eligió el modelo de unión, se especificaron los residuos de aminoácidos con los cuales el ligando tuvo interacción y el tipo de enlace entre ellos mediante el uso del programa Maestro versión 13.1.141 (Schrödinger, LLC, Nueva York, Nueva York, Estados Unidos de América, 2021).

## 6.9 Análisis estadístico

Los resultados de citotoxicidad de los polifenoles fueron normalizados con respecto al vehículo y se expresaron como porcentajes de viabilidad celular promedio  $\pm$  desviación estándar (D.E.) de tres experimentos independientes. A partir de las curvas concentración-efecto, se calculó la concentración citotóxica media (CC<sub>50</sub>) a través de un ajuste por regresión no lineal de pendiente variable de cuatro parámetros en GraphPad Prism 9.

Los experimentos de expresión génica fueron realizados por triplicado. La comparación de la expresión génica de las células tratadas con el vehículo y las tratadas con el flavonoide fue realizada mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA), utilizando el método

de Dunnett para comparaciones múltiples, considerando valores de  $p$  menores a 0.05 como estadísticamente significativos. Para ello se empleó el programa GraphPad Prism versión 9.

## 7. Resultados

### 7.1 Ensayos de viabilidad celular

Los ensayos de viabilidad celular fueron realizados para conocer si los compuestos polifenólicos evaluados son citotóxicos para las células RMS13 y comparar su potencial citotóxico con el de los fármacos usados en los regímenes quimioterapéuticos del RMS. Para ello se calculó la  $CC_{50}$ , que es la concentración necesaria para reducir la viabilidad celular en un 50% (*Figura 5*), con lo cual se afectará tanto al crecimiento como a la proliferación celular.

Bajo las condiciones evaluadas, los flavonoides hidrato de morin y quercetina son los compuestos con mayor efecto citotóxico sobre las células RMS (*Figura 6b y 5c*), mostrando una inhibición de la viabilidad celular de una manera dependiente de la concentración del compuesto con valores de  $CC_{50}$  de  $281 \pm 14 \mu\text{M}$  y  $238 \pm 2 \mu\text{M}$ , respectivamente.

Tras 48 h de exposición a la catequina (*Figura 6a*) y a la naringina (*Figura 6d*), únicamente se observa una disminución en la viabilidad celular con las concentraciones más altas (2.5 mM).

En el tratamiento con los agentes antineoplásicos, las células mostraron ser resistentes a la ciclofosfamida e ifosfamida, donde se observa la disminución en la viabilidad celular a concentraciones mayores a 0.5 mM (*Figura 7a y 7d*).

La doxorrubicina incrementa la citotoxicidad de manera dependiente de la concentración de fármaco, como se aprecia en la *Figura 7b*, con un valor de  $CC_{50}$  de  $1.7 \pm 0.8 \mu\text{M}$ . En el caso del tratamiento con vincristina ( $CC_{50}$  de  $288 \pm 90 \mu\text{M}$ , *Figura 6c*) se observa un menor efecto citotóxico en comparación con la doxorrubicina.

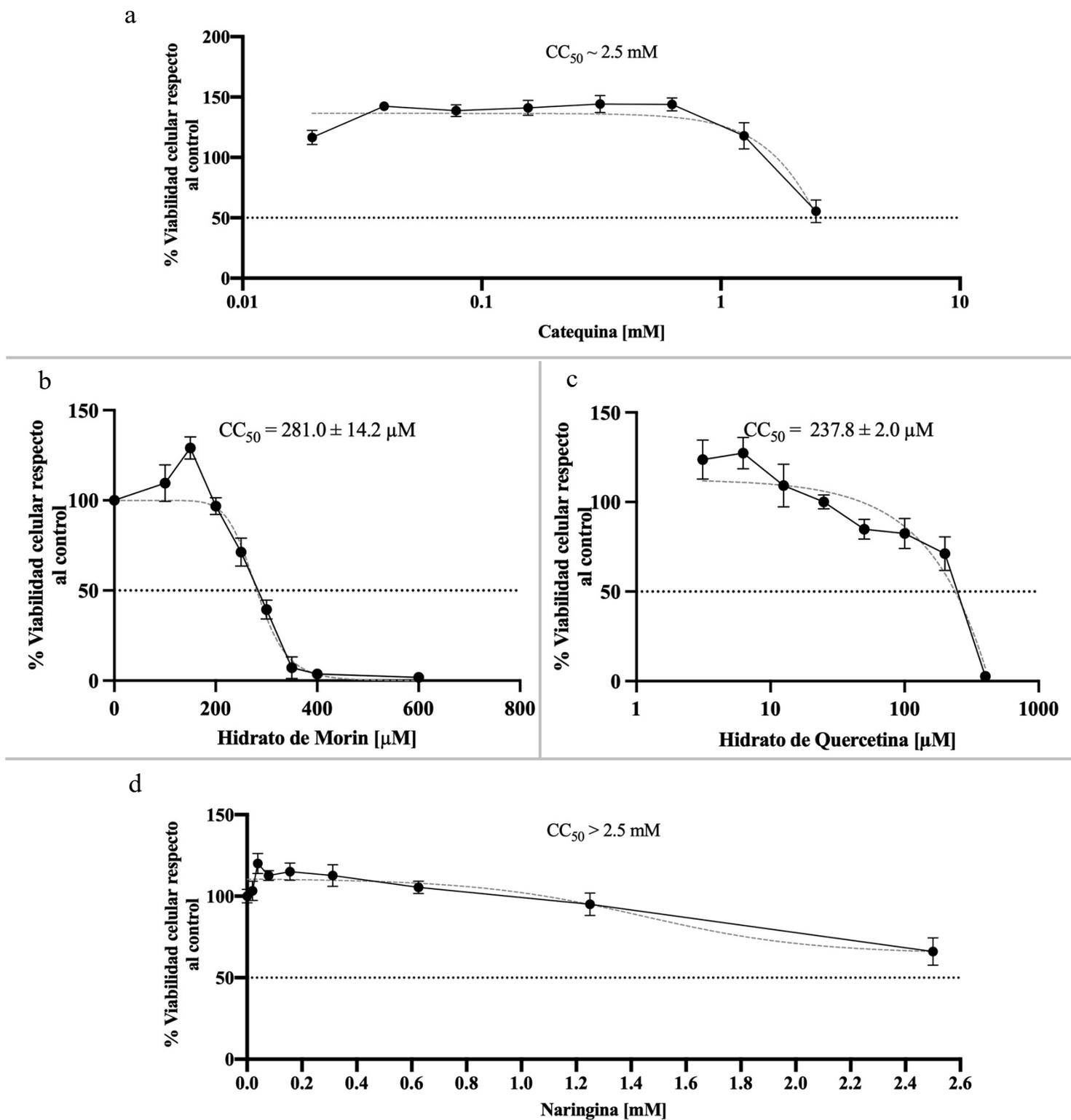


Figura 6. Curvas de porcentaje de viabilidad celular a diferentes concentraciones de flavonoides, tras 48 h de exposición. a. Catequina, b. Hidrato de morin, c. Hidrato de quercetina, d. Naringina. La línea punteada gris corresponde al ajuste por regresión no lineal.

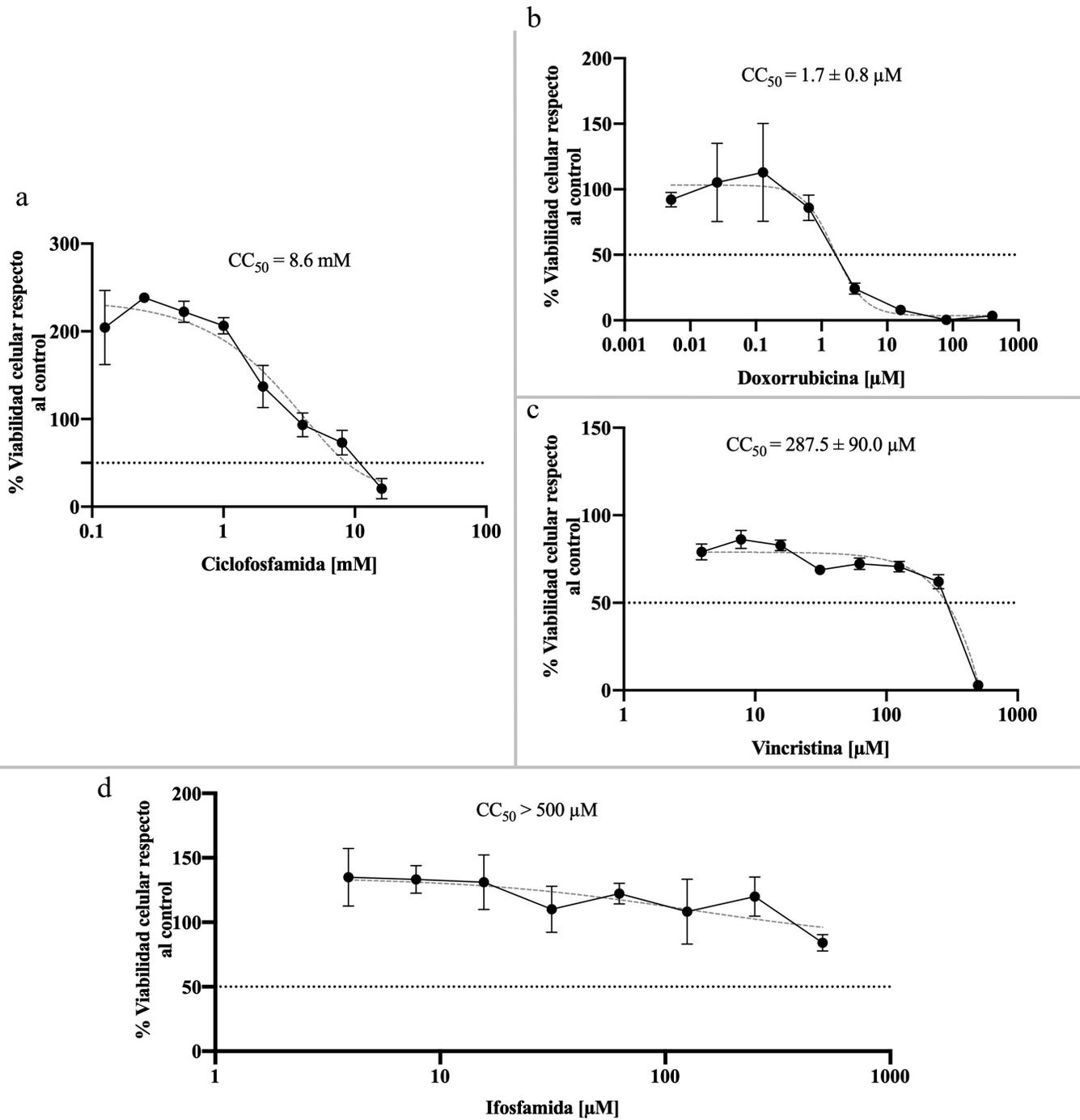


Figura 7. Curvas de porcentaje de viabilidad celular a diferentes concentraciones de fármacos, tras 48 h de exposición. a. Ciclofosfamida, b. Doxorubicina, c. Vincristina, d. Ifosfamida. La línea punteada gris corresponde al ajuste por regresión no lineal.

Para facilitar la comparación de las  $CC_{50}$  la unidad de concentración fue igualada para todos los casos ( $\mu\text{M}$ ), los datos se resumen en la *Tabla II*.

*Tabla II. Concentración Citotóxica Media de flavonoides y fármacos antineoplásicos sobre las células RMS13*

<b>Compuesto</b>	<b><math>CC_{50}</math> (<math>\mu\text{M}</math>) <math>\pm</math> D.E.</b>
Doxorrubicina	$1.7 \pm 0.8$
Hidrato de quercetina	$237.8 \pm 2.0$
Hidrato de morin	$281.0 \pm 14.2$
Vincristina	$287.5 \pm 90.0$
Ifosfamida	$> 500 *$
Catequina	$\sim 2\,500$
Naringina	$> 2\,500*$
Ciclofosfamida	8 600

\* 80% de viabilidad celular

Se observa que ninguno de los flavonoides evaluados tuvo mayor poder citotóxico que el fármaco doxorubicina ( $CC_{50}$  de  $1.7 \pm 0.8 \mu\text{M}$ ). Aun así, el hidrato de quercetina ( $CC_{50}$  de  $237.8 \pm 2.0 \mu\text{M}$ ) y el hidrato de morin ( $CC_{50}$  de  $281.0 \pm 14.2 \mu\text{M}$ ) fueron más citotóxicos que los demás fármacos antineoplásicos; es decir, la vincristina ( $CC_{50}$  de  $287.5 \pm 90.0 \mu\text{M}$ ), la ifosfamida ( $CC_{50} > 500 \mu\text{M}$ ) y la ciclofosfamida ( $CC_{50}$  de  $8.6 \times 10^3 \mu\text{M}$ ).

Por otro lado, el poder citotóxico de la catequina ( $\sim 2,500 \mu\text{M}$ ) es aproximadamente diez veces menor que el del hidrato de quercetina y el hidrato de morin. En cuanto a la  $CC_{50}$  de la naringina ( $> 2,500 \mu\text{M}$ ), este valor no se logró determinar bajo las condiciones experimentales examinadas.

Pese a que el hidrato de quercetina fue el compuesto polifenólico más citotóxico, los siguientes ensayos se realizaron con el flavonoide hidrato de morin, pues ya existe evidencia del efecto mutagénico de la quercetina en modelos *in vitro*.<sup>7</sup>

## 7.2 Ensayo de migración celular

El fenómeno de migración celular está profundamente relacionado con el desarrollo de metástasis, por ello se evaluó el efecto del hidrato de morin y de la doxorrubicina en tal proceso.

Durante el tiempo de monitoreo, se recabaron imágenes que permitieron observar y contrastar los efectos del hidrato de morin (150  $\mu\text{M}$ ) y de la doxorrubicina (1.5  $\mu\text{M}$ ) en la migración celular de las células RMS13 (*Figura 8*). Las concentraciones analizadas fueron menores a la  $\text{CC}_{50}$  para evitar la muerte celular.

En la *Figura 8*, se muestran los resultados tanto cualitativos como cuantitativos del ensayo de cierre de herida. El área de la herida del grupo control disminuye conforme transcurre el tiempo, llegando a cerrar en un 73% después de 6 horas, esto como resultado de un proceso fisiológico normal. En comparación con éstas, en las células que fueron tratadas con morin (150  $\mu\text{M}$ ), el porcentaje de cierre de herida tras 6 horas de exposición al polifenol fue del 31%. Se observa que a pesar de que el morin no impide que se repueble la zona de la herida, hace que este proceso sea más lento en presencia de este polifenol teniendo un posible efecto antimetastásico.

Por otro lado, la doxorrubicina muestra un mayor efecto inhibitor de la migración celular. A la concentración de 1.5  $\mu\text{M}$  es mucho más notorio que el área de la herida se va agrandando a lo largo del tiempo, lo que se ve reflejado en los porcentajes negativos de cierre de herida (-13% tras 6 h de exposición).

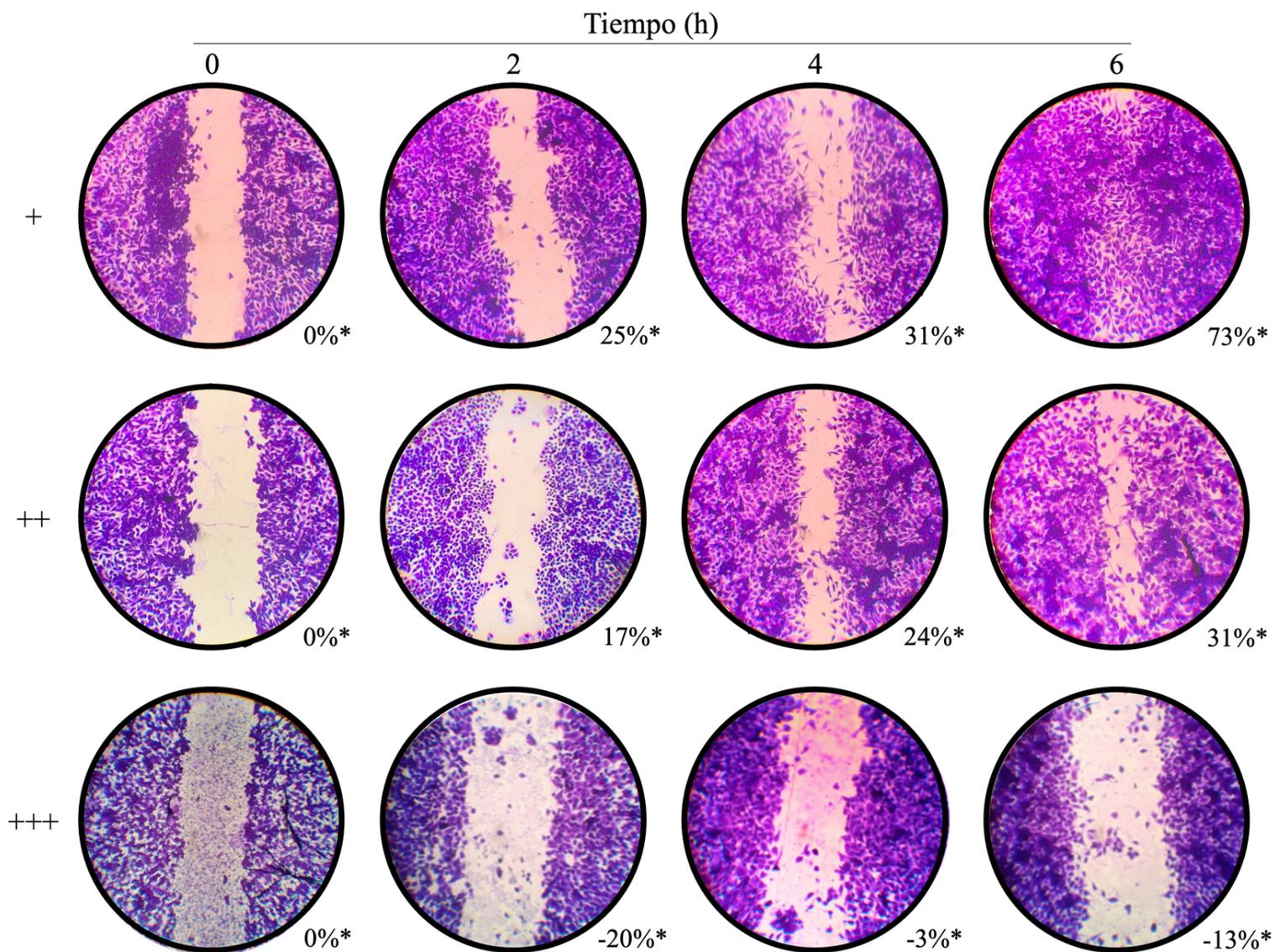
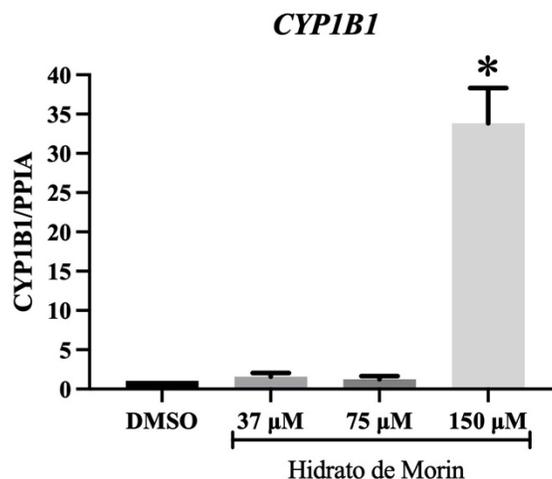


Figura 8. Monitoreo de cierre de herida. + Control, ++ Morin 150  $\mu$ M, +++ Doxorubicina 1.5  $\mu$ M. \*Porcentaje de cierre de la herida.

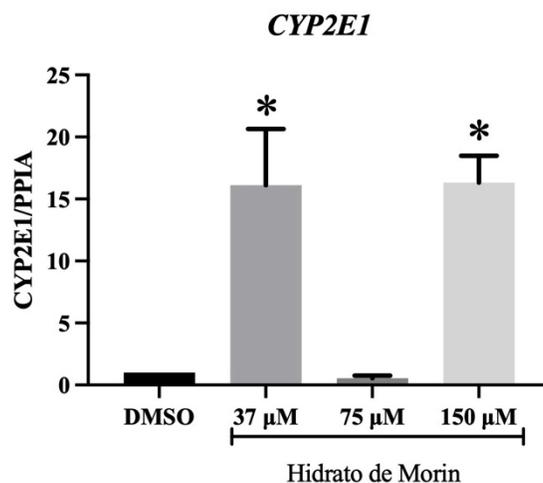
### 7.3 Evaluación de expresión génica

Se evaluó la capacidad del hidrato de morin de modular la expresión de los citocromos P450 importantes en la carcinogénesis y respuesta a la quimioterapia, a través de ensayos de RT-PCR. En la *Figura 9* se observa que a la concentración de 150  $\mu\text{M}$  de compuesto, el hidrato de morin propició un incremento en la expresión del *CYP1B1* de 34 veces más respecto al grupo control. Con las concentraciones de 37  $\mu\text{M}$  y 75  $\mu\text{M}$ , no existió diferencia significativa en la expresión del *CYP1B1* en comparación con las células tratadas con el vehículo.



*Figura 9. Efecto de diferentes concentraciones de hidrato de morin sobre la expresión del CYP1B1. \* $p < 0.05$  vs DMSO*

La expresión del *CYP2E1* en células RMS13 aumentó 16 veces más cuando fueron tratadas con hidrato de morin a concentraciones de 37  $\mu\text{M}$  y 150  $\mu\text{M}$  para ambos casos (*Figura 10*), mostrando diferencias significativas respecto al control.



*Figura 10. Efecto de diferentes concentraciones de hidrato de morin sobre la expresión de CYP2E1. \* $p < 0.05$  vs DMSO*

Similar al *CYP1B1*, el hidrato de morin (150  $\mu\text{M}$ ) incrementó la expresión del *CYP3A4*, 4 veces más en comparación a cuando las células recibieron tratamiento con el vehículo. Con las concentraciones de 37  $\mu\text{M}$  y 75  $\mu\text{M}$ , no hubo diferencia significativa en la expresión del *CYP3A4* (Figura 11).

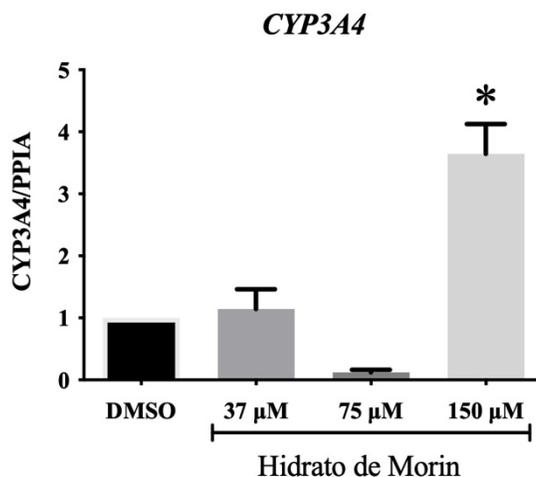


Figura 11. Efecto de diferentes concentraciones de hidrato de morin sobre la expresión del *CYP3A4*. \* $p < 0.05$  vs DMSO

Finalmente, la expresión del *CYP3A5* no se vio afectada por el tratamiento con hidrato de morin, como se confirma en la Figura 12.

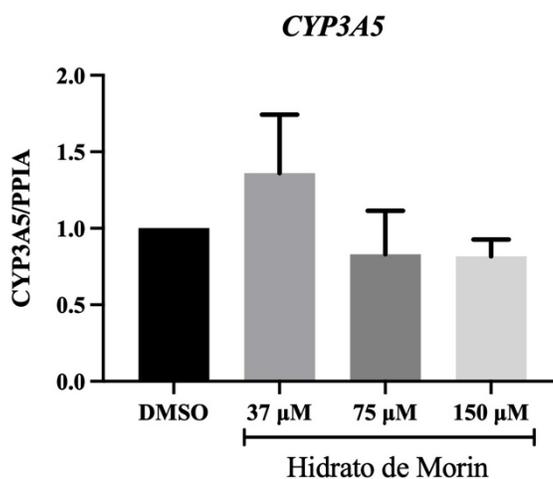


Figura 12. Efecto de diferentes concentraciones de hidrato de morin sobre la expresión del *CYP3A5*. \* $p < 0.05$  vs DMSO

## 7.4 Acoplamiento molecular *in silico*

Los resultados de los análisis de acoplamiento molecular son de utilidad porque ayudan a predecir el tipo de interacciones que podrían existir entre una proteína y un ligando, además de que permiten sugerir a los mejores ligandos de la proteína a través de la comparación de los valores de energía de unión de los complejos formados.

En la *Tabla III* se muestran los resultados obtenidos de los acoplamientos realizados entre las enzimas CYP1B1, CYP2E1, CYP3A4, CYP3A5 y LOXL2 con los flavonoides D-catequina, morin y quercetina. Se excluyó del análisis a la naringina, como se mencionó previamente, a causa de los resultados experimentales obtenidos que muestran una CC<sub>50</sub> superior, en comparación con los demás flavonoides (*Figura 6d*), y por ello se descartó su posible uso como agente terapéutico para el RMS13.

*Tabla III. Interacciones moleculares entre enzimas-flavonoides*

Enzima	Flavonoide	Energía de unión (kcal/mol)	Residuos con interacción
CYP1B1	D-Catequina	-11.9	Val126, Ala133, Phe134, Asn228, Phe231, Leu264, Phe268, Thr325, Asp326, Gly329, Ala330, Asp333, Thr334, Ile339, Leu509, Hem
	Morin	-11.6	Ser127, Ala133, Phe134, Phe231, Leu264, Phe268, Thr325, Asp326, Gly329, Ala330, Asp333, Thr334, Val395, Ile399, Leu509, Hem
	Quercetina	-10.8	Ala133, Phe134, Asn228, Phe231, Leu264, Phe268, Thr325, Asp326, Gly329, Ala330, Gln332, Asp333, Thr334, Ile399, Leu509, Hem
CYP2E1	D-Catequina	-8.9	Leu48, Leu50, Ile53, Phe57, Val72, Met77, Leu103, Gln216, Leu217, Asn219, Asn220, Ser366, Asn367, Pro369, Val390, Gly477, Phe478
	Morin	-8.1	Leu41, Leu48, Leu50, Ile53, Phe57, Val72, Met77, Gln216, Leu217, Asn219, Asn220, Ser366, Asn367, Leu368, Pro369, Gly477, Phe478
	Quercetina	-7.4	Leu48, Leu50, Ile53, Phe57, Val72, Met77, Leu103, Gln216, Asn219, Asn220, Val364, Pro365, Ser366, Asn367, Leu368, Pro369, Gly477, Phe478
CYP3A4	D-Catequina	-8.3	Phe108, Met114, Ser119, Leu210, Leu211, Val240, Phe241, Ile300, Ile301, Phe304, Ala305, Hem
	Morin	-8.2	Arg105, Ser119, Leu211, Ile301, Phe304, Ala305, Thr309, Ala370, Hem
	Quercetina	-7.7	Arg105, Ser119, Ile301, Phe304, Ala305, Glu308, Thr309, Ala370, Arg372, Leu373, Glu374, Hem
CYP3A5	D-Catequina	-8.2	Arg105, Phe213, Gly214, Phe304, Ala305, Thr309, Gly480, Leu481, Hem
	Morin	-8.2	Val50, Tyr53, Arg54, Arg106, Gly214, Phe220, Leu221, Ile224, Thr478, Gln479, Gly480
	Quercetina	-8.1	Ser119, Phe210, Leu211, Lys212, Phe213, Phe304, Ala305, Glu308, Thr309, Gly480, Leu481, Hem

Tabla IV (Continuación). Interacciones moleculares entre enzimas-flavonoides

Enzima	Flavonoide	Energía de unión (kcal/mol)	Residuos con interacción
LOXL2	D-Catequina	-8.3	Gly331, Val471, Met474, Arg478, Phe484, Ser512, Gly513, Phe718, Glu722, Ser723, Asp724, Tyr725, Ser726
	Morin	-8.0	Leu328, Arg329, Gly330, Gly331, Ala332, Tyr333, Ile334, Gly335, Glu336, Val471, Met474, Arg478, Ser512, Gly513, Glu722, Ser723, Asp724, Tyr725, Ser726
	Quercetina	-8.7	Leu328, Arg329, Gly330, Gly331, Ala332, Tyr333, Ile334, Gly335, Glu336, Gly337, Met474, Arg478, Ser723, Asp724, Tyr725, Ser726

Comparando los valores de energía de unión podemos observar que los complejos más estables de los citocromos P450 fueron formados con la D-catequina, ya que tienen los valores más bajos en tal parámetro, siendo para CYP1B1 de -11.9 kcal/mol, CYP2E1 -8.9 kcal/mol, CYP3A4 -8.3 kcal/mol y CYP3A5 de -8.2 kcal/mol; sin embargo, esas energías de unión son muy semejantes a las afinidades de unión de los complejos CYP-morin, que para CYP1B1 fue de -11.6 kcal/mol, CYP2E1 -8.1 kcal/mol, CYP3A4 -8.2 kcal/mol y CYP3A5 -8.2 kcal/mol. En el caso de la proteína LOXL2, el complejo más estable se formó con el flavonoide quercetina (-8.7 kcal/mol).

La *Tabla III* muestra los residuos de la proteína con los cuales el flavonoide tiene interacción. En algunos casos los flavonoides interactúan con el sitio activo de los citocromos P450, es decir, cercano al grupo hemo. Tal es el caso de la D-catequina y la quercetina que interactúan con el grupo hemo de CYP1B1, CYP3A4 y CYP3A5. El morin tiene interacciones con el sitio activo de CYP1B1 y CYP3A4.

La *Figura 13* muestra las conformaciones tridimensionales y bidimensionales de los modelos de unión predichos para el CYP1B1 (cian). En las tres imágenes 2D observamos que la fenilalanina 231 estableció interacciones de apilamiento  $\pi$ - $\pi$  (línea verde) con el anillo A de la D-catequina (naranja) y del morin (rosa), y con los anillos A y C de la quercetina (amarillo).



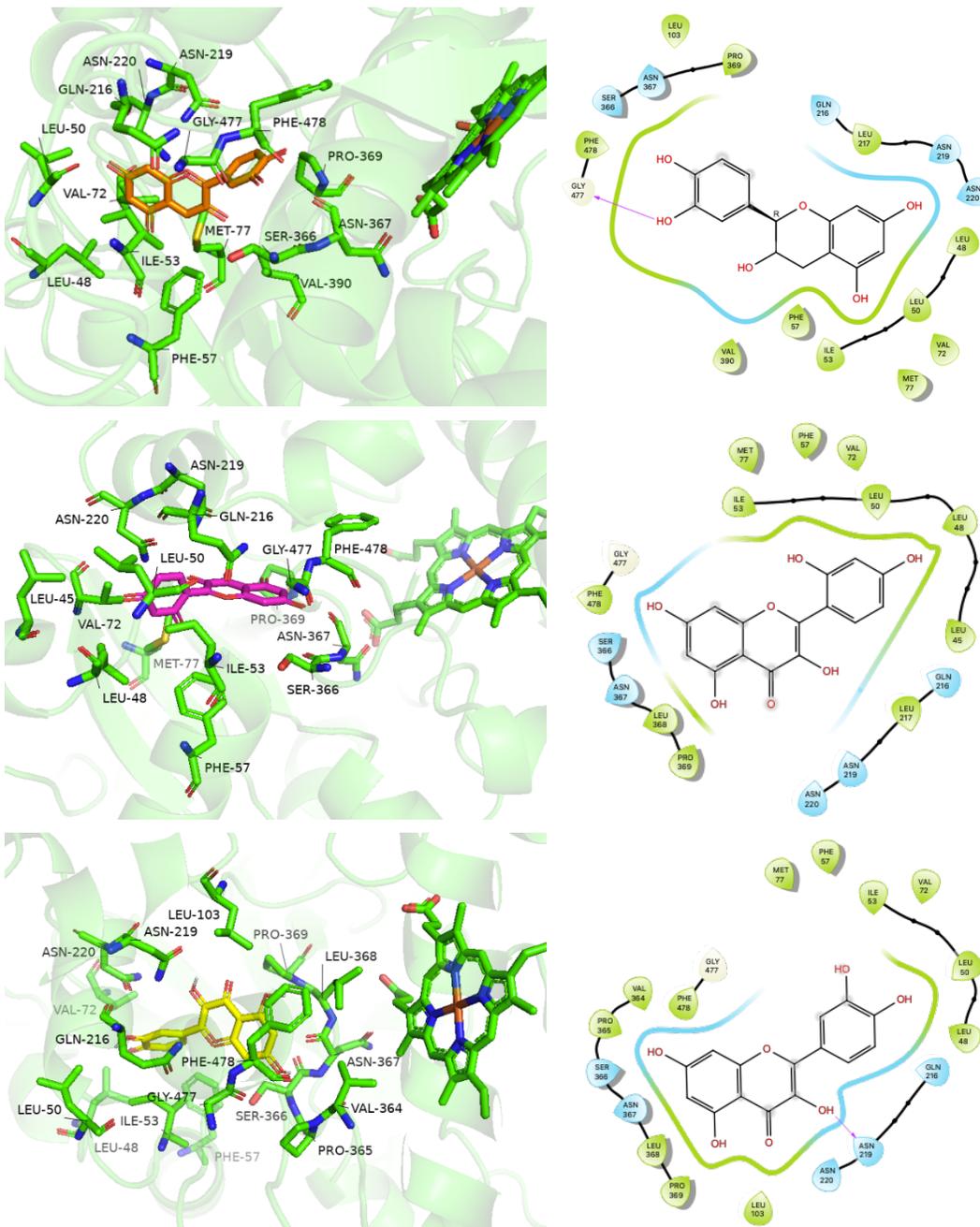


Figura 14. Representaciones 3D (PyMOL) y 2D (Maestro) de los modelos de unión energéticamente favorecidos entre el CYP2E1 (verde) y los flavonoides D-catequina (naranja), morin (rosa) y quercetina (amarillo). En ambos modelos se representan los residuos de aminoácidos obtenidos a 4 Å de distancia. Las flechas rosas en las representaciones 2D indican puentes de hidrógeno.

En el caso del CYP3A4 (azul), únicamente se encontraron interacciones débiles con la quercetina (amarillo). Existen dos interacciones de tipo  $\pi$ -catión, la primera entre la arginina 105 y el anillo B, y la segunda entre el grupo hemo y los anillos A y C. Aunado a esto, el grupo hemo también interactuó con el anillo B mediante apilamientos tipo  $\pi$ - $\pi$  como es mostrado en la Figura 15.

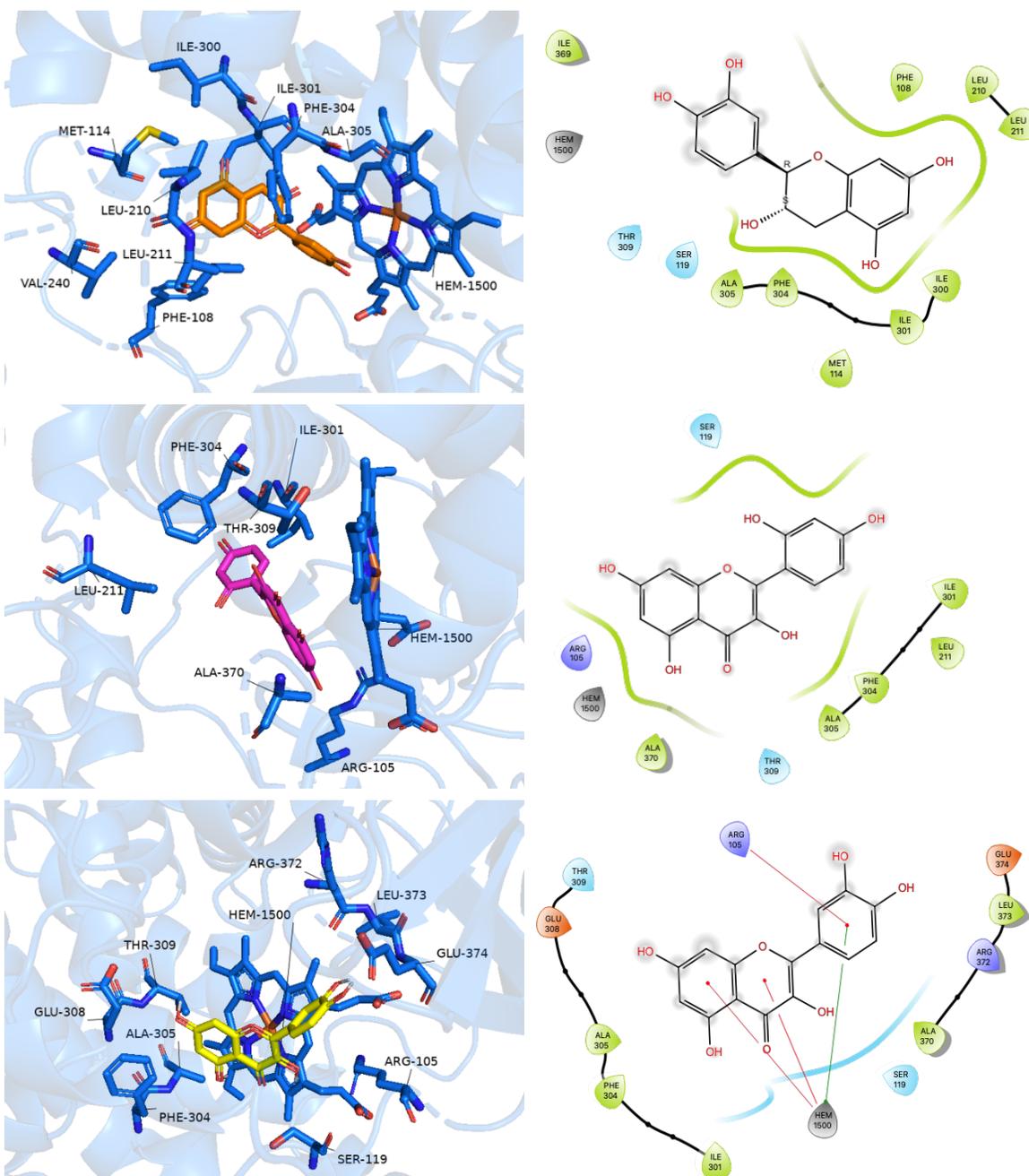


Figura 15. Representaciones 3D (PyMOL) y 2D (Maestro) de los modelos de unión energéticamente favorecidos entre el CYP3A4 (azul) y los flavonoides D-catequina (naranja), morin (rosa) y quercetina (amarillo). En ambos modelos se representan los residuos de aminoácidos obtenidos a 4 Å de distancia. Las líneas rojas en las representaciones 2D indican interacciones  $\pi$ -catión; la línea verde apilamiento  $\pi$ - $\pi$ .

Correspondiente al CYP3A5 (gris), el primer panel de la Figura 16 muestra que el anillo A de la D-catequina formó interacciones  $\pi$ - $\pi$  con el grupo hemo; además, el grupo -OH del C4' formó un puente de hidrógeno con la fenilalanina 213. Asimismo, el grupo hemo interactuó mediante apilamientos tipo  $\pi$ - $\pi$  con el anillo A de la quercetina.

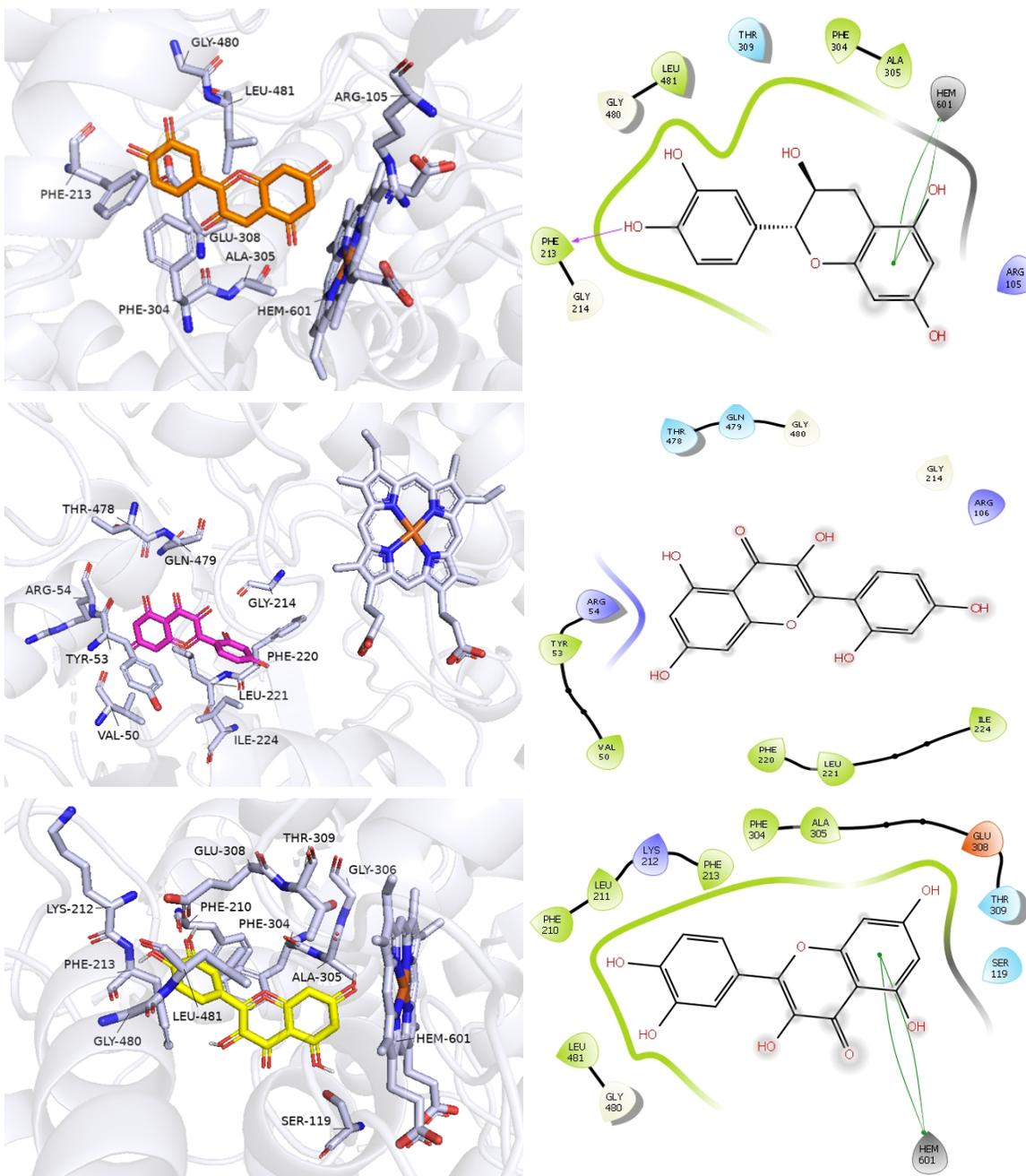


Figura 16. Representaciones 3D (PyMOL) y 2D (Maestro) de los modelos de unión energéticamente favorecidos entre el CYP3A5 (gris) y los flavonoides D-catequina (naranja), morin (rosa) y quercetina (amarillo). En ambos modelos se representan los residuos de aminoácidos obtenidos a 4 Å de distancia. Las líneas verdes en las representaciones 2D indican apilamiento  $\pi$ - $\pi$ ; la flecha rosa indica puentes de hidrógeno.

En cuanto a la enzima LOXL2 (morado), en la Figura 17 se demuestra que existe apilamiento de anillos  $\pi$ - $\pi$  entre el anillo de la tirosina 725 y el anillo A de la D-catequina. Con el morin existen interacciones de tres tipos, la primera  $\pi$ -catión entre la arginina 478 y el anillo B; la segunda por apilamiento de anillos  $\pi$ - $\pi$  entre la tirosina 725 y el anillo B del

morin; y finalmente uniones de puentes de hidrógeno entre el ácido glutámico 722 y el anillo B; así como entre la leucina 328 y el grupo -OH del C5. Para la quercetina, el grupo -OH del C4 mostró un puente de hidrógeno con el ácido glutámico 336.

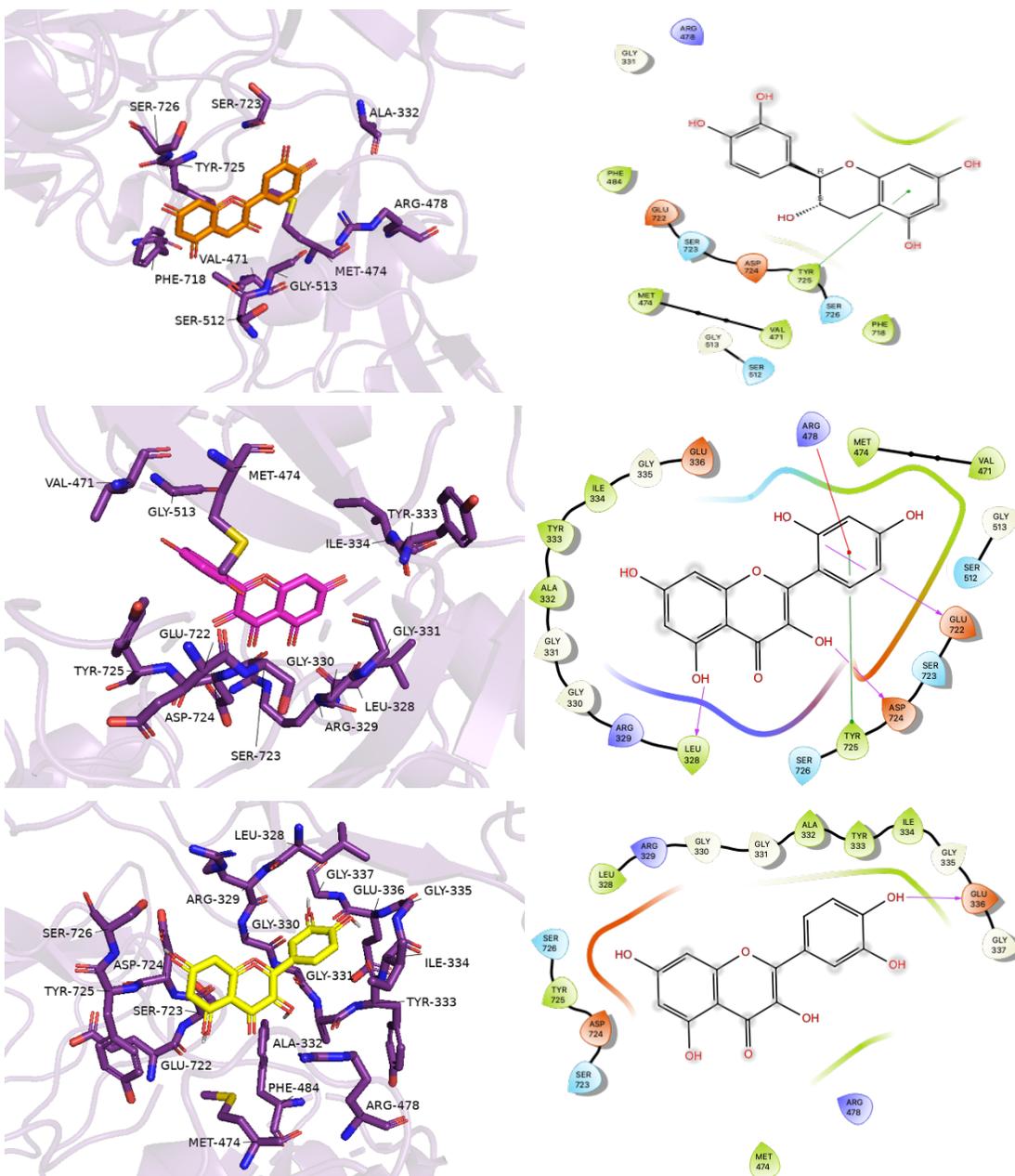


Figura 17. Representaciones 3D (PyMOL) y 2D (Maestro) de los modelos de unión energéticamente favorecidos entre LOXL2 (morado) y los flavonoides D-catequina (naranja), morin (rosa) y quercetina (amarillo). En ambos modelos se representan los residuos de aminoácidos obtenidos a 4 Å de distancia. Las líneas verdes en las representaciones 2D indican apilamiento  $\pi$ - $\pi$ ; la línea rosa indica enlace de hidrógeno; la línea roja indica interacciones  $\pi$ -catión.

## 8. Discusión

La mayoría de los pacientes pediátricos con RMS son diagnosticados en estadios avanzados de la enfermedad. Aunado a esto, la quimiorresistencia de las células cancerosas a los agentes antineoplásicos se ha convertido en un grave problema de salud pública. Aunque la quimioterapia tiene un efecto citotóxico sobre las células cancerosas, no consigue detener el proceso metastásico. Por ello, el nuevo reto en la terapia de los RMS es encontrar compuestos más seguros y eficaces, que además de ser citotóxicos, inhiban o detengan la progresión de la enfermedad.

En este trabajo se demostró que tanto el hidrato de quercetina como el hidrato de morin tienen un mayor poder citotóxico en las células de RMS en comparación con los fármacos antineoplásicos vincristina, ifosfamida y ciclofosfamida, sin embargo, el fármaco doxorubicina es más citotóxico que ambos flavonoides. A pesar de ello, estos resultados los convierten en potenciales agentes terapéuticos para el tratamiento de los RMS pediátricos. Por otro lado, hay evidencia en estudios *in vivo* del efecto mutagénico de la quercetina donde se ha observado la aparición de tumores en el tracto urinario de ratas bajo una exposición prolongada al flavonoide.<sup>115,116</sup> Por tal razón, los consiguientes ensayos *in vitro* de este proyecto se enfocaron en el hidrato de morin.

La  $CC_{50}$  calculada para el hidrato de morin ( $281.0 \pm 14.2 \mu\text{M}$ ) en células de RMS se encuentra dentro del intervalo de concentraciones citotóxicas reportadas para el mismo compuesto en otras líneas celulares cancerosas, tales como las células de adenocarcinoma de colon SW480 ( $200\text{-}250 \mu\text{M}$ )<sup>117</sup>, las células EJ de carcinoma de vejiga ( $450 \mu\text{M}$ )<sup>118</sup> o las células HeLa de cáncer cervicouterino ( $214 \mu\text{M}$ )<sup>119</sup>; lo que puede hacer al morin un compuesto citotóxico candidato que pueda ser utilizado contra diversos tipos de cáncer.

Respecto a los valores de  $CC_{50}$  calculados para los fármacos antineoplásicos en la línea celular RMS13, éstos difieren de los reportados en la literatura. Para la doxorubicina se reportan  $CC_{50}$  de  $0.14 \mu\text{M}$ <sup>120</sup> y  $0.41 \pm 0.4 \mu\text{M}$ <sup>121</sup>, valores entre 4 y 12 veces más bajos que la  $CC_{50}$  determinada en este trabajo ( $1.7 \pm 0.8 \mu\text{M}$ ). Por otro lado, para la vincristina las  $CC_{50}$  son de  $0.15 \mu\text{M}$ <sup>120</sup> y  $0.29 \pm 0.3 \mu\text{M}$ <sup>121</sup>, siendo en este trabajo la  $CC_{50}$  calculada de  $288 \pm 90 \mu\text{M}$ . Parte de estas discrepancias pueden deberse al tipo de línea celular utilizada y al tiempo de exposición. A pesar de que muchos autores se refieren a las líneas celulares RMS13 y SJRH30 como sinónimos, éstas presentan diferente histología, sitio de origen del tumor primario y se desconoce si el paciente a partir del cual se obtuvieron las células SJRH30 recibió tratamiento alguno o no. Todos estos factores influyen en su susceptibilidad a los fármacos.<sup>122</sup>

Generar un efecto citotóxico en las células cancerosas no es suficiente para detener el progreso de la enfermedad. El RMS con histología alveolar es un subtipo histológico que presenta muy malos pronósticos de vida a causa de su capacidad para migrar de un lado a otro facilitando el desarrollo de metástasis.<sup>35</sup> Por lo tanto, los agentes quimioterapéuticos que inhiban la migración de las células cancerígenas podrían ser más efectivos para reducir el progreso a estadios más avanzados del cáncer.

El ensayo de curación de herida demostró que el hidrato de morin inhibe el proceso de migración de las células RMS13. Este resultado también ha sido reportado en líneas celulares de cáncer de mama (MDA-MB-231), ovario (A2780 y SKOV-3) y pulmón (A549), en donde se observó que el hidrato de morin tiene un efecto inhibitorio en el proceso EMT. Sin embargo, su mecanismo de acción y participación en la cascada metastásica aún no ha sido dilucidado.<sup>80,123,124</sup>

A pesar de que el hidrato de morin no presentó una notable disminución de la migración celular como lo hace la doxorubicina, el polifenol ocasiona menor número de efectos adversos en comparación con este agente antineoplásico.<sup>50,51</sup> De igual manera, la doxorubicina muestra efectos promotores de la migración e invasión celular en algunos tipos de cáncer como el cáncer de mama, incluso siendo un agente citotóxico.<sup>125,126</sup>

El flavonol hidrato de morin a dosis subletales indujo significativamente la expresión de *CYP1B1*, *CYP2E1* y *CYP3A4*. Se reconoce a algunos flavonoides como inductores de la familia *CYP1* debido a que actúan como ligandos de AhR.<sup>104</sup> El determinar la vía por la cual el hidrato de morin modula a estos citocromos P450 en las células RMS13 es interesante para estudios posteriores.

Dong (2016) propone que los flavonoides hidroxilados en las posiciones C5 ó C7, como es el caso del hidrato de morin, inhiben preferentemente la actividad del CYP1B1 sobre otros citocromos P450.<sup>104</sup> Los apilamientos de anillo  $\pi$ - $\pi$  que se presentan entre la fenilalanina 231 del CYP1B1 y el anillo A del hidrato de morin (*Figura 13*) podrían ser los responsables de la inhibición de esta enzima.

El CYP3A4 es el encargado de biotransformar y con ello generar metabolitos activos de profármacos como la ciclofosfamida;<sup>98</sup> un aumento en su expresión podría resultar benéfico para el tratamiento del RMS13, pues se esperaría una mayor concentración de la mostaza fosforamida, que es su metabolito activo. Los resultados experimentales demostraron un aumento en la modulación de la expresión génica (*Figura 11*) lo que sugiere el uso del hidrato de morin como un coadyuvante farmacológico en la quimioterapia ya que potenciaría el efecto citotóxico de los profármacos activados por CYP3A4 al inducir la expresión del gen correspondiente. Las interacciones del hidrato de morin con el sitio catalítico de CYP3A4 observadas en los ensayos *in silico* (*Figura 15*) sugieren que el flavonoide también puede tener algún efecto en su actividad enzimática.

La proteína LOXL2 se encuentra altamente expresada en diferentes tipos de cáncer, entre ellos el RMS alveolar. Aunado a ello, su sobreexpresión se asocia con el desarrollo de metástasis.<sup>42,43</sup> El hidrato de morin estableció numerosas interacciones con esta proteína en los límites del sitio catalítico (*Figura 16*), lo que bien podría generar un complejo estable para ejercer un efecto inhibitorio sobre esta proteína. Estos hallazgos correlacionan con el hecho de que el hidrato de morin inhibe la migración celular. Sin embargo, para comprobar si su posible efecto antimetastásico es a través de este mecanismo, se tendrían que hacer otros experimentos.

Diversas publicaciones sustentan la propuesta del uso del hidrato de morin en el tratamiento del cáncer. Investigaciones hechas en ratones atímicos mostraron una clara

inhibición en el tamaño de tumores de cáncer de mama tras la administración diaria de 10 mg/kg de morin durante 45 días, dosis a la cual no se presentaron efectos adversos en los animales.<sup>123</sup> Kok (2000) reporta que el cotratamiento con morin disminuye la cardiotoxicidad asociada a la doxorubicina sin alterar su citotoxicidad en las células cancerosas.<sup>127</sup> Finalmente, Solairaja (2019) resalta que entre las características propias del cáncer que son detenidas o revertidas a causa del morin se encuentran la inhibición de la proliferación celular debido al arresto celular en las fases G2/M o G1/S del ciclo celular, la prevención de la inflamación, la interferencia en la invasión celular y metástasis, entre otras.<sup>128</sup>

El morin está presente en la guayaba (*Psidium guajava*), las hojas de guayaba (3.788 - 5.505 mg/g de peso seco)<sup>129</sup>, los higos (*Chlorophora tinctoria*), las moras blancas (*Morus alba L.*, 0.157 mg/g de polvo liofilizado)<sup>130</sup>, la cáscara de almendra (fruto de *Prunus dulcis*), las castañas (fruto de *Castanea sativa*), la cebolla (*Allium cepa*), las fresas (*Fragaria anassa*, 0.06- 0.28 mg/ 100 g de peso fresco)<sup>131,132</sup>, las algas marinas (0.26 – 3.73 mg/g de peso seco)<sup>133</sup>, la yaca (*Artocarpus heterophyllus*), el té, el café y el vino tinto.<sup>128,134</sup>

Thakur (2020) afirma que como consecuencia de la baja solubilidad en agua del morin, el porcentaje de biodisponibilidad es < 1%, esto a causa del metabolismo normal de los flavonoides. Incluso experimentaciones en ratas Wistar, exhibieron una biodisponibilidad del 1% después de dosis orales elevadas (200 mg/kg).<sup>135</sup>

Si bien los alimentos que contienen morin pueden fungir como alimentos funcionales por los múltiples beneficios del flavonoide, la ingesta de estos alimentos como parte del régimen terapéutico con la finalidad de alcanzar concentraciones citotóxicas no es viable pues el morin se encuentra en bajas concentraciones en fuentes derivadas de la dieta. Por ello, la mejor manera de usar clínicamente al flavonol sería en tratamientos que logren incrementar su biodisponibilidad; por ejemplo, mediante el uso de suspensiones farmacéuticas para su administración intravenosa. Li y colaboradores (2019) administraron dosis de 2.5 mg/kg de una solución salina con morin, lo que incrementó la biodisponibilidad del flavonol en un 92.92%.<sup>136</sup>

Por otro lado, este polifenol puede ser aislado a partir de la matriz vegetal, por medio de una extracción orgánica con metanol al 100% o Etanol:Agua (80/20) como lo realizaron Díaz-de-Cerio (2015)<sup>129</sup>, Hussain (2014)<sup>137</sup> y Zhang (2017)<sup>119</sup>.

## 9. Conclusiones

Se demostró que, de los 4 polifenoles evaluados, el hidrato de morin es uno de los potenciales agentes terapéuticos para el tratamiento del RMS pediátrico ya que tiene propiedades anticancerígenas *in vitro* siendo citotóxico para las células RMS13 ( $CC_{50}$  de  $281 \pm 14 \mu\text{M}$ ). También inhibe la migración celular y regula la expresión génica de los citocromos P450 *CYP1B1*, *CYP2E1* y *CYP3A4*. Además, establece interacciones con los sitios catalíticos de los citocromos P450 importantes en la carcinogénesis y la respuesta a la quimioterapia, así como con proteínas asociadas con la migración celular como LOXL2.

A pesar de que el poder citotóxico del morin es menor que el de la doxorubicina, este polifenol podría considerarse para el desarrollo de un nuevo régimen de quimioterapia donde se administre en combinación con un profármaco en los pacientes pediátricos con RMS.

La opción de obtener el hidrato de morin a partir de la ingesta de alimentos es poco viable ya que su biodisponibilidad es muy baja a causa de todos los procesos metabólicos que sufre en el organismo. Además, tienen que estudiarse las interacciones alimento-fármaco y descartar sus efectos adversos en modelos *in vivo*. Así como encontrar mejores opciones farmacológicas para incrementar la biodisponibilidad del morin y poder usarlo en la quimioterapia.

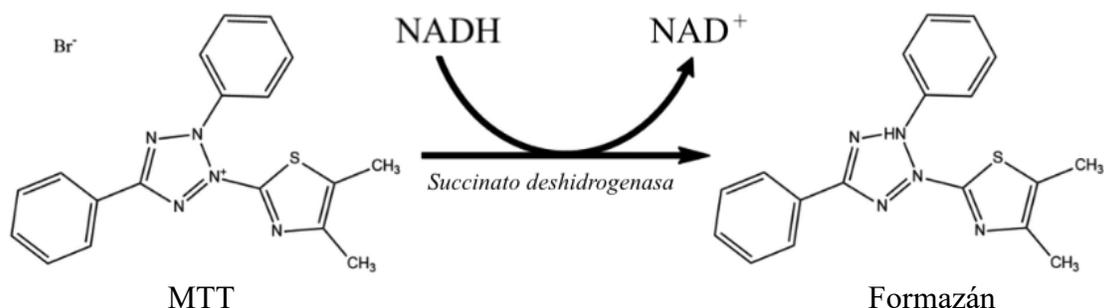
## 10. Anexo

### 10.1 Fundamento de las Técnicas Utilizadas

#### 10.1.1 Ensayo MTT

Uno de los métodos más comunes para la medición de la viabilidad celular es el ensayo MTT.

Este método colorimétrico se basa en la reducción metabólica (*Figura 18*) del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) a causa de la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa, produciendo como producto final de la reducción al compuesto azul, formazán. Tal reducción será realizada por células metabólicamente activas.



*Figura 18. Reducción del MTT en Formazán (adaptada de Kamiloglu et al., 2020)<sup>138</sup>*

Como producto de la reducción, el compuesto coloreado está directamente asociado con la cantidad de células metabólicamente activas. Esta relación facilita el análisis de las tasas de proliferación y/o muerte celular.<sup>139</sup>

#### 10.1.2 Curación de Herida

El ensayo de curación de herida es un protocolo sencillo que permite analizar el proceso de migración celular *in vitro* bajo condiciones controladas. En las investigaciones que proponen nuevas terapias contra el cáncer, es vital la evaluación de la migración celular, ya que es un proceso involucrado en los rasgos más distintivos del desarrollo de cáncer, como lo son la angiogénesis, la invasión de células cancerígenas y la metástasis.<sup>140</sup>

La metodología consiste en realizar una herida sobre el crecimiento celular confluyente y subsecuentemente capturar imágenes en intervalos determinados de tiempo. Los cambios en las dimensiones del área de la herida son determinantes para conocer si la migración celular fue o no inhibida. El método permite analizar tanto de manera cuantitativa como cualitativa la migración celular.<sup>140</sup>

### 10.1.3 Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real consiste en generar copias de un fragmento específico de ADN, y además detectarlo y cuantificarlo, tras cada ciclo de replicación.

Su detección, se da por efecto de la transferencia de energía entre un reportero fluorescente y un aceptor, lo que emite una resonancia fluorescente detectable y cuantificable por el equipo.

Las sondas TaqMan, funcionan como el reportero fluorescente y tienen una alta especificidad y eficiencia. Cuando la sonda hibrida con su secuencia diana, la *Taq polimerasa* rompe la unión de la sonda con su quencher o desactivador de fluorescencia, lo que da paso a la exposición de la señal fluorescente. El termociclador genera curvas de amplificación para cada ciclo, graficando la cantidad de fluorescencia detectada en función de cada ciclo, lo que permite visualizar el progreso de la reacción. El incremento de la fluorescencia deberá ser proporcional al aumento del número de copias de ADN.<sup>141</sup>

### 10.1.4 Acoplamiento Molecular

Las herramientas computacionales son sumamente útiles en el desarrollo de nuevos fármacos. El acoplamiento molecular *in silico* tiene como objetivo proponer modelos de unión entre dos moléculas, generalmente entre una proteína y un ligando.

Para ello, el software especializado considera campos de fuerza, cavidades moleculares, ángulos geométricos y puntos de torsión, lo que facilita la representación de la superficie y a su vez reconoce los posibles sitios de unión entre dos moléculas. Como resultado, el programa arroja posibles modelos de unión y mediante el cálculo de la energía libre de unión  $\Delta G$  se predice la interacción más favorable. La existencia de una interacción estable y favorable entre la proteína y un ligando, sugiere la actividad biológica de este último, ya sea ejerciendo un efecto de inhibición o de activación.<sup>142,143</sup>

## 11. Referencias

1. Prados, J. *et al.* Induction of drug resistance in embryonal rhabdomyosarcoma treated with conventional chemotherapy is associated with HLA class I increase. *Neoplasma* **53**, 226–231 (2006).
2. Spira, A. I. & Ettinger, D. S. The Use of Chemotherapy in Soft-Tissue Sarcomas. *Oncologist* **7**, 348–359 (2002).
3. Rubio Sánchez, S. Flavonoides con actividad antitumoral: Identificación y estudio del mecanismo de acción. (Universidad de las Palmas de Gran Canaria, 2009).
4. Shalkow, J. Cáncer Infantil en México: Situación Actual y Retos. (2017).
5. Albín-Cano, R. G. Sarcomas: etiología y síntomas Sarcomas: etiology and symptoms. *Revista Finlay* **2**, 116–129 (2012).
6. Organización Mundial de la Salud. Antineoplásicos, inmunosupresores y fármacos utilizados en los cuidados paliativos. in *Organización Mundial de la Salud, Formulario Modelos de la OMS* 183–201 (Organización Mundial de la Salud, 2004).
7. Álvarez-Castro, E. & Orallo-Cambeiro, F. Actividad Biológica de los flavonoides (I). Acción frente al cáncer. *Offarm* **22**, 130–140 (2003).
8. Moon, Y. J., Wang, X. & Morris, M. E. Dietary flavonoids: Effects on xenobiotic and carcinogen metabolism. *Toxicology in Vitro* vol. 20 187–210 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2005.06.048> (2006).
9. Organización Mundial de la Salud. El cáncer Infantil. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer-in-children> (2021).
10. Cicero-Oneto, C., Zapata-Tarrés, M., Flores-Toscano, K. Y. & Flores-Montes, O. A. Tumores sólidos malignos neonatales en el Hospital Infantil de México Federico Gómez. Experiencia de 69 años. *Gaceta Mexicana de Oncología* **12**, 143–149 (2013).
11. Fernández Cantón, S. B. & Hernández Martínez, A. M. Principales causas de mortalidad entre los menores de quince años: México, 2012. *Bol Med Hosp Infant Mex* **71**, 188–191 (2014).
12. Secretaria de Salud. *Cáncer en la Infancia y la Adolescencia*. (2014).
13. Fajardo-Gutierrez, A. & Rendon, M. Importancia del ‘diagnóstico temprano’ en los niños con cáncer para mejorar el pronóstico: concepto con poco sustento científico. *Gac Med Mex* **154**, 520–526 (2018).
14. Instituto de Salud para el Bienestar. 15 de Febrero - Día Internacional del Cáncer Infantil. *Gobierno de México* (2021).
15. de la Garza, J. & Juárez-Sánchez, P. *El Cáncer*. (Universidad Autónoma de Nuevo León, 2014).
16. Clark, J. W. & Longo, D. L. Biología de la célula cancerosa. in *Harrison. Principios de Medicina Interna, 20e* (eds. Jameson, J. L. et al.) (McGraw-Hill Education, 2018).
17. Rodríguez, L., Hernández, E. & Reyes, J. El ciclo celular: características, regulación e importancia en el cáncer. *Biotecnología Aplicada* **21**, 60–69 (2004).
18. Puente, J. & de Velasco, G. ¿Qué es el cáncer y cómo se desarrolla? *Sociedad Española de Oncología Médica* (2019).
19. Welch, D. R. & Hurst, D. R. Defining the Hallmarks of Metastasis. *Cancer Research* vol. 79 3011–3027 Preprint at <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-19-0458> (2019).

20. Hapach, L. A., Mosier, J. A., Wang, W. & Reinhart-King, C. A. Engineered models to parse apart the metastatic cascade. *npj Precision Oncology* vol. 3 Preprint at <https://doi.org/10.1038/s41698-019-0092-3> (2019).
21. Ribatti, D., Mangialardi, G. & Vacca, A. Stephen Paget and the ‘seed and soil’ theory of metastatic dissemination. *Clinical and Experimental Medicine* vol. 6 145–149 Preprint at <https://doi.org/10.1007/s10238-006-0117-4> (2006).
22. Akhtar, M., Haider, A., Rashid, S., Dakhilalla, A. & Al-Nabet, M. H. Paget’s ‘Seed and Soil’ Theory of Cancer Metastasis: An Idea Whose Time has Come. *Adv Anat Pathol* **26**, 69–74 (2019).
23. Liu, Y. & Cao, X. Characteristics and Significance of the Pre-metastatic Niche. *Cancer Cell* vol. 30 668–681 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2016.09.011> (2016).
24. Gavhane, N. *et al.* Solid Tumors: Facts, Challenges and Solutions. *International Journal of Pharma Sciences and Research* **2**, 1–12 (2011).
25. González-Rivera, A. *et al.* Mortalidad del cáncer en el Instituto Nacional de Pediatría como problema de salud pública. *Acta Pediátrica de México* **30**, 124–131 (2009).
26. Toro-Moreno, A. C. *et al.* Revista ecuatoriana de neurología : publicación oficial de la Sociedad Ecuatoriana de Neurología, de la Liga Ecuatoriana Contra la Epilepsia y la Sociedad Iberoamericana de Enfermedad Cerebrovascular. *Revista Ecuatoriana de Neurología* **26**, 283–288 (2017).
27. Amaral, D. *et al.* Actualización: Neuroblastoma. *Revista Pediátrica Elizalde* **2**, 31–34 (2011).
28. Gómez-Piña, J. J., Flores-Azamar, A. M., Gómez-Piña, J. J. & Flores-Azamar, A. M. Tumor de Wilms. *Medicina interna de México* **35**, 177–182 (2019).
29. Méndez, R. *et al.* Patrones clínicos de comportamiento en sarcomas pediátricos de partes blandas\*. *Cirugía Pediátrica* **14**, 14–20 (2001).
30. Sierrasesumaga, L. Tumores sólidos más frecuentes en la infancia. *Anales de Pediatría Continuada* **2**, 153–162 (2004).
31. Plaza, D., Sastre, A. & García-Miguel, P. Tumores óseos. *Anales de Pediatría Continuada* **6**, 266–275 (2008).
32. Paredes-Guerra, G. Hepatocarcinoma en niños: 15 años de experiencia del Grupo Oncológico Pediátrico- EsSalud Rebagliati–Almenara, Lima Perú. *Horizonte Médico (Lima)* **13**, 6–14 (2013).
33. Bautista Moreno, D. A. *et al.* Tumores Germinales Gonadales en niños: Experiencia de 20 años en un centro de referencia pediátrico. *Revista de la Facultad de Medicina* **63**, 47–56 (2015).
34. Villalobos-León, M. Sarcoma de partes blandas. *Medicine* **11**, 1659–1668 (2013).
35. Figueroa-Carbajal, J. de J., Cárdenas-Cardós, R., Rivera-Luna, R. & Castellanos-Toledo, A. Rbdomiosarcoma, experiencia de siete años en el Instituto Nacional de Pediatría. *Gaceta Mexicana de Oncología* **9**, 198–207 (2010).
36. American Society of Clinical Oncology. Sarcoma de Tejido Blando: Introducción. <https://www.cancer.net/es/tipos-de-cáncer/sarcoma-de-tejido-blando/introducción> (2019).
37. American Cancer Society. Signos y síntomas de los sarcomas de tejidos blandos. <https://www.cancer.org/es/cancer/sarcoma-de-tejidos-blandos/deteccion-diagnostico-clasificacion-por-etapas/senales-sintomas.html> (2018).

38. Kapoor, G. & Das, K. Soft tissue sarcomas in children. *Indian J Pediatr* **79**, 936–942 (2012).
39. Gasparini, P. *et al.* MiRNAs as players in rhabdomyosarcoma development. *International Journal of Molecular Sciences* vol. 20 Preprint at <https://doi.org/10.3390/ijms20225818> (2019).
40. Trejo-Scorza, E., Marquez Alvarez, B. B., Trejo-Scorza, C. J. & Paz-Ivannov, S. Pediatric Soft Tissue Tumors. in *Soft Tissue Tumors* 103–116 (InTech, 2011). doi:10.5772/25298.
41. Malempati, S. & Hawkins, D. S. Rhabdomyosarcoma: Review of the Children's Oncology Group (COG) soft-tissue Sarcoma committee experience and rationale for current COG studies. *Pediatric Blood and Cancer* vol. 59 5–10 Preprint at <https://doi.org/10.1002/pbc.24118> (2012).
42. Wen, B., Xu, L. Y. & Li, E. M. LOXL2 in cancer: regulation, downstream effectors and novel roles. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer* vol. 1874 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2020.188435> (2020).
43. Almacellas-Rabaiget, O. *et al.* LOXL2 promotes oncogenic progression in alveolar rhabdomyosarcoma independently of its catalytic activity. *Cancer Lett* **474**, 1–14 (2020).
44. Rey, G. Sarcomas en pediatría. *Revista del Hospital de Niños de Buenos Aires* **53**, 56–69 (2011).
45. Secretaria de Salud. *Diagnóstico y tratamiento de Sarcomas de Partes Blandas (Rabdomiosarcoma) en el paciente pediátrico.* (2010).
46. Avendaño, C. & Menéndez, C. *Medicinal Chemistry of Anticancer Drugs.* (Elsevier, 2015).
47. Barber, L. & Burgess, K. Overview of Antineoplastic Agents. *MSD Manual Veterinary* (2016).
48. Vega-Ávila, E., Velasco-Lezama, R. & Jiménez-Estrada, M. Las plantas como fuente de compuestos antineoplásicos. Revisión. *Bioquímica* **31**, 97–111 (2006).
49. Chu, E. & Sartorelli, A. Quimioterapia del cáncer. in *Farmacología básica y clínica, 12e* (eds. Katzung, B. G., Masters, S. B. & Trevor, A. J.) (McGraw-Hill Education, 2013).
50. Benedí, J. & Gómez del Río, M. A. Fármacos antineoplásicos (I). *Farmacia Profesional* **20**, 60–64 (2006).
51. Rhee, D. S. *et al.* Update on pediatric rhabdomyosarcoma: A report from the APSA Cancer Committee. *J Pediatr Surg* **55**, 1987–1995 (2020).
52. Gottesman, M. M. Mechanisms of Cancer Drug Resistance. *Annu Rev Med* **53**, 615–627 (2002).
53. Álvarez-Castro, E. & Orallo-Cambeiro, F. Actividad biológica de los flavonoides (II). Acción cardiovascular y sanguínea. *Offarm* **22**, 102–110 (2003).
54. Martín-Gordo, D. A. Los compuestos fenólicos, un acercamiento a su biosíntesis, síntesis y actividad biológica. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental* **9**, 81–104 (2018).
55. Bhagwat, S. & Haytowitz, D. B. *USDA Database for the Flavonoid Content of Selected Foods Release 3.2.* (2015).
56. Herrera Calderon, O. Efecto antioxidante y antitumoral in vitro del extracto etanólico de la raíz de *Waltheria ovata* Cav. 'lucraco' en línea celular de cáncer de próstata DU-

145. (Universidad Nacional Mayor de San Marcos, 2016). doi:10.13140/RG.2.1.3673.0486.
57. Martínez-Flórez, S., González-Gallego, J., Culebras, J. M., Tuñón, M. J. & Jesús Tuñón, M. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes Correspondencia. *Nutr. Hosp* 271–278 (2002).
  58. Mozaffarian, D. & Wu, J. H. Y. Flavonoids, dairy foods, and cardiovascular and metabolic health: A review of emerging biologic pathways. *Circ Res* **122**, 369–384 (2018).
  59. Rosales-Castro, M. *et al.* Evaluación química y capacidad antioxidante de extractos polifenólicos de cortezas de *Pinus cooperi*, *P. engelmannii*, *P. leiophylla* y *P. teocote*. *Madera y Bosques* **15**, 87–105 (2009).
  60. Busch, C. *et al.* Epigenetic activities of flavonoids in the prevention and treatment of cancer. *Clin Epigenetics* **7**, (2015).
  61. Escobar-Cévoli, R., Castro-Espín, C., Béraud, V., Buckland, G. & Zamora-Ros, R. An Overview of Global Flavonoid Intake and its Food Sources. in *Flavonoids - From Biosynthesis to Human Health* 371–391 (InTech, 2017). doi:10.5772/67655.
  62. Coronado, M., Vega y León, S., Gutiérrez, R., Vázquez, M. & Radilla, C. Antioxidantes: perspectiva actual para la salud humana Antioxidants: present perspective for the human health. *Rev Chil Nutr* **42**, 206–212 (2015).
  63. Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C. & Jiménez, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr* **79**, 727–774 (2004).
  64. Chun, O. K., Chung, S. J. & Song, W. O. Estimated Dietary Flavonoid Intake and Major Food Sources of U.S. Adults. *J Nutr* **137**, 1244–1252 (2007).
  65. Peterson, J. J. *et al.* Flavanones in grapefruit, lemons, and limes: A compilation and review of the data from the analytical literature. *Journal of Food Composition and Analysis* vol. 19 74–80 (2006).
  66. Khan, M. K., Zill-E-Huma & Dangles, O. A comprehensive review on flavanones, the major citrus polyphenols. *Journal of Food Composition and Analysis* **33**, 85–104 (2014).
  67. Tsanova-Savova, S. & Ribarova, F. Flavonols and flavones in some bulgarian plant foods. *Pol J Food Nutr Sci* **63**, 173–177 (2013).
  68. Hollman, P. C. H. & Arts, I. C. W. Flavonols, flavones and flavanols - Nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture* vol. 80 1081–1093 Preprint at [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(20000515\)80:7<1081::AID-JSFA566>3.0.CO;2-G](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(20000515)80:7<1081::AID-JSFA566>3.0.CO;2-G) (2000).
  69. Salinas-Moreno, Y., Rojas-Herrera, L., Sosa-Montes, E. & Pérez-Herrera, P. Composición de Antocianinas en variedades de Frijol Negro (*Phaseolus vulgaris* L.) Cultivadas en México. *Agrociencia* **39**, 385–394 (2005).
  70. Hostetler, G. L., Ralston, R. A. & Schwartz, S. J. Flavones: Food sources, bioavailability, metabolism, and bioactivity. *Advances in Nutrition* **8**, 423–435 (2017).
  71. Escamilla Jiménez, C. I., Cuevas Martínez, E. Y. & Fonseca, J. G. *Flavonoides y sus acciones antioxidantes*. *Rev Fac Med UNAM* vol. 52 [www.medigraphic.com](http://www.medigraphic.com) (2009).
  72. Hollman, P. Absorption, Bioavailability, and Metabolism of Flavonoids. *Pharm Biol* **42**, 74–83 (2004).
  73. Manach, C. & Donovan, J. L. Pharmacokinetics and metabolism of dietary flavonoids in humans. *Free Radical Research* vol. 38 771–785 Preprint at <https://doi.org/10.1080/10715760410001727858> (2004).

74. Kaushik, S. *et al.* Genistein potentiates Centchroman induced antineoplasticity in breast cancer via PI3K/Akt deactivation and ROS dependent induction of apoptosis. *Life Sci* **239**, 117073 (2019).
75. Radicchi, D. *et al.* Naringin: antitumor potential in silico and in vitro on bladder cancer cells. *Ars Pharmaceutica (Internet)* **63**, 132–143 (2022).
76. Wu, D. *et al.* Hesperetin induces apoptosis of esophageal cancer cells via mitochondrial pathway mediated by the increased intracellular reactive oxygen species. *Tumor Biology* **37**, 3451–3459 (2016).
77. Zhang, J., Song, J., Wu, D., Wang, J. & Dong, W. Hesperetin induces the apoptosis of hepatocellular carcinoma cells via mitochondrial pathway mediated by the increased intracellular reactive oxygen species, ATP and calcium. *Medical Oncology* **32**, 101 (2015).
78. Palit, S., Kar, S., Sharma, G. & Das, P. K. Hesperetin Induces Apoptosis in Breast Carcinoma by Triggering Accumulation of ROS and Activation of ASK1/JNK Pathway. *J Cell Physiol* **230**, 1729–1739 (2015).
79. Lim, W., Park, S., Bazer, F. W. & Song, G. Naringenin-Induced Apoptotic Cell Death in Prostate Cancer Cells Is Mediated via the PI3K/AKT and MAPK Signaling Pathways. *J Cell Biochem* **118**, 1118–1131 (2017).
80. Yao, D., Cui, H., Zhou, S. & Guo, L. Morin inhibited lung cancer cells viability, growth, and migration by suppressing miR-135b and inducing its target CCNG2. *Tumor Biology* **39**, 1–9 (2017).
81. Wang, R. *et al.* Quercetin Inhibits Breast Cancer Stem Cells via Downregulation of Aldehyde Dehydrogenase 1A1 (ALDH1A1), Chemokine Receptor Type 4 (CXCR4), Mucin 1 (MUC1), and Epithelial Cell Adhesion Molecule (EpCAM). *Med Sci Monit* **24**, 412–420 (2018).
82. Luo, H., Daddysman, M. K., Rankin, G. O., Jiang, B. H. & Chen, Y. C. Kaempferol enhances cisplatin's effect on ovarian cancer cells through promoting apoptosis caused by down regulation of cMyc. *Cancer Cell Int* **10**, (2010).
83. Park, W., Park, S., Lim, W. & Song, G. Chrysin disrupts intracellular homeostasis through mitochondria-mediated cell death in human choriocarcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* **503**, 3155–3161 (2018).
84. Sorrenti, V. *et al.* Cyanidin induces apoptosis and differentiation in prostate cancer cells. *Int J Oncol* **47**, 1303–1310 (2015).
85. Cvorovic, J. *et al.* Oxidative stress-based cytotoxicity of delphinidin and cyanidin in colon cancer cells. *Arch Biochem Biophys* **501**, 151–157 (2010).
86. Weyant, M. J., Carothers, A. M., Dannenberg, A. J. & Bertagnolli, M. M. (+)-Catechin Inhibits Intestinal Tumor Formation and Suppresses Focal Adhesion Kinase Activation in the Min/+ Mouse1. *Cancer Res* **61**, 118–125 (2001).
87. Cabrera, A. & Mach, N. Flavonoides como agentes quimiopreventivos y terapéuticos contra el cáncer de pulmón. *Revista Espanola de Nutricion Humana y Dietetica* vol. 16 143–153 Preprint at [https://doi.org/10.1016/S2173-1292\(12\)70089-3](https://doi.org/10.1016/S2173-1292(12)70089-3) (2012).
88. Batra, P. & Sharma, A. K. Anti-cancer potential of flavonoids: recent trends and future perspectives. *3 Biotech* **3**, 439–459 (2013).
89. Manikandan, P. & Nagini, S. Cytochrome P450 Structure, Function and Clinical Significance: A Review. *Curr Drug Targets* **19**, (2017).

90. Lu, J. *et al.* New insights of CYP1A in endogenous metabolism: a focus on single nucleotide polymorphisms and diseases. *Acta Pharmaceutica Sinica B* vol. 10 91–104 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2019.11.016> (2020).
91. Zanger, U. M. & Schwab, M. Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: Regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacology and Therapeutics* vol. 138 103–141 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2012.12.007> (2013).
92. Dong, J. *et al.* Flavonoids and Naphthoflavonoids: Wider Roles in the Modulation of Cytochrome P450 Family 1 Enzymes. *ChemMedChem* 2102–2118 Preprint at <https://doi.org/10.1002/cmdc.201600316> (2016).
93. Tornio, A. & Backman, J. T. Chapter One - Cytochrome P450 in Pharmacogenetics: An Update. in *Advances in Pharmacology* (eds. Brøsen, K. & Damkier, P.) vol. 83 3–32 (Academic Press, 2018).
94. Donato, M. T. *¿Qué es el citocromo P-450 y cómo funciona?*
95. Reed, L., Arlt, V. M. & Phillips, D. H. The role of cytochrome P450 enzymes in carcinogen activation and detoxication: An in vivo-in vitro paradox. *Carcinogenesis* vol. 39 851–859 Preprint at <https://doi.org/10.1093/carcin/bgy058> (2018).
96. Kwon, Y. J. *et al.* CYP1B1 enhances cell proliferation and metastasis through induction of EMT and activation of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling via Sp1 upregulation. *PLoS One* **11**, (2016).
97. Arbitrio, M. *et al.* 1.26 - Pharmacogenetics/Pharmacogenomics of Drug-Metabolizing Enzymes and Transporters. in *Comprehensive Pharmacology* (ed. Kenakin, T.) 657–697 (Elsevier, 2022). doi:<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-820472-6.00013-X>.
98. Quiñones, L. *et al.* Papel de las enzimas citocromo p450 en el metabolismo de fármacos antineoplásicos: Situación actual y perspectivas terapéuticas. *Rev Med Chil* **136**, 1327–1335 (2008).
99. Křížková, J., Burdová, K., Stiborová, M., Křen, V. & Hodek, P. The effects of selected flavonoids on cytochromes P450 in rat liver and small intestine. *Interdiscip Toxicol* **2**, 201–204 (2009).
100. Wang, Y. & Ho, C.-T. Metabolism of Flavonoids. in *Food Factors for Health Promotion* (ed. Yoshikawa, T.) vol. 61 64–74 (Karger, 2009).
101. Otake, Y. & Walle, T. Oxidation of the flavonoids galangin and kaempferide by human liver microsomes and CYP1A1, CYP1A2, and CYP2C9. *Drug Metabolism and Disposition* **30**, 103–105 (2002).
102. Guven, H., Arici, A. & Simsek, O. Flavonoids in Our Foods: A Short Review. *Journal of Basic and Clinical Health Sciences* (2019) doi:10.30621/jbachs.2019.555.
103. Kale, A., Gawande, S. & Kotwal, S. Cancer Phytotherapeutics: Role for Flavonoids at the Cellular Level. *Phytotherapy Research* **22**, 567–577 (2008).
104. Dong, J. *et al.* Flavonoids and Naphthoflavonoids: Wider Roles in the Modulation of Cytochrome P450 Family 1 Enzymes. *ChemMedChem* 2102–2118 Preprint at <https://doi.org/10.1002/cmdc.201600316> (2016).
105. Franco Tobón, Y. N. & Ramírez Botero, C. M. El benzo(a)pireno en los alimentos y su relación con el cáncer. *Perspectivas en Nutrición Humana* **15**, 99–112 (2013).
106. Hodek, P., Trefil, P. & Stiborová, M. Mini review Flavonoids-potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P450. *Chemico-Biological Interactions* vol. 139 1–21 (2002).
107. Royal Society of Chemistry. Chemical Structure Database. *ChemSpider* (2022).

108. Mosmann, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Journal of Immunological Methods* **65**, 55–63 (1983).
109. Denizot, F. & Lang, R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *Journal of Immunological Methods* **89**, 271–277 (1986).
110. Liang, C. C., Park, A. Y. & Guan, J. L. In vitro scratch assay: A convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nat Protoc* **2**, 329–333 (2007).
111. Rio, D. C., Ares, M., Hannon, G. J. & Nilsen, T. W. Purification of RNA using TRIzol (TRI Reagent). *Cold Spring Harb Protoc* **5**, (2010).
112. Schmittgen, T. D. & Livak, K. J. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nat Protoc* **3**, 1101–1108 (2008).
113. Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods* **25**, 402–408 (2001).
114. Trott, O. & Olson, A. J. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J Comput Chem* NA-NA (2009) doi:10.1002/jcc.21334.
115. Stoewsand, G. S. *et al.* Quercetin: A mutagen, not a carcinogen, in fischer rats. *J Toxicol Environ Health* **14**, 105–114 (1984).
116. Dunnick, J. K. & Hailey, J. R. Toxicity and Carcinogenicity Studies of Quercetin, a Natural Component of Foods. *Fundamental and Applied Toxicology* **19**, 423–466 (1992).
117. Sithara, T., Arun, K. B., Syama, H. P., Reshmitha, T. R. & Nisha, P. Morin inhibits proliferation of SW480 colorectal cancer cells by inducing apoptosis mediated by reactive oxygen species formation and uncoupling of warburg effect. *Front Pharmacol* **8**, (2017).
118. Shin, S. S. *et al.* Morin Inhibits Proliferation, Migration, and Invasion of Bladder Cancer EJ Cells via Modulation of Signaling Pathways, Cell Cycle Regulators, and Transcription Factor-Mediated MMP-9 Expression. *Drug Dev Res* **78**, 81–90 (2017).
119. Zhang, Q. *et al.* Molecular mechanism of anti-cancerous potential of Morin extracted from mulberry in Hela cells. *Food and Chemical Toxicology* **112**, 466–475 (2018).
120. Wellcome Sanger Institute. Genomics of Drug Sensitivity in Cancer. (2022).
121. Cocker, H. A., Pinkerton, C. R. & Kelland, L. R. Characterization and modulation of drug resistance of human paediatric rhabdomyosarcoma cell lines. *Br J Cancer* **83**, 338–345 (2000).
122. Hinson, A. R. P. *et al.* Human rhabdomyosarcoma cell lines for rhabdomyosarcoma research: Utility and pitfalls. *Front Oncol* **3** JUL, (2013).
123. Jin, H. *et al.* Morin, a flavonoid from Moraceae, suppresses growth and invasion of the highly metastatic breast cancer cell line MDA-MB-231 partly through suppression of the Akt pathway. *Int J Oncol* **45**, 1629–1637 (2014).
124. Lo, H. C. & Zhang, X. H. F. EMT in Metastasis: Finding the Right Balance. *Developmental Cell* vol. 45 663–665 (2018).
125. Liu, C. L. *et al.* Doxorubicin promotes migration and invasion of breast cancer cells through the upregulation of the RHOA/MLC pathway. *J Breast Cancer* **22**, 185–195 (2019).

126. Sun, Z., Zhou, D., Yang, J. & Zhang, D. Doxorubicin promotes breast cancer cell migration and invasion via DCAF13. *FEBS Open Bio* **12**, 221–230 (2022).
127. Kok, L. D. S. *et al.* Morin hydrate A potential antioxidant in minimizing the free-radicals-mediated damage to cardiovascular cells by anti-tumor drugs. *Life Sci* **67**, 91–99 (2000).
128. Solairaja, S., Andrabi, M. Q., Dunna, N. R. & Venkatabalasubramanian, S. Overview of Morin and Its Complementary Role as an Adjuvant for Anticancer Agents. *Nutrition and Cancer* vol. 73 927–942 Preprint at <https://doi.org/10.1080/01635581.2020.1778747> (2021).
129. Díaz-de-Cerio, E., Gómez-Caravaca, A. M., Verardo, V., Fernández-Gutiérrez, A. & Segura-Carretero, A. Determination of guava (*Psidium guajava* L.) leaf phenolic compounds using HPLC-DAD-QTOF-MS. *J Funct Foods* **22**, 376–388 (2016).
130. Yang, X., Yang, L. & Zheng, H. Hypolipidemic and antioxidant effects of mulberry (*Morus alba* L.) fruit in hyperlipidaemia rats. *Food and Chemical Toxicology* **48**, 2374–2379 (2010).
131. Ehala, S., Vaher, M. & Kaljurand, M. Characterization of phenolic profiles of Northern European berries by capillary electrophoresis and determination of their antioxidant activity. *J Agric Food Chem* **53**, 6484–6490 (2005).
132. Pavun, L., Janošević-Ležaić, A. & Uskoković-Marković, S. Spectrophotometric determination of morin in strawberries and their antioxidant activity. *Arh Farm (Belgr)* **71**, 55–71 (2021).
133. Zeng, L., Zhang, G., Liao, Y. & Gong, D. Inhibitory mechanism of morin on  $\alpha$ -glucosidase and its anti-glycation properties. *Food Funct* **7**, 3953–3963 (2016).
134. Choudhury, A., Chakraborty, I., Subhra Banerjee, T., Rao Vana, D. & Adapa, D. Efficacy of Morin as a Potential Therapeutic Phytochemical: Insights into the Mechanism of Action. *International Journal of Medical Research & Health Sciences* **6**, 175–194 (2017).
135. Thakur, K. *et al.* Morin as an imminent functional food ingredient: An update on its enhanced efficacy in the treatment and prevention of metabolic syndromes. *Food and Function* vol. 11 8424–8443 Preprint at <https://doi.org/10.1039/d0fo01444c> (2020).
136. Li, J., Yang, Y., Ning, E., Peng, Y. & Zhang, J. Mechanisms of poor oral bioavailability of flavonoid Morin in rats: From physicochemical to biopharmaceutical evaluations. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **128**, 290–298 (2019).
137. Hussain, J. *et al.* Isolation and bioactivities of the flavonoids morin and Morin-3-O- $\beta$ -D-glucopyranoside from *Acridocarpus orientalis* - A wild arabian medicinal plant. *Molecules* **19**, 17763–17772 (2014).
138. Kamiloglu, S., Sari, G., Ozdal, T. & Capanoglu, E. Guidelines for cell viability assays. *Food Front* **1**, 332–349 (2020).
139. Bahuguna, A., Khan, I., Bajpai, V. K. & Kang, S. C. MTT assay to evaluate the cytotoxic potential of a drug. *Bangladesh J Pharmacol* **12**, 115–118 (2017).
140. Grada, A., Otero-Vinas, M., Prieto-Castrillo, F., Obagi, Z. & Falanga, V. Research Techniques Made Simple: Analysis of Collective Cell Migration Using the Wound Healing Assay. *Journal of Investigative Dermatology* **137**, e11–e16 (2017).
141. Tamay de Dios, L., Ibarra, C. & Velasquillo, C. Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en Discapacidad* **2**, 70–78 (2013).

142. Ballón-Paucara, W. G. & Grados-Torres, R. E. Acoplamiento molecular: criterios prácticos para la selección de ligandos biológicamente activos e identificación de nuevos blancos terapéuticos. *Revista Con-ciencia* **7**, 55–72 (2019).
143. Prieto-Martínez, F. D., Arciniega, M. & Medina-Franco, J. L. Molecular Docking: Current advances and challenges. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas* **21**, 65–87 (2018).