



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO



FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

EFFECTO DE UN COMPUESTO DE COORDINACIÓN DE
ZINC SOBRE LA MIGRACIÓN CELULAR DE
RABDOMIOSARCOMAS *IN VITRO*.

TESIS DE INVESTIGACIÓN

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

CIRUJANA DENTISTA

PRESENTA:

JAQUELINE DE LA ROSA RUÍZ

TUTORA:

DRA. MARÍA DOLORES JIMÉNEZ FARFÁN

ASESORES:

Dr. CLAUDIO VIVEROS AMADOR.

Dr. JUAN CARLOS CUAUHTÉMOC HERNÁNDEZ GUERRERO



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

Agradecimientos y Dedicatorias .

A Dios por guiarme en mi camino, y ponerme a lo largo de mi vida grandiosas personas que me han apoyado a lograr mis metas con sus enseñanzas y cariño .

A mis padres, Virginia Ruíz F. y Oscar de la Rosa G. ¡Gracias por todo el apoyo a lo largo de este camino cuando las cosas no salían como yo las esperaba!, en especial a mi mamá ya que sin su amor, confianza y sacrificio no estaría donde hoy me encuentro. Por sus palabras de aliento, por aguantar mis desveladas, mi mal humor en ciertos momentos y por siempre estar a mi lado en los malos y buenos tiempos. Mis logros son tuyos también.

A mis abuelitos, Marcos Ruiz A. y Virginia Flores C. Por ayudarme a superar los obstáculos que se me presentaban y no dejarme dar por vencida, por hacerme sentir que lo mejor estaba por venir, cuánta razón tenían, ustedes son lo muy importantes para mí como mis segundos padres.

A mis hermanos, Adolfo y Oscar por brindarme su apoyo y comprensión a lo largo de mi carrera.

A mi familia Ruiz, por su cariño, apoyo y confiar en mí.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por haberme permitido crecer en su regazo. Agradezco todas las experiencias logradas durante mi formación.

A la Dra Maria Dolores Jiménez Farfán, por permitirme participar en la realización de este trabajo, por sus enseñanzas, apoyo y dedicación.

Al programa de apoyo a proyectos de investigación e innovación Tecnológica UNAM-DGAPA-PAPIIT, por la beca otorgada a través del folio 419020 con número de proyecto IN223720.

Al laboratorio de inmunología, en especial a los Doctores. Claudio Viveros A y Juan Carlos Hernández G. Por ser mis asesores, así como cada uno de sus integrantes, por permitirme conocer otra área de la odontología y realizar el servicio social con ustedes.

A la Mtra. Cristina Trejo Solis por formar parte de la supervisión y el desarrollo de este trabajo

A todas las personas que me acompañaron durante estos años de prepa y licenciatura (Profesores, colegas y amigos). Gracias por hacerme la vida más fácil en tiempos difíciles con todos sus consejos y apoyos, por compartir alegrías y alentarme a seguir adelante para nunca rendirme y por todos esos momentos vividos dentro y fuera de clases que nunca olvidaré.

“Tengo en mi teclado un arma.

Pero , si tus ojos o tus oídos no aprietan el gatillo , nunca

será disparada”

NACH
-HAMBRIENTO-

ÍNDICE

RESUMEN	1
I . INTRODUCCIÓN	2
ANTECEDENTES	3
CAPÍTULO I. RABDOMIOSARCOMA	5
1.1 CLASIFICACIÓN HISTOLÓGICA	6
1.2. ETIOPATOGENIA	10
1.3 TRATAMIENTO	12
CAPÍTULO 2.	15
COMPUESTOS DE COORDINACIÓN	15
2.1 COMPUESTO bis(acetylacetonato-kO,O)(1,10-phenanthroline-k N,N')Zn(II)	16
CAPÍTULO 3	19
MIGRACIÓN Y CÁNCER	19
CAPÍTULO 4.	22
ESTRÉS OXIDATIVO Y CÁNCER	22
4.1 Mecanismos antioxidantes	24
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	26
III. JUSTIFICACIÓN	27
IV. OBJETIVO GENERAL	28
V. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28

VI. HIPÓTESIS	28
VII. MATERIALES Y MÉTODO	29
7.1 Cultivo y expansión de células.	29
7.2 Tratamientos.	29
7.3 Ensayo de cierre de herida.	30
7.4 Zimograma.	30
7.5 Análisis estadístico	31
7.6 Equipo, material y reactivos.	31
Material:	31
Reactivos:	32
FINANCIAMIENTO	33
VII. RESULTADOS	33
VIII. DISCUSIÓN	40
CONCLUSIONES	43
REFERENCIAS	44

RESUMEN

El rabdomiosarcoma (RMS) es un tipo de cáncer de tejidos blandos más común en la infancia y adolescencia. Aunque no se conoce con exactitud cuál es la causa que provoca este sarcoma, se han identificado algunas alteraciones genéticas. La clasificación histopatológica incluye 5 histotipos diferentes, de los cuales dos son los más prevalentes son el RMS alveolar y el RMS embrionario. El pronóstico de RMS ha mejorado en las últimas décadas y se mantiene la búsqueda de tratamientos más con mejores resultados contra las células cancerosas y con menos efectos secundarios. En el presente trabajo se describe el efecto anti-migratorio del compuesto bis(acetilacetato-k² O,O')(1,10-fenantrolina-k² N,N')Zn(II) en RMS *in vitro* mediante los ensayos de cierre de herida y zimograma, así como el efecto generador de especies reactivas de oxígeno.

I . INTRODUCCIÓN

Los sarcomas de tejidos blandos son un grupo de neoplasias malignas poco frecuentes que representan menos del 1% del total de tumores malignos, cuya incidencia se acerca a 5/100,000 casos por año. Ocupan el quinto lugar entre los tumores sólidos de la infancia y representan entre el 6% y 7% de todas las malignidades^(1, 2).

El Rbdomiosarcoma (RMS) es una neoplasia maligna derivada de las células mesenquimales precursoras del músculo esquelético. Hoy en día se reconoce la existencia de translocaciones y deleciones en el genoma directamente relacionadas con su aparición, así como se han identificado algunos síndromes asociados ^(3, 4).

Existe un esquema farmacológico de primera elección para el tratamiento de RMS conocido como VAC (Vincristina-Actinomicina D-Ciclofosfamida), sin embargo genera diversos efectos que plantean el reto de crear más y mejores medicamentos para su tratamiento. La utilización de compuestos de coordinación como opción terapéutica está en crecimiento, por lo que el estudio de sus mecanismos de acción y los efectos en el comportamiento de las células neoplásicas representa un área importante de interés biomédico.

ANTECEDENTES

Cáncer es el término utilizado para referirse al grupo de enfermedades que presentan un crecimiento descontrolado de las células, generado a partir de acumulaciones progresivas de mutaciones cuyos efectos aberrantes impactan en el fenotipo y comportamiento celular (transformación maligna), al punto de invadir tejidos circundantes y diseminarse al resto del organismo (metástasis).

El tipo de cáncer se define por el tejido u órgano en el que se ha originado. El potencial de inducir la muerte es inminente en cualquiera de los casos si no son tratados. Aunque existen diversas terapias que pueden llegar a eliminarlos o coadyuvar a reducir de forma considerable su crecimiento y diseminación, el éxito de estas terapias depende en gran medida del momento en que se realiza el diagnóstico.

Las causas asociadas al desarrollo del cáncer son muy diversas y depende de la interacción de varios factores, entre ellos la predisposición genética (mutaciones, deleciones, translocaciones) y, tres categorías de agentes externos clasificados por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como carcinógenos físicos, químicos y biológicos, muchos de ellos generadores de cambios epigenéticos muy relevantes (OMS, 2018).⁽⁵⁾

El Global Cancer Observatory (GCO) o GLOBOCAN como parte del Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer (IARC, por sus siglas en inglés), perteneciente a la OMS, menciona que en 2020 hubo una incidencia de cáncer de

19.3 millones y una mortalidad de 9,96 millones, lo que representa el segundo lugar entre las causas principales de muerte en el mundo.⁽⁶⁾ Esto se traduce aproximadamente en 10 millones de defunciones al año . En la Región de las Américas se estima que 4 millones de personas fueron diagnosticadas con algún tipo de cáncer y, 1.4 millones murieron por esta enfermedad. ⁽⁷⁾ De acuerdo con datos de GLOBOCAN, México (año 2020) registró 195,499 nuevos casos de cáncer y 90,222 muertes. ⁽⁶⁾ Por su parte en México, el Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI), entre enero y agosto de 2020 registró 683,823 defunciones, de las cuales 9% se debieron a tumores malignos. Un año antes, registró 747,784 defunciones, de las cuales 12% se debieron a algún tipo de neoplasia maligna. La distribución porcentual por sexo indica que hay más fallecimientos en mujeres (51%) que en hombres (49%) por esta causa.⁽⁵⁾

CAPÍTULO I.

RABDOMIOSARCOMA

El rhabdomiosarcoma (RMS) es un tipo de sarcoma de tejido blando más común en la infancia. Corresponde a un tumor maligno y agresivo originado de las células embrionarias del mesénquima (células miogénicas) y presenta características de diferenciación a músculo esquelético fetal correspondientes a la semana 7 a 10 del desarrollo ^(8,9,10). Este tumor representa aproximadamente el 60% de todos los sarcomas de tejidos blandos y aproximadamente un 3-8% de todas las neoplasias malignas que afectan a niños menores de 14 años ^(11,12,13). Existe una leve predominancia en pacientes de sexo masculino y más común en niños caucásicos ⁽¹⁴⁾. La localización más frecuente es en la región de cabeza y cuello, donde la lengua, paladar y carrillos son los sitios más afectados; sin embargo, puede encontrarse también en el aparato genitourinario y extremidades ^(14,15). Se caracteriza por un crecimiento local, rápido y persistente con posibilidad de diseminación temprana. ⁽¹⁶⁾

La mayor parte de los RMS ocurren de manera esporádica y solamente el 9% de los mismos está relacionado con síndromes ⁽¹⁷⁾ como el Síndrome de Li-Fraumeni ^(3,4,15), Síndrome *DICER1* ⁽³⁾, Beckwith-Wiedemann ⁽³⁾, Síndrome de Noonan. ^(3,15), Neurofibromatosis tipo I ^(12,15), Síndrome de Costello ^(12,15), Síndrome de Síndrome de Rubinstein-Taybi, Síndrome de Gorlin- Goltz (carcinoma basocelular nevoide) ⁽¹⁸⁾.

La mortalidad por cáncer infantil entre 1975 y 2010 disminuyó en más de 50% en estados unidos y durante ese período, la tasa de supervivencia a 5 años para el

rabdomiosarcoma (RMS) aumentó de 53% a 67% para los niños menores de 15 años, y de 30% a 51% para los adolescentes de 15 a 19 años. ⁽¹⁹⁾

La incidencia anual media en el Reino Unido es de 5,2 por millón de niños menores de 15 años (Registro Nacional de Tumores Infantiles), que asciende a aproximadamente 60 casos pediátricos recién diagnosticados por año. ⁽²⁰⁾ Existe una distribución bimodal para la edad en cuanto a su manifestación, con un pico entre los 2 y 6 años, y luego nuevamente entre los 10 y 18 años de edad, con una relación hombre-mujer de 1.5 a 1, teniendo el hombre una supervivencia general ligeramente más larga. ⁽²¹⁾

En México se calcula una incidencia anual promedio de 2.5 por millón y una proporción hombre: mujer de 2:1. ⁽²²⁾ De acuerdo con el Instituto Nacional de Pediatría (INP) en México, el RMS ocupa el séptimo lugar del total de las neoplasias malignas en niños y adolescentes ⁽²²⁾.

1.1 CLASIFICACIÓN HISTOLÓGICA

La Organización Mundial de la Salud ha clasificado al RMS en los subtipos:

- Embrionario: más común en bebés y niños menores de 10 años, ^(23,28) caracterizado por la presencia de células mesenquimales en diversas etapas de la miogénesis (rabdomioblastos). Histológicamente presenta células ahusadas y/o redondeadas con núcleo ubicado en el centro, de forma oval, hipercromático y abundante citoplasma eosinófilo, dispuestas en grupos o aisladas dentro de un estroma de aspecto mixoide ^(17,24). Se localiza en cabeza y cuello (especialmente

la órbita), vejiga, próstata, tracto biliar, abdomen, pelvis y retroperitoneo. Su pronóstico es favorable ^(23,25) **(Figura 1A)**.

- Alveolar: tumor maligno de alto grado que afecta a todos los grupos de edad, aunque es más común entre la segunda y tercera décadas de la vida. Se caracteriza por la disposición en nidos de células tumorales pequeñas y redondas primitivas, con nucléolo prominente, separadas por septos de tejido fibroso. ^(23,25) Las células neoplásicas varían en tamaño y en ocasiones tienen múltiples núcleos. ⁽²⁶⁾ En el centro, estas células aparecen dispersas e imitan un patrón alveolar pulmonar ^(17,24). Se ubica en extremidades, cabeza y cuello, tórax, órganos genitales, abdomen y área anal. Su pronóstico es desfavorable ^(17,18). **(Figura 1B)**.
- Pleomórfico: más común entre los 60 y 80 años; presenta células de diferente tipo y tamaño, se compone de células poligonales, redondas y ahusadas con núcleos hipercromáticos, lobulados y agrandados, citoplasma densamente eosinófilo y gran cantidad de figuras mitóticas ^(17,24). Se ubica principalmente en extremidades, pecho y abdomen ^(25,28). Suele formarse en el interior de un músculo y también puede afectar la piel ⁽²⁷⁾. En pacientes adultos, la variante pleomórfica se asocia con el peor pronóstico **(Figura 1C)**.
- Botrioide: Se origina a partir de células mesenquimatosas primitivas y es más común en las dos primeras décadas de la vida.⁽²¹⁾ El término botrioide se refiere a las masas en “forma de racimo” que sobresalen de la mucosa de la vejiga urinaria, que es la ubicación más común de este subtipo de RMS. ⁽²⁶⁾ Organizado en estructuras polipoides revestidas por epitelio escamoso con agregados celulares subyacentes ^(25, 28). Histológicamente, el RMS botrioide de la vejiga

urinaria se localiza en la submucosa, y las células neoplásicas están separadas del epitelio de la mucosa por una capa de tejido conectivo. Se caracteriza por múltiples proyecciones polipoides que forman racimos de consistencia gelatinosa, friables y que se desprenden en fragmentos causantes de hemorragias (**Figura 1D**)⁽²⁹⁾. El pronóstico está determinado por variables como el tamaño del tumor, el sitio de origen, la edad del paciente, la enfermedad residual postquirúrgica y la presencia de metástasis al momento de establecer el diagnóstico. Los sitios primarios de pronóstico más favorable incluyen el paratesticular, vaginal y tracto biliar⁽³⁰⁾

- De células fusiformes/esclerótico: más común en niños menores de 10 años y adultos mayores de 40 años. Células fusiformes relativamente diferenciadas con características que recuerdan a las neoplasias del músculo liso y presencia de bandas densas de colágeno. Se ubica en la región paratesticular, cabeza y cuello. Su pronóstico es desfavorable en adultos y favorable en niños^(25,28).

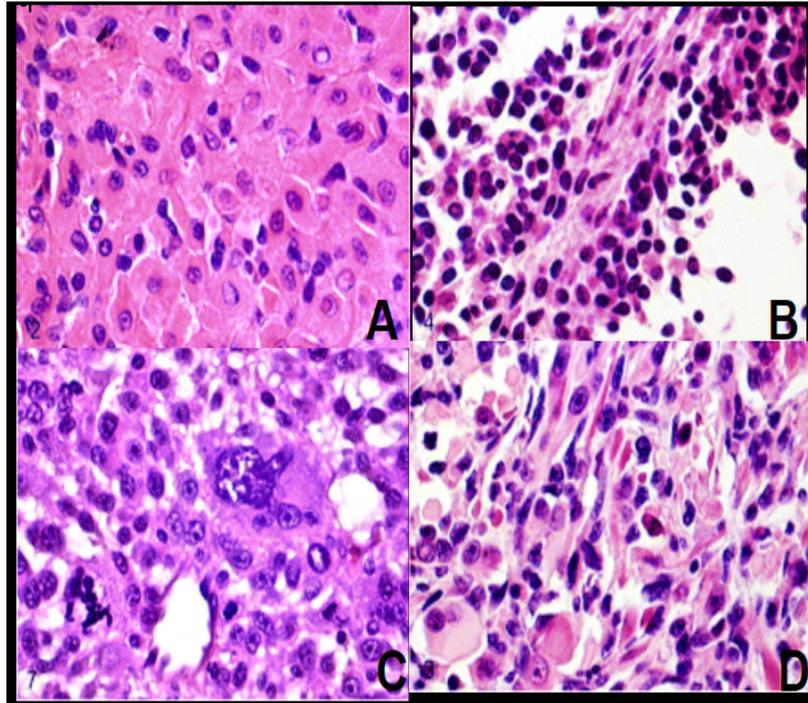


Figura 1. Principales subtipos de rhabdomiosarcoma (RMS): **A.** embrionario; **B.** alveolar; **C.** pleomórfico; **D.** botrioide. Fuente: Caserto, 2013. ⁽²⁶⁾

El RMS embrionario (RMSE) y alveolar (RMSA) representan el 60% y 20% de los casos, respectivamente ⁽³¹⁾. Otros autores han reportado un mayor porcentaje en el RMSA (31%), RMSE (60%) y RMS pleomórfico (9%) ⁽¹⁷⁾.

Dentro del diagnóstico diferencial se encuentra el leiomioma, el cual es más común que el RMS. El sarcoma del estroma endometrial es otro diagnóstico diferencial de importancia, representa un tumor morfológicamente bifásico, compuesto de áreas semejantes al endometrio de tipo proliferativo, que se mezclan con focos de alto grado y células epitelioideas malignas. ⁽²¹⁾.

1.2. ETIOPATOGENIA

El origen del RMS ha sido motivo de numerosos estudios y aunque no se conoce con exactitud cuál es la causa, sí se han identificado algunas alteraciones genéticas como la presencia de la translocación $t(2;13)(q35, q14)$ en más de 50% de los casos de RMSA. Esta translocación fusiona al gen *PAX3* (implicado en la regulación de la transcripción durante el desarrollo neuromuscular temprano) con el gen *FKHR/FOXO1*, que codifica el factor transcripcional supresor tumoral FOXO1 en humanos (importante regulador transcripcional de la gluconeogénesis, glucogenólisis, apoptosis y ciclo celular) ^(17, 32). La fusión de los factores de transcripción *PAX3* y *FOXO1* activa de forma inapropiada diversos genes que favorecen el desarrollo tumoral asociados con la evasión de la muerte celular y la metástasis ^(17,32). Con menor frecuencia se ha identificado la translocación $t(1;13)(p36, q14)$, capaz de promover la fusión del gen *PAX7* con el *FOXO1* ^(2,3). La fusión *PAX3-FOXO1* se asocia clínicamente con tumores más agresivos que aquellos que presentan la fusión *PAX7-FOXO1* ⁽¹⁷⁾.

Los genes *PAX3/7-FOXO1* en el RMS están relacionados con la activación de la señalización RTK/RAS/PI3K (mediante PDGFR-A, ERBB2, FGFR-4, c-Met, PI3K, NRAS, KRAS y HRAS), alteración en la expresión de genes reguladores del ciclo celular (CTNNB1, FBXW7, BCOR-CCNB3 y p53) e incremento en la expresión de c-Myc ⁽³³⁾. Los factores de transcripción codificados por *PAX3* y *PAX7* se expresan muy tempranamente durante la embriogénesis, siendo los principales reguladores de la neurogénesis y miogénesis, así como la segmentación embrionaria ⁽³⁴⁾. La alta expresión de *PAX7* mantiene la migración y la invasividad en las células RMSE

regulando positivamente los receptores de efrina A3, ⁽³⁵⁾ proteína constitutiva de la membrana plasmática que regula eventos relevantes del desarrollo embrionario y de la vida adulta como la angiogénesis⁽³⁶⁾ y la diferenciación de células madre. ⁽³⁷⁾

En el RMSE no se ha descrito ninguna translocación, pero sí se ha observado una pérdida de la heterocigosidad en el locus 11p15, con pérdida de información materna y duplicación del material genético paterno. En este locus es donde se encuentra el gen IGF-2 (gen del factor de crecimiento similar a la insulina tipo 2), el cual podría participar en la patogénesis del RMS. En el RMSE también se han evidenciado ganancias y deleciones de cromosomas, especialmente copias extra de los cromosomas 8 y 20 y, del brazo largo del cromosoma 2 ⁽¹⁷⁾.

Otras alteraciones moleculares implicadas en la patogénesis de este tumor, incluyen la mutación del gen *P53* (que se observa en la mitad de los pacientes), elevación de *N-MYC* (en el 10% de los RMSA) y mutaciones en los oncogenes *N-RAS* y *K-RAS* (principalmente en los RMSE) ⁽¹⁷⁾.

Actualmente, el análisis genómico del RMS sugiere que los tumores con fusión positiva presentan una baja carga de otras alteraciones genómicas, mientras que los tumores con fusión negativa tienen una tasa de mutaciones alta. Las mutaciones somáticas aumentan con la edad. Algunas de las mutaciones son en los genes *NRAS*, *KRAS*, *HRAS*, *FGFR4*, *NF1*, *PIK3CA*, *TP53*, *CTNNB1*, *FBXW7*, *BCOR* y *MYOD1*.^(21, 38)

1.3 TRATAMIENTO

El tratamiento del RMS se centra en conseguir un “control sistémico”, es decir, implica la eliminación permanente de las metástasis mediante quimioterapia, cirugía o radioterapia.⁽²⁰⁾ El beneficio logrado en estos protocolos de tratamiento se basa en la optimización del control local (erradicación permanente del tumor primario) y a distancia, añadiendo el tratamiento farmacológico.⁽³⁹⁾

En los últimos 30 años, la tasa de curación en pacientes con RMS ha mejorado en forma significativa de entre 25% hasta 70%. Estos resultados se atribuyen además del diagnóstico más temprano, al desarrollo de protocolos de tratamiento multidisciplinario basados en el riesgo de la enfermedad. Los principales grupos colaborativos internacionales han establecido los lineamientos de tratamiento para este tumor.⁽⁴⁰⁾ El Instituto Nacional del Cáncer de Estados Unidos menciona que los niños de 1 a 9 años tienen el mejor pronóstico, mientras que los mayores o menores tienen un pronóstico menos favorable.⁽⁴¹⁾ Los niños con tumores menores a 5 cm tienen una mejor tasa de supervivencia, por lo que el volumen y el diámetro máximo del tumor se relacionan con el desenlace.⁽⁴¹⁾

La cirugía es un componente integral del manejo local del RMS siendo este el principio básico para el tratamiento. Se trata de una resección completa del tumor primario con un margen circundante de tejido normal y una muestra de los nódulos linfáticos. Algunas excepciones a la resección de un margen normal la constituyen los tumores de órbita y de la región genitourinaria.⁽⁴²⁾

Lawrence y cols., consideran que los tumores desarrollados en sitios de cabeza y cuello no parameningeos, orbitarios y genitourinarios distintos de la vejiga o próstata (paratesticular, vaginal, uterino y vulva) presentan mejores tasas de supervivencia mientras no exista metástasis ⁽⁴²⁾

Por otro lado, la farmacoterapia más comúnmente empleada en el tratamiento de los RMS es la combinación de sulfato de Vincristina-Actinomicina D (D-actinomicina)-Ciclofosfamida conocido como VAC ⁽⁴³⁾. El uso combinado de estos fármacos afecta negativamente a los pacientes debido a la toxicidad a corto y largo plazo y, a menudo, las células cancerosas adquieren resistencia al tratamiento.

La Vincristina es un fármaco específico que interfiere con el ciclo celular. Se une a la tubulina provocando la despolimerización de los microtúbulos, la detención de la metafase y la muerte por apoptosis. ⁽⁴⁴⁾ El perfil farmacocinético de Vincristina se describe con una vida media de distribución inicial muy rápida seguida de una vida media de eliminación más prolongada. También tiene un gran volumen de distribución, lo que sugiere una distribución difusa y unión tisular, propiedades que pueden limitar su empleo óptimo hacia tejidos diana. La actividad antitumoral de Vincristina incluye propiedades anti-angiogénicas ⁽⁴⁴⁾.

La Actinomicina D tiene un mecanismo de acción dependiente de la intercalación del fármaco entre las dos cadenas del ADN, con lo que se impide la replicación correcta (a dosis altas) y se altera la síntesis del ARN (a dosis altas y bajas) ⁽⁴⁵⁾.

La Ciclofosfamida es un precursor inactivo del 4-hidroxiciclofosfamida (4-HC) y agente quelante oxazafosforina; éstos reaccionan con el ADN preferentemente en la posición N-7 de la guanina, causando pérdida de la purina o

desdoblamiento y finalmente ruptura y fragmentación de la doble cadena de ADN. La ciclofosfamida sobresale de los agentes quelantes en virtud de que su efecto se reserva a las células madre hematopoyéticas y tiene toxicidad extramedular limitada ⁽⁴⁶⁾.

La combinación resultante de VAC es altamente tóxica y los efectos secundarios derivan en mielosupresión, además de anemia, trombocitopenia, leucemia mielógena aguda, diarrea, leucopenia de grado 3 y 4, neutropenia de grado 3 y 4, neurotoxicidad, disfunción cardíaca ventricular, alopecia, cistitis hemorrágica, fibrosis pulmonar intersticial, hepatitis tóxica, mucositis oral, proctitis, glositis y queilitis ⁽⁴⁷⁻⁵⁰⁾.

Con la utilización de terapias multimodales, más del 75% de los pacientes con la enfermedad localizada pueden curarse ⁽⁵¹⁾. Sin embargo, a pesar de la disponibilidad de nuevos agentes y la intensificación del tratamiento, los pacientes con RMS recurrente o metastásico experimentan tasas de supervivencia bajas a 5 años ⁽⁵²⁾.

CAPÍTULO 2.

COMPUESTOS DE COORDINACIÓN

Un complejo o compuesto de coordinación es una especie química (neutra o iónica) constituida por un átomo central (generalmente un metal) unido a una serie de ligandos. ⁽⁵³⁾ Los metales más comunes son los de transición como el Fe, Cu, Ni, Pt, Zn, Cd, Hg, entre otros. Los ligandos poseen átomos con pares de electrones libres, tales como H₂O, NH₃, CN⁻, CO, Cl⁻ y etilendiamina. El enlace entre el átomo central y los ligandos es un enlace covalente coordinado donde el ligando aporta el par de electrones del enlace y el metal aporta orbitales vacíos de baja energía donde pueden alojarse los pares de electrones de los ligandos.

Algunos iones metálicos pueden interactuar con ciertas proteínas modificando su estructura y ocupando posiciones específicas en las metaloenzimas. Los cationes metálicos esenciales establecen enlaces e interacciones con proteínas y ácidos nucleicos. Existen varios ligandos orgánicos que han demostrado su utilidad para fines terapéuticos como pirazol, acetyl-acetonato, imidazol, fenantrolina entre otros. Los derivados de fenantrolina se han reportado como compuestos bioactivos potenciales por su capacidad de unión al ADN ⁽⁵⁴⁾. Los compuestos de coordinación presentan actividad antimicrobiana, antitumoral y anti-inflamatoria ⁽⁵⁵⁾.

Las CASIOPEÍNAS[®] son un ejemplo de compuestos de coordinación que contienen como centro a metales de la primera serie de transición (Mn, Fe, Co, Ni, Cu y Zn) y quelatos diiminas (NN) con quelatos aminoácidos o donadores (OO) con fórmula general [Cu(N-N)(N-O)]NO₃. Algunas de estas CASIOPEÍNAS[®] han probado

su efecto sobre células tumorales resistentes a cisplatino.⁽⁵⁶⁻⁵⁸⁾ Asimismo han mostrado actividad citotóxica y antineoplásica *in vitro* e *in vivo* al inducir apoptosis mediante la generación de especies reactivas de oxígeno, a través del factor transcripcional AP-1 que es un regulador de genes que codifican citocinas, receptores de citocinas y moléculas de adhesión, e inducen respuestas inflamatorias e inmunológicas^(59, 60).

2.1 COMPUESTO bis(acetylacetonato-*kO,O*)(1,10-phenanthroline-*k N,N'*)Zn(II)

El zinc es un metal esencial para los humanos dado que participa en el funcionamiento de numerosas enzimas que intervienen en la síntesis y metabolismo de proteínas y ácidos nucleicos,⁽⁶¹⁾ contribuye al adecuado funcionamiento del sistema inmunitario ⁽⁶²⁾ y cicatrización de las heridas, interviene en las percepciones del gusto y el olfato y en procesos enzimáticos antioxidantes (superóxido dismutasa -SOD-). Asimismo se ha reportado su participación en el desarrollo y progresión del cáncer. ⁽⁶³⁻⁶⁵⁾ Se ha estudiado la participación del zinc en diversos mecanismos de señalización involucrados en la carcinogénesis ⁽⁶⁶⁻⁶⁸⁾. Los niveles intracelulares de zinc pueden modular las vías de señalización MAPK, ERK, PKC y NFκB ⁽⁶⁷⁻⁷⁰⁾. El zinc libre puede estabilizar el factor 1 inducible por hipoxia (HIF-1) e influir en procesos como la glucólisis, la apoptosis y la angiogénesis ⁽⁶³⁾. Además, el zinc libre inhibe la tioredoxina reductasa, un mediador clave en la respuesta celular al estrés oxidativo que con frecuencia incrementa su expresión en el cáncer ⁽⁷¹⁾.

ZinCris es un compuesto de coordinación de zinc, cuya estructura química es bis(acetylacetonato-k2O,O')(1,10-phenanthroline-k2 N,N')Zn(II). Este compuesto de coordinación se compone principalmente de zinc y fenantrolina. En un estudio *in vitro* se determinó la citotoxicidad de este complejo ⁽⁵⁴⁾ y se observó en líneas celulares cancerosas de glándula salival, faringe, lengua, RMS, glioma, mama y pulmón que tras un tratamiento de 24 horas se inhibió significativamente la proliferación celular ⁽⁵⁴⁾. Las líneas celulares de adenocarcinoma de glándula salival y glioma tuvieron una reducción del 80%, seguido de las células cancerosas de faringe, RMS (casi 70%) y lengua (51%) ⁽⁵⁴⁾ (**Figuras 2 y 3**). Lo anterior muestra que este mismo fármaco tiene efectos citotóxicos diferentes dependiendo del tipo celular y se evidenció que el complejo de zinc induce muerte celular por una vía apoptótica ⁽⁵⁴⁾.

Línea celular	IC50 (CL95) (µmol/ml)
A253 (adenocarcinoma de glándula salival)	0.240 (0.211–0.245)
FADU (carcinoma de células escamosas faríngeo)	0.250 (0.234–0.273)
RH-30 (RMS embrionario)	0.277 (0.179–0.408)
CAL27 (carcinoma de células escamosas de lengua)	0.338 (0.290–0.581)
RD (RMS alveolar)	0.154 (0.124–0.179)
U-373 (glioblastoma humano)	0.230 (0.183–0.258)

Fig. 2. Efecto inhibitorio del crecimiento celular del fármaco ZnCris en líneas celulares de carcinoma, sarcoma y glioblastoma tras 24h de tratamiento. Fuente: Trejo-Solís et al. 2018. ⁽⁵⁴⁾

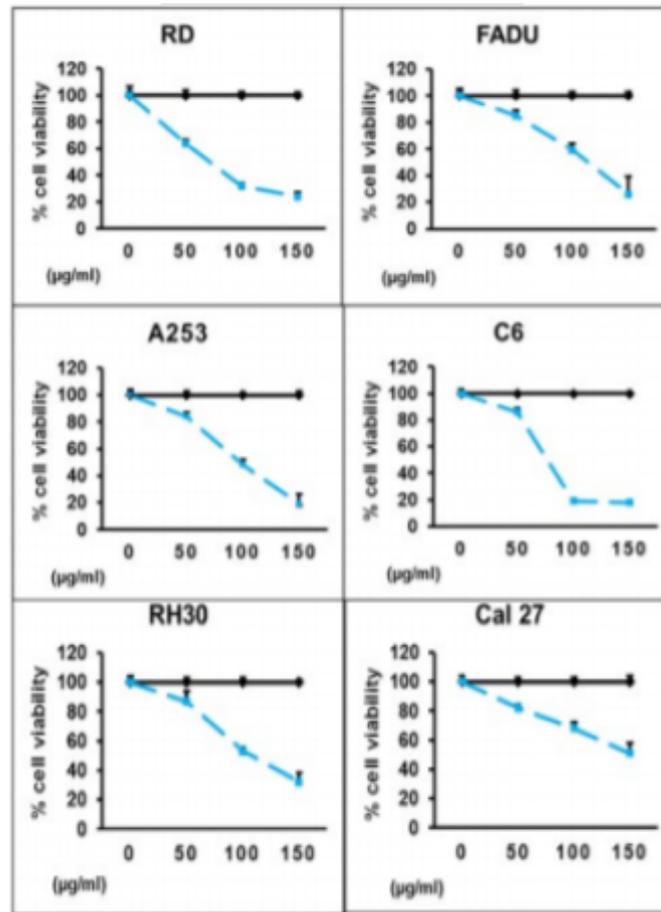


Figura 3. Efecto del complejo ZnCris sobre la viabilidad celular después de 24h de tratamiento. Las células se incubaron con 50, 100 y 150 µg/ml del complejo de Zn. Las líneas azules indican la viabilidad celular para ZnCris y las negras corresponden al efecto del ácido acético (1% v/v) utilizado como disolvente para el complejo. Fuente: Trejo-Solís et al. 2018.⁽⁵⁴⁾

CAPÍTULO 3

MIGRACIÓN Y CÁNCER

Durante la transformación neoplásica, las células cancerosas adquieren numerosas aberraciones que les permiten mantener el control de su proliferación mediante la inactivación de supresores tumorales, la entrada constante al ciclo celular y la evasión de la muerte, además de la angiogénesis, la invasión y la metástasis. ⁽⁷²⁾

La metástasis ocurre cuando las células cancerosas se desprenden del tumor primario, viajan por el torrente sanguíneo o linfático invadiendo tejidos normales anatómicamente distantes, formando así un tumor secundario generalmente con las mismas características del tumor primario, aunque puede presentar nuevas aberraciones genéticas que lo tornan más agresivo y potencialmente más resistente a los tratamientos.

No todas las células cancerosas pueden hacer metástasis, ya que ésta última para ser exitosa depende tanto de las propiedades intrínsecas de las células tumorales como de los factores derivados del microambiente tumoral^(73,74) La metástasis consta de cinco pasos que colectivamente se denomina como “cascada metastásica”⁽⁷⁵⁾ (**Figura 4**).

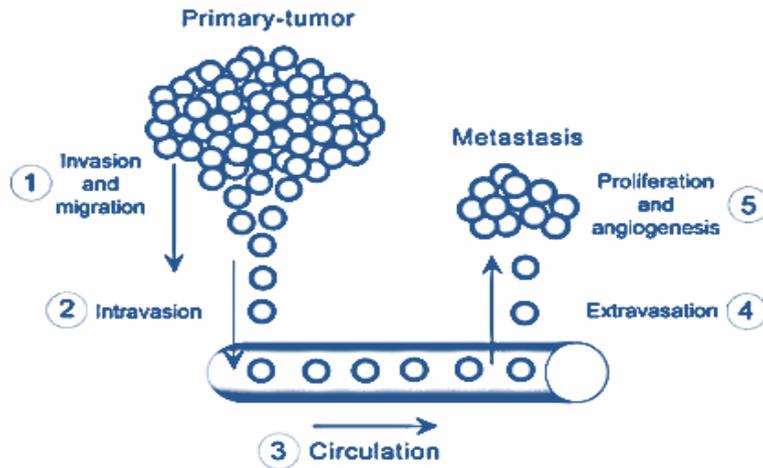


Figura 4. Pasos de la cascada metastásica. 1) Invasión y migración: las células cancerosas dejan el tumor primario para invadir tejidos sanos; 2) Intravasación: entrada de las células cancerosas a los vasos sanguíneos y linfáticos; 3) Circulación: la célula viaja a través de la sangre y sortea los diferentes componentes humorales y celulares de ésta, tales como la alta concentración de oxígeno y los linfocitos Tc; 4) Extravasación: las células atraviesan el endotelio; 5) Colonización, proliferación y angiogénesis: la célula neoplásica se asienta en un nuevo sitio y constituye un tumor secundario. Fuente original: Leber & Efferth, 2009. ⁽⁷⁵⁾

Para invadir el estroma, las células deben romper la membrana basal mediante la ruptura de múltiples uniones intercelulares y así llegar a la matriz extracelular (MEC), formada por proteoglicanos y glicosaminoglicanos, colágeno y elastina, fibronectina y laminina. Existen una serie de señales enviadas desde las células cancerosas a las células basales, que activan a las uniones intercelulares mediadas por integrinas, produciendo alteraciones en la polaridad de la célula, proliferación, invasión y supervivencia. ⁽⁷⁶⁾ La matriz extracelular (MEC) para su remodelación requiere de una familia de endopeptidasas denominadas metaloproteasas de la matriz extracelular (MMPs), las cuales requieren zinc como cofactor enzimático. Estas MPPs se dedican a degradar proteínas del medio

extracelular y, activar factores de crecimiento, receptores de superficie y moléculas de adhesión. ⁽⁷⁷⁾

Las MMP-2 y MMP-9 tienen actividad proteolítica, pueden escindir proteínas de unión a IGF, activar TGF- β , degradar la colágena tipo IV y perlecan, liberar VEGF y bFGF, respectivamente. Su expresión excesiva se ha relacionado con la transición epitelio mesénquima (EMT) y migración celular, liberación de TGF- β activo con efectos para degradar barreras físicas, inducir proliferación y regular positivamente de la angiogénesis; además se ha relacionado con supresión de la reacción de los linfocitos T contra las células cancerosas. ⁽⁷⁸⁾ **(Figura 5).**

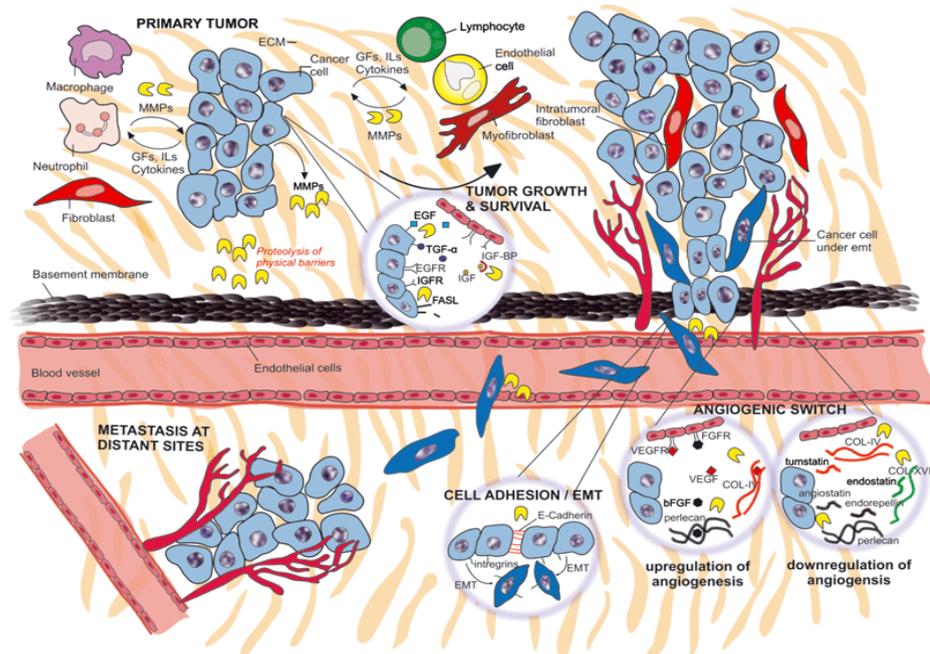


Figura 5. Funciones fundamentales de las MMP en la progresión del cáncer. La progresión tumoral incluye además del crecimiento, los procesos de invasión, metástasis y angiogénesis, los cuales pueden ser modulados por las MMPs. La expresión de MMPs en el microambiente tumoral depende de las células cancerosas y de las células del estroma vecinas. El crecimiento tumoral y la angiogénesis también dependen de la mayor disponibilidad de moléculas de señalización, como factores de crecimiento y citosinas. Esto puede facilitarse a través de las MMPs ya que a través de su actividad proteolítica de la MEC o de superficies celulares, puede liberar IGF, bFGF, VEGF, EGF, TGF- α y HB-EGF. Las MMPs también modulan las interacciones célula-célula y célula-MEC mediante las interacciones de la E-cadherina e integrinas, respectivamente, lo que afecta el fenotipo celular favoreciendo la migración celular. Fuente: Gialeli et al., 2011. ⁽⁷⁸⁾

CAPÍTULO 4.

ESTRÉS OXIDATIVO Y CÁNCER

El estrés oxidativo representa el desbalance entre la producción de radicales libres y la habilidad para neutralizar esas moléculas oxidantes. La alta acumulación de ROS y/o el bajo nivel de antioxidantes en las células provocan un desequilibrio en el estado redox.⁽⁷⁹⁾ Los radicales libres son generalmente especies reactivas de oxígeno (ROS) y especies reactivas de nitrógeno (RNS) capaces de existir de forma independiente.⁽⁸⁰⁾

La producción de ROS es un proceso normal en todas las células, las cuales son capaces de activar vías de señalización esenciales para la viabilidad celular,⁽⁸¹⁾ así como señales productoras de citocinas mediante el factor transcripcional NF-κB.⁽⁸²⁾

El exceso de ROS provoca daños en las proteínas, lípidos, carbohidratos, ADN y ARN, lo que puede generar alteraciones genéticas en las células. Por otro lado, niveles bajos y constantes de ROS son esenciales para diversas funciones biológicas, incluida la supervivencia celular, el crecimiento celular, la proliferación, la diferenciación y la respuesta inmune, así como para el desarrollo del envejecimiento y de enfermedades inflamatorias, metabólica y neoplásicas, entre otras.^(80, 83)

Las células cancerosas generan ROS elevadas debido a su mayor actividad metabólica, estimulación oncogénica y disfunción mitocondrial⁽⁸⁴⁾. Las células cancerosas incrementan su tasa metabólica, lo que genera la sobreproducción de ROS. Al mismo tiempo, tienen una marcada capacidad antioxidante que ayuda a

mantener el equilibrio redox. Recientemente, se ha prestado una gran atención a las terapias contra el cáncer que inducen estrés oxidativo aumentando las ROS y/o inhibiendo el nivel de antioxidantes.⁽⁸⁵⁾

Dos fuentes principales de ROS en el cáncer son las mitocondrias y las oxidasas de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH). En general, se cree que los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial son responsables de generar ROS, O_2^- y H_2O_2 , entre otros.⁽⁸⁶⁾ La mitocondria, establece interconexiones de señalización con otros organelos como el retículo endoplásmico (RE), aparato de Golgi, lisosomas, melanosomas y peroxisomas. Estos organelos están involucrados en múltiples funciones celulares como el tráfico de lípidos, la dinámica mitocondrial, el flujo de calcio y el estrés en el RE.⁽⁸⁷⁾ **(Figura 6).**

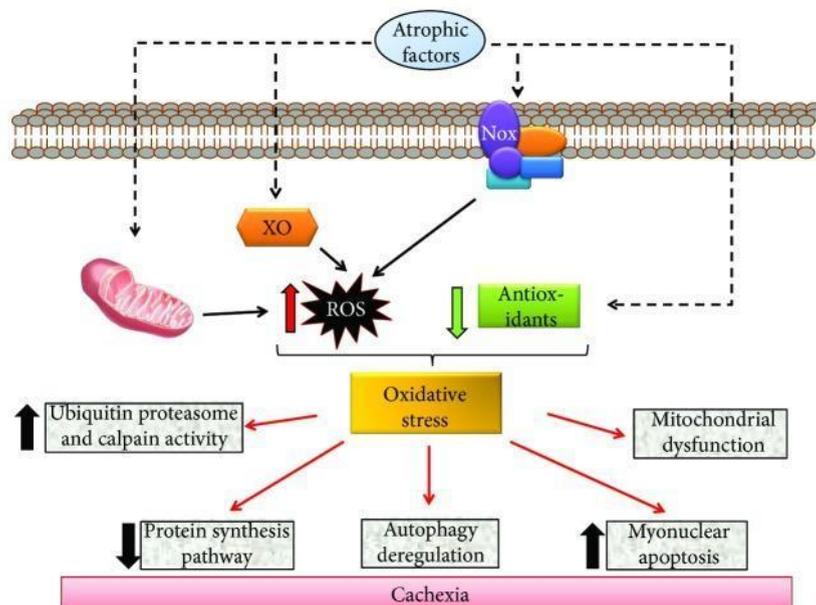


Figura 6. Factores que promueven el estrés oxidativo y su efecto en el funcionamiento de las células musculares. Fuente: Ábrigo et al., 2018.⁽⁸¹⁾

4.1 Mecanismos antioxidantes

Existen diferentes mecanismos antioxidantes no enzimáticos como glutatión (GSH), tiorredoxina (Trx) y melatonina y, mecanismos enzimáticos antioxidantes que involucran enzimas como la superóxido dismutasa (SOD), la glutatión peroxidasa (GPX), la glutatión reductasa (GR), la catalasa (CAT) y la hemoxygenasa (HO) .⁽⁸⁸⁾

⁸⁹⁾ SOD tiene tres isoformas: SOD1 se localiza en el citoplasma; SOD2 se encuentra en la mitocondria y, SOD3 se localiza en la matriz extracelular. Esta enzima es una enzima antioxidante específica para el radical $O_2^{\cdot -}$ y, cataliza la disminución de $O_2^{\cdot -}$ hacia H_2O_2) ⁽⁸⁹⁾ La catalasa está presente en el citoplasma y la mitocondria⁽⁹⁰⁾ y cataliza la conversión de H_2O_2 a H_2O y O_2 ⁽⁹¹⁾ La actividad enzimática de la catalasa es muy elevada en el músculo esquelético sobre todo en las fibras glicolíticas rápidas⁽⁹²⁾ La enzima GPx tiene gran afinidad hacia el radical H_2O_2 , más que la catalasa ⁽⁸⁹⁾ Hay cinco isoformas de la GPx en mamíferos con diferente localización celular y distintos sustratos. La GPx1 se localiza principalmente en el citosol y en la matriz mitocondrial. La GPx3 está presente en el espacio extracelular ⁽⁹³⁾ La GPx4 es una enzima asociada a la membrana que se localiza parcialmente en el espacio intermembranal de la mitocondria. La disminución en los niveles de antioxidantes en respuesta a enfermedades puede llevar a un desbalance en el estado redox celular generando estrés oxidativo ^(94, 95) **(Figura 7)**.

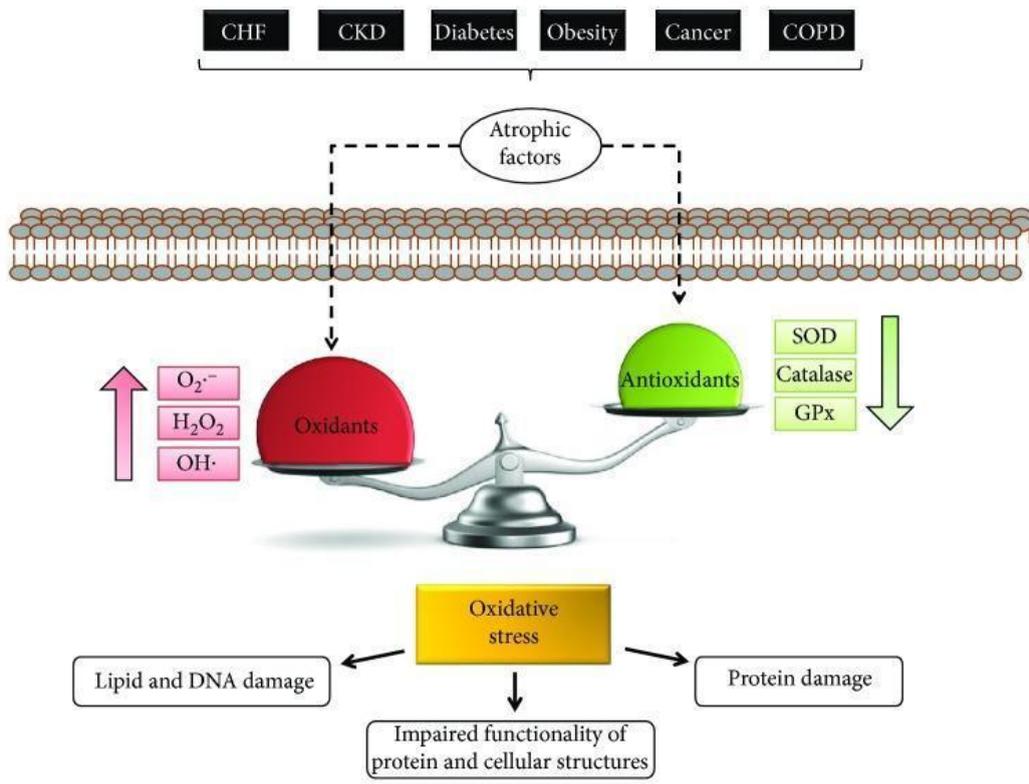


Figura 7. Mecanismos antioxidantes. Fuente: Ábrigo et al., 2018. ⁽⁸¹⁾

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El cáncer infantil representa la principal causa de muerte por enfermedad entre los 5 y 14 años de edad. La mitad de los infantes que comienzan un tratamiento se cura en 5 años. El 65% de los casos se diagnostican en etapas avanzadas de la enfermedad. El rhabdomioma (RMS) es una de las diez entidades malignas más comunes durante la infancia y adolescencia. Representa aproximadamente el 3.5% de las malignidades en niños de 0 a 14 años, y 2% entre adolescentes de 15 a 19 años. La incidencia es de 4.5/millón de niños y la edad media del diagnóstico es de 5 años. En México se estima una prevalencia de 0.1% (en niños menores de 15 años es de 1/244,000).

El RMS se puede desarrollar en cualquier parte del cuerpo, incluso en lugares donde normalmente no hay tejido muscular estriado y, tiene un riesgo alto de recurrencia, extensión local a ganglios linfáticos y metástasis. La presencia frecuente de deleciones y translocaciones favorece la metástasis y la resistencia a los fármacos, reduciendo considerablemente la supervivencia. El tratamiento del RMS se efectúa con una combinación de quimioterapia, radioterapia y cirugía. Debido a los efectos deletéreos del uso de medicamentos se ha intensificado la búsqueda de nuevas terapias más efectivas y menos agresivas para el organismo afectado.

III. JUSTIFICACIÓN

El reciente uso de blancos subcelulares en las células cancerosas ha llevado al desarrollo de drogas dirigidas hacia diversos componentes de las vías de transducción que controlan el ciclo celular, apoptosis, angiogénesis e invasión. El compuesto $\text{bis}(\text{acetylacetonato-}k_2O,O')(1,10\text{-phenanthroline-}k_2\text{ N,N'})\text{Zn(II)}$ conocido como ZnCris -sintetizado en México-, forma parte de los compuestos de coordinación que contienen como centro a metales de la primera serie de transición. Se han reportado previamente las cualidades anti-proliferativas y pro-apoptósicas de ZnCris en diversas líneas celulares de carcinoma, sarcoma y tumores cerebrales. Asimismo, se ha encontrado que a diferentes dosis del fármaco en líneas celulares normales (fibroblastos, células renales, mioblastos), éste no muestra efectos deletéreos significativos. Se reportó recientemente que este compuesto de zinc afecta la proliferación celular e induce muerte celular por apoptosis en dos tipos de rhabdomiosarcomas *in vitro*. Aunque se conoce que los compuestos de coordinación ejercen un efecto importante a través de la generación de especies reactivas de oxígeno, esto aún no ha sido reportado en el fármaco ZnCris, ni se ha documentado si esto puede tener efecto sobre la migración celular.

IV. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto anti-migratorio del compuesto bis(acetilacetato-k² O,O')(1,10-phenantrolina-k² N,N')Zn(II) en rhabdomyosarcomas (RD y RH30) *in vitro* y la acción pro-oxidante del mismo.

V. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar el efecto anti-migratorio del compuesto bis(acetilacetato-k² O,O')(1,10-phenantrolina-k² N,N')Zn(II) sobre las líneas celulares RD y RH30 mediante el ensayo de cierre de herida.
- Determinar los cambios en la expresión de las metaloproteasas MMP2 y MMP9 con el compuesto bis(acetilacetato-k² O,O')(1,10-phenantrolina-k² N,N')Zn(II) sobre las líneas celulares RD y RH30 mediante zimograma.
- Demostrar el efecto pro-oxidativo del compuesto bis(acetilacetato-k² O,O')(1,10-phenantrolina-k² N,N')Zn(II) sobre las líneas celulares RD y RH30 mediante el tratamiento con y sin el precursor de glutatión N-acetil cisteína.

VI. HIPÓTESIS

Si el compuesto de coordinación bis(acetilacetato-k² O,O')(1,10-phenantrolina-k² N,N')Zn(II) muestra un efecto antineoplásico sobre las líneas celulares RD y RH30, se observará disminución en la migración a las distintas dosis del fármaco en cultivos celulares en monocapa.

VII. MATERIALES Y MÉTODO

Tipo de estudio: Experimental.

7.1 Cultivo y expansión de células.

Se utilizaron las líneas celulares RD y RH30 (ATCC™) que corresponden a los RMS subtipo embrionario y alveolar. Las células se mantuvieron en medio de cultivo DMEM (Sigma Aldrich) suplementado con suero fetal bovino (ByProductos) al 10%, penicilina G (60 mg/L) y estreptomycin (100 mg/L), en un gabinete de bioseguridad Fisher (37°C, 5% CO₂ y 95% de O₂).

7.2 Tratamientos.

Se formaron grupos de cultivos tratados con 0, 50, 75 y 100 µg/ml equivalente a 0, 0.112, 0.168 y 0.225 µmol/ml, respectivamente del fármaco bis(acetilacetato-k² O,O')(1,10-phenantrolina-k² N,N')Zn(II) disuelto en ácido acético al 0.1% y medio DMEM ⁽⁵⁴⁾. Paralelamente se formaron grupos de tratamiento con las mismas dosis mencionadas del fármaco y se adicionó el atrapador de especies reactivas de oxígeno N-acetilcisteína (10 mM) al inicio de cada experimento. Las condiciones de incubación se mantuvieron como fue descrito previamente. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

7.3 Ensayo de cierre de herida.

Las células RD y RH30 se sembraron en placas de 6 pozos y se incubaron hasta llegar a la confluencia. Para realizar el ensayo de cierre de herida, las monocapas celulares se rasparon de forma lineal con puntas de pipeta de 200 μ L generando zonas desprovistas de células, mismas que se observaron en el microscopio. Después de colocar los diferentes tratamientos, se permitió a las células migrar al área desnuda y se tomaron fotografías a las 0 y 24 horas en los grupos con y sin tratamientos. Las imágenes se capturaron con el objetivo 20x. La distancia entre los dos bordes de un área desnuda se cuantificó por triplicado mediante el programa Image J (NIH).

7.4 Zimograma.

Se determinó la actividad de las MMP2 y MMP9 en las células RD y RH30 tratadas con el fármaco y, con el fármaco más el antioxidante NAC. Las condiciones experimentales se mantuvieron como fue descrito previamente (0, 50, 75 y 100 μ g/ml equivalente a 0, 0.112, 0.168 y 0.225 μ mol/ml) durante 24 horas. Posteriormente, el medio de cultivo se recuperó y se mezcló con buffer de muestra no reductor para ser corrido mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS al 10% (SDS/PAGE) en presencia de 1mg/ml de gelatina A y B correspondiente al sustrato de la MMP2 y 9, respectivamente. El gel resultante de la corrida se lavó en Tris 10mM (pH 8.0) que contenía Tritón X-100 al 2.5% y se incubó durante toda la noche en un buffer de desarrollo a 37°C. Finalmente el gel se tiñó con azul

Coomassie brillante y se decoloró hasta que la actividad gelatinasa fue identificable como bandas claras.

7.5 Análisis estadístico

Los resultados se presentan como medias \pm SD. Las diferencias entre grupos se evaluaron mediante un análisis de varianza de una vía y las correcciones se hicieron para comparaciones múltiples usando la prueba múltiple de Tukey. Las comparaciones entre dos grupos se realizaron utilizando la prueba t de Student. Se asumieron diferencias significativas con $P < 0.05$.

7.6 Equipo, material y reactivos.

Equipo:

- Campana de flujo laminar, Thermo Scientific 1300 series A2.
- Centrífuga clínica Z 100 A Labnet.
- Microcentrífuga refrigerada Select Bioproductos.
- Microscopio Invertido Optika 500.
- Microscopio de luz Zeiss.
- Medidor de pH y electrodo de Ph (ORION).
- Micropipetas de distintos calibres (1000, 200, 100, 20 y 10 μ L).
- Cámara de electroforesis y fuente de poder.

Material:

- Líneas celulares RD y RH30 (ATCC™)
- Placas de cultivo de 25 y 75 cm Corning^R.
- Tubos para centrífuga estériles de 15 ml.

- Microtubos de 1.5µl estériles.
- Pipetas de poliestireno estériles de 5 y 10 ml Corning^{MR}.

Reactivos:

- bis(acetilacetonato-k² O,O')(1,10-phenantrolina-k² N,N')Zn(II).
- Medio DMEM Sigma Aldrich.
- Suero fetal bovino (BY productos).
- Anfotericina B/estreptomicina (Sigma Aldrich).
- Tripsina-EDTA 0.25% (Sigma Aldrich).
- Bicarbonato de sodio (J.T. Baker).
- Cloruro de sodio (J.T. Baker).
- Buffers de pH (ORION).
- N-acetil cisteína (SIGMA-Aldrich).
- Agua desionizada MILLI-Q.
- Alcohol etílico 70% (J.T. Baker).
- Ácido acético (J.T. Baker).
- Anticuerpos: anti -MMP2 y -MMP9 (Santa Cruz).
- Poliacrilamida.
- SDS.
- Gelatinas A y B.
- Tris 10mM.
- Tritón X-100.
- Azul Coomassie brillante.

FINANCIAMIENTO

Investigación realizada gracias al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM IN-223720. Folio de beca 448421.

VII. RESULTADOS

1. El fármaco bis(acetilacetato- k^2 O,O')(1,10-phenantrolina- k^2 N,N')Zn(II) induce cambios sugestivo de daño y muerte en células RD y RH30 *in vitro*.

A las 24 horas de tratamiento con el fármaco bis(acetilacetato- k^2 O,O')(1,10-phenantrolina- k^2 N,N')Zn(II) a las dosis más altas indujo cambios morfológicos sugestivos de daño celular en las células RD y RH30, tales como reducción en el volumen celular (células picnóticas) e inhibición del contacto entre ellas con el consecuente desprendimiento de las mismas.

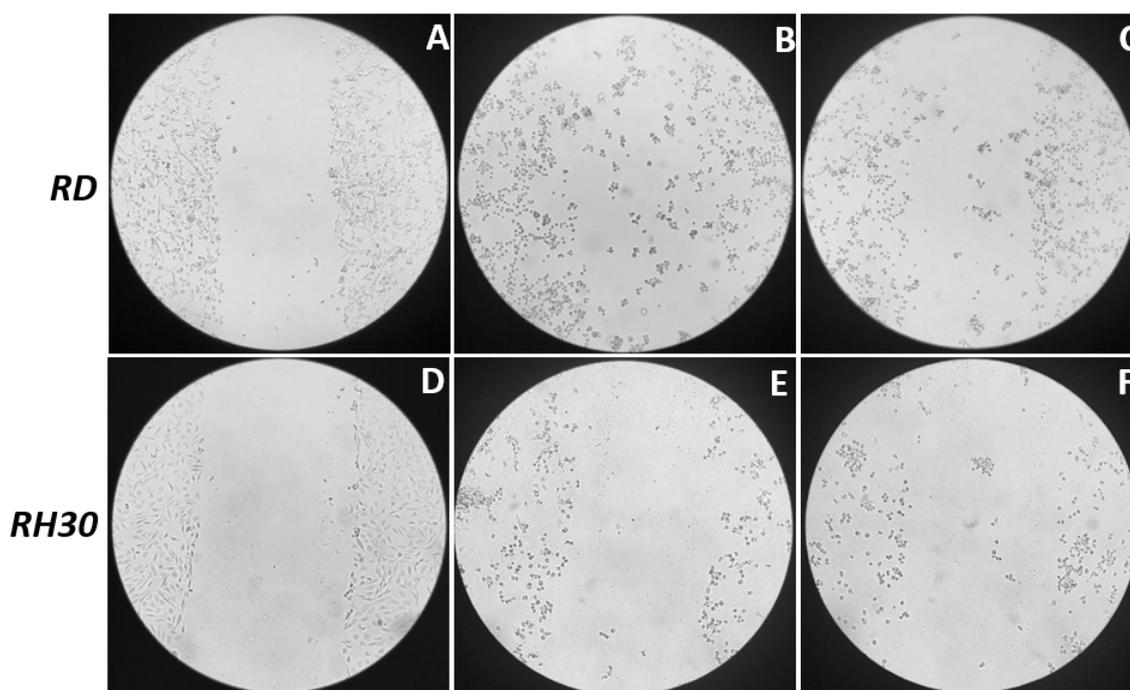


Figura 8. Ensayo de cierre de herida. Fotografías tomadas en tiempo 0h y 24h. Nótese la morfología estrellada (células RD) (A) o fusiforme (células RH30) (D) al inicio de los experimentos (0h) y, el efecto del fármaco ZnCris a las 24h a las dosis de 75 µg/ml (0.168 µmol/ml) (B y E) y 100 µg/ml (0.225 µmol/ml) (C y F). Las células tratadas a las dosis más altas se observan redondas y con un volumen marcadamente reducido, además de la pérdida de contacto entre ellas. La presencia de células desprendidas fue un resultado común encontrado a las dosis más altas.

2. El fármaco bis(acetilacetonato-k² O,O')(1,10-phenantrolina-k² N,N')Zn(II) afecta la migración celular de rabdiosarcomas *in vitro*.

Para determinar el efecto sobre la migración celular, se empleó el ensayo de cierre de herida. Se observó que el fármaco tuvo efecto a partir de la dosis más baja (50µg/ml; 0.112µmol/ml) en ambas líneas celulares. A las dosis de 75µg/ml (0.168 µmol/ml) y 100µg/ml (0.225 µmol/ml) fue evidente el desprendimiento de células que flotaban en el medio de cultivo (**Figuras 9 y 10**). En la Figura 9 se les puede observar en el espacio correspondiente a la herida.

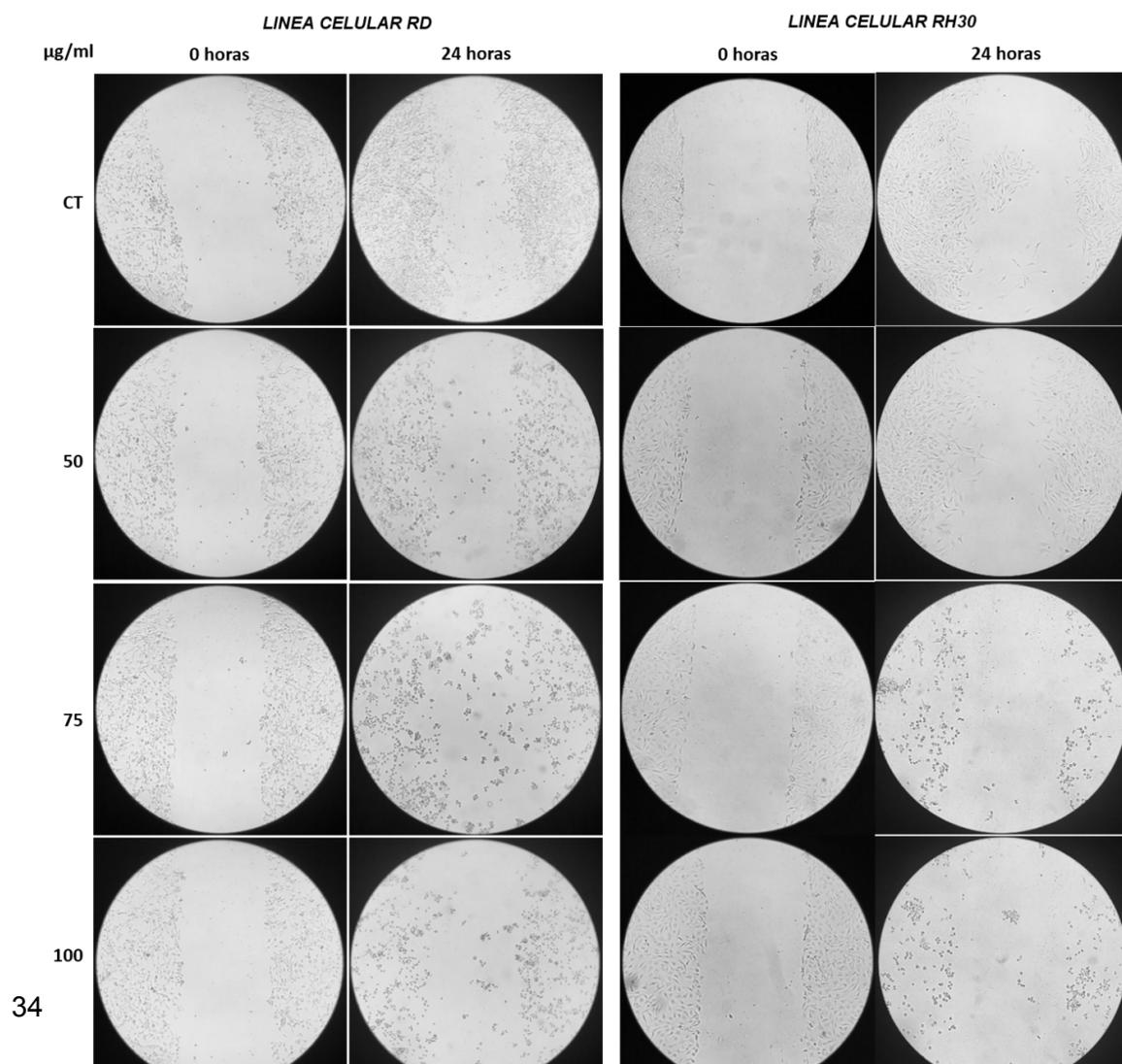


Figura 9. Ensayo de cierre de herida. Fotografías tomadas en tiempo 0h y 24h. Se observa daño celular, desprendimiento de células, sin migración hacia la herida desde la dosis de 50µg/ml del fármaco ZnCris (RD) y, efecto en la migración más notable a partir de la dosis de 75µg/ml (RH30).

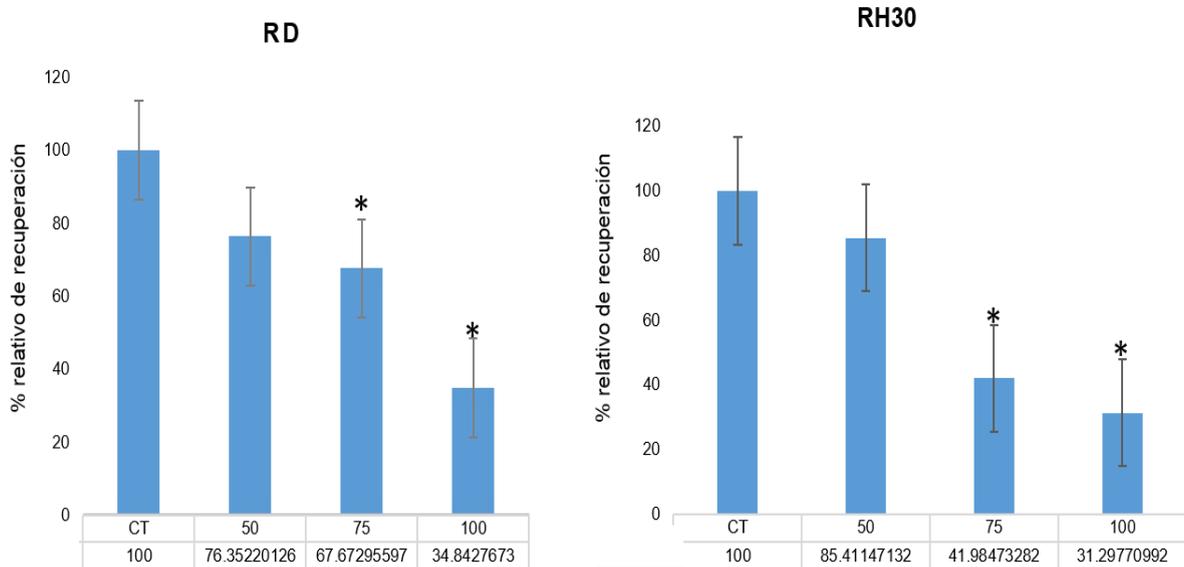


Figura 10. Representación gráfica del porcentaje de reducción de la herida. En las líneas celulares RD y RH30 se observó una reducción significativa de la recuperación de la herida en los grupos de 75µg/ml y 100µg/ml, lo que coincide con los cambios morfológicos y desprendimiento de células. Las células RH30 mostraron una reducción más significativa en la dosis de mostraron efecto en la migración más notable a la dosis de 75µg/ml, comparado con la línea celular RD. Todos los experimentos se realizaron por triplicado. Los histogramas muestran media ± SD. *P≤0.05.

3. Efecto pro-oxidativo del fármaco bis(acetilacetonato-k² O,O')(1,10-phenantrolina-k² N,N')Zn(II) determinado mediante el antioxidante NAC.

El antioxidante N-acetilcisteína (10mM) se aplicó a los cultivos de células RD y RH30 crecidas en monocapa y tratadas con las dosis de 50µg/ml (0.112µmol/ml), 75µg/ml (0.168 µmol/ml) y 100µg/ml (0.225 µmol/ml). Se observó el efecto protector del daño celular a partir del antioxidante, dado que las células conservaron su morfología y no hubo desprendimiento de células, conservando el contacto entre ellas.

No obstante, en la línea celular RD, a las dosis de 75µg/ml (0.168 µmol/ml) y 100µg/ml (0.225 µmol/ml) se aprecia una menor reducción de la amplitud de la herida, respecto al grupo control (sin tratamiento) y el grupo de 50µg/ml (0.112µmol/ml).

La línea celular RH30 muestra componentes con morfología conservada, aunque las células no llenan el espacio de la herida desde la dosis más baja (**Figura 11**). Si se compara el efecto a esta misma dosis sin la NAC (**Figura 9**) y en presencia de ésta, puede notarse cómo el antioxidante protege del daño evitando la muerte de las células, pero no favorece la actividad migratoria de éstas a dosis más altas. Estos resultados permiten sugerir el efecto pro-oxidante del fármaco bis(acetilacetonato-k² O,O')(1,10-phenantrolina-k² N,N')Zn(II), toda vez que la presencia de NAC rescata a las células del daño y muerte celular.

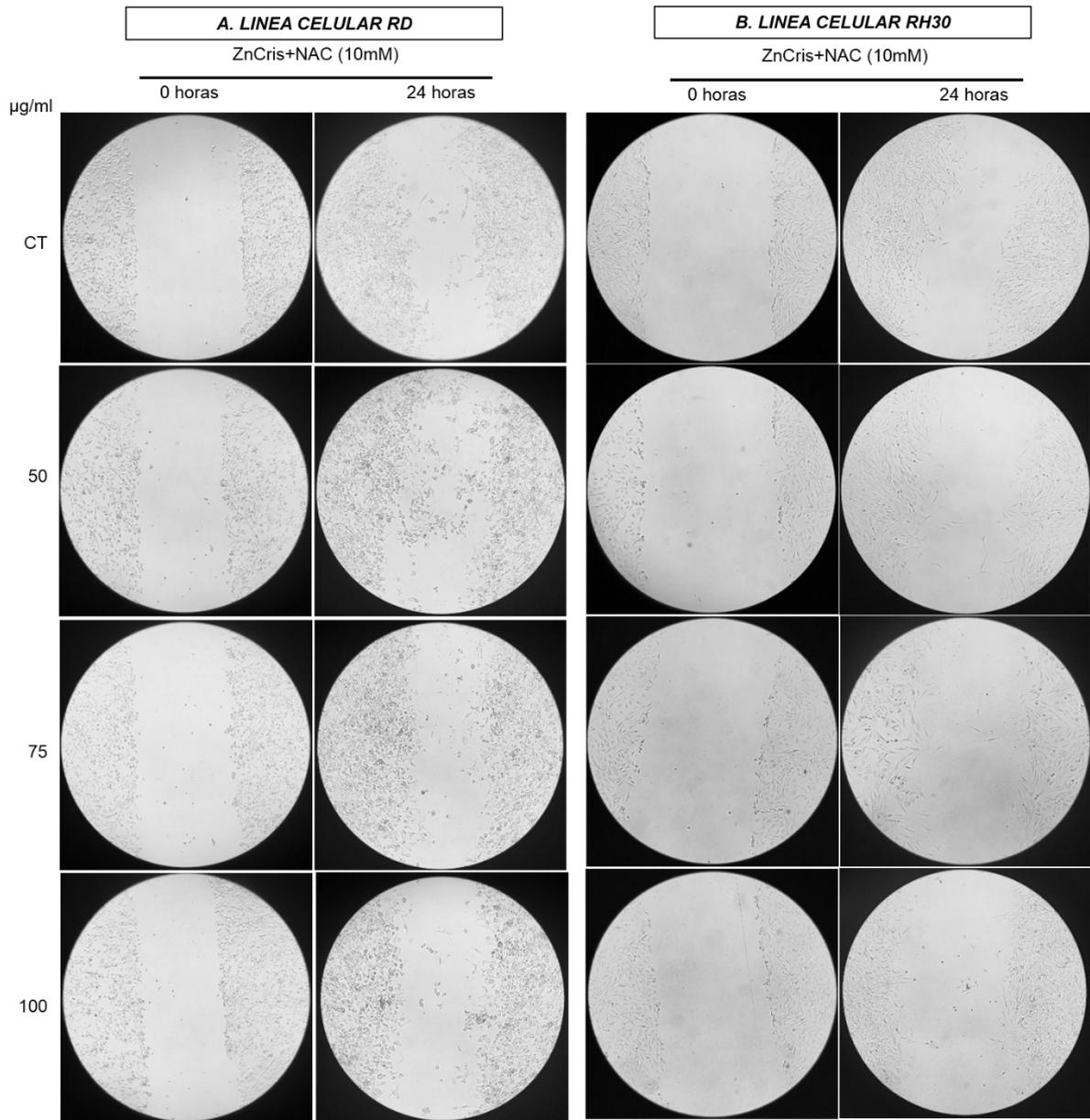


Figura 11. Ensayo de cierre de herida. Fotografías tomadas en tiempo 0h y 24h en células tratadas con el fármaco ZnCris + NAC. Este último generó un efecto protector a las células RD y RH30 tratadas con el fármaco ZnCris, lo que pudo evidenciarse a partir de las características morfológicas conservadas de las células a las diferentes dosis del fármaco, además de la presencia de células en el espacio de la herida.

4. Efecto del antioxidante NAC en la actividad de las MMP2 y MMP9 en células RD y RH30 tratadas con el fármaco bis(acetilacetonato-k² O,O')(1,10-phenantrolina-k² N,N')Zn(II).

Como efecto derivado del papel protector del antioxidante N-acetilcisteína en células tratadas con ZnCris, observamos que la actividad de las enzimas MMP2 y MMP9 incrementó de forma importante. Como puede apreciarse en la **Figura 12**, la actividad gelatinasa MMP2 y MMP9 no mostró afectación significativa en presencia del fármaco en las líneas celulares estudiadas. Sin embargo, la actividad gelatinasa de ambas MMPs sí mostró cambios cuando el antioxidante NAC fue administrado.

En las células RD se aprecia que sin NAC hay mayor MMP2 activa que inactiva, sin diferencias relevantes entre el grupo control y tratados. No obstante, en presencia de NAC se incrementan tanto la forma inactiva como la MMP2 activa. En las células RH30 hubo más pro-MMP2 que MMP2, sin ninguna diferencia relevante en presencia del fármaco. Sin embargo, con NAC baja la forma inactiva (pro-MMP2) y aumenta la forma activa, incluso en la dosis más alta de 100µg/ml (0.225 µmol/ml).

La pro-MMP9 y MMP9 no presentan cambios significativos en los grupos control y tratados sin NAC en las células RD. No obstante, la forma inactiva pro-MMP9 fue más baja en presencia del antioxidante, aumentando la forma activa MMP9, particularmente a la dosis de 100µg/ml (0.225 µmol/ml). Este incremento fue incluso mayor que el observado en el grupo control más NAC. Respecto a las células RH30, la MMP9 fue menos activa en las dosis de 75µg/ml (0.168 µmol/ml) y 100µg/ml (0.225 µmol/ml) sin el antioxidante. Con NAC, la pro-MMP9 incrementa en los grupos tratados, al igual que la forma activa MMP9 en el control y dosis de 50µg/ml (0.112µmol/ml). Aunque esta forma activa se redujo ligeramente a las dosis

de 75µg/ml (0.168 µmol/ml) y 100µg/ml (0.225 µmol/ml), esta MMP9 activa fue mayor que en los grupos tratados sin NAC.

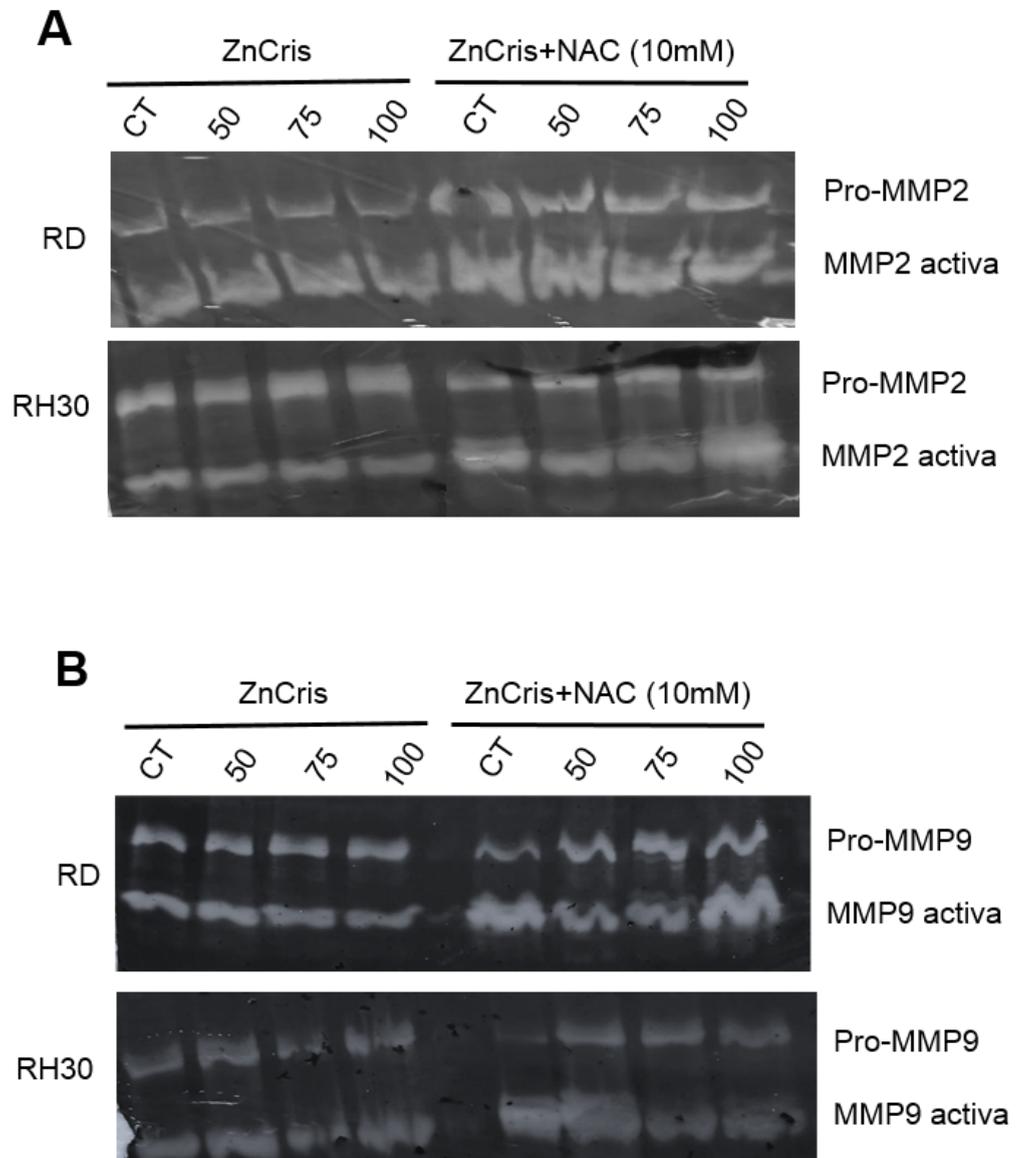


Figura 12. Zimograma de MMP2 y MMP9 en células RD y RH30 tratadas con el fármaco ZnCris y el antioxidante N-acetilcisteína. En **A** y **B** se aprecia el incremento de las formas activas de ambas MMPs en presencia de NAC.

VIII. DISCUSIÓN

El cáncer es una de las principales causas de muerte a nivel mundial por lo que se busca desarrollar nuevos tratamientos que eliminen o inhiban los procesos oncogénicos, sin generar tantos efectos secundarios o dañar el comportamiento natural de las células del cuerpo.

En un estudio previo se reportó que el fármaco bis(acetilacetato- k^2 O,O')(1,10-phenantrolina- k^2 N,N')Zn(II) o ZnCris produce células TUNEL positivas y fragmentos constantes de DNA sugestivos de muerte celular por apoptosis ⁽⁵⁴⁾. Como ha sido sugerido por otros fármacos, entre ellos los compuestos de coordinación, el posible mecanismo de daño irreversible e inductor de muerte celular podría estar relacionado con la generación de radicales libres. ⁽⁹⁶⁾

En este trabajo se planteó conocer si el fármaco ZnCris podría tener efectos sobre la capacidad de migración de las células, y si el efecto observado está asociado con la inducción de moléculas pro-oxidantes. Para tal fin, se seleccionó el antioxidante genérico N-acetilcisteína (NAC) que es una forma modificada del aminoácido alimenticio cisteína, el cual rompe puentes de disulfuro y es utilizado como agente mucolítico. NAC puede reaccionar con la mayoría de los oxidantes radicales y no radicales típicos y, es un precursor para la síntesis de glutatión reducido, el cual tiene efecto antioxidante y antiinflamatorio, además de regular la respuesta inflamatoria e inmune a varios niveles, ^(97, 98) Los antioxidantes pueden proteger a las células cancerosas de la muerte inducida por estrés oxidativo, lo que acelera la progresión neoplásica. Entonces, el papel de las ROS para mantener el

equilibrio redox en la célula cancerosa puede influir en el mantenimiento de la expansión clonal en lugar de una mayor muerte celular. ⁽⁹⁹⁾ Los ROS celulares se generan en diferentes organelos como mitocondria, retículo endoplásmico y sarcolema. Asimismo, la principal enzima involucrada en la generación de ROS bajo condiciones fisiológicas y patológicas son la NADPH oxidasa y xantina oxidasa (XO) ⁽⁸¹⁾

Las células musculares esqueléticas tienen un metabolismo energético único debido a su capacidad aeróbica y adaptación rápida a la anaerobiosis a corto plazo. ⁽⁸⁴⁾ El H_2O_2 puede generar radicales $OH\cdot$ en presencia de iones de hierro libres u otros metales de transición, proceso conocido como reacción de Fenton. El $OH\cdot$ reacciona inmediatamente con cualquier biomolécula resultando en más efectos deletéreos asociados con el estrés oxidativo. En este sentido, el músculo esquelético contiene de 10–15% del hierro total corporal –principalmente en la mioglobina y mitocondria-, volviéndolo especialmente sensible al estrés oxidativo. ⁽¹⁰⁰⁾ Como resultado de sus propiedades metabólicas únicas, las células musculares tienen un sistema de defensa antioxidante robusto para proteger el ADN, los lípidos y las proteínas de los efectos nocivos del exceso de ROS. ⁽⁸⁴⁾ El papel de las ROS en el músculo parece contradictorio dado que los ROS pueden actuar como moléculas de señalización en procesos normales como la regeneración y la reparación ⁽¹⁰¹⁾ y promover la biogénesis mitocondrial durante el ejercicio, ⁽¹⁰²⁾ pero los niveles locales sostenidos de ROS pueden causar daño por estrés oxidativo ⁽¹⁰³⁾ Aproximadamente el 1–3% del oxígeno total utilizado por la mitocondria es incompletamente reducido y se mantiene como ROS ⁽¹⁰⁴⁾

En el presente estudio se demostró que el fármaco ZnCris puede generar daño en células de rhabdiosarcoma *in vitro* mediante un mecanismo relacionado con la generación de ROS. Este efecto pudo ser revertido mediante la administración del antioxidante N-acetilcisteína. El retorno de las células cancerosas hacia el equilibrio fue evidenciado mediante el mantenimiento de la morfología celular, de la adhesión al sustrato y del contacto célula-célula, además del mantenimiento de su capacidad migratoria. En esto último destacan los cambios observados en la actividad de las enzimas MMP2 y MMP9. La agresividad de las células tumorales depende de su capacidad para degradar y remodelar la matriz extracelular debido a la capacidad para activar proteasas como el activador del plasminógeno y las MMPs ^(105, 106) Las enzimas MMP2 y MMP9 tienen una participación relevante como remodeladoras extracelulares, en especial en las células tumorales ⁽¹⁰⁷⁾. Las MMPs están estrechamente reguladas por inhibidores endógenos como las TIMPs, citocinas y factores de crecimiento ⁽¹⁰⁸⁾. En el presente estudio fue muy interesante encontrar que la MMP9 estaba particularmente activa en células tratadas con el fármaco ZnCris más NAC. Recientemente se publicó que la expresión de MMP9 limita la acumulación de ROS y el daño al DNA ⁽¹⁰⁹⁾, lo que podría explicar por qué observamos incremento en su actividad, como mecanismo de defensa de la propia célula tumoral ante el daño que le representaba la presencia del fármaco. En este sentido, se ha demostrado que la suplementación con antioxidantes promueve la incidencia de tumores y la metástasis, no sólo en modelos de cáncer en ratones, sino también en ensayos clínicos con antioxidantes dietéticos.⁽¹¹⁰⁾

Agradecimiento.

A la Mtra. Cristina Trejo Solís por la alícuota del fármaco bis(acetilacetonato- k^2 O,O')(1,10-phenantrolina- k^2 N,N')Zn(II) proporcionada para la realización del presente trabajo.

CONCLUSIONES

Se comprobó que el complejo bis(acetilacetonato- k^2 O,O')(1,10-phenantrolina- k^2 N,N')Zn(II) o ZnCris tiene un efecto citotóxico significativo sobre la migración celular y, que dicho efecto puede estar mediado por la generación de especies reactivas de oxígeno. Esto último fue evidenciado por el efecto protector del antioxidante genérico N-acetilcisteína (NAC) sobre las células tratadas con el fármaco.

REFERENCIAS

1. Giménez C, Pereira A, Arcamone G, Gómez M, Reyes J, Mota D et al. Sarcomas de tejidos blandos no rhabdomiosarcoma en niños. Rev Venezolana de Oncología 2007 Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=375635137007> ISSN: 0798-0582 ISSN electrónico: 2343-6239
2. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2019. CA Cancer J Clin 2019; 69:7–34. doi.org/10.3322/caac.21551
3. Comité editorial de tratamiento pediátrico del PDQ. Tratamiento del rhabdomiosarcoma infantil (PDQ®): versión para profesionales de la salud. En: Resúmenes de información sobre el cáncer del PDQ. Bethesda (MD): Instituto Nacional del Cáncer; 2020. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK65802/>
4. Trahair T, Andrews L, Cohn RJ. Recognition of Li Fraumeni syndrome at diagnosis of a locally advanced extremity rhabdomyosarcoma. Pediatr Blood Cancer. 2007; 48(3):345–8. DOI: 10.1002/pbc.20795
5. INEGI .Comunicado de Prensa núm 105/21 .Sala de prensa. Noticias. [Internet] 2021 [citado el 27 de noviembre de 2021]; Disponible en: <https://www.inegi.org.mx/app/saladeprensa/noticia.html?id=6338>
6. Cancer Tomorrow [Internet]. iarc.fr. [citado el 27 de noviembre de 2021]. Disponible en: https://gco.iarc.fr/tomorrow/en/dataviz/isotype?types=0&single_unit=500000
7. Cáncer [Internet]. [citado el 27 de noviembre de 2021]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>

8. Van Rijn RR, Wilde JCH, Bras J, Oldenburger F, McHugh KMC, Merks JHM. Imaging findings in noncraniofacial childhood rhabdomyosarcoma. *Pediatr Radiol*. 2008; 38(6):617–34. <https://doi.org/10.1007/s00247-008-0751-y>
9. Micete León JA. Factores de riesgo al nacimiento para el desarrollo de rhabdomiosarcoma en pacientes pediátricos derechohabientes del CMN 20 de Noviembre ISSSTE, Universidad Autónoma de México; 2019 http://132.248.9.41:8880/jspui/handle/DGB_UNAM/TES01000794514
10. S. Singh, C. Vinson, CM Gurley et al. Impaired Wnt signaling in embryonal rhabdomyosarcoma cells from p53/c-fos double mutant mice. *Am J Pathol* 2010; 177(4):2055-2066. doi: 10.2353/ajpath.2010.091195
11. Sun X, Guo W, Shen JK, Mankin HJ, Hornicek FJ, Duan Z. Rhabdomyosarcoma: Advances in molecular and cellular biology. *Sarcoma*. 2015; 2015:232010. <https://doi.org/10.1155/2015/232010>
12. Ruíz F, G Villegas M, Aguirre L, Urdaneta N, López B, Abreu P. Rhabdomiosarcoma tratamiento multidisciplinario análisis de 27 pacientes. *Revista Venezolana de Oncología* 2018; 30(3):175–186. Disponible en: <https://www.redalyc.org/jatsRepo/3756/375655486005/html/index.html>
13. Ruiz Cabrera AL, Revollo Pardo FM, Calderón Quiroz PH. Rhabdomiosarcoma botrioides, reporte de dos casos y revisión de la literatura. *Univ Médica* 2006 <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=231018678009>
14. Fernández A, Becerra F, Rehbein J, Acuña S, Somarriva C, Cáceres A, et al. Maxillofacial cancer in pediatric patients III: Malignant tumors in soft tissue. *Int J Odontostomat* 2017; 11(4):387-392. Disponible en: <https://scielo.conicyt.cl/pdf/ijodontos/v11n4/0718-381X-ijodontos-11-04-00387.pdf>

15. Risk Factors for Rhabdomyosarcoma Cancer.org. Disponible en: <https://www.cancer.org/cancer/rhabdomyosarcoma/causes-risks-prevention/risk-factors.html>
16. Lawrence W Jr, Gehan EA, Hays DM, et al.: Prognostic significance of staging factors of the UICC staging system in childhood rhabdomyosarcoma: a report from the Intergroup Rhabdomyosarcoma Study (IRS-II). *J Clin Oncol* 5 (1): 46-54, 1987.
17. Cervini AB., Buján MM, Pierini AM. Rabdomiosarcomas en la infancia. *Educación Médica Continua* 2012; 18 (6): 443-441. <https://www.dermatolarg.org.ar/index.php/dermatolarg/article/view/960/584>
18. González DM, Velásquez JC, Galvis LA, Pulido L. Síndrome de Gorlin con carcinoma basocelular metastásico en tratamiento con vismodegib. *Rev Asoc Colomb Dermatol.* 2016; 24(2):127-132. Disponible en: <https://revistasocolderma.org/articulo-revista/sindrome-de-gorlin-con-carcinoma-basocelular-metastasisico-en-tratamiento-com>
19. Smith MA, Altekruse SF, Adamson PC, Reaman GH, Seibel NL. Disminución de la mortalidad por cáncer en la niñez y la adolescencia. *Cáncer.* 2014; 120 (16): 2497–506. DOI: 10.1002 / cncr.28748
20. Wasti AT, Mandeville H, Gatz S, Chisholm JC. Rabdomiosarcoma. *Pediatra de Salud Infantil (Oxford).* 2018; 28 (4): 157–63. <https://doi.org/10.1016/j.paed.2018.03.001>
21. García-López F, García-Hernández GG, Martínez-Hernández CM. Rabdomiosarcoma de cuello uterino tipo botrioide. Informe de un caso. *Revista Latinoamericana* .2021;59:1-7. <https://doi.org/10.24245/patrl.v59id.4086>

22. 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 GAMO 2010; 9(5):198-207. Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-gaceta-mexicana-oncologia-305-articulo-rabdomiosarcoma-experiencia-siete-anos-el-X1665920110871408>
23. González Díaz K. Participación de citocromo P450 y transportadores tipo ABC en la resistencia a ciclofosfamida en una línea celular de rbdomiosarcoma infantil [México]: Universidad Autónoma de México; 2020. [Tesis]. Disponible en: <http://132.248.9.195/ptd2020/enero/0800077/Index.html>
24. Parham D.M., Barr F.G. Pathology and Genetics of Tumours of Soft Tissue and Bone. WHO; 2002: 146-154.
25. Kashi VP, Hatley ME, Galindo RL. Probing for a deeper understanding of rhabdomyosarcoma: insights from complementary model systems. Nat Rev Cancer. 2015; 15(7):426–39. <https://doi.org/10.1038/nrc3961>
26. Caserto BG. A comparative review of canine and human rhabdomyosarcoma with emphasis on classification and pathogenesis. Vet Pathol. 2013;50(5):806–26 <https://doi.org/10.1177/0300985813476069>
27. Junco Gelpi DA, Blanco Trujillo F, Montoya Cardero LE, Junco Anaya DM, Anaya Correoso SM. Rbdomiosarcoma pleomórfico del muslo. MEDISAN 2015;19(2):252 Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1029-3019201500020001

28. Parham DM, Barr FG. Classification of rhabdomyosarcoma and its molecular basis. *Adv Anat Pathol.* 2013; 20(6):387–97. <https://doi.org/10.1097/PAP.0b013e3182a92d0d>
29. Vega Betancourt N, Jiménez Puñales S, Rodríguez Santos IC. Rabdomiosarcoma botrioide del aparato genital femenino en una adolescente virgen. *Rev cuba obstet ginecol.* 2018;44(4):1–8. ISSN 1561-3062
30. Gartner Caballero ÁM, Quezada Dalmau MF. Rabdomiosarcoma Botrioide del aparato genital femenino. *Ciencia Salud.* 2018;2(2):49–55. <http://dx.doi.org/10.22206/cysa.2018.v2i2.pp49-55>.
31. Pappo AS, Shapiro DN, Crist WM. Rhabdomyosarcoma. Biology and treatment. *Pediatr Clin North Am.* 1997; 44(4):953–72. [https://doi.org/10.1016/S0031-3955\(05\)70539-3](https://doi.org/10.1016/S0031-3955(05)70539-3)
32. López Márquez A, Barañón Martínez I, Ortiz Hidalgo C. Utilidad de la inmunohistoquímica en el diagnóstico de rabdomiosarcoma alveolar variante sólida. Informe de un caso superficial (cutáneo) localizado en el dorso de la mano. *An Med Asoc Med Hosp ABC* 2004; 49(3):151-155 Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/abc/bc-2004/bc043h.pdf>
33. Monti E, Fanzani A. Uncovering metabolism in rhabdomyosarcoma. *Cell Cycle.* 2016; 15(2):184-95. doi: 10.1080/15384101.2015.1071746.
34. Blake J, Ziman MR. Aberrant PAX3 and PAX7 expression. A link to the metastatic potential of embryonal rhabdomyosarcoma and cutaneous malignant melanoma? *Histol Histopathol* 2003; 18(2):529-39. doi: 10.14670/HH-18.529.

35. Skapek SX, Ferrari A, Gupta AA, Lupo PJ, Butler E, Shipley J, et al. Rhabdomyosarcoma. *Nat Rev Dis Primers.* 2019; 5(1):1. <https://doi.org/10.1038/s41572-018-0051-2>
36. Kuijper S, Turner CJ, Adams RH. Regulation of angiogenesis by Eph-ephrin interactions. *Trends Cardiovasc Med.* 2007;17(5):145–51. doi:10.1016/j.tcm.2007.03.003
37. Genander M, Frisén J. Ephrins and Eph receptors in stem cells and cancer. *Curr Opin Cell Biol.* 2010;22(5):611–6. doi:10.1016/j.ceb.2010.08.005.
38. Pommert L, Bradley W. Pediatric Gynecologic Cancers. *Curr Oncol Rep.* 2017;19(7):44. <https://doi.org/10.1007/s11912-017-0604-7>.
39. Goset P., Karen, Córdova B., Andrés, Varas P., Mónica, & Badínez V., Leonardo. (2002). Treatment of rhabdomyosarcoma in Chilean children: a report on 2 cases. *Revista chilena de pediatría,* 73(4), 375-379. <https://dx.doi.org/10.4067/S0370-41062002000400007>
40. Figueroa-Carbajal J de J, Cárdenas-Cardós R, Rivera-Luna R, Castellanos-Toledo A. Rabdomyosarcoma, experiencia de siete años en el Instituto Nacional de Pediatría. *Gac mex oncol.* 2010;9(5):198–207.
41. Tratamiento del rabdomyosarcoma infantil (PDQ®)–Versión para profesionales de salud [Internet]. Cancer.gov. 2021 [citado el 27 de noviembre de 2021]. Disponible en: <https://www.cancer.gov/espanol/tipos/sarcoma-de-tejido-blando/pro/tratamiento-r-abdomiosarcoma-pdq>
42. Lawrence W Jr, Neifeld JP. Soft tissue sarcomas. *Curr Probl Surg.* 1989;26(11):753–827. [https://doi.org/10.1016/0011-3840\(89\)90036-1](https://doi.org/10.1016/0011-3840(89)90036-1)

43. Vásquez Ponce ML. FACTORES PRONÓSTICOS CLÍNICOS Y EPIDEMIOLOGÍCOS EN NIÑOS CON RABDOMIOSARCOMA [ESPECIALISTA EN ONCOLOGÍA PEDIÁTRICA]. Universidad de San Martín de Porres ; 2014. https://repositorio.usmp.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12727/2560/VASQUEZ_ML.pdf?sequence=1&isAllowed=y
44. Silverman JA, Deitcher SR. Marqibo® (vincristine sulfate liposome injection) improves the pharmacokinetics and pharmacodynamics of vincristine. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2013; 71(3):555–64. <https://doi.org/10.1007/s00280-012-2042-4>
45. Benedi J, Gómez del Rio MA. Fármacos antineoplásicos (I). *Farmacia Profesional* 2006; 20(2):60-64. <https://www.elsevier.es/es-revista-farmacia-profesional-3-articulo-farmacos-antineoplasicos-i--13084621>
46. Salazar Varela LO. Quimiosensibilidad y toxicidad de topotecan/ciclofosfamida en niños con sarcomas: revisión cualitativa de la literatura [Tesis]. [México]; 2008. Disponible en: http://repositorio.pediatrica.gob.mx:8180/bitstream/20.500.12103/61/1/tesis2008_38.pdf
47. Hawkins DS, Chi Y-Y, Anderson JR, Tian J, Arndt CAS, Bomgaars L, et al. Addition of vincristine and irinotecan to vincristine, dactinomycin, and cyclophosphamide does not improve outcome for intermediate-risk rhabdomyosarcoma: A report from the children's oncology group. *J Clin Oncol.* 2018; 36(27):2770–7. doi: 10.1200/JCO.2018.77.9694.

48. Arndt C, Hawkins D, Anderson JR, Breitfeld P, Womer R, Meyer W. Age is a risk factor for chemotherapy-induced hepatopathy with vincristine, dactinomycin, and cyclophosphamide. *J Clin Oncol.* 2004; 22(10):1894–901. doi: 10.1200/JCO.2004.08.075.
49. Bisogno G, De Salvo GL, Bergeron C, Gallego Melcón S, Merks JH, Kelsey A, et al. Vinorelbine and continuous low-dose cyclophosphamide as maintenance chemotherapy in patients with high-risk rhabdomyosarcoma (RMS 2005): a multicentre, open-label, randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2019; 20(11):1566–75. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(19\)30617-5](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(19)30617-5)
50. Velasco Martín A, Alsasúa del Valle A, Carvajal García Pando A,, Dueñas Laíta A, de la Gala Sánchez F, García Méndez P, Jimeno Carruez A, Macías Fernández JA, Martínez Sierra R, Serrano Molina JS. *Farmacología clínica y terapéutica.* [Internet]. 1era. Edición. Ed. McGraw-Hill/Interamericana. España, 2004. 128–135 p. Disponible en: https://www.academia.edu/8927307/Farmacologia_clinica_y_terapeutica_medica_booksmedicos
51. Crist WM, Anderson JR, Meza JL, Fryer C, Raney RB, Ruymann FB, et al. Intergroup rhabdomyosarcoma study-IV: results for patients with nonmetastatic disease. *J Clin Oncol.* 2001;19(12):3091–102. DOI: 10.1200 / JCO.2001.19.12.3091
52. Survival rates for rhabdomyosarcoma by risk group [Internet]. Cancer.org. [citado el 6 de mayo de 2021]. American Cancer Society. Disponible en: <https://www.cancer.org/cancer/rhabdomyosarcoma/detection-diagnosis-staging/staging-survival-rates.html>

53. Basolo F, Johnson RC. Química de los compuestos de coordinación: La química de los compuestos metálicos. Editorial Reverte; México: 1980.
54. Trejo-Solís C, Álvarez-Lemus MA, Jiménez-Farfán D, Anaya-Rubio I, López-González R, Palencia G, et al. In vitro evaluation of apoptotic effect of bis(acetylacetonato-k²O,O')(1,10-phenanthroline-k² N,N')Zn(II) complex. *Chem Biol Drug Des.* 2017; 89(4):529–37. <https://doi.org/10.1111/cbdd.12875>
55. López Tévez LL. Estudio de complejos metálicos con ligandos de interés biológico [Tesis]. [Argentina]: Universidad Nacional de la Plata Facultad de Ciencias Exactas Departamento de Química.; 2016. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.35537/10915/55585>
56. Dasari S, Tchounwou PB. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *Eur J Pharmacol* 2014; 740:364-78. DOI: 10.1016 / j.ejphar.2014.07.025
57. Galindo-Murillo R., Garcia-Ramos J.C., Ruiz-Azuara L., Cheatham T.E., Cortes-Guzman F. Intercalation processes of copper complexes in DNA. *Nucleic Acids Res* 2015;4 3:5364–5376. doi: 10.1093/nar/gkv467
58. Rufino-González Y., Ponce-Macotela M., García-Ramos J.C., Martínez-Gordillo M.N., Galindo-Murillo R., González-Maciél A., Reynoso-Robles R., Tovar-Tovar A., Flores-Alamo M., Toledano-Magaña Y., et al. Antigiardiasic activity of Cu(II) coordination compounds: Redox imbalance and membrane damage after a short exposure time. *J Inorg Biochem* 2019; 195:83–90. doi: 10.1016/j.jinorgbio.2019.03.012
59. Ruiz-Azuara L., Bastian G., Bravo-Gómez M.E., Cañas R.C., Flores-Alamo M., Fuentes I., Mejía C., García-Ramos J., Serrano A. Abstract CT408: Phase I study of one mixed chelates copper(II) compound, Casiopeína CasIIIa with antitumor

- activity and its mechanism of action. AACR. Cancer Res 2014; 74(Suppl. 19) doi: 10.1158/1538-7445.
60. Anda-Jáuregui G., Espinal-Enríquez J., Hur J., Alcalá-Corona S.A., Ruiz-Azuara L., Hernández-Lemus E. Identification of Casiopeina II-gly secondary targets through a systems pharmacology approach. *Comput. Biol. Chem.* 2019; 78:127–132. doi: 10.1016/j.compbiolchem.2018.11.021.
61. Huang L, Drake VJ, Ho E. Zinc. *Adv Nutr.* 2015; 6(2):224–6. <https://doi.org/10.3945/an.114.006874>
62. Cousins RJ, Blanchard RK, Popp MP, et al. A global view of the selectivity of zinc deprivation and excess on genes expressed in human THP-1 mononuclear cells. *PNAS* 2003; 100(12):6952–6957 DOI: 10.1073/pnas.0732111100
63. Magda D, Lecane P, Miller RA, Lepp C, Miles D, Mesfin M, et al. Motexafin gadolinium disrupts zinc metabolism in human cancer cell lines. *Cancer Res.* 2005; 65(9):3837–45. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-4099>
64. Hasumi M, Suzuki K, Matsui H, Koike H, Ito K, Yamanaka H. Regulation of metallothionein and zinc transporter expression in human prostate cancer cells and tissues. *Cancer Lett.* 2003; 200(2):187–95. [https://doi.org/10.1016/s0304-3835\(03\)00441-5](https://doi.org/10.1016/s0304-3835(03)00441-5)
65. Jayasurya A, Bay BH, Yap WM, Tan NG, Tan BK. Proliferative potential in nasopharyngeal carcinoma: correlations with metallothionein expression and tissue zinc levels. *Carcinogenesis.* 2000; 21(10):1809–12. <https://doi.org/10.1093/carcin/21.10.1809>

66. Kim CH, Kim JH, Moon SJ, Chung KC, Hsu CY, Seo JT, et al. Pyrithione, a zinc ionophore, inhibits NF-kappaB activation. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999; 259(3):505–9. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1999.0814>
67. Seo SR, Chong SA, Lee SI, Sung JY, Ahn YS, Chung KC, et al. Zn²⁺-induced ERK activation mediated by reactive oxygen species causes cell death in differentiated PC12 cells. *J Neurochem.* 2001; 78(3):600–10. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2001.00438.x>
68. Forbes IJ, Zalewski PD, Giannakis C. Role for zinc in a cellular response mediated by protein kinase C in human B lymphocytes. *Exp Cell Res.* 1991; 195(1):224–9. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(91\)90521-u](https://doi.org/10.1016/0014-4827(91)90521-u)
69. Kondoh M, Tasaki E, Araragi S, Takiguchi M, Higashimoto M, Watanabe Y, et al. Requirement of caspase and p38MAPK activation in zinc-induced apoptosis in human leukemia HL-60 cells: Zn and apoptosis. *Eur J Biochem.* 2002; 269(24):6204–11. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2002.03339.x>
70. Uzzo RG, Leavis P, Hatch W, Gabai VL, Dulin N, Zwartau N, et al. Zinc inhibits nuclear factor-kappa B activation and sensitizes prostate cancer cells to cytotoxic agents. *Clin Cancer Res.* 2002; 8(11):3579–83. <https://clincancerres.aacrjournals.org/content/8/11/3579.long>
71. Magda D, Lecane P, Wang Z, Hu W, Thiemann P, Ma X, et al. Synthesis and anticancer properties of water-soluble zinc ionophores. *Cancer Res.* 2008; 68(13):5318–25. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-08-0601
72. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011; 144(5):646–74. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>

73. Mantovani A. Cancer: Inflaming metastasis: *Cancer. Nature.* 2009;457(7225):36–7 <https://doi.org/10.1038/457036b>
74. Van Doorslaer de Ten Rye S, Deldicque L. The regulation of the metastatic cascade by physical activity: A narrative review. *Cancers (Basel).* 2020;12(1):153. [10.3390 / cancers12010153](https://doi.org/10.3390/cancers12010153)
75. Leber MF, Efferth T. Molecular principles of cancer invasion and metastasis (review). *Int J Oncol.* 2009;34(4):881–95. https://doi.org/10.3892/ijo_00000214.
76. Valastyan S, Weinberg RA. Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms. *Cell.* 2011; 147(2):275–92. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.09.024>
77. Cascales Angosto M, Álvarez Gómez JAI. Metaloproteinasas, matriz extracelular y cáncer. *An. R. Acad. Farm* 2010; 76(1):59-84. Disponible en: <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/ibc-86406>
78. Gialeli C, Theocharis AD, Karamanos NK. Roles of matrix metalloproteinases in cancer progression and their pharmacological targeting: MMPs as potential targets in malignancy. *FEBS J.* 2011;278(1):16–27. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2010.07919.x>
79. Phaniendra A, Jestadi DB, Periyasamy L. Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. *Indian J Clin Biochem.* 2015;30(1):11–26 Doi: [10.1007 / s12291-014-0446-0](https://doi.org/10.1007/s12291-014-0446-0)
80. Gupta N, Verma K, Nalla S, Kulshreshtha A, Lall R, Prasad S. Free radicals as a double-edged sword: The cancer preventive and therapeutic roles of curcumin. *Molecules.* 2020;25(22):5390. Doi: [10.3390 / moléculas25225390](https://doi.org/10.3390/molecules25225390)

81. Ábrigo J, Elorza AA, Riedel CA, Vilos C, Simon F, Cabrera D, et al. Role of oxidative stress as key regulator of muscle wasting during cachexia. *Oxid Med Cell Longev*. 2018;2018:2063179. doi: 10.1155 / 2018/2063179
82. Neha K, Haider MR, Pathak A, Yar MS. Medicinal prospects of antioxidants: A review. *Eur J Med Chem*. 2019;178:687–704. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.06.010>
83. Holmström KM, Finkel T. Cellular mechanisms and physiological consequences of redox-dependent signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014;15(6):411–21. <https://doi.org/10.1038/nrm3801>
84. Chen X, Stewart E, Shelat AA, Qu C, Bahrami A, Hatley M, et al. Targeting oxidative stress in embryonal rhabdomyosarcoma. *Cancer Cell*. 2013; 24(6):710–24. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2013.11.002>
85. Prasad S, Gupta SC, Tyagi AK. Reactive oxygen species (ROS) and cancer: Role of antioxidative nutraceuticals. *Cancer Lett*. 2017;387:95–105 <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2016.03.042>
86. Kalyanaraman B, Cheng G, Hardy M, Ouari O, Bennett B, Zielonka J. Teaching the basics of reactive oxygen species and their relevance to cancer biology: Mitochondrial reactive oxygen species detection, redox signaling, and targeted therapies. *Redox Biol*. 2018;15:347–62. doi: 10.1016 / j.redox.2017.12.012
87. Brillo V, Chieriegato L, Leanza L, Muccioli S, Costa R. Mitochondrial dynamics, ROS, and cell signaling: A blended overview. *Life (Basel)*. 2021;11(4):332. doi: 10.3390 / life11040332

88. Bhattacharyya A, Chattopadhyay R, Mitra S, Crowe SE. Oxidative stress: an essential factor in the pathogenesis of gastrointestinal mucosal diseases. *Physiol Rev.* 2014;94(2):329–54. doi: 10.1152 / physrev.00040.2012
89. I. N. Zelko, T. J. Mariani, and R. J. Folz, “Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression,” *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 33, no. 3, pp. 337–349, 2002..
[https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(02\)00905-x](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(02)00905-x)
90. D. F. Dai, Y. A. Chiao, G. M. Martin et al., “Mitochondrial Targeted catalase: extended longevity and the roles in various disease models,” *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, vol. 146, pp. 203–241, 2017.
91. G. K. Sakellariou, A. P. Lightfoot, K. E. Earl, M. Stofanko, and B. McDonagh, “Redox homeostasis and age-related deficits in neuromuscular integrity and function,” *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*, vol. 8, no. 6, pp. 881–906, 2017.
92. Pereira B. , Costa Rosa L. F. B. , Safi D. A. , Medeiros M. H. G, Curi R., and . Bechara E. J. H, “Superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase activities in muscle and lymphoid organs of sedentary and exercise-trained rats,” *Physiology & Behavior*, vol. 56, no. 5, pp. 1095–1099, 1994
93. Brigelius-Flohe R. , “Glutathione peroxidases and redoxregulated transcription factors,” *Biological Chemistry*, vol. 387, no. 10-11, pp. 1329–1335, 2006
94. Barreiro E, de la Puente B, Busquets S, López-Soriano FJ, Gea J, Argilés JM. Tanto el estrés oxidativo como el nitrosativo están asociados con la atrofia

- muscular en ratas portadoras de tumores. *FEBS Lett.* 2005; 579 (7): 1646–1652. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.02.017>
95. Ji L. L., “Antioxidant signaling in skeletal muscle: a brief review,” *Experimental Gerontology*, vol. 42, no. 7, pp. 582–593, 2007
96. Habermann KJ, Grünewald L, van Wijk S, Fulda S. Targeting redox homeostasis in rhabdomyosarcoma cells: GSH-depleting agents enhance auranofin-induced cell death. *Cell Death & Disease.* 2017 Oct;8(10):e3067–7. doi: 10.1038 / cddis.2017.412
97. De Flora S, Balansky R, La Maestra S. Rationale for the use of N -acetylcysteine in both prevention and adjuvant therapy of COVID-19. *The FASEB Journal.* 2020 Aug 11; <https://doi.org/10.1096/fj.202001807>
98. Poe FL, Corn J. N-Acetylcysteine: a potential therapeutic agent for SARS-CoV-2. *Medical Hypotheses.* 2020 May;109862. 10.1016 / j.mehy.2020.109862
99. Martin KR, Barrett JC. Especies reactivas de oxígeno como espadas de doble filo en procesos celulares: señalización celular en dosis bajas versus toxicidad en dosis altas. *Hum Exp Toxicol.* 2002; 21 (2): 71–5. <https://doi.org/10.1191/0960327102ht213oa>
100. Altun M, Edström E, Spooner E, Flores-Moralez A, Bergman E, Tollet-Egnell P, et al. Iron load and redox stress in skeletal muscle of aged rats. *Muscle & Nerve.* 2007 Aug;36(2):223–33. DOI: 10.1002 / mus.20808
101. Tidball JG. Inflammatory processes in muscle injury and repair. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology.* 2005 Feb;288(2):R345–53. DOI: 10.1152 / ajpregu.00454.2004

102. Adhihetty PJ, Irrcher I, Joseph A-M, Ljubicic V, Hood DA. Plasticity of Skeletal Muscle Mitochondria in Response to Contractile Activity. *Experimental Physiology*. 2003 Jan;88(1):99–107.
103. Kramer PA, Duan J, Qian W-J, Marcinek DJ. The Measurement of Reversible Redox Dependent Post-translational Modifications and Their Regulation of Mitochondrial and Skeletal Muscle Function. *Frontiers in Physiology*. 2015 Nov 25;6.<https://doi.org/10.3389/fphys.2015.00347>
104. Boveris A. [57] Determination of the production of superoxide radicals and hydrogen peroxide in mitochondria [Internet]. Vol. 105, ScienceDirect. Academic Press; 1984 [cited 2021 Nov 28]. p. 429–435. Available from:[https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05060-6](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05060-6)
105. Deshmukh H, Case L, Wesselkamper S, Borchers M, Martin L, et al. Metalloproteinases mediate mucin 5AC expression by epidermal growth factor receptor activation. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;171:305-314 <https://doi.org/10.1164/rccm.200408-1003OC>
106. Sternlicht M, Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Ann Rev Cell Dev Biol* 2001;17:463-516. DOI: 10.1146/annurev.cellbio.17.1.463
107. Lu L, Deng H, Fan W. Correlation of MUC1 expression to adhesion of breast cancer cell line MDA-MB-231. *Ai Zheng* 2004;23:1294-1296.
108. Joyce A, Azzah A, Melissa C, Adriance, Tessier J, Kotlarczyk K, Melissa C Thompson and Gendler S. MUC1 oncoprotein activates the I κ B kinase β complex and constitutive NF- κ B signaling. *NatCell Biology* 2007;9:1419–1427
109. Walter L, Canup B, Pujada A, Bui TA, Arbasi B, Laroui H, et al. Matrix metalloproteinase 9 (MMP9) limits reactive oxygen species (ROS) accumulation

and DNA damage in colitis-associated cancer. *Cell Death & Disease* [Internet]. 2020 Sep [cited 2021 Apr 14];11(9). Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7498454/pdf/41419_2020_Article_2959.pdf

110. Harris IS, Endress JE, Coloff JL, Selfors LM, McBrayer SK, Rosenbluth JM, et al. Deubiquitinases maintain protein homeostasis and survival of cancer cells upon glutathione depletion. *Cell Metab.* 2019; 29(5):1166-1181.e6. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2019.01.020>