

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



EFFECTO DE LA COMBINACIÓN DE SORAFENIB, ÁCIDO VALPROICO Y METFORMINA
EN UN XENOTRANSPLANTE DE HEPATOCARCINOMA HUMANO

Por

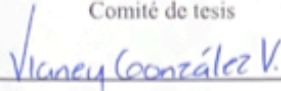
EDGAR XCHEL FRANCO JUÁREZ

Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN INMUNOBIOLOGÍA

2026

EFFECTO DE LA COMBINACIÓN DE SORAFENIB,
ÁCIDO VALPROICO Y METFORMINA EN UN
XENOTRANSPLANTE
DE HEPATOCARCINOMA HUMANO.

Comité de tesis



Dra. Vianey González Villasa

Directora



Dra. Diana Reséndez Pérez

Secretario



Dr. Fermin Mar Aguilar

Vocal



Dr. Pablo Zapata Benavides

Vocal



Dra. Claudia D. Altamirano Torres

Vocal



Dra. Katiushka Arévalo
Subdirector de Posgrado



EFFECTO DE LA COMBINACIÓN DE SORAFENIB,
ÁCIDO VALPROICO Y METFORMINA EN UN
XENOTRANSPLANTE
DE HEPATOCARCINOMA HUMANO.

DIRECCION DE TESIS

Vianey González V.

Dra. Vianey González Villasana
Directora interna

Mario A. Bermúdez de León
Dr. Mario A. Bermúdez de León
Director externo

DERECHOS RESERVADOS©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta Tesis está protegido, el uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material contenido que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde se obtuvo mencionando al autor o autores.

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi agradecimiento a la Secretaría de Ciencia, Humanidades Tecnología e Innovación (SECIHTI), al Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) a través del Fondo de Investigación en Salud (proyecto 2023-3-135) y el Centro de Investigación Biomédica del Noreste, por los recursos económicos y tecnológicos otorgados para la realización de este trabajo. A la Universidad Autónoma de Nuevo León, a través de la Facultad de Ciencias Biológicas y el Instituto de Inmunología y Virología por la oportunidad para formarme como Doctor en Ciencias con Orientación en Inmunobiología y a la Unidad de Biología del Desarrollo perteneciente a la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL por el espacio para desarrollar mis conocimientos. Al Dr. Mario Bermúdez, Dra. Vianey González, a la Dra. Katia Peñuelas, Dra. Laura González, Dra. Elena Camacho, Dra. Beatriz Silva, Dra. Fabiola Castorena, Dr. Oscar Raul Fajardo, Dr. Juan Carlos Flores, a todos ustedes y a mis compañeros del laboratorio, muchas gracias.

DEDICATORIAS

A todos mis seres queridos.

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN	3
2. ANTECEDENTES.....	5
2.1 Hepatocarcinoma.....	5
2.2 Carcinogénesis del HCC	7
2.3 La vía MAPK-MAPK1 en HCC	8
2.4 Sorafenib en HCC	10
2.5 Efectos del sorafenib en la apoptosis	11
2.6 Autofagia y sorafenib	14
2.7 La vía AMPK-MTOR-AKT1 regula la autofagia	17
2.8 Reposicionamiento farmacológico del ácido valproico y metformina en HCC.....	20
2.9 Ácido valproico y sorafenib en HCC	22
2.10 Metformina y sorafenib en HCC	24
3. JUSTIFICACIÓN.....	27
4. HIPÓTESIS	28
5. OBJETIVOS.....	29
6. MATERIAL Y MÉTODOS	30
6.1 Reactivos	30
6.2 Stock de sorafenib	30
6.3 Stock de ácido valproico y metformina.....	31
6.4 Línea celular	31

6.5 Citometría de flujo	31
6.6 Ensayos de clonogenicidad	32
6.7 Ensayo de invasión en Transwell	32
6.8 Microarreglo de anticuerpos para apoptosis humana (Human apoptosis antibody array) ...	33
6.9 Extracción de proteína total e inmunoblotting	34
6.10 Xenotransplante de HepG2 en un modelo murino	35
6.11 Bioquímica sanguínea.	36
6.12 Histoquímica	36
6.13 Análisis estadísticos	37
7. RESULTADOS	38
7.1 Determinación de muerte celular y clonogenicidad de células HepG2 tratadas la combinación de sorafenib, ácido valproico y metformina.....	38
7.2 Efecto del tratamiento con SVM sobre la invasión de las células HepG2	39
7.3 Efecto del tratamiento con SVM sobre proteínas involucradas en muerte celular y autofagia en células HepG2	41
7.4 Efecto del SVM sobre moléculas involucradas en la señalización farmacológica de las células HepG2	47
7.5 Efecto de la combinación de sorafenib con ácido valproico y metformina en un modelo murino de HCC humano	49
8. DISCUSIÓN.....	52
8.1 Mecanismos involucrados en los efectos de la combinación de sorafenib con ácido valproico.	55
8.2 Potenciales mecanismos moleculares en la combinación de sorafenib con metformina	56
8.3 Mecanismos involucrados en la combinación de sorafenib, ácido valproico y metformina..	57
9. CONCLUSIÓN	62

10.	PERSPECTIVAS	63
11.	BIBLIOGRAFIA.....	64
12.	RESUMEN BIOGRÁFICO	85
Anexo 1. MATERIAL SUPLEMENTARIO		A

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Proporción de cambio de proteínas modificadas por efecto del tratamiento con SVM en células HepG2.	43

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Mecanismo molecular involucrado en la inducción de apoptosis intrínseca mediada por el sorafenib y el ácido valproico	14
Figura 2. Mecanismo molecular de señalización implicado en la regulación farmacológica de la autofagia	20
Figura 3. Muerte celular y evaluación de clonogenicidad en células HepG2 tratadas con sorafenib, ácido valproico y metformina	40
Figura 4. Determinación del potencial migrativo de células HepG2 por efecto del SVM	42
Figura 5. Efecto del tratamiento con 2 μ M de sorafenib, 4 mM de ácido valproico y 10 mM de metformina en proteínas relacionadas con la vía de apoptosis	45
Figura 6. Niveles de expresión de proteínas relacionadas con la apoptosis y la autofagia en células HepG2 tratadas con sorafenib, ácido valproico y metformina	48
Figura 7. Señalización intracelular por efecto del tratamiento con sorafenib, ácido valproico y metformina en células HepG2	50
Figura 8. Efecto del tratamiento con sorafenib, ácido valproico y metformina en un modelo murino xenoinjertado con células de HCC humano	52
Figura S1. Expresión de proteínas relacionadas con la apoptosis por efecto del SVM en células HepG2	88-89
Figura S2. Efecto del tratamiento con sorafenib, ácido valproico y metformina en el peso y marcadores séricos en un modelo murino xenoinjertado con células de HCC humano	90
Figura S3. Tinción histoquímica del tejido tumoral por efecto de la combinación de sorafenib con ácido valproico y metformina	91

LISTA DE SIMBOLOS

$\mu\text{g} / \text{mL}$	Microgramos por mililitro
μL	Microlitros
μM	Micromolar
$^{\circ}\text{C}$	Grados Celsius

LISTA DE ABREVIATURAS

AKT1	AKT serina/treonina cinasa 1
p-AKT1	AKT serina/treonina cinasa 1 fosforilada
AKT1S1	Sustrato 1 de AKT
ALP	Fosfatasa alcalina
APAF1	Factor activador de la peptidasa apoptótica 1
AMPK	Subunidad catalítica alfa 2 de la proteína cinasa activada por AMP o PRKAA2
ARID1A	Dominio 1A de interacción rico en AT
ATF4	Factor activador de la transcripción 4
ATG3	Proteína relacionada con la autofagia 3
BAD	Agonista de muerte celular asociado a BCL2
BAK1	Antagonista 1 de BCL2
BAX	Regulador de la apoptosis X asociado a BCL2
BCL2	Regulador de apoptosis BCL2
BCL2L1	Proteína 1 semejante a BCL2
BCL2L11	Proteína 11 tipo BCL2 también denominada Bim
BCL2L2	Proteína 2 semejante a BCL2
BCLC	Clínica del Cáncer Hepático de Barcelona
BID	Proteína agonista de muerte celular con dominio de interacción BH3
BIRC3	Proteína 3 con repetidos IAP baculovirales
BIRC5	Proteína 5 con repetidos IAP baculovirales
BIRC7	Proteína 7 con repetidos IAP baculovirales
CD274	Molécula CD274 o PDL1
CDH1	Caderina 1 o E-caderina
CDH2	Caderina 2 o N-caderina
CDKN1A	Inhibidor de la ciclina dependiente 1A
CLIP1	Proteína 1 de enlace con dominio CAP – Gly
CO ₂	Dióxido de carbono
CREB1	Proteína de unión 1 al elemento de respuesta cAMP
CTLA4	Proteína 4 asociada a linfocitos T citotóxicos
CYCS	Citocromo C somático
DEPTOR	Proteína de interacción con MTOR con dominio DEP
DIABLO	Proteína mitocondrial diablo de unión a IAP
DMEM	Medio mínimo Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
E2F1	Factor de transcripción 1 E2F

EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidermal
EIF4EBP1	Proteína 1 de unión al factor eucariótico de iniciación de traducción 4E
FAS	Receptor de muerte en la superficie Fas
FASLG	Ligando del receptor de muerte en superficie Fas
FDA	Administración de alimentos y medicamentos de Estados Unidos
FGFR1	Receptor 1 del factor de crecimiento de fibroblastos
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FLT3	Receptor tirocina cinasa 3 relacionado con FMS
FOS	Subunidad del factor de transcripción AP-1 protooncogén Fos
FOXM1	Factor de transcripción forkhead box M1
FOXO3	Factor de transcripción forkhead box 3
GAPDH	Gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa
GLOBOCAN	Observatorio global del cáncer
GRB10	Proteína 10 de unión al factor de crecimiento
h	Horas
HCC	Carcinoma hepatocelular
HDAC	Histonas desacetilasas
HDACi	Inhibidor de histonas desacetilasas
HSPA1A	Miembro 1A de la familia A de proteínas de choque térmico (Hsp70)
HSPB1	Miembro 1 de la familia B de proteínas pequeñas de choque térmico
HSPD1	Miembro 1 de la familia D de proteínas de choque térmico (Hsp60)
HTATIP2	Proteína 2 que interactúa con la proteína Tat del VIH-1
HTRA1	Serina peptidasa 1 Htra
HVB	Virus causante de hepatitis B
HVC	Virus causante de hepatitis C
IGF1	Factor de crecimiento semejante a insulina 1
IGF1R	Receptor 1 del factor de crecimiento semejante a insulina
IGF2	Factor de crecimiento semejante a insulina 2
IGFBP1-7	Proteínas de unión al factor de crecimiento semejante a insulina 1-7
KEAP1	Proteína asociada 1 Kelch semejante a ECH
KIT	Receptor tirosina cinasa protooncogén KIT
KRAS	Protooncogén RAS GTPasa o RAS
LC3BI	Proteína 1 de cadena ligera asociada a microtúbulos o LC3-I
LC3BII	Proteína 2 de cadena ligera asociada a microtúbulos o LC3-II
LPIN1	Lipin 1
LTA	Linfotoxina alfa
MAPK	Proteínas cinasas activadas por mitógenos
MAPK1	Proteína cinasa 1 activada por mitógenos o ERK
p-MAPK1	Proteína cinasa 1 activada por mitógenos fosforilada
MAPKAP1	Proteína 1 asociada a MAPK

MCL1	Miembro de la familia BCL2 regulador de apoptosis MCL1
MET	Receptor tirosina cinasa protooncogén MET
MEK	Cinasas proteínas cinasas activadas por mitógenos
miliQ	Grado de pureza del agua
min	Minutos
mM	Milimolar
mTOR	Conjunto mecanístico del blanco sensible a rapamicina en mamíferos
MTOR	Cinasa del blanco de rapamicina en mamíferos
MYC	Factor de transcripción bHLH protooncogén MYC
NOTCH1	Receptor notch 1
NOTCH3	Receptor notch 3
NRF2	Factor de transcripción 2 NFE2 semejante a bZIP
PARP1	Poli ADP ribosa polimerasa 1
PDGFRB	Receptor beta del factor de crecimiento derivado de plaquetas
PE	Ficoeritrina
PI3K	Fosfatidilinositol 3 cinasa de clase III
PI3P	Fosfatidilinositol 3 fosfato
PRKAA2	Subunidad catalítica alfa 2 de la proteína cinasa activada por AMP o AMPK
PRKCG	Proteína cinasa C gamma
PSMD9	Subunidad 26S del proteasoma no ATPasa 9
PUMA	Modulador de la apoptosis dependiente de p53
RAS	GTPasas pequeñas RAS
RAF	Familia de proteínas cinasas RAF
RB1	Correpresor transcripcional 1 de RB
RET	Receptor del protooncogen RET
RHEB	Homologo Ras de unión a mTORC1
RHO	Rodopsina
RICTOR	Acompañante independiente RPTOR del complejo 2 de MTOR
RNA	Ácido ribonucleico
RPS6KB2	Proteína ribosomal S6 cinasa B2
RPM	Revoluciones por minuto
RPTOR	Proteína asociada reguladora del complejo MTOR 1
RTK	Receptores del tipo tirocina-cinasa
SENASICA	Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria.
sIGF1R	Forma soluble del receptor 1 del factor de crecimiento semejante a insulina
SNAIL	Represor transcripcional 1 de la familia snail
SQSTM1	Sequestosoma 1 o p62
STAT3	Transductor de señal y activador de la transcripción 3
STK11	Serina/treonina cinasa 11

sTNFRSF1A	Forma soluble del miembro 1A de la superfamilia del receptor TNF
sTNFRSF1B	Forma soluble del miembro 1B de la superfamilia del receptor TNF
SVM	Combinación de sorafenib, ácido valproico y metformina
TERT	Telomerasa transcriptasa reversa
TGF- β	Factor de crecimiento transformante β
TGFB1	Factor transformante 1 β
TNF	Ligando del receptor del factor de necrosis tumoral
TNFRSF10A	Miembro 10 A de la superfamilia del receptor TNF
TNFRSF10A-D	Miembro 10 A, B, C, D de la superfamilia del receptor TNF
TNFRSF1A	Miembro 1A de la superfamilia del receptor TNF
TNFRSF21	Miembro 21 de la superfamilia del receptor TNF
TNFSF10	Miembro 10 de la superfamilia TNF
TP53	Proteína tumoral 53
TSC	Complejo de esclerosis tuberosa
TSC1	Hamartina
TSC2	Tuberina
TUNEL	Del inglés, <i>Terminal Transferase dUTP Nick End Labeling</i>
ULK1	Cinasa 1 semejante a unc-51 activadora de la autofagia
VEGFA	Factor de crecimiento endotelial vascular A
VEGFR	Receptor del factor endotelial vascular
VIM	Vimentina
WIPI	Proteínas con dominios repetidos WD de interacción con PI3P

RESUMEN

El cáncer de hígado o hepatocarcinoma es una de las principales causas de muerte en México y el mundo. El diagnóstico se realiza, regularmente, en etapas avanzadas, donde las opciones terapéuticas han demostrado una prolongación de la vida muy limitada. Actualmente el uso de la inmunoterapia ha proporcionado resultados alentadores sin embargo, en el ánimo de poder utilizar una combinación farmacológica que incrementa la tasa de sobrevida de los pacientes, es necesario ensayar aquellos medicamentos que han tenido algún efecto anti-oncogénico en ensayos *in vitro*, usando la combinación con el fármaco sorafenib, un inhibidor de tirosina cinasa, y que actualmente es el tratamiento indicado para el cáncer hepático avanzado. En este trabajo se evaluaron los efectos de combinar sorafenib con ácido valproico y metformina en un modelo celular de hepatocarcinoma y en un modelo murino xenoinjertado con células de hepatocarcinoma humano. Los métodos utilizados consistieron en cultivos celulares expuestos a las combinaciones farmacológicas y se evaluó la viabilidad, potencial proliferativo e invasivo, perfil de expresión de proteínas involucradas en rutas de muerte celular y blancos farmacológicos. También se evaluó el efecto del tratamiento combinado en un modelo animal xenoinjertado con células HepG2. Los resultados demostraron que la combinación incrementó la muerte celular, disminuyó el potencial proliferativo e invasivo de las células HepG2. Aunado a lo anterior, la combinación ocasionó la escisión de la caspasa 3, la poli ADP ribosa polimerasa 1 (PARP1) y disminuyó la fosforilación de la AKT serina/treonina cinasa 1 (AKT1). Los efectos de esta combinación sobre la inhibición tumoral en el modelo murino fueron similares a los observados en la monoterapia. Como conclusión la combinación farmacológica de sorafenib con ácido valproico y metformina incrementó significativamente la muerte de las células HepG2 en ensayos *in vitro*, no obstante en la masa tumoral de ratones xenoinjertados sus efectos permanecieron comparables a los del sorafenib.

ABSTRACT

Liver cancer or hepatocellular carcinoma is a major cause of death in Mexico and all over the world. Diagnosis is often performed in advanced stages of the disease where the available treatments showed a very limited patient-overall life extension. Current immunotherapy-based research projects had shown promising results. However, in order to use a pharmacological combination that extends the patient-overall survival is necessary to evaluate those drugs that previously showed antioncogenic properties in cellular models, using the combination with sorafenib, a tyrosine kinase inhibitor and current standard of care for advanced hepatocellular carcinoma. In this work the effects of sorafenib combined with valproic acid and metformin in HCC cells and in a murine model xenografted with human HCC cells were evaluated. Methods consisted of cells exposed to drug combinations from whose viability, toxicity, proliferative and invasive potential, protein profile expression of death-related pathways and drug-related molecular targets were evaluated. The effects of this combination in a HepG2 xenografted animal model were also evaluated. The results showed that the combination increased cell death while migration and clonogenic potential of HepG2 cells were decreased. Also, drug combination increased levels of cleaved caspase 3 and poli-ADP-ribose polymerase 1 (PARP1) along with a reduction in AKT serine/threonine kinase 1 (AKT1) phosphorylation. In the murine model the combination inhibited tumor development to levels comparable to monotherapy. As conclusion, drug combination of sorafenib with valproic acid and metformin had a significant effect increasing HepG2 cells death but this effect was not observed in tumoral mass from xenografted mice.

1. INTRODUCCIÓN

El hepatocarcinoma (HCC) es el tipo de cáncer más común dentro de las neoplasias con origen hepático. De acuerdo con el GLOBOCAN se ubica en el octavo lugar en incidencia y es el cuarto tipo de cáncer con mayor mortalidad a nivel mundial. En México ocupa el sexto lugar en mortalidad y es el décimo tipo de cáncer más común en la población (Bray et al., 2024). Las principales causas asociadas al desarrollo de este tipo de cáncer son las infecciones por virus hepatotrópicos causantes de hepatitis B o C, el consumo de alimentos contaminados con aflatoxinas, el consumo excesivo de alcohol, la diabetes, la enfermedad del hígado graso no alcohólico entre otras, que ocasionan un daño crónico y estimulan la proliferación descontrolada de los hepatocitos (Ho et al., 2016).

El tratamiento del HCC depende del grado de desarrollo de la enfermedad, el cual está clasificado en 5 etapas de acuerdo con la Clínica del Cáncer de Hígado de Barcelona (BCLC). El sorafenib forma parte de la primera línea disponible para los pacientes diagnosticados con hepatocarcinoma avanzado (Reig et al., 2022). Este fármaco es un inhibidor de tirosinas cinasas cuya administración incrementó la sobrevida de los pacientes en aproximadamente 3 meses (Llovet et al., 2008). Dentro de los esfuerzos para mejorar los resultados de los tratamientos para el cáncer se han propuesto diferentes estrategias como el reposicionamiento farmacológico, cuyas ventajas incluyen la descripción previa de los efectos secundarios, además de las vías de metabolización y perfiles farmacocinéticos (Zamami et al., 2021).

Algunos autores han mostrado evidencia del potencial del ácido valproico y de la metformina para inducir la muerte celular mediante mecanismos regulados como la apoptosis intrínseca (Sanaei y Kavooosi, 2021; Tsai et al., 2017) o la autofagia (C. Gao et al., 2020; Ling et al., 2017), además de efectos antiproliferativos (Sun et al., 2015; Cai et al., 2013) inclusive inhiben la migración celular de las células de HCC (J. Liu et al., 2020; Hsieh et al., 2014). En los modelos murinos estos fármacos han demostrado potenciar los efectos antitumorales del sorafenib en presencia de marcadores asociados con la activación de las caspasas involucradas en la apoptosis (Zhu et al., 2017; Ling et al., 2017). Aunado a lo anterior diferentes estudios han demostrado el potencial de estos fármacos para hacer frente a la resistencia al sorafenib (Hu et al., 2023; X. Yang et al., 2021; Lai et al., 2020; Matsuda et al., 2014).

En este trabajo se evaluó el efecto de la combinación de sorafenib, ácido valproico y metformina sobre la muerte celular, el potencial clonogénico e invasivo de células de HCC humano. Además se evaluaron los niveles de expresión de 43 proteínas relacionadas con la apoptosis y mediante inmunoblotting se confirmó la escisión y la actividad de las caspasas involucradas en la apoptosis intrínseca. Mediante esta técnica se evaluaron marcadores de autofagia temprana y diferentes proteínas de interés involucradas en las vías de señalización intracelular. Además se evaluó el efecto de la combinación en machos BALB/c desnudos xenoinjertados con células de HCC humano y tratados durante 21 días. Al finalizar el protocolo, se midieron el volumen y la masa tumoral además de diferentes marcadores relacionados con la función hepática y renal.

2. ANTECEDENTES

2.1 Hepatocarcinoma

El cáncer hepático primario es una enfermedad del hígado ubicada por el GLOBOCAN en el octavo lugar de incidencia y fue la cuarta causa de muerte por cáncer a nivel mundial en el 2022. En México se ubica en el décimo lugar en incidencia y en el sexto lugar en mortalidad (Bray et al., 2024). Los subtipos de cáncer hepático son el colangiocarcinoma intrahepático, el combinado de colangiocarcinoma intrahepático y el carcinoma hepatocelular o hepatocarcinoma (Zhou et al., 2023). Este último destaca por una prevalencia estimada en ~ 90 % del total de cánceres hepáticos primarios (Kim y Viatour, 2020).

Los factores de riesgo asociados al desarrollo de HCC incluyen las infecciones crónicas por virus de hepatitis B (HVB) o C (HVC), la ingesta de alimentos contaminados con aflatoxinas, el alcoholismo, la diabetes y la enfermedad del hígado graso no alcohólico (Saitta et al., 2019; Petrick y McGlynn, 2019; Magnussen y Parsi, 2013). Esta última destaca como el principal factor de riesgo en México (Cisneros-Garza et al., 2022). Cabe mencionar que la cirrosis hepática ha sido observada en un 80 % de los pacientes diagnosticados con HCC (Desai et al., 2019) y su presencia incrementa el riesgo de desarrollar HCC independientemente de la etiología del mismo (Fattovich et al., 2004).

A nivel mundial el desarrollo de HCC es más frecuente en hombres que en mujeres con una relación estimada de 4:1 (Park et al., 2015) sin embargo, en México y otros países de Latinoamérica es de 1:1 (Sung et al., 2021; Petrick y McGlynn, 2019). Algunos autores han sugerido un rol protector de los estrógenos en las mujeres (Nevola et al., 2023) en el que el papel de la interleucina 6 es determinante durante la hepatocarcinogénesis (Naugler et al., 2007) debido a su participación en procesos de proliferación e inflamación (Natri et al., 2019). Los principales mecanismos moleculares involucrados en la hepatocarcinogénesis incluyen la reactivación de la telomerasa transcriptasa reversa (TERT), sobreactivación en vías de señalización como las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK), la vía de β -catenina o la vía de la fosfatidilinositol 3 cinasa de clase III (PI3K). Además se han descrito mutaciones que ocasionan la pérdida de función de la proteína tumoral 53 (TP53) o en el correpresor transcripcional 1 de RB (RB1) (Ho et al., 2016).

Los tratamientos disponibles para las etapas 0, A y B incluyen el trasplante de hígado, la resección hepática, la ablación y la quimioembolización transarterial. Aquellos casos en etapa B o intermedia que presentan nódulos tumorales en ambos lóbulos hepáticos, son candidatos a terapia sistémica. Este tipo de terapia es la única opción disponible para los pacientes en etapas C o avanzado. Para aquellos pacientes en etapa D o terminal se sugiere el mejor tratamiento paliativo disponible (Reig et al., 2022; Llovet et al., 2021).

Debido a la ausencia de sintomatología en las etapas más tempranas de la enfermedad la mayor parte de los pacientes son diagnosticados en las etapas B y C (Park et al., 2015) lo que reduce el abanico de opciones terapéuticas. Para aquellos pacientes candidatos a recibir terapia sistémica, la primera línea de tratamientos incluye el uso de anticuerpos monoclonales dirigidos hacia el ligando 1 de muerte celular programada también denominado PDL1 o molécula CD274 (CD274), hacia el factor de crecimiento endotelial vascular A (VEGFA) o la proteína 4 asociada a linfocitos T citotóxicos (CTLA4) (Finn et al., 2020; Abou-Alfa et al., 2018). No obstante cuando el tratamiento con inmunoterapia no es factible, el uso de inhibidores del tipo tirosina-cinasa como el sorafenib esta recomendado (Reig et al., 2022).

Debido a la ausencia de sintomatología en las etapas más tempranas de la enfermedad la mayor parte de los pacientes son diagnosticados en las etapas B y C (Park et al., 2015) lo que reduce el abanico de opciones terapéuticas. Para aquellos pacientes candidatos a recibir terapia sistémica, la primera línea de tratamientos incluye el uso de anticuerpos monoclonales dirigidos hacia el ligando 1 de muerte celular programada también denominado PDL1 o molécula CD274 (CD274), hacia el factor de crecimiento endotelial vascular A (VEGFA) o la proteína 4 asociada a linfocitos T citotóxicos (CTLA4) (Finn et al., 2020; Abou-Alfa et al., 2018). No obstante cuando el tratamiento con inmunoterapia no es factible, el uso de inhibidores del tipo tirosina-cinasa como el sorafenib esta recomendado (Reig et al., 2022).

Estos grados hacen referencia a la severidad de los eventos adversos, los cuales de acuerdo con los criterios comunes de terminología para eventos adversos (CTCAE – versión 6) son clasificados en 5 niveles. El grado I incluye hasta síntomas leves que no requieren intervención,

mientras que los síntomas moderados o que requieren una intervención local mínima o no invasiva pertenecen al grado II. Aquellos síntomas que requieren hospitalización pero no representan un riesgo de vida inmediato o sean deshabilitantes pertenecen al grado III. Los efectos adversos cuyas consecuencias pongan en peligro la vida y requieran una intervención inmediata son clasificados como grado IV. El fallecimiento relacionado a algún evento adverso se considera grado V (National Cancer Institute, 2025).

2.2 Carcinogénesis del HCC

Estudios realizados para elucidar la etiología del HCC han identificado factores de riesgo que promueven el establecimiento de un microentorno celular y molecular que favorece el desarrollo tumoral. Tal es el caso de la infección con HBV que provoca la reactivación de la telomerasa transcriptasa reversa (TERT) (Totoki et al., 2014) lo que favorece la resistencia a la muerte celular y está asociada con un fenotipo tumoral más agresivo (Sze et al., 2021). Este fenotipo patológico está acompañado de otros eventos moleculares como la pérdida de función de la proteína tumoral 53 (TP53), lo que ocasiona alteraciones en procesos esenciales como la reparación del DNA, regulación del ciclo celular y vías de señalización como las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK) (Yeh et al., 2023). En el caso de HVC el establecimiento del entorno cirrótico y pro-tumoral son el resultado de la actividad del sistema inmune sobre los hepatocitos infectados (Shen et al., 2023). En estas células las proteínas virales promueven la expresión de oncogenes como el codificante para la telomerasa transcriptasa reversa (TERT), incrementan la actividad de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK) asociadas con la proliferación celular y mediante el secuestro de supresores tumorales como la proteína tumoral 53 (TP53) o el correpresor transcripcional 1 de RB (RB1) permiten condiciones que favorecen la adquisición de mutaciones (Stella et al., 2022).

Otro factor comúnmente observado en pacientes con obesidad y diabetes es la enfermedad del hígado graso no alcohólico (Caballeria y Caballeria, 2016), la cual es el principal factor de riesgo para el desarrollo de HCC identificado en México (Cisneros-Garza et al., 2022). Esta enfermedad genera el establecimiento de un entorno cirrótico debido a la muerte de los hepatocitos por lipotoxicidad (Sanyal et al., 2010), el cual provoca alteraciones en la actividad de las proteínas

quinasas activadas por mitógenos (MAPK) y el eje conformado por la fosfatidil inositol 3 cinasa de clase III (PI3K), AKT serina/treonina cinasa 1 (AKT1) y la cinasa blanco mecánico de rapamicina en mamíferos (MTOR) (Kutlu et al., 2018).

Por otro lado las aflatoxinas pueden formar aductos que generan mutaciones en proteínas críticas para el correcto funcionamiento celular, tales como la pérdida de función en la proteína tumoral 53 (TP53) (Gouas et al., 2009) que tiene un impacto crítico sobre diferentes mecanismos celulares dentro de los cuales destacan la proliferación sostenida y la evasión de mecanismos de muerte celular regulada (Ozaki y Nakagawara, 2011).

En el caso de la hemocromatosis y el consumo excesivo de alcohol, el daño hepático ocurre como resultado de la acumulación de hierro o de los metabolitos del alcohol en los hepatocitos (Kowdley, 2004). Inclusive el acetaldehído formado durante el metabolismo del alcohol tiene actividad carcinogénica (Testino et al., 2014) al provocar mutaciones que promueven el establecimiento del entorno cirrótico y la pérdida del control proliferativo celular (Sanyal et al., 2010).

Por otro lado, los principales genes identificados con mutaciones asociadas al desarrollo de HCC son la telomerasa transcriptasa reversa (TERT) con una prevalencia del 90 % de los casos, seguido por mutaciones los genes codificantes para la β -catenina y la proteína tumoral p53 (TP53) con una prevalencia del 40 al 60 %, mutaciones en el protooncogén RAS GTPasa (KRAS), en el factor de transcripción bHLH protooncogén MYC (MYC) y en la subunidad del factor de transcripción AP-1 protooncogén Fos (FOS) que ocurren en el 30 a 60 % de los casos y las menos frecuentes que ocurren en la proteína con dominio 1A de interacción rico en AT (ARID1A) visto en un 10 o 15 % y en el correpresor transcripciones 1 de RB (RB1) con menos del 5 % de los casos (Choi y Thung, 2023; Alqahtani et al., 2019).

2.3 La vía MAPK-MAPK1 en HCC

La vía conformada por las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK) es utilizada para llevar señales del espacio extracelular hacia el interior de la célula (Dimri y Satyanarayana,

2020) y puede activarse en respuesta a factores de crecimiento y citocinas (Chen et al., 2019). Esta vía se encuentra conformada por al menos tres familias de proteínas dentro de las cuales se encuentra la familia de la cinasa c-jun N-terminal, la proteína activada por mitógenos 14 y la proteína cinasa 1 activada por mitógenos también llamada ERK (MAPK1) (Moon y Ro, 2021).

La cascada de señalización de la proteína cinasa 1 activada por mitógenos (MAPK1) comienza en los receptores del tipo tirosina-cinasa (RTK) cuyos miembros incluyen al receptor del factor endotelial vascular (VEGFR), el receptor del factor de crecimiento epidermal (EGFR), el receptor beta del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR), el receptor 1 del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR1), al receptor 1 del factor de crecimiento semejante a insulina (IGF1R), el receptor tirosina cinasa protooncogén MET (MET) y el receptor tirosina cinasa protooncogén KIT (KIT) (Dimri y Satyanarayana, 2020). La interacción de estos receptores con sus ligandos provocan cambios conformacionales que favorecen el reclutamiento de proteínas accesorias que activan a la superfamilia de GTPasas pequeñas Ras (RAS) mediante fosforilación. Esta señal es posteriormente transducida mediante una serie de fosforilaciones secuenciales que se dirigen hacia la familia de proteínas cinasas RAF (RAF), la actividad cinasa de la familia de cinasas proteínas cinasas activadas por mitógenos (MEK) continua con la cascada de señalización lo que ocasiona la fosforilación de la proteína cinasa 1 activada por mitógenos (MAPK1) (Moon y Ro, 2021; Delire y Stärkel, 2015). La fosforilación de la proteína cinasa 1 activada por mitógenos (MAPK1) activa procesos de proliferación, angiogénesis, remodelación de la matriz extracelular (Y. Guo et al., 2020; Delire y Stärkel, 2015) y promueve la expresión de genes relacionados con la inhibición de la apoptosis a través de la interacción con la proteína de unión 1 al elemento de respuesta cAMP (CREB1) (Balmanno y Cook, 2009).

La vía de señalización MAPK-MAPK1 es de interés debido a que presenta mutaciones en una amplia variedad de tipos de cáncer que incluyen al cáncer colorectal, melanoma, carcinoma tiroideo entre otros (Y. J. Guo et al., 2020). Esta vía se encuentra sobreactivada en al menos el 50 % de los pacientes con HCC, por lo que ha sido considerada un blanco terapéutico (Neuzillet et al., 2014; Hoffmann et al., 2011). Los estudios para identificar las posibles causas de la sobreactivación han demostrado una baja frecuencia de mutaciones puntuales en los miembros de esta cascada de señalización (Moon y Ro, 2021; Taketomi et al., 2013) y apuntado a los receptores RTK como los

principales responsables de la actividad aberrante. En particular el receptor del factor endotelial vascular (VEGFR) y el receptor del factor de crecimiento epidermal (EGFR) se han encontrado sobreexpresados en pacientes con HCC (Poon et al., 2004) lo que ha sido asociado con la promoción de procesos de proliferación, evasión de apoptosis, metástasis e inclusive con el desarrollo de resistencia farmacológica (Yang y Liu, 2017; Li et al., 2016).

La inhibición de los receptores RTK y de algunos miembros de esta cascada mediante inhibidores farmacológicos como el sorafenib (Adnane et al., 2006 ; Wilhelm et al., 2006) es una de las estrategias actuales en el tratamiento del HCC avanzado (Reig et al., 2022), cuyo incremento en la sobrevida de los pacientes demuestra la relevancia de esta vía en la progresión y tratamiento del HCC.

2.4 Sorafenib en HCC

El sorafenib es un inhibidor de RTK aprobado en 2005 por la FDA para el tratamiento de carcinoma renal (Kane et al., 2006), y en 2008 recibió la aprobación de uso para el tratamiento de HCC avanzado (Lang, 2008). Actualmente forma parte de la primera línea de tratamiento de acuerdo con la BCLC y es la opción recomendada cuando los pacientes no son candidatos a inmunoterapia o a tratamientos curativos como el trasplante hepático o la resección hepática (Reig et al., 2022).

El sorafenib forma parte de la terapia dirigida conformada por fármacos con blancos moleculares específicos dentro de los que se encuentran el receptor del factor endotelial vascular (VEGFR), receptor del factor de crecimiento epidermal (EGFR), el receptor tirocina cinasa protooncogén KIT (KIT), el receptor tirocina cinasa protooncogén MET (MET), el receptor 1 del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR1), al receptor tirosina cinasa 3 relacionado con FMS (FLT3) y otros receptores como el del protooncogén RET (RET) (Gong et al., 2017; Cervello et al., 2012; Gomaa et al., 2008) los cuales transducen señales intracelulares mediante la vía MAPK-MAPK1 (Wilhelm et al., 2004). Durante los estudios de fase clínica incrementó a 10.7 meses la sobrevida total comparado contra 7.9 meses de los pacientes del grupo placebo. Este incremento de aproximadamente 3 meses (Llovet et al., 2008) aunado a la mejoría de la atención médica y el

uso de antivirales para HBV y HCV ha incrementado hasta 13.4 meses la sobrevida promedio de acuerdo con un metaanálisis (Tan et al., 2023).

Los pacientes tratados con sorafenib comúnmente desarrollan efectos secundarios que incluyen la reacción dérmica mano-pie, sarpullido, diarrea, náusea e hipertensión (Llovet et al., 2008). La reacción dérmica mano-pie es el síntoma más frecuentemente observado y la severidad de esta reacción ha sido asociada con el incremento en la concentración en plasma del sorafenib (Kanbayashi et al., 2016). Algunos estudios clínicos han mostrado que el porcentaje de pacientes que pueden beneficiarse de los efectos del sorafenib es limitado (Cheng et al., 2009; Llovet et al., 2008). Esta heterogeneidad en la respuesta podría deberse a diferencias en las vías de señalización, en los sistemas de transporte intracelular y extracelular, en los receptores diana del fármaco, en las enzimas metabolizadoras y a otros factores individuales como la presencia de comorbilidades y la edad (George et al., 2021; Cabral et al., 2020). Por otro lado el desarrollo de resistencia farmacológica es un factor asociado a la ineficacia del tratamiento y el consecuente abandono del tratamiento (P. Wang et al., 2018).

Acerca de los mecanismos celulares involucrados en los efectos antitumorales del sorafenib aún no se han elucidado completamente, sin embargo, algunos estudios han relacionado sus efectos antiproliferativos y antiangiogénicos con la inhibición de vías de señalización mitogénicas específicamente con la vía MAPK-MAPK1 (Adnane et al., 2006). Con respecto a sus efectos sobre la muerte celular algunos estudios han observado la activación de mecanismos como la piroptosis (Hage et al., 2019), necroptosis (Liao et al., 2021) y más recientemente la ferroptosis (Guo et al., 2023; Eum et al., 2013). La inducción de apoptosis mediada por el sorafenib ha sido observada en diferentes tipos de cáncer (Grossi et al., 2012; Schult et al., 2010) y ampliamente reportada en modelos de cáncer hepático (Sonntag et al., 2014; Fernando et al., 2012).

2.5 Efectos del sorafenib en la apoptosis

Actualmente se conocen dos mecanismos involucrados en la apoptosis cuya principal diferencia es el estímulo que los activa. La vía extrínseca de la apoptosis es activada por la unión del ligando del receptor de muerte en la superficie Fas (FASLG) con el receptor de muerte en la

superficie Fas (FAS), por el ligando del receptor del factor de necrosis tumoral (TNF) y su interacción con el miembro 1A de la superfamilia del receptor TNF (TNFRSF1A) o por la unión del miembro 10 de la superfamilia TNF o (TNFSF10) con el miembro 10A de la superfamilia del receptor TNF (TNFRSF10A). Esta interacción promueve el ensamble de un complejo formado por proteínas accesorias en el dominio intracelular del receptor, para formar un centro de reacción catalítica que permite la escisión de la procaspasa 8 durante la fase reguladora. En la fase ejecutora la caspasa 8 escindida activa mediante corte proteolítico a la procaspasa 3 y a la procaspasa 7 cuyas formas escindidas son iniciadoras irreversibles de la degradación intracelular caracterizada por la escisión de la poli ADP ribosa polimerasa 1 (PARP1), la fragmentación del DNA, el desensamble de estructuras de andamiaje intracelular como los microtúbulos y la membrana extracelular para culminar con la muerte celular (Kanehisa et al., 2025; Galluzzi et al., 2018; Duprez et al., 2009; Kanehisa y Goto, 2000).

A diferencia de la anterior, la forma intrínseca de la apoptosis es activada por un factor estresante o por una perturbación intracelular que activa la transducción de señales mediante los factores apoptóticos. Estos factores se encuentran constituidos por proteínas de la familia Bcl-2 tales como el regulador de la apoptosis X asociado a BCL2 (BAX), el agonista de muerte celular asociado a BCL2 (BAD), el modulador de la apoptosis dependiente de p53 (PUMA), la proteína agonista de la muerte celular con dominio de interacción BH3 (BID), la proteína 11 semejante a BCL2 (BCL2L11) y otros elementos con dominios BH3 cuya función es promover la apoptosis. Con funciones opuestas a los anteriores están los factores asociados con un mecanismo antiapoptótico, tales como el miembro de la familia BCL2 regulador de apoptosis MCL1 (MCL1), el regulador de apoptosis BCL2 (BCL2), la proteína 1 semejante a BCL2 (BCL2L1) y la proteína 2 semejante a BCL2 (BCL2L2) (Pihán et al., 2017; Haupt et al., 2003;).

Al ocurrir una perturbación que enriquezca el perfil proapoptótico, la señal es transducida al regulador de la apoptosis X asociado a BCL2 (BAX) y el antagonista 1 de BCL2 (BAK1), posteriormente éstas se translocan a la membrana mitocondrial para dar lugar a la formación de un poro por el que se libera el citocromo C somático (CYCS), el cual en asociación con la caspasa 9 y el factor 1 activador de la peptidasa apoptótica (APAF1) forman una ultraestructura denominada apoptosoma. El dominio catalítico del apoptosoma escinde a la caspasa 9 y genera la forma activa

que tiene como blancos a la caspasa 3 y 7, cuya activación inicia la fase ejecutora de la apoptosis caracterizada por la escisión de la poli ADP ribosa polimerasa 1 (PARP1), la degradación del DNA y la ruptura de otras estructuras celulares (Kanehisa et al., 2025; Kanehisa y Goto, 2000).

Estudios realizados en diferentes tipos de cáncer han reportado que el tratamiento con sorafenib indujo apoptosis en líneas celulares de leucemia (Schult et al., 2010), de cáncer pulmonar de células pequeñas (Zhang et al., 2014), de cáncer colorectal (Grossi et al., 2012) y en modelos de cáncer hepático como colangiocarcinoma (Blechacz et al., 2009) y HCC (Zhu et al., 2017; Wei et al., 2015). Los estudios llevados a cabo sobre líneas de HCC han demostrado un enriquecimiento del perfil proapoptótico a nivel de RNA y de proteína (Sonntag et al., 2014; Zhao et al., 2013; Fernando et al., 2012). Inclusive en modelos murinos xenotransplantados con células de HCC el tratamiento con sorafenib ocasionó la disminución del volumen tumoral de forma dependiente de la concentración (Liu et al., 2006) acompañado por la activación de caspasas ejecutoras (Garten et al., 2019; Ling et al., 2017; Huynh et al., 2009; Liu et al., 2006).

El sorafenib modula la actividad de factores tales como TP53, el factor de transcripción forkhead box M1 (FOXO1) (Wei et al., 2015), el factor de transcripción 1 E2F (E2F1) (Zhai et al., 2013) y proteínas como el transductor de señal y activador de la transcripción 3 (STAT3) (Blechacz et al., 2009) y la proteína cinasa 1 activada por mitógenos (MAPK1) (Liang et al., 2017; Liu et al., 2006). Este último factor ha sido propuesto como un marcador de respuesta al tratamiento con sorafenib (Liang et al., 2017) y desempeña funciones asociadas con la inhibición de la apoptosis ya que mediante su asociación con la proteína de unión 1 al elemento de respuesta cAMP (CREB1) promueve la expresión genes con funciones anti apoptóticas como el regulador de apoptosis BCL2 (BCL2), la proteína 1 semejante a BCL2 (BCL2L1) y el miembro de la familia BCL2 regulador de apoptosis MCL1 (MCL1) (Figura 1).

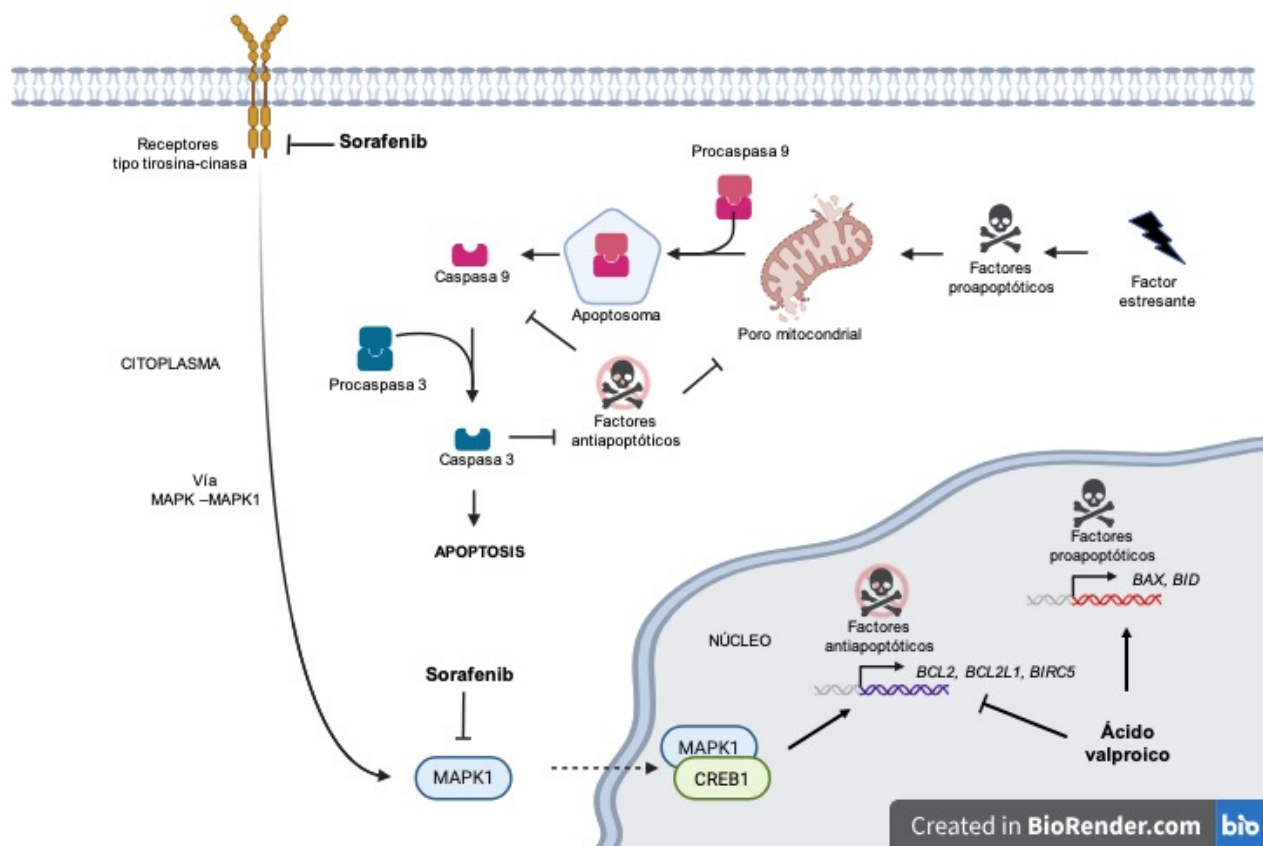


Figura 1. Mecanismo molecular involucrado en la inducción de apoptosis intrínseca mediada por el sorafenib y el ácido valproico. El incremento en la cantidad de factores proapoptóticos promueve la formación del poro mitocondrial lo que facilita el ensamblaje del apoptosoma y la escisión de las caspasas 9 y 3 durante la fase final de la apoptosis. Este proceso es inhibido por medio del incremento en la cantidad de factores antiapoptóticos. El sorafenib inhibe la transcripción de los factores antiapoptóticos mediante la inactivación de los receptores tipo tirosina-cinasa y la actividad de MAPK1. La actividad HDACi del ácido valproico promueve la apoptosis al favorecer la transcripción de genes proapoptóticos e inhibe la expresión de los factores antiapoptóticos. Imágenes creadas con BioRender. Abreviaturas: BAX: Regulador de la apoptosis X asociado a BCL2; BID: Proteína agonista de muerte celular con dominio de interacción BH3; BCL2: Regulador de la apoptosis BCL2; BCL2L1: Proteína semejante a 11; BIRC5: Proteína 5 con repetidos IAP baculovirales; CREB1: Proteína de unión 1 al elemento de respuesta cAMP; MAPK: Proteínas cinasas activadas por mitógenos; MAPK1: Cinasa activada por mitógenos 1.

2.6 Autofagia y sorafenib

Durante el tratamiento con sorafenib es poco frecuente observar pacientes que alcancen una respuesta completa y la mayoría de ellos muestran progresión de la enfermedad (Assenat et al.,

2019). Esta progresión o falta de eficacia al tratamiento es conocida como farmacoresistencia y se debe principalmente a factores como la heterogeneidad genética (Cabral et al., 2020) o la disminución de la dosis debido a la aparición de efectos secundarios (Awada et al., 2005). Algunos estudios orientados a la elucidación de los procesos celulares asociados han mostrado la participación de la autofagia (Rodríguez-Hernández et al., 2020; Tai et al., 2013; Shimizu et al., 2012).

La autofagia es un proceso cuya actividad basal incrementa debido a perturbaciones intracelulares como la privación de nutrientes, estrés oxidativo e hipoxia. Forma parte de una estrategia que al reciclar organelos y otros componentes intracelulares permite a las células hacer frente al estrés y recuperar la homeostasis (Yu et al., 2018). Este proceso juega un papel importante en la progresión y tratamiento del cáncer ya que promueve el desarrollo tumoral y la adquisición de resistencia farmacológica. En particular el tratamiento con sorafenib induce la activación de la autofagia (Fischer et al., 2014) asociada con la adquisición de resistencia farmacológica en modelos preclínicos de HCC (Tang et al., 2020; Shimizu et al., 2012).

El proceso autofágico inicia con la etapa de nucleación en el retículo endoplásmico, en la que gracias al reclutamiento de diferentes proteínas se conforma el omegasoma, una estructura compuesta por una bicapa lipídica enriquecida en fosfatidilinositol 3 fosfato (PI3P) la cual sirve de andamiaje para la conformación del autofagosoma. La producción comienza cuando el complejo Ulk que incluye a la cinasa 1 semejante a unc-51 activadora de la autofagia (ULK1) fosforila al complejo de la fosfatidilinositol 3 cinasa de clase III (PI3K) en la membrana celular, esta producción favorece el reclutamiento de diferentes factores accesorios que incluyen a las proteínas con dominios repetidos WD de interacción con PI3P (WIPI) (Dikic y Elazar, 2018; Yu et al., 2018). A continuación, las proteínas con dominios repetidos WD de interacción con PI3P (WIPI), las proteínas asociadas al receptor de ácido- κ -butírico, la proteína 1 de cadena ligera asociada a microtúbulos (LC3BI) y diferentes miembros de la familia de proteínas relacionadas a la autofagia forman un complejo en el retículo endoplásmico. Este complejo además de servir como andamiaje también promueve la conjugación de la proteína 1 de cadena ligera asociada a microtúbulos (LC3BI) con fosfatidil-etanolamina mediante la proteína relacionada a la autofagia 3 (ATG3). Esta modificación permite la formación de la proteína 2 de cadena ligera asociada a

microtúbulos (LC3BII) durante la fase de síntesis y elongación de la membrana del autofagosoma (Hashemi et al., 2023; Dikic y Elazar, 2018).

En esta membrana se localizan los dominios de interacción con LC3 los cuales en conjunto con la proteína sequestosoma 1 o p62 (SQSTM1) sirven como señalización para internalizar el material previamente marcado por ubiquitinación durante la fase de maduración del autofagosoma. Esta fase culmina con el cierre de la membrana y la consecuente fusión con el lisosoma, para dar lugar a la formación del autofagolisosoma, en cuyo interior las hidrolasas ácidas provenientes del lisosoma digieren el contenido para posteriormente ser reciclado por la célula (Dikic y Elazar, 2018).

Previamente, algunos estudios han sugerido que la modulación farmacológica de la autofagia es una estrategia para incrementar los efectos antitumorales de algunos fármacos al facilitar la inducción de apoptosis, disminuir la capacidad clonogénica y proliferativa e inclusive disminuir la adquisición de resistencia a tratamientos como la radioterapia (Hashemi et al., 2023). Actualmente se sabe que la inducción de apoptosis facilitada por la autofagia involucra a una compleja red de interacciones y la participación de proteínas con dominio BCL2, a la proteína sequestosoma 1 (SQSTM1) (Mukhopadhyay et al., 2014; Moscat y Diaz-Meco, 2009), además de diferentes vías intracelulares como la AMPK-MTOR, MAPK-MAPK1 y la conformada por las proteínas sequestosoma 1 (SQSTM1), la proteína asociada 1 Kelch semejante a ECH (KEAP1) y el factor de transcripción 2 NFE2 semejante a bZIP (NRF2) (Kanehisa et al., 2025; Chen et al., 2021; Bartolini et al., 2018; Kanehisa y Goto, 2000) entre otras dependiendo del factor estresante (Hashemi et al., 2023).

Algunos estudios previamente han demostrado que la inducción de autofagia mediante el uso de fármacos con actividad moduladora de la vía AMPK-MTOR (Lai et al., 2020) incluye efectos como la disminución de la proliferación celular (Cai et al., 2013), la inducción de apoptosis (Han et al., 2015) y la disminución del volumen tumoral en modelos murinos de HCC acompañados por la presencia de marcadores de muerte celular relacionados con la apoptosis (Zhou et al., 2023; Huynh et al., 2009). Aunado a lo anterior existe evidencia que muestra la resensibilización de las células resistentes al sorafenib (Lai et al., 2020; Zhai et al., 2014). Estos efectos muestran la

importancia de la señalización del conjunto mecanístico del blanco sensible a rapamicina en mamíferos, el cual es uno de los principales reguladores del metabolismo energético celular, control de la proliferación celular y actúa como un regulador negativo de la apoptosis (Ferrín et al., 2020).

2.7 La vía AMPK-MTOR-AKT1 regula la autofagia

El conjunto mecanístico del blanco sensible a rapamicina en mamíferos (mTOR) es nodo central de diferentes vías de señalización intracelular que actúan en respuesta a la estimulación por factores de crecimiento, hipoxia, privación de nutrientes, estrés genotóxico, oxidativo y del retículo endoplasmático. Este complejo multiproteico regula procesos celulares como la inflamación, angiogénesis, autofagia, reorganización del citoesqueleto, síntesis de proteínas, mitocondrias y lípidos (Kanehisa et al., 2025; González et al., 2020; Laplante y Sabatini, 2009; Kanehisa y Goto, 2000). Las alteraciones en la actividad del mTOR han sido asociadas con desordenes neurológicos, la osteoporosis, la resistencia a la insulina, la atrofia muscular y el cáncer. En el cáncer la actividad aberrante del complejo mTOR puede deberse a mutaciones en genes que codifican para elementos reguladores por arriba de la cascada de señalización y en los genes que codifican para las proteínas miembros del complejo lo que incluye a la cinasa del blanco de rapamicina en mamíferos (MTOR) (Panwar et al., 2023; Saxton y Sabatini, 2017). En estudios realizados en pacientes con HCC se encontró un incremento en su expresión (Sahin et al., 2004), no obstante en la mayoría de los casos el incremento de su actividad se debe a las alteraciones en proteínas por arriba en las vías de señalización como la fosfatidilinositol 3 cinasa de clase III (PI3K), la proteína tumoral 53 (TP53) y otras cuya alteración resulta crucial debido a sus funciones como reguladores directos del mTOR como el complejo de esclerosis tuberosa (TSC) o AKT serina/treonina cinasa 1 (AKT1) (Matter et al., 2014).

El mTOR es un complejo multiproteico conformado por dos grupos diferentes denominados TORC1 y TORC2. Ambos cuentan con actividad fosfotransferasa debido a la presencia de la cinasa del blanco de rapamicina en mamíferos (MTOR) y están conformados por la proteína asociada a mTOR (MLST8) y la proteína de interacción con mTOR con dominio DEP (DEPTOR) (González et al., 2020; Huber et al., 2011). Además de las anteriores en el TORC1 se encuentra la proteína

asociada reguladora del complejo mTOR 1 (RPTOR) y el sustrato 1 de AKT (AKT1S1), el cual regula negativamente a este complejo en respuesta a la estimulación por factores de crecimiento (Sancak et al., 2007). Con respecto al TORC2 en este se encuentra la proteína 1 asociada a MAPK (MAPKAP1) y el acompañante independiente RPTOR del complejo 2 de mTOR insensible a rapamicina (RICTOR).

Por debajo del mTOR se conocen una variedad de blancos que son susceptibles a la fosforilación tales como la proteína 10 de unión al factor de crecimiento (GRB10) o lipin 1 (LPIN1) que participan en el metabolismo de lípidos, la proteína 1 de unión al factor eucariótico de iniciación de traducción 4E (EIF4EBP1) o la proteína ribosomal S6 cinasa B2 (RPS6KB2) cuyas funciones están relacionadas con la síntesis de ribosomas y de proteínas. Participa en la organización del citoesqueleto mediante la fosforilación de la proteína rodopsina (RHO), la proteína cinasa C gamma (PRKCG) y la proteína 1 de enlace con dominio CAP – Gly (CLIP1) (Kanehisa et al., 2025; Hemmings y Restuccia, 2012; Huber et al., 2011; Kanehisa y Goto, 2000).

El mTOR es regulado positivamente por el homólogo Ras de unión a mTORC1 (RHEB) y éste a su vez es inhibido por el complejo TSC el cual esta formado por la hamartina (TSC1) y la tuberina (TSC2). El complejo agrupa señales que conectan al mTOR con diferentes vías de señalización tales como la PI3K-AKT1 o MAPK-MAPK1. Su activación mediante las proteínas AKT serina/treonina cinasa 1 (AKT1) y la proteína cinasa 1 activada por mitógenos (MAPK1) respectivamente, favorece la actividad asociada a los procesos de crecimiento y proliferación celular (Ma et al., 2005; Inoki et al., 2002). Por otro lado la proteína subunidad catalítica alfa 2 de la proteína cinasa activada por AMP (AMPK) inhibe al mTOR de forma indirecta al activar al complejo TSC y de forma directa al fosforilar a la proteína asociada reguladora del complejo MTOR 1 (RPTOR) en el TORC1, por lo que la actividad de la subunidad catalítica alfa 2 de la proteína cinasa activada por AMP (AMPK) favorece la inducción de autofagia (Figura 2) (Paquette et al., 2021; Kim et al., 2011).

La actividad del TORC1 inhibe potentemente la autofagia al prevenir la fosforilación de la cinasa 1 semejante a unc-51 activadora de la autofagia (ULK1) mediada por la subunidad catalítica alfa 2 de la proteína cinasa activada por AMP (AMPK) (Kim et al., 2011), lo que impide el

reclutamiento de las proteínas necesarias para la formación del omegasoma (Dikic y Elazar, 2018). El TORC2 se ha descrito como regulador débil de la autofagia cuyo mecanismo disminuye la expresión de genes relacionados con la autofagia mediante la inhibición del factor de transcripción forkhead box 3 (FOXO3). Por otro lado ejerce una actividad indirecta debido a que participa en un mecanismo de retroalimentación con AKT serina/treonina cinasa 1 (AKT1) mediante la fosforilación de la serina 473 necesaria para la máxima actividad cinasa (Kumar et al., 2025) lo que resulta en la inhibición de la actividad del factor de transcripción forkhead box 3 (FOXO3), el cual modula la expresión de genes relacionados con procesos celulares como la apoptosis, autofagia y senescencia (Kanehisa et al., 2025; Khor y Wong, 2024; Kanehisa y Goto, 2000).

La inhibición del complejo mTOR ha demostrado potencial terapéutico debido a que sus efectos incluyen la disminución del tamaño tumoral, de la cantidad de focos metastáticos y el incremento de la supervivencia en diferentes modelos pre-clínicos de HCC (Thomas et al., 2012; Semela et al., 2007) mediados por el eje AMPK-mTOR (El-Sewedy et al., 2023; Kim et al., 2021; Gao et al., 2020). Estos efectos antitumorales han sido asociados con la disminución en la expresión de genes antiapoptóticos y el incremento de aquellos relacionados con la autofagia (Thomas et al., 2012). En este sentido el reposicionamiento farmacológico de la metformina es de interés, ya que fue descrita como inhibidor del complejo mTOR mediante la activación de la subunidad catalítica alfa 2 de la proteína cinasa activada por AMP (AMPK) y la inducción de la autofagia mediada por la inhibición del TORC1 (Ling et al., 2017; Zhai et al., 2014) (Figura 2).

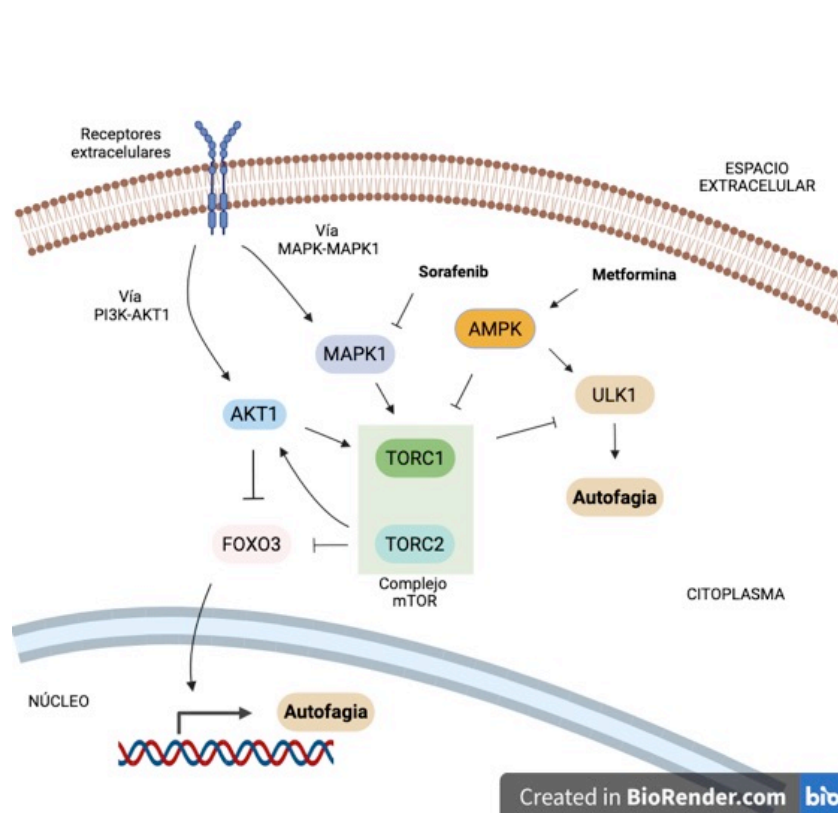


Figura 2. Mecanismo molecular de señalización implicado en la regulación farmacológica de la autofagia. Las vías intracelulares MAPK-MAPK1 y la vía PI3K-AKT1 transducen señales desde el espacio extracelular que culminan con la activación del TORC1. La actividad del TORC1 inhibe la autofagia mediante la inhibición de ULK1. Por su parte el TORC2 disminuye la expresión de genes relacionados con la autofagia mediante la fosforilación de FOXO3 e incrementa la actividad cinasa de AKT1. El sorafenib, el ácido valproico y la metformina participan indirectamente en la regulación de la actividad del complejo mTOR mediante la modulación en la actividad de MAPK1, AKT1 y AMPK respectivamente. Abreviaturas: AMPK: Proteína subunidad catalítica alfa 2 de la proteína cinasa activada por AMP; AKT1: AKT serina/treonina cinasa 1; FOXO3: Factor de transcripción forkhead box 3; MAPK: proteínas cinasas activadas por mitógenos; MAPK1: Cinasa activada por mitógenos 1; mTOR: Conjunto mecanístico del blanco sensible a rapamicina en mamíferos; PI3K: Fosfatidilinositol 3 cinasa de clase III; RAS: Protooncogén RAS GTPasa; TORC1-2: Grupos asociados a TOR 1 y 2; ULK1: Cinasa 1 semejante a unc-51 activadora de la autofagia.

2.8 Reposicionamiento farmacológico del ácido valproico y metformina en HCC

Como se mencionó más arriba, algunos fármacos comercialmente disponibles en el mercado han sido objeto de investigación debido a su posible reposicionamiento debido a su actividad farmacológica. El reposicionamiento farmacológico es una estrategia que consiste en utilizar fármacos para tratar enfermedades distintas a las que fueron concebidos inicialmente.

Algunas ventajas de esta estrategia frente al diseño *de novo* son la reducción de costos, se cuenta con información acerca de los efectos secundarios (Cha et al., 2018) y de las vías de metabolización (Whirl-Carrillo et al., 2012). Un ejemplo de reposicionamiento exitoso es el caso del minoxidil, el cual fue inicialmente concebido como tratamiento oral para la hipertensión y posteriormente reposicionado satisfactoriamente para el tratamiento de la alopecia, ya que los efectos secundarios incluyen el crecimiento de cabello (Panchaprateep y Lueangarun, 2020). Otro ejemplo es la aspirina, cuya indicación inicial fue como analgésico y debido a sus propiedades antiinflamatorias fue reposicionado exitosamente en 2015 como tratamiento para el cáncer colorectal (Pushpakom et al., 2019).

Acerca de la metformina se trata de una biguanida perteneciente a la familia de los rapálogos administrada oralmente e indicada en el manejo de pacientes con diabetes tipo II. Su uso ha sido asociado con un menor riesgo de desarrollar HCC por causas relacionadas a la diabetes (Cunha et al., 2020; P. Wang et al., 2012; Evans et al., 2005). Los beneficios de añadir metformina al tratamiento con sorafenib aún no han sido claramente elucidados. Algunos de los hallazgos sugieren que la combinación reduce la supervivencia de los pacientes (Casadei Gardini et al., 2015) y la administración secuencial disminuye la eficacia del sorafenib en modelos preclínicos (Harati et al., 2021). En contraste con esta evidencia otros hallazgos sugieren un incremento en la función hepática y la reducción tumoral acompañada del incremento en la supervivencia (Schulte et al., 2019). Inclusive la potenciación de los efectos antitumorales del sorafenib ha sido reportada consistentemente en modelos preclínicos (Hu et al., 2023; Siddharth et al., 2022; Tang et al., 2022; Lai et al., 2020; Ling et al., 2017; Hsieh et al., 2014).

Con respecto al ácido valproico se trata de un fármaco cuyo uso fue aprobado para el tratamiento de epilepsia y es de interés en el reposicionamiento farmacológico debido a sus efectos epigenéticos. Este fármaco fue descrito como inhibidor de histonas desacetilasas (HDACi) con el potencial de modificar la expresión genética (Krämer et al., 2003; Gottlicher et al., 2001). Esta actividad podría ser de valor durante el tratamiento del HCC ya que los pacientes presentan perfiles epigenéticos aberrantes que favorecen el desarrollo de esta malignidad (Freese et al., 2019). Estos perfiles podrían ser modulados por el ácido valproico (Tsilimigras et al., 2018; Gao et al., 2015) el

cual además ha demostrado potenciar los efectos del sorafenib en modelos preclínicos de HCC (X. Y. et al., 2021; J. Liu et al., 2020; Zhu et al., 2017; Matsuda et al., 2014).

2.9 Ácido valproico y sorafenib en HCC

La actividad HDACi del ácido valproico provoca cambios en el perfil epigenético celular al modificar la estructura tridimensional de la cromatina. En las células eucariotas esta estructura resulta del empaquetamiento del DNA, el cual se encuentra organizado rodeando a las histonas. Estas histonas son proteínas que son susceptibles a modificaciones postraduccionales como las fosforilaciones, metilaciones, acetilaciones, ADP-ribosilaciones, ubiquitinaciones, lactilaciones, entre otras que en conjunto con otros mecanismos epigenéticos regulan la expresión genética (Hu et al., 2024; Bannister y Kouzarides, 2011). Las modificaciones postraduccionales son llevadas a cabo por diferentes enzimas de transferencia dentro de las cuales destacamos a las histonas desacetilasas (HDAC) por ser blanco del ácido valproico (Massumeh Sanaei y Kavooosi, 2021; Phiel et al., 2001).

Algunos estudios acerca del rol de las HDAC en el desarrollo del HCC han relacionado su actividad con la inhibición de la apoptosis (Massumeh Sanaei y Kavooosi, 2021), la desregulación del ciclo celular, la disminución en la expresión de supresores tumorales (Wang et al., 2018; Fan et al., 2014), además de la inducción de angiogénesis (Qian et al., 2006) y del perfil prometastático caracterizado por la transición epitelio-mesenquimal (EMT) (Hu et al., 2020). Inclusive la sobreexpresión de las HDAC ha sido asociada con una reducción en la sobrevivencia de los pacientes con HCC (Freese et al., 2019).

Reportes previos orientados a la elucidación del valor terapéutico de los HDACi han mostrado resultados alentadores en el tratamiento del cáncer (Toh et al., 2019) debido a sus efectos antiproliferativos (J. Zhao et al., 2018; Mandl-Weber et al., 2010) y el aumento en la sobrevida de los pacientes tratados con sorafenib (Tak et al., 2018; Bitzer et al., 2016; Plumb et al., 2003). Sin embargo, en algunos casos se han observado efectos secundarios de grado 3 o superiores en el 5 % de los pacientes (Yeo et al., 2012) Estos hallazgos sugieren un potencial valor terapéutico de los HDACi en el tratamiento del HCC (Tsilimigras et al., 2018) y la necesidad de evaluar sus efectos.

El ácido valproico es un fármaco con actividad inhibidora de las histonas desacetilasas (Sanaei y Kavooosi, 2021; Sun et al., 2015; Yang et al., 2014; Phiel et al., 2001) cuyos efectos epigenéticos han sido descritos en diferentes tipos de cáncer (Yagi et al., 2010; Milutinovic et al., 2007; Gottlicher et al., 2001). Acerca de los efectos de este fármaco en el HCC algunos reportes incluyen promover un fenotipo tumoral más agresivo mediante el incremento en la actividad de marcadores relacionados con la transición epitelio-mesenquima (L. Wu et al., 2016) en contraste con otros reportes que indican la inducción de arresto celular (Yu et al., 2017; W. Yang et al., 2015) y la disminución de la viabilidad (Masumeh Sanaei et al., 2018) acompañada por la inducción de apoptosis (Masumeh Sanaei et al., 2018; Zhu et al., 2017). Este incremento en la muerte celular ocurre mediante la disminución en los niveles de RNA y proteína de factores antiapoptóticos como el regulador de apoptosis BCL2 (BCL2), la proteína 5 con repetidos IAP baculovirales (BIRC5) (Li et al., 2013) y BCL2L1 (J. Liu et al., 2020; Armeanu et al., 2005) aunado al incremento en los niveles del regulador de la apoptosis X asociado a BCL2 (BAX) (Li et al., 2013) y la proteína agonista de muerte celular con dominio de interacción BH3 (BID) cuya actividad favorece la inducción de la apoptosis (Figura 1) (Armeanu et al., 2005). El incremento en los factores proapoptóticos favorece la formación del poro mitocondrial y el ensamble de una ultraestructura llamada apoptosoma. La función de esta estructura ocurre durante la fase ejecutora y consiste en la activación de la caspasa 9, lo que conlleva la escisión irreversible de la caspasa 3 y culmina con la apoptosis (Elmore, 2007). La inhibición de las caspasas disminuyó la muerte celular ocasionada por el ácido valproico (W. Yang et al., 2015).

Como parte de la búsqueda de un co-tratamiento para optimizar la terapia farmacológica, el añadir ácido valproico al tratamiento con sorafenib ha demostrado ser capaz de sobreponerse a la resistencia inducida mediante el factor de crecimiento transformante β (TGF- β) (Hu et al., 2023; Lai et al., 2020; J. Liu et al., 2020) al incrementar la citotoxicidad y la muerte celular inducida por el sorafenib mediante la disminución en los niveles de la AKT serina/treonina cinasa 1 y de su forma fosforilada en células de HCC (X. Yang et al., 2021). Esta combinación disminuye con mayor eficiencia el peso y el volumen tumoral comparado contra el tratamiento únicamente con sorafenib. Además esta combinación farmacológica no afectó negativamente el peso corporal ni

ocasionó daño en el tejido hepático ni renal, lo que sugiere que la combinación es bien tolerada (Zhu et al., 2017).

2.10 Metformina y sorafenib en HCC

La metformina es un biguanida derivada de *Galega officinalis* utilizada para regular los niveles de azúcar en pacientes con diabetes tipo II (Graham et al., 2011). Esta enfermedad es considerada un factor de riesgo asociado al HCC (Papadakis et al., 2023; McGlynn y London, 2011) cuya prevalencia es mayor en la población latina (Setiawan et al., 2014). Actualmente el valor terapéutico de la metformina es motivo de debate debido a que algunos estudios indican que los pacientes diabéticos que reciben este fármaco y son diagnosticados con HCC tienen un menor riesgo de muerte asociada al HCC (Hatia et al., 2025) por lo que se le ha sugerido con un rol protector (P. Wang et al., 2012), en contraste con otros autores quienes han asociado el uso de este fármaco con un mal pronóstico (Azit et al., 2022).

Durante la hepatocarcinogénesis algunos estudios han observado que la metformina provocó una tendencia a disminuir la cantidad de nódulos tumorales y el número de focos celulares con alteraciones morfológicas en un modelo murino de HCC. Lo anterior fue ocurrido de forma concomitante con el incremento en los niveles de fosforilación de la subunidad catalítica alfa 2 de la proteína cinasa activada por AMP (AMPK) y la disminución en la actividad del mTOR (Jo et al., 2016; Ohno et al., 2015). Durante la elucidación de los efectos antitumorales de este fármaco se observó que redujo la proliferación (Cai et al., 2013), la movilidad (Ferretti et al., 2019; Y. Zhao et al., 2018) e incrementó la muerte celular (Y. Sun et al., 2016; Han et al., 2015) por medio de la activación de la autofagia (; X. Yang et al., 2021; Lai et al., 2020; S. Liu et al., 2020; Tsai et al., 2017) mediada por la vía AMPK-mTOR en HCC (Gao et al., 2020).

Los reportes previos acerca del efecto de la metformina sobre la muerte celular indican que la disminución de la viabilidad (Y. Zhao et al., 2018; Fujimori et al., 2015) ocurre mediante la activación de mecanismos de muerte celular regulada tales como la ferroptosis (Hu et al., 2023), piroptosis (Liu et al., 2023), apoptosis (Li et al., 2020; Sun et al., 2016; Qu et al., 2012) y de autofagia (Gao et al., 2020; Ling et al., 2017; Tsai et al., 2017). El proceso autofágico inicia con la

activación de la proteína subunidad catalítica alfa 2 de la proteína cinasa activada por AMP (AMPK) y la posterior inhibición del mTOR resulta de particular interés en el tratamiento del HCC ya que incrementa los efectos antitumorales del sorafenib (Lai et al., 2020; Chung et al., 2018; Ling et al., 2017).

Los estudios que han profundizado en los mecanismos de apoptosis y autofagia indican que ocurren con la activación de la subunidad catalítica alfa 2 de la proteína cinasa activada por AMP (AMPK). El estudio realizado por Qu y colaboradores (2012) mostró que la proteína 5 con repetidos IAP baculovirales (BIRC5) con función antiapoptótica y sus niveles de mRNA, disminuyeron de forma dosis dependiente al tratamiento con metformina. Este efecto fue mediado por la activación de la proteína subunidad catalítica alfa 2 de la proteína cinasa activada por AMP (AMPK) cuya transducción de señales mediante el mTOR redujo la fosforilación de la proteína ribosomal S6 cinasa B2 (RPS6KB2) (Qu et al., 2012). La activación por fosforilación de la proteína subunidad catalítica alfa 2 de la proteína cinasa activada por AMP (AMPK) (Yang et al., 2018; Sun et al., 2016) está mediada por la serina/treonina cinasa 11 (STK11) también conocida como LKB1 (Chen et al., 2013), y posteriormente por la inhibición del TORC1 (Lu et al., 2021) de forma dependiente de la concentración (Gao et al., 2020). Además, la metformina induce la expresión de genes involucrados en la autofagia de forma dependiente de la proteína subunidad catalítica alfa 2 de la proteína cinasa activada por AMP (AMPK) (Chung et al., 2018), incrementa los niveles de fosforilación de la cinasa 1 semejante a unc-51 activadora de la autofagia (ULK1) (Hong et al., 2022), disminuye los niveles de sequestosoma 1 (SQSTM1) (Del Campo et al., 2018), ocasiona un incremento de autofagosomas (Yang et al., 2018; Ling et al., 2017) y del flujo autofágico (Tsai et al., 2017; Kim et al., 2011), además de disminuir el volumen tumoral en los modelos preclínicos de HCC (Ling et al., 2017; J. Li et al., 2015). No obstante los efectos de la metformina aún son motivo de debate ya que existen reportes que sugieren que la activación de la autofagia depende de las diferencias en los niveles basales de autofagia presentes en los modelos de estudio (H. Yang et al., 2015).

Acerca del tratamiento combinado de sorafenib con metformina, Ling y colaboradores (2017) reportaron un incremento en la muerte celular mediante la inducción de la apoptosis intrínseca y de la autofagia mediada por la activación de la proteína subunidad catalítica alfa 2 de

la proteína cinasa activada por AMP (AMPK). Durante la evaluación de los efectos de esta combinación en un modelo murino los autores indicaron que no observaron pérdida de peso asociada con el tratamiento combinado acompañado de un incremento en la inhibición del crecimiento tumoral. Durante la evaluación de los tejidos provenientes de los xenoinjertos se observó un incremento de células positivas para la tinción por TUNEL y para la forma escindida de la caspasa 3, además de la reducción en el marcador de proliferación Ki-67. La elucidación del mecanismo molecular de señalización reveló que la combinación de sorafenib y metformina redujo la fosforilación de AKT serina/treonina cinasa 1 (AKT1) y la proteína cinasa 1 activada por mitógenos (MAPK1) de forma más eficiente que la monoterapia (Ling et al., 2017). En otro estudio, se observó un efecto sinérgico en la inhibición tumoral, además de haber demostrado que son dependientes de la secuencia de administración (Harati et al., 2021). Este incremento en los efectos ha sido consistentemente observado en otros estudios de combinación (Tang et al., 2022; Chung et al., 2018; Hsieh et al., 2014). Aunado a lo anterior, el tratamiento combinado con metformina podría superar la resistencia al sorafenib mediante la activación de la autofagia mediada por la proteína subunidad catalítica alfa 2 de la proteína cinasa activada por AMP (AMPK) (Lai et al., 2020).

Como se mencionó anteriormente, el valor terapéutico de la metformina en el tratamiento del HCC con sorafenib aún no ha sido esclarecido completamente. Algunos estudios han reportado una menor incidencia y mortalidad de los pacientes (Cunha et al., 2020 ; Fujita et al., 2016), en contraste con otros estudios que muestran la disminución de la sobrevida y el tiempo libre de progresión de los pacientes diabéticos tratados con metformina y que recibieron sorafenib (Casadei Gardini et al., 2015). Se ha sugerido estos fenómenos podrían deberse a factores tales como la interacciones entre fármacos derivadas de los tiempos de administración (Harati et al., 2021), aunado a la etapa de desarrollo del HCC, en conjunto con la presencia y duración de comorbilidades como la diabetes (Hatia et al., 2025; Schulte et al., 2019; P. Wang et al., 2012).

Por lo tanto con la evidencia anterior en este trabajo nos enfocamos en evaluar si la combinación de ácido valproico y metformina puede incrementar los efectos antitumorales del sorafenib en un modelo preclínico de hepatocarcinoma humano.

3. JUSTIFICACIÓN

El hepatocarcinoma o carcinoma hepatocelular (HCC) es una enfermedad cuya incidencia y mortalidad se ubica dentro de los diez primeros lugares a nivel mundial. Debido a la falta de síntomas durante las etapas tempranas de desarrollo, el hepatocarcinoma es regularmente detectado en estados intermedios o avanzados lo que limita las opciones de tratamiento disponibles para los pacientes. Actualmente los tratamientos de primera línea disponibles incluyen la terapia sistémica con sorafenib, cuyos efectos incrementan en aproximadamente 3 meses la sobrevida de los pacientes. Con la intención de buscar incrementar la tasa de efectividad farmacológica y con ello la de sobrevida de los pacientes, es necesario evaluar combinaciones farmacológicas con efectos sinérgicos con el sorafenib como una estrategia para el tratamiento contra el HCC.

4. HIPÓTESIS

La combinación de sorafenib, ácido valproico y metformina induce la muerte celular en un modelo de cáncer hepático *in vitro*, y disminuye el volumen tumoral de un xenotransplante de hepatocarcinoma humano en un modelo preclínico.

5. OBJETIVOS

General

- ⇒ Evaluar el efecto del tratamiento combinado de sorafenib, ácido valproico y metformina en un xenotransplante de hepatocarcinoma.

Particulares

- ⇒ Determinar el efecto del tratamiento combinado sobre la muerte celular, proliferación e invasión en un modelo *in vitro* de hepatocarcinoma humano.
- ⇒ Cuantificar el nivel de expresión de proteínas relacionadas con la muerte celular por efecto del tratamiento farmacológico combinado.
- ⇒ Determinar el estado de activación de blancos moleculares de interés en la ruta de señalización intracelular por efecto del tratamiento farmacológico combinado.
- ⇒ Evaluar el tamaño tumoral de un xenotransplante de hepatocarcinoma en un modelo preclínico por efecto del tratamiento farmacológico combinado.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Reactivos

El medio de cultivo DMEM alta glucosa (#11965092), el suero fetal bovino (#26140079) y los aminoácidos no esenciales (#11140050) fueron adquiridos en Gibco (Grand Island, NY, E.U.). El piruvato de sodio (#11501871) y el matrigel (#356234) fueron adquiridos en Corning (Corning, NY, E.U.). El sorafenib (#10000964), la metformina (#13118) y la mitomicina C (#11435) fueron adquiridos en Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, E.U.). El ácido valproico (#P4543), el paraformaldehído (#158127), el xileno (#95672), la hematoxilina de Harris (#HHS32-1L), la eosina (#2853), la parafina (#327212) y el DMSO (#D8418) fueron adquiridos en Sigma-Aldrich (Saint-Louis, MO, E.U.). El alcohol etílico desnaturalizado 40 B J.T. Baker (#9014-03) fue adquirido en Fisher Scientific (Massachusetts, E.U.). EL medio de montaje Richard-Allan Scientific (#4111) fue adquirido en Thermo Scientific (Massachusetts, E.U.). Los anticuerpos primarios dirigidos hacia la caspasa 3 y caspasa 3 escindida (#9692), caspasa 9 y caspasa 9 escindida (#9502), poli-ADP-ribosa polimerasa 1 (PARP1) (#9542), proteínas 1 y 2 de cadena ligera asociadas a microtúbulos (LC3BI, LC3BII) (#4108), sequestosoma 1 SQSTM1 (#5114), gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa (GAPDH) (#2118), AKT serina/treonina cinasa 1 fosforilada (p-AKT1) (#9271), subunidad catalítica alfa 2 de la proteína cinasa activada por AMP (AMPK) (#2532) fueron adquiridos en Cell Signaling (Danvers, MA, E.U.). Los anticuerpos dirigidos hacia AKT serina/treonina cinasa 1 (AKT1) (#ab8805), la proteína cinasa 1 activada por mitógenos MAPK1 (#ab17942), y la proteína cinasa 1 activada por mitógenos fosforilada (p-MAPK1) (#ab17942) fueron adquiridos en Abcam (Cambridge, R.U.). Los estándares de proteína (#500-0202) y el reactivo Quick Start Bradford Reagent 1× (#500-0205) fueron adquiridos en BioRad (Hercules, CA, E.U.).

6.2 Stock de sorafenib

El sorafenib fue resuspendido en DMSO y permaneció a - 20 °C hasta su uso. El volumen máximo de DMSO usado en el cultivo celular fue inferior al 0.1 %. El sorafenib fue mezclado con

DMEM y administrado en los ensayos celulares a 2 μ M y a 10 mg / kg en una mezcla de 40 % agua, 40 % fructosa y 20 % miel en el modelo murino.

6.3 Stock de ácido valproico y metformina

El ácido valproico y la metformina fueron resuspendidos en agua desionizada estéril. Ambas soluciones fueron preparadas y administradas en fresco. El ácido valproico y la metformina fueron mezclados con DMEM y administrados en los ensayos celulares a 4 mM y 10 mM respectivamente. En el modelo murino cada uno de los fármacos fue administrado a 200 mg / kg.

6.4 Línea celular

La línea celular HepG2 (#HB-8065) fue adquirida de ATCC (Manassas, VA, E.U) y cultivada en medio DMEM suplementado con 10 % de suero fetal bovino, 1 % de aminoácidos no esenciales y 1 % de piruvato de sodio. Las células fueron incubadas a 37 °C, 5 % CO₂ y 100 % de humedad relativa. Los pases celulares se realizaron al 80 % de confluencia.

6.5 Citometría de flujo

La determinación de la muerte celular se realizó mediante una citometría de flujo con el kit Annexin V-FITC Apoptosis Staining/Detection Kit (Abcam, Cambridge, R.U.) siguiendo las instrucciones de proveedor. Se sembraron 2.8×10^5 células HepG2 en placas de seis pozos y se incubaron durante 48 h en las condiciones previamente mencionadas. Posteriormente las células fueron expuestas a 0.02 % de DMSO, 2 μ M de sorafenib y 2 μ M de sorafenib en combinación con 4 mM de ácido valproico y 10 mM de metformina e incubadas durante 48 h sin remplazo de medio. Al termino del tratamiento el medio de cultivo fue recolectado y las células fueron tripsinizadas y centrifugadas (1,000 RPM – 5 min) junto con el medio de cultivo recolectado previamente. Se descartó el sobrenadante y el pellet celular fue lavado dos veces con PBS. A continuación 500 μ L de buffer de unión, 5 μ L de anexina V y 5 μ L de yoduro de propidio fueron añadidos

secuencialmente a las muestras y la reacción fue incubada cubierta de la luz durante 5 min a temperatura ambiente. Se recolectaron los datos provenientes de 10,000 eventos con los filtros para FITC y PE en el citómetro FACS Canto II Flow System (BD, Erembogeden, Bélgica). Las células positivas para anexina V y anexina V / yoduro de propidio fueron consideradas en el análisis de muerte.

6.6 Ensayos de clonogenicidad

Para la determinación de la formación de clonas por efecto del tratamiento farmacológico combinado, 2.8×10^5 células HepG2 fueron sembradas por pozo en una placa de seis pozos e incubadas durante 48 h. Posteriormente las células fueron tratadas con 0.02 % de DMSO como vehículo, 2 μ M de sorafenib o con 2 μ M de sorafenib combinado con 4 mM de ácido valproico y 10 mM de metformina durante 48 h. Al finalizar el tratamiento las células fueron tripsinizadas y 3×10^4 células resembradas en una placa de seis pozos y, posteriormente incubadas durante trece días en las condiciones descritas más arriba. Al término de la incubación, las células fueron lavadas dos veces con PBS, fijadas durante 10 min con metanol al 100 % y teñidas con solución de cristal violeta al 1 % por 10 min. Posteriormente, se realizaron dos lavados con agua bidestilada y las placas se dejaron secar a temperatura ambiente. La cuantificación del número de colonias se realizó mediante cuenta manual. Aquellas colonias que por proximidad no fue posible diferenciar individualmente fueron contadas como una.

6.7 Ensayo de invasión en Transwell

Se realizó la determinación del número de células invasivas mediante ensayos en cámaras Transwell de 6.5 mm recubiertas con matrigel y un tamaño de poro de 0.8 μ m, siguiendo las instrucciones de proveedor. Se sembraron 2.8×10^5 células HepG2 en placas de seis pozos y fueron incubadas por 48 h en las condiciones previamente descritas. Posteriormente, las células fueron tratadas con 0.02 % de DMSO, 2 μ M de sorafenib y 2 μ M de sorafenib combinado con 4 mM de ácido valproico y 10 mM de metformina durante 48 h. Al término del tratamiento, las células fueron

tripsinizadas y 3.2×10^4 células vivas fueron resuspendidas en 100 μL de DMEM libre de suero y colocadas en cámaras Transwell, previamente recubiertas con 200 $\mu\text{g} / \mu\text{L}$ de matrigel disuelto en DMEM libre de suero. En la parte inferior de la cámara, se añadió DMEM suplementado con 20 % de suero fetal bovino como quimioatrayente y las células fueron incubadas durante 24 h en las condiciones descritas más arriba. Al finalizar la incubación, las células del interior de la cámara fueron removidas con un hisopo humedecido y las cámaras fueron lavadas dos veces con PBS. Después las células fueron fijadas durante 10 minutos con metanol frío al 100 % y teñidas por 10 minutos con solución de cristal-violeta al 1 % en PBS. Al concluir la tinción se realizaron dos lavados con agua destilada y las cámaras fueron secadas a temperatura ambiente. Las células fueron contadas manualmente y aquellas células en las que por proximidad no fue posible diferenciarlas individualmente, fueron contadas como una.

6.8 Microarreglo de anticuerpos para apoptosis humana (Human apoptosis antibody array)

Se realizó la cuantificación de las proteínas relacionadas con la apoptosis con el kit Human Apoptosis Antibody Array (Cat.#134001) (Abcam, Cambridge, R.U.), siguiendo las instrucciones de proveedor. Se sembraron 1.6×10^6 células HepG2 en placas de 100 mm y fueron incubadas por 48 h. Posteriormente fueron expuestas a 0.02 % de DMSO, 2 μM de sorafenib o 2 μM de sorafenib combinado con 4 mM de ácido valproico y 10 mM de metformina por 24 h. Como control positivo se incluyó un tratamiento con 10 $\mu\text{g} / \text{mL}$ de mitomicina C. Al término del tratamiento, las células fueron recuperadas de las placas mediante remoción mecánica y centrifugadas junto con el medio de cultivo (1000 RPM – 5 min – 4 °C). A continuación, se descartó el sobrenadante y el pellet celular fue lavado una vez con PBS frío y las células fueron lisadas con buffer de lisis 1× suplementado con inhibidor de proteasas 1× en agitación (60 RPM – 30 min – 4 °C). A continuación, las muestras fueron centrifugadas (14,000 RPM – 10 min – 4 °C) y se recuperó el sobrenadante conteniendo las proteínas. Posteriormente las membranas previamente bloqueadas con buffer de bloqueo 1× (60 RPM – 30 min) y muestras fueron cuantificadas mediante el reactivo de Bradford. A continuación 400 μg de proteína total resuspendidos en 1.2 mL de buffer de bloqueo 1× se añadieron a cada una de las membranas las cuales fueron incubadas durante la noche en agitación (200 RPM – 4 °C). Al día siguiente se realizaron 3 lavados (60 RPM – 5 min) y un lavado

extendido (60 RPM – 30 min) con buffer de lavado 1 al 1×. A continuación, se realizaron dos lavados (60 RPM – 5 min) con buffer de lavado 2 al 1× y las membranas fueron incubadas con 1 mL de buffer de bloqueo 1× suplementado con coctel anti-citosinas 1× durante la noche (200 RPM – 4 °C). Al término de la incubación, se realizaron 3 lavados con buffer de lavado 1 al 1× (60 RPM – 5 min), seguido por 2 lavados con buffer de lavado 2 al 1× (60 RPM – 5 min). Las membranas fueron incubadas en agitación (60 RPM – 2 h) a temperatura ambiente con 2 mL de buffer de bloqueo 1× suplementado con HRP-estreptavidina 1×. Finalmente, las membranas fueron lavadas nuevamente 3 veces con buffer de lavado 1 al 1× y 2 veces con buffer de lavado 2 al 1× (60 RPM – 5 min). Por último, las membranas fueron incubadas por 2 minutos con buffer de detección y fotodocumentadas en el equipo ChemiDoc XRS + System (BioRad, CA, E.U.). El procesamiento de las imágenes fue llevado a cabo con el plug-in Protein Array Analyzer en ImageJ.

6.9 Extracción de proteína total e inmunoblotting

Para comparar el nivel de expresión de diferentes proteínas relacionadas con los mecanismos de muerte y sobrevivencia, 8×10^6 células HepG2 fueron sembradas en placas de 60 mm e incubadas por 48 h. Posteriormente las células fueron tratadas con 0.02 % de DMSO, 2 μ M de sorafenib o 2 μ M de sorafenib combinado con 4 mM de ácido valproico y 10 mM de metformina durante 24 h, en las condiciones de incubación previamente descritas. A continuación, las células fueron recolectadas mecánicamente y centrifugadas (1000 RPM – 5 min – 4 °C) junto con el medio de cultivo. El pellet fue lavado dos veces con PBS frío y posteriormente lisado con buffer RIPA (#89901) (ThermoFisher, MA, E.U.) adicionado con inhibidor de proteasas cOmplete™ (Roche, Mannheim, Alemania), inhibidor de fosfatasas 2 (#P5226) y 3 (#P0044) (Sigma-Aldrich, MO, E.U.) durante 30 min en hielo. Al término de la lisis, las muestras fueron centrifugadas (14,000 RPM – 15 min – 4 °C) y los sobrenadantes almacenados a – 80 °C hasta su uso. Se realizó la cuantificación de las muestras con el reactivo Quick Start Bradford Reagent 1× y 70 μ g de proteína fueron separados mediante SDS-PAGE en geles al 7.5 %, 10 % o 15 %. Las condiciones de la electroforesis fueron 80 V constantes en el gel concentrador y 110 V constantes en el gel separador. Posteriormente, las proteínas fueron transferidas a una membrana de PVDF de 0.2 μ m (BioRad, CA, E.U.) en cámara semiseca durante 1 h a 10 V constantes. A continuación las membranas fueron

colocadas en agitación (60 RPM – 1 h) y, bloqueadas con 5 % de leche desnatada disuelta en PBS durante 1 h a temperatura ambiente. Después, se retiró el bloqueo y las membranas fueron incubadas toda la noche en agitación (60 RPM – 4 °C) con anticuerpo primario resuspendido en leche desnatada al 1 % disuelta en PBS durante la noche. Al día siguiente las membranas se lavaron tres veces con PBS-T en agitación (60 RPM) durante 5, 10, y 15 minutos, respectivamente. Al término, las membranas fueron incubadas en agitación (60 RPM – 4 h) a temperatura ambiente con anticuerpo secundario (1:10,000) resuspendido en leche desnatada al 1 % disuelta en PBS-T. Al finalizar la incubación, las membranas fueron lavadas tres veces con PBS-T en agitación constante (60 RPM) durante 5, 10 y 15 minutos respectivamente. Se realizó la detección mediante quimioluminiscencia con el reactivo SuperSignal™ (#34580) (ThermoFisher, MA, E.U.) en el equipo ChemiDoc XRS + System (BioRad, CA, E.U.) y las imágenes fueron procesadas en ImageJ. Los datos se representan como las medias $\pm$ desviación estándar de tres experimentos independientes.

6.10 Xenotransplante de HepG2 en un modelo murino

Ratones macho BALB/c desnudos de cuatro a seis semanas de edad fueron adquiridos del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, fueron mantenidos en instalaciones libres de patógenos y recibieron alimento y agua *ad libitum*. Los procedimientos fueron llevados a cabo de acuerdo con la norma oficial (NOM-062-ZOO-1999) y aprobados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio del Tecnológico de Monterrey (2024-017) y por el Comité Nacional de Investigación Científica del Instituto Mexicano del Seguro Social (Registro R-2021-785-090). Los procedimientos fueron realizados por el Core Lab Unidad de Investigación Preclínica del Tecnológico de Monterrey, entidad acreditada por la SENASICA.

Los ratones fueron distribuidos aleatoriamente en 3 grupos: ratones expuestos al vehículo, el grupo tratado con sorafenib y el grupo expuesto a la combinación de sorafenib, ácido valproico y metformina, como se detalla más abajo.

Veinticinco machos recibieron un injerto subcutáneo en la parte superior derecha del dorso con 5×10^5 células HepG2 resuspendidas en matrigel diluido 1:1 en DMEM libre de suero. Cuando el tumor alcanzó $\sim 100 \text{ mm}^3$, los ratones fueron distribuidos aleatoriamente en tres grupos y recibieron 200 μL de una mezcla de 40 % agua, 40 % fructosa y 20 % miel como vehículo ($n = 7$), 10 mg / kg / día de sorafenib ($n = 9$) o combinado con 200 mg / kg / día de ácido valproico y 200 mg / kg / día de metformina ($n = 9$), durante 21 días. El desarrollo tumoral fue monitoreado dos veces por semana con el ultrasonido Marshall M9 Doppler Ultrasound (Vitalmed, Ciudad Juárez, CHIH, México) y los ratones fueron pesados tres veces por semana. Al día 21, se recolectaron muestras de sangre y los ratones fueron eutanizados con sevoflurano. Posteriormente, la masa tumoral y otros tejidos fueron recolectados y mantenidos en paraformaldehído al 4 % o congelados en nitrógeno líquido. El volumen tumoral fue estimado siguiendo la formula $(d^2) \times (D/2)$ donde d representa el diámetro más corto y D representa el más largo.

6.11 Bioquímica sanguínea.

Las muestras sanguíneas fueron analizadas siguiendo las instrucciones de proveedor. Brevemente, 600 μL de sangre fueron obtenidos mediante punción cardiaca y posteriormente centrifugados (1500 RPM). Posteriormente 200 μL de suero fueron colocados en discos de análisis y leídos en el equipo Skyla VB1 analyzer (Skyla Corporation, Hsinchu, Taiwan).

6.12 Histoquímica

Inmediatamente después de la eutanasia, muestras representativas de la masa tumoral de cada uno de los tratamientos fueron fijadas en paraformaldehído, posteriormente procesadas y analizadas por el Core Lab Unidad de Investigación Preclínica del Tecnológico de Monterrey. Brevemente, los tumores fueron colocados en una solución de paraformaldehído al 4 % y se mantuvieron en fijación por 24 h. Posteriormente, las muestras fueron deshidratadas en soluciones de etanol creciente al 70 %, 80 %, 96 % y 100 %, tratadas con xileno en un procesador automático de tejidos Leica Biosystems TP1020 (Wetzlar, Hesse, Alemania) y finalmente embebidas en parafina.

Los cortes se realizaron con un microtomo Leica Biosystems RM2235 (Wetzlar, Hesse, Alemania) con un grosor de 4 μm . Todos los cortes histológicos se colocaron en portaobjetos previamente tratados con poli-lisina Fisherbrand™ Superfrost™ Plus Microscope Slides (#12-550-15) (Fisher Scientific, Massachusetts, E.U.). Para el estudio morfológico de los cortes histológicos se derritió la parafina en el horno a 60 °C durante 40 min y las muestras se desparafinaron con xileno. Posteriormente las muestras se hidrataron en concentraciones de etanol decrecientes y a continuación se incubaron 20 seg con hematoxilina de Harris, se retiró el exceso de colorante y luego se incubaron en eosina durante 3 min. Después, tras eliminar el exceso de colorante, las muestras fueron lavadas en alcohol ácido y deshidratadas con soluciones de etanol en concentraciones crecientes. Posteriormente las muestras fueron pasadas por xileno y colocadas en un portaobjetos con el medio de montaje Richard-Allan Scientific (#4111) de Thermo Scientific, (Massachusetts, E.U.) y un cubreobjetos. Las imágenes fueron obtenidas en un microscopio EVOS M5000 ThermoFisher Scientific (Massachusetts, E.U.).

6.13 Análisis estadísticos

Los datos provenientes de los ensayos de muerte celular, de clonogenicidad, de expresión de proteínas con el kit Human Apoptosis Antibody Array, de invasión celular, inmunoblotting, química sanguínea, peso y volumen tumoral *ex vivo* fueron analizados con ANOVA de una vía acoplada a la prueba de comparación de Tukey. Los datos correspondientes a las mediciones tumorales por ultrasonido fueron analizados con ANOVA de dos vías con comparación múltiple de Tukey. La significancia estadística se consideró cuando la $p \leq 0.05$.

7. RESULTADOS

7.1 Determinación de muerte celular y clonogenicidad de células HepG2 tratadas la combinación de sorafenib, ácido valproico y metformina

Con la finalidad de evaluar si la combinación de 2 μ M de sorafenib, 4 mM de ácido valproico y 10 mM de metformina (SVM) incrementa la muerte celular, las células fueron tratadas durante 48 h y posteriormente 10,000 eventos fueron evaluados mediante citometría de flujo. Como control positivo, las células fueron tratadas con 10 μ g / mL de mitomicina C durante 48 h, un inductor de apoptosis intrínseca (Kumari et al., 2009; I. C. Park et al., 2000). Las células positivas para anexina V y anexina V / yoduro de propidio, fueron consideradas para la cuantificación.

Se observó un 35 ± 0.57 % de muerte celular en las células expuestas solamente al medio de cultivo. Al añadir DMSO al tratamiento este porcentaje incrementó a 36 ± 0.95 %. La adición de 2 μ M de sorafenib al tratamiento ocasionó un 43 ± 0.84 % de células positivas, lo que representa un incremento del 6 % en la muerte celular comparado contra las células tratadas con DMSO. En las células que fueron tratadas con el combinado SVM la muerte celular fue de 74 ± 0.30 % , lo que representa un incremento del 31 % comparado contra las células tratadas solamente con sorafenib (Figura 3A y 3B). Cuando las células fueron tratadas con mitomicina C, el porcentaje de muerte celular incrementó a 92 ± 0.33 %.

Para determinar si el SVM es capaz de disminuir el potencial proliferativo de las células HepG2, las células fueron pretratadas por 48 h con el combinado farmacológico y sometidas a ensayos de clonogenicidad durante 13 días (Figura 3C y 3D). En las células expuestas solamente al medio de cultivo se cuantificaron $1,436 \pm 96$ colonias y, al añadir DMSO al tratamiento se cuantificaron $1,332 \pm 177$ colonias. Cuando las células fueron tratadas con 2 μ M de sorafenib se cuantificaron 936 ± 129 colonias, lo que representa una reducción del 29 % en la clonogenicidad comparado contra el tratamiento con DMSO. En el grupo tratado con SVM se cuantificaron 540 ± 51 colonias, lo que representa una reducción del 65 % del potencial proliferativo comparado contra el DMSO y, un incremento del 36 % en los efectos antiproliferativos del sorafenib.

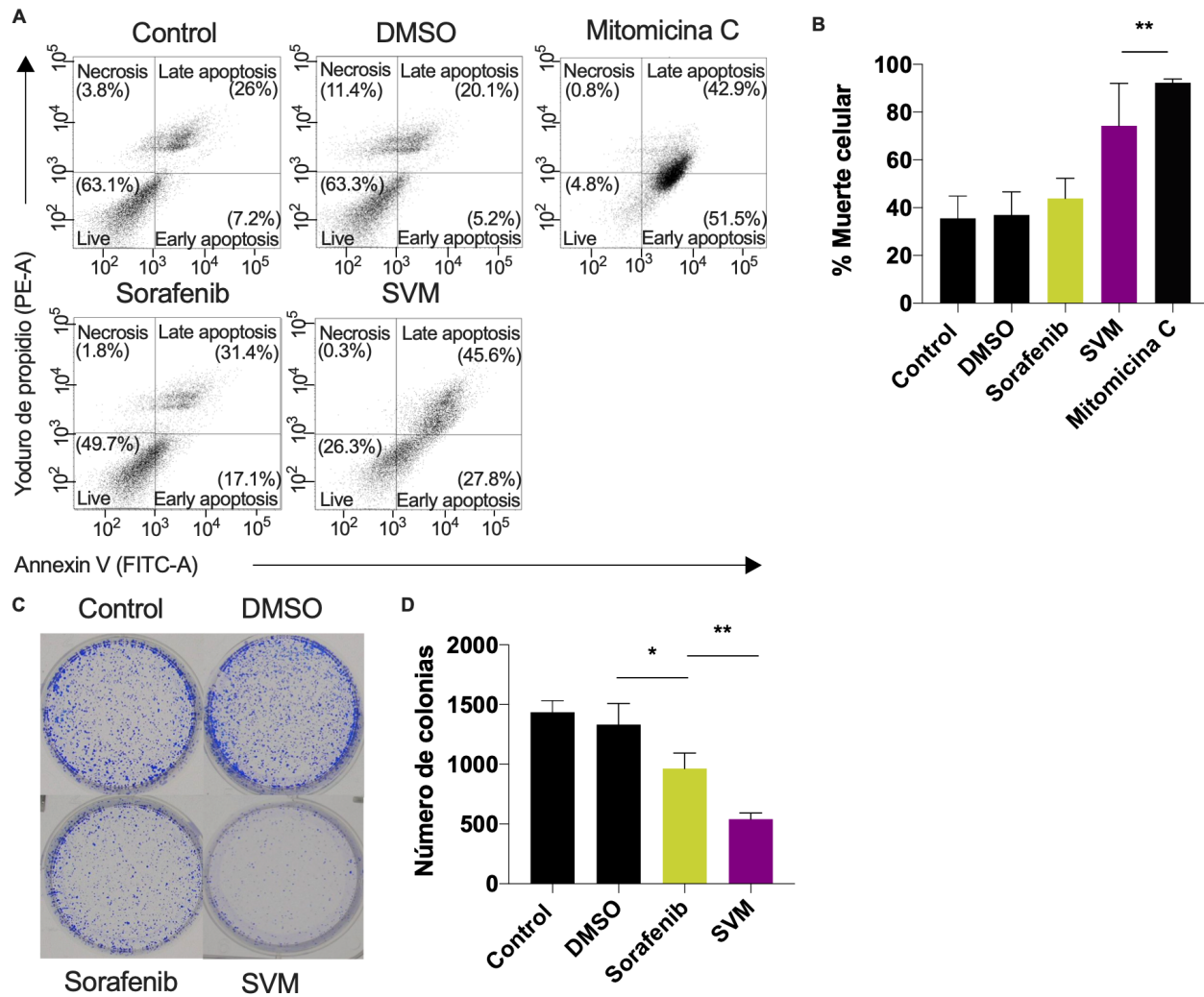


Figura 3. Muerte celular y evaluación de clonogenicidad en células HepG2 tratadas con sorafenib, ácido valproico y metformina. Imágenes representativas de los ensayos de citometría de flujo (A, B) y de clonogenicidad (C, D). Las células fueron expuestas al tratamiento con 2 μ M de sorafenib o 2 μ M de sorafenib, 4 mM de ácido valproico y 10 mM de metformina (SVM). Como control positivo se incluyó un tratamiento con 10 μ g / mL de mitomicina C. Los datos representan la media $\pm$ desviación estándar de tres replicas independientes y fueron analizados mediante ANOVA de una vía. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$. Abreviaturas: SVM: combinación de sorafenib con ácido valproico y metformina.

7.2 Efecto del tratamiento con SVM sobre la invasión de las células HepG2

Con la finalidad de determinar si el tratamiento con SVM reduce el potencial invasivo de las células HepG2, se realizaron pretratamientos por 48 h y las células fueron sembradas en cámaras Transwell recubiertas con matrigel. Como control positivo se utilizó DMEM suplementado con 20 % de suero fetal bovino.

En el control negativo las células HepG2 no recibieron quimioatrayente y se cuantificaron 7 ± 2 células. Al añadir 20 % de suero fetal bovino el número de células incrementó a 175 ± 85 . El pretratamiento con 2 μM de sorafenib redujo el número de células a 114 ± 44 , lo que representa una reducción del 34 % comparada contra el control positivo. En las células que fueron pretratadas con 2 μM de sorafenib, 4 mM de ácido valproico y 10 mM de metformina se cuantificaron 60 ± 39 células, lo que representa una tendencia a la reducción calculada en 65 % comparada contra el control sin tratamiento (Figura 4A y 4B) y una tendencia al incremento del 47 % en los efectos del pretratamiento con sorafenib.

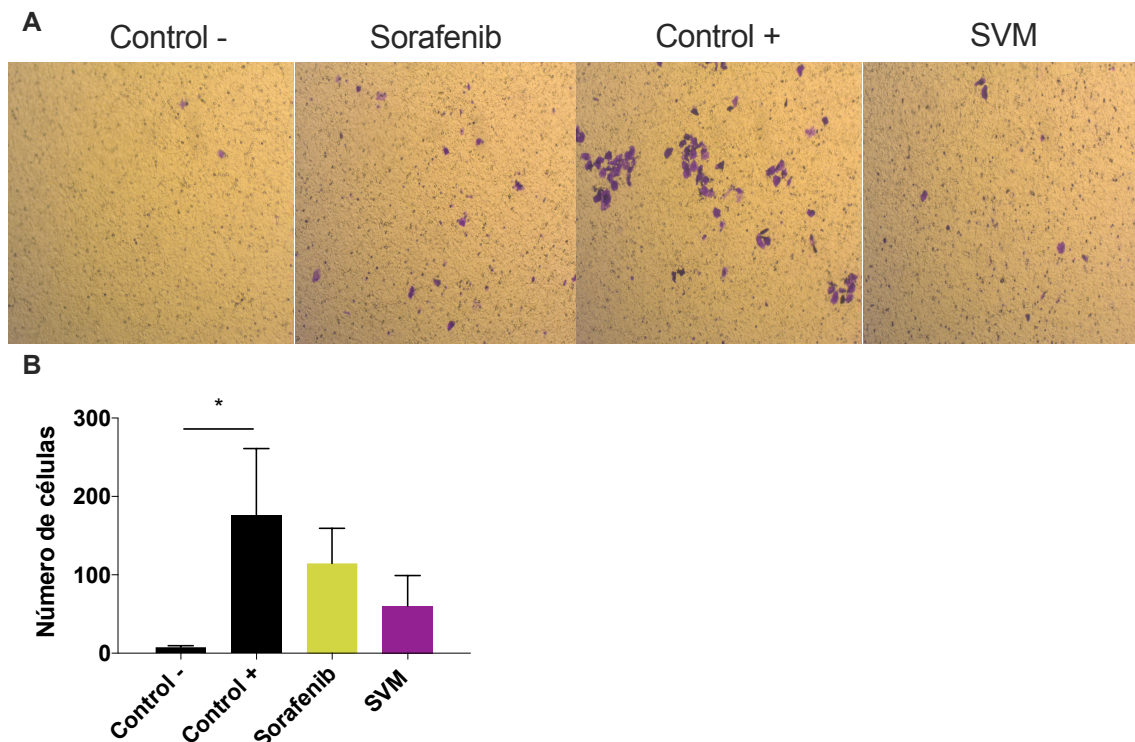


Figura 4. Determinación del potencial invasivo de células HepG2 por efecto del SVM. Imágenes representativas de ensayos Transwell (A, B). Las células pretratadas con DMSO fueron sembradas sin suero fetal (control -) o en

medio de cultivo con 20 % de suero fetal bovino como quimioatrayente (control +). Las células pretratadas con 2 μ M de sorafenib o 2 μ M de sorafenib, 4 mM de ácido valproico y 10 mM de metformina (SVM) fueron resemebradas en presencia del quimioatrayente. Los datos representan la media $\pm$ desviación estándar de tres réplicas independientes y fueron analizados mediante ANOVA de una vía. *, $p < 0.05$. Abreviaturas: SVM: combinación de sorafenib con ácido valproico y metformina.

7.3 Efecto del tratamiento con SVM sobre proteínas involucradas en muerte celular y autofagia en células HepG2

Con la finalidad de elucidar la participación del mecanismo de apoptosis en la muerte celular por efecto del tratamiento con SVM, las células HepG2 fueron tratadas durante 24 h y posteriormente mediante el kit Human Apoptosis Antibody Array, se cuantificaron por densitometría los niveles de expresión de 43 asociadas con la apoptosis. Como control positivo se incluyó el tratamiento con 10 μ g / mL de mitomicina C.

Se encontraron cambios significativos en 11 de las proteínas evaluadas (Tabla 1), en contraste en las 32 proteínas restantes involucradas en la apoptosis, no se observaron efectos significativos (Figura S1).

Tabla 1. Proporción de cambio de proteínas modificadas por efecto del tratamiento con SVM en células HepG2.

Abreviatura	Nombre	Función	Proporción de cambio SVM vs Sorafenib	Sorafenib vs DMSO
IGF1	Factor de crecimiento semejante a insulina 1	Inhibición	- 0.39	NS
IGF2	Factor de crecimiento semejante a insulina 2	Inhibición	- 0.49	NS
sTNFRSF1A	Forma soluble del miembro 1A de la superfamilia del receptor TNF	Inhibición	- 0.52	NS
CDKN1A	Inhibidor de la ciclina dependiente 1A	Inducción	- 0.28	NS
BIRC5	Proteína 5 con repeticiones IAP baculovirales	Inhibición	- 0.41	NS
BIRC7	Proteína 7 con repeticiones IAP baculovirales	Inhibición	- 0.18	NS
BCL2L11	Proteína 11 tipo BCL2	Inducción	- 0.42	+ 1.27
BCL2	Regulador de la apoptosis	Inhibición	- 0.24	NS
DIABLO	Proteína mitocondrial diablo de unión a IAP	Inducción	- 0.41	NS
HSPB1	Miembro 1 de la familia B de proteínas de choque térmico	Inhibición	- 0.41	+ 0.41

-	Caspasa 8	Inducción	- 0.6	NS
---	-----------	-----------	-------	----

NS: No significativo; SVM: combinación sorafenib, ácido valproico y metformina.

Se observó una reducción del 39 % y del 49 % en los niveles de los factores de crecimiento semejante a insulina 1 (IGF1) y 2 (IGF2) respectivamente en las células tratadas con la combinación SVM comparado contra el tratamiento con 2 μ M de sorafenib (Figura 5A y 5B). Aunado a lo anterior en el tratamiento con SVM los niveles de la forma soluble del miembro 1A de la superfamilia del receptor TNF (sTNFRSF1A) disminuyeron en 52 % comparado contra las células tratadas únicamente con sorafenib (Figura 5C).

Además en las células tratadas con SVM se observó una disminución del 28 % y 41 % en los niveles del inhibidor de la ciclina dependiente 1A (CDKN1A) (Figura 5D) y en la proteína 5 con repetidos IAP baculovirales (BIRC5) respectivamente (Figura 5E). Aunado a lo anterior se observó la disminución del 18 % y 42 % en la proteína 7 con repetidos IAP baculovirales (BIRC7) (Figura 5F) y en la proteína 11 tipo BCL2 (BCL2L11) (Figura 5G) con respecto a las células tratadas con sorafenib. Cabe mencionar que el tratamiento únicamente con sorafenib incrementó 1.27 veces los niveles de la proteína 11 tipo BCL2 (BCL2L11) con respecto al DMSO.

En el regulador de la apoptosis BCL2 (BCL2) el tratamiento con SVM redujo los niveles en 24 % (Figura 5H) y en 33 % los niveles de la proteína mitocondrial diablo de unión a IAP (DIABLO) (Figura 3J) con respecto al tratamiento con 2 μ M de sorafenib. Se observó un incremento del 41 % en el miembro 1 de la familia B de proteínas de choque térmico (HSPB1) ocasionado por el tratamiento con 2 μ M de sorafenib, en contraste con la disminución del 41 % observada al añadir ácido valproico y metformina a la mezcla (Figura 5J). La combinación farmacológica ocasionó una reducción del 60 % en los niveles de la caspasa 8 con respecto a aquellos por efecto del sorafenib (Figura 5K).

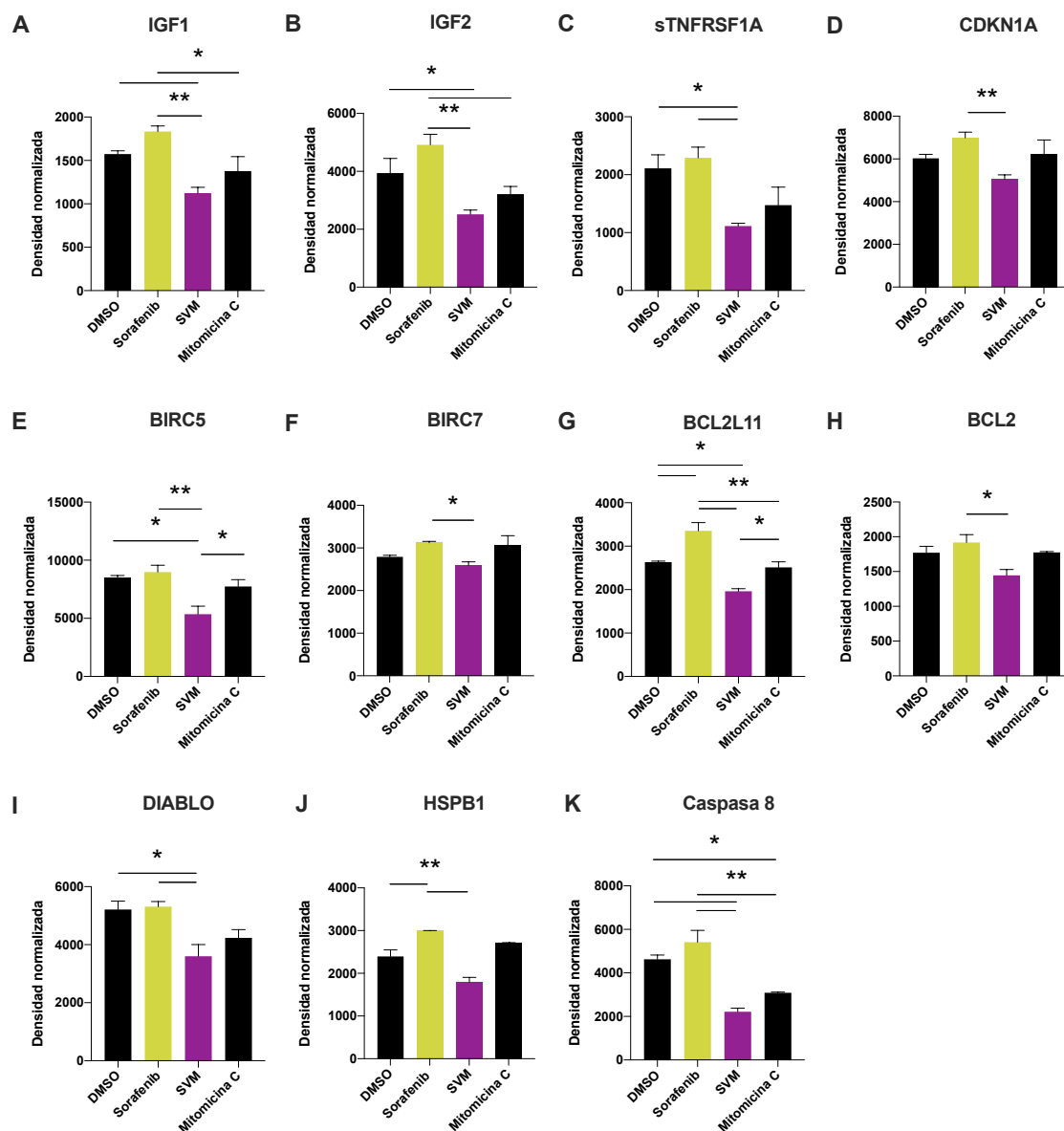


Figura 5. Efecto del tratamiento con 2 μ M de sorafenib, 4 mM de ácido valproico y 10 mM de metformina en proteínas relacionadas con la vía de apoptosis. Imágenes representativas de la cuantificación por densitometría de los niveles de expresión de las proteínas IGF1 (A), IGF2 (B), sTNFRSF1A (C), CDKN1A (D), BIRC5 (E), BIRC7 (F). Se muestran también las proteínas BCL2L11 (G), BCL2 (H), DIABLO (I), HSPB1 (J) y la caspasa 8 (K). Los datos fueron normalizados al DMSO y representan la media $\pm$ desviación estándar. Estos datos fueron analizados mediante ANOVA de una vía. *, $p < 0.05$ **, $p < 0.01$. Abreviaturas: IGF1: Factor de crecimiento semejante a insulina 1; IGF2: Factor de crecimiento semejante a insulina 2; sTNFRSF1A: Forma soluble del miembro 1A de la superfamilia del receptor TNF; CDKN1A: Inhibidor de la ciclina dependiente 1A; BIRC5: proteína 5 con repetidos IAP baculovirales; BIRC7: Proteína 7 con repetidos IAP baculovirales; BCL2L11: BCL2 semejante a 11; BCL2: Regulador

de la apoptosis BCL2; DIABLO: Proteína mitocondrial diablo de unión a IAP; HSPB1: Miembro 1 de la familia B de proteínas de choque térmico; SVM: Combinación de sorafenib, ácido valproico y metformina.

Con la finalidad de confirmar el potencial mecanismo involucrado en la muerte celular durante el tratamiento con SVM, las células fueron tratadas con 2 μ M de sorafenib o con la combinación de 2 μ M de sorafenib, 4 mM de ácido valproico y 10 mM de metformina por 24 h y posteriormente se realizó un inmunoblotting dirigido a diferentes proteínas involucradas en la apoptosis y en la etapa temprana de la autofagia.

El tratamiento con 2 μ M de sorafenib ocasionó una tendencia al incremento del 52 % en los niveles de la caspasa 9. Al añadir 4 mM de ácido valproico y 10 mM de metformina los niveles se redujeron un 65 % comparado con aquellos niveles en las células tratadas con la monoterapia con 2 μ M de sorafenib. Esta reducción fue más evidente en el tratamiento con 10 μ g / mL de mitomicina C, ya que redujo en 90 % los niveles de la forma nativa de la caspasa 9 (Figura 6A y 6G). Cabe mencionar que el tratamiento con 2 μ M de sorafenib ocasionó una tendencia al incremento del 24 % en los niveles de la forma escindida de la caspasa 9, cuyos niveles fueron comparables a aquellos por efecto del SVM (Figura 6A y 6H). Acerca de la caspasa 3 la tendencia al incremento ocasionada por el tratamiento con 2 μ M de sorafenib fue evidente con un alza del 20 % en los niveles de esta proteína, los cuales no mostraron cambios significativos por efecto del tratamiento con SVM. En el tratamiento con 10 μ g / mL de mitomicina C los niveles de la caspasa 3 se redujeron un 48 % comparado también contra las células expuestas a 2 μ M de sorafenib (Figura 6B y 6I)

La forma activa de la caspasa 3 no fue detectable en las células tratadas con el vehículo ni en aquellas tratadas con 2 μ M de sorafenib. Cuando se combinaron los fármacos fue posible detectar la presencia de la caspasa 3 escindida y se observó un incremento de 1.5 veces en sus niveles cuando las células fueron tratadas únicamente con 10 μ g / mL de mitomicina C (Figura 6B y 6J). Aunado a lo anterior el tratamiento con 2 μ M de sorafenib incrementó 34 % la poli ADP ribosa polimerasa 1 (PARP1) comparado contra el control. Sin embargo al combinar 2 μ M de sorafenib con 4 mM de ácido valproico y 10 mM de metformina los niveles de esta proteína permanecieron comparables al control. Cuando las células fueron tratadas con 10 μ g / mL de

mitomicina C los niveles de la poli ADP ribosa polimerasa 1 (PARP1) se redujeron en 93 % comparado contra el control (Figura 6C y 6K). Los niveles de esta proteína escindida no fueron detectados en el control ni en el tratamiento con 2 μ M de sorafenib. Cuando este fármaco fue combinado ocasionó la escisión de la poli ADP ribosa polimerasa 1 (PARP1) la cual fue detectada también en el tratamiento con 10 mM de metformina. En el tratamiento con 10 μ g / mL de mitomicina C los niveles de la forma escindida mostraron un incremento del 77 % con respecto a aquellos en el control (Figura 6C y 6L).

Con respecto a los niveles de los marcadores moleculares relacionados con la autofagia, se incluyó un tratamiento con 10 mM de metformina como control positivo. El tratamiento con 2 μ M de sorafenib no modificó los niveles de la proteína sequestosoma 1 (SQSTM1). No obstante añadir 4 mM ácido valproico y 10 mM metformina ocasionó un incremento no significativo del 48 % con respecto a los niveles por efecto de 2 μ M de sorafenib. Al tratar a las células con 10 μ g / mL de mitomicina C se observó un incremento del 50 % y cuando fueron tratadas con 10 mM de metformina los niveles de esta proteína se acumularon 2.94 veces, con respecto al control (Figura 6D y 6M). Cuando se determinaron los niveles de la proteína 1 de cadena ligera asociada a microtúbulos (LC3BI) no observaron cambios por efecto del tratamiento con 2 μ M de sorafenib ni por efecto del combinado SVM. Esta tendencia se mantuvo inclusive en el tratamiento con 10 mM de metformina, el cual no modificó los niveles de la proteína. A diferencia de los anteriores el tratamiento con 10 μ g / mL de mitomicina C ocasionó un incremento de 7 veces en los niveles de la proteína 1 de cadena ligera asociada a microtúbulos (LC3BI) (Figura 6E y 6N). Con respecto a la proteína 2 de cadena ligera asociada a microtúbulos (LC3BII) el tratamiento con 2 μ M de sorafenib no modificó significativamente los niveles de esta proteína con respecto al tratamiento con DMSO. Aunado a lo anterior en el tratamiento SVM esta proteína permaneció en niveles comparables con el tratamiento con 2 μ M de sorafenib, lo cual también fue observado en el tratamiento únicamente con 10 mM de metformina. En contraste con estos resultados el tratamiento con 10 μ g / mL de mitomicina C ocasionó un incremento de 5 veces en los niveles de acumulación de la proteína 2 de cadena ligera asociada a microtúbulos (LC3BII) con respecto al DMSO (Figura 6E y 6O).

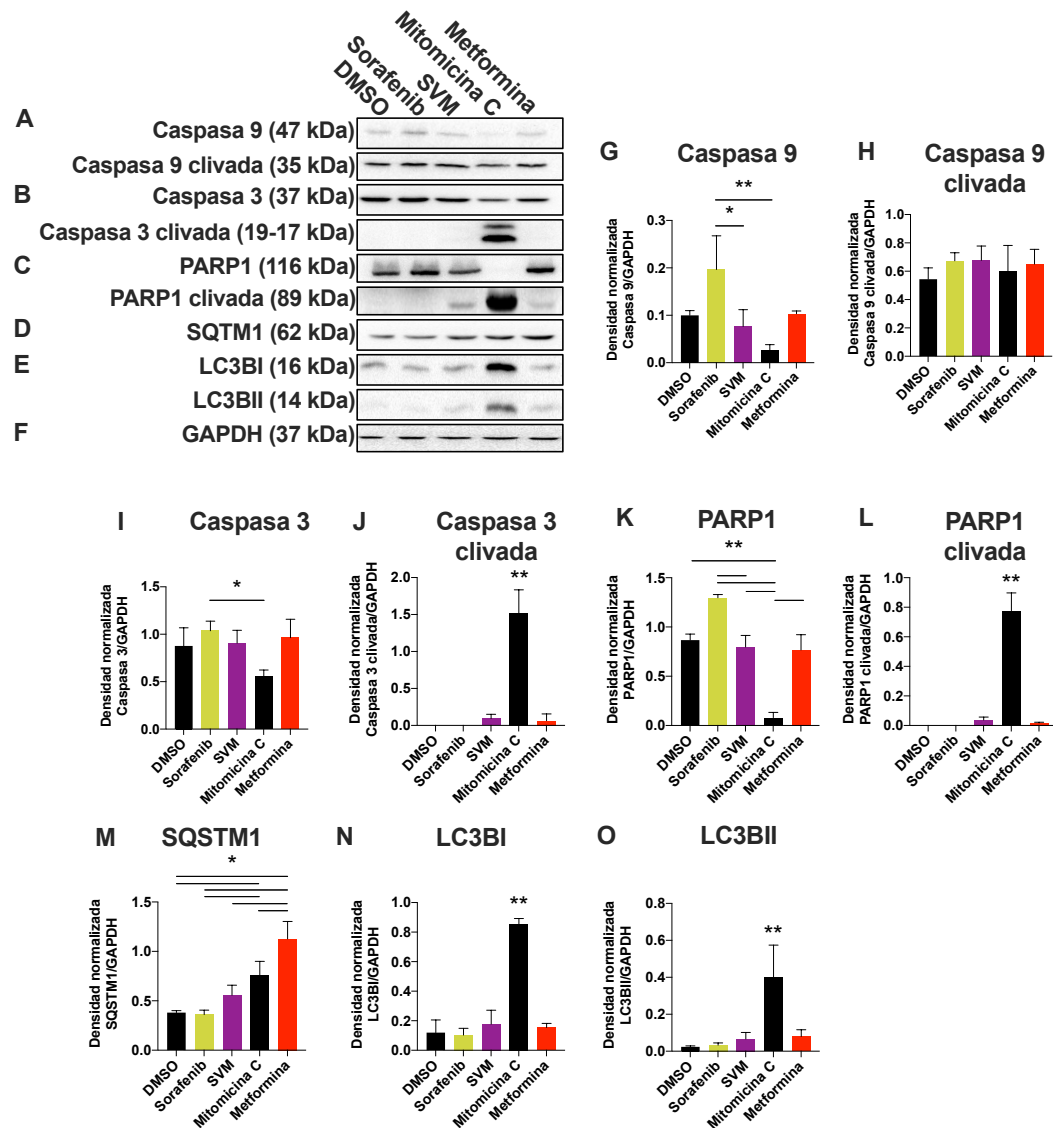


Figura 6. Niveles de expresión de proteínas relacionadas con la apoptosis y la autofagia en células HepG2 tratadas con sorafenib, ácido valproico y metformina. Imágenes representativas de ensayos de detección en fase sólida y los análisis por densitometría de los niveles de expresión de la caspasa 9 (A, G), caspasa 9 escindida (A, H). Caspasa 3 (B, I), caspasa 3 escindida (I, J) PARP1 nativa (C, K), PARP1 escindida (C, L). Se muestra además SQSTM1 (D, M), LC3BI (E, N), LC3BII (E, O). La detección de GAPDH (F) fue usado como control para la normalización de carga proteica. Las células fueron expuestas a 2 μ M de sorafenib o 2 μ M de sorafenib, 4 mM de ácido valproico y 10 mM de metformina (SVM). Los datos representan la media $\pm$ desviación estándar y fueron analizados mediante ANOVA de una vía. *, $p < 0.05$ **, $p < 0.01$. Abreviaturas: PARP1: Poli ADP-ribosa polimerasa 1; LC3BI y BII: Proteínas 1 y 2 asociadas a microtúbulos cadena ligera 3; SQSTM1: Sequestosoma 1; GAPDH: Glicer aldehído 3 fosfato deshidrogenasa; SVM: Combinación de sorafenib, ácido valproico y metformina.

7.4 Efecto del SVM sobre moléculas involucradas en la señalización farmacológica de las células HepG2

Con la finalidad de evaluar la potencial vía de señalización involucrada en el tratamiento combinado las células fueron expuestas a la mezcla de 2 μ M de sorafenib, 4 mM de ácido valproico y 10 mM de metformina por 24 h, y posteriormente se realizó la inmunodetección en fase sólida de la proteína AKT serina/treonina cinasa 1 (AKT1), la proteína cinasa 1 activada por mitógenos (MAPK1) y sus formas fosforiladas además de la proteína subunidad catalítica alfa 2 de la proteína cinasa activada por AMP (AMPK) las cuales están involucradas en la vía de señalización farmacológica. Estas proteínas son blancos intracelulares de interés por su relevancia en el mecanismo de acción farmacológico. Fueron seleccionadas con base en las modificaciones reportadas por efecto de las combinaciones de sorafenib con ácido valproico o con metformina.

En el tratamiento con 2 μ M de sorafenib se observó una acumulación no significativa del 27 % en los niveles de la proteína AKT serina/treonina cinasa 1 (AKT1), con respecto al tratamiento control con DMSO. Aunado a lo anterior al añadir 4 mM de ácido valproico y 10 mM de metformina, los niveles de esta proteína fueron comparables a aquellos ocasionados con 2 μ M de sorafenib (Figura 7A y 7E). Inclusive los niveles de la forma fosforilada permanecieron sin cambios en las células tratadas con 2 μ M de sorafenib comparado contra las células tratadas con DMSO. Al combinar 2 μ M de sorafenib con 4 mM de ácido valproico y 10 mM de metformina los niveles de la proteína AKT serina/treonina cinasa 1 fosforilada (p-AKT1) disminuyeron 67 % comparado contra la monoterapia con 2 μ M de sorafenib. Una reducción del 59 % en los niveles de fosforilación de la proteína AKT serina/treonina cinasa 1 fosforilada (p-AKT1) fue observada en el tratamiento con 10 μ g / mL de mitomicina C comparado contra el tratamiento con DMSO (Figura 7A y 7F).

Acerca de la proteína cinasa 1 activada por mitógenos (MAPK1), el tratamiento con 2 μ M de sorafenib mostró una tendencia a incrementar de forma no significativa los niveles de esta proteína con una acumulación del 37 %. Aunado a estos resultados, en el tratamiento combinado los niveles permanecieron comparables a aquellos en el tratamiento con 2 μ M de sorafenib.

Inclusive los niveles de esta proteína por efecto del tratamiento con 10 mM de metformina son comparables al SVM. Por otro lado, el tratamiento con 10 μ g / mL de mitomicina C mostró niveles comparables a los del control con DMSO (Figura 7B y 7G) . Con respecto a la forma fosforilada de la proteína cinasa 1 activada por mitógenos (p-MAPK1), el tratamiento con 2 μ M de sorafenib ocasionó una ligera acumulación que no fue significativa comparado contra el DMSO. Los niveles por efecto del combinado SVM no mostraron diferencias con respecto a la monoterapia con 2 μ M de sorafenib o con DMSO. El tratamiento con 10 μ g / mL de mitomicina C incrementó 69 veces la forma fosforilada de la proteína cinasa 1 activada por mitógenos (p-MAPK1) (Figura 7B y 7H). Con respecto a los niveles de la proteína subunidad catalítica alfa 2 de la proteína cinasa activada por AMP (AMPK), nuevamente el tratamiento con 2 μ M de sorafenib tendió a incrementar un 24 % la presencia de esta proteína, a diferencia de los tratamientos SVM o 10 μ g / mL de mitomicina C, los cuales mostraron niveles semejantes a los vistos en el grupo DMSO. Esta tendencia a la acumulación fue mayor en las células expuestas a 10 mM de metformina en donde se observó un aumento no significativo del 34 %, con respecto a las células tratadas con DMSO (Figura 7C y 7I).

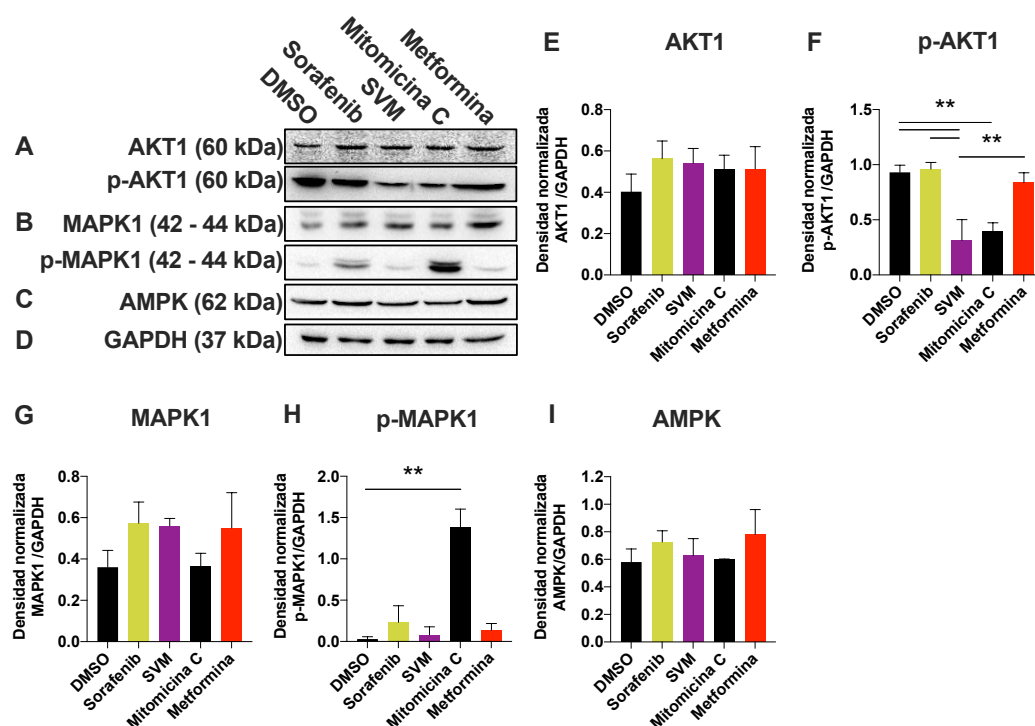


Figura 7. Señalización intracelular por efecto del tratamiento con sorafenib, ácido valproico y metformina en células HepG2. Imágenes representativas y análisis por densitometría de AKT1 (A, E), p-AKT1 (A, F), MAPK1 (B, G), p-MAPK1 (B, H) y AMPK (C, I). La proteína GAPDH fue utilizada como control de carga (D). Las células fueron tratadas con 2 μ M de sorafenib o 2 μ M de sorafenib, 4 mM de ácido valproico y 10 mM de metformina (SVM). Los datos representan la media de la densidad normalizada $\pm$ desviación estándar y fueron analizados mediante ANOVA de una vía. **, $p < 0.01$. Abreviaturas: AKT1: Serina/treonina cinasa 1; p-AKT1: Serina/treonina cinasa 1 fosforilada; MAPK1: Cinasa 1 activada por mitógenos; p-MAPK1: Cinasa 1 activada por mitógenos fosforilada; AMPK: proteína subunidad catalítica alfa 2 de la proteína cinasa activada por AMP; GAPDH: Gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa; SVM: Combinación de sorafenib, ácido valproico y metformina.

7.5 Efecto de la combinación de sorafenib con ácido valproico y metformina en un modelo murino de HCC humano

Con la finalidad de determinar si la combinación farmacológica podría incrementar los efectos del sorafenib, ratones macho desnudos xenotransplantados con la línea HepG2 fueron aleatorizados en tres grupos y tratados durante 21 días como se detalla en Material y Métodos.

Brevemente, el grupo control fue tratado con el vehículo ($n = 7$), otro grupo que fue expuesto a sorafenib ($n = 9$) y un tercer grupo de ratones tratados con la mezcla de tres fármacos SVM ($n = 9$). Durante el protocolo no se observaron cambios en el peso de los ratones por efecto de los tratamientos (Figura S2). El tumor no desarrolló metástasis ni alcanzó un tamaño deshabilitante. Las mediciones por ultrasonido mostraron que todos los grupos presentan una tendencia al incremento del volumen tumoral. En particular en el grupo expuesto a SVM se observó un volumen tumoral promedio de $6,318 \pm 2,934 \text{ mm}^3$ (Figura 8A), el cual se estimó que fue 2.74 veces mayor que el volumen promedio del grupo control estimado en $2,304 \pm 2,103 \text{ mm}^3$. El volumen tumoral promedio del grupo tratado con sorafenib fue de $2,655 \pm 2,583 \text{ mm}^3$ lo que corresponde a un incremento de 1.58 veces comparado contra el control.

Las evaluaciones de los especímenes tumorales *ex vivo* no mostraron diferencias en la estructura del tejido tumoral ni presencia de tejido necrótico (Figura S3). Se estimó un volumen tumoral de $388 \pm 275 \text{ mm}^3$ en el grupo tratado con el vehículo, en el grupo tratado con sorafenib fue de $373 \pm 101 \text{ mm}^3$ y de $396 \pm 275 \text{ mm}^3$ en el grupo tratado con la combinación (Figura 8B). No se encontró diferencia en el peso tumoral el cual fue de $0.21 \pm 0.05 \text{ g}$ en el control, de $0.19 \pm 0.04 \text{ g}$ en los ratones expuestos a sorafenib y de $0.18 \pm 0.05 \text{ g}$ en aquellos tratados con SVM (Figura 8C). Los hallazgos durante la necropsia mostraron lesiones gastrointestinales en uno de los ratones tratados con sorafenib y en cinco de los que fueron tratados con la combinación.

Los análisis de las muestras sanguíneas mostraron un incremento en la relación sodio potasio (Na^+ / K^+) por efecto del tratamiento con sorafenib acompañado por una disminución en la fosfatasa alcalina (ALP). Al añadir ácido valproico y metformina a la combinación con sorafenib se restauraron los niveles Na^+ / K^+ e incrementaron los iones de calcio (Ca^{+2}) y fosfato (PO_4^{3-}) (Figura S2).

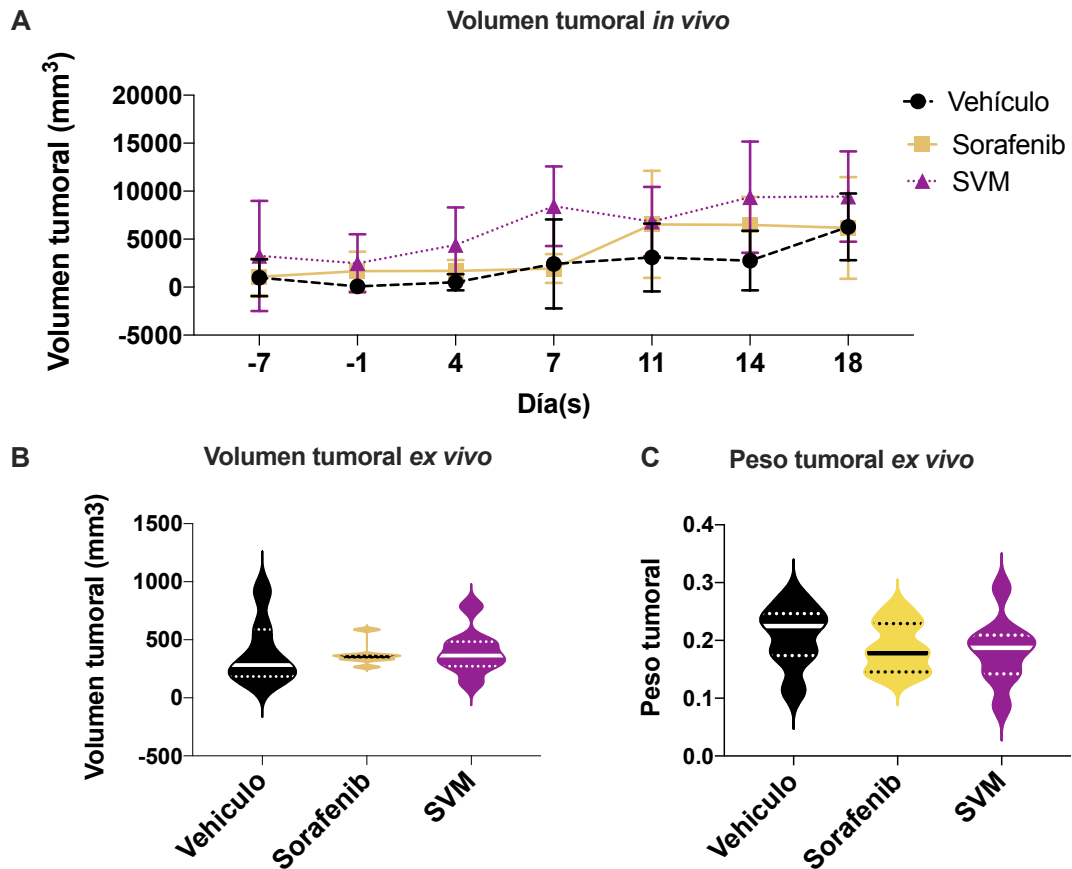


Figura 8. Efecto del tratamiento con sorafenib, ácido valproico y metformina en un modelo murino xenoinjertado con células de HCC humano. Machos desnudos de la cepa BALB/c fueron tratados con una mezcla de aceite de maíz, fructosa y miel como vehículo (grupo control), recibieron 10 mg / kg / día de sorafenib (grupo Sorafenib) o la combinación de 10 mg / kg / día de sorafenib, 200 mg / kg / día de ácido valproico y 200 mg / kg / día de metformina (grupo SVM). (A) Representación gráfica del desarrollo tumoral. Los datos representan la media $\pm$ desviación estándar y fueron analizados mediante ANOVA de dos vías. Los gráficos de violín representan (B) volumen tumoral y (C) el peso tumoral *ex vivo*. Los datos representan la media $\pm$ desviación estándar y fueron analizados mediante ANOVA de una vía. Se muestran los cuartiles (líneas punteadas) y las medias (líneas continuas). Abreviaturas: SVM: Combinación de sorafenib, ácido valproico y metformina.

8. DISCUSIÓN

El HCC permanece como una enfermedad prevalente en la población mundial a pesar de que los programas de prevención y de vacunación han disminuido la incidencia de casos de HCC relacionados con HBV (Cao et al., 2022 ; Flores et al., 2022), otros factores como el HCV, la enfermedad del hígado graso no alcohólico y el consumo excesivo de alcohol han mostrado una tendencia al incremento en años recientes (Kim, 2024). De acuerdo con la Clínica del Cáncer de Hígado de Barcelona los tratamientos para el HCC avanzado incluyen la inmunoterapia con combinados de anticuerpos como atezolizumab-bevacizumab o durvalumab-tremelimumab. Estos anticuerpos han demostrado su eficacia terapéutica con tasas de supervivencia global superiores a las del sorafenib y tienen como blancos a las proteínas CD274 y VEGFR (Finn et al., 2020) o a CD274 y CTLA4 respectivamente (Abou-Alfa et al., 2022). Aquellos pacientes que debido a factores como la función hepática, la presencia de hipertensión o de enfermedades autoinmunes entre otros riesgos vasculares no son candidatos a recibir inmunoterapia, cuentan con otras opciones disponibles dentro de la primera línea de tratamiento como el sorafenib (Reig et al., 2022). Aunado a lo anterior, aquellos pacientes tratados con sorafenib tienen una media de supervivencia de 10.7 meses comparado contra 7.9 meses en los pacientes que recibieron el placebo. Los efectos secundarios comúnmente observados incluyen hipertensión, diarrea y la reacción mano-pie (Llovet et al., 2008). Con la finalidad de incrementar los efectos del tratamiento con sorafenib es necesario evaluar los efectos de las moléculas con posible relevancia terapéutica. En este sentido, el ácido valproico y la metformina son dos fármacos de interés para su reposicionamiento farmacológico en HCC humano, cuyo potencial como coadyuvantes del sorafenib fue evaluado en este trabajo. En términos generales la combinación incrementó los efectos del sorafenib en las células de HCC y fue bien tolerada en el modelo animal, aunque sus efectos en el desarrollo tumoral fueron comparables al tratamiento con sorafenib. La posterior elucidación del mecanismo molecular mostró la participación de la AKT serina/treonina cinasa 1 (p-AKT1).

En este estudio se evaluaron los efectos de combinar sorafenib, ácido valproico y metformina (SVM) en células HepG2, mediante una relación de dosis fija. Los resultados demuestran que añadir ácido valproico y metformina incrementó la muerte celular y disminuyó el potencial clonogénico de las células de HCC humano comparado contra el tratamiento únicamente

con sorafenib. Estos resultados concuerdan con el reporte de Zhu y colaboradores (2017) quienes observaron que añadir de ácido valproico al tratamiento con sorafenib ocasionó un incremento del 6 % en la muerte celular con respecto al tratamiento únicamente con sorafenib (Zhu et al., 2017). Por otro lado Ling y colaboradores (2017) demostraron un incremento de hasta el 10 % en la muerte celular en diferentes líneas de HCC al añadir metformina al tratamiento con sorafenib (Ling et al., 2017). Estudios llevados a cabo en células de HCC resistentes al sorafenib han reportado incrementos de hasta el 66 % en la muerte celular al añadir ácido valproico al tratamiento con sorafenib (X. Yang et al., 2021; J. Liu et al., 2020). Inclusive la resistencia al sorafenib inducida por el factor transformante 1 β (TGFB1) puede ser sobrepasada si se añade ácido valproico al tratamiento, mediante un mecanismo que involucra la disminución en la fosforilación de la proteína cinasa 1 activada por mitógenos (p-MAPK1) y en la AKT serina/treonina cinasa 1 (p-AKT1) (Matsuda et al., 2014).

Previamente se demostró el efecto antiproliferativo del sorafenib en diferentes tipos de células de HCC (Cervello et al., 2012), el cual ocurre acompañado de la disminución en la fosforilación de la proteína cinasa 1 activada por mitógenos (p-MAPK1) (Liu et al., 2006). Este efecto antiproliferativo también ha sido reportado acompañado por el incremento en el porcentaje de muerte celular y en los niveles de poli-ADP-ribosa 1 (PARP1) escindida (Garten et al., 2019). Otros estudios han observado la inducción del arresto celular enmarcado por la supresión en la fosforilación de la AKT serina/treonina cinasa 1 (AKT1) y de la proteína 1 de unión al factor eucariótico de iniciación de traducción 4E (EIF4EBP1) en células de leucemia (Schult et al., 2010). El sorafenib inhibe el desarrollo tumoral mediante el bloqueo de receptores de superficie celular que transducen señales a través de la vía de las MAPK lo que ocasiona una disminución en los niveles de fosforilación de la proteína cinasa 1 activada por mitógenos (MAPK1) como lo demuestran las biopsias tumorales en modelos murinos y en los pacientes tratados con sorafenib (Adnane et al., 2006; Wilhelm et al., 2004). Aunado a lo anterior, un estudio llevado a cabo en un modelo murino de cáncer de colon no encontró inhibición de la actividad de la proteína cinasa 1 activada por mitógenos (MAPK1), lo que sugirió la presencia de otras vías de señalización involucradas en la inhibición tumoral observada (Wilhelm et al., 2004). En modelos clonogénicos el sorafenib inhibió la expansión clonal en ~ 30 % y al combinarlo con metformina la inhibición alcanzó ~ 75 % (Ling et al., 2017). Aunado a lo anterior, el tratamiento con ácido valproico suprime

la expansión clonal de células de HCC resistentes al sorafenib en ~ 60 % y actúa en sinergismo con las propiedades antiproliferativas del sorafenib al suprimir la expansión clonal hasta ~ 90 % (J. Liu et al., 2020). Estos efectos coinciden con los resultados obtenidos en este ensayo en los que se observó que el tratamiento con sorafenib suprimió en 34 % la formación de colonias, aunado al incremento de los efectos al añadir ácido valproico y metformina a la mezcla, los cuales disminuyeron en 65 % el potencial clonogénico de las células HepG2.

Además de los efectos sobre la muerte celular y la proliferación, el sorafenib inhibe el proceso de invasión (Ha et al., 2015) con efectos que alcanzaron una reducción del 75 % en distintas líneas celulares de HCC humano cuando las células fueron tratadas con 6 μ M de sorafenib (Wei et al., 2015). En este aspecto el tratamiento con 2 μ M de sorafenib redujo un 34 % el número de células invasivas. Este efecto incrementó en 47 % cuando las células fueron tratadas con la mezcla de 2 μ M de sorafenib, 4 mM de ácido valproico y 10 mM de metformina. Algunos estudios previos reportaron disminuciones en la migración celular por efecto del ácido valproico e inclusive potencian los efectos del tratamiento con sorafenib, mediante un mecanismo que disminuyó la presencia de marcadores moleculares involucrados en la transición epitelio mesenquimal (J. Liu et al., 2020). Este efecto reductor también fue reportado previamente en un modelo celular de colangiocarcinoma hepático (J. Wang et al., 2018). Aunado a lo anterior la metformina también disminuyó la capacidad migrativa e invasiva de diferentes líneas celulares de HCC. Este efecto estuvo caracterizado por la reducción de los niveles de RNA y proteína de la metaloproteína 9, además de la fosforilación de la proteína cinasa activada por mitógenos 1 (MAPK1), sin embargo no afectó los niveles de fosforilación de la AKT serina/treonina cinasa 1 (AKT1) (Hsieh et al., 2014). Cabe mencionar que la administración concomitante de sorafenib con metformina disminuyó mas eficientemente el número de células invasivas, lo que sugiere que la metformina podría incrementar los efectos del sorafenib (Siddharth et al., 2022). Aunado a lo anterior la administración concomitante de sorafenib con metformina incrementó la inhibición de la metástasis pulmonar en un 50 %, comparado contra el tratamiento únicamente con sorafenib en un modelo xenoinjertado con células de HCC humano (You et al., 2016). En particular un estudio reportó que el sorafenib podría tener un efecto contrario ya que el sorafenib incrementó el número de células invasivas. No obstante, añadir metformina al tratamiento suprimió este efecto al activar a la subunidad catalítica alfa 2 de la proteína cinasa activada por AMP (AMPK) y ocasionar la

disminución de la proteína 2 que interactúa con la proteína Tat del VIH-1 (HTATIP2) (Guo et al., 2016).

Diferentes estudios han evaluado los potenciales mecanismos moleculares involucrados en los efectos de las combinaciones del ácido valproico y la metformina con sorafenib (Franco-Juárez et al., 2024) sin embargo, los mecanismos involucrados en la combinación de los tres fármacos, permanecen pendientes por elucidarse. Con respecto a los mecanismos involucrados en el tratamiento con sorafenib se ha reportado la activación de la piroptosis en macrófagos asociados a HCC (Hage et al., 2019), la inducción de ferroptosis (Dixon et al., 2014; Louandre et al., 2013) además de la autofagia (Q. Yang et al., 2021; Fischer et al., 2014; Tai et al., 2013; Shimizu et al., 2012) y la apoptosis (Q. Yang et al., 2021; Garten et al., 2019; Kong et al., 2014; Zhao et al., 2013; Fernando et al., 2012; Liu et al., 2006).

8.1 Mecanismos involucrados en los efectos de la combinación de sorafenib con ácido valproico.

La disección del mecanismo molecular involucrado en los efectos de la combinación de sorafenib con ácido valproico mostró que diferentes proteínas de la familia BCL2 asociadas con mecanismos antiapoptóticos tales como la proteína 1 semejante a BCL2 (BCL2L1), el regulador de apoptosis BCL2 (BCL2) y proteína 5 con repetidos IAP baculovirales también conocida como survivina (BIRC5) mostraron una reducción en sus niveles en contraste con el incremento en miembros con actividad proapoptotica como el antagonista 1 de BCL2 (BAK1) y el regulador de la apoptosis X asociado a BCL2 (BAX) además de la escisión de la poli-ADP- ribosa polimerasa 1 (PARP1) (J. Liu et al., 2020 ; Zhu et al., 2017). La posterior elucidación de las vías de señalización mostró que la combinación redujo los niveles del inhibidor de la ciclina dependiente 1A (CDKN1A) y del receptor notch 3 (NOTCH3) aunado a una disminución en la fosforilación de la AKT serina/treonina cinasa 1 (p-AKT1) (Zhu et al., 2017) y de la proteína cinasa 1 activada por mitógenos (p-MAPK1) (Matsuda et al., 2014). Inclusive en células resistentes al sorafenib se observó que esta combinación puede resensibilizar al tratamiento con sorafenib mediante la reducción de la proteína 5 con repetidos IAP baculovirales (BIRC5) y el receptor notch 1 (NOTCH1) (Q. Yang et al., 2021; J. Liu et al., 2020).

Los estudios llevados a cabo por Zhu y colaboradores (2017) en ratones xenoinjertados con una línea celular de HCC tratados por 21 días con sorafenib, ácido valproico y la combinación de ambos, mostraron que la combinación disminuyó de forma más eficiente la masa tumoral mediante la activación de las caspasas 9, 3 y de la poli-ADP- ribosa polimerasa 1 (PARP1). Además la combinación no ocasionó pérdida de peso ni alteraciones morfológicas en la estructura del hígado o de los riñones de acuerdo con la evaluación histológica. Inclusive, los niveles de alanin-transferasa y de nitrógeno ureico no fueron diferentes al control lo que sugiere la preservación de la función hepática y renal (Zhu et al., 2017).

Esta combinación también ha demostrado efectos sinérgicos en modelos injertados con células resistentes al sorafenib. Liu y colaboradores (2020) determinaron que los ratones xenoinjertados con una línea celular de HCC resistente al sorafenib tratados por 21 días con la combinación de sorafenib y ácido valproico mostraron una mayor reducción tumoral comparada con la monoterapia. Además, esta combinación inhibió con mayor eficiencia la migración celular y disminuyó los niveles de proteínas asociadas con la transición epitelio-mesenquimal como la caderina 2 (CDH2) o N-caderina, la vimentina (VIM) y el represor transcripcional 1 de la familia snail (SNAIL) (J. Liu et al., 2020).

8.2 Potenciales mecanismos moleculares en la combinación de sorafenib con metformina

Acerca de la combinación de sorafenib y metformina, recientemente algunos estudios han mostrado la inducción de ferroptosis mediante las vías ATF4-STAT3 y la vía SQTMI-KEAP-NRF2 (Hu et al., 2023; Tang et al., 2022). En otro estudio, se observó que combinar sorafenib con metformina resensibiliza a las células resistentes mediante la inducción de la autofagia. Durante la elucidación del mecanismo molecular involucrado se observó un incremento sinérgico en la fosforilación de la proteínasubunidad catalítica alfa 2 de la proteína cinasa activada por AMP (AMPK) y en los niveles de la proteína 1 de cadena ligera asociada a microtubulos (LC3BI) y la proteína 2 de cadena ligera asociada a microtubulos (LC3BII). En este estudio, también se observó que la inhibición de la proteína ubunidad catalítica alfa 2 de la proteína cinasa activada por AMP (AMPK) mediante un knockdown con un vector lentiviral disminuyó el efecto citotoxico de la combinación (Lai et al., 2020). En el estudio llevado a cabo por Chung y colaboradores (2018) se

reportó que la combinación disminuyó la viabilidad celular de forma más eficiente acompañado de la inducción en la expresión de genes relacionados con la autofagia como la proteína 2 de cadena ligera asociada a microtubulos (LC3BII) (Chung et al., 2018). Aunado a lo anterior previamente se demostró que la actividad autofágica inducida por la combinación estuvo acompañada por una activación más eficiente de la caspasa 3 y poli-ADP- ribosa polimerasa 1 (PARP1), enmarcadas por la disminución en los niveles de fosforilación de la proteína cinasa 1 activada por mitógenos (p-MAPK1) (Ling et al., 2017 ; Siddharth et al., 2022) y la AKT serina/treonina cinasa 1 (p-AKT1) (Ling et al., 2017).

Las investigaciones acerca de los efectos de combinar sorafenib y metformina han incluido modelos murinos xenoinjertados con células de HCC humano en los que se observó un incremento en la sobrevivencia total por efecto de la combinación (Guo et al., 2016). Inclusive, diversos reportes con diferentes líneas celulares de HCC y modelos inmunodeficientes reportan un mejor efecto antitumoral caracterizado por una mayor disminución en la masa tumoral comparado contra los tratamientos individuales con sorafenib o con metformina (Guo et al., 2016; Harati et al., 2021; Lai et al., 2020; Ling et al., 2017; Siddharth et al., 2022). Durante la elucidación de los mecanismos moleculares involucrados en la combinación se observó la disminución en los niveles de fosforilación de la proteína cinasa 1 activada por mitógenos (p-MAPK1) y la AKT serina/treonina cinasa 1 (p-AKT1) (Ling et al., 2017 ; Siddharth et al., 2022). Aunado a lo anterior durante las evaluaciones en los tejidos tumorales se encontró la presencia de la forma escindida de la caspasa 3 y células positivas para la tinción con TUNEL lo que indica la activación de la apoptosis intrínseca como un mecanismo involucrado en la disminución del volumen tumoral (Ling et al., 2017).

8.3 Mecanismos involucrados en la combinación de sorafenib, ácido valproico y metformina

En el presente estudio se evaluaron los efectos de combinar sorafenib, ácido valproico y metformina en un modelo HCC humano. Se encontró que el grupo tratado con la combinación de sorafenib con ácido valproico y metformina ocasionó una reducción de los niveles del factor de crecimiento semejante a insulina 1 (IGF1), del factor de crecimiento semejante a insulina 2 (IGF2) y de la forma soluble del miembro 1A de la superfamilia del receptor TNF (sTNFRSF1A). La

reducción en la actividad de la vía del factor semejante a insulina promueve los efectos del sorafenib como se observa en el estudio de Wang y colaboradores (2018), quienes muestran que la inhibición de la actividad de esta vía promovió la escisión de la caspasa 3 y de la poli-ADP- ribosa polimerasa 1 (PARP1) en un contexto que incluyó la disminución en fosforilación de AKT serina/treonina cinasa 1 (p-AKT1) (F. Wang et al., 2018). Acerca de la forma soluble del miembro 1A de la superfamilia del receptor TNF (sTNFRSF1A) un estudio llevado a cabo en 55 pacientes adultos tratados con diferentes dosis de sorafenib mostró que la administración de 400 mg de sorafenib incrementó la concentración de esta forma en el suero de los pacientes (Nagai et al., 2014). Las formas solubles del receptor del ligando de necrosis tumoral (TNF) se generan por escisión proteolítica directamente en la membrana (Black et al., 1997). Algunos estudios acerca de la funcionalidad de las formas solubles de los receptores del ligando de necrosis tumoral (TNF) han demostrado que actúan como señuelos de los ligandos y ocasionan la inhibición de la apoptosis (Monden et al., 2007). Por otro lado existe evidencia que sugiere un efecto contrario al activar la apoptosis mediante un mecanismo independiente a la vía de extrínseca y que incluyó la activación de la señalización mediada por la vía MAPK (Waetzig et al., 2005).

Aunado a lo anterior, el tratamiento con SVM también redujo los niveles de inhibidor de la ciclina dependiente 1A (CDKN1A) y de otras proteínas como la proteína 5 con repetidos IAP baculovirales (BIRC5), la proteína 7 con repetidos IAP baculovirales (BIRC7), el regulador de apoptosis BCL2 (BCL2) y del miembro 1 de la familia B de proteínas pequeñas de choque térmico (HSPB1). Estos efectos coinciden con reportes anteriores en los que la actividad proapoptótica del sorafenib está caracterizada por la inhibición de factores con funciones agonistas de la apoptosis (Fernando et al., 2012) e incrementa sinérgicamente al añadir ácido valproico debido a la disminución más eficiente en los niveles de factores antiapoptóticos como proteína baculoviral 5 con repetidos IAP (BIRC5) (J. Liu et al., 2020). Acerca de los niveles del inhibidor de la ciclina dependiente 1A (CDKN1A), el reporte de Inoue y colaboradores (2011) mostró que el sorafenib disminuyó sus niveles de forma dosis-dependiente y de forma concomitante a los niveles de fosforilación de la proteína cinasa 1 activada por mitógenos (p-MAPK1) en células de cáncer renal (Inoue et al., 2011). De forma contrastante Vacante y colaboradores (2019) indican que el inhibidor de la ciclina dependiente 1A (CDKN1A) incrementa sus niveles y su translocación nuclear en células de HCC durante el arresto celular inducido por la metformina (Vacante et al., 2019). Este

incremento también fue observado al combinar sorafenib con ácido valproico en células de HCC (Zhu et al., 2017).

Durante las evaluaciones por inmunodetección en fase sólida, se observó que a diferencia de las células expuestas únicamente a sorafenib, aquellas tratadas también con ácido valproico y metformina mostraron la presencia de la forma escindida de la caspasa 3 y de la poli-ADP- ribosa polimerasa 1 (PARP1). Este incremento coincide con reportes previos en los se observó que añadir ácido valproico o metformina facilita los efectos proapoptóticos del sorafenib caracterizados por la presencia de la poli-ADP- ribosa polimerasa 1 (PARP1) escindida. Por otro lado, se observó una disminución en la fosforilación de la AKT serina/treonina cinasa 1 (p-AKT1) por efecto del tratamiento con SVM. Esta reducción coincide con el estudio de Zhu y colaboradores (2017) el cual muestra que el tratamiento simultáneo de sorafenib y ácido valproico disminuyó la fosforilación de forma más eficiente en diferentes líneas celulares de HCC (Zhu et al., 2017). Aunado a lo anterior en el estudio de Ling y colaboradores (2017) se observó que el tratamiento con sorafenib y metformina ocasionó la disminución en la fosforilación de AKT serina/treonina cinasa 1 (p-AKT1) mediante la reducción en la actividad del complejo TORC2 (Ling et al., 2017). La proteína AKT serina/treonina cinasa 1 (AKT1) desempeña un rol fundamental en la carcinogénesis al promover procesos de proliferación celular, la expresión de genes inhibidores de la apoptosis y ha sido correlacionada con la recurrencia y un mal pronóstico (Bhat et al., 2013 ; Noda y Ohsumi, 1998 ; Wang et al., 2019).

Durante las evaluaciones realizadas en ratones BALB/c desnudos, se observó el desarrollo tumoral a partir de un xenoinjerto de células HepG2 mediante ultrasonido, el cual fue confirmado posteriormente durante la necropsia. El tamaño tumoral *ex vivo* fue menor que el estimado durante el seguimiento *in vivo*. Otros estudios con xenoinjertos de líneas celulares han reportado subestimaciones del 21 % en el tamaño tumoral (Roth et al., 2024), en tanto que el estudio de Schmitz y colaboradores (2004) reportó que el tamaño tumoral de un xenotransplante de hepatocarcinoma que desarrolló ascitis fue 1.15 veces mayor (Schmitz et al., 2004). En el presente estudio la sobreestimación en las dimensiones tumorales fue de 5.9, 7.1 y 5.8 veces en los grupos control, sorafenib y SVM, respectivamente. A pesar de ser poco frecuentes en la literatura, estas discrepancias han sido asociadas con limitaciones ocasionadas por el tamaño (Ayers et al., 2010)

y la geometría tumoral (Brough et al., 2023) aunado a la presencia de edema y cambios consistentes con el desarrollo angiogénico y crecimiento infiltrativo en la zona peritumoral, detectables únicamente por ultrasonido (Schmitz et al., 2004).

Por otro lado, en el presente estudio se observó una tendencia a la disminución del peso del tumoral por efecto del tratamiento oral con sorafenib. Algunos estudios han reportado inhibiciones del crecimiento tumoral del 40 % en ratones desnudos. Este efecto inhibitorio es mayor al incrementar la dosis como lo demuestran los estudios llevados a cabo por Huyn y colaboradores (2009), en el que los ratones que fueron tratados con 50 mg / kg / día o 100 mg / kg / día se observó más del 80 % de inhibición tumoral (Huynh et al., 2009). En otros estudios, 30 mg / kg / día de sorafenib reportaron inhibiciones del 25 % y hasta del 40 % en hembras inmunodeficientes (Kong et al., 2014 ; Wu et al., 2020). La disminución en los efectos terapéuticos del sorafenib fue reportada por Harati y colaboradores (2021) quienes observaron que administrar sorafenib seis horas después del tratamiento con metformina disminuyó la inhibición tumoral a niveles comparables a los observados al tratamiento únicamente con metformina. Este efecto en el tratamiento secuencial se asoció con una disminución en la activación de la proteína subunidad catalítica alfa 2 de la proteína cinasa activada por AMP (AMPK) comparado contra el tratamiento concomitante. Cabe mencionar que la disminución de la eficacia terapéutica también fue observado en células de HCC expuestas a sunitinib, otro inhibidor de tirocinas-cinasas (Harati et al., 2021). Otras interacciones farmacocinéticas entre el sorafenib y la metformina fueron reportadas en ratas en las que se observó que la metformina disminuyó 45 % la concentración de sorafenib en plasma (Karbownik et al., 2020).

La pérdida de los efectos sinérgicos en el modelo murino puede asociarse a múltiples causas que incluyen las limitaciones de los modelos en líneas celulares y la dificultad para extrapolar los resultados a modelos de investigación más complejos. La probabilidad de interacciones farmacológicas incrementa en la medida en la que la formulación incluye a otras moléculas. Estas interacciones pueden ser farmacocinéticas o farmacodinámicas, y sus consecuencias incluyen la pérdida de eficacia, desarrollo de toxicidad y otras reacciones adversas (Palleria et al., 2013). Las interacciones farmacológicas han estado en el foco de la investigación y han dado lugar al desarrollo de modelos para los mecanismos de absorción, distribución, metabolización y excreción,

sin embargo la limitada información experimental es un factor limitante en la aplicabilidad de estos (Peng et al., 2021).

La evidencia anterior indica la participación de diferentes mecanismos de muerte celular, los cuales en parte dependen de la concentración y del contexto celular en el que fueron evaluados. Sin embargo los efectos citotóxicos y antiproliferativos del sorafenib pueden ser incrementados al añadir ácido valproico y metformina. La evidencia muestra la inhibición de la transición epitelio mesenquimal durante la potenciación de los efectos del sorafenib, cuya participación durante el tratamiento con SVM queda pendiente por elucidarse mediante el análisis de diferentes marcadores moleculares. Cabe mencionar que aunque los mecanismos de señalización involucran principalmente a la proteína cinasa activada por mitógenos (MAPK1) y a la AKT serina/treonina cinasa 1 (AKT1), otras cinasas podrían ser las responsables de la modulación de los efectos observados en este estudio. De acuerdo con la literatura los efectos de las combinaciones farmacológicas en los modelos murinos estarían sujetos a las dosificaciones y a la vía de administración, lo que sugiere que las potenciales interacciones farmacológicas serían las responsables de los efectos limitados del SVM.

9. CONCLUSIÓN

La adición de ácido valproico y metformina al tratamiento con sorafenib incrementa la muerte celular en células HepG2 en cultivo, disminuye su potencial clonogénico e invasivo mediante un mecanismo que involucra la escisión de la caspasa 3 y de la poli-ADP- ribosa polimerasa 1 (PARP1), aunado a la disminución de la fosforilación de la AKT serina/treonina cinasa 1 (p-AKT1). El tratamiento con SVM no redujo la masa tumoral del modelo preclínico de HCC humano.

10. PERSPECTIVAS

Como perspectivas de este trabajo se plantean:

1. Cuantificar la formación de los metabolitos con actividad antitumoral del sorafenib por efecto de la combinación.
2. Cuantificar por inmunodetección en fase sólida los niveles de fosforilación y de las formas nativas de las proteínas AKT serina/treonina cinasa 1 (AKT1), la proteína subunidad catalítica alfa 2 de la proteína cinasa activada por AMP (AMPK), la proteína cinasa 1 activada por mitógenos (MAPK1) además la cinasa del blanco de rapamicina en mamíferos MTOR (MTOR) en el tejido tumoral.
3. Determinar el efecto de la combinación en presencia de diferentes inhibidores de mecanismos de muerte celular en otros modelos celulares de HCC.
4. Rediseño de las dosificaciones del modelo murino a través de un modelo de combinación basado en parámetros farmacocinéticos. Además se sugiere complementar las estimaciones del volumen tumoral mediante ultrasonido con otras técnicas de imagenología por bioluminiscencia.

11. BIBLIOGRAFIA

- Abou-Alfa G. K., Chan S. L., Kudo M., Lau G., Kelley R. K., Furuse J., Sukeepaisarnjaroen W., Kang Y.-K., Dao T. V., De Toni E. N., Rimassa L., Breder V. V., Vasilyev A., Heurgue A., Tam V., Mody K., Thungappa S. C., He P., Negro A., y Sangro B. (2022). Phase 3 randomized, open-label, multicenter study of tremelimumab (T) and durvalumab (D) as first-line therapy in patients (pts) with unresectable hepatocellular carcinoma (uHCC): HIMALAYA. *Journal of Clinical Oncology*, 40 (4_suppl), 379.
- Abou-Alfa G. K., Meyer T., Cheng A.-L., El-Khoueiry A. B., Rimassa L., Ryoo B.-Y., Cicin I., Merle P., Chen Y., Park J.-W., Blanc J.-F., Bolondi L., Klumpen H.-J., Chan S. L., Zagonel V., Pressiani T., Ryu M.-H., Venook A. P., Hessel C., Borgman-Hagey A. E., Schwab G., y Kelley R. K. (2018). Cabozantinib in Patients with Advanced and Progressing Hepatocellular Carcinoma. *New England Journal of Medicine*, 379 (1), 54-63.
- Adnane L., Trail P. A., Taylor I., y Wilhelm S. M. (2006). Sorafenib (BAY 43-9006, Nexavar®), a Dual-Action Inhibitor That Targets RAF/MEK/ERK Pathway in Tumor Cells and Tyrosine Kinases VEGFR/PDGFR in Tumor Vasculature. *Methods in Enzymology*, 407 , 597-612.
- Alqahtani A., Khan Z., Alloghbi A., Said Ahmed T. S., Ashraf M., y Hammouda D. M. (2019). Hepatocellular Carcinoma: Molecular Mechanisms and Targeted Therapies. *Medicina (Kaunas, Lithuania)*, 55 (9).
- Armeanu S., Pathil A., Venturelli S., Mascagni P., Weiss T. S., Göttlicher M., Gregor M., Lauer U. M., y Bitzer M. (2005). Apoptosis on hepatoma cells but not on primary hepatocytes by histone deacetylase inhibitors valproate and ITF2357. *Journal of Hepatology*, 42 (2), 210-217.
- Assenat E., Pageaux G.-P., Thézenas S., Peron J.-M., Bécouarn Y., Seitz J.-F., Merle P., Blanc J.-F., Bouché O., Ramdani M., Poujol S., de Forges H., Ychou M., y Boige V. (2019). Sorafenib alone vs. sorafenib plus GEMOX as 1st-line treatment for advanced HCC: the phase II randomised PRODIGE 10 trial. *British Journal of Cancer*, 120 (9), 896-902.
- Awada A., Hendlisz A., Gil T., Bartholomeus S., Mano M., de Valeriola D., Strumberg D., Brendel E., Haase C. G., Schwartz B., y Piccart M. (2005). Phase I safety and pharmacokinetics of BAY 43-9006 administered for 21 days on/7 days off in patients with advanced, refractory solid tumours. *British Journal of Cancer*, 92 (10), 1855-1861.
- Ayers G. D., McKinley E. T., Zhao P., Fritz J. M., Metry R. E., Deal B. C., Adlerz K. M., Coffey R. J., y Manning H. C. (2010). Volume of Preclinical Xenograft Tumors Is More Accurately Assessed by Ultrasound Imaging Than Manual Caliper Measurements. *Journal of Ultrasound in Medicine*, 29 (6), 891-901.
- Azit N. A., Sahran S., Meng L. V., Subramaniam M. K., Mokhtar S., y Nawi A. M. (2022). The survival outcomes and prognostic factors of hepatocellular carcinoma among type 2 diabetes patients: a two-centre retrospective cohort study. *Turkish Journal of Medical Sciences*, 52 (5), 1580-1590.

- Balmano K., y Cook S. J. (2009). Tumour cell survival signalling by the ERK1/2 pathway. *Cell Death and Differentiation*, 16 (3), 368-377.
- Bannister A. J., y Kouzarides T. (2011). Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Research*, 21 (3), 381-395.
- Bartolini D., Dallaglio K., Torquato P., Piroddi M., y Galli F. (2018). Nrf2-p62 autophagy pathway and its response to oxidative stress in hepatocellular carcinoma. *Translational Research*, 193 , 54-71.
- Bhat M., Sonenberg N., y Gores G. J. (2013). The mTOR pathway in hepatic malignancies. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 58 (2), 810-818.
- Bitzer M., Horger M., Giannini E. G., Ganten T. M., Wörns M. A., Siveke J. T., Dollinger M. M., Gerken G., Scheulen M. E., Wege H., Zagonel V., Cillo U., Trevisani F., Santoro A., Montesarchio V., Malek N. P., Holzapfel J., Herz T., Ammendola A. S., Pegoraro S., Hauns B., Mais A., Lauer U. M., Henning S. W., y Hentsch B. (2016). Resminostat plus sorafenib as second-line therapy of advanced hepatocellular carcinoma - The SHELTER study. *Journal of Hepatology*, 65 (2), 280-288.
- Black R. A., Rauch C. T., Kozlosky C. J., Peschon J. J., Slack J. L., Wolfson M. F., Castner B. J., Stocking K. L., Reddy P., Srinivasan S., Nelson N., Boiani N., Schooley K. A., Gerhart M., Davis R., Fitzner J. N., Johnson R. S., Paxton R. J., March C. J., y Cerretti D. P. (1997). A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor- α from cells. *Nature*, 385 (6618), 729-733.
- Blechacz B. R. A., Smoot R. L., Bronk S. F., Werneburg N. W., Sirica A. E., y Gores G. J. (2009). Sorafenib inhibits signal transducer and activator of transcription-3 signaling in cholangiocarcinoma cells by activating the phosphatase shatterproof 2. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 50 (6), 1861-1870.
- Bray F., Laversanne M., Sung H., Ferlay J., Siegel R. L., Soerjomataram I., y Jemal A. (2024). Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 74 (3), 229-263.
- Brough D., Amos H., Turley K., y Murkin J. (2023). Trends in Subcutaneous Tumour Height and Impact on Measurement Accuracy. *Cancer Informatics*, 22 , 11769351231165181.
- Caballeria J., y Caballeria L. (2016). Esteatohepatitis no alcohólica y diabetes. *Endocrinología y Nutrición*, 63 (8), 377-379.
- Cabral L. K. D., Tiribelli C., y Sukowati C. H. C. (2020). Sorafenib Resistance in Hepatocellular Carcinoma: The Relevance of Genetic Heterogeneity. *Cancers*, 12 (6).
- Cai X., Hu X., Cai B., Wang Q., Li Y., Tan X., Hu H., Chen X., Huang J., Cheng J., y Jing X. (2013). Metformin suppresses hepatocellular carcinoma cell growth through induction of cell cycle G1/G0 phase arrest and p21CIP and p27KIP expression and downregulation of cyclin D1 in vitro and in vivo. *Oncology Reports*, 30 (5), 2449-2457.
- Cao M., Fan J., Lu L., Fan C., Wang Y., Chen T., Zhang S., Yu Y., Xia C., Lu J., Chen K., Yao H., Chen W., y Qu C. (2022). Long term outcome of prevention of liver cancer by hepatitis B vaccine: Results from an RCT with 37 years. *Cancer Letters*, 536 , 215652.

- Casadei Gardini A., Faloppi L., De Matteis S., Foschi F. G., Silvestris N., Tovoli F., Palmieri V., Marisi G., Brunetti O., Vespasiani-Gentilucci U., Perrone G., Valgiusti M., Granato A. M., Ercolani G., Negrini G., Tamburini E., Aprile G., Passardi A., Santini D., Cascinu S., Frassineti G. L., y Scartozzi M. (2017). Metformin and insulin impact on clinical outcome in patients with advanced hepatocellular carcinoma receiving sorafenib: Validation study and biological rationale. *European Journal of Cancer* (Oxford, England : 1990), 86 , 106-114.
- Casadei Gardini A., Marisi G., Scarpi E., Scartozzi M., Faloppi L., Silvestris N., Masi G., Vivaldi C., Brunetti O., Tamberi S., Foschi F. G., Tamburini E., Tenti E., Ricca Rosellini S., Ulivi P., Cascinu S., Nanni O., y Frassineti G. L. (2015). Effects of metformin on clinical outcome in diabetic patients with advanced HCC receiving sorafenib. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 16 (18), 2719-2725.
- Cervello M., Bachvarov D., Lampiasi N., Cusimano A., Azzolina A., McCubrey J. A., y Montalto G. (2012). Molecular mechanisms of sorafenib action in liver cancer cells. *Cell Cycle*, 11 (15), 2843-2855.
- Cha Y., Erez T., Reynolds I. J., Kumar D., Ross J., Koytiger G., Kusko R., Zeskind B., Risso S., Kagan E., Papapetropoulos S., Grossman I., y Laifenfeld D. (2018). Drug repurposing from the perspective of pharmaceutical companies. *British Journal of Pharmacology*, 175 (2), 168-180.
- Chen Caixia, Gao H., y Su X. (2021). Autophagy-related signaling pathways are involved in cancer (Review). *Experimental and Therapeutic Medicine*, 22 (1), 710.
- Chen Chaobo, Nelson L. J., Ávila M. A., y Cubero F. J. (2019). Mitogen-Activated Protein Kinases (MAPKs) and Cholangiocarcinoma: The Missing Link. *Cells*, 8 (10).
- Chen H. P., Shieh J. J., Chang C. C., Chen T. T., Lin J. T., Wu M. S., Lin J. H., y Wu C. Y. (2013). Metformin decreases hepatocellular carcinoma risk in a dose-dependent manner: Population-based and in vitro studies. *Gut*, 62 (4), 606-615.
- Cheng A.-L., Kang Y.-K., Chen Z., Tsao C.-J., Qin S., Kim J. S., Luo R., Feng J., Ye S., Yang T.-S., Xu J., Sun Y., Liang H., Liu J., Wang J., Tak W. Y., Pan H., Burock K., Zou J., Voliotis D., y Guan Z. (2009). Efficacy and safety of sorafenib in patients in the Asia-Pacific region with advanced hepatocellular carcinoma: a phase III randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *The Lancet. Oncology*, 10 (1), 25-34.
- Choi J. H., y Thung S. N. (2023). Advances in Histological and Molecular Classification of Hepatocellular Carcinoma. *Biomedicines*, 11 (9).
- Chung Y.-G., Tak E., Hwang S., Lee J.-Y., Kim J.-Y., Kim Y.-Y., Song G.-W., Lee K.-J., y Kim N. (2018). Synergistic effect of metformin on sorafenib in vitro study using hepatocellular carcinoma cell lines. *Annals of Hepato-Biliary-Pancreatic Surgery*, 22 (3), 179.
- Cisneros-Garza L. E., González-Huezo M. S., Moctezuma-Velázquez C., Ladrón de Guevara-Cetina L., Vilatobá M., García-Juárez I., Alvarado-Reyes R., Álvarez-Treviño G. A., Allende-Pérez S., Bornstein-Quevedo L., Calderillo-Ruiz G., Carrillo-Martínez M. A., Castillo-Barradas M., Cerda-Reyes E., Félix-Leyva J. A., Gabutti-Thomas J. A., Guerrero-Ixtlahuac J., Higuera-de-la-Tijera F., Huitzil-Meléndez D., Kimura-Hayama E., López-

- Hernández P. A., Malé-Velázquez R., Méndez-Sánchez N., Morales-Ruiz M. A., Ruíz-García E., Sánchez-Ávila J. F., y Torrecillas-Torres L. (2022). II Consenso Mexicano de Carcinoma Hepatocelular. Parte I: Epidemiología y diagnóstico. *Revista de Gastroenterología de México*, 87 (2), 216-234.
- Cunha V., Cotrim H. P., Rocha R., Carvalho K., y Lins-Kusterer L. (2020). Metformin in the prevention of hepatocellular carcinoma in diabetic patients: A systematic review. *Annals of Hepatology*, 19 (3), 232-237.
- Del Campo J. A., García-Valdecasas M., Gil-Gómez A., Rojas Á., Gallego P., Ampuero J., Gallego-Durán R., Pastor H., Grande L., Padillo F. J., Muntané J., y Romero-Gómez M. (2018). Simvastatin and metformin inhibit cell growth in hepatitis C virus infected cells via mTOR increasing PTEN and autophagy. *PloS One*, 13 (1), e0191805.
- Delire B., y Stärkel P. (2015). The Ras/MAPK pathway and hepatocarcinoma: pathogenesis and therapeutic implications. *European Journal of Clinical Investigation*, 45 (6), 609-623.
- Desai A., Sandhu S., Lai J.-P., y Sandhu D. S. (2019). Hepatocellular carcinoma in non-cirrhotic liver: A comprehensive review. *World Journal of Hepatology*, 11 (1), 1-18.
- Dikic I., y Elazar Z. (2018). Mechanism and medical implications of mammalian autophagy. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 19 (6), 349-364.
- Dimri M., y Satyanarayana A. (2020). Molecular Signaling Pathways and Therapeutic Targets in Hepatocellular Carcinoma. *Cancers*, 12 (2).
- Dixon S. J., Patel D. N., Welsch M., Skouta R., Lee E. D., Hayano M., Thomas A. G., Gleason C. E., Tatonetti N. P., Slusher B. S., y Stockwell B. R. (2014). Pharmacological inhibition of cystine-glutamate exchange induces endoplasmic reticulum stress and ferroptosis. *eLife*, 3, e02523.
- Duprez L., Wirawan E., Berghe T. V., y Vandenabeele P. (2009). Major cell death pathways at a glance. *Microbes and Infection*, 11 (13), 1050-1062.
- Elmore S. (2007). Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology*, 35 (4), 495-516.
- El-Sewedy T., Salama A. F., Mohamed A. E., Elbaoumy N. M., El-Far A. H., Albalawi A. N., y Elmetwalli A. (2023). Hepatocellular Carcinoma cells: activity of Amygdalin and Sorafenib in Targeting AMPK /mTOR and BCL-2 for anti-angiogenesis and apoptosis cell death. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 23 (1), 329.
- Eum K. H., Ahn S. K., Kang H., y Lee M. (2013). Differential inhibitory effects of two Raf-targeting drugs, sorafenib and PLX4720, on the growth of multidrug-resistant cells. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 372 (1-2), 65-74.
- Evans J. M. M., Donnelly L. A., Emslie-Smith A. M., Alessi D. R., y Morris A. D. (2005). Metformin and reduced risk of cancer in diabetic patients. *BMJ (Clinical Research Ed.)*, 330 (7503), 1304-1305.
- Fan J., Lou B., Chen W., Zhang J., Lin S., Lv F., y Chen Y. (2014). Down-regulation of HDAC5 inhibits growth of human hepatocellular carcinoma by induction of apoptosis and cell cycle arrest. *Tumor Biology*, 35 (11), 11523-11532.

- Fattovich G., Stroffolini T., Zagni I., y Donato F. (2004). Hepatocellular carcinoma in cirrhosis: Incidence and risk factors. *Gastroenterology*, 127 (5), S35-S50.
- Fernando J., Sancho P., Fernández-Rodríguez C. M., Lledó J. L., Caja L., Campbell J. S., Fausto N., y Fabregat I. (2012). Sorafenib sensitizes hepatocellular carcinoma cells to physiological apoptotic stimuli. *Journal of Cellular Physiology*, 227 (4), 1319-1325.
- Ferretti A. C., Hidalgo F., Tonucci F. M., Almada E., Pariani A., Larocca M. C., y Favre C. (2019). Metformin and glucose starvation decrease the migratory ability of hepatocellular carcinoma cells: targeting AMPK activation to control migration. *Scientific Reports*, 9 (1), 2815.
- Ferrín G., Guerrero M., Amado V., Rodríguez-Perálvarez M., y De La Mata M. (2020). Activation of mTOR Signaling Pathway in Hepatocellular Carcinoma. *International Journal of Molecular Sciences*, 21 (4), 1266.
- Finn R. S., Qin S., Ikeda M., Galle P. R., Ducreux M., Kim T.-Y., Kudo M., Breder V., Merle P., Kaseb A. O., Li D., Verret W., Xu D.-Z., Hernandez S., Liu J., Huang C., Mulla S., Wang Y., Lim H. Y., Zhu A. X., y Cheng A.-L. (2020). Atezolizumab plus Bevacizumab in Unresectable Hepatocellular Carcinoma. *The New England Journal of Medicine*, 382 (20), 1894-1905.
- Fischer T. D., Wang J.-H., Vlada A., Kim J.-S., y Behrns K. E. (2014). Role of autophagy in differential sensitivity of hepatocarcinoma cells to sorafenib. *World Journal of Hepatology*, 6 (10), 752-758.
- Flores J. E., Thompson A. J., Ryan M., y Howell J. (2022). The Global Impact of Hepatitis B Vaccination on Hepatocellular Carcinoma. *Vaccines*, 10 (5), 793.
- Franco-Juárez E. X., González-Villasana V., Camacho-Moll M. E., Rendón-Garlant L., Ramírez-Flores P. N., Silva-Ramírez B., Peñuelas-Urquides K., Cabello-Ruiz E. D., Castorena-Torres F., y Bermúdez De León M. (2024). Mechanistic Insights about Sorafenib-, Valproic Acid- and Metformin-Induced Cell Death in Hepatocellular Carcinoma. *International Journal of Molecular Sciences*, 25 (3), 1760.
- Freese K., Seitz T., Dietrich P., Lee S. M. L., Thasler W. E., Bosserhoff A., y Hellerbrand C. (2019). Histone Deacetylase Expressions in Hepatocellular Carcinoma and Functional Effects of Histone Deacetylase Inhibitors on Liver Cancer Cells In Vitro. *Cancers*, 11 (10).
- Fujimori T., Kato K., Fujihara S., Iwama H., Yamashita T., Kobayashi K., Kamada H., Morishita A., Kobara H., Mori H., Okano K., Suzuki Y., y Masaki T. (2015). Antitumor effect of metformin on cholangiocarcinoma: In vitro and in vivo studies. *Oncology Reports*, 34 (6), 2987-2996.
- Fujita K., Iwama H., Miyoshi H., Tani J., Oura K., Tadokoro T., Sakamoto T., Nomura T., Morishita A., Yoneyama H., y Masaki T. (2016). Diabetes mellitus and metformin in hepatocellular carcinoma. *World Journal of Gastroenterology*, 22 (27), 6100-6113.
- Galluzzi L., Vitale I., Aaronson S. A., Abrams J. M., Adam D., Agostinis P., Alnemri E. S., Altucci L., Amelio I., Andrews D. W., Annicchiarico-Petruzzelli M., Antonov A. V., Arama E., Baehrecke E. H., Barlev N. A., Bazan N. G., Bernassola F., Bertrand M. J. M., Bianchi K., Blagosklonny M. V., Blomgren K., Borner C., Boya P., Brenner C., Campanella M., Candi

- E., Carmona-Gutierrez D., Cecconi F., Chan F. K.-M., Chandel N. S., Cheng E. H., Chipuk J. E., Cidlowski J. A., Ciechanover A., Cohen G. M., Conrad M., Cubillos-Ruiz J. R., Czabotar P. E., D'Angiolella V., Dawson T. M., Dawson V. L., De Laurenzi V., De Maria R., Debatin K.-M., DeBerardinis R. J., Deshmukh M., Di Daniele N., Di Virgilio F., Dixit V. M., Dixon S. J., Duckett C. S., Dynlacht B. D., El-Deiry W. S., Elrod J. W., Fimia G. M., Fulda S., García-Sáez A. J., Garg A. D., Garrido C., Gavathiotis E., Golstein P., Gottlieb E., Green D. R., Greene L. A., Gronemeyer H., Gross A., Hajnoczky G., Hardwick J. M., Harris I. S., Hengartner M. O., Hetz C., Ichijo H., Jäättelä M., Joseph B., Jost P. J., Juin P. P., Kaiser W. J., Karin M., Kaufmann T., Kepp O., Kimchi A., Kitsis R. N., Klionsky D. J., Knight R. A., Kumar S., Lee S. W., Lemasters J. J., Levine B., Linkermann A., Lipton S. A., Lockshin R. A., López-Otín C., Lowe S. W., Luedde T., Lugli E., MacFarlane M., Madeo F., Malewicz M., Malorni W., Manic G., Marine J.-C., Martin S. J., Martinou J.-C., Medema J. P., Mehlen P., Meier P., Melino S., Miao E. A., Molkentin J. D., Moll U. M., Muñoz-Pinedo C., Nagata S., Nuñez G., Oberst A., Oren M., Overholtzer M., Pagano M., Panaretakis T., Pasparakis M., Penninger J. M., Pereira D. M., Pervaiz S., Peter M. E., Piacentini M., Pinton P., Prehn J. H. M., Puthalakath H., Rabinovich G. A., Rehm M., Rizzuto R., Rodrigues C. M. P., Rubinsztein D. C., Rudel T., Ryan K. M., Sayan E., Scorrano L., Shao F., Shi Y., Silke J., Simon H.-U., Sistigu A., Stockwell B. R., Strasser A., Szabadkai G., Tait S. W. G., Tang D., Tavernarakis N., Thorburn A., Tsujimoto Y., Turk B., Vanden Berghe T., Vandenabeele P., Vander Heiden M. G., Villunger A., Virgin H. W., Vousden K. H., Vucic D., Wagner E. F., Walczak H., Wallach D., Wang Y., Wells J. A., Wood W., Yuan J., Zakeri Z., Zhivotovsky B., Zitvogel L., Melino G., y Kroemer G. (2018). Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death and Differentiation*, 25 (3), 486-541.
- Gao C., Fang L., Zhang H., Zhang W.-S., Li X.-O., y Du S.-Y. (2020). Metformin Induces Autophagy via the AMPK-mTOR Signaling Pathway in Human Hepatocellular Carcinoma Cells. *Cancer Management and Research*, Volume 12 , 5803-5811.
- Gao J.-J., Shi Z.-Y., Xia J.-F., Inagaki Y., y Tang W. (2015). Sorafenib-based combined molecule targeting in treatment of hepatocellular carcinoma. *World Journal of Gastroenterology*, 21 (42), 12059-12070.
- Garten A., Grohmann T., Kluckova K., Lavery G. G., Kiess W., y Penke M. (2019). Sorafenib-Induced Apoptosis in Hepatocellular Carcinoma Is Reversed by SIRT1. *International Journal of Molecular Sciences*, 20 (16).
- George M., Smith A., Sabesan S., y Ranmuthugala G. (2021). Physical Comorbidities and Their Relationship with Cancer Treatment and Its Outcomes in Older Adult Populations: Systematic Review. *JMIR Cancer*, 7 (4), e26425.
- Gomaa A.-I., Khan S.-A., Toledano M.-B., Waked I., y Taylor-Robinson S.-D. (2008). Hepatocellular carcinoma: epidemiology, risk factors and pathogenesis. *World Journal of Gastroenterology*, 14 (27), 4300-4308.

- Gong L., Giacomini M. M., Giacomini C., Maitland M. L., Altman R. B., y Klein T. E. (2017). PharmGKB summary: sorafenib pathways. *Pharmacogenetics and Genomics*, 27 (6), 240-246.
- González A., Hall M. N., Lin S.-C., y Hardie D. G. (2020). AMPK and TOR: The Yin and Yang of Cellular Nutrient Sensing and Growth Control. *Cell Metabolism*, 31 (3), 472-492.
- Gottlicher M., Minucci S., Zhu P., Krämer O. H., Schimpf A., Giavara S., Sleeman J. P., Lo Coco F., Nervi C., Pelicci P. G., y Heinzl T. (2001). Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells. *EMBO Journal*, 20 (24), 6969-6978.
- Gouas D., Shi H., y Hainaut P. (2009). The aflatoxin-induced TP53 mutation at codon 249 (R249S): biomarker of exposure, early detection and target for therapy. *Cancer Letters*, 286 (1), 29-37.
- Graham G. G., Punt J., Arora M., Day R. O., Doogue M. P., Duong J. K., Furlong T. J., Greenfield J. R., Greenup L. C., Kirkpatrick C. M., Ray J. E., Timmins P., y Williams K. M. (2011). Clinical pharmacokinetics of metformin. *Clinical Pharmacokinetics*, 50 (2), 81-98.
- Grossi V., Liuzzi M., Murzilli S., Martelli N., Napoli A., Ingravallo G., Del Rio A., y Simone C. (2012). Sorafenib inhibits p38 α activity in colorectal cancer cells and synergizes with the DFG-in inhibitor SB202190 to increase apoptotic response. *Cancer Biology y Therapy*, 13 (14), 1471-1481.
- Guo L., Hu C., Yao M., y Han G. (2023). Mechanism of sorafenib resistance associated with ferroptosis in HCC. *Frontiers in Pharmacology*, 14 , 1207496.
- Guo Yang, Xiao Z., Yang L., Gao Y., Zhu Q., Hu L., Huang D., y Xu Q. (2020). Hypoxia-inducible factors in hepatocellular carcinoma (Review). *Oncol Rep*, 43 (1), 3-15.
- Guo Yan-Jun, Pan W., Liu S., Shen Z., Xu Y., y Hu L. (2020). ERK/MAPK signalling pathway and tumorigenesis (Review). *Experimental and Therapeutic Medicine*,.
- Guo Z., Cao M., You A., Gao J., Zhou H., Li H., Cui Y., Fang F., Zhang W., Song T., Li Q., Zhu X., Sun H., y Zhang T. (2016). Metformin inhibits the prometastatic effect of sorafenib in hepatocellular carcinoma by upregulating the expression of TIP30. *Cancer Science*, 107 (4), 507-513.
- Ha T.-Y., Hwang S., Moon K.-M., Won Y.-J., Song G.-W., Kim N., Tak E., Ryoo B.-Y., y Hong H.-N. (2015). Sorafenib inhibits migration and invasion of hepatocellular carcinoma cells through suppression of matrix metalloproteinase expression. *Anticancer Research*, 35 (4), 1967-1976.
- Hage C., Hoves S., Strauss L., Bissinger S., Prinz Y., Pöschinger T., Kiessling F., y Ries C. H. (2019). Sorafenib Induces Pyroptosis in Macrophages and Triggers Natural Killer Cell-Mediated Cytotoxicity Against Hepatocellular Carcinoma. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 70 (4), 1280-1297.
- Han G., Gong H., Wang Y., Guo S., y Liu K. (2015). AMPK/mTOR-mediated inhibition of survivin partly contributes to metformin-induced apoptosis in human gastric cancer cell. *Cancer Biology y Therapy*, 16 (1), 77-87.

- Harati R., Vandamme M., Blanchet B., Bardin C., Praz F., Hamoudi R. A., y Desbois-Mouthon C. (2021). Drug-Drug Interaction between Metformin and Sorafenib Alters Antitumor Effect in Hepatocellular Carcinoma Cells. *Molecular Pharmacology*, 100 (1), 32-45.
- Hashemi M., Nadafzadeh N., Imani M. H., Rajabi R., Ziaolhagh S., Bayanzadeh S. D., Norouzi R., Rafiei R., Koohpar Z. K., Raei B., Zandieh M. A., Salimimoghadam S., Entezari M., Taheriazam A., Alexiou A., Papadakis M., y Tan S. C. (2023). Targeting and regulation of autophagy in hepatocellular carcinoma: revisiting the molecular interactions and mechanisms for new therapy approaches. *Cell Communication and Signaling : CCS*, 21 (1), 32.
- Hatia R., Hwang L.-Y., Li R., Troisi C., Jalal P., Amos C., Gomez H., Chun Y. S., Rashid A., Kaseb A., Scheet P., y Hassan M. (2025). Risk and Prognosis of Hepatocellular Carcinoma in Mexican Americans with Type 2 Diabetes Mellitus. *Journal of Hepatocellular Carcinoma*, Volume 12 , 93-106.
- Haupt S., Berger M., Goldberg Z., y Haupt Y. (2003). Apoptosis - the p53 network. *Journal of Cell Science*, 116 (Pt 20), 4077-4085.
- Hemmings B. A., y Restuccia D. F. (2012). PI3K-PKB/Akt pathway. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4 (9), a011189.
- Ho D. W. H., Lo R. C. L., Chan L. K., y Ng I. O. L. (2016). Molecular pathogenesis of hepatocellular carcinoma. *Liver Cancer*.
- Hoffmann K., Shibo L., Xiao Z., Longerich T., Büchler M. W., y Schemmer P. (2011). Correlation of gene expression of ATP-binding cassette protein and tyrosine kinase signaling pathway in patients with hepatocellular carcinoma. *Anticancer Research*, 31 (11), 3883-3890.
- Hong J., Maacha S., Pidkovka N., Bates A., Salaria S. N., Washington M. K., y Belkhiri A. (2022). AXL Promotes Metformin-Induced Apoptosis Through Mediation of Autophagy by Activating ROS-AMPK-ULK1 Signaling in Human Esophageal Adenocarcinoma. *Frontiers in Oncology*, 12 .
- Hsieh S.-C., Tsai J.-P., Yang S.-F., Tang M.-J., y Hsieh Y.-H. (2014). Metformin inhibits the invasion of human hepatocellular carcinoma cells and enhances the chemosensitivity to sorafenib through a downregulation of the ERK/JNK-mediated NF-κB-dependent pathway that reduces uPA and MMP-9 expression. *Amino Acids*, 46 (12), 2809-2822.
- Hu Y., He Z., Li Z., Wang Y., Wu N., Sun H., Zhou Z., Hu Q., y Cong X. (2024). Lactylation: the novel histone modification influence on gene expression, protein function, and disease. *Clinical Epigenetics*, 16 (1), 72.
- Hu Y., Nie Q., Dai M., Chen F., y Wu H. (2020). Histone Deacetylases Inhibit the Snail2-Mediated EMT During Metastasis of Hepatocellular Carcinoma Cells. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8 .
- Hu Z., Zhao Y., Li L., Jiang J., Li W., Mang Y., Gao Y., Dong Y., Zhu J., Yang C., Ran J., Li L., y Zhang S. (2023). Metformin promotes ferroptosis and sensitivity to sorafenib in hepatocellular carcinoma cells via ATF4/STAT3. *Molecular Biology Reports*, 50 (8), 6399-6413.

- Huber T. B., Walz G., y Kuehn E. W. (2011). mTOR and rapamycin in the kidney: signaling and therapeutic implications beyond immunosuppression. *Kidney International*, 79 (5), 502-511.
- Huynh H., Ngo V. C., Koong H. N., Poon D., Choo S. P., Thng C. H., Chow P., Ong H. S., Chung A., y Soo K. C. (2009). Sorafenib and rapamycin induce growth suppression in mouse models of hepatocellular carcinoma. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 13 (8B), 2673-2683.
- Inoki K., Li Y., Zhu T., Wu J., y Guan K.-L. (2002). TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nature Cell Biology*, 4 (9), 648-657.
- Inoue H., Hwang S. H., Weckslar A. T., Hammock B. D., y Weiss R. H. (2011). Sorafenib attenuates p21 in kidney cancer cells and augments cell death in combination with DNA-damaging chemotherapy. *Cancer Biology y Therapy*, 12 (9), 827-836.
- Jo W., Yu E.-S., Chang M., Park H.-K., Choi H.-J., Ryu J.-E., Jang S., Lee H.-J., Jang J.-J., y Son W.-C. (2016). Metformin inhibits early stage diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis in rats. *Molecular Medicine Reports*, 13 (1), 146-152.
- Kanbayashi Y., Hosokawa T., Yasui K., Hongo F., Yamaguchi K., Moriguchi M., Miki T., y Itoh Y. (2016). Predictive factors for sorafenib-induced hand-foot skin reaction using ordered logistic regression analysis. *American Journal of Health-System Pharmacy: AJHP: Official Journal of the American Society of Health-System Pharmacists*, 73 (1), e18-23.
- Kane R. C., Farrell A. T., Saber H., Tang S., Williams G., Jee J. M., Liang C., Booth B., Chidambaram N., Morse D., Sridhara R., Garvey P., Justice R., y Pazdur R. (2006). Sorafenib for the Treatment of Advanced Renal Cell Carcinoma. *Clinical Cancer Research*, 12 (24), 7271-7278.
- Kanehisa M., Furumichi M., Sato Y., Matsuura Y., y Ishiguro-Watanabe M. (2025). KEGG: biological systems database as a model of the real world. *Nucleic Acids Research*, 53 (D1), D672-D677.
- Kanehisa M., y Goto S. (2000). KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. .
- Karbownik A., Szkutnik-Fiedler D., Czyrski A., Kostewicz N., Kaczmarek P., Bekier M., Stanisławski-Rudowicz J., Karaźniewicz-Łada M., Wolc A., Głowska F., Grześkowiak E., y Szalek E. (2020). Pharmacokinetic Interaction between Sorafenib and Atorvastatin, and Sorafenib and Metformin in Rats. *Pharmaceutics*, 12 (7), 600.
- Khor Y.-S., y Wong P.-F. (2024). MicroRNAs-associated with FOXO3 in cellular senescence and other stress responses. *Biogerontology*, 25 (1), 23-51.
- Kim D. Y. (2024). Changing etiology and epidemiology of hepatocellular carcinoma: Asia and worldwide. *Journal of Liver Cancer*, 24 (1), 622-70.
- Kim E., y Viatour P. (2020). Hepatocellular carcinoma: old friends and new tricks. *Experimental y Molecular Medicine*, 52 (12), 1898-1907.
- Kim J., Kundu M., Viollet B., y Guan K.-L. (2011). AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nature Cell Biology*, 13 (2), 132-141.

- Kim T. S., Lee M., Park M., Kim S. Y., Shim M. S., Lee C. Y., Choi D. H., y Cho Y. (2021). Metformin and Dichloroacetate Suppress Proliferation of Liver Cancer Cells by Inhibiting mTOR Complex 1. *International Journal of Molecular Sciences*, 22 (18).
- Kong J., Kong F., Gao J., Zhang Q., Dong S., Gu F., Ke S., Pan B., Shen Q., Sun H., Zheng L., y Sun W. (2014). YC-1 enhances the anti-tumor activity of sorafenib through inhibition of signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) in hepatocellular carcinoma. *Molecular Cancer*, 13 , 7.
- Kowdley K. V. (2004). Iron, hemochromatosis, and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*, 127 (5 Suppl 1), S79-86.
- Krämer O. H., Zhu P., Ostendorff H. P., Golebiewski M., Tiefenbach J., Peters M. A., Brill B., Groner B., Bach I., Heinzel T., y Göttlicher M. (2003). The histone deacetylase inhibitor valproic acid selectively induces proteasomal degradation of HDAC2. *The EMBO journal*, 22 (13), 3411-20.
- Kumar B. H., Kabekkodu S. P., y Pai K. S. R. (2025). Structural insights of AKT and its activation mechanism for drug development. *Molecular Diversity*,.
- Kumari R., Sharma A., Ajay A. K., y Bhat M. K. (2009). Mitomycin C induces bystander killing in homogeneous and heterogeneous hepatoma cellular models. *Molecular Cancer*, 8 , 87.
- Kutlu O., Kaleli H. N., y Ozer E. (2018). Molecular Pathogenesis of Nonalcoholic Steatohepatitis-(NASH-) Related Hepatocellular Carcinoma. *Canadian Journal of Gastroenterology y Hepatology*, 2018 , 8543763.
- Lai H.-Y., Tsai H.-H., Yen C.-J., Hung L.-Y., Yang C.-C., Ho C.-H., Liang H.-Y., Chen F.-W., Li C.-F., y Wang J.-M. (2020). Metformin Resensitizes Sorafenib-Resistant HCC Cells Through AMPK-Dependent Autophagy Activation. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8 , 596655.
- Lang L. (2008). , février FDA approves sorafenib for patients with inoperable liver cancer. *Gastroenterology*.
- Laplanche M., y Sabatini D. M. (2009). mTOR signaling at a glance. *Journal of Cell Science*, 122 (20), 3589-3594.
- Li B., Zhou P., Xu K., Chen T., Jiao J., Wei H., Yang X., Xu W., Wan W., y Xiao J. (2020). Metformin induces cell cycle arrest, apoptosis and autophagy through ROS/JNK signaling pathway in human osteosarcoma. *International Journal of Biological Sciences*, 16 (1), 74-84.
- Li J., Hernanda P. Y., Bramer W. M., Peppelenbosch M. P., van Luijk J., y Pan Q. (2015). Anti-tumor effects of metformin in animal models of hepatocellular carcinoma: a systematic review and meta-analysis. *PloS One*, 10 (6), e0127967.
- Li L., Zhao G., Shi Z., Qi L., Zhou L., y Fu Z. (2016). The Ras/Raf/MEK/ERK signaling pathway and its role in the occurrence and development of HCC (Review). *Oncol Lett*, 12 (5), 3045-3050.
- Li X., Zhu Y., He H., Lou L., Ye W., Chen Y., y Wang J. (2013). Synergistically killing activity of aspirin and histone deacetylase inhibitor valproic acid (VPA) on hepatocellular cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 436 (2), 259-264.

- Li Y., Gao Z.-H., y Qu X.-J. (2015). The adverse effects of sorafenib in patients with advanced cancers. *Basic y Clinical Pharmacology y Toxicology*, 116 (3), 216-221.
- Liang Y., Chen J., Yu Q., Ji T., Zhang B., Xu J., Dai Y., Xie Y., Lin H., Liang X., y Cai X. (2017). Phosphorylated ERK is a potential prognostic biomarker for Sorafenib response in hepatocellular carcinoma. *Cancer Medicine*, 6 (12), 2787-2795.
- Liao Y., Yang Y., Pan D., Ding Y., Zhang H., Ye Y., Li J., y Zhao L. (2021). HSP90 α Mediates Sorafenib Resistance in Human Hepatocellular Carcinoma by Necroptosis Inhibition under Hypoxia. *Cancers*, 13 (2).
- Ling S., Song L., Fan N., Feng T., Liu L., Yang X., Wang M., Li Y., Tian Y., Zhao F., Liu Y., Huang Q., Hou Z., Xu F., Shi L., y Li Y. (2017). Combination of metformin and sorafenib suppresses proliferation and induces autophagy of hepatocellular carcinoma via targeting the mTOR pathway. *International Journal of Oncology*, 50 (1), 297-309.
- Liu B., Xu J., Lu L., Gao L., Zhu S., Sui Y., Cao T., y Yang T. (2023). Metformin induces pyroptosis in leptin receptor-defective hepatocytes via overactivation of the AMPK axis. *Cell Death y Disease*, 14 (2), 82.
- Liu J., Yang X., Liang Q., Yu Y., Shen X., y Sun G. (2020). Valproic acid overcomes sorafenib resistance by reducing the migration of Jagged2-mediated Notch1 signaling pathway in hepatocellular carcinoma cells. *The International Journal of Biochemistry y Cell Biology*, 126 , 105820.
- Liu L., Cao Y., Chen C., Zhang X., McNabola A., Wilkie D., Wilhelm S., Lynch M., y Carter C. (2006). Sorafenib blocks the RAF/MEK/ERK pathway, inhibits tumor angiogenesis, and induces tumor cell apoptosis in hepatocellular carcinoma model PLC/PRF/5. *Cancer Research*, 66 (24), 11851-11858.
- Liu S., Yue C., Chen H., Chen Y., y Li G. (2020). Metformin Promotes Beclin1-Dependent Autophagy to Inhibit the Progression of Gastric Cancer. *OncoTargets and Therapy*, 13 , 4445-4455.
- Llovet J. M., Kelley R. K., Villanueva A., Singal A. G., Pikarsky E., Roayaie S., Lencioni R., Koike K., Zucman-Rossi J., y Finn R. S. (2021). Hepatocellular carcinoma. *Nature Reviews Disease Primers*, 7 (1), 6.
- Llovet J. M., Ricci S., Mazzaferro V., Hilgard P., Gane E., Blanc J.-F., de Oliveira A. C., Santoro A., Raoul J.-L., Forner A., Schwartz M., Porta C., Zeuzem S., Bolondi L., Greten T. F., Galle P. R., Seitz J.-F., Borbath I., Häussinger D., Giannaris T., Shan M., Moscovici M., Voliotis D., y Bruix J. (2008). Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *The New England Journal of Medicine*, 359 (4), 378-390.
- Louandre C., Ezzoukhry Z., Godin C., Barbare J.-C., Mazière J.-C., Chauffert B., y Galmiche A. (2013). Iron-dependent cell death of hepatocellular carcinoma cells exposed to sorafenib. *International Journal of Cancer*, 133 (7), 1732-1742.
- Ma, L., Chen, Z., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., y Pandolfi, P. P. (2005). Phosphorylation and Functional Inactivation of TSC2 by Erk. *Cell*, 121(2), 179-193.

- Magnussen A., y Parsi M. A. (2013). , mars Aflatoxins, hepatocellular carcinoma and public health. World journal of gastroenterology.
- Mandl-Weber S., Meinel F. G., Jankowsky R., Oduncu F., Schmidmaier R., y Baumann P. (2010). The novel inhibitor of histone deacetylase resminostat (RAS2410) inhibits proliferation and induces apoptosis in multiple myeloma (MM) cells. British Journal of Haematology, 149 (4), 518-528.
- Matsuda Y., Wakai T., Kubota M., Osawa M., Hirose Y., Sakata J., Kobayashi T., Fujimaki S., Takamura M., Yamagiwa S., y Aoyagi Y. (2014). Valproic acid overcomes transforming growth factor- β -mediated sorafenib resistance in hepatocellular carcinoma. International Journal of Clinical and Experimental Pathology, 7 (4), 1299-1313.
- Matter M. S., Decaens T., Andersen J. B., y Thorgeirsson S. S. (2014). Targeting the mTOR pathway in hepatocellular carcinoma: Current state and future trends. Journal of Hepatology, 60 (4), 855-865.
- McGlynn K. A., y London W. T. (2011). The Global Epidemiology of Hepatocellular Carcinoma: Present and Future. Clinics in Liver Disease, 15 (2), 223-243.
- Milutinovic S., D'Alessio A. C., Detich N., y Szyf M. (2007). Valproate induces widespread epigenetic reprogramming which involves demethylation of specific genes. Carcinogenesis, 28 (3), 560-571.
- Monden Y., Kubota T., Tsutsumi T., Inoue T., Kawano S., Kawamura N., Ide T., Egashira K., Tsutsui H., y Sunagawa K. (2007). Soluble TNF receptors prevent apoptosis in infiltrating cells and promote ventricular rupture and remodeling after myocardial infarction. Cardiovascular Research, 73 (4), 794-805.
- Moon H., y Ro S. W. (2021). MAPK/ERK Signaling Pathway in Hepatocellular Carcinoma. Cancers, 13 (12).
- Moscat J., y Diaz-Meco M. T. (2009). p62 at the Crossroads of Autophagy, Apoptosis, and Cancer. Cell, 137 (6), 1001-1004.
- Mukhopadhyay S., Panda P. K., Sinha N., Das D. N., y Bhutia S. K. (2014). Autophagy and apoptosis: where do they meet? Apoptosis, 19 (4), 555-566.
- Nagai H., Kanekawa T., Kobayashi K., Mukozu T., Matsui D., Matsui T., Kanayama M., Wakui N., Momiyama K., Shinohara M., Ishii K., Igarashi Y., y Sumino Y. (2014). Changes of cytokines in patients with liver cirrhosis and advanced hepatocellular carcinoma treated by sorafenib. Cancer Chemotherapy and Pharmacology, 73 (2), 223-229.
- National Cancer Institute (2025). Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE) v6.0 (MedDRA 28.0). .
- Natri H. M., Wilson M. A., y Buetow K. H. (2019). Distinct molecular etiologies of male and female hepatocellular carcinoma. BMC Cancer, 19 (1), 951.
- Naugler W. E., Sakurai T., Kim S., Maeda S., Kim K., Elsharkawy A. M., y Karin M. (2007). Gender Disparity in Liver Cancer Due to Sex Differences in MyD88-Dependent IL-6 Production. Science, 317 (5834), 121-124.
- Neuzillet C., Tijeras-Raballand A., de Mestier L., Cros J., Faivre S., y Raymond E. (2014). MEK in cancer and cancer therapy. Pharmacology y Therapeutics, 141 (2), 160-171.

- Nevola R., Tortorella G., Rosato V., Rinaldi L., Imbriani S., Perillo P., Mastrocinque D., La Montagna M., Russo A., Di Lorenzo G., Alfano M., Rocco M., Riconzi C., Gjeloghi K., Sasso F. C., Marfella R., Marrone A., Kondili L. A., Esposito N., Claar E., y Cozzolino D. (2023). Gender Differences in the Pathogenesis and Risk Factors of Hepatocellular Carcinoma. *Biology*, 12 (7), 984.
- Noda T., y Ohsumi Y. (1998). Tor, a Phosphatidylinositol Kinase Homologue, Controls Autophagy in Yeast. *Journal of Biological Chemistry*, 273 (7), 3963-3966.
- Ohno T., Shimizu M., Shirakami Y., Baba A., Kochi T., Kubota M., Tsurumi H., Tanaka T., y Moriwaki H. (2015). Metformin Suppresses Diethylnitrosamine-Induced Liver Tumorigenesis in Obese and Diabetic C57BL/KsJ-*Leprdb/Leprdb* Mice. *PLOS ONE*, 10 (4), e0124081.
- Ozaki T., y Nakagawara A. (2011). Role of p53 in cell death and human cancers. *Cancers*, 3 (1), 994-1013.
- Palleria C., Di Paolo A., Giofrè C., Caglioti C., Leuzzi G., Siniscalchi A., De Sarro G., y Gallelli L. (2013). Pharmacokinetic drug-drug interaction and their implication in clinical management. *Journal of research in medical sciences: the official journal of Isfahan University of Medical Sciences*, 18 (7), 601-10.
- Panchaprateep R., y Lueangarun S. (2020). Efficacy and Safety of Oral Minoxidil 5 mg Once Daily in the Treatment of Male Patients with Androgenetic Alopecia: An Open-Label and Global Photographic Assessment. *Dermatology and Therapy*, 10 (6), 1345-1357.
- Panwar V., Singh A., Bhatt M., Tonk R. K., Azizov S., Raza A. S., Sengupta S., Kumar D., y Garg M. (2023). Multifaceted role of mTOR (mammalian target of rapamycin) signaling pathway in human health and disease. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 8 (1), 375.
- Papadakos S. P., Ferraro D., Carbone G., Frampton A. E., Vennarecci G., Kykalos S., Schizas D., Theocharis S., y Machairas N. (2023). The Emerging Role of Metformin in the Treatment of Hepatocellular Carcinoma: Is There Any Value in Repurposing Metformin for HCC Immunotherapy? *Cancers*, 15 (12), 3161.
- Paquette M., El-Houjeiri L., C. Zirden L., Puustinen P., Blanchette P., Jeong H., Dejgaard K., Siegel P. M., y Pause A. (2021). AMPK-dependent phosphorylation is required for transcriptional activation of TFEB and TFE3. *Autophagy*, 17 (12), 3957-3975.
- Park I. C., Park M. J., Hwang C. S., Rhee C. H., Whang D. Y., Jang J. J., Choe T. B., Hong S. I., y Lee S. H. (2000). Mitomycin C induces apoptosis in a caspases-dependent and Fas/CD95-independent manner in human gastric adenocarcinoma cells. *Cancer Letters*, 158 (2), 125-132.
- Park J.-W., Chen M., Colombo M., Roberts L. R., Schwartz M., Chen P.-J., Kudo M., Johnson P., Wagner S., Orsini L. S., y Sherman M. (2015). Global patterns of hepatocellular carcinoma management from diagnosis to death: the BRIDGE Study. *Liver International: Official Journal of the International Association for the Study of the Liver*, 35 (9), 2155-2166.
- Peng Y., Cheng Z., y Xie F. (2021). Evaluation of Pharmacokinetic Drug–Drug Interactions: A Review of the Mechanisms, In Vitro and In Silico Approaches. *Metabolites*, 11 (2), 75.

- Petrick J. L., y McGlynn K. A. (2019). The changing epidemiology of primary liver cancer. *Current Epidemiology Reports*, 6 (2), 104-111.
- Phiel C. J., Zhang F., Huang E. Y., Guenther M. G., Lazar M. A., y Klein P. S. (2001). Histone Deacetylase is a Direct Target of Valproic Acid, a Potent Anticonvulsant, Mood Stabilizer, and Teratogen. *Journal of Biological Chemistry*, 276 (39), 36734-36741.
- Pihán P., Carreras-Sureda A., y Hetz C. (2017). BCL-2 family: integrating stress responses at the ER to control cell demise. *Cell Death and Differentiation*, 24 (9), 1478-1487.
- Plumb J. A., Finn P. W., Williams R. J., Bandara M. J., Romero M. R., Watkins C. J., La Thangue N. B., y Brown R. (2003). Pharmacodynamic response and inhibition of growth of human tumor xenografts by the novel histone deacetylase inhibitor PXD101. *Molecular Cancer Therapeutics*, 2 (8), 721-728.
- Poon R. T. P., Ho J. W. Y., Tong C. S. W., Lau C., Ng I. O. L., y Fan S.-T. (2004). Prognostic significance of serum vascular endothelial growth factor and endostatin in patients with hepatocellular carcinoma. *The British Journal of Surgery*, 91 (10), 1354-1360.
- Pushpakom S., Iorio F., Eyers P. A., Escott K. J., Hopper S., Wells A., Doig A., Guilleams T., Latimer J., McNamee C., Norris A., Sanseau P., Cavalla D., y Pirmohamed M. (2019). Drug repurposing: progress, challenges and recommendations. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 18 (1), 41-58.
- Qian D. Z., Kachhap S. K., Collis S. J., Verheul H. M. W., Carducci M. A., Atadja P., y Pili R. (2006). Class II histone deacetylases are associated with VHL-independent regulation of hypoxia-inducible factor 1 α . *Cancer Research*, 66 (17), 8814-8821.
- Qu Z., Zhang Y., Liao M., Chen Y., Zhao J., y Pan Y. (2012). In vitro and in vivo antitumoral action of metformin on hepatocellular carcinoma. *Hepatology Research: The Official Journal of the Japan Society of Hepatology*, 42 (9), 922-933.
- Reig M., Forner A., Rimola J., Ferrer-Fàbrega J., Burrel M., Garcia-Criado Á., Kelley R. K., Galle P. R., Mazzaferro V., Salem R., Sangro B., Singal A. G., Vogel A., Fuster J., Ayuso C., y Bruix J. (2022). BCLC strategy for prognosis prediction and treatment recommendation: The 2022 update. *Journal of Hepatology*, 76 (3), 681-693.
- Rodríguez-Hernández M. A., de la Cruz-Ojeda P., Gallego P., Navarro-Villarán E., Staňková P., Del Campo J. A., Kučera O., Elkalaf M., Maseko T. E., Červinková Z., y Muntané J. (2020). Dose-dependent regulation of mitochondrial function and cell death pathway by sorafenib in liver cancer cells. *Biochemical Pharmacology*, 176 , 113902.
- Roth D., Safi M., Vilhelmsson Timmermand O., Sereti E., Molendowska M., Gottschalk M., Bjartell A., Ceberg C., Szczepankiewicz F., y Strand J. (2024). Evaluation of superficial xenograft volume estimation by ultrasound and caliper against MRI in a longitudinal pre-clinical radiotherapeutic setting. *PLOS ONE*, 19 (7), e0307558.
- Sahin F., Kannangai R., Adegbola O., Wang J., Su G., y Torbenson M. (2004). mTOR and P70 S6 Kinase Expression in Primary Liver Neoplasms. *Clinical Cancer Research*, 10 (24), 8421-8425.
- Saitta C., Pollicino T., y Raimondo G. (2019). Obesity and liver cancer. *Annals of Hepatology*, 18 (6), 810-815.

- Sanaei Masumeh, y Kavooosi F. (2021). Effect of Valproic Acid on the Class I Histone Deacetylase 1, 2 and 3, Tumor Suppressor Genes p21WAF1/CIP1 and p53, and Intrinsic Mitochondrial Apoptotic Pathway, Pro- (Bax, Bak, and Bim) and anti- (Bcl-2, Bcl-xL, and Mcl-1) Apoptotic Genes Expression, C. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention : APJCP, 22 (S1), 89-95.
- Sanaei Masumeh, Kavooosi F., Roustazadeh A., y Shahsavani H. (2018). In Vitro Effect of the Histone Deacetylase Inhibitor Valproic Acid on Viability and Apoptosis of the PLC/PRF5 Human Hepatocellular Carcinoma Cell Line. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention : APJCP, 19 (9), 2507-2510.
- Sancak Y., Thoreen C. C., Peterson T. R., Lindquist R. A., Kang S. A., Spooner E., Carr S. A., y Sabatini D. M. (2007). PRAS40 Is an Insulin-Regulated Inhibitor of the mTORC1 Protein Kinase. Molecular Cell, 25 (6), 903-915.
- Sanyal A. J., Yoon S. K., y Lencioni R. (2010). The etiology of hepatocellular carcinoma and consequences for treatment. The Oncologist, 15 Suppl 4 , 14-22.
- Saxton R. A., y Sabatini D. M. (2017). mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. Cell, 168 (6), 960-976.
- Schmitz V., Tirado-Ledo L., Tiemann K., Raskopf E., Heinicke T., Ziske C., González-Carmona M. A., Rabe C., Wernert N., Prieto J., Qian C., Sauerbruch T., y Caselmann W. H. (2004). Establishment of an orthotopic tumour model for hepatocellular carcinoma and non-invasive in vivo tumour imaging by high resolution ultrasound in mice. Journal of Hepatology, 40 (5), 787-791.
- Schult C., Dahlhaus M., Ruck S., Sawitzky M., Amoroso F., Lange S., Etro D., Glass A., Fuellen G., Boldt S., Wolkenhauer O., Neri L. M., Freund M., y Junghanss C. (2010). The multikinase inhibitor Sorafenib displays significant antiproliferative effects and induces apoptosis via caspase 3, 7 and PARP in B- and T-lymphoblastic cells. BMC Cancer, 10 , 560.
- Schulte L., Scheiner B., Voigtländer T., Koch S., Schweitzer N., Marhenke S., Ivanyi P., Manns M. P., Rodt T., Hinrichs J. B., Weinmann A., Pinter M., Vogel A., y Kirstein M. M. (2019). Treatment with metformin is associated with a prolonged survival in patients with hepatocellular carcinoma. Liver International: Official Journal of the International Association for the Study of the Liver, 39 (4), 714-726.
- Semela D., Piguet A.-C., Kolev M., Schmitter K., Hlushchuk R., Djonov V., Stoupis C., y Dufour J.-F. (2007). Vascular remodeling and antitumoral effects of mTOR inhibition in a rat model of hepatocellular carcinoma. Journal of Hepatology, 46 (5), 840-848.
- Setiawan V. W., Hernandez B. Y., Lu S. C., Stram D. O., Wilkens L. R., Marchand L. L., y Henderson B. E. (2014). Diabetes and Racial/Ethnic Differences in Hepatocellular Carcinoma Risk: The Multiethnic Cohort. JNCI Journal of the National Cancer Institute, 106 (12), dju326-dju326.
- Shen C., Jiang X., Li M., y Luo Y. (2023). Hepatitis Virus and Hepatocellular Carcinoma: Recent Advances. Cancers, 15 (2).

- Shimizu S., Takehara T., Hikita H., Kodama T., Tsunematsu H., Miyagi T., Hosui A., Ishida H., Tatsumi T., Kanto T., Hiramatsu N., Fujita N., Yoshimori T., y Hayashi N. (2012). Inhibition of autophagy potentiates the antitumor effect of the multikinase inhibitor sorafenib in hepatocellular carcinoma. *International Journal of Cancer*, 131 (3), 548-557.
- Siddharth S., Kuppusamy P., Wu Q., Nagalingam A., Saxena N. K., y Sharma D. (2022). Metformin Enhances the Anti-Cancer Efficacy of Sorafenib via Suppressing MAPK/ERK/Stat3 Axis in Hepatocellular Carcinoma. *International Journal of Molecular Sciences*, 23 (15).
- Sonntag R., Gassler N., Bangen J.-M., Trautwein C., y Liedtke C. (2014). Pro-apoptotic Sorafenib signaling in murine hepatocytes depends on malignancy and is associated with PUMA expression in vitro and in vivo. *Cell Death y Disease*, 5 (1), e1030-e1030.
- Stella L., Santopaolo F., Gasbarrini A., Pompili M., y Ponziani F. R. (2022). Viral hepatitis and hepatocellular carcinoma: From molecular pathways to the role of clinical surveillance and antiviral treatment. *World Journal of Gastroenterology*, 28 (21), 2251-2281.
- Sun G., Mackey L. V., Coy D. H., Yu C.-Y., y Sun L. (2015). The Histone Deacetylase Inhibitor Vaproic Acid Induces Cell Growth Arrest in Hepatocellular Carcinoma Cells via Suppressing Notch Signaling. *Journal of Cancer*, 6 (10), 996-1004.
- Sun Y., Tao C., Huang X., He H., Shi H., Zhang Q., y Wu H. (2016). Metformin induces apoptosis of human hepatocellular carcinoma HepG2 cells by activating an AMPK/p53/miR-23a/FOXA1 pathway. *OncoTargets and Therapy*, 9 , 2845-2853.
- Sung H., Ferlay J., Siegel R. L., Laversanne M., Soerjomataram I., Jemal A., y Bray F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71 (3), 209-249.
- Sze K. M.-F., Ho D. W.-H., Chiu Y.-T., Tsui Y.-M., Chan L.-K., Lee J. M.-F., Chok K. S.-H., Chan A. C.-Y., Tang C.-N., Tang V. W.-L., Lo I. L.-O., Yau D. T.-W., Cheung T.-T., y Ng I. O.-L. (2021). Hepatitis B Virus-Telomerase Reverse Transcriptase Promoter Integration Harnesses Host ELF4, Resulting in Telomerase Reverse Transcriptase Gene Transcription in Hepatocellular Carcinoma. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 73 (1), 23-40.
- Tai W.-T., Shiau C.-W., Chen H.-L., Liu C.-Y., Lin C.-S., Cheng A.-L., Chen P.-J., y Chen K.-F. (2013). Mcl-1-dependent activation of Beclin 1 mediates autophagic cell death induced by sorafenib and SC-59 in hepatocellular carcinoma cells. *Cell Death y Disease*, 4 (2), e485.
- Tak W. Y., Ryoo B.-Y., Lim H. Y., Kim D.-Y., Okusaka T., Ikeda M., Hidaka H., Yeon J.-E., Mizukoshi E., Morimoto M., Lee M.-A., Yasui K., Kawaguchi Y., Heo J., Morita S., Kim T.-Y., Furuse J., Katayama K., Aramaki T., Hara R., Kimura T., Nakamura O., y Kudo M. (2018). Phase I/II study of first-line combination therapy with sorafenib plus resminostat, an oral HDAC inhibitor, versus sorafenib monotherapy for advanced hepatocellular carcinoma in east Asian patients. *Investigational New Drugs*, 36 (6), 1072-1084.
- Taketomi A., Shirabe K., Muto J., Yoshiya S., Motomura T., Mano Y., Ikegami T., Yoshizumi T., Sugio K., y Maehara Y. (2013). A rare point mutation in the Ras oncogene in hepatocellular carcinoma. *Surgery Today*, 43 (3), 289-292.

- Tan D. J. H., Tang A. S. P., Lim W. H., Ng C. H., Nah B., Fu C., Xiao J., Koh B., Tay P. W. L., Tan E. X., Teng M., Syn N., Muthiah M. D., Tamaki N., Lee S. W., Kim B. K., Yau T., Vogel A., Loomba R., y Huang D. Q. (2023). Survival Trends in Sorafenib for Advanced Hepatocellular Carcinoma: A Reconstructed Individual Patient Data Meta-Analysis of Randomized Trials. *Liver Cancer*, 12 (5), 445-456.
- Tang K., Chen Q., Liu Y., Wang L., y Lu W. (2022). Combination of Metformin and Sorafenib Induces Ferroptosis of Hepatocellular Carcinoma Through p62-Keap1-Nrf2 Pathway. *Journal of Cancer*, 13 (11), 3234-3243.
- Tang W., Chen Z., Zhang W., Cheng Y., Zhang B., Wu F., Wang Q., Wang S., Rong D., Reiter F. P., De Toni E. N., y Wang X. (2020). The mechanisms of sorafenib resistance in hepatocellular carcinoma: theoretical basis and therapeutic aspects. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 5 (1), 87.
- Testino G., Leone S., y Borro P. (2014). Alcohol and hepatocellular carcinoma: a review and a point of view. *World Journal of Gastroenterology*, 20 (43), 15943-15954.
- Thomas H. E., Mercer C. A., Carnevali L. S., Park J., Andersen J. B., Conner E. A., Tanaka K., Matsutani T., Iwanami A., Aronow B. J., Manway L., Maira S. M., Thorgeirsson S. S., Mischel P. S., Thomas G., y Kozma S. C. (2012). mTOR inhibitors synergize on regression, reversal of gene expression, and autophagy in hepatocellular carcinoma. *Science Translational Medicine*, 4 (139), 139ra84.
- Toh T. B., Lim J. J., y Chow E. K.-H. (2019). Epigenetics of hepatocellular carcinoma. *Clinical and Translational Medicine*, 8 (1), 13.
- Totoki Y., Tatsuno K., Covington K. R., Ueda H., Creighton C. J., Kato M., Tsuji S., Donehower L. A., Slagle B. L., Nakamura H., Yamamoto S., Shinbrot E., Hama N., Lehmkuhl M., Hosoda F., Arai Y., Walker K., Dahdouli M., Gotoh K., Nagae G., Gingras M.-C., Muzny D. M., Ojima H., Shimada K., Midorikawa Y., Goss J. A., Cotton R., Hayashi A., Shibahara J., Ishikawa S., Guiteau J., Tanaka M., Urushidate T., Ohashi S., Okada N., Doddapaneni H., Wang M., Zhu Y., Dinh H., Okusaka T., Kokudo N., Kosuge T., Takayama T., Fukayama M., Gibbs R. A., Wheeler D. A., Aburatani H., y Shibata T. (2014). Trans-ancestry mutational landscape of hepatocellular carcinoma genomes. *Nature Genetics*, 46 (12), 1267-1273.
- Tsai H.-H., Lai H.-Y., Chen Y.-C., Li C.-F., Huang H.-S., Liu H.-S., Tsai Y.-S., y Wang J.-M. (2017). Metformin promotes apoptosis in hepatocellular carcinoma through the CEBPD-induced autophagy pathway. *Oncotarget*, 8 (8), 13832-13845.
- Tsilimigras D. I., Ntanasis-Stathopoulos I., Moris D., Spartalis E., y Pawlik T. M. (2018). Histone deacetylase inhibitors in hepatocellular carcinoma: A therapeutic perspective. *Surgical Oncology*, 27 (4), 611-618.
- Vacante F., Senesi P., Montesano A., Paini S., Luzi L., y Terruzzi I. (2019). Metformin Counteracts HCC Progression and Metastasis Enhancing KLF6/p21 Expression and Downregulating the IGF Axis. *International Journal of Endocrinology*, 2019 , 1-14.
- Waetzig G. H., Rosenstiel P., Arlt A., Till A., Bräutigam K., Schäfer H., Rose-John S., Seegert D., y Schreiber S. (2005). Soluble tumor necrosis factor (TNF) receptor-1 induces apoptosis

- via reverse TNF signaling and autocrine transforming growth factor- β 1. *The FASEB Journal*, 19 (1), 91-93.
- Wang F., Bank T., Malnassy G., Arteaga M., Shang N., Dalheim A., Ding X., Cotler S. J., Denning M. F., Nishimura M. I., Breslin P., y Qiu W. (2018). Inhibition of insulin-like growth factor 1 receptor enhances the efficacy of sorafenib in inhibiting hepatocellular carcinoma cell growth and survival. *Hepatology Communications*, 2 (6), 732-746.
- Wang J., Lee E., Ji M., y Park S. (2018). HDAC inhibitors, trichostatin A and valproic acid, increase E-cadherin and vimentin expression but inhibit migration and invasion of cholangiocarcinoma cells. *Oncology Reports*,.
- Wang L.-T., Chiou S.-S., Chai C.-Y., Hsi E., Wang S.-N., Huang S.-K., y Hsu S.-H. (2018). Correction: Aryl hydrocarbon receptor regulates histone deacetylase 8 expression to repress tumor suppressive activity in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget*, 9 (102), 37807-37807.
- Wang P., Kang D., Cao W., Wang Y., y Liu Z. (2012). Diabetes mellitus and risk of hepatocellular carcinoma: a systematic review and meta-analysis. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, 28 (2), 109-122.
- Wang P., Tan G., Zhu M., Li W., Zhai B., y Sun X. (2018). Hand-foot skin reaction is a beneficial indicator of sorafenib therapy for patients with hepatocellular carcinoma: a systemic review and meta-analysis. *Expert Review of Gastroenterology y Hepatology*, 12 (1), 1-8.
- Wang X., Huo B., Liu J., Huang X., Zhang S., y Feng T. (2019). Hepatitis B virus X reduces hepatocyte apoptosis and promotes cell cycle progression through the Akt/mTOR pathway in vivo. *Gene*, 691 , 87-95.
- Wei J. C., Meng F. D., Qu K., Wang Z. X., Wu Q. F., Zhang L. Q., Pang Q., y Liu C. (2015). Sorafenib inhibits proliferation and invasion of human hepatocellular carcinoma cells via up-regulation of p53 and suppressing FoxM1. *Acta Pharmacologica Sinica*, 36 (2), 241-251.
- Whirl-Carrillo M., McDonagh E. M., Hebert J. M., Gong L., Sangkuhl K., Thorn C. F., Altman R. B., y Klein T. E. (2012). Pharmacogenomics knowledge for personalized medicine. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 92 (4), 414-417.
- Wilhelm S., Carter C., Lynch M., Lowinger T., Dumas J., Smith R. A., Schwartz B., Simantov R., y Kelley S. (2006). Discovery and development of sorafenib: a multikinase inhibitor for treating cancer. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 5 (10), 835-844.
- Wilhelm S., Carter C., Tang L., Wilkie D., McNabola A., Rong H., Chen C., Zhang X., Vincent P., McHugh M., Cao Y., Shujath J., Gawlak S., Eveleigh D., Rowley B., Liu L., Adnane L., Lynch M., Auclair D., Taylor I., Gedrich R., Voznesensky A., Riedl B., Post L. E., Bollag G., y Trail P. A. (2004). BAY 43-9006 exhibits broad spectrum oral antitumor activity and targets the RAF/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis. *Cancer Research*, 64 (19), 7099-7109.
- Wu J. D., Cui Y. J., Zhou Y. G., Tang L. Q., Zhang C. M., y Liu Z. P. (2020). Tubulin colchicine site binding agent LL01 displays potent antitumor efficiency both in vitro and in vivo with suitable drug-like properties. *Investigational New Drugs*, 38 (1), 29-38.

- Wu L., Feng H., Hu J., Tian X., y Zhang C. (2016). Valproic acid (VPA) promotes the epithelial mesenchymal transition of hepatocarcinoma cells via transcriptional and post-transcriptional up regulation of Snail. *Biomedicine y Pharmacotherapy = Biomedecine y Pharmacotherapie*, 84 , 1029-1035.
- Yagi Y., Fushida S., Harada S., Kinoshita J., Makino I., Oyama K., Tajima H., Fujita H., Takamura H., Ninomiya I., Fujimura T., Ohta T., Yashiro M., y Hirakawa K. (2010). Effects of valproic acid on the cell cycle and apoptosis through acetylation of histone and tubulin in a scirrhous gastric cancer cell line. *Journal of Experimental y Clinical Cancer Research : CR*, 29 (1), 149.
- Yang F. Q., Liu M., Yang F. P., Che J., Li W., Zhai W., Wang G. C., Zheng J. H., y Li X. (2014). VPA inhibits renal cancer cell migration by targeting HDAC2 and down-regulating HIF-1 α . *Molecular Biology Reports*,.
- Yang H., Peng Y.-F., Ni H.-M., Li Y., Shi Y.-H., Ding W.-X., y Fan J. (2015). Basal Autophagy and Feedback Activation of Akt Are Associated with Resistance to Metformin-Induced Inhibition of Hepatic Tumor Cell Growth. *PloS One*, 10 (6), e0130953.
- Yang Q., Gao L., Huang X., Weng J., Chen Y., Lin S., y Yin Q. (2021). Sorafenib prevents the proliferation and induces the apoptosis of liver cancer cells by regulating autophagy and hypoxia-inducible factor-1. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 22 (3), 980.
- Yang S., y Liu G. (2017). Targeting the Ras/Raf/MEK/ERK pathway in hepatocellular carcinoma. *Oncology Letters*, 13 (3), 1041-1047.
- Yang W., Zhao X., Pei F., Ji M., Ma W., Wang Y., y Jiang G. (2015). Activation of the intrinsic apoptosis pathway contributes to the induction of apoptosis in hepatocellular carcinoma cells by valproic acid. *Oncology Letters*, 9 (2), 881-886.
- Yang Xiaoli, Liu Y., Li M., Wu H., Wang Y., You Y., Li P., Ding X., Liu C., y Gong J. (2018). Predictive and preventive significance of AMPK activation on hepatocarcinogenesis in patients with liver cirrhosis. *Cell Death y Disease*, 9 (3), 264.
- Yang Xu, Liu J., Liang Q., y Sun G. (2021). Valproic acid reverses sorafenib resistance through inhibiting activated Notch/Akt signaling pathway in hepatocellular carcinoma. *Fundamental y Clinical Pharmacology*, 35 (4), 690-699.
- Yeh S.-H., Li C.-L., Lin Y.-Y., Ho M.-C., Wang Y.-C., Tseng S.-T., y Chen P.-J. (2023). Hepatitis B Virus DNA Integration Drives Carcinogenesis and Provides a New Biomarker for HBV-related HCC. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*, 15 (4), 921-929.
- Yeo W., Chung H. C., Chan S. L., Wang L. Z., Lim R., Picus J., Boyer M., Mo F. K. F., Koh J., Rha S. Y., Hui E. P., Jeung H. C., Roh J. K., Yu S. C. H., To K. F., Tao Q., Ma B. B., Chan A. W. H., Tong J. H. M., Erlichman C., Chan A. T. C., y Goh B. C. (2012). Epigenetic Therapy Using Belinostat for Patients With Unresectable Hepatocellular Carcinoma: A Multicenter Phase I/II Study With Biomarker and Pharmacokinetic Analysis of Tumors From Patients in the Mayo Phase II Consortium and the Cancer Therapeutics Res. *Journal of Clinical Oncology*, 30 (27), 3361-3367.
- You A., Cao M., Guo Z., Zuo B., Gao J., Zhou H., Li H., Cui Y., Fang F., Zhang W., Song T., Li Q., Zhu X., Yin H., Sun H., y Zhang T. (2016). Metformin sensitizes sorafenib to inhibit

- postoperative recurrence and metastasis of hepatocellular carcinoma in orthotopic mouse models. *Journal of Hematology y Oncology*, 9 (1), 20.
- Yu J. I., Choi C., Shin S.-W., Son A., Lee G.-H., Kim S.-Y., y Park H. C. (2017). Valproic Acid Sensitizes Hepatocellular Carcinoma Cells to Proton Therapy by Suppressing NRF2 Activation. *Scientific Reports*, 7 (1), 14986.
- Yu L., Chen Y., y Tooze S. A. (2018). Autophagy pathway: Cellular and molecular mechanisms. *Autophagy*, 14 (2), 207-215.
- Zamami Y., Hamano H., Niimura T., Aizawa F., Yagi K., Goda M., Izawa-Ishizawa Y., y Ishizawa K. (2021). Drug-Repositioning Approaches Based on Medical and Life Science Databases. *Frontiers in Pharmacology*, 12 .
- Zhai B., Hu F., Jiang X., Xu J., Zhao D., Liu B., Pan S., Dong X., Tan G., Wei Z., Qiao H., Jiang H., y Sun X. (2014). Inhibition of Akt reverses the acquired resistance to sorafenib by switching protective autophagy to autophagic cell death in hepatocellular carcinoma. *Molecular Cancer Therapeutics*, 13 (6), 1589-1598.
- Zhai J.-M., Yin X.-Y., Lai Y.-R., Hou X., Cai J.-P., Hao X.-Y., Liang L.-J., y Zhang L.-J. (2013). Sorafenib enhances the chemotherapeutic efficacy of S-1 against hepatocellular carcinoma through downregulation of transcription factor E2F-1. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 71 (5), 1255-1264.
- Zhang Y.-N., Wu X.-Y., Zhong N., Deng J., Zhang L., Chen W., Li X., y Zhong C.-J. (2014). Stimulatory effects of sorafenib on human non-small cell lung cancer cells in vitro by regulating MAPK/ERK activation. *Molecular Medicine Reports*, 9 (1), 365-369.
- Zhao J., Gray S. G., Wabitsch M., Greene C. M., y Lawless M. W. (2018). The therapeutic properties of resminostat for hepatocellular carcinoma. *Oncoscience*, 5 (5-6), 196-208.
- Zhao X., Tian C., Puszyk W. M., Ogunwobi O. O., Cao M., Wang T., Cabrera R., Nelson D. R., y Liu C. (2013). OPA1 downregulation is involved in sorafenib-induced apoptosis in hepatocellular carcinoma. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, 93 (1), 8-19.
- Zhao Y., Sun H., Feng M., Zhao J., Zhao X., Wan Q., y Cai D. (2018). Metformin is associated with reduced cell proliferation in human endometrial cancer by inhibiting PI3K/AKT/mTOR signaling. *Gynecological Endocrinology : The Official Journal of the International Society of Gynecological Endocrinology*, 34 (5), 428-432.
- Zhou J., Sun H., Wang Z., Cong W., Zeng M., Zhou W., Bie P., Liu L., Wen T., Kuang M., Han G., Yan Z., Wang M., Liu R., Lu L., Ren Z., Zeng Z., Liang P., Liang C., Chen M., Yan F., Wang W., Hou J., Ji Y., Yun J., Bai X., Cai D., Chen W., Chen Y., Cheng W., Cheng S., Dai C., Guo W., Guo Y., Hua B., Huang X., Jia W., Li Q., Li T., Li X., Li Y., Li Y., Liang J., Ling C., Liu T., Liu X., Lu S., Lv G., Mao Y., Meng Z., Peng T., Ren W., Shi H., Shi G., Shi M., Song T., Tao K., Wang J., Wang K., Wang L., Wang W., Wang X., Wang Z., Xiang B., Xing B., Xu J., Yang J., Yang J., Yang Y., Yang Y., Ye S., Yin Z., Zeng Y., Zhang B., Zhang B., Zhang L., Zhang S., Zhang T., Zhang Y., Zhao M., Zhao Y., Zheng H., Zhou L., Zhu J., Zhu K., Liu R., Shi Y., Xiao Y., Zhang L., Yang C., Wu Z., Dai Z., Chen M., Cai J., Wang W., Cai X., Li Q., Shen F., Qin S., Teng G., Dong J., y Fan J. (2023).

Guidelines for the Diagnosis and Treatment of Primary Liver Cancer (2022 Edition). Liver Cancer, 12 (5), 405-444.

Zhu W., Liang Q., Yang X., Yu Y., Shen X., y Sun G. (2017). Combination of sorafenib and Valproic acid synergistically induces cell apoptosis and inhibits hepatocellular carcinoma growth via down-regulating Notch3 and pAkt. American Journal of Cancer Research, 7 (12), 2503-2514.

12. RESUMEN BIOGRÁFICO

Edgar Xchel Franco Juárez

Candidato para el Grado de Doctor en Ciencias con Orientación en Inmunobiología

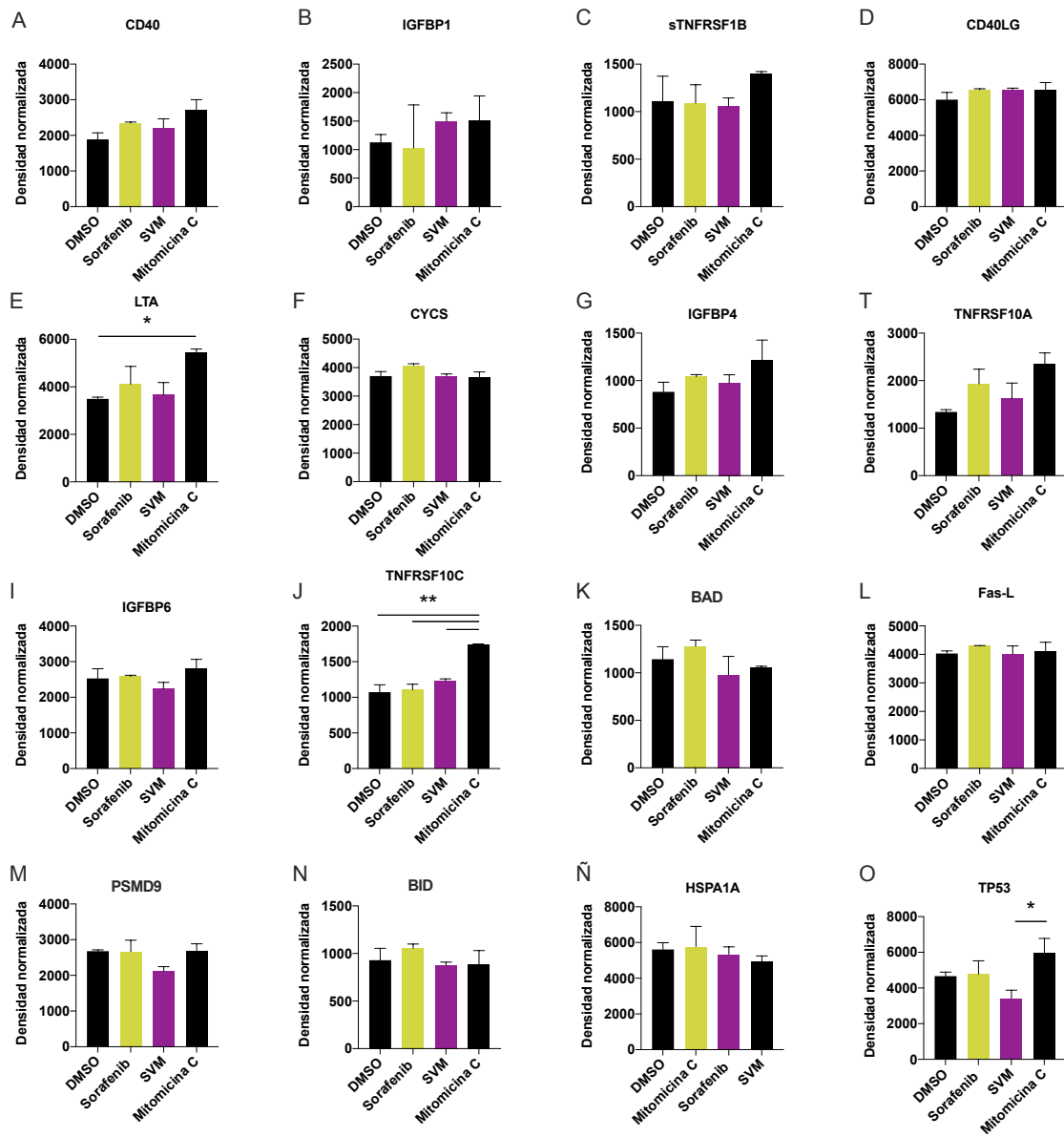
Tesis: EFECTO DE LA COMBINACIÓN DE SORAFENIB, ÁCIDO VALPROICO Y METFORMINA EN UN XENOTRANSPLANTE DE HEPATOCARCINOMA HUMANO.

Campo de Estudio: Ciencias biomédicas.

Datos Personales: Nacido en Ciudad de México el 6 de agosto de 1988.

Educación Profesional: Egresado de la Universidad Autónoma de Nuevo León. Grados obtenidos Maestría en Ciencias con Orientación en Inmunobiología y Licenciatura en Biotecnología Genómica.

Anexo 1. MATERIAL SUPLEMENTARIO



Continua Figura S1

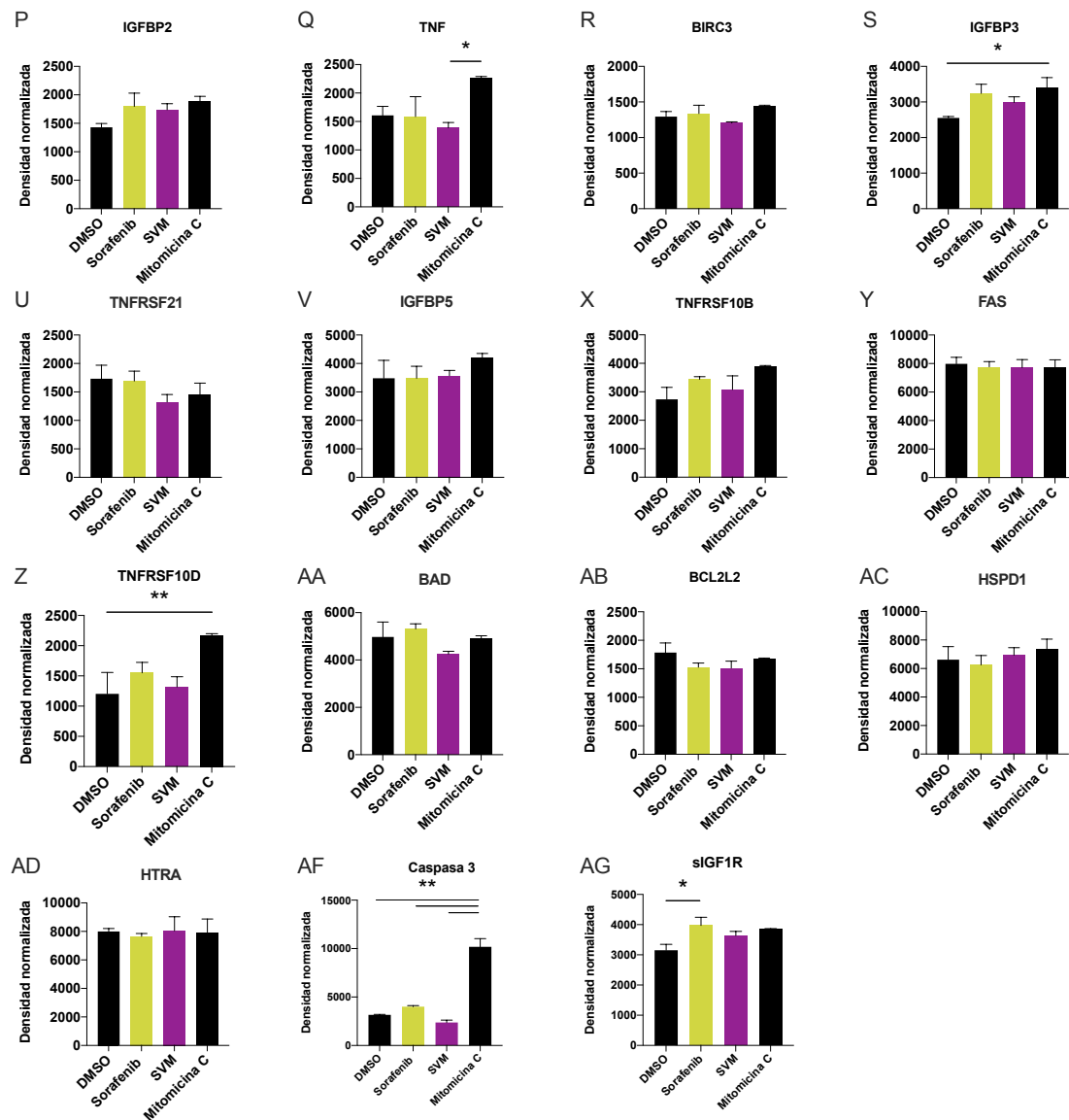


Figura S1. Expresión de proteínas relacionadas con la apoptosis por efecto del SVM en células HepG2. Las células fueron tratadas con 2 μ M de sorafenib (amarillo) y con la combinación de 2 μ M de sorafenib, 4 mM de ácido valproico y 10 mM de metformina (morado). Como control las células fueron tratadas con DMSO o con 10 μ g / mL de mitomicina C (negro) durante 24 h. Los datos representan la media $\pm$ desviación estándar y fueron analizados con ANOVA de una vía. *, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$ Abreviaturas: Forma soluble del receptor 1 del factor de crecimiento semejante a insulina (sIGF1R) CD40: Molécula CD40; IGFBP1-7: Proteínas de unión al factor de crecimiento semejante a insulina 1-7; sTNFRSF1B: Forma soluble del miembro 1B de la superfamilia del receptor TNF; CD40LG: Ligando del CD40; TNF: Factor de necrosis tumoral; BIRC3: Proteína baculoviral 3 con repetidos IAP; LTA: Linfotoxina alfa; CYCS: Citocromo C somático; TNFRSF10A-D: Miembro 10 A, B, C y D de la superfamilia del receptor TNF; TNFRSF21: Miembro 21 de la superfamilia del receptor TNF; FAS: Receptor de muerte celular Fas en superficie; BAD: Agonista asociado a muerte BCL2; BAX: Regulador de apoptosis X asociado a BCL2; BCL2L2: Proteína 2 semejante a BCL2; HSPD1: Miembro 1 de la familia D de proteínas de choque térmico (Hsp60); PSMD9: Subunidad 26S del proteasoma no ATPasa 9; BID: Agonista de muerte de interacción con dominio BH3; HSPA1A: Miembro 1A de la familia A de proteínas de choque térmico (Hsp70); TP53: Proteína tumoral 53; HTRA1: Serina peptidasa 1 Htra; SVM: Combinación de sorafenib, ácido valproico y metformina.

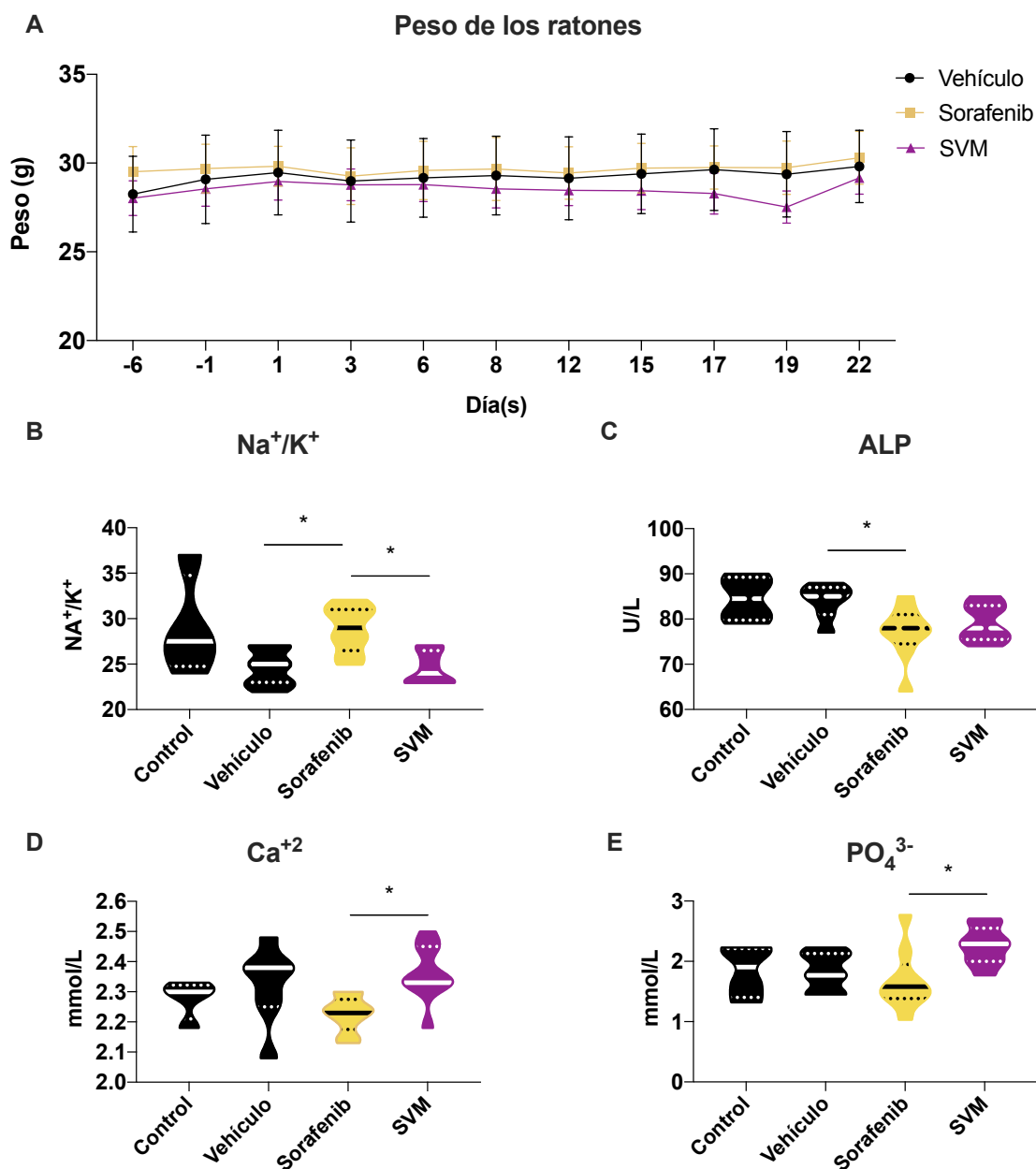


Figura S2. Efecto del tratamiento con sorafenib, ácido valproico y metformina en el peso y marcadores séricos en un modelo murino xenoinjertado con células de HCC humano. Machos desnudos de la cepa BALB/c fueron tratados oralmente con una mezcla de aceite de maíz, fructosa y miel como vehículo, recibieron 10 mg /kg / día de sorafenib o la combinación con 200 mg / kg / día de ácido valproico y 200 mg / kg / día de metformina. Imágenes representativas del peso de los ratones (A). Los datos representan la media $\pm$ desviación estándar y fueron analizados mediante ANOVA de dos vías. Los gráficos de violín representan la relación Na⁺ / K⁺ (B) y las concentraciones en suero del ion fosfato PO₄³⁻ (C), de la fosfatasa alcalina y del ión calcio Ca²⁺ (E). Los datos representan la media $\pm$ desviación estándar y fueron analizados mediante ANOVA de una vía. *, $p < 0.05$. Se muestran los cuartiles (líneas punteadas) y las medias (líneas continuas). Abreviaturas: ALP: Fosfatasa alcalina; SVM: Combinación de sorafenib, ácido valproico y metformina.

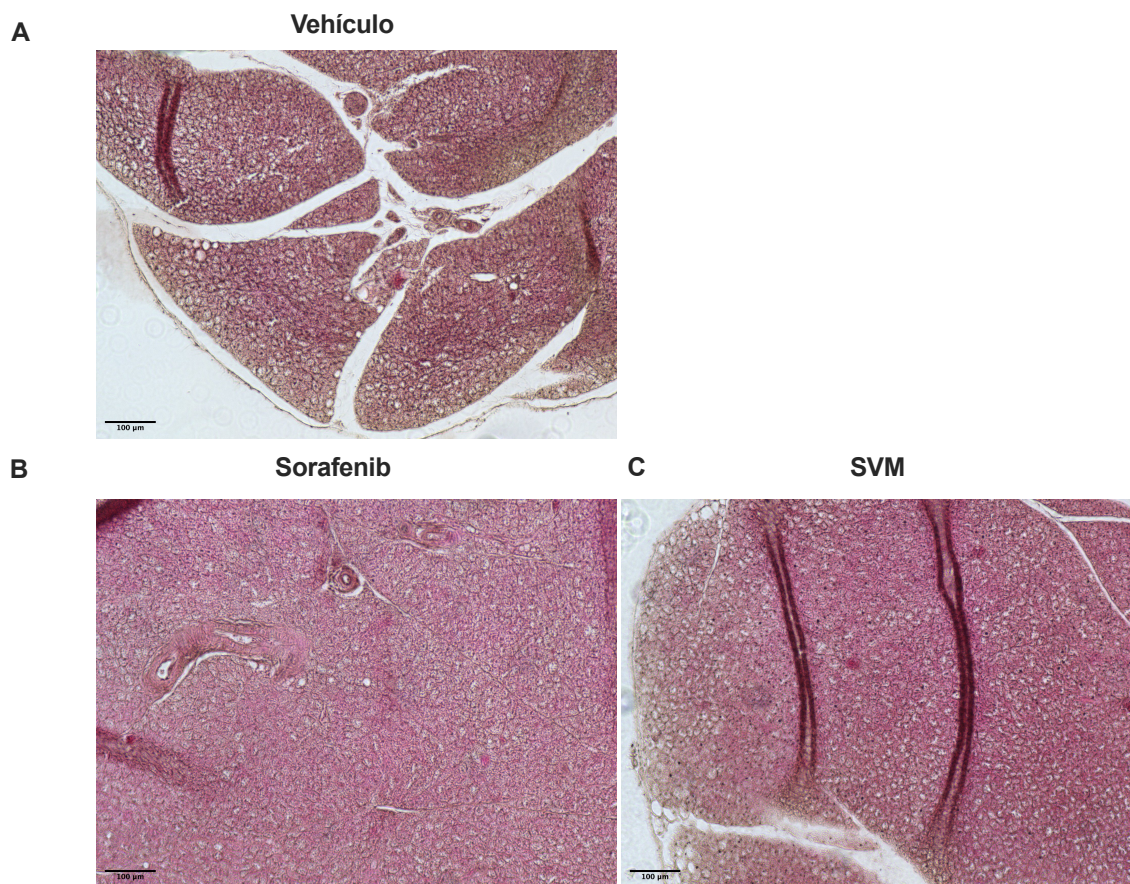


Figura S3. Tinción histoquímica del tejido tumoral por efecto de la combinación de sorafenib con ácido valproico y metformina. Imágenes representativas de secciones del tejido tumoral teñidos con eosina-hematoxilina. Machos BALB/c desnudos xenoinjertados con células HepG2 fueron aleatorizados y distribuidos para ser tratados oralmente con el vehículo compuesto de una mezcla de aceite de maíz, fructosa y miel (A), o recibieron 10 mg /kg / día de sorafenib (B) o 10 mg / kg / día de sorafenib en combinación con 200 mg /kg / día de ácido valproico y 200 mg /kg / día de metformina (C).