



Determinación del efecto de la combinación xanthohumol – sorafenib sobre la proliferación en células humanas de cáncer de hígado

Cajas Villalva, Katherin Graciela

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Trabajo de titulación, previo a la obtención del título de Ingeniera en Biotecnología

Dr. Grijalva Silva, Rodrigo Marcelo M.D., Ph.D.

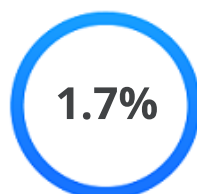
Sangolquí, 16 de febrero de 2022

Informe Copyleaks



PROYECTO_TITULACIÓN_CAJAS_KATHERIN_COPYLEAKS 012...

Scanned on: 19:35 January 27, 2022 UTC



Overall Similarity Score



Results Found



Total Words in Text

Identical Words	62
Words with Minor Changes	8
Paraphrased Words	77
Ommited Words	0

Firmado electrónicamente por:
RODRIGO MARCELO
GRIJALVA SILVA



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

CERTIFICACION

Por la presente CERTIFICO que el trabajo de titulación **“Determinación del efecto de la combinación xanthohumol – sorafenib sobre la proliferación en células humanas de cáncer de hígado”** fue realizado por la señorita Katherin Graciela Cajas Villalva, y que este trabajo ha sido revisado y analizado en su totalidad por la herramienta de verificación de similitud de contenido y por lo tanto cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE. Me permito por lo tanto acreditar y autorizar para que el trabajo mencionado se sustente públicamente.



Firmado electrónicamente por:
**RODRIGO MARCELO
GRIJALVA SILVA**

Dr. Marcelo Grijalva M.D., Ph.D.

C.C.: 1706590641



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

RESPONSABILIDAD DE AUTORÍA

Yo, **Cajas Villalva Katherin Graciela**, con cédula de ciudadanía n° 1804437471, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: **Determinación del efecto de la combinación xanthohumol – sorafenib sobre la proliferación en células humanas de cáncer de hígado** es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos, y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Sangolquí, 27 de enero del 2022

.....
Cajas Villalva, Katherin Graciela

C.C.: 1804437471



**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA
AGRICULTURA**

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN

Yo **Cajas Villalva Katherin Graciela**, con cédula de ciudadanía n° 1804437471, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: **Determinación del efecto de la combinación xanthohumol – sorafenib sobre la proliferación en células humanas de cáncer de hígado** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Sangolquí, 27 de enero del 2022

.....
Cajas Villalva, Katherin Graciela

C.C.: 1804437471

Dedicatoria

El presente trabajo de titulación esta dedicado a mi familia, especialmente:

A mis padres Luis Cajas y Graciela Villalva por ser mi motor principal a lo largo de toda mi carrera universitaria, por todos sus consejos brindados, por todo el apoyo y motivación que con amor y paciencia me han ayudado a conseguir este logro tan importante para mí.

A mis hermanos Karina, Jorge y Karla que me han ayudado a seguir adelante y con todo su cariño me han impulsado a ser mejor persona.

Finalmente, en memoria de mi abuelita Carlota Rosero quien en su momento con su sabiduría y amor fue la responsable de que ahora sea la mujer que me he convertido y tenga grandes aspiraciones en mi vida.

Agradecimientos

En primer lugar, quiero agradecer a Dios, el pilar fundamental en mi vida y de manera especial a la Virgencita María quienes de la mano me han llevado a conseguir todos los logros que me he planteado.

Un agradecimiento especial a mi director Dr. Marcelo Grijalva M.D., PhD y codirector Dr. Francisco Javier Camacho PhD por su guía profesional y personal en el transcurso de mi proyecto y por la inspiración que para mí representa el poder desarrollar este trabajo de investigación a cargo de tan reconocidos investigadores.

Gracias a Liz Hernández y Marta Noyola por su guía técnica en el desarrollo del presente trabajo de titulación y por la amistad brindada en el transcurso de mi estancia en México.

A mis amigos, Gaby P, Juan Carlos, Gaby B, Mary, Noryuly y Mario gracias por su amistad, por enseñarme lo valioso que es tener amistades que siempre te impulsen a ser mejor y sobre todo que incondicionalmente han estado para mí.

A toda mi familia especialmente a mi tío Lenin y mi tía Rosario por todo su apoyo y motivación.

Gracias a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, a la Carrera de Ingeniería en Biotecnología y a todos sus docentes por todo el aporte científico que me han brindado.

Sin ustedes el presente trabajo de titulación no hubiese sido posible.

Índice de contenidos

Informe Copyleaks	2
Certificación Docente	3
Responsabilidad de Autoría	4
Autorización de Publicación	5
Dedicatoria.....	6
Agradecimientos	7
Índice de contenidos	8
Índice de tablas.....	11
Índice de figuras.....	12
Resumen	14
Palabras Clave	14
Abstract.....	15
Key Words.....	15
Capítulo I: Introducción	16
Planteamiento del problema	16
Justificación del problema	17
Área de Influencia	19
Objetivos	20
Objetivo general.....	20
Objetivos específicos	20

Hipótesis	20
Capítulo II: Marco Teórico	21
Cáncer.....	21
Incidencia a Nivel Mundial y en el Ecuador	21
Mortalidad a Nivel Mundial y en el Ecuador	24
Carcinoma Hepatocelular	29
Patogénesis	29
Etiología.....	29
Epidemiología	30
Diagnostico	31
Tratamiento.....	32
Línea Celular HepG2.....	34
Sorafenib.....	36
Origen.....	36
Farmacocinética.....	37
Xanthohumol	38
Origen.....	38
Farmacocinética.....	40
Capítulo III: Metodología	41
Localización Geográfica	41
Cultivo Celular	41

	10
Curvas de Crecimiento	41
Fase I.....	42
Fase II.....	43
Preparación de los Fármacos Sorafenib y Xanthohumol	44
Ensayos de Proliferación Celular	45
Determinación de Concentraciones Inhibitorias IC ₂₀ , IC ₅₀ e IC ₈₀	47
Combinación de los Fármacos Xanthohumol y Sorafenib.....	47
Análisis Estadístico.....	49
Diseño Experimental.....	49
Repeticiones	49
Unidad Experimental.....	49
Variables.....	49
Capítulo IV: Resultados	51
Cultivo Celular	51
Efecto de los fármacos sobre la proliferación celular	53
Ensayos de Combinación del Sorafenib y Xanthohumol.....	55
Capítulo V: Discusión.....	58
Capítulo VI: Conclusiones	62
Capítulo VII: Recomendaciones	63
Capítulo VIII: Bibliografía	64

Índice de tablas

Tabla 1. <i>Tipos de cáncer mayormente diagnosticados en el mundo en el 2020</i>	23
Tabla 2. <i>Comparación de mortalidad de todos los tipos de cáncer entre 1990 y 2016</i>	25
Tabla 3. <i>Comparación de mortalidad de cáncer en estados unidos del 2017 y 2018</i>	27
Tabla 4. <i>Estimación de casos y muertes de cáncer de hígado del 2021 y tasa de mortalidad</i>	27
Tabla 5. <i>Diferentes técnicas de imagen utilizadas para el diagnóstico de CHC</i>	31
Tabla 6. <i>Diferentes avances terapéuticos enfocados a tratar el CHC</i>	33
Tabla 7. <i>Uso de la línea celular HepG2 en investigaciones de biomedicina</i>	35
Tabla 8. <i>Tratamientos combinados sorafenib y xanthohumol</i>	47
Tabla 9. <i>Operatividad de variables, factores a determinar y resultado</i>	50

Índice de figuras

Figura 1. <i>Rango de incidencia del cáncer de hígado a nivel mundial por sexo</i>	16
Figura 2. <i>Prevalencia a 5 años del cáncer de hígado a nivel mundial en ambos sexos</i>	18
Figura 3. <i>Incidencia de cáncer para ambos sexos por continentes</i>	22
Figura 4. <i>Fórmula estructural del tosilato de sorafenib</i>	37
Figura 5. <i>Estructura química del xanthohumol</i>	39
Figura 6. <i>Reducción metabólica del MTT</i>	41
Figura 7. <i>Construcción de la placa para las curvas de crecimiento de la línea celular HepG2</i>	44
Figura 8. <i>Construcción de las placas de proliferación para los dos fármacos individualmente</i>	46
Figura 9. <i>Construcción de la placa de proliferación de la combinación de los dos fármacos</i>	48
Figura 10. <i>Aplicación del reactivo MTT en la línea celular HepG2</i>	51
Figura 11. <i>Curva de crecimiento normalizada de la línea celular HepG2</i>	52
Figura 12. <i>Confluencia de la línea celular HepG2 durante la construcción de las curvas de crecimiento</i>	53
Figura 13. <i>Efecto antiproliferativo de sorafenib en la línea celular HepG2</i>	56
Figura 14. <i>Efecto antiproliferativo de xanthohumol en la línea celular HepG2</i>	57
Figura 15. <i>Efecto antiproliferativo de sorafenib y xanthohumol individualmente y en combinación</i>	56

Figura 16. <i>Imágenes representativas del efecto antiproliferativo de sorafenib y xanthohumol individualmente y en combinación</i>	57
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

Resumen

El cáncer de hígado a nivel mundial es el quinto cáncer más común en hombres y el séptimo cáncer más común en mujeres. Desde su primer reporte y a pesar de varias investigaciones realizadas hasta el momento, es una de las enfermedades más difíciles de tratar y de diagnosticar, por ello es importante realizar investigaciones acerca de nuevos tratamientos y potenciar otros ya existentes. En el presente trabajo se estudió el posible efecto potenciador de xanthohumol en el tratamiento de células cancerosas de la línea HepG2 con sorafenib. Se sabe que el efecto anticanceroso de xanthohumol es eficaz para inhibir la proliferación e inducir apoptosis de las células HepG2 a través de la vía de señalización de apoptosis NF- κ B/p53 y Notch. En primer lugar, se estableció la cinética de crecimiento de la línea celular HepG2 aplicando el método colorimétrico MTT, se estudió el efecto de los dos fármacos individualmente sobre la línea celular HepG2. El efecto significativo antiproliferativo para sorafenib fue en concentraciones de 1, 10, 15, 20 y 30 μ M y para xanthohumol a concentraciones de 1, 15, 20, 25, 30, 40, 50 y 100 μ M. Las concentraciones inhibitorias IC₂₀, IC₅₀ e IC₈₀ para sorafenib fueron 3.8, 7.6, y 11.3 μ M y para xanthohumol 11.9, 25.6 y 39.2 μ M respectivamente. Se analizó el efecto de la combinación xanthohumol y sorafenib sobre la proliferación en la línea celular HepG2 donde se obtuvieron diferencias significativas con relación a la combinación comparada con el control S IC₂₀ + X IC₅₀; S IC₅₀ + X 1 μ M; S IC₅₀ + X IC₂₀ y S IC₅₀ + X IC₅₀, pero no a la combinación comparada con ambos fármacos por individual, lo que indica que se necesitan más estudios que comprueben el sinergismo de los fármacos y su forma de actuar en combinación.

Palabras Clave

- **CARCINOMA HEPATOCELULAR**
- **ANTIPROLIFERACIÓN**
- **CONCENTRACIONES INHIBITORIAS**

Abstract

Liver cancer worldwide is the fifth most common cancer in men and the seventh most common cancer in women. Liver cancer has been long studied but its prevalence and incidence remain high, is one of the most difficult diseases to treat and diagnose, so it is important to conduct research on new treatments and enhance the existing ones. The present study aimed at assessing xanthohumol as a potentiating drug combined to sorafenib, a drug currently used to treat hepatocellular carcinoma. Xanthohumol is effective to inhibit proliferation and induce apoptosis of human liver cancer HepG2 cells via the NF- κ B / p53 and Notch apoptosis signaling pathway. We firstly studied the growth kinetics of HepG2 cells through the MTT colorimetric method. Then, the effect of both sorafenib and xanthohumol on cell viability was assessed individually for each drug. We found a dose-related cell growth inhibition. For sorafenib, significant inhibitory concentrations were found at 1, 10, 15, 20 and 30 μ M and for xanthohumol it had significant inhibitory effects at concentrations of 1, 15, 20, 25, 30, 40, 50 and 100 μ M. Inhibitory concentrations IC_{20} , IC_{50} and IC_{80} were calculated for sorafenib at 3.8; 7.6 and 11.3 μ M while for xanthohumol those figures were 11.9, 25.6 and 39.2 μ M respectively. The effect of the combination xanthohumol/sorafenib on proliferation in the human hepatocellular carcinoma cell line HepG2 was analyzed, where significant differences were obtained when the combination was compared to the control S IC_{20} + X IC_{50} ; S IC_{50} + X 1 μ M; S IC_{50} + X IC_{20} y S IC_{50} + X IC_{50} , but not when compared to both drugs individually. More studies are needed to verify the synergism of the drugs and their way of acting in combination.

Key Words

- HEPATOCELLULAR CARCINOMA
- ANTIPROLIFERATION
- INHIBITORY CONCENTRATIONS

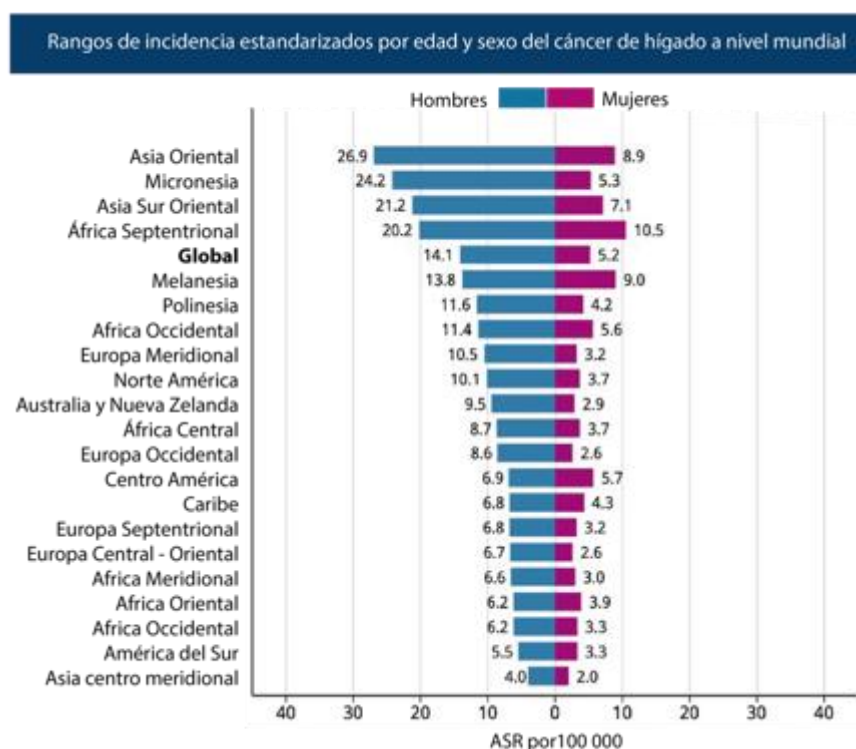
Capítulo I: Introducción

Planteamiento del problema

El cáncer de hígado a nivel mundial es el quinto cáncer más común en hombres y el séptimo cáncer más común en mujeres, en algunos casos la incidencia es del doble o incluso mayor en hombres que en mujeres. Las tasas de mayor índice son en las regiones del Este de Asia, Micronesia, Sureste de Asia, Norte de África. Dentro de nuestra región en América del Sur el rango de incidencia es una de las más bajas con 550000 en hombres y 330000 en mujeres por año como se ilustra en la Figura 1 (Sung et al., 2020).

Figura 1

Rango de incidencia del cáncer de hígado a nivel mundial por sexo



Nota. Modificado de *World Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN estimates the worldwide incidence and mortality for 36 cancers in 185 countries* (p. 1941–1953), por H. Sung et al., 2020, *Cancer Journal for Clinicians*.

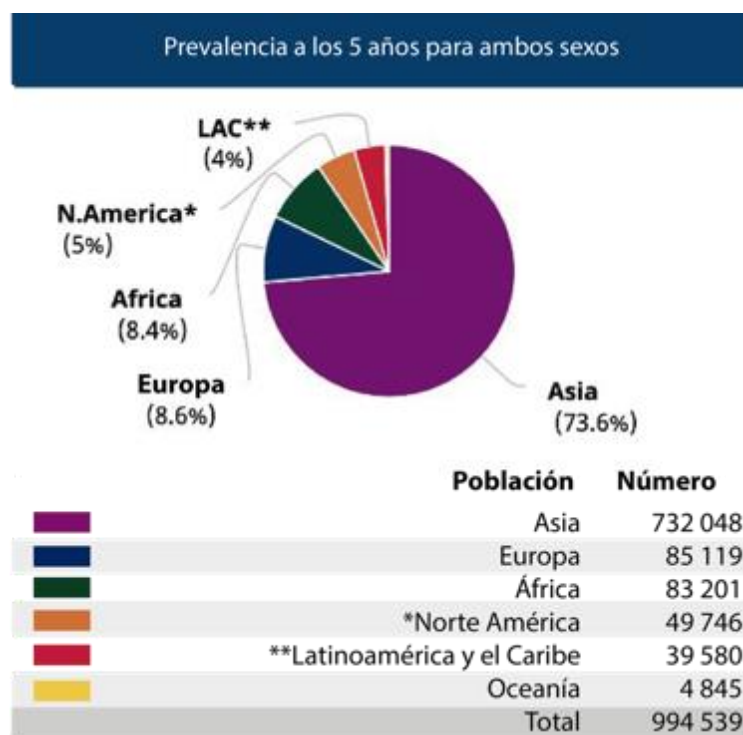
En la actualidad los tratamientos empleados son la cirugía, el trasplante de hígado, la terapia estándar de primera línea, terapia de virus y oncolíticos, la ablación, terapia de radiación, terapia sistémica que incluye la terapia dirigida, quimioterapia citotóxica e inmunoterapia (Liu, Chen, & Chen, 2015). La cirugía es una de las principales opciones de tratamiento para el cáncer de hígado, se puede hacer a través de resección del tumor o por medio de hepatectomía parcial. El trasplante de hígado se basa en ciertos límites de tamaño y ubicaciones de tumores y no todos los pacientes son candidatos para el trasplante ya que deben cumplir con determinados criterios. Dentro de la terapia dirigida se puede aplicar sorafenib, lenvatinib, atezolizumab, bevacizumab, regorafenib, cabozantinib, ramucirumab, de los cuales el sorafenib y regorafenib son los únicos agentes sistémicos aprobados por la FDA para su uso en el carcinoma hepatocelular con enfermedad metastásica o con una gran carga tumoral hepática. Las opciones de tratamiento para pacientes con carcinoma hepatocelular irreseccable que no son candidatos a trasplante incluyen la ablación, terapia dirigida, terapia de radiación (National Comprehensive Cancer Network, 2020).

Justificación del problema

Desde su aparición y a pesar de varias investigaciones realizadas hasta el momento el cáncer de hígado es una de las enfermedades más difíciles de tratar y de diagnosticar. Como se muestra en la Figura 2 la prevalencia de 5 años en ambos sexos por 100000 personas en América Latina y el Caribe es de 39580 personas, es decir que el 4% de todos los casos a nivel mundial está en LATAM y el Caribe. Las estadísticas nos dan una visión que a pesar de los grandes avances tecnológicos y farmacéuticos todavía no se ha logrado encontrar tratamientos eficaces contra algunos tipos de cáncer tales como el de hígado, páncreas y cerebro (National Cancer Institute, 2020).

Figura 2

Prevalencia a 5 años del cáncer de hígado a nivel mundial en ambos sexos



Nota. Modificado de *Global Cancer Observatory: Cancer Today*, por J. Ferlay et al., 2020, International Agency for Research on Cancer.

Por ello es importante realizar investigaciones acerca de nuevos tratamientos y potenciar otros ya existentes. El presente estudio implementa xanthohumol como fármaco potenciador al sorafenib, el cual es un medicamento utilizado para tratar el carcinoma hepatocelular.

Xanthohumol en varias investigaciones ha dado una respuesta positiva como agente anticanceroso, ya que inhibe la actividad y proliferación de algunas células cancerígenas, por ejemplo en cáncer de páncreas inhibe angiogénesis y propagación del tumor al suprimir la actividad de NF-κB (Kenta et al., 2017). Además, el efecto antitumoral también se ha evidenciado en diversas células cancerosas como en colon, ovario, mama, y próstata donde

se ha demostrado que inhibe el crecimiento tumoral e induce la apoptosis de células tumorales (Dorn et al., 2009).

No obstante, a pesar de que no se dispone de mucha información con respecto a los efectos sobre el carcinoma hepatocelular se ha demostrado el efecto anticanceroso de xanthohumol mediante inhibición de la proliferación e inducción de apoptosis en células HepG2 de cáncer de hígado humano a través de la vía de señalización de apoptosis NF- κ B/p53 (Zhao et al., 2016).

Al tener actividad antitumoral tanto xanthohumol como sorafenib para tratar el cáncer de hígado, la presente investigación pretende demostrar los efectos que conlleva el utilizar ambos medicamentos en conjunto en células HepG2.

Área de Influencia

El cáncer es una de las principales causas de muerte a nivel mundial. Durante varios años se han realizado diferentes estudios para contrarrestar los problemas que causa y el sustancial impacto económico generado que con el paso del tiempo va en aumento. En países de ingresos bajos, la detección en una fase avanzada, la falta de diagnóstico y tratamiento son problemas habituales. El cáncer de hígado tiene una de las tasas de mortalidad más alta siendo esta del 91,58% en el mundo.

La presente investigación está aplicada en el sector farmacéutico ya que se pretende estudiar el efecto de xanthohumol como fármaco potenciador al sorafenib que es utilizado en el tratamiento de pacientes con carcinoma hepatocelular en los cuales la cirugía ya no es aplicable.

Objetivos

Objetivo general

Determinar el efecto de la combinación xanthohumol – sorafenib sobre la proliferación en células humanas de cáncer de hígado.

Objetivos específicos

- Establecer la cinética de crecimiento de la línea celular del carcinoma hepatocelular humano HepG2.
- Identificar las concentraciones inhibitorias IC_{20} , IC_{50} e IC_{80} para los fármacos sorafenib y xanthohumol.
- Analizar el efecto de la combinación xanthohumol – sorafenib sobre la proliferación en la línea celular del carcinoma hepatocelular humano HepG2.

Hipótesis

La combinación xanthohumol – sorafenib tiene un efecto sobre la proliferación en células humanas de cáncer de hígado en comparación a la acción individual de los fármacos.

Capítulo II: Marco Teórico

Cáncer

El cáncer es una enfermedad que involucra cambios en las rutas moleculares y de señalización. Estas modificaciones conllevan a una proliferación celular descontrolada, ocasionando muerte celular, resistencia y posteriormente angiogénesis, lo cual conduce a transformar las células sanas en células malignas (Girisa et al., 2021).

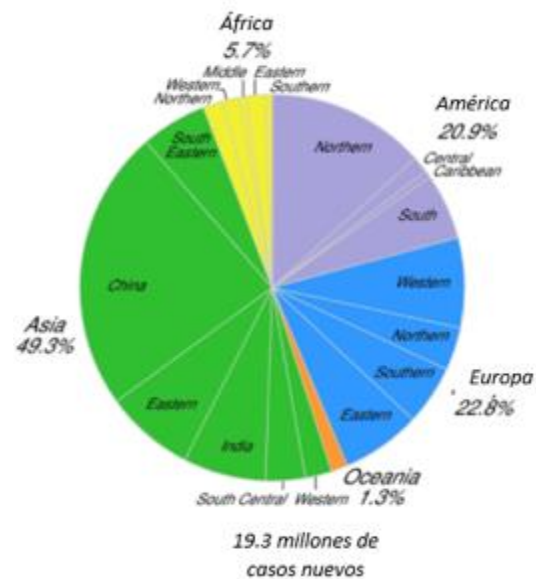
Incidencia a Nivel Mundial y en el Ecuador

Datos Mundiales. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2020), el cáncer se encuentra entre las 10 principales causas de defunción a nivel mundial, así como también la cardiopatía isquémica, enfermedad de Alzheimer, accidentes cerebrovasculares, entre otras enfermedades. En el año 2020, se registraron 19,2 millones de casos reportados nuevos de cáncer y existió 9,9 millones de muertes ocasionadas por esta enfermedad. Según Lortet-Tieulent et al. (2020), la incidencia de cáncer aumenta mientras más alta sea la esperanza de vida, educación y estándar de vida. Los valores promedio de incidencia a nivel mundial varían de entre 115 a 258 casos por cada 100000 habitantes, en países con baja y alta esperanza de vida, respectivamente. Por ejemplo, la incidencia de cáncer es más alta en Francia (323 casos por cada 100000 habitantes) que en Arabia Saudita (88 por cada 100000), no obstante, el porcentaje de supervivencia relativa es mayor en el país con alta esperanza de vida debido a la existencia de recursos para acudir a una pronta atención.

Asia fue el continente con mayor incidencia de cáncer en el 2020, con el 49,3% de los 19,3 millones de casos registrados a nivel mundial como se muestra en la Figura 3.

Figura 3

Incidencia de cáncer para ambos sexos por continentes



Nota. Modificado de *World Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN estimates the worldwide incidence and mortality for 36 cancers in 185 countries (p. 1941–1953)*, por H. Sung et al., 2021, *Cancer Journal for Clinicians*.

En América, el cáncer es la segunda causa de muerte. Los tipos de cáncer diagnosticados en 2020 mayoritariamente tanto en hombres como en mujeres se detallan en la Tabla 1.

Tabla 1*Tipos de cáncer mayormente diagnosticados a nivel mundial en el 2020*

Tipo de cáncer	Porcentaje de incidencia (%)	
	Mujeres	Hombres
Mama	25,4	
Próstata		21,7
Pulmón	8,5	8,9
Colorrectal	7,9	7,8
Tiroides	5	
Vejiga		4,5
Cervicouterino	3,8	
Melanoma de piel		3,4

Nota. Modificado de *Organización Panamericana de la Salud, 2021.*

Se cree que para el año 2040 el número de casos de cáncer aumentará hasta 29,5 millones a nivel mundial, con un número aproximado de 16,4 millones de defunciones (Sung et al., 2021).

Datos en el Ecuador. Según el último reporte de la OMS (2020), el cáncer con mayor incidencia en el Ecuador es el cáncer de mama, seguido por el de próstata, estómago, colon, tiroides, cérvix uterino, linfoma no-Hodgkin, leucemia, pulmón e hígado. El país presenta una tasa de incidencia de cáncer estandarizada por edad de 154.6 para hombres y mujeres. Para este mismo año, se registraron 29273 personas diagnosticadas con la enfermedad, es decir, existen 157,2 casos de cáncer por cada 100000 habitantes.

El cáncer de hígado representa el 3.1% de todos los tipos de cáncer registrados en el país. No obstante, se encuentra entre los 10 tipos mayormente encontrados en la población. Su prevalencia en 5 años es de 5.07 casos por cada 100000 habitantes. Su incidencia es de 4.6 en mujeres y de 4.7 en hombres (OMS, 2021).

Mortalidad a Nivel Mundial y en el Ecuador

Datos Mundiales. La mortalidad es un factor que nos indica el estado de la salud pública y en este caso hace referencia a la mortalidad únicamente del cáncer, la cual no se ve afectada solo por problemas de salud sino que además pueden ser influenciada por errores en el diagnóstico o que este se haya realizado en una etapa avanzada de la enfermedad, fallas en el tratamiento, situación económicas, entre otros muchos (Campoverde & Campoverde, 2012).

Santucci et al. (2020) obtuvieron datos de muertes a causa de varios tipos de cáncer durante el período de 1991 y 2016, cuyas cifras fueron obtenidos de la base de datos de la OMS (WHO Statistical Information System). Los cambios de porcentajes anuales promedio hacen referencia al porcentaje de descenso de la mortalidad a causa del cáncer en los diferentes años como se observa en la Tabla 2 (Santucci et al., 2020).

Tabla 2*Comparación de mortalidad de todos los tipos de cáncer entre 1990 y 2016*

Países	Sexo	1990	2016	Muertes del 2016	Cambios de porcentajes anuales promedio
Europa	Hombres	186.76	137.53	760,123	-1.2
	Mujeres	105.26	85.68	603,984	-0.9
Francia	Hombres	202.87	133.02	95,440	-1.6
	Mujeres	89.59	76.26	72,811	-0.7
Alemania	Hombres	180.45	125.37	128,942	-1.5
	Mujeres	110.34	85.33	109,619	-1.1
Italia	Hombres	193.52	123.69	100,166	-1.7
	Mujeres	99.62	78.14	79,533	-0.9
Reino Unido	Hombres	181.71	122.24	90,490	-1.6
	Mujeres	127.38	93.52	79,976	-1.2
Estados Unidos	Hombres	163.87	107.22	323,488	-1.6
	Mujeres	111.70	82.41	291,133	-1.2

Países	Sexo	1990	2016	Muertes del 2016	Cambios de porcentajes anuales promedio
Japón	Hombres	154.69	112.98	226,026	-1.2
	Mujeres	78.79	63.12	158,785	-0.8

Nota. Modificado de *Progress in cancer mortality, incidence, and survival: A global overview*, por C. Santucci et al., 2020, European Journal of Cancer Prevention.

Con los datos obtenidos entre 1990 y 2016 y suponiendo que las tasas de mortalidad de 1990 se mantuvieran, se considera que se evitaron 3371200 fallecimientos a causa de cáncer en la Unión Europea, en Estados Unidos 2170000 y 600000 en Japón, esto con excepción del cáncer de páncreas y el de pulmón en mujeres. Se conoce que, dentro de los tipos de cáncer, el de pulmón es el más recurrente. Finalmente, como ya se mencionó, todos los tipos de cáncer descendieron con excepción del cáncer de páncreas, este por otro lado está en aumento y esto se debe a causas como la obesidad, sobrepeso, diabetes tipo II y a que este tipo de cáncer durante su etapa inicial no presenta síntomas y que requiere diagnóstico invasivo (Santucci et al., 2020).

Para los años entre el 2017 y 2018 se observa un cambio relativo en la tasa de mortalidad del cáncer en Estados Unidos (Siegel et al., 2021), con un descenso del 2,4% (Tabla 3).

Tabla 3

Comparación de mortalidad por cáncer en Estados Unidos, años 2017 y 2018

2017		2018		Cambio relativo de la tasa mortalidad
Número	Porcentaje	Número	Porcentaje	
599,108	21%	599,274	21 %	-2.4%

Nota. Modificado de *Cancer Statistics*, por R. Siegel et al., 2021, *Cancer Journal for Clinicians*.

Ya que el cáncer de hígado está entre las cinco principales causas de muerte en Estados Unidos según los datos presentados hasta el 2018, una estimación de casos y muertes nuevas para el 2021 se presenta en la Tabla 4 (Siegel et al., 2021).

Tabla 4

Estimación de casos y muertes de cáncer de hígado del 2021 y tasa de mortalidad.

Casos estimados		Muertes estimadas		Tasa de mortalidad del 2009- 2018
Hombres	Mujeres	Hombres	Mujeres	
29890	12340	20300	9930	1.7

Nota. Modificado de *Cancer Statistics*, por R. Siegel et al., 2021, *Cancer Journal for Clinicians*.

En estos últimos años varios estudios han verificado una disminución en la mortalidad relacionada con cáncer en el nivel económico alto, si se compara con países de ingresos medios o bajos (Torre et al., 2016). Se han hechos análisis con relación a la mortalidad y el índice de educación e ingresos denominado como EdI, en el cual se observa que Níger, perteneciendo al país con un EdI más bajo presenta de 69-320 casos por 100000 habitantes, mientras que en Australia, con un EdI alto se presentan de 62 a 91 muertes por 100000 habitantes (Lortet-Tieulent et al., 2020).

La incidencia del cáncer de hígado es 1,5 veces más elevada en los países con EdI bajos con relación a los de EdI altos, y se ha observado que la tasa de mortalidad baja conforme el EdI aumenta (Lortet-Tieulent et al., 2020).

Es importante considerar que a causa de la pandemia del Covid-19 existió un retraso con relación al tratamiento y diagnóstico del cáncer, causando un posible aumento de mortalidad (Siegel et al., 2021).

Datos en el Ecuador. En el Ecuador el cáncer es una de las diez primeras causas de defunción. Durante los años 60 la tasa de mortalidad era de 32,5 en 100.000 habitantes, en 1982 la tasa fue de 46,5 por 100.000 habitantes obteniendo el segundo lugar entre las causas de fallecimientos de la época. En el 2008 la tasa de mortalidad por cáncer fue del 54,7 por 100.000 habitantes siendo la principal causa de muerte en el Ecuador. Hasta el 2009, el índice de muerte causada por el cáncer duplicó a la de diabetes. Para el 2012 los índices de mortalidad a causa del cáncer en hombres y mujeres ecuatorianos por cada 100.000 habitantes son de 54,3 y 55,6 respectivamente y se estimó que de cada 8 muertes una se debía al cáncer (Campoverde & Campoverde, 2012). Por otro lado, el cáncer de estómago se convirtió en la primera causa de muerte del año 2013 (Corral Cordero et al., 2018). Para los años del 2017 al 2018 existían entre un intervalo de 500 a 1300 muertes por 100.000 habitantes a causa de distintos tipos de cáncer (Parrales-Pincay et al., 2021).

Uno de los factores limitantes dentro del Ecuador en el tratamiento de cáncer es que los hospitales no tienen un esquema que les permita discernir correctamente a los pacientes que no necesitan hospitalización (Corral Cordero et al., 2018). En el 2017 se realizó un análisis de mortalidad de distintos tipos de cáncer en el Ecuador y se determinó que el cáncer con mayor incidencia es el cáncer de estómago, seguido de colorrectal y en tercer lugar al cáncer de hígado. De 100.000 habitantes 1229 defunciones en personas de 40 años de edad o más se dieron a causa del cáncer de hígado, 553 fallecidos fueron mujeres y 676 hombres (Parrales-Pincay et al., 2021).

Carcinoma Hepatocelular

Patogénesis

Para que se desarrolle el carcinoma hepatocelular debe transcurrir una secuencia de pasos donde el primer síntoma es una lesión hepática, seguida por regeneración, fibrosis y cirrosis, para luego avanzar hacia displasia y finalmente la aparición de malignidad. El carcinoma hepatocelular altera gravemente el funcionamiento hepático, así como la estructura del hígado, con displasia celular y formación de nódulos, lo que se diagnostica como hepatocarcinoma (Kirstein & Vogel, 2014).

Etiología

Según Kirstein & Vogel (2014), el hepatocarcinoma se desarrolla en personas diagnosticadas con cirrosis hepática avanzada, quienes poseen un riesgo alto de cáncer dentro de 5 años a partir del diagnóstico. Mundialmente, la causa mayoritariamente ligada al carcinoma hepatocelular es la hepatitis viral. Se atribuye el 54% de casos a hepatitis B y el 31% de casos a hepatitis C. Un menor porcentaje de causalidad se le atribuye a la exposición a toxinas u otras enfermedades hepáticas hereditarias. Por otro lado, el hígado

graso no alcohólico también constituye un factor de riesgo que ha hecho que aumente su prevalencia (Kirstein & Vogel, 2014).

Generalmente, la enfermedad se suele desarrollar a raíz de haber tenido una hepatitis crónica prolongada, la cual ocurre después de haberse diagnosticado cirrosis hepática debido a una infección por hepatitis B o C (Yang et al., 2019).

Por otro lado, la diabetes mellitus también constituye un factor de riesgo para desarrollar este tipo de enfermedad debido a que la resistencia a la insulina y posterior formación de especies reactivas del oxígeno (ROS) conllevan inflamación del hígado, lo cual se considera un estadio de riesgo para hepatocarcinogénesis (Yang et al., 2019).

Epidemiología

El carcinoma hepatocelular (CHC ó HCC) corresponde al 7% de cánceres en general. Su incidencia aumenta con la edad avanzada y es mucho mayor en personas sobre los 70 años, sin embargo, se ha visto un incremento del HCC en hombres de 55 a 64 años (Kulik & El-Serag, 2019). Se debe considerar también la ubicación geográfica. La infección por virus de la hepatitis B (VHB) y C (VHC) son las principales causas del CHC ya que su genoma puede causar mutaciones integrándose al ADN del huésped (Budny et al., 2017). Otro de los causantes del CHC es la enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD) (Kulik & El-Serag, 2019). El alcohol, toxinas de *Aspergillus*, deficiencia de α 1-antitripsina, hemocromatosis, tirosinemia, porfiria, enfermedad de von Gierke y la mutación n p.I148M del gen de la adiponutrina son otros factores que provocan CHC (Budny et al., 2017).

El VHC presenta una incidencia por año del 0,5 al 10%. Los factores de riesgo son edad avanzada, la etnia hispana, diabetes, obesidad, sexo masculino, tabaquismo, alcoholismo, VIH, VHB y el genotipo VHC. En el caso del VHB los más recurrentes son los CHC presentados en pacientes con cirrosis, quienes conforman del 70 al 90% de los casos.

Dentro de los factores de riesgo tenemos: sexo masculino, vejez, etnia asiática o africana, niveles altos de replicación de VHB, genotipo VHB, infección por VHC, infección VIH, exposición a aflatoxinas, alcoholismo y tabaquismo. Finalmente, en el caso de NAFLD, que es la causa principal del CHC, tiene una prevalencia del 30%, pudiendo desarrollar enfermedad hepática con necro inflamación y fibrosis (Kulik & El-Serag, 2019).

Diagnostico

Durante las últimas décadas se ha visto un descenso en la mortalidad causada por cáncer en los países con un índice alto de ingresos, siendo este un indicativo de una mejora en las pruebas de diagnóstico y tratamiento de la enfermedad (Santucci et al., 2020).

Para las pruebas de diagnóstico se conoce que son muy aplicadas las técnicas basadas en imagen, debido a que no necesitan ser acompañadas por una biopsia (Kulik & El-Serag, 2019). El diagnóstico es de dos tipos de acuerdo con su enfoque y es el que se da en forma no invasiva (radiológicos) o invasivos (biopsia) (Tabla 5) (Grandhi et al., 2016).

Tabla 5

Diferentes técnicas de imagen utilizadas para el diagnóstico de CHC

Técnica de diagnóstico	Descripción
Ultrasonografía por contraste (CEUS)	Técnica de diagnóstico no invasiva para tumores hepáticos, que ayuda a distinguir cirrosis de CHC mediante agentes de contraste ecográficos, estos están formados por microburbujas que fluyen en el capilar y producen vascularización.
Tomografía computarizada (TC)	Dentro de estas técnicas la de corte transversal es una de las primeras utilizadas y se puede usar si es que se sospecha de una lesión hepática maligna, en la actualidad su caracterización es más precisa y es un examen multifásico en los que incluye fase percontraste, arterial y el portal que duran 30 segundos por fase.

Técnica de diagnóstico	Descripción
Imagen por resonancia magnética (IRM)	Este método se fundamenta en el poder difusor de la molécula de agua, este cambia dependiendo de la densidad de la célula y la zona del tejido. Debido al incremento en la celularidad que se da en tumores, estas partículas líquidas se mueven a una distancia corta del campo magnético si las comparamos con las normales, sin embargo, la resolución de la técnica no permite identificar tumores de menos de 10 mm.
Biopsia hepática por aspiración con aguja fina	Este es un método más invasivo, por ello se recomienda únicamente si no es posible otro estudio. Actualmente este método ya cuenta con imágenes. Es usado en tumores de 1 a 2 cm.
Marcadores de pronóstico	La AFP, siendo una de las primeras proteínas oncofetales es la prueba sérica con más uso. Sin embargo, hay nuevos marcadores séricos. Tiene una sensibilidad del 50% .

Nota. Modificado de *Considerations regarding current diagnosis and prognosis of hepatocellular carcinoma*, por C. Cristea et al., 2015, *Journal of Medicine and Life*; *Epidemiology and Management of Hepatocellular Carcinoma*, por L. Kulik & H. El-Serag, 2019, *Gastroenterology*.

Tratamiento

Para poder establecer el mejor tratamiento para tratar el CHC es necesario hacer uso de la carga tumoral, la función hepática y el estado funcional. En la Tabla 6 se detalla los diferentes avances terapéuticos para tratar el CHC (Grandhi et al., 2016).

Tabla 6

Diferentes avances terapéuticos enfocados a tratar el CHC

Técnica de tratamiento	Descripción
Ablación por radiofrecuencia (RAF)	También llamada resección, es la opción principal de tratamiento. Tiene una mortalidad quirúrgica del 1 al 3 %, sin embargo, solo el 10% de pacientes se considera candidatos a resección.
Inmunoterapia de carcinoma hepatocelular	Se basa en activar al sistema inmunitario y de esa forma establecer una respuesta para combatir al cáncer. Se ha visto su exitoso funcionamiento en melanoma metastásico. En el caso de HCC el sistema inmunitario va a atacar a las moléculas expresadas por CHC como alfa-fetoproteína (AFP) o el glipicano-3 (GPC-3).
Terapia locorregional	Se utiliza cuando el paciente no es candidato a resección quirúrgica. Existe la terapia de ablación que es usada para controlar de forma local las células tumorales, además su impacto es reducido a nivel de tejido hepático. Para esta técnica se usan inyecciones percutáneas de etanol, ablación por radiofrecuencia y ablación por microondas. Otra alternativa es la quimioterapia citotóxica intraarterial .
Terapia sistémica	Sorafenib es la primera terapia sistémica basada en un inhibidor multitirosina quinasa de administración oral

Nota. Modificado de *Epidemiology and Management of Hepatocellular Carcinoma*, por L. Kulik & H. El-Serag, 2019, *Gastroenterology*; *Hepatocellular carcinoma: From diagnosis to*

treatment, por M. S. Grandhi et al., 2016, *Surgical Oncology; Immunotherapy for hepatocellular carcinoma: Current and future*, por M. P. Johnston & S. I. Khakoo, 2019, *World Journal of Gastroenterology*.

Línea Celular HepG2

Las líneas celulares han sido utilizadas en varios campos de la investigación dados sus bajos costos, fácil uso y a que limitan el uso de modelos animales. El cultivo celular tiene un uso importante dentro de la producción de vacunas, evaluación de citotoxicidad, identificación de vías metabólicas en fármacos, síntesis de proteínas terapéuticas y otros (Arzumanian et al., 2021).

Las líneas celulares que se derivan del carcinoma hepático son 40, dentro de las más usadas tenemos el Hep3B, SK-Hep-1, HepG2, C3A, HepaRG, HuH6 y otras son usadas para estudios de genotoxicidad por que poseen un crecimiento ilimitado, una alta reproducibilidad y disponibilidad. Además, estas líneas tienen características fenotípicas y funcionales de las células del hígado y facilitan el cultivo y la expresión de enzimas involucradas en xenobióticos (Štampar et al., 2020, Arzumanian et al., 2021). La línea celular HepG2 fue una de las primeras células en presentar características esenciales de los hepatocitos y se usa mucho en investigación por ejemplo en la evaluación del potencial de hepatotoxicidad química de diversos agentes (Huang et al., 2020). Esta línea también se usa en estudios de oncogénesis, citotoxicidad de sustancias del hígado, para evaluar niveles de heterogeneidad de la línea celular, estudios biomédicos in vitro y ha permitido el estudio de infecciones de VHB y VHD (Arzumanian et al., 2021).

La línea celular HepG2 se caracteriza por tener múltiples genes mutados (CTNNB1) y tiene de 50 a 60 cromosomas. Los componentes subcelulares incluyen núcleos grandes, de 3 a 7 nucléolos, bajo contenido mitocondrial y SER (retículo endoplasmático liso) con bajo desarrollo. El contenido de ADN genómico es 7,5 pg con un genoma inestable. Las

células HepG2 tienen translocaciones de brazos cortos en los cromosomas 1 y 21, trisomías en los cromosomas 2, 16 y 17 y una tetrasomía en el cromosoma 20. Tiene una mutación en el promotor TERT. Existen 14.000 genes expresados por las células HepG2. En el transcriptoma 50 genes se regulan bien al comparar con hepatocitos normales. HepG2 contiene 170 pg de proteína total y por último estas células expresan enzimas metabolizadoras de fármacos en fase II (Enzimas de la familia UGT) (Arzumanian et al., 2021).

En la Tabla 7 se detalla la aplicación en la biomedicina que tiene la línea celular HepG2.

Tabla 7

Uso de la línea celular HepG2 en investigaciones de biomedicina

Tipo de investigación	Ventajas	Desventajas
Pruebas de toxicidad	Incluye albúmina y alfa-fetoproteína	Baja expresión de actividad enzimática metabolizadora
Metabolismo farmacológico	No incluye genoma viral de hepatitis B	
Modelo HCC	Perfil de genoma y transcriptoma similares	Esta línea celular tiene varias mutaciones parecidas al HCC

Nota. Modificado de *The Curious Case of the HepG2 Cell Line: 40 Years of Expertise*, por V. A. Arzumanian et al., 2021, International Journal of Molecular Sciences.

Sorafenib

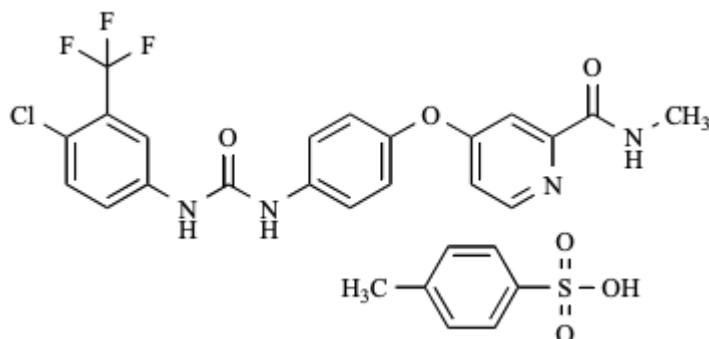
Sorafenib (BAY-43-9006), es distribuido por Bayer como Nexavar, este es un fármaco aprobado por la FDA de Estados Unidos para su uso en carcinoma hepatocelular (Abdelgalil et al., 2019). Sorafenib es un inhibidor multiquinasa oral, el cual se desarrolló inicialmente debido a que tiene efectos en la serina/treonina quinasa Raf y RTK que causan proliferación celular y angiogénesis (Strumberg et al., 2007).

Origen

Originalmente se pensó desarrollar un inhibidor de la quinasa RAF debido a su propiedad antiproliferativa (Ng & Chen, 2006). Durante los estudios iniciales de química médica se vio que una variación en el grupo fenilo 4 mejoraba la capacidad inhibidora tumoral. Posteriormente se elaboró una biblioteca con alrededor de 1000 análogos de bis-arilu urea del compuesto primordial. Se estudió a profundidad la relación entre la estructura y la actividad del elemento principal de 3-tienil urea para aumentar la fuerza inhibidora de RAF-1. Posteriormente se interrogó la biblioteca frente a RAF-1 para identificar otro análogo, 3 amino isoxazol, el cual quintuplicó la potencia inhibidora tumoral mediante un cambio en el anillo distal de la molécula por un 4-piridilo. Luego se descubrió que sorafenib se podía administrar oralmente en ratones y de esa forma inhibir el crecimiento de xenoinjertos HCT116 in vivo. Además, ya que estas células tienen una mutación KRAS, se evidenció actividad de inhibición de quinasas. Se realizaron análisis de la relación entre la estructura y la actividad que arrojaron que la urea era indispensable para generar actividad inhibidora en la quinasa RAF-1 y que la molécula podía tolerar cambios aromáticos en el residuo heterocíclico obteniéndose difenil ureas. Para culminar, al modificar el anillo de piridina distal y manteniendo el anillo difenilurea se sintetizó el tosilato de sorafenib (Figura 4), cuya fórmula empírica es $C_{21}H_{16}ClF_3N_4O_3 \times C_7H_8O_3S$ con número CAS 28844-1-73-01 para sorafenib y 475207-59-1 para tosilato de sorafenib (Ranieri et al., 2012).

Figura 4

Fórmula estructural del tosilato de sorafenib



Nota. Tosilato de sorafenib (etil benceno sulfonato de 4-(4-{3-[4-cloro-3(trifluorometil)fenil]ureido} fenoxi) -N 2 metil piridina-2-carboxamida). Tomado de *Sorafenib (BAY 43-9006) in Hepatocellular Carcinoma Patients*, por G. Ranieri et al., 2012, Discovery to Clinical Development. Current Medicinal Chemistry.

Farmacocinética

Dentro de la farmacocinética se evalúa la biodisponibilidad, y a pesar de que no se encuentre evaluado este parámetro a nivel general, se conoce que para sorafenib existe una biodisponibilidad relativa media de 38-49% en administración vía oral, así también establecieron que los alimentos grasos ocasionan un descenso del 29% en la biodisponibilidad de sorafenib. Se conoce también que tras 3 horas de aplicación oral se alcanzan las concentraciones máximas en plasma. Posee una distribución en volumen de 213 L y una unión *in vitro* del 99,5% a proteínas plasmáticas humanas. En relación con la eliminación del sorafenib se observó que es metabolizado en el hígado usando reacciones de oxidación. Además, tras administrarlo de forma oral se logró recuperar un 96% de la solución, 19% en orina y 77% en heces. Finalmente, se evidenció un tiempo de vida media de 25 a 49 h (Abdelgalil et al., 2019).

Xanthohumol

Xanthohumol es un compuesto químico obtenido de la planta de lúpulo *Humulus lupulus* L. (Cannabaceae). Se trata de una chalcona prenilada que ha demostrado tener potencial en el tratamiento contra el cáncer de ovario, de mamas, páncreas, próstata e hígado. Sus efectos se deben a la inhibición de vías de señalización, es decir, la interrupción del mecanismo de activación de vías de transcripción, supresión enzimática de las quinasas y de la expresión de genes involucrados en la proliferación celular (Yuan et al., 2020)

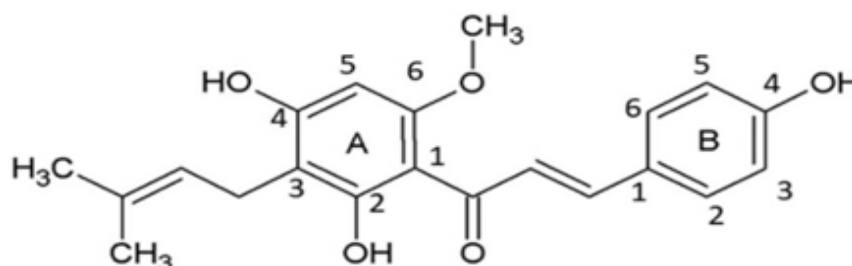
Origen

El lúpulo (*Humulus lupulus* L.) ha sido utilizado a través de la historia en la industria cervecera desde el siglo VIII. Esta planta contiene una variedad de compuestos fenólicos, los cuales han demostrado tener efectos terapéuticos: ácidos fenólicos, chalconas preniladas, catequinas, flavonoides y proantocianidinas, de los cuales xanthohumol es la chalcona prenilada más abundante (Harish et al., 2021). Según la nomenclatura IUPAC, este compuesto se denomina 3'-[3,3-dimetilalil]-2',4',4'-trihidroxi-6'-metil chalcona, constituye del 0.1 al 1% del peso total seco del lúpulo y en la Figura 5 se muestra su estructura química (Dresel et al., 2016).

Históricamente, esta planta ha sido además utilizada como medicina tradicional contra la ansiedad, el insomnio, la falta de apetito, el estrés, la disfunción cardiovascular y problemas del sueño. No obstante, estas propiedades no fueron anunciadas sino hasta el 2007 por el Comité de Medicamentos a Base de Hierbas de la Agencia Europea de Medicamentos.

Figura 5

Estructura química del Xanthohumol



Nota. Nombre Yupac: 3'-[3,3-dimetilalil]-2',4',4-trihidroxi-6'-metil chalcona. Tomado de *Anticancer effect of xanthohumol induces growth inhibition and apoptosis of human liver cancer through NF-κB/p53-apoptosis signaling pathway*, por X. Zhao et al., 2016, *Oncology reports*.

Xanthohumol tiene actividad quimioprotectora contra el cáncer, ya que utiliza varios mecanismos de inhibición según las diferentes etapas de carcinogénesis: iniciación, promoción y progresión (Gerhäuser, 2005). Además, se encuentra involucrado en la inhibición de la síntesis del ADN, la supresión del ciclo celular en la fase S y la detención de la actividad enzimática de células malignas en cultivos celulares de glándulas mamarias de ratón. En lo que respecta al cáncer de hígado, Weiskirchen et al. (2015), demostró que este compuesto posee un efecto quimioprotector, además de tener un efecto contra la obesidad y la esteatosis hepática. Al ser evaluado utilizando células de hepatocarcinoma se reveló que evitó la activación de procarcinógenos, a través de la inhibición de la vía citocromo P450, además se demostró la detención del ciclo celular en la fase G0/G1. Por otro lado, un estudio realizado por Zhao et al.(2016), también demostró que el xanthohumol tendría efectos anticancerígenos al inhibir la proliferación celular ya que detiene la vía de señalización de apoptosis NF-κB/p53 en células de cáncer de hígado humano.

Farmacocinética

Xanthohumol tiene un tiempo de vida media de 18h, considerando un cuerpo humano de 64kg de peso. Su dosis recomendada es de 180mg, la concentración máxima del medicamento es de 0.13mg/L y el tiempo estimado para alcanzar esa concentración es de 2h en humanos (Legette, 2014).

La vía de administración oral es lenta debido a la recirculación enterohepática y a que este compuesto puede unirse fácilmente a células intestinales. En el caso de administración intravenosa, su alcance es mayor, por lo cual tiene una eliminación retardada del organismo (Legette, 2014; Harish, 2021)

Capítulo III: Metodología

Localización Geográfica

Este trabajo de investigación se realizó en el laboratorio No. 13 de Oncofarmacología Molecular del Departamento de Farmacología del Centro de Investigaciones y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional CINVESTAV de la Ciudad de México.

Cultivo Celular

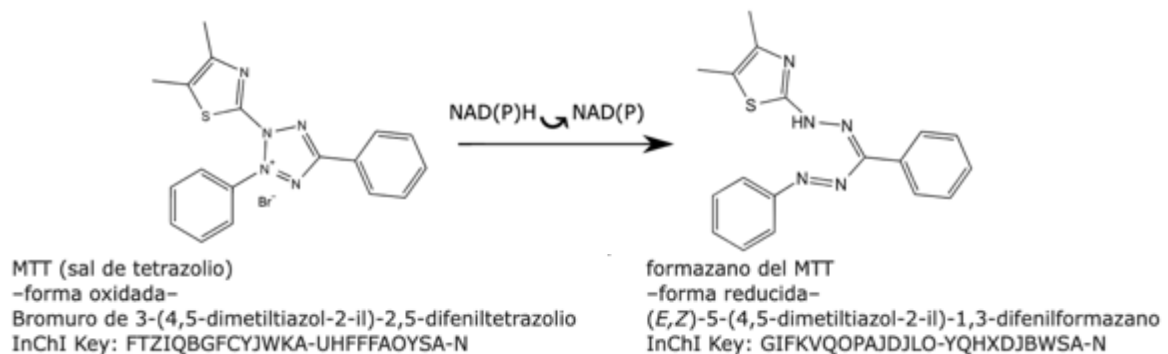
Se utilizó la línea celular derivada de carcinoma hepatocelular humano HepG2 (ATCC HB-8065) que fue obtenida de American Type Culture Collection (ATCC). Para el cultivo celular se usó el medio Dulbecco's Modified Eagle (DMEM) obtenido de Gibco Life Technologies, el cual se suplementó con 10% de suero fetal bovino (SFB), 1% de glutamina, 1% de piruvatos, 1% de antibiótico - antimicótico (penicilina, estreptomicina y fungizona) y 1% de aminoácidos no esenciales. Las células fueron incubadas en una atmósfera controlada de 5% de CO₂ y a 37°C en matraces de cultivo celular siguiendo las recomendaciones de American Type Culture Collection - ATCC (2021).

Curvas de Crecimiento

Para las curvas de crecimiento se adaptó el protocolo recomendado por ATCC que emplea el método colorimétrico bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol conocido como MTT para estudiar la viabilidad de las células en el cultivo (ATCC, 2011). Como se observa en la Figura 6 el ensayo del MTT se basa en la reducción enzimática de la sal de tetrazolio de color amarillo a la sal de formazán de color púrpura cuando se expone a las células viables, esto se da por la acción de las enzimas deshidrogenasas, dicha reducción se puede solubilizar con disolventes orgánicos como es el dimetilsulfóxido (DMSO) y los resultados se cuantifican por espectrofotometría.

Figura 6

Reducción metabólica del MTT



Nota. La reducción del MTT se debe principalmente a succinato deshidrogenasa, las coenzimas reducidas resultantes que son el NADH y NADPH son aquellas que convertirán el MTT en su sal de formazán de color púrpura. Tomado de *Ensayo de MTT*, por A. Herráez, 2015, Biomodel.

La construcción de las curvas de crecimiento se realizó en dos fases, como se detalla a continuación:

Fase I

Para comenzar con la primera fase, las células HepG2 previamente se descongelaron e incubaron en una atmósfera controlada para que estén listas para iniciar los respectivos tratamientos.

- Se succionó todo el medio del matraz de cultivo.
- Se hizo dos lavados con PBS, para ello se colocó 3000 μ L aproximadamente.
- Se colocó 500 uL de tripsina para que se despeguen las células de la pared de la caja.
- Se incubó de 2 a 3 min a 37°C y 5% de CO₂.
- Se observó en el microscopio de luz que exista el levantamiento apropiado de las células.

- Se colocó 3000 μL de medio DMEM suplementado al matraz para reducir el efecto de la tripsina y se homogenizó.
- Se pasó 2000 μL de las células a un tubo Falcon.
- Se colocó 5000 μL del medio DMEM al matraz y se incubó por 24 h.
- Se colocó 10 μL de azul de tripan en un tubo Eppendorf.
- Se añadió 10 μL de las células preparadas.
- Se homogenizó y se colocó en la placa de recuento de células.
- Se contó las células en el equipo de conteo de células automático Invitrogen (CountessTM, C10281, Korea).
- Según el cálculo se colocó 360000 células por cada placa de 96 pocillos.
- Se colocó 100 μL en cada pocillo de la placa dejando el primer pocillo vacío, que será el blanco.
- Se incubó por 24 h a 37°C y a 5% de CO₂.

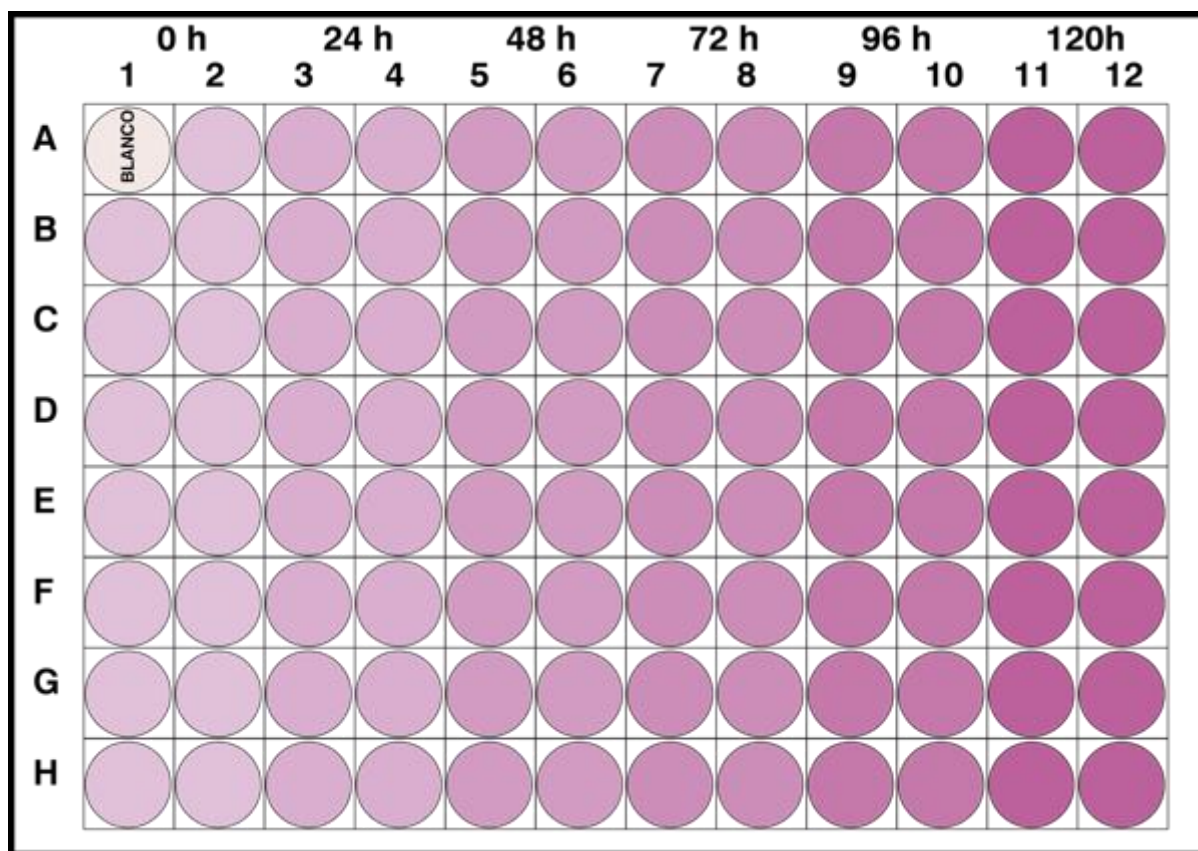
Fase II

Para la fase II se evaluó de 0 a 120h como se visualiza en la Figura 7, este proceso se realizó cada 24h y se graficó los datos obtenidos para realizar la curva absorbancia vs tiempo

- Se visualizó el crecimiento y proliferación celular en el microscopio de luz.
- Se colocó 10 μL de MTT en las dos primeras columnas (16 pocillos) de la placa de 96 pocillos.
- Se incubó por 4h a 37°C y a 5% de CO₂ para que se de la respectiva reducción de MTT y las sales de formazán precipiten.
- Se colocó 100 μL de dimetilsulfóxido (DMSO) en las columnas que se colocó MTT y de inmediato se midió la absorbancia en un lector de microplacas ELISA (Thermo ScientificTM, Multiskan FC, 51119100, Singapore) a 595 nm y a 690 nm.

Figura 7

Construcción de la placa para las curvas de crecimiento de la línea celular HepG2



Nota. Para construir las curvas de crecimiento de la línea celular HepG2 se evaluó de 0h a 120 h manteniendo siempre una atmósfera controlada de 37°C y a 5% de CO₂ y se midió la placa en un lector de microplacas ELISA a 595 nm y a 690 nm.

Preparación de los Fármacos Sorafenib y Xanthohumol

Los fármacos sorafenib y xanthohumol fueron adquiridos de Sigma-Aldrich, lotes 0000073598 y SLCD2196 respectivamente.

Para sorafenib se preparó una solución stock de 40000 µM y para xanthohumol se preparó una solución stock de 60000 µM, usando DMSO como disolvente. A partir de las soluciones stock se preparó diluciones seriadas para los tratamientos de sorafenib a concentraciones de 0,1; 0,2; 0,5; 1; 2,5; 5; 10; 15; 20 y 30 µM, para xanthohumol se empleó

las concentraciones de 1; 5; 10; 15; 20; 25; 30; 40; 50 y 100 μM . Se usó DMSO como vehículo a una concentración final menor a 0.1%.

Ensayos de Proliferación Celular

Para los ensayos de proliferación celular tanto para sorafenib como para xanthohumol se empleó el método colorimétrico de MTT descrito anteriormente. Para sorafenib se utilizó las concentraciones de 0,1 a 30 μM como se muestra en la Figura 8-A. Para xanthohumol se usó las concentraciones de 1 a 100 μM como se muestra en la Figura 8-B. Para los dos tratamientos se aplicó el mismo procedimiento de la Fase I del cultivo celular mientras que para la Fase II se utilizó el siguiente protocolo:

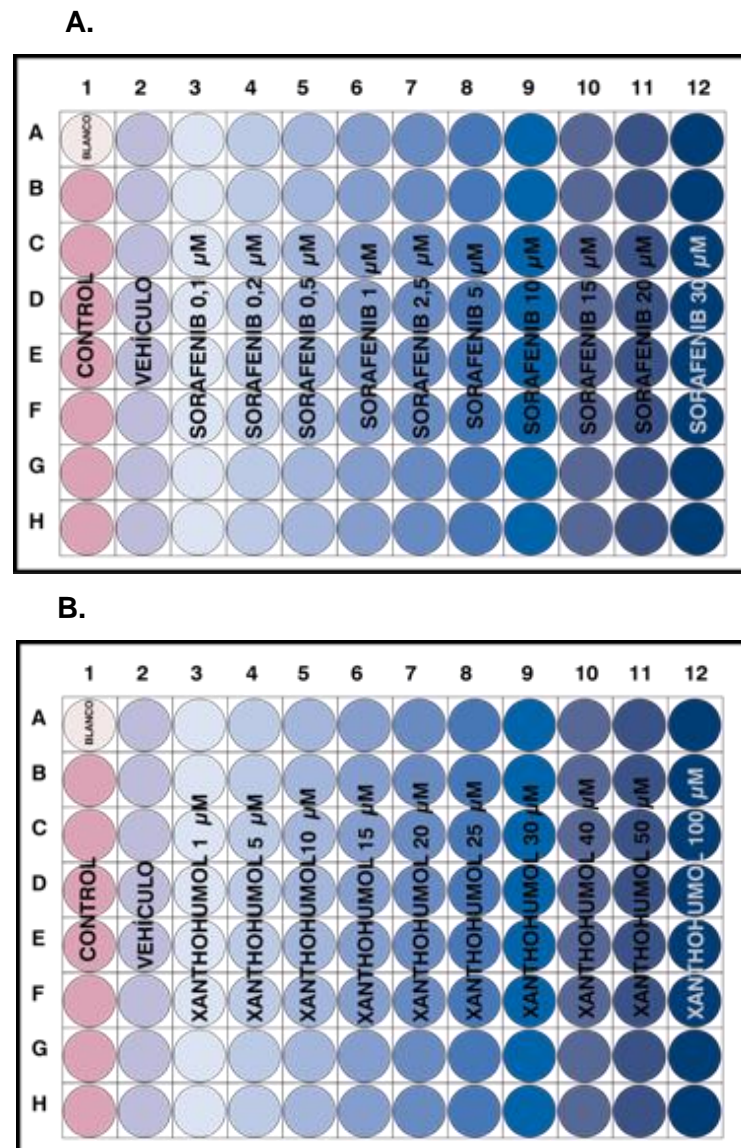
- Se visualizó el crecimiento y proliferación celular en el microscopio de luz al igual que se verificó la esterilidad de la placa.
- Se reemplazó el medio de cada pocillo por 100 μL del tratamiento correspondiente según las concentraciones establecidas para cada fármaco.
- Se incubó por 48h a 37°C y a 5% de CO_2
- Se refrescó el medio con 100 μL de los tratamientos respectivos y se volvió a incubar por 24h
- Aproximadamente 4h antes de concluir con el tiempo del ensayo se adicionó 10 μL de MTT a cada pocillo, sin incluir el blanco.
- Se incubó por 4h en atmósfera controlada para que las sales de formazán precipiten.
- Se colocó 100 μL de DMSO y de inmediato se midió la absorbancia en un lector de microplacas ELISA a 595 nm y a 690 nm.

Para el análisis de los resultados obtenidos de la actividad metabólica se normalizó todos los datos de absorbancia con respecto al vehículo que en este caso fue el DMSO. Una vez normalizados los resultados se construyó las gráficas de la actividad metabólica vs

la concentración de cada fármaco que se empleó, este experimento fue realizado por cuadruplicado.

Figura 8

Construcción de las placas de proliferación para los dos fármacos individualmente



Nota. Para evaluar la proliferación celular de los dos fármacos se estableció cada uno a diferentes tratamientos con diferentes concentraciones para cada uno, para el Sorafenib (A) se utilizó concentraciones de 0,1, 0,2, 0,5, 1, 2,5, 5, 10, 15, 20 y 30 μM y para el Xanthohumol (B) se usó concentraciones de 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50 y 100 μM .

Determinación de Concentraciones Inhibitorias IC₂₀, IC₅₀ e IC₈₀

Se determinó, en base al ensayo de proliferación celular las concentraciones inhibitorias IC₂₀, IC₅₀ e IC₈₀ de los dos fármacos, con la ayuda del software para análisis y gráficos de datos científicos OriginPro 9.4, OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA. Se graficó las curvas concentración vs respuesta para xanthohumol y sorafenib. Las curvas de concentración vs respuesta representan fracción de células afectada (Fa) en función del logaritmo de la concentración. Para construir las curvas la fracción de células afectadas se calculó a través de la siguiente ecuación:

$$Fa = 1 - \text{fracción de células viables}$$

Combinación de los Fármacos Xanthohumol y Sorafenib

Para el fármaco xanthohumol se tomó tres concentraciones de 1 µM, IC₂₀ e IC₅₀, en cambio para el fármaco sorafenib se ocupó únicamente las concentraciones inhibitorias 20 y 50. Se realizó 6 combinaciones como se muestra la Tabla 8 y con estos tratamientos se construyó los ensayos de proliferación como se detalla en la Figura 9, aplicando la misma metodología descrita con anterioridad.

Tabla 8

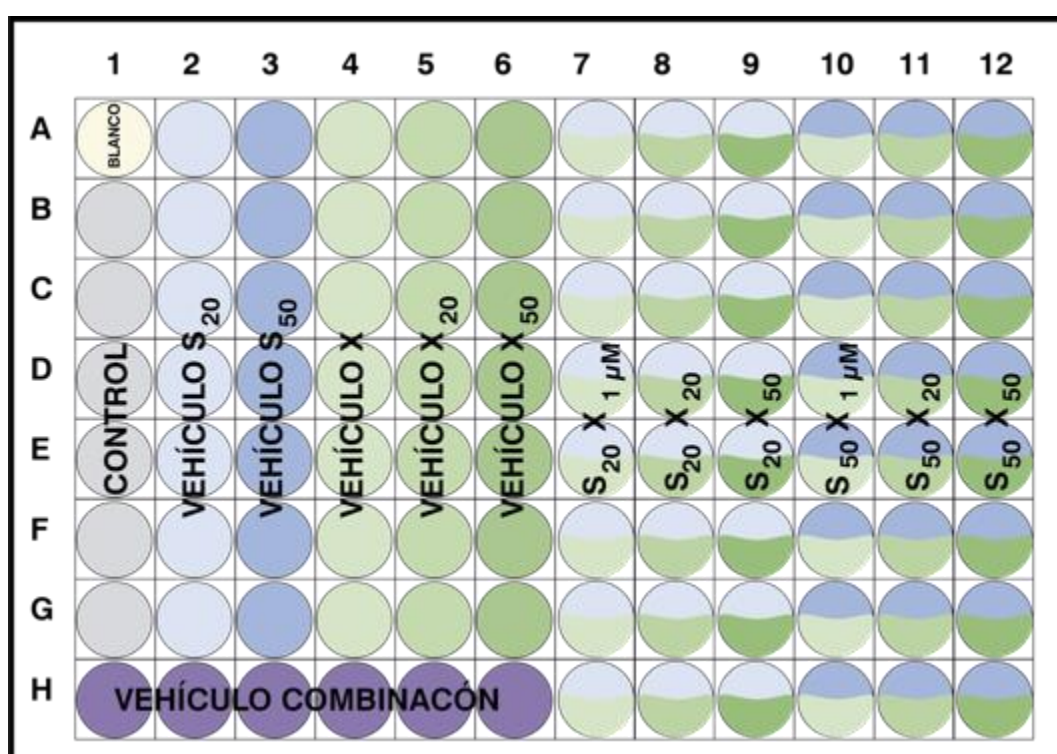
Tratamientos combinados sorafenib y xanthohumol

Tratamiento combinado	Sorafenib	Xanthohumol
S ₂₀ X _{1 µM}	IC ₂₀	1 µM
S ₂₀ X ₂₀	IC ₂₀	IC ₂₀
S ₂₀ X ₅₀	IC ₂₀	IC ₅₀
S ₅₀ X _{1 µM}	IC ₅₀	1 µM

Tratamiento combinado	Sorafenib	Xanthohumol
S ₅₀ X ₂₀	IC ₅₀	IC ₂₀
S ₅₀ X ₅₀	IC ₅₀	IC ₅₀

Figura 9

Construcción de la placa de proliferación de la combinación de los dos fármacos



Nota. Para la combinación de los fármacos se estableció un vehículo de la combinación y un vehículo para cada concentración de cada fármaco, se combinó tres concentraciones de xanthohumol: 1 µM, IC₂₀, IC₅₀ con dos concentraciones de sorafenib: IC₂₀, IC₅₀

Análisis Estadístico

Diseño Experimental

Para el presente proyecto cada ensayo se analizó por medio de ANOVA de una vía, seguido de una prueba de Tukey, la cual realizó comparaciones entre los resultados promedios de todos los grupos obtenidos. Las diferencias significativas se definieron con una probabilidad es menor a 0.05 ($p < 0.05$). Se utilizó el programa estadístico OriginPro 9.4. Los resultados se reportaron como promedio \pm desviación estándar (SD).

Repeticiones

Se realizó ocho repeticiones técnicas realizadas por cuadruplicado

Unidad Experimental

Se tomó como unidad experimental a las células sometidas a cada uno de los tratamientos con los fármacos sorafenib y xanthohumol individualmente, en combinación y con el control.

Variables

Variable de respuesta. La variable de respuesta fue el promedio de la proliferación de células de la combinación de los dos fármacos en relación con el promedio de proliferación de las células de cada fármaco individualmente y del control.

Operatividad de las Variables. Las variables, factores a determinar y el resultado se indican en la Tabla 9.

Tabla 9

Operatividad de variables, factores a determinar y resultado.

Variables	Factores para determinar	Resultado
Combinación sorafenib y xanthohumol	Densidad celular medida por absorbancia	Promedio
Fármaco sorafenib	Densidad celular medida por absorbancia	Promedio
Fármaco xanthohumol	Densidad celular medida por absorbancia	Promedio
Control (sin los fármacos)	Densidad celular medida por absorbancia	Promedio

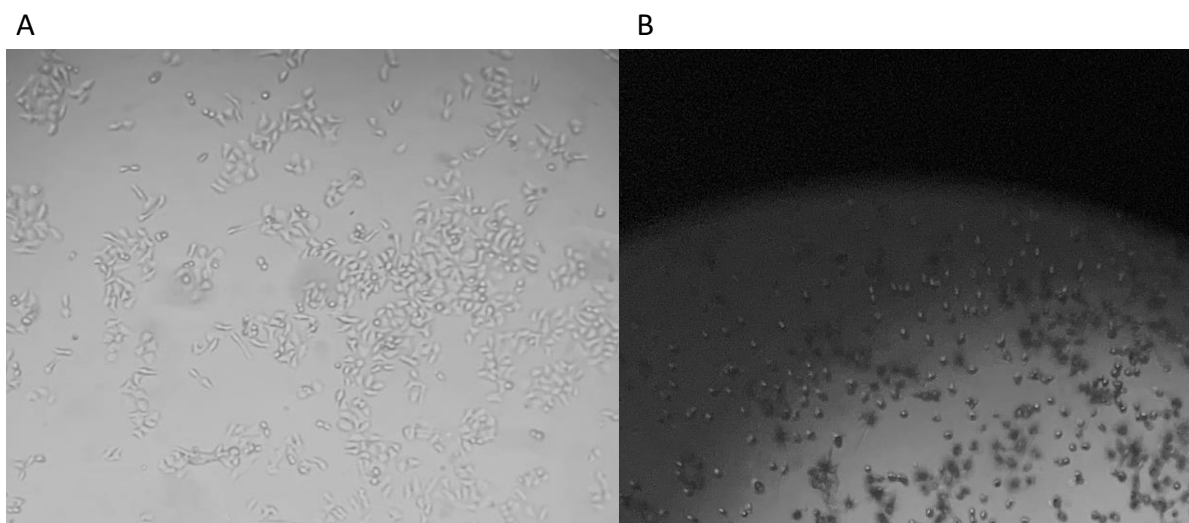
Capítulo IV: Resultados

Cultivo Celular

Para estudiar la viabilidad de la línea celular HepG2 se empleó el método colorimétrico MTT, donde la proporción de células vivas y funcionales existentes en una población celular es proporcional a la cantidad de formazán producido el cual se cuantificó en un lector de microplacas ELISA a 595 nm y a 690 nm. Como se observa en la Figura 10-A pasado las 4 h de aplicar el reactivo de MTT las células forman unas ramificaciones y estas al aplicar el disolvente orgánico DMSO se vuelven de color púrpura como indicativo que se precipitaron las sales de formazán (Figura 10-B).

Figura 10

Aplicación del reactivo MTT en la línea celular HepG2



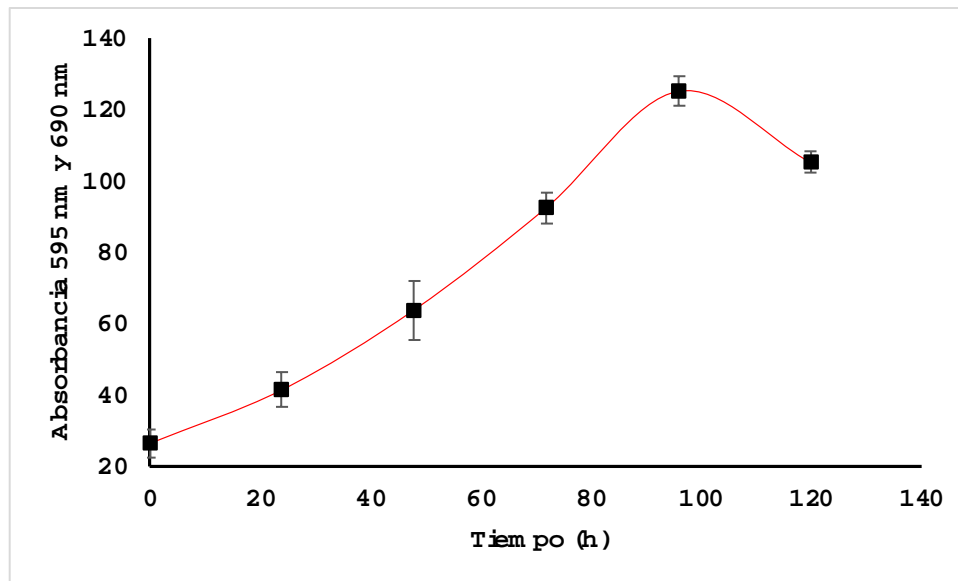
Nota. (A) La línea celular HepG2 en medio DMEM a 24 horas de haber sido sembrada, (B) la línea celular HepG2 con el reactivo de MTT lista para ser solubilizada y cuantificada.

Con la finalidad de estandarizar el tiempo adecuado para la aplicación de los diferentes tratamientos donde las células estén en su fase exponencial se construyó una curva de crecimiento normalizada de la línea celular HepG2 como se muestra en la Figura

11. El experimento se realizó en el lapso de 120 horas de las cuales se determinó un punto de inicio cuyas coordenadas aproximadamente fueron (20, 30) y un punto de finalización (98,120) donde la curva se mantuvo en la fase exponencial

Figura 11

Curva de crecimiento normalizada de la línea celular HepG2

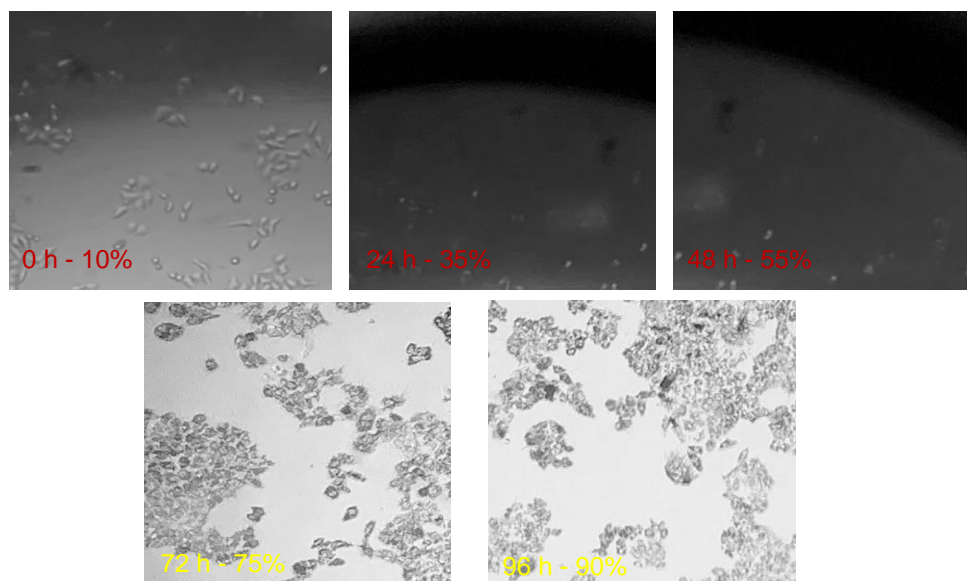


Nota. Crecimiento de la línea celular HepG2 en función del tiempo, la fase exponencial empieza a partir de las coordenadas (20, 30) y termina en las coordenadas (98,120).

De igual manera se tomó fotos de la confluencia celular a diferentes tiempos 0, 24, 48, 72 y 96 horas (Figura 12), se corroboró que los experimentos deben ser realizados a partir de las 24 horas hasta las 72 horas donde se obtuvo una confluencia de 35% al 75% respectivamente.

Figura 12

Confluencia de la línea celular HepG2 durante la construcción de las curvas de crecimiento

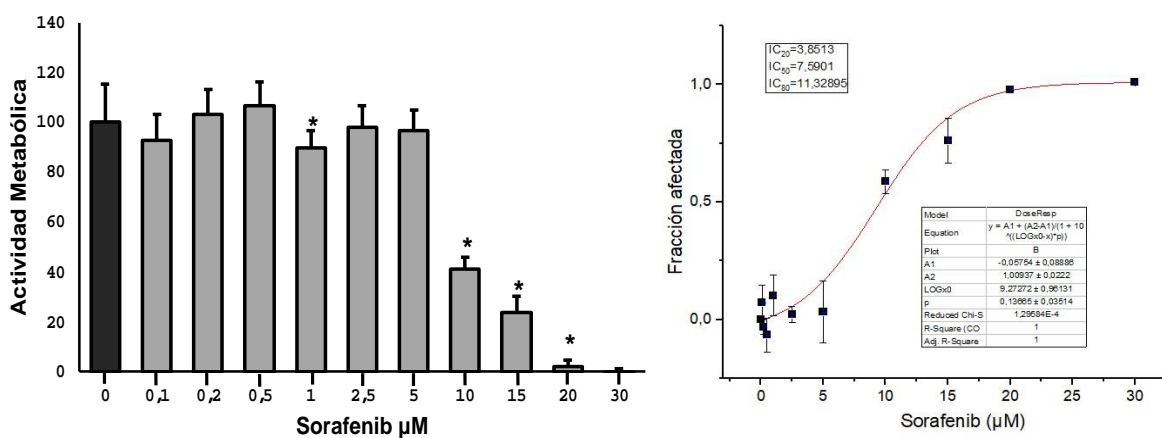
**Efecto de los fármacos sobre la proliferación celular**

Se determinó el efecto antiproliferativo de sorafenib y xanthohumol al ser aplicados en los cultivos de la línea celular HepG2, como se muestra en las Figuras 13 y 14. Tanto sorafenib como xanthohumol mostraron una reducción en la actividad metabólica, la misma que es dependiente de la concentración a tratar.

Para el caso de sorafenib, a concentraciones de 1, 10, 15, 20 y 30 μM se tuvo una reducción en el porcentaje de células viables significativa a $89.7 \pm 6.9\%$; $41.3 \pm 4.8\%$; $23.9 \pm 6.4\%$; $2.1 \pm 2.3\%$; $-0.9 \pm 1.9\%$ respectivamente (Figura 13-A). La gráfica de dosis-respuesta que se representa en la Figura 13B se utilizó para calcular las concentraciones inhibitorias 20, 50 y 80 de sorafenib teniendo las concentraciones de 3.8; 7.6 y 11.3 μM respectivamente.

Figura 13

Efecto antiproliferativo de sorafenib en la línea celular HepG2

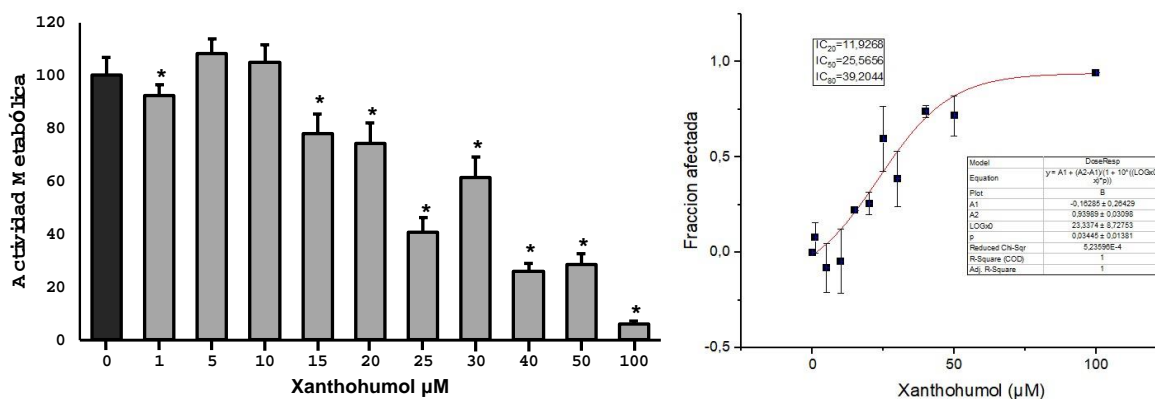


Nota. (A) Actividad metabólica de sorafenib a diferentes concentraciones desde 0,1 a 30 μM , (B) Gráfico dosis-respuesta construido con el modelo de curva sigmoidea, los resultados que se presentan son el promedio \pm S.D. de ocho repeticiones técnicas realizadas por cuadruplicado. La significancia estadística ($p < 0.05$), resulta de análisis ANOVA de una vía, seguida de una prueba de Tukey.

Por otro lado, xanthohumol tuvo efectos inhibitorios significativos a concentraciones de 1, 15, 20, 25, 30, 40, 50 y 100 μM ($99.2 \pm 4.0\%$; $77.9 \pm 7.2\%$; $74.3 \pm 7.6\%$; $40.5 \pm 5.5\%$; $61.4 \pm 7.5\%$; $26.0 \pm 2.9\%$; $28.3 \pm 4.1\%$; $5.9 \pm 1.3\%$ respectivamente) (Figura 14-A). Así mismo en la Figura 14-B se muestra la gráfica de dosis-respuesta de xanthohumol donde se obtuvo las concentraciones inhibitorias 20, 50 y 80 de 11.9; 25.6 y 39.2 μM respectivamente.

Figura 14

Efecto antiproliferativo de xanthohumol en la línea celular HepG2



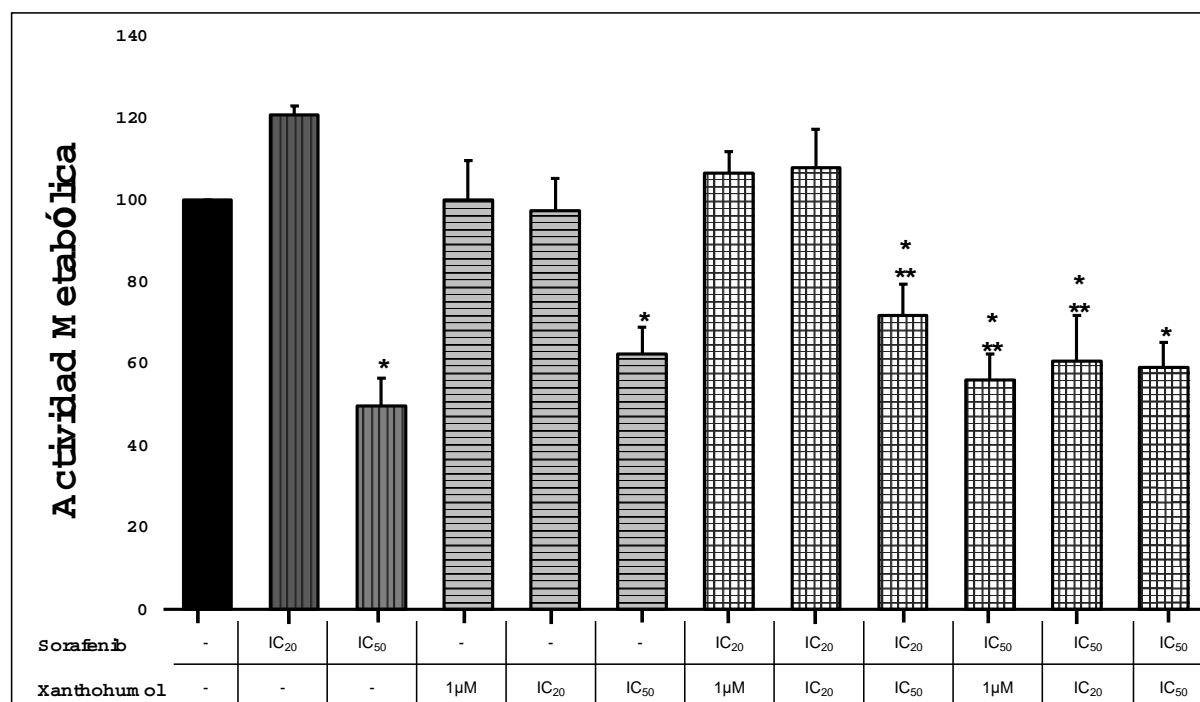
Nota. (A) Actividad metabólica de xanthohumol a diferentes concentraciones desde 1 a 100 µM, (B) Gráfico dosis respuesta construido con el modelo de curva sigmoidea, los resultados que se presentan son el promedio \pm S.D. de ocho repeticiones técnicas realizadas por cuadruplicado. La significancia estadística ($p < 0.05$), resulta de un análisis ANOVA de una vía, seguida de una prueba de Tukey.

Ensayos de Combinación del Sorafenib y Xanthohumol

Una vez obtenidas las concentraciones inhibitorias 20, 50 de cada fármaco se procedió a evaluar el efecto antiproliferativo de la combinación e individualmente de cada fármaco que se representa en el Figura 15, para lo cual se tomó tres concentraciones del xanthohumol a 1 µM, 10.3 µM (IC_{20}) y 25.8 µM (IC_{50}) por otra parte, para sorafenib se ocupó las concentraciones de 3.9 y 7.6 µM que equivale a IC_{20} e IC_{50} respectivamente. Como se observa, los efectos anti-proliferativos se potenciaron en los 4 últimos tratamientos combinados (S IC_{20} + X IC_{50} ; S IC_{50} + X 1 µM; S IC_{50} + X IC_{20} y S IC_{50} + X IC_{50}) los mismos que fueron estadísticamente significativos comparado con el control.

Figura 15

Efecto antiproliferativo de sorafenib y xanthohumol individualmente y en combinación



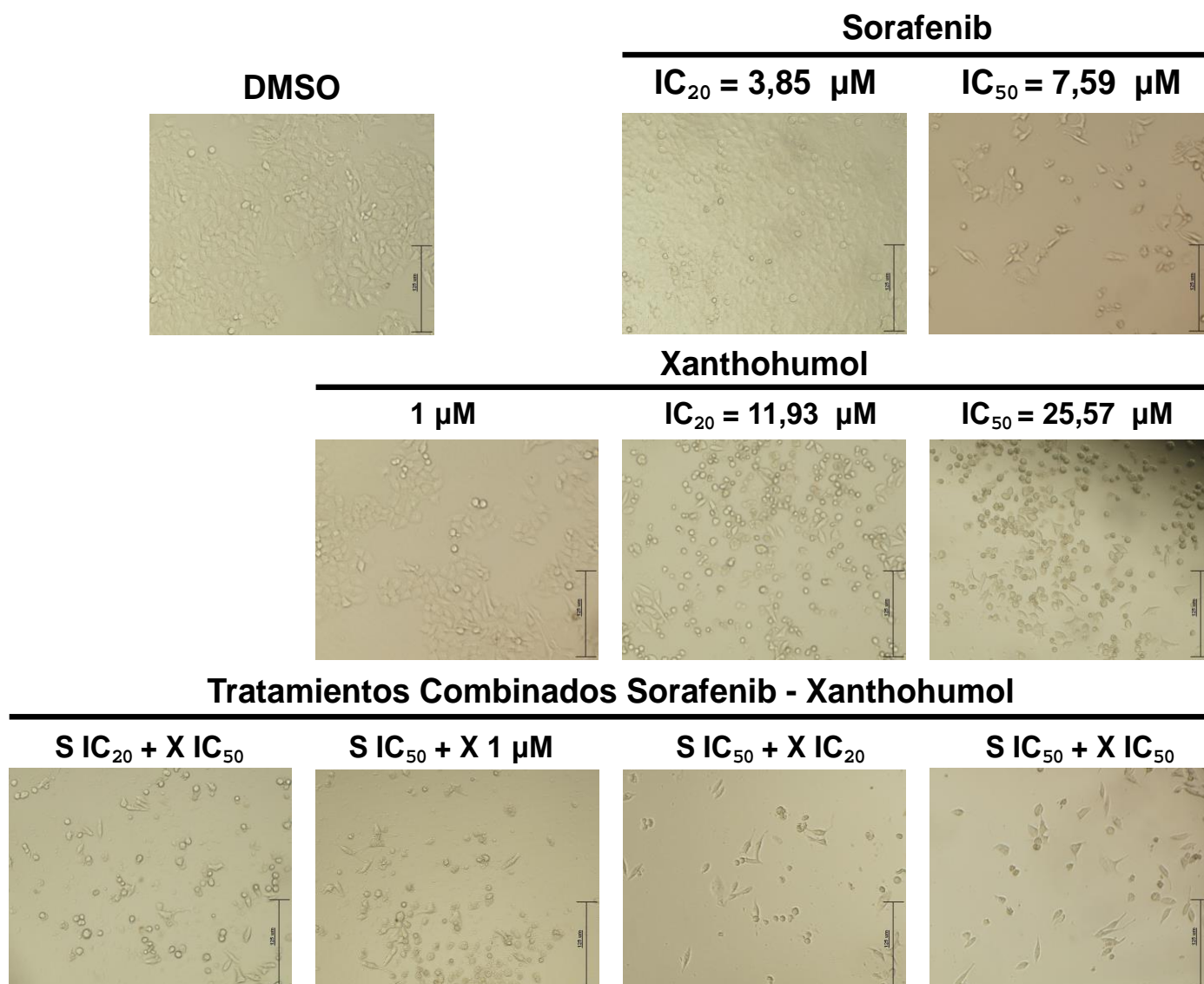
Nota. Las células HepG2 fueron incubadas a una atmósfera controlada de 37°C y a 5% de CO₂ durante 72 horas. La barra negra (control) es el cultivo celular expuesto a una concentración determinada de DMSO con la cual se comparó el efecto antiproliferativo de las combinaciones de los dos fármacos. Los asteriscos son indicativos que existe una diferencia significativa en los resultados, un solo asterisco equivale a que es estadísticamente significativo comparado con el control mientras que dos asteriscos equivalen a que es estadísticamente significativo comparado con uno de los fármacos. El efecto es significativo cuando $p < 0.05$

El efecto antiproliferativo que tienen los fármacos individualmente y en combinación también se evaluó en función de las características físicas de la línea celular HepG2. Como se observa en la Figura 16 existe diferencias en la morfología y en la confluencia de los diferentes tratamientos al ser comparados con el control (DMSO). Se evidencia una

confluencia del 5 al 10% en todos los tratamientos en combinación S IC₂₀ + X IC₅₀; S IC₅₀ + X 1 μM; S IC₅₀ + X IC₂₀ y S IC₅₀ + X IC₅₀ comparados con los fármacos por si solos y con el control. Así mismo se visualiza que existe un cambio de la morfología poligonal (control) comparado a la morfología redonda y granulada de los diferentes tratamientos, que hace referencia a la muerte celular.

Figura 16

Imágenes representativas del efecto antiproliferativo de sorafenib y xanthohumol individualmente y en combinación.



Capítulo V: Discusión

El cáncer de hígado en la actualidad sigue siendo la segunda causa más común de mortalidad por cáncer a nivel mundial. En Estados Unidos es la primordial causa del aumento de la mortalidad por cáncer en los últimos años (Sung et al., 2021). Uno de los factores más importantes a considerar es que la gran mayoría de los pacientes diagnosticados con cáncer de hígado se encuentran en fases intermedias avanzadas donde las opciones de un tratamiento potencialmente curativo son menores. Esto refleja la dificultad en el diagnóstico temprano de esta enfermedad. Las principales causas que generan esta enfermedad hepática son la cirrosis, sea esta por hepatitis viral, por el abuso de alcohol o hígado graso. De todos los casos con cáncer de hígado la neoplasia maligna primaria más frecuente (90%) es el carcinoma hepatocelular (Anwanwan et al., 2020). Dentro de los tratamientos que se emplean para el cáncer de hígado están la resección quirúrgica, el trasplante de hígado y la ablación local y, cuando la enfermedad se encuentra en fases avanzadas, se aplican medicamentos aprobados por la FDA como sorafenib, regorafenib y cabozantinib (Villanueva et al., 2019).

Sorafenib es un fármaco utilizado contra el cáncer especialmente para el tratamiento del carcinoma hepatocelular no resecable y en carcinoma avanzado de células renales, dado que inhibe el crecimiento tumoral y la angiogénesis al actuar tanto sobre la vía RAF/MEK/ERK como sobre los receptores de las tirosinas quinasas VEGFR2 y PDGFR (Liu et al., 2006). No obstante, este medicamento tiene varios efectos adversos que afectan a los sistemas gastrointestinal, piel, provoca la pérdida de peso, hipertensión e hipofosfatemia. Por ello, el medicamento se aplica en concentraciones bajas y en combinación con otros fármacos como por ejemplo capecitabina, doxorubicina y fluorouracilo (Abdelgalil et al., 2019). A pesar de que sorafenib es el primer agente aprobado

dirigido molecularmente, se ha evidenciado que muchos pacientes han desarrollado resistencia, esto debido a la heterogeneidad genética del carcinoma hepatocelular, la diafonía de las vías PI3K/Akt, JAK-STAT y la vía de la activación de hipoxia. Hay estudios donde los pacientes que empiezan con el tratamiento del sorafenib muestran tasas de supervivencia global de aproximadamente 10.7 meses, tiempo de progresión sintomática de 4.1 meses y así mismo se han detenido varias investigaciones porque los pacientes antes de finalizar los ensayos fallecen (Llovet et al., 2008). Todo esto indica que aún cuando existan beneficios terapéuticos significativos, no todos los pacientes responden adecuadamente y es por ello por lo que se requieren nuevas estrategias terapéuticas para optimizar la eficacia de sorafenib.

Para el caso de xanthohumol se ha demostrado en varios estudios que tiene efectos anticancerígenos previniendo la metástasis de células cancerosas en diferentes tipos de cáncer como es el de páncreas, colon, ovario, mama y próstata; sin embargo, el efecto en el cáncer de hígado aún no es conocido. Estudios en las líneas celulares HepG2 y Huh7 mostraron que xanthohumol a una concentración de 25 μ M induce apoptosis, reprime la proliferación y la migración, así como la actividad de NF-kappaB inducida por TNF y la expresión de interleucina-8 (Dorn et al., 2009). Otro estudio demostró que xanthohumol induce la inhibición del crecimiento y favorece apoptosis y la muerte celular dependiente de caspasas, a través de la vía de señalización de NF- κ B/p53, así como la regulación de Bax/Bcl-2-citocromo c -caspasa-3-PARP y AIF y supresión de la vía de señalización XIAP en células HepG2, lo que confirma el efecto anticancerígeno de xanthohumol en el cáncer de hígado humano (Zhao et al., 2016). Otros estudios han demostrado que xanthohumol reduce significativamente la viabilidad celular, la capacidad de formación de colonias y también la confluencia de cuatro líneas celulares del carcinoma hepatocelular (HepG2, Hep3B, SK-Hep-1, Huh-7). En este caso xanthohumol inhibió la vía de señalización de

Notch con disminución en la expresión de las proteínas Notch1 y HES-1 (Kunnimalaiyaan et al., 2015). Todos estos estudios justifican al xanthohumol como agente potencial para el tratamiento del carcinoma hepatocelular.

Wang et al. (2015) para evaluar la eficacia de sorafenib contra el carcinoma hepatocelular utilizaron concentraciones de 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 5 y 10 μM en un ensayo de MTT. Así mismo Garten et al. (2019) en su estudio para analizar los efectos de sorafenib en la inducción de apoptosis de células HepG2 utilizó concentraciones de 1, 5 y 10 μM . Para nuestra investigación se tomaron concentraciones de 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 15, 20 y 30 μM que muestran que están dentro de los parámetros antes investigados. Por otra parte Liu et al. (2006) en su investigación determinó que la concentración inhibitoria 50 del sorafenib fue de 4.5 μM , así mismo otros estudios que han evaluado al sorafenib en relación a la línea celular HepG2 muestran que su IC_{50} es de 5, 6 y 8 μM ; los datos que se obtuvieron para este estudio fueron de una IC_{50} de 7.6, IC_{20} de 3.9 μM e IC_{80} de 11.3 μM lo que nos indica que nuestros resultados obtenidos en el efecto antiproliferativo del sorafenib se correlacionan con otras investigaciones realizadas.

Zhao et al. (2016) evaluaron el efecto antiproliferativo de xanthohumol sobrecélulas de carcinoma hepatocelular en concentraciones de 0, 50, 100, 150 y 200 μM en un ensayo de MTT. De igual manera Dorn et al. (2009) en su estudio donde determinó que el xanthohumol inhibe la proliferación, migración y expresión de interleucina-8 de células de carcinoma hepatocelular, empleó concentraciones de 10, 25, 50 y 100 μM . En el presente estudio se tomaron concentraciones de 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40 y 50 μM lo que indica que las concentraciones aplicadas están acorde a investigaciones antes realizadas. Logan et al. (2019) encontraron en curvas de crecimiento de la línea celular HepG2 tratadas con

xanthohumol una concentración inhibitoria 50 (IC_{50}) de 25.4 μ M. En el presente estudio se obtuvo una IC_{50} de 25.6 μ M que evidencia una correlación de los resultados obtenidos con investigaciones realizadas anteriormente.

A pesar de haber tenido resultados favorables de cada fármaco en la línea celular HepG2, al momento de realizar la combinación y probar la hipótesis que xanthohumol potencia el efecto de sorafenib, únicamente se obtuvo diferencias significativas con la combinación comparada con el control, pero no con la combinación comparada con ambos fármacos por individual, lo que conlleva a que dichos fármacos no poseen un sinergismo entre ambos y por ende al combinarlos no se logra potenciar el efecto antiproliferativo. Sorafenib actúa en la vía de RAF/MEK/ERK así como sobre los receptores de las tirosinas quinasas VEGFR2 y PDGFR. Xanthohumol actúa a través de la vía de señalización de NF- κ B/p53 y la vía de señalización de Notch. Es posible que la combinación de los dos fármacos bloquee alguna de las vías mencionadas y por ende uno de los fármacos deje de ejercer su función, lo que causa que no se potencie ninguno de los dos (Kunnimalaiyaan et al., 2015; Liu et al., 2006; Zhao et al., 2016). Sin embargo, para poder validar estas hipótesis se necesitan más estudios que comprueben el sinergismo de los fármacos y su forma de actuar en combinación.

Capítulo VI: Conclusiones

Se estableció la cinética de crecimiento de la línea celular del carcinoma hepatocelular humano HepG2 a través del ensayo de MTT que determinó la viabilidad celular, empleando 3000 células por pocillo en experimentos de 72 horas, las cuales muestran una confluencia adecuada para los diferentes tratamientos, todo esto a una atmósfera controlada de 37°C y a 5% de CO₂.

Los fármacos sorafenib y xanthohumol al ser aplicados en la línea de carcinoma hepatocelular HepG2 presentan un efecto antiproliferativo dependiendo de la concentración que se administre. El efecto significativo para sorafenib fue en concentraciones de 1, 10, 15, 20 y 30 µM mientras que xanthohumol tuvo efectos inhibitorios significativos a concentraciones de 1, 15, 20, 25, 30, 40, 50 y 100 µM.

Se identificaron las concentraciones inhibitorias de IC₂₀, IC₅₀ e IC₈₀ para sorafenib de 3.8; 7.6 y 11.3 µM respectivamente mientras que para xanthohumol se tuvo IC₂₀ de 11.9 µM, IC₅₀ de 25.6 µM y e IC₈₀ de 39.2 µM, concentraciones que concuerdan con otras investigaciones.

Se analizó el efecto de la combinación xanthohumol – sorafenib sobre la proliferación en la línea celular del carcinoma hepatocelular humano HepG2 donde se obtuvo diferencias significativas con relación a la combinación comparada con el control, pero no a la combinación comparada con ambos fármacos individualmente, lo que indica que se necesitan más estudios que comprueben el sinergismo de los fármacos y su forma de actuar en combinación.

Capítulo VII: Recomendaciones

Se recomienda analizar la proliferación celular con diversos números de células con el fin de determinar la cantidad de células óptimas para cada tratamiento.

Para la combinación de sorafenib y xanthohumol se recomienda modificar las concentraciones de ambos fármacos, realizar más pruebas para verificar el sinergismo entre ambos como apoptosis, técnicas de RT-PCR, inmunocitoquímica incluso ensayos de arresto de ciclo celular y experimentos de electrofisiología celular.

De igual manera se recomienda utilizar otra línea celular a parte de la línea celular HepG2, como sería la línea HuH7.

Capítulo VIII: Bibliografía

- Abdelgalil, A. A., Alkahtani, H. M., & Al-Jenoobi, F. I. (2019). Sorafenib. *Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology*, 44, 239–266.
<https://doi.org/10.1016/BS.PODRM.2018.11.003>
- American Type Culture Collection. (2011). *MTT Cell Proliferation Assay*.
<https://www.atcc.org>
- American Type Culture Collection. (2021). *HepG2*. <https://www.atcc.org>
- Anwanwan, D., Singh, S. K., Singh, S., Saikam, V., & Singh, R. (2020). Challenges in liver cancer and possible treatment approaches. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*, 1873(1). <https://doi.org/10.1016/J.BBCAN.2019.188314>
- Arzumanian, V. A., Kiseleva, O. I., & Poverennaya, E. V. (2021). The Curious Case of the HepG2 Cell Line: 40 Years of Expertise. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(23), 13135. <https://doi.org/10.3390/ijms222313135>
- Budny, A., Kozłowski, P., Kamińska, M., Jankiewicz, M., Kolak, A., Budny, B., Budny, W., Niemunis-Sawicka, J., Szczypiór, G., Kurniawka, B., & Burdan, F. (2017). [Epidemiology and risk factors of hepatocellular carcinoma]. *Polski Merkurusz Lekarski: Organ Polskiego Towarzystwa Lekarskiego*, 43(255), 133-139.
- Campoverde, A., & Campoverde, M. (2012). El cáncer: Un problema de salud pública en el Ecuador y en el cantón Cuenca. *Revista de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad de Cuenca*.
- Corral Cordero, F., Cueva Ayala, P., Yépez Maldonado, J., & Tarupi Montenegro, W. (2018). Trends in cancer incidence and mortality over three decades in Quito—Ecuador. *Colombia Médica : CM*, 49(1), 35-41. <https://doi.org/10.25100/cm.v49i1.3785>
- Cristea, C., Gheonea, I., Săndulescu, L., Gheonea, D., Ciurea, T., & Purcarea, M. (2015).

- Considerations regarding current diagnosis and prognosis of hepatocellular carcinoma. *Journal of Medicine and Life*, 8(2), 120-128.
- Dorn, C., Weiss, T. S., Heilmann, J., & Hellerbrand, C. (2009). Xanthohumol, a prenylated chalcone derived from hops, inhibits proliferation, migration and interleukin-8 expression of hepatocellular carcinoma cells. *International Journal of Oncology*, 36(2), 435–441. https://doi.org/10.3892/IJO_00000517/HTML
- Dresel M, Vogt C, Dunkel A *et al.* (2016). La quimiodiversidad amarga del lúpulo (*Humulus lupulus* L.) . *J. Agri. Química alimentaria* 4(41), 7789–7799 .
- Garten, A., Grohmann, T., Kluckova, K., Lavery, G. G., Kiess, W., & Penke, M. (2019). Sorafenib-Induced Apoptosis in Hepatocellular Carcinoma Is Reversed by SIRT1. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(16). <https://doi.org/10.3390/IJMS20164048>
- Gerhäuser C. (2005). Beer constituents as potential cancer chemopreventive agents. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*, 41(13), 1941–1954. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2005.04.012>
- Girisa, S., Saikia, Q., Bordoloi, D., Banik, K., Monisha, J., Daimary, U. D., Verma, E., Ahn, K. S., & Kunnumakkara, A. B. (2021). Xanthohumol from Hop: Hope for cancer prevention and treatment. *IUBMB life*, 73(8), 1016–1044. <https://doi.org/10.1002/iub.2522>
- Grandhi, M. S., Kim, A. K., Ronnekleiv-Kelly, S. M., Kamel, I. R., Ghasebeh, M. A., & Pawlik, T. M. (2016). Hepatocellular carcinoma: From diagnosis to treatment. *Surgical Oncology*, 25(2), 74-85. <https://doi.org/10.1016/j.suronc.2016.03.002>
- Harish, V., Haque, E., Śmiech, M., Taniguchi, H., Jamieson, S., Tewari, D. y Bishayee, A. (2021). Xantohumol para tumores malignos humanos: química, farmacocinética y dianas moleculares. *Revista internacional de ciencias moleculares* , 22 (9), 4478.

<https://doi.org/10.3390/ijms22094478>

Huang, T., Huang, Y., Huang, Y., Yang, Y., Zhao, Y., & Martyniuk, C. J. (2020). Toxicity assessment of the herbicide acetochlor in the human liver carcinoma (HepG2) cell line. *Chemosphere*, *243*, 125345.

<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125345>

Johnston, M. P., & Khakoo, S. I. (2019). Immunotherapy for hepatocellular carcinoma: Current and future. *World Journal of Gastroenterology*, *25*(24), 2977-2989.

<https://doi.org/10.3748/wjg.v25.i24.2977>

Kenta, S., Yoichi, M., Hiroyuki, I., Tomotaka, O., Yuzo, M., Takafumi, S., Tomoya, S., Ken, T., Mamoru, M., Hiroki, T., Hideyuki, I. & Shuji, T. (2017). Xanthohumol inhibits angiogenesis by suppressing nuclear factor- κ B activation in pancreatic cancer. *Wiley Cancer Science*, *9*. doi:10.1111/cas.13441

Kirstein, M. M., & Vogel, A. (2014). The Pathogenesis of Hepatocellular Carcinoma.

Digestive Diseases, *32*(5), 545-553. <https://doi.org/10.1159/000360499>

Kulik, L., & El-Serag, H. B. (2019). Epidemiology and Management of Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology*, *156*(2), 477-491.e1.

<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2018.08.065>

Kunnimalaiyaan, S., Sokolowski, K. M., Balamurugan, M., Gamblin, T. C., &

Kunnimalaiyaan, M. (2015). Xanthohumol inhibits Notch signaling and induces apoptosis in hepatocellular carcinoma. *PloS One*, *10*(5).

<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0127464>

Legette, L., Karnpracha, C., Reed, R. L., Choi, J., Bobe, G., Christensen, J. M., Rodriguez-Proteau, R., Purnell, J. Q., & Stevens, J. F. (2014). Human pharmacokinetics of xanthohumol, an antihyperglycemic flavonoid from hops. *Molecular nutrition & food*

research, 58(2), 248–255. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201300333>

- Liu, C., Chen, K. & Chen, P. (2015). Treatment of Liver Cancer. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 5(9). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a021535>.
- Liu, L., Cao, Y., Chen, C., Zhang, X., McNabola, A., Wilkie, D., Wilhelm, S., Lynch, M., & 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. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-1377>
- 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., ... Bruix, J. (2008). Sorafenib in Advanced Hepatocellular Carcinoma. *New England Journal of Medicine*, 359(4), 378–390. <https://doi.org/10.1056/NEJMOA0708857>
- Logan, I. E., Miranda, C. L., Lowry, M. B., Maier, C. S., Stevens, J. F., & Gombart, A. F. (2019). Antiproliferative and Cytotoxic Activity of Xanthohumol and Its Non-Estrogenic Derivatives in Colon and Hepatocellular Carcinoma Cell Lines. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(5). <https://doi.org/10.3390/IJMS20051203>
- Lortet-Tieulent, J., Georges, D., Bray, F., & Vaccarella, S. (2020). Profiling global cancer incidence and mortality by socioeconomic development. *International Journal of Cancer*, 147(11), 3029-3036. <https://doi.org/10.1002/ijc.33114>
- National Cancer Institute. (2020). *NCI - National Cancer Institute*. <https://www.cancer.gov/research/areas/treatment>
- National Comprehensive Cancer Network. (2020). Liver Cancer, Hepatobiliary cancers. *NCCN Guidelines for Patients*.
- Ng, R., & Chen, E. X. (2006). Sorafenib (BAY 43-9006): Review of Clinical Development.

Current Clinical Pharmacology, 1(3), 223-228.

<https://doi.org/10.2174/157488406778249325>

Nowak, B., Poźniak, B., Popłoński, J., Bobak, Ł., Matuszewska, A., Kwiatkowska, J., Dziewiszek, W., Huszcza, E., & Szeląg, A. (2020). Pharmacokinetics of xanthohumol in rats of both sexes after oral and intravenous administration of pure xanthohumol and prenylflavonoid extract. *Advances in clinical and experimental medicine: official organ Wroclaw Medical University*, 29(9), 1101–1109.

<https://doi.org/10.17219/acem/126293>

OMS. (09 de diciembre de 2020). *Las 10 principales causas de defunción* [Organización Mundial de la Salud]. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>

OMS. (Marzo, 2021). GloboCan 2020 Ecuador. *Organización Mundial de la Salud, The Global Cancer Observatory*. <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/218-ecuador-fact-sheets.pdf>

OPS. (2021). Día Mundial contra el Cáncer 2021: Yo Soy y voy a. *Organización Panamericana de la Salud*. <https://www.paho.org/es/campanas/dia-mundial-contra-cancer-2021-yo-soy-voy>

Parrales-Pincay, I. G., Macias-Carrillo, J. L., & Tomalá-Aranea, D. Y. (2021). Diabetes mellitus, cáncer y riesgos cardiovasculares en adultos mayores. *Dominio de las Ciencias*, 7(3), 1500-1518.

Pérez, L. M., López, S. A., Fajes, J. L. H., & Martín, L. C. (2020). Carcinoma hepatocelular. *Medicine - Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*, 13(12), 653-665. <https://doi.org/10.1016/j.med.2020.06.019>

- Ranieri, G., Gadaleta-Caldarola, G., Goffredo, V., Patruno, R., Mangia, A., Rizzo, A., Sciorsci, R. L., & Gadaleta, C. D. (2012). Sorafenib (BAY 43-9006) in Hepatocellular Carcinoma Patients: From Discovery to Clinical Development. *Current Medicinal Chemistry*, *19*(7), 938-944.
- Santucci, C., Carioli, G., Bertuccio, P., Malvezzi, M., Pastorino, U., Boffetta, P., Negri, E., Bosetti, C., & La Vecchia, C. (2020). Progress in cancer mortality, incidence, and survival: A global overview. *European Journal of Cancer Prevention*, *29*(5), 367-381. <https://doi.org/10.1097/CEJ.0000000000000594>
- Siegel, R. L., Miller, K. D., Fuchs, H. E., & Jemal, A. (2021). Cancer Statistics, 2021. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, *71*(1), 7-33. <https://doi.org/10.3322/caac.21654>
- Štampar, M., Breznik, B., Filipič, M., & Žegura, B. (2020). Characterization of In Vitro 3D Cell Model Developed from Human Hepatocellular Carcinoma (HepG2) Cell Line. *Cells*, *9*(12), 2557. <https://doi.org/10.3390/cells9122557>
- Strumberg, D., Clark, J. W., Awada, A., Moore, M. J., Richly, H., Hendlisz, A., Hirte, H. W., Eder, J. P., Lenz, H.-J., & Schwartz, B. (2007). Safety, Pharmacokinetics, and Preliminary Antitumor Activity of Sorafenib: A Review of Four Phase I Trials in Patients with Advanced Refractory Solid Tumors. *The Oncologist*, *12*(4), 426-437. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.12-4-426>
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & 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. <https://doi.org/10.3322/CAAC.21660>
- Torre, L. A., Siegel, R. L., Ward, E. M., & Jemal, A. (2016). Global Cancer Incidence and Mortality Rates and Trends—An Update. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*, *25*(1), 16-27. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-15-0578>

- Villanueva, A., Schwartz, M. E., & Llovet, J. M. (2019). Liver cancer. *Oncology*, 89–100.
<https://doi.org/10.1002/9781119189596.CH8>
- Wang, Z., Zhao, Z., Wu, T., Song, L., & Zhang, Y. (2015). Sorafenib-irinotecan sequential therapy augmented the anti-tumor efficacy of monotherapy in hepatocellular carcinoma cells HepG2. *Neoplasma*, 62. https://doi.org/10.4149/neo_2015_022
- Weiskirchen, R., Mahli, A., Weiskirchen, S., & Hellerbrand, C. (2015). The hop constituent xanthohumol exhibits hepatoprotective effects and inhibits the activation of hepatic stellate cells at different levels. *Frontiers in physiology*, 6, 140.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2015.00140>
- Yang, J. D., Hainaut, P., Gores, G. J., Amadou, A., Plymoth, A., & Roberts, L. R. (2019). A global view of hepatocellular carcinoma: Trends, risk, prevention and management. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology*, 16(10), 589-604.
<https://doi.org/10.1038/s41575-019-0186-y>
- Yuan, J., Peng, G., Xiao, G., Yang, Z., Huang, J., Liu, Q., Yang, Z., & Liu, D. (2020). Xanthohumol suppresses glioblastoma via modulation of Hexokinase 2 -mediated glycolysis. *Journal of Cancer*, 11(14), 4047–4058. <https://doi.org/10.7150/jca.33045>
- Zhao, X., Jiang, K., Liang, B., & Huang, X. (2016). Anticancer effect of xanthohumol induces growth inhibition and apoptosis of human liver cancer through NF-B/p53-apoptosis signaling pathway. *Oncology Reports*, 35(2), 669–675.
<https://doi.org/10.3892/OR.2015.4455/HTML>