



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Química

Trabajo Monográfico de Actualización

**Estrategias terapéuticas basadas en la
ferroptosis para el tratamiento del
hepatocarcinoma**

**Que para obtener el título de
Químico Farmacéutico Biólogo**

Presenta

Mario Andrés Ventura Mondragón



Ciudad Universitaria, CDMX. 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: HERNANDEZ LUIS FRANCISCO

VOCAL: Profesor: PEREZ MUÑOZ CARLOS

SECRETARIO: Profesor: DEL VALLE PEREZ PAULINA

1er. SUPLENTE: Profesor: OVALLE MAGALLANES BERENICE

2do. SUPLENTE: Profesor: ORTEGA VAZQUEZ ALBERTO

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Laboratorio 121, Conjunto E, Facultad de Química. UNAM

ASESOR DEL TEMA: Dr. Francisco Hernández Luis

SUSTENTANTE: Mario Andrés Ventura Mondragón

Índice

| | | |
|------------|--|-----------|
| 1 | <i>Resumen</i> | 1 |
| 2 | <i>Introducción</i> | 1 |
| 3 | <i>Método</i> | 2 |
| 3.1 | Metodología de búsqueda | 2 |
| 3.2 | Criterios de selección | 3 |
| 3.2.1 | Criterios de inclusión..... | 3 |
| 3.2.2 | Criterios de exclusión..... | 3 |
| 4 | <i>Descubrimiento de la ferroptosis</i> | 3 |
| 5 | <i>Bases moleculares de la ferroptosis</i> | 4 |
| 6 | <i>Mecanismos que desencadenan la ferroptosis</i> | 5 |
| 6.1 | Por supresión del sistema Xc⁻ | 5 |
| 6.2 | Por supresión de GPX4 | 6 |
| 6.3 | Mediada por VDACs mitocondriales | 7 |
| 6.4 | Inducida por bloqueo de la síntesis de GSH | 8 |
| 7 | <i>Principales vías de regulación de la ferroptosis</i> | 9 |
| 7.1 | Vía del mevalonato | 9 |
| 7.2 | Vía de la transulfuración | 10 |
| 7.3 | Regulación transcripcional | 10 |
| 7.4 | Regulación de la degradación | 11 |
| 7.5 | Regulación del metabolismo de hierro | 11 |
| 7.6 | Regulación del metabolismo de lípidos | 12 |
| 8 | <i>Hepatocarcinoma</i> | 13 |
| 8.1 | Causas/factores de riesgo | 13 |
| 8.2 | Tratamiento | 14 |
| 8.3 | Morbilidad y mortalidad en México | 16 |
| 8.3.1 | Morbilidad | 16 |
| 8.3.2 | Mortalidad..... | 17 |
| 9 | <i>Estrategias terapéuticas basadas en la ferroptosis para el tratamiento del hepatocarcinoma</i> | 20 |
| 9.1 | Estrategia terapéutica actualmente implementada | 20 |
| 9.1.1 | El Sorafenib como fármaco capaz de desencadenar la ferroptosis | 20 |

| | | |
|------------|---|-----------|
| 9.1.1.1 | Muerte celular dependiente de hierro de células de hepatocarcinoma expuestas a Sorafenib | 21 |
| 9.1.1.2 | El Sorafenib actúa como inhibidor del sistema Xc^- | 22 |
| 9.1.1.3 | El Sorafenib induce disfunción mitocondrial promoviendo la ferroptosis en células de hepatocarcinoma | 23 |
| 9.1.1.4 | La inducción de la ferroptosis es una propiedad única del Sorafenib con respecto a otros inhibidores de cinasas | 25 |
| 9.2 | Problemática existente con la estrategia actual..... | 25 |
| 9.2.1 | Principales mecanismos de resistencia al Sorafenib en el hepatocarcinoma..... | 26 |
| 9.2.1.1 | Modificaciones epigenéticas involucradas en la resistencia al Sorafenib..... | 27 |
| 9.2.1.2 | Procesos de transporte involucrados en la resistencia al Sorafenib | 28 |
| 9.2.1.3 | Tipos de muerte celular regulada involucrados en la resistencia al Sorafenib..... | 29 |
| 9.2.1.4 | El ambiente tumoral y la resistencia al Sorafenib..... | 30 |
| 9.3 | Estrategias terapéuticas potenciales | 31 |
| 9.3.1 | Estrategias terapéuticas potenciales que mejoran la eficacia del Sorafenib y no involucran el uso de nanopartículas..... | 31 |
| 9.3.1.1 | Efecto sinérgico del Artesunato y el Sorafenib para inducir ferroptosis en el hepatocarcinoma | 31 |
| 9.3.1.2 | El Haloperidol (un antagonista del receptor sigma 1) promueve la ferroptosis inducida por Sorafenib en células de hepatocarcinoma..... | 33 |
| 9.3.1.3 | La disminución de la expresión de MT-1G mejora la actividad anticancerígena del Sorafenib en células de hepatocarcinoma..... | 35 |
| 9.3.1.4 | La sobreexpresión de Quiescina sulfidril oxidasa 1 (QSOX1) promueve la ferroptosis inducida por Sorafenib en células de hepatocarcinoma | 37 |
| 9.3.1.5 | La Trigonelina promueve la ferroptosis inducida por Sorafenib en células de hepatocarcinoma | 39 |
| 9.3.1.6 | Efecto sinérgico anticancerígeno del Sorafenib en combinación con la disminución de GSH en células de hepatocarcinoma..... | 40 |
| 9.3.1.7 | La disminución de la expresión de DAZAP1 promueve la ferroptosis inducida por Sorafenib en células de hepatocarcinoma..... | 41 |
| 9.3.1.8 | Glutatión S-transferasa Zeta 1 (GSTZ1) sensibiliza a las células de hepatocarcinoma a la ferroptosis inducida por Sorafenib | 43 |
| 9.3.1.9 | El tratamiento combinado de RSL3, hierro y Sorafenib incrementa la susceptibilidad a la ferroptosis de células de hepatocarcinoma | 44 |
| 9.3.1.10 | La disminución de la expresión de ABCC5 promueve la ferroptosis inducida por Sorafenib en células de hepatocarcinoma..... | 45 |
| 9.3.2 | Estrategias terapéuticas potenciales que no involucran al Sorafenib ni el uso de nanopartículas..... | 46 |
| 9.3.2.1 | La Solasonina promueve la ferroptosis en células de hepatocarcinoma e inhibe su migración | 46 |
| 9.3.2.2 | BSO en combinación con Auranofin o con Erastina induce muerte por ferroptosis a células de hepatocarcinoma..... | 48 |
| 9.3.2.3 | La sobreexpresión de la colectrina (CLTRN) aumenta la radiosensibilidad a través de la ferroptosis en células de hepatocarcinoma | 50 |
| 9.3.2.4 | La Formosanina C induce muerte celular por ferroptosis en células de hepatocarcinoma. . | 51 |

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 9.3.2.5 | La disminución de la expresión de ceruloplasmina (CP) promueve la ferroptosis inducida por Erastina y RSL3 en células de hepatocarcinoma | 52 |
| 9.3.2.6 | La inhibición de la proteína nuclear 1 (NUPR1) por ZZW-115 induce ferroptosis en células de hepatocarcinoma..... | 54 |
| 9.3.2.7 | <i>Scutellaria barbata</i> inhibe la tumorigenicidad del hepatocarcinoma al inducir la ferroptosis..... | 55 |
| 9.3.2.8 | El tratamiento conjunto de Disulfiram/cobre induce muerte celular por ferroptosis en células de hepatocarcinoma la cual se ve favorecida al inhibir NRF2..... | 57 |
| 9.3.3 | Estrategias terapéuticas potenciales que involucran el uso de nanopartículas | 59 |
| 9.3.3.1 | Nanopartículas de lipoproteínas de baja densidad de ácido docosaheptaenoico inducen ferroptosis en células de hepatocarcinoma | 59 |
| 9.3.3.2 | Nanopartículas duales de manganeso y sílice cargadas con Sorafenib que agotan GSH para inducir ferroptosis en células de hepatocarcinoma | 61 |
| 9.3.3.3 | Nanopartículas duales de manganeso y sílice cargadas con Dihidroartemisina que agotan GSH y producen OH ⁻ para inducir ferroptosis en células de hepatocarcinoma..... | 64 |
| 9.3.3.4 | Coadministración de iRGD con una estructura organometálica a base de hierro cargada con Sorafenib como agente causante de ferroptosis dirigido al tratamiento del hepatocarcinoma..... | 66 |
| 9.3.3.5 | Nanomicelas cargadas con triapina/Ce6 y decoradas con lactosa (TCLMs) proveen de una efectiva terapia quimio-fotodinámica (CT-PDT) para el hepatocarcinoma mediante un aumento en las ROS y un mecanismo inductor de la ferroptosis..... | 68 |
| 10 | <i>Discusión</i> | 71 |
| 11 | <i>Conclusiones</i> | 72 |
| 12 | <i>Bibliografía</i> | 73 |

1 Resumen

La finalidad del presente trabajo es mostrar que la ferroptosis, un nuevo tipo de muerte celular descubierta hace relativamente poco tiempo, tiene una gran aplicación en el desarrollo de nuevas estrategias para el tratamiento contra el cáncer, en específico del hepatocarcinoma, el cual es un gran problema de salud actualmente debido a la falta de tratamientos eficaces. Para ello, se llevó a cabo una investigación bibliográfica en la que se encontró una estrategia actualmente implementada que involucra a la ferroptosis en su mecanismo de acción (Sorafenib), pero la cual es poco eficaz. Asimismo, se encontró una cantidad considerable de estrategias potenciales para el tratamiento del hepatocarcinoma que también involucran a la ferroptosis; estas estrategias se clasificaron en tres categorías: las que se enfocan en mejorar la eficacia del Sorafenib, las que no involucran el uso de Sorafenib y las que se basan en el uso de nanopartículas. La oferta de estrategias potenciales es amplia, lo que es alentador para combatir la falta de tratamientos eficaces, sin embargo, lo más importante no es esto, sino que algunas de ellas puedan ser investigadas a fondo y, eventualmente, ser puestas a disposición de los pacientes para mejorar su esperanza de vida.

2 Introducción

La ferroptosis es un tipo de muerte celular que fue descubierta en años recientes la cual involucra la acumulación de grandes cantidades de hierro intracelular, así como una gran peroxidación lipídica. Este tipo de muerte celular se ha mostrado como una alternativa muy prometedora para la terapia contra el cáncer, especialmente en el hepatocarcinoma. El hepatocarcinoma es un tipo de cáncer con baja tasa de supervivencia debido a su frecuente recurrencia y a la falta de terapias eficaces. El hepatocarcinoma está a menudo asociado con cirrosis hepática que resulta de enfermedades crónicas en el hígado como hepatitis crónica, infecciones por virus de la hepatitis B y C, y hepatitis autoinmune. Otros factores de riesgo que son muy comunes en la actualidad son el consumo de alcohol de forma excesiva y la *diabetes mellitus* que es una enfermedad muy común en México. La Organización Mundial de la Salud estima que más de un millón de pacientes morirá de cáncer de hígado en 2030. En México durante 2019, el cáncer de hígado fue una de las principales causas de muerte por tumores malignos en personas de 0 a 14 años y de 60 y más años. El tratamiento para el hepatocarcinoma puede ser curativo o paliativo y varía de acuerdo a la etapa en la que se

encuentre el paciente según la clasificación *Barcelona Clinic Liver Cancer* en la cual se incluyen: ablación, resección, trasplante hepático, quimioembolización, terapias sistémicas (en las que se usan algunos fármacos) y medidas de soporte vital.

El Sorafenib es un fármaco aprobado por la FDA para el tratamiento del carcinoma renal avanzado, el hepatocarcinoma avanzado y el cáncer de tiroides diferenciado localmente avanzado o metastásico refractario al yodo radioactivo. En México, el Sorafenib es el tratamiento de elección para pacientes con hepatocarcinoma avanzado, además de que es el único en su tipo que hasta hace poco se sabe que involucra a la ferroptosis como mecanismo de acción en el tratamiento de este tipo de cáncer. Sin embargo, se ha observado que el Sorafenib extiende muy poco el tiempo de supervivencia, debido a que se desarrolla resistencia después de cierto tiempo en los pacientes tratados. A pesar de esto, la ferroptosis, al ser una muerte celular descubierta hace poco tiempo, podría ser el mecanismo de acción de nuevas estrategias terapéuticas más prometedoras que las actualmente utilizadas e incluso podrían existir alternativas que mejoren la eficacia del Sorafenib y combatan la resistencia al mismo. Por ello, el objetivo de este trabajo es mostrar que la ferroptosis tiene una gran aplicación en el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas para tratamiento del hepatocarcinoma. (Escudier et al., 2019; INEGI, 2021; J. Li et al., 2020; Nie et al., 2018; Tunissioli et al., 2017; Villanueva, 2019).

3 Método

3.1 Metodología de búsqueda

La búsqueda de artículos se acotó a los encontrados entre 2012 e inicios de 2022 y se llevó a cabo en Google Académico, en ScienceDirect y en el buscador de la Biblioteca Digital de la UNAM.

En Google Académico se utilizaron las siguientes palabras clave: ferroptosis, voltage-dependent-anion channel, System Xc⁻, glutathione peroxidase 4, Systemic therapies, Hepatocellular carcinoma, Clasificación BCLC, nanoparticles, Trigonelline, Sorafenib, resistance, regulation pathways y therapeutic strategies,

En ScienceDirect se utilizaron las siguientes palabras clave: ferroptosis, HCC y Hepatocellular Carcinoma.

En el buscador de la Biblioteca Digital de la UNAM se utilizaron las siguientes palabras clave: ferroptosis, glutathione peroxidase 4 y System Xc⁻.

3.2 Criterios de selección

3.2.1 Criterios de inclusión

- Estudios que aborden cualquier estrategia potencial a ser implementada para el tratamiento del hepatocarcinoma que involucre a la ferroptosis como mecanismo de acción.
- Estudios que demuestren de forma concisa que la ferroptosis está involucrada en la estrategia terapéutica planteada.
- Estudios hechos *in vivo* e *in vitro* con células de hepatocarcinoma para el caso de las estrategias terapéuticas potenciales que involucran a la ferroptosis.
- *Reviews* y artículos que pertenezcan a revistas indizadas.

3.2.2 Criterios de exclusión

- Estudios que aborden estrategias terapéuticas para el tratamiento del hepatocarcinoma cuyo mecanismo de acción no sea la ferroptosis.
- *Reviews* y artículos que no pertenezcan a revistas indizadas.
- Estudios en los que no se tengan resultados concluyentes que aseguren que la ferroptosis está involucrada en el mecanismo de acción de la estrategia terapéutica.
- Estudios hechos en otro tipo de células que no sean de hepatocarcinoma para el caso de las estrategias terapéuticas potenciales que involucran a la ferroptosis.

4 Descubrimiento de la ferroptosis

El rol del estrés oxidativo en la muerte celular ha sido estudiado por bastante tiempo. En la década de 1950, Harry Eagle y sus colegas examinaron aminoácidos, vitaminas y otros nutrientes requeridos para promover el crecimiento y la proliferación de un cultivo de células de mamífero; determinaron que un nutriente esencial era la cistina, la forma oxidada de la cisteína. En 1977, Shiro Banni y sus colegas encontraron que privar de cistina a un cultivo de fibroblastos de pulmón humano, resultaba en una reducción de los niveles de glutatión reducido (GSH) y, posteriormente en muerte celular. Esta muerte celular podía ser prevenida, no por restablecer los niveles de GSH, sino por la presencia del antioxidante lipofílico conocido como vitamina E. Estos resultados implicaban que la cistina era necesaria para

mantener los niveles de GSH, y que la muerte celular era ocasionada por la acumulación de peróxidos lipídicos. En años posteriores, se realizaron más estudios sobre la muerte celular inducida por deficiencia de cistina en otras líneas celulares, los cuales confirmaron la importancia de la disminución de GSH en la muerte celular, y demostraron que tanto los antioxidantes lipofílicos como los quelantes de hierro podían impedir que ocurriera la muerte de la célula. Además, se estableció que para prevenir la acumulación de peróxidos lipídicos era necesario contar con cistina, la cual sería utilizada por la célula para producir GSH (Cao & Dixon, 2016).

Los inductores de la ferroptosis fueron descubiertos antes de que la ferroptosis fuera nombrada. En 2003, se identificó un nuevo compuesto químico mediante un experimento de detección a gran escala, en este experimento se exploraba el efecto letal de diferentes compuestos químicos en células tumorales. El compuesto químico identificado fue la Erastina, la cual causó la muerte de células tumorales que tenían mutado a *RAS*, pero la muerte celular de estas células fue diferente de lo que hasta ese momento se había visto, incluso de la tradicional apoptosis; no existían cambios morfológicos en el núcleo ni fragmentación del DNA, tampoco se presentaba la activación de caspasas, por lo que los inhibidores de las mismas no podían evitar la muerte de las células. En 2008, se descubrieron dos nuevos compuestos, RSL3 y RSL5, los cuales tenían el mismo efecto que la Erastina, además se determinó que el patrón de muerte celular podía ser inhibido por un quelante de hierro y por un antioxidante, lo cual confirmó que esa forma de muerte celular estaba relacionada con el hierro intracelular y las especies reactivas de oxígeno. En 2012, finalmente se nombró a este tipo de muerte celular usando el término “ferroptosis” haciendo alusión a sus características (J. Li et al., 2020; H. Yu et al., 2017).

5 Bases moleculares de la ferroptosis

La ferroptosis es dependiente de hierro y es causada por la excesiva peroxidación de los lípidos de membrana (L. Wang et al., 2020). Durante la ferroptosis, diferentes tipos de especies reactivas de oxígeno (ROS) son producidas, como: el anión superóxido (O_2^-), que es producido mediante O_2 en el complejo I/III de la cadena de transporte de electrones en la mitocondria, pero rápidamente dismuta para generar peróxido de hidrógeno (H_2O_2); el radical hidroxilo (OH^\bullet), el cual se forma mediante la reacción de Fenton y es muy reactivo; el

peróxido de hidrógeno (H_2O_2), que es un compuesto moderadamente reactivo y es responsable de la oxidación de proteínas y, los peróxidos de lípidos, los cuales se forman a partir de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) (Capelletti et al., 2020).

La peroxidación de lípidos ocurre cuando radicales libres, como el radical hidroxilo, el cual es producido por la reacción que ocurre entre un ion ferroso (Fe^{2+}) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2), reacciona con los PUFAs que se encuentran en los fosfolípidos de membrana, generando radicales lipídicos ($L\cdot$). Los radicales lipídicos, a su vez, reaccionan con el oxígeno molecular para dar lugar a radicales peroxilo lipídicos ($LOO\cdot$), éstos reaccionan con PUFAs adyacentes para producir hidroperóxidos lipídicos ($LOOH$) y un nuevo radical lipídico. Mientras el nuevo radical lipídico puede iniciar una nueva reacción, el hidroperóxido lipídico ($LOOH$) puede convertirse en un radical alcoxi ($LO\cdot$) en presencia de Fe^{2+} y, posteriormente oxidar a un PUFA adyacente, lo que produciría un nuevo radical lipídico que puede iniciar otra reacción (**Figura 1**). Esta reacción en cadena que se amplifica por sí misma, provoca la acumulación de peróxidos lipídicos, generando la pérdida de fluidez e integridad de la membrana, daño en las proteínas celulares y, eventualmente, la muerte celular por ferroptosis (L. Wang et al., 2020).

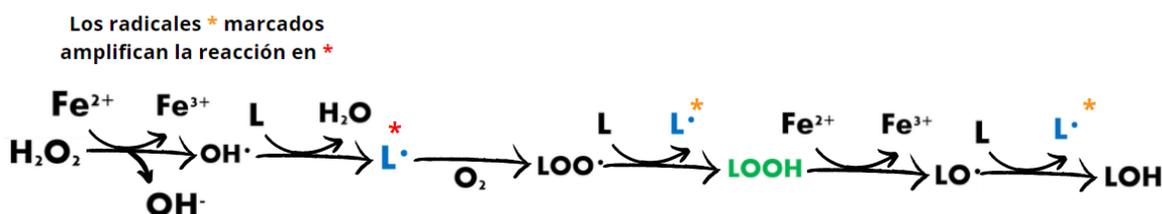


Figura 1. Reacción en cadena que se amplifica y causa la acumulación de peróxidos lipídicos.

6 Mecanismos que desencadenan la ferroptosis

6.1 Mediada por el sistema Xc^-

El sistema Xc^- es un antiportador el cual está ampliamente distribuido en la bicapa de fosfolípidos de la membrana y, pertenece a la familia de transportadores heterodiméricos de aminoácidos (HAT). Es parte de un importante sistema antioxidante en las células y es un heterodímero compuesto por dos subunidades, SLC7A11 (cadena ligera) y SLC3A2 (cadena pesada). Las dos subunidades están conectadas por un enlace disulfuro extracelular y poseen

diferentes funciones; la subunidad SLC3A2 es crítica para mantener la estabilidad estructural y la subunidad SLC7A11 representa la especificidad del sistema y provee una función de transporte, por lo que es considerada el componente central del sistema Xc^- . La cistina y el glutamato (Glu) son intercambiados dentro y fuera de la célula respectivamente por el sistema Xc^- (**Figura 2**). La cistina que es introducida es reducida a cisteína en la célula y es utilizada en la síntesis de GSH. Para asegurar que la cistina sea transportada dentro de la célula, los niveles de Glu intracelular se mantienen altos para que pueda ser fácilmente exportado. El GSH reduce a las ROS bajo la acción de las enzimas glutatión peroxidadas (GPXs). Al inhibir la actividad del sistema Xc^- (con algún inhibidor como la Erastina) se ve afectada la síntesis de GSH por la inhibición de la absorción de cistina, lo cual provoca la disminución de la actividad de GPX y, por ende, un decremento en la capacidad antioxidante de la célula, provocando una acumulación de especies reactivas de oxígeno lipídicas, para finalmente, provocar daño oxidativo y ferroptosis (Capelletti et al., 2020; J. Li et al., 2020; M. Liu et al., 2021).

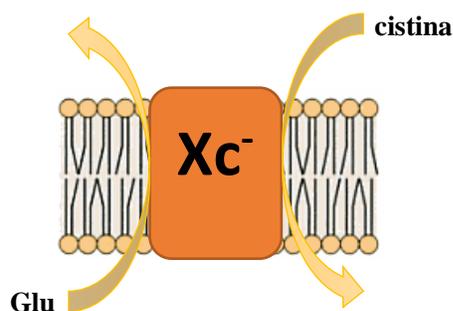


Figura 2. Intercambio de glutamato (Glu) del interior de la célula por cistina del exterior llevado a cabo por el sistema Xc^- . Tomado y adaptado de Capelletti et al, 2020.

6.2 Mediada por GPX4

La enzima glutatión peroxidasa 4 (GPX4) es una de las ocho peroxidadas conocidas en mamíferos. Con la excepción de GPX5, GPX7, GPX8 y GPX6 en roedores, las glutatión peroxidadas son selenoproteínas. Las selenoproteínas contienen el aminoácido selenocisteína (Sec), el cual difiere de la cisteína en un sólo átomo, selenio por azufre. Todos los miembros de la familia de las GPXs comparten la misma función básica de reducir peróxidos a expensas de GSH, sin embargo, GPX4 es la que juega un rol regulatorio en la ferroptosis, ya que inhibe la formación de peróxidos lipídicos. GPX4 convierte GSH a glutatión oxidado (GSSG)

reduciendo a los peróxidos lipídicos citotóxicos (L-OOH) en los correspondientes alcoholes (L-OH) (**Figura 3**). La inhibición de la actividad de GPX4 puede conducir a la acumulación de peróxidos lipídicos, lo que puede desencadenar la ferroptosis. Uno de los inductores de la ferroptosis que inhibe directamente la actividad de GPX4 es RSL3, éste reduce la capacidad antioxidante de la célula, provocando la acumulación de ROS, para finalmente conducir a la ferroptosis. (Conrad & Friedmann, 2015; J. Li et al., 2020).

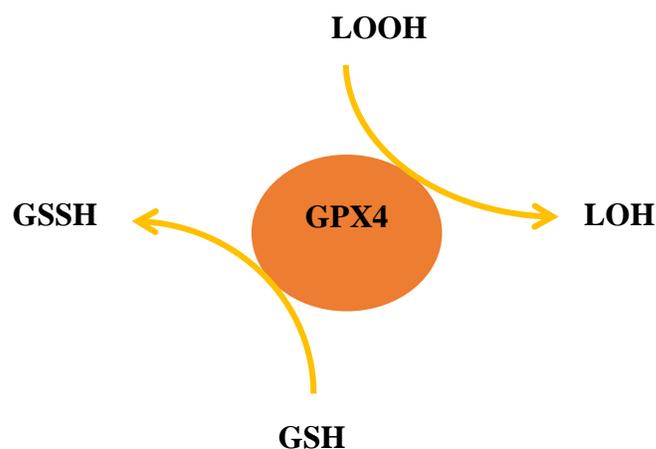


Figura 3. Mecanismo mediante el cual GPX4 reduce los peróxidos lipídicos. Tomado y adaptado de Capelletti et al, 2020.

6.3 Mediada por VDACs mitocondriales

Los canales iónicos dependientes de voltaje (VDAC) son bien conocidos como la vía de difusión pasiva de metabolitos aniónicos hidrofílicos mitocondriales a través de la membrana externa mitocondrial. Los VDAC son las proteínas más abundantes en la membrana externa mitocondrial. La familia de proteínas VDAC está conformada por tres isoformas: (VDAC1, VDAC2 y VDAC3). Las tres isoformas tienen una estructura y conductancia muy similares. La Erastina es un inductor canónico de la ferroptosis, la cual abre los VDAC en presencia de tubulina e hiperpolariza la mitocondria, conduciendo a la producción de ROS, provocando disfunción mitocondrial y, finalmente, la muerte celular (Lemasters, 2017).

En un estudio realizado por David N. DeHart y sus colaboradores, se propuso demostrar que la Erastina y otros compuestos, que también bloquean la despolarización mitocondrial dependiente de tubulina, incrementan el metabolismo mitocondrial y la formación de ROS

al abrir los canales VDAC, y con esto, conducir a la disfunción mitocondrial dependiente de ROS, una falla bioenergética y, finalmente, la muerte celular. Para el experimento, se utilizaron células HepG2 y células Huh7. Para medir los cambios en el potencial de membrana mitocondrial se utilizó la microscopía confocal de tetrametilrodamina metil éster (TMRM). Las células HepG2, una vez expuestas a TMRM, fueron tratadas con Erastina. Después de una hora, la fluorescencia de TMRM incrementó, lo que significa que se produjo una hiperpolarización mitocondrial. Al pasar alrededor de cuatro horas la fluorescencia de TMRM decreció, indicando una despolarización. En cambio, en las células no tratadas con Erastina, la fluorescencia de TMRM permaneció sin cambio alguno por cuatro horas. En experimentos paralelos, las células HepG2 fueron expuestas al indicador de ROS, cmH₂DFC, y al indicador de superóxido mitocondrial, MitoSOX Red. Después de una hora de exposición a la Erastina, la fluorescencia de ambos indicadores incrementó en comparación con las células tratadas con vehículo, indicando un incremento en las ROS y en la formación de superóxido mitocondrial. Otros compuestos evaluados conocidos como X1 y X4, que producen efectos similares a la Erastina, también produjeron hiperpolarización mitocondrial seguida de una despolarización tanto en células HepG2 como en Huh7. La despolarización de la membrana mitocondrial significa el inicio de la disfunción de la mitocondria y la pérdida de la integridad de la membrana. Es importante mencionar, que la cistina no estuvo presente en el medio celular, por lo que no podría haberse llevado a cabo un intercambio cistina/Glu, por ende, el efecto de la Erastina en el sistema Xc⁻ no pudo haber influido (DeHart et al., 2018).

6.4 Inducida por bloqueo de la síntesis de GSH

La inhibición de la enzima glutamato cisteína ligasa (GCL), la cual es la primera en participar en la síntesis de dos pasos del GSH, usando butionina sulfoximina (BSO) (**Figura 4**), produce muerte celular que puede ser evitada usando vitamina E y deferoxamina (DFO), los cuales son un antioxidante y un quelante de hierro respectivamente, pero no por el inhibidor de caspasas ZVAD-FMK o el inhibidor de necroptosis Nec-1. Esto sugiere que la inhibición de la síntesis de GSH es suficiente para producir ferroptosis, al menos en algunas células. Sin embargo, el BSO en algunas células es menos potente para inducir la ferroptosis en comparación con la inhibición del sistema Xc⁻ o GPX4 (Cao & Dixon, 2016).

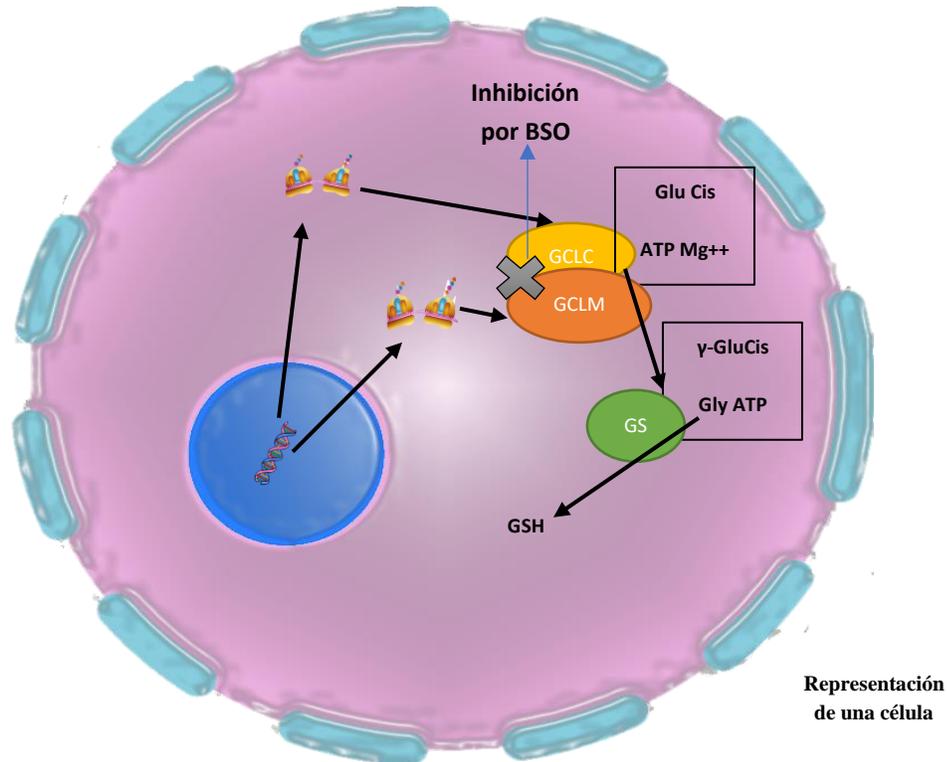


Figura 4. Síntesis de GSH e inhibición por BSO. El primer paso para la síntesis de GSH se lleva a cabo por la enzima glutamato cisteína ligasa (GCL), la cual está compuesta por dos subunidades: GCLC (catalítica) y GCLM (moduladora). Primero, GCL liga cisteína y glutamato para formar el dipéptido γ -L-glutamil-L-cisteína (paso limitante de la velocidad de síntesis). Después, la enzima glutatión sintetasa (GS) une glicina a γ -L-glutamil-L-cisteína. El BSO inhibe a GCL, lo que disminuye los niveles de GSH. Tomado y adaptado de Denzoin et al., 2013.

7 Principales vías de regulación de la ferroptosis

7.1 Vía del mevalonato

La biosíntesis de selenoproteínas está regulada por la vía del mevalonato. GPX4 es una selenoproteína que contiene una Sec en su sitio activo. El código genético para Sec es UGA, el cual normalmente es un codón de paro, por lo que se requiere maquinaria traduccional específica para incorporar Sec a GPX4. El RNA de transferencia de selenocisteína [tRNA(Sec)] es uno de los componentes clave de la maquinaria y controla la biosíntesis de las 25 selenoproteínas presentes en el humano. tRNA(Sec) sufre una isopentenilación en una adenina de un sitio específico durante el proceso de maduración, la cual es requerida para la eficiente incorporación de Sec en las selenoproteínas. La enzima que lleva a cabo esta

modificación es la isopentenil trasferasa, la cual usa al isopentenil pirofosfato como un donador. Éste es un producto de la vía del mevalonato, por lo que los inhibidores de esta vía, como lo son las estatinas, han mostrado interferencia con la maduración del tRNA(Sec) y, por ende, en la biosíntesis de GPX4 (Yang & Stockwell, 2016).

7.2 Vía de la transulfuración

La cisteína es un aminoácido no esencial debido a que algunas células en mamíferos son capaces de sintetizarla a través de la vía de la transulfuración, en la cual la metionina es usada como un donante de azufre y es convertida en cisteína a través de los intermediarios homocisteína y cistationina. Además de sintetizar cisteína de *novο*, existe un mecanismo de captación que ya fue explicado anteriormente; el sistema Xc⁻, el cual capta cistina que posteriormente es transformada en cisteína. La vía de la transulfuración se vuelve importante para la supervivencia de la célula cuando el mecanismo de captación es inhibido. La cisteinil-tRNA sintetasa (gen *CARS*) está involucrada en la carga de tRNAs con cisteína para la traducción de proteínas. Se ha observado que la expresión de *CARS* tiene un impacto en la ferroptosis inducida por Erastina. Al tratar con Erastina a células con la expresión del gen *CARS* disminuida, aumentan los niveles de cistationina y cisteína intracelular (metabolitos de la vía de la transulfuración) y, por ende, incrementan los niveles de GSH y GSSG, lo que conduce al mantenimiento de la actividad de GPX4 y, a la evasión de la ferroptosis inducida por Erastina. Por lo anterior, se hace evidente que usar un inductor de la ferroptosis como la Erastina en células con una vía de transulfuración defectuosa (como en células cancerígenas) puede ser efectivo para provocar muerte celular (Hayano et al., 2016; Yang & Stockwell, 2016).

7.3 Regulación transcripcional

La proteína p53 (TP53) y el factor nuclear (derivado del eritroide 2) similar al 2 (NFE2L2/NRF2) son los dos factores de transcripción mejor estudiados en la ferroptosis. La función de TP53 en la muerte por ferroptosis de células cancerígenas depende no sólo de sus genes diana sino de sus proteínas de unión. Por ejemplo, la inhibición transcripcional de SLC7A11 promueve la ferroptosis en células humanas de cáncer de mama, mientras que, en células humanas de cáncer de colon, TP53 forma un complejo con la dipeptidil peptidasa 4 (DPP4), enzima localizada en el núcleo celular y la membrana plasmática, lo que promueve su redistribución al núcleo y, por ende, la inhibición de la ferroptosis. En ausencia de TP53,

DPP4 se mueve del núcleo al citoplasma donde interactúa con NADPH oxidasa 1 (NOX1); esto provoca peroxidación lipídica asociada a la membrana plasmática que resulta en ferroptosis. NFE2L2 es un regulador maestro de la respuesta antioxidante a la ferroptosis mediante la activación de la expresión de un grupo de genes desintoxicantes de ROS. Además, los factores de choque tóxico (HSF), el factor inducido por hipoxia (HIF), el factor de transcripción activador (ATF), el translocador nuclear del receptor de arilos (ARNTL/BMAL1) y el regulador transcripcional asociado a Yes-1 (YAP1/YAP) son factores de transcripción que regulan la respuesta ferroptótica en la hipertermia, la hipoxia, el estrés del retículo endoplásmico, la alteración circadiana y la densidad celular respectivamente (D. Tang & Kroemer, 2020).

7.4 Regulación de la degradación

En células eucariontes la degradación de las proteínas puede ocurrir ya sea mediante el sistema ubiquitina-proteasoma (UPS) o mediante la vía autofágica que culmina en la digestión lisosomal. Se cree que la autofagia es fundamental para mantener la homeostasis celular al promover la supervivencia de la célula bajo estrés ambiental. La autofagia excesiva puede conducir a la muerte celular. La autofagia es regulada al alza en la ferroptosis, y varios tipos de autofagia selectiva promueven la ferroptosis a través de la degradación de reguladores antiferroptóticos, por ejemplo, ferritina, gotas lipídicas, receptor de hidrocarburos arilo (ARNTL) y GPX4. Las ligasas E3 determinan principalmente la especificidad del sustrato del UPS durante la ferroptosis. Por ejemplo, las ligasas E3: NEDD4 proteína ligasa de ubiquitina E3 (NEDD4) y NEDD4 como la proteína ligasa de ubiquitina E3 (NEDD4L) inhiben la ferroptosis mediante la degradación de VDAC y lactotransferrina. Esta vía de regulación como muchas otras es poco conocida, y requiere ser más explorada (D. Tang & Kroemer, 2020).

7.5 Regulación del metabolismo de hierro

El hierro es un importante oligoelemento en el cuerpo. La distribución y concentración anormal de hierro en el cuerpo puede afectar los procesos fisiológicos normales. El Fe^{2+} obtenido por absorción intestinal o degradación de eritrocitos puede ser oxidado por la ceruloplasmina (CP) a Fe^{3+} , el cual se une a la transferrina (TF) en la membrana celular para formar TF-Fe^{3+} que con ayuda del receptor 1 de transferrina (TRF1) es endocitado. Fe^{3+} es reducido a Fe^{2+} por el antígeno epitelial de seis-transmembrana de próstata 3 (STEAP3), y

Fe^{2+} es almacenado en el *Labile Iron Pool* (LIP) y en la ferritina, lo cual es mediado por el transportador de metal divalente (DMT1). El exceso de Fe^{2+} es oxidado a Fe^{3+} por la ferroportina (FPN). El silenciamiento de *TFRC*, el gen que codifica para TFR1, puede inhibir la ferroptosis inducida por Erastina, mientras que la hemo oxigenasa-1 (HO-1) puede acelerarla debido a que provee hierro. Además, la proteína de choque térmico beta-1 (HSPB1) puede reducir las concentraciones de hierro al inhibir la expresión de TRF1, por lo que la sobreexpresión de HSPB1 puede inhibir de forma importante la ferroptosis. (Figura 5) (J. Li et al., 2020).

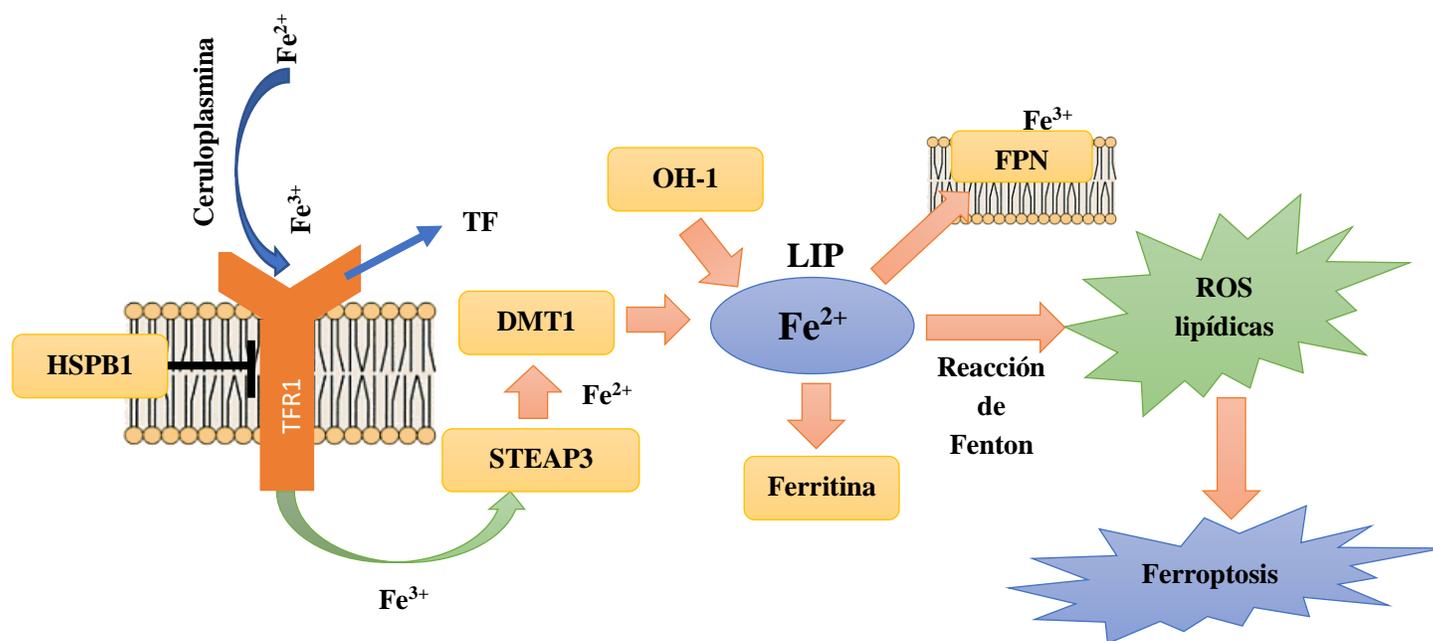


Figura 5. Regulación del metabolismo del hierro.

7.6 Regulación del metabolismo de lípidos

El metabolismo lipídico está estrechamente relacionado con la ferroptosis. Los PUFAs son sensibles a la peroxidación lipídica y son uno de los elementos esenciales en la ferroptosis. Los PUFAs libres deben ser esterificados en fosfolípidos de membrana y oxidados para desencadenar la ferroptosis. Se ha demostrado que la fosfatidiletanolamina (PE), la cual contiene ácido araquidónico (AA), es el principal fosfolípido que induce ferroptosis. La acil-CoA sintetasa de cadena larga 4 (ACSL4) y la lisofosfatidilcolina aciltransferasa 3 (LPCAT3) participan en la biosíntesis y remodelación de PE; activan a los PUFAs y afectan sus características transmembranales. Además, la disminución de la expresión de ACSL4 y LPCAT3 reduce la acumulación de sustratos para la peroxidación lipídica, por lo que se

inhibe la ferroptosis. Los PUFAs asociados a fosfatidiletanolamina (PUFA-PE) pueden desempeñar más roles oxidativos bajo la catálisis de la lipoxigenasa (LOX) y, eventualmente, inducir la ferroptosis (**Figura 6**) (J. Li et al., 2020).

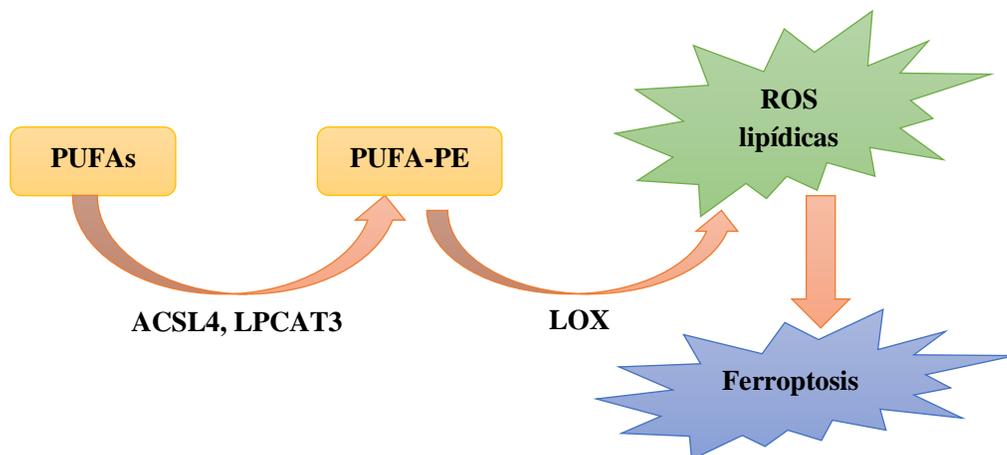


Figura 6. Generación de ROS lipídicas mediante la vía del metabolismo de lípidos. Tomado y adaptado de J. Li et al, 2020.

8 Hepatocarcinoma

El cáncer de hígado se mantiene como un reto de salud global y su incidencia crece cada vez más alrededor del mundo. Se estima que para el 2025, más de un millón de individuos se verán afectados por cáncer de hígado anualmente. El hepatocarcinoma es la forma más común de cáncer de hígado y representa aproximadamente el 90% de todos los casos. Al igual que otros tipos de cáncer, se origina por varios factores que dan lugar a las etapas tempranas de la transformación de los hepatocitos a células cancerígenas y el desarrollo del hepatocarcinoma (Llovet et al., 2021).

8.1 Causas/factores de riesgo

El hepatocarcinoma está comúnmente asociado con cirrosis resultante de enfermedades crónicas del hígado como hepatitis crónica; infección por el virus de la hepatitis B (VHB) o C (VHC) y hepatitis autoinmune. Otros factores de riesgo incluyen: excesivo consumo de alcohol, esteatohepatitis no alcohólica (NASH), enfermedad del hígado no alcohólico (NAFLD), exposición e ingestión de aflatoxinas, *diabetes mellitus*, obesidad, síndrome metabólico, consumo de tabaco y algunas enfermedades genéticas. La presencia de una infección crónica de VHC y un excesivo consumo de alcohol duplica el riesgo de padecer hepatocarcinoma comparado con el riesgo presente si sólo se tuviera la infección. La

enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD) puede progresar a NASH, cirrosis y hepatocarcinoma debido a la inflamación resultante de la acumulación de grasa en el hígado (Tunissioli et al., 2017). La **Figura 7** muestra los factores de riesgo que influyen en el desarrollo de hepatocarcinoma.

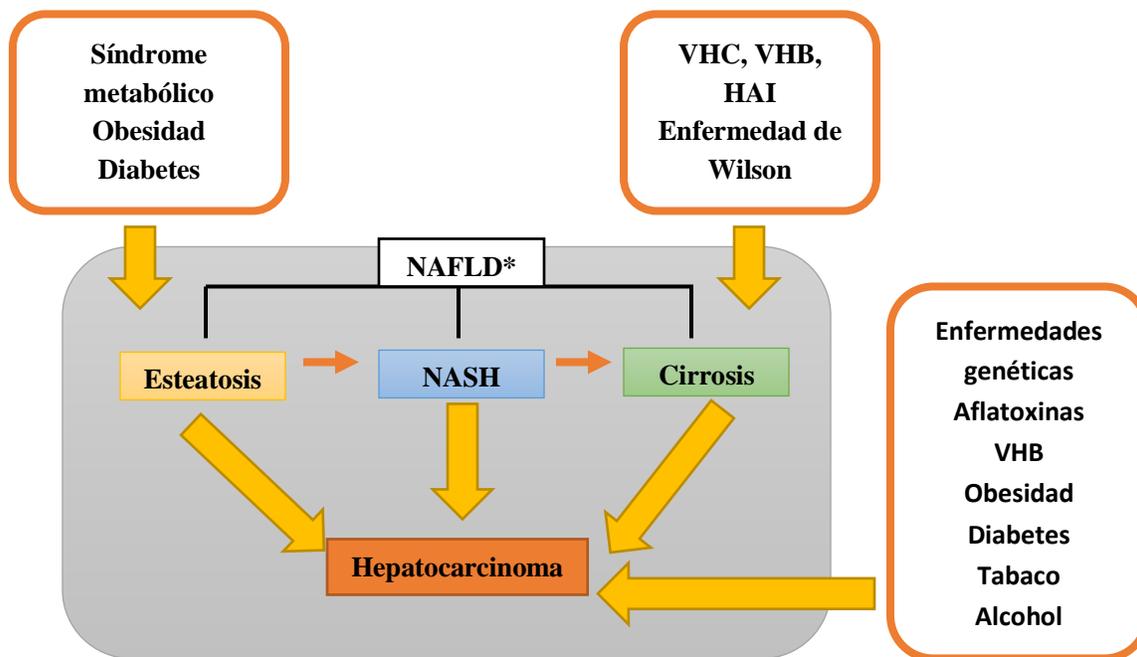


Figura 7. Factores de riesgo que influyen en el desarrollo de hepatocarcinoma. Virus de la hepatitis C (VHC), Virus de la hepatitis B (VHB), Hepatitis autoinmune (HAI), enfermedades genéticas: hemocromatosis, porfiria y tirosinemia. *El espectro de NAFLD. Tomado y adaptado de Tunissioli et al.,2017.

8.2 Tratamiento

Existen tanto tratamientos curativos como paliativos para tratar el hepatocarcinoma. La elección del tratamiento adecuado debe de tomar en cuenta la etapa del cáncer, la experiencia de los profesionales, la disponibilidad de recursos, la edad y las comorbilidades del paciente. Para establecer el pronóstico y las estrategias de tratamiento se han diseñado diversas clasificaciones del hepatocarcinoma basadas en tamaño o número de tumores, compromiso ganglionar y metástasis a distancia. Dada su estrecha relación con la presencia de cirrosis, y su relevancia en términos pronósticos y estrategias terapéuticas, una clasificación ideal debe involucrar tanto los factores tumorales, como la función hepática basal y la capacidad funcional del paciente. La clasificación *Barcelona Clinic Liver Cancer* (BCLC) considera todos estos puntos y es la más utilizada actualmente. Dentro de la clasificación, se toma en cuenta la escala Child-Turcotte-Pugh que provee una evaluación de la disfunción hepática.

En términos prácticos, un resultado “A” para Child-Turcotte-Pugh en una escala de “A” a “C” significa que se tiene una función hepática bien preservada mientras que una “C” indica que hay una mayor disfunción hepática que en “A” (Díaz et al., 2015; Tunissioli et al., 2017; Villanueva, 2019).

La clasificación BCLC se divide en cinco etapas, las cuales van asociadas a una estrategia de tratamiento específica para cada una (**Figura 8**). La etapa muy temprana (BCLC 0) incluye a pacientes con una lesión única ≤ 2 cm, asintomáticos y Child-Turcotte-Pugh A; estos pacientes tienen una baja probabilidad de diseminación y se benefician de tratamientos curativos. Por otra parte, la etapa temprana (BCLC A) la constituyen pacientes con hasta tres lesiones ≤ 3 cm, asintomáticos y Child-Turcotte-Pugh A-B. Para los pacientes con BCLC 0 o A se recomienda tratarlos con resección quirúrgica, trasplante hepático o ablación por radiofrecuencia. La etapa intermedia (BCLC B) corresponde a pacientes con lesiones grandes únicas o múltiples sin invasión intravascular ni metástasis extrahepáticas, que no sean candidatos a cirugía ni a trasplante hepático, asintomáticos y Child-Turcotte-Pugh A-B; en ellos se recomienda quimioembolización transarterial. La etapa avanzada (BCLC C) considera pacientes Child-Turcotte-Pugh A-B y con algunos síntomas constitucionales que presentan invasión vascular o diseminación extrahepática; para estos se debe considerar el uso de la terapia sistémica que comprende el uso de inhibidores de tirosina cinasa e inhibidores de puntos de control inmunitario como tratamiento paliativo. Existen siete aprobados por la FDA: los de primera línea; Sorafenib y Lenvatinib, y los de segunda línea; Regorafenib, Cabozantinib, Nivolumab, Pembrolizumab y Ramucirumab. Por último, la etapa terminal (BCLC D) incluye a pacientes muy sintomáticos y con mala función hepática (Child-Turcotte-Pugh C), en los que no se ha demostrado beneficio de sobrevida con ningún tratamiento complementario, por lo que únicamente se les proporcionan medidas de soporte vital (Bteich & Di Bisceglie, 2019; Díaz & Barrera, 2015).

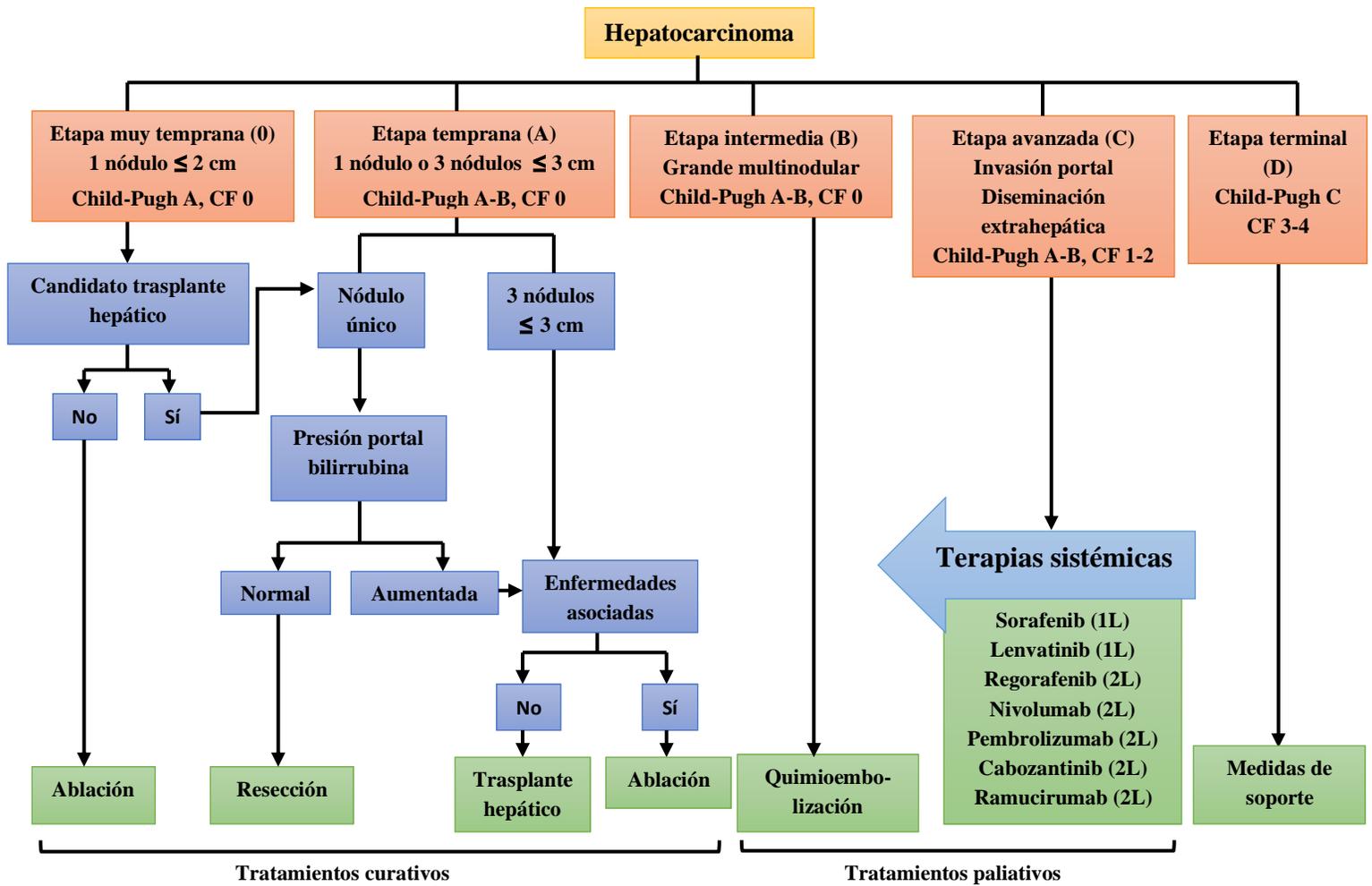


Figura 8. Clasificación y estrategias de tratamiento. Capacidad funcional (CF) entendida por 0= sin síntomas; 1= con síntomas leves, capaz de hacer actividad ligera; 2= capaz de autocuidarse, pero no de trabajar; 3= capacidad limitada de autocuidado, en cama o sentado más del 50% del tiempo; 4= dependiente, postrado. Tomado y adaptado de Díaz & Barrera, 2015; Bteich & Di Bisceglie, 2019.

8.3 Morbilidad y mortalidad en México

8.3.1 Morbilidad

En México durante 2017, de cada 100 egresos hospitalarios por cáncer (tumores malignos), en la población de 0 a 19 años; 2 son en órganos digestivos, que es donde se incluye el cáncer de hígado según la Clasificación Estadística Internacional de Enfermedades y Problemas Relacionados con la Salud (CIE-10) (**Tabla 1**).

Tabla 1. Porcentaje de morbilidad hospitalaria de los principales tumores malignos en la población 0 a 19 años según el sexo (2017).

| Principales tumores malignos | Total | Hombres | Mujeres |
|---|-------|---------|---------|
| Tejidos linfoides, hematopoyéticos o tejidos relacionados | 73 | 73 | 73 |
| Sistema nervioso | 6 | 6 | 7 |
| Hueso o cartílago | 5 | 5 | 4 |
| Tejido conectivo y blando | 3 | 3 | 3 |
| <u>Órganos digestivos</u> | 2 | 2 | 1 |

En la población de 20 años y más, el cáncer de órganos digestivos es la principal causa de morbilidad hospitalaria por tumores malignos entre los varones (23%), mientras en las mujeres ocupa el tercer lugar (12%) (Tabla 2).

Tabla 2. Porcentaje de morbilidad hospitalaria de los principales tumores malignos en la población de 20 años y más según el sexo (2017).

| Principales tumores malignos | Total | Hombres | Mujeres |
|---|-------|---------|---------|
| Mama | 24 | 1 | 37 |
| Órganos genitales | 21 | 20 | 22 |
| <u>Órganos digestivos</u> | 16 | 23 | 12 |
| Tejidos linfoides, hematopoyéticos o tejidos relacionados | 13 | 19 | 9 |
| Piel | 5 | 7 | 4 |
| Órganos respiratorios e intratorácicos | 4 | 7 | 2 |
| Órganos urinarios | 4 | 7 | 2 |

8.3.2 Mortalidad

En el año 2019 y el periodo enero-agosto 2020 se registraron 747,784 y 683,823 defunciones respectivamente, de las cuales 12% se deben a tumores malignos (88,683) en el año 2019 y 9% (60,421) en el periodo señalado de 2020. La distribución porcentual por sexo de ambos

periodos de tiempo indica que hay más fallecimientos en mujeres (51%) que en hombres (49%) por esta causa.

En México durante 2019, por el tipo de tumor maligno, en este caso tumor maligno del hígado y de las vías biliares intrahepáticas representó el 3% de muertes en mujeres y el 4% en hombres en edad de 0 a 14 años (**Tabla 3**) (INEGI, 2021).

Tabla 3. Distribución porcentual de defunciones de los principales tumores malignos según el sexo en edad de 0 a 14 años (2019).

| Principales causas de muerte | En mujeres | En hombres |
|---|------------|------------|
| Leucemia | 56 | 51 |
| Tumor maligno de las meninges, del encéfalo y de otras partes del sistema nervioso central | 15 | 18 |
| <u>Tumor maligno del hígado y de las vías biliares intrahepáticas</u> | 3 | 4 |
| Linfoma no Hodgkin | 3 | 3 |
| Otras causas de tumores malignos | 23 | 24 |
| | 100 | 100 |

En la población de 60 años y más, también fue una de las principales causas de muerte por tumores malignos; representado un 9% en hombres y un 10% en mujeres (**Tabla 4**) (INEGI, 2021).

Tabla 4. Distribución porcentual de defunciones de los principales tumores malignos según el sexo en edad de 60 años y más (2019).

| Principales causas de muerte en hombres | Porcentaje | Principales causas de muerte en mujeres | Porcentaje |
|---|------------|---|------------|
| Tumor maligno de la próstata | 22 | Tumor maligno de la mama | 13 |

| | | | |
|--|-----|--|-----|
| Tumor maligno de la tráquea, de los bronquios y del pulmón | 11 | <u>Tumor maligno del hígado y de las vías biliares intrahepáticas</u> | 10 |
| <u>Tumor maligno del hígado y de las vías biliares intrahepáticas</u> | 9 | Tumor maligno del colon, del recto y del ano | 8 |
| Tumor maligno del colon, del recto y del ano | 8 | Tumor maligno de la tráquea, de los bronquios y del pulmón | 7 |
| Otras causas de tumores malignos | 50 | Otras causas de tumores malignos | 62 |
| | 100 | | 100 |

En las poblaciones de 15 a 29 años y de 30 a 59 años durante 2019, el tumor maligno del hígado y de las vías biliares intrahepáticas no fue una de las principales causas de defunciones por tumores malignos, por lo que fue clasificado en otras causas de tumores como se muestra en la **Tabla 5** (INEGI, 2021).

Tabla 5. Distribución porcentual de defunciones de los principales tumores malignos según el sexo en las edades de 15 a 29 años y de 30 a 59 años (2019).

| Principales causas de muerte en hombres | Porcentaje | Principales causas de muerte en mujeres | Porcentaje |
|---|-------------------|---|-------------------|
| De 15 a 29 años | 100 | De 15 a 29 años | 100 |
| Leucemia | 33 | Leucemia | 32 |
| Linfoma no Hodgkin | 6 | Tumor maligno del cuello del útero | 9 |
| Tumor maligno de las meninges, del encéfalo y de otras partes del sistema nervioso central | 5 | Tumor maligno de las meninges, del encéfalo y de otras partes del sistema nervioso central | 7 |

| | | | |
|---|------------|---|------------|
| Tumor maligno del estómago | 3 | Tumor maligno del ovario | 6 |
| <u>Otras causas de tumores malignos</u> | 53 | <u>Otras causas de tumores malignos</u> | 46 |
| De 30 a 59 años | 100 | De 30 a 59 años | 100 |
| Tumor maligno del colon, del recto y del ano | 12 | Tumor maligno de la mama | 23 |
| Tumor maligno del estómago | 10 | Tumor maligno del cuello del útero | 13 |
| Tumor maligno de la tráquea, de los bronquios y del pulmón | 8 | Tumor maligno del ovario | 9 |
| Leucemia | 7 | Tumor maligno del colon, del recto y del ano | 6 |
| <u>Otras causas de tumores malignos</u> | 63 | <u>Otras causas de tumores malignos</u> | 49 |

9 Estrategias terapéuticas basadas en la ferroptosis para el tratamiento del hepatocarcinoma

9.1 Estrategia terapéutica actualmente implementada

9.1.1 El Sorafenib como fármaco capaz de desencadenar la ferroptosis

El Sorafenib es un inhibidor de proteínas-cinasas de amplio espectro que puede inhibir al receptor del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR), al receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR) y a las Raf quinasas. Además, es uno de los fármacos autorizados por la FDA para el tratamiento del hepatocarcinoma avanzado (aprobado en 2007 para este fin) siendo uno de los más utilizados. Permanece en duda si su efecto anticancerígeno es debido a la inhibición de cinasas, sin embargo, lo que sí se sabe es que debido a la inhibición de éstas induce una débil apoptosis. El Sorafenib es un potente inhibidor del sistema Xc⁻, lo que desencadena la ferroptosis en varias líneas celulares incluyendo células de hepatocarcinoma; el efecto directo del Sorafenib en éstas resulta de la inducción de ferroptosis más que de apoptosis. Hasta el momento, es el único inhibidor de

proteínas-cinasas que se sabe que induce ferroptosis. (J. Li et al., 2020; Z. Li et al., 2021; L. Wang et al., 2020).

9.1.1.1 Muerte celular dependiente de hierro en células de hepatocarcinoma expuestas a Sorafenib

El investigador Christophe Louandre y sus colaboradores evidenciaron que el Sorafenib es capaz de desencadenar la ferroptosis en células de hepatocarcinoma utilizando deferoxamina (DFO), un quelante de hierro. Con sus experimentos se demostró lo que se muestra en la **Tabla 6** (Louandre et al., 2013).

Tabla 6. Resumen de resultados de los experimentos realizados.

| Experimento | Planteamiento | Resultado |
|--------------------|--|---|
| 1 | Efecto de la DFO en células HCC expuestas a Sorafenib | La deferoxamina protegió a las células de hepatocarcinoma contra el efecto citotóxico del Sorafenib. |
| 2 | Capacidad de la DFO para bloquear la apoptosis en células HCC | La deferoxamina no bloquea la apoptosis en células de hepatocarcinoma. |
| 3 | La inducción de macroautofagia, ¿explica la protección de DFO? | El incremento de la macroautofagia no está involucrada en la protección contra los efectos citotóxicos del Sorafenib. |
| 4 | DFO, ¿interfiere con la actividad inhibidora de cinasas del Sorafenib? | La deferoxamina no interfiere en la actividad inhibidora de cinasas del Sorafenib. |
| 5 | La protección del DFO, ¿depende de su capacidad para disminuir las reservas de hierro intracelulares? | Existe una estricta correlación entre la disminución de las reservas de hierro intracelulares y el efecto protector ejercido por la deferoxamina sobre la citotoxicidad ejercida por Sorafenib. |

| | | |
|---|--|--|
| 6 | DFO, ¿previene eventos oxidativos inducidos por Sorafenib en células HCC? | Los productos de oxidación lipídica que se producen por la exposición a Sorafenib son prevenidos por la deferoxamina (quelante de hierro). |
| | | Conclusión: el Sorafenib aplicado a células HCC induce muerte celular por ferroptosis. |

9.1.1.2 El Sorafenib actúa como inhibidor del sistema Xc^-

El investigador Scott Dixon y sus colaboradores determinaron que el Sorafenib inhibe el sistema Xc^- desencadenando la ferroptosis. Se encontró que la muerte celular inducida por el tratamiento con Sorafenib en células HT-1080 fue inhibida por los supresores de ferroptosis: Beta-mercaptoetanol (β -ME), Ferrostatina-1 (Fer-1) y DFO, que también inhiben la muerte por ferroptosis inducida por Erastina. También, se observó que el tratamiento con Sorafenib en células HT-1080 disminuyó los niveles de glutatión total y resultó en la acumulación de peróxidos lipídicos, lo mismo ocurrió con un tratamiento realizado con Erastina. Estos resultados indicaron que, como la Erastina, el Sorafenib inhibe la captura de cistina mediada por el sistema Xc^- conduciendo al estrés del retículo endoplasmático, la disminución de los niveles de glutatión y la acumulación de especies reactivas de oxígeno lipídicas dependiente de hierro. Se evaluó la generalidad de estos resultados usando otras líneas celulares, en las cinco líneas utilizadas se observó que tanto el tratamiento con Erastina como el tratamiento con Sorafenib causaron una inhibición similar de la actividad del sistema Xc^- . No se sabe exactamente mediante qué mecanismo el Sorafenib inhibe el sistema Xc^- , sin embargo, se tienen dos hipótesis (**Figura 9**): la primera sugiere que se inhibe mediante la modulación de la actividad de una cinasa que controla la función del sistema Xc^- y, la segunda propone que se inhibe mediante una modulación de un objetivo no cinasa, como SLC7A11 (Dixon et al., 2014).

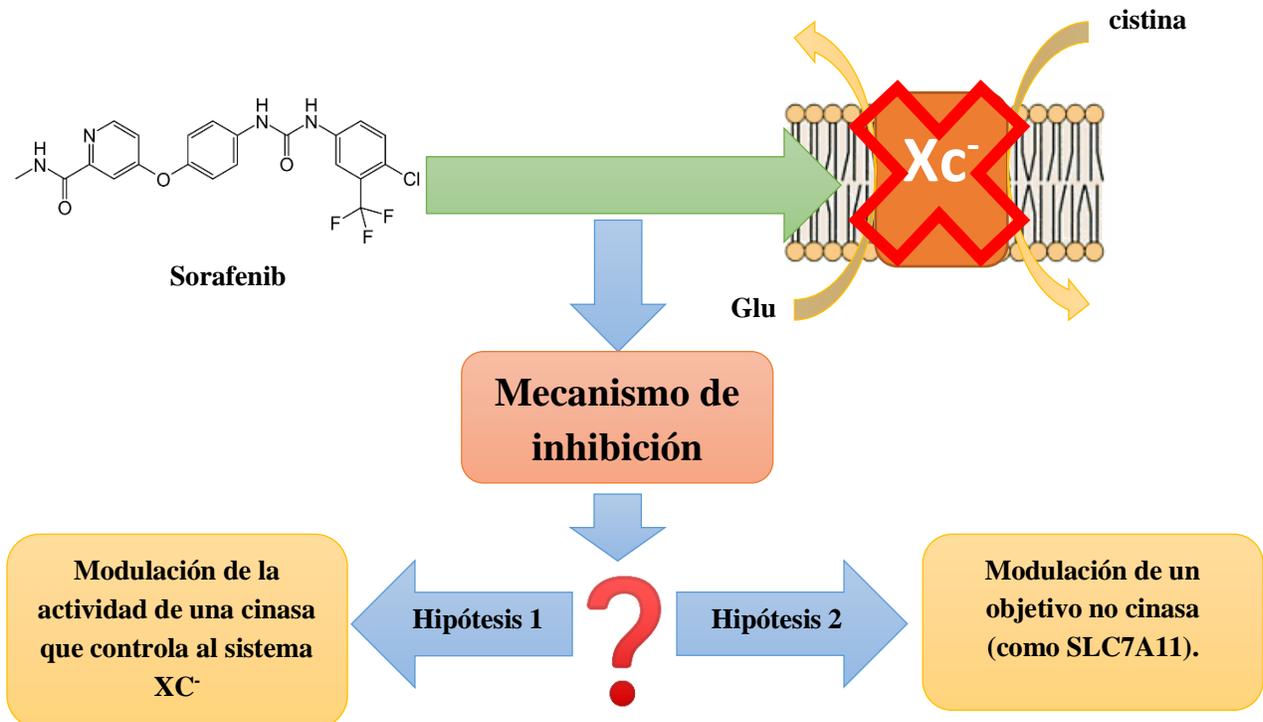


Figura 9. El Sorafenib inhibe al sistema Xc^- mediante un mecanismo que aún no se conoce, sin embargo, se tienen dos hipótesis.

9.1.1.3 El Sorafenib induce disfunción mitocondrial promoviendo la ferroptosis en células de hepatocarcinoma

El investigador Yanchun Lin y sus colaboradores demostraron que el Sorafenib induce disfunción mitocondrial y estrés oxidativo en células de hepatocarcinoma, lo cual promueve la ferroptosis. Además, determinaron que el Sorafenib inhibe la proliferación y migración de las células de hepatocarcinoma dependiendo de la dosis (Y. Li et al., 2021).

La mitocondria juega un papel clave en el metabolismo celular, por lo que su disfunción puede conducir a la acumulación de ROS. La morfología mitocondrial es un parámetro valioso para determinar el estado de la mitocondria. Después de tratar células Huh7 con diferentes concentraciones de Sorafenib se observaron cambios morfológicos en las mitocondrias los cuales resultaron en un pronunciado aumento de su fragmentación alrededor del núcleo. La principal función de la mitocondria es la síntesis de ATP mediante la fosforilación oxidativa, por lo que se examinó la actividad de los complejos de transporte de electrones mitocondrial para determinar si se afectó el balance del sistema de transporte de electrones; el Sorafenib interrumpió el transporte de electrones y disminuyó la actividad de

los complejos I+III, II+III y V. La disminución resultó en el colapso del potencial de membrana mitocondrial y el decremento de la síntesis de ATP. Una morfología mitocondrial anormal afecta el balance en la homeostasis de ROS, lo que puede conducir a peroxidación lipídica y muerte por ferroptosis. Cuando las células de hepatocarcinoma fueron expuestas a diferentes concentraciones de Sorafenib se observó que, tanto las especies reactivas de oxígeno intracelulares como los niveles de ROS mitocondriales aumentaron. Aunado a lo anterior, el Sorafenib incrementó la formación de peróxidos lipídicos, lo que condujo a la muerte celular por ferroptosis (**Figura 10**) (Y. Li et al., 2021).

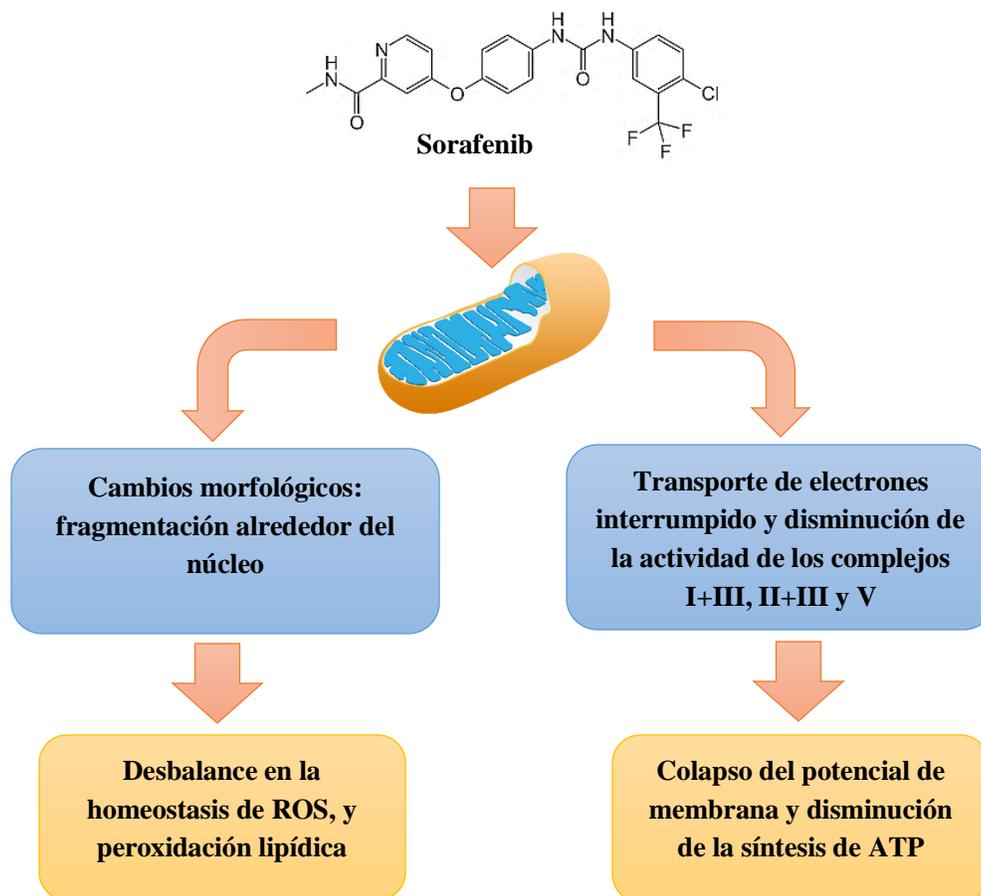


Figura 10. Efectos del Sorafenib en la mitocondria determinado en células de hepatocarcinoma

9.1.1.4 La inducción de la ferroptosis es una propiedad única del Sorafenib con respecto a otros inhibidores de cinasas

La investigadora Emma Lachaier y sus colaboradores demostraron que la inducción de la ferroptosis es una propiedad específica del Sorafenib y no es compartida con otros fármacos anticancerígenos disponibles para uso clínico. Para demostrar esto se utilizaron células ACHN, las cuales son altamente sensibles a la ferroptosis inducida por Sorafenib, se les aplicaron diez inhibidores de quinasas clínicamente relevantes que tenían diferentes actividades en el kinoma (que es el conjunto completo de proteínas quinasas codificadas en el genoma) de células cancerígenas: Erlotinib, Gefitinib, Tivantinib, Vemurafenib, Selumetinib, Rapamicina, Imatinib, Masatinib, Ponatinib y Sorafenib. Obteniendo los resultados mostrados en la **Tabla 7**.

Tabla 7. Resultados obtenidos de la exposición de células ACHN a diferentes inhibidores de quinasas

| Inhibidor de quinasas | ¿Induce ferroptosis? | Inhibidor de quinasas | ¿Induce ferroptosis? |
|------------------------------|-----------------------------|------------------------------|-----------------------------|
| Erlotinib | No | Rapamicina | No |
| Gefitinib | No | Imatinib | No |
| Tivantinib | No | Masatinib | No |
| Vemurafenib | No | Ponatinib | No |
| Selumetinib | No | <u>Sorafenib</u> | Sí |

Por los resultados anteriores se concluyó que la inducción de ferroptosis es una propiedad específica del Sorafenib la cual no comparte con otros inhibidores de quinasas con actividad anticancerígena (Borba et al., 2021; Lachaier et al., 2014).

9.2 Problemática existente con la estrategia actual

El principal problema que existe con el uso del Sorafenib como tratamiento para el hepatocarcinoma avanzado es que sólo aproximadamente el 30% de los pacientes puede obtener beneficios reales con el Sorafenib debido a que se ha observado que los resultados de la terapia están ligados a la función hepática; a mayor función hepática mayor es la supervivencia y viceversa. Aunado a esto, los pacientes que obtienen beneficios reales de

esta terapia usualmente adquieren resistencia a este fármaco dentro de un lapso de seis meses. La variabilidad en la quimiosensibilidad al Sorafenib entre diferentes pacientes no es entendida del todo; es posible que otras vías de señalización estén involucradas en su mecanismo anticancerígeno. En estudios clínicos aleatorios de fase III realizados a pacientes con hepatocarcinoma avanzado, se observó que el tratamiento con Sorafenib sólo mejoró el tiempo de progresión del tumor de 1.4 a 2.7 meses y extendió la supervivencia de 2.3 a 2.8 meses comparado con el grupo placebo, sugiriendo que existe una resistencia adquirida la cual ocasiona que el Sorafenib tenga un efecto insatisfactorio (Colagrande et al., 2015; Y. Li et al., 2021; W. Tang et al., 2020; Xie et al., 2012).

9.2.1 Principales mecanismos de resistencia al Sorafenib en el hepatocarcinoma

Recientes estudios sugieren que en la resistencia al Sorafenib en el tratamiento del hepatocarcinoma se ven involucrados factores epigenéticos, procesos de transporte, muerte celular regulada y microambiente del tumor (**Figura 11**) (W. Tang et al., 2020).

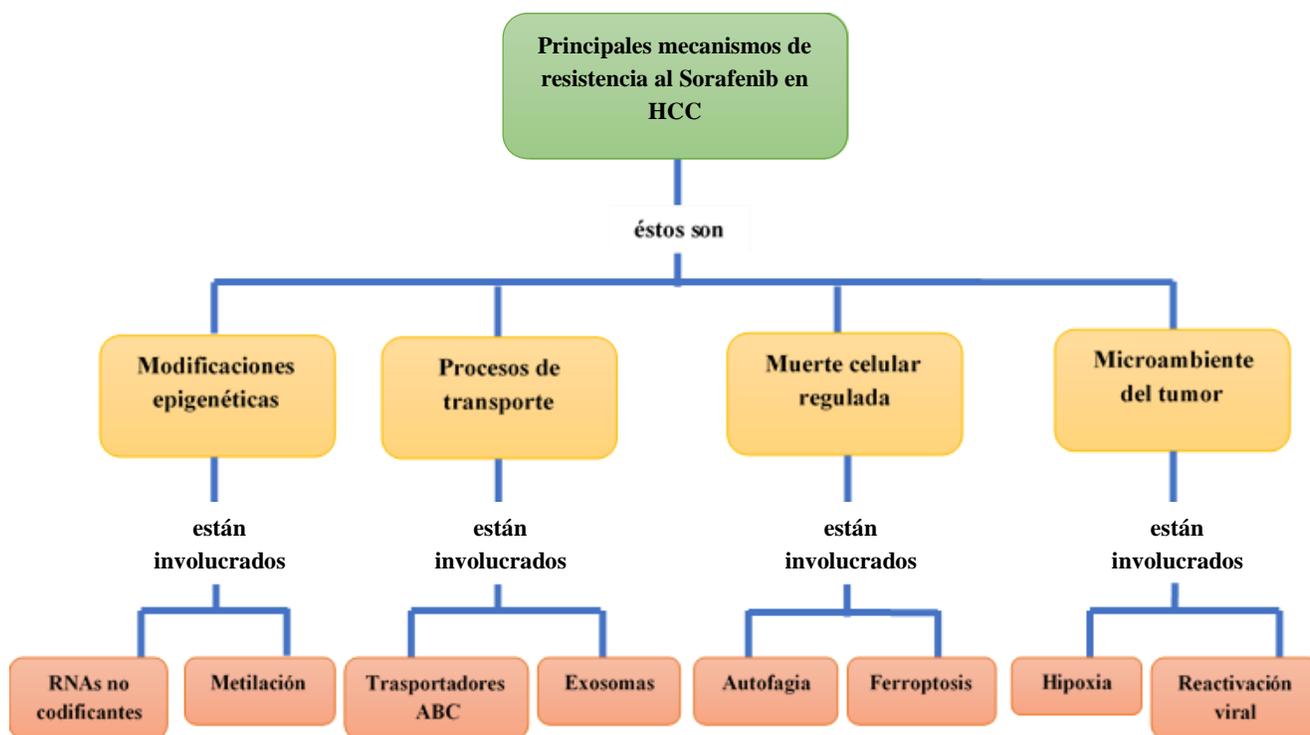


Figura 11. Principales mecanismos de resistencia al Sorafenib en hepatocarcinoma.

9.2.1.1 Modificaciones epigenéticas involucradas en la resistencia al Sorafenib

Las modificaciones epigenéticas pueden cambiar la expresión de genes sin cambiar las secuencias de DNA, y algunas modificaciones pueden ser heredadas (**Figura 12**). En algunos casos, los cambios epigenéticos son dinámicos y responden a estímulos del ambiente. Los mecanismos epigenéticos regulan diferentes procesos fisiológicos que ocurren en los organismos vivos, incluyendo la diferenciación y la proliferación celular. Existen dos tipos de mecanismos que están involucrados en la resistencia al Sorafenib en el hepatocarcinoma: basados en RNA no codificantes y por metilación. Se ha hecho evidente que los RNAs no codificantes (ncRNAs), incluyendo los RNAs largos no codificantes (lncRNAs) y microRNAs (miRNA), son críticos en el desarrollo de la resistencia al Sorafenib en el hepatocarcinoma debido a que se ha observado que varios RNAs no codificantes se desregulan en el hepatocarcinoma e impactan en la sensibilidad al Sorafenib, por ejemplo, la sobreexpresión de SNHG16 favorece la resistencia al Sorafenib, sin embargo, no se conoce del todo el mecanismo por el que lo hace, se cree que puede actuar como una esponja que captura a otros RNAs no codificantes que sensibilizan a las células de hepatocarcinoma al Sorafenib como miR-140-5p. La metilación se refiere al proceso de transferencia de grupos metilo de compuestos metílicos activos a otros compuestos. Algunos ejemplos son: la metilación de RNA, la metilación de histonas y la metilación de DNA. Una metilación aberrante puede ocasionar que la expresión de genes cambie y resulte en características cancerosas (W. Tang et al., 2020).

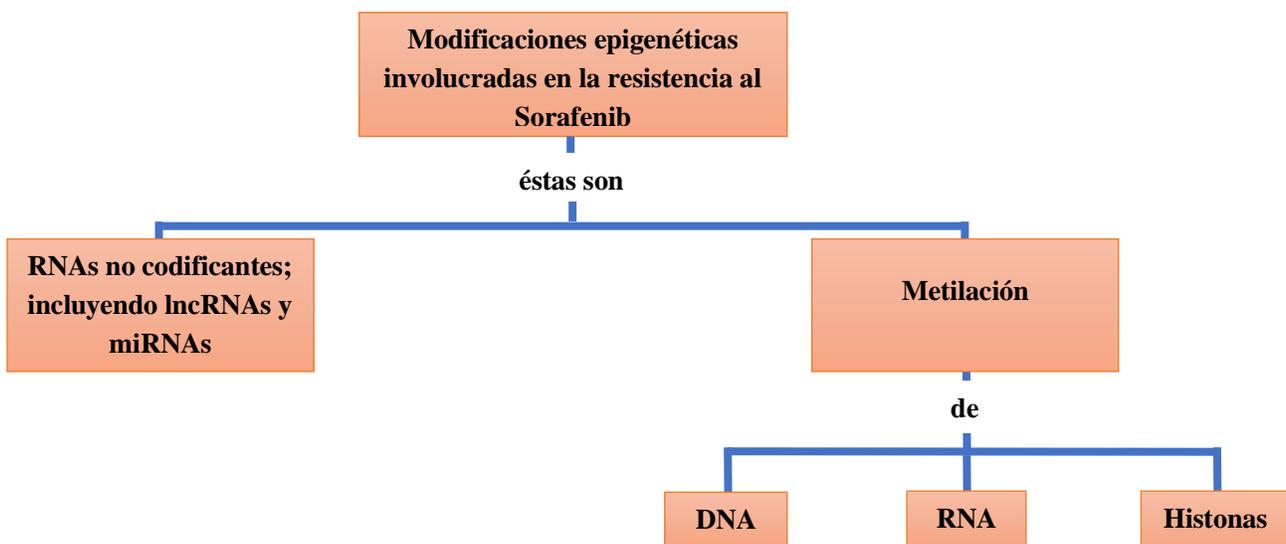


Figura 12. Modificaciones epigenéticas involucradas en la resistencia al Sorafenib.

9.2.1.2 Procesos de transporte involucrados en la resistencia al Sorafenib

En la resistencia al Sorafenib se ven involucrados los transportadores ABC los cuales reducen la efectividad de la terapia debido a que transportan a los fármacos fuera de la célula cancerígena y afectan negativamente los resultados de las terapias anticancerígenas. Se ha observado que varios inhibidores de quinasas incluido el Sorafenib interaccionan con los transportadores ABC. También, los exosomas están involucrados en la resistencia al Sorafenib; éstos son pequeñas vesículas extracelulares que contribuyen a la comunicación celular y regulan el microambiente tumoral. En células normales, los exosomas remueven biomoléculas dañinas, pero en células cancerígenas este mecanismo podría estar secuestrado. Por ejemplo, células cancerígenas resistentes a fármacos pueden encapsular fármacos de uso terapéutico en exosomas y transportarlos fuera de las células tumorales (**Figura 13**) (W. Tang et al., 2020).

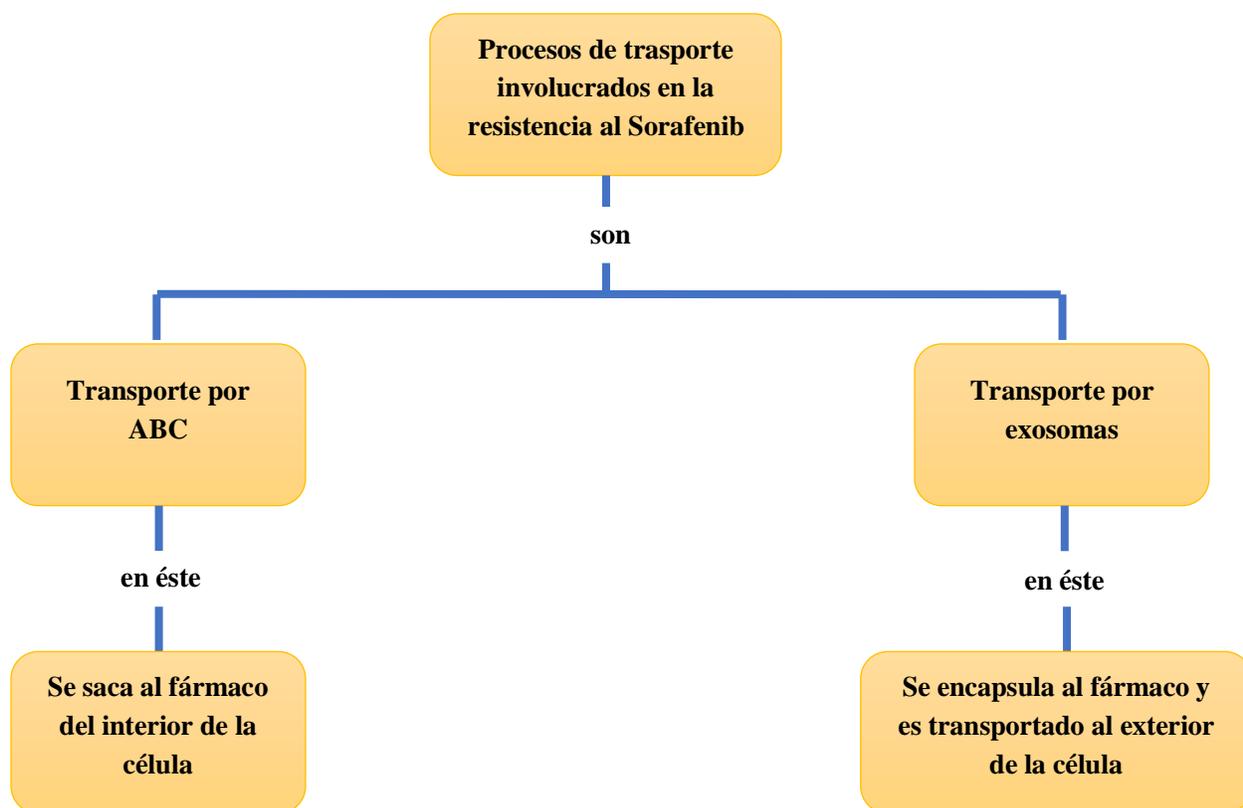


Figura 13. Procesos de transporte involucrados en la resistencia al sorafenib en el hepatocarcinoma.

9.2.1.3 Tipos de muerte celular regulada involucrados en la resistencia al Sorafenib

El término muerte celular regulada describe los tipos de muerte celular originados del microambiente extracelular o intracelular que ocurren a través de mecanismos moleculares cuando las respuestas adaptativas no pueden restablecer la homeostasis celular. La muerte celular regulada se puede dividir en diferentes procesos: apoptosis, autofagia, proptosis, ferroptosis, etc. Especialmente la autofagia y la ferroptosis están involucradas en la resistencia al Sorafenib en el hepatocarcinoma (**Figura 14**). La autofagia es un proceso en el que algunas proteínas dañadas u organelos son encapsulados en vesículas autofágicas y, éstas a su vez, son enviadas a los lisosomas para su degradación y reciclado. La autofagia es un mecanismo importante en la resistencia a los fármacos debido a que promueve la supervivencia de las células tumorales en caso de estrés terapéutico o metabólico (W. Tang et al., 2020).

En la ferroptosis se rompe el balance redox en la célula y se producen peróxidos lipídicos, conduciendo a la muerte celular. Para este mecanismo se encontró que metalotioneina *MT-1G* es un regulador crítico en la resistencia al Sorafenib en el hepatocarcinoma debido a que la expresión del RNA mensajero para *MT-1G*, así como la expresión de la respectiva proteína fue promovida por el Sorafenib, pero no por otros inhibidores de quinasas. Aunado a esto, se observó que al disminuir la expresión de *MT-1G* disminuyeron más los niveles de glutatión e incrementó la peroxidación lipídica, lo que contribuyó a la ferroptosis (W. Tang et al., 2020).

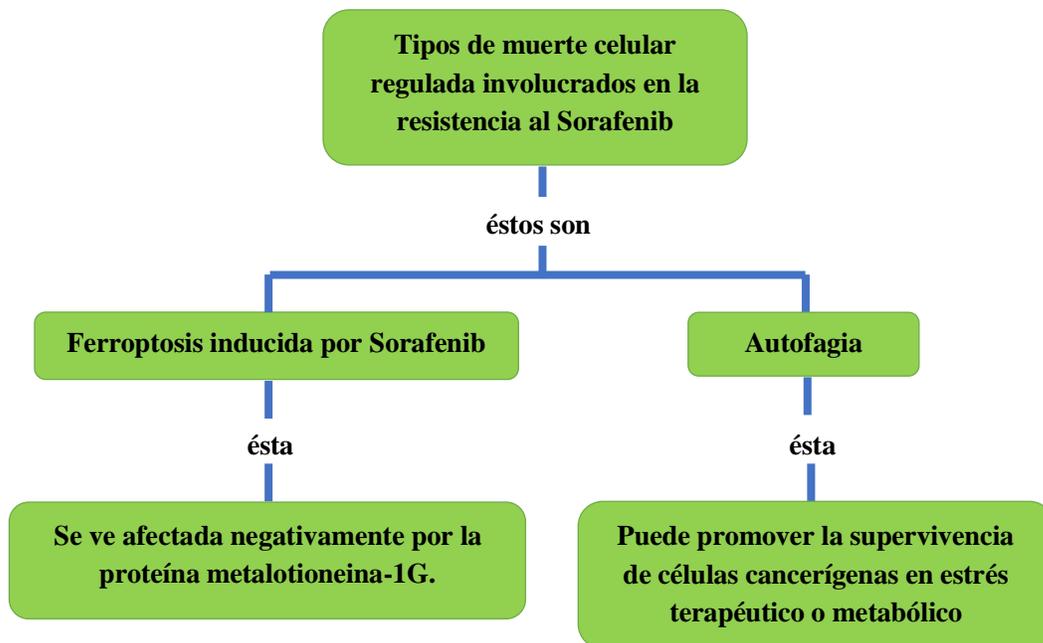


Figura 14. Tipos de muerte regulada involucrados en la resistencia al Sorafenib en el hepatocarcinoma.

9.2.1.4 El ambiente tumoral y la resistencia al Sorafenib

La metástasis, la invasión y el crecimiento del cáncer están afectados por el microambiente del tumor. Un tratamiento continuo con Sorafenib resulta en la inhibición angiogénica del tumor y, posteriormente en hipoxia dentro del mismo, lo que facilita la selección de clones celulares resistentes que se adaptan al déficit de oxígeno y nutrientes y, por lo tanto, se limita la eficacia del Sorafenib. La hepatitis B y C crónicas son de las principales causas de hepatocarcinoma. La reactivación de la infección viral durante la quimioterapia e inmunosupresión puede causar daño fulminante al hígado y muerte (**Figura 15**). Una alta carga de DNA del virus de la hepatitis B está críticamente relacionada con el riesgo en la recurrencia del hepatocarcinoma. Se ha comenzado a estudiar la correlación entre la eficacia del Sorafenib y la reactivación viral y, se ha reportado que el Sorafenib promueve la reactivación viral debido a que reduce el número de células *natural killer* (NK) e inhibe la reactividad de éstas contra las células de hepatocarcinoma, sin embargo, aún no se conoce del todo la correlación entre la terapia con Sorafenib y la reactivación viral (W. Tang et al., 2020).

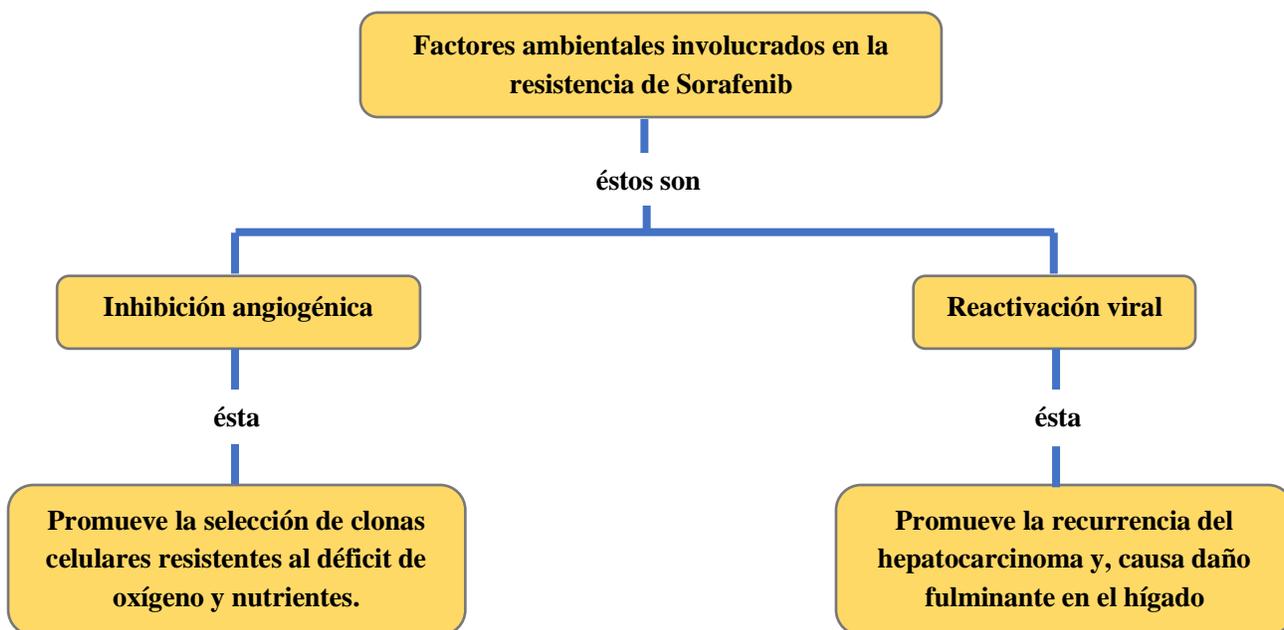


Figura 15. Factores ambientales involucrados en la resistencia al Sorafenib en el hepatocarcinoma.

9.3 Estrategias terapéuticas potenciales

9.3.1 Estrategias terapéuticas potenciales que mejoran la eficacia del Sorafenib y no involucran el uso de nanopartículas

9.3.1.1 Efecto sinérgico del Artesunato y el Sorafenib para inducir ferroptosis en el hepatocarcinoma

El Artesunato es un derivado de la Artemisinina usado como monoterapia para el tratamiento de la malaria grave y, en combinación con un fármaco asociado se usa para la malaria no grave (Kouakou et al., 2019). Además, a diferencia del Sorafenib, tiene la capacidad de producir ferroptosis independiente del sistema Xc^- . En células de cáncer cervical HeLa, el Artesunato se acumula en el lisosoma, activando la función lisosomal y promoviendo la degradación de la ferritina y, como consecuencia, se da la liberación de Fe^{2+} . Este efecto mediado por Artesunato en el lisosoma y la acumulación de hierro celular puede también ocurrir en células de hepatocarcinoma, por lo que el Artesunato podría tener sinergia con el Sorafenib para inducir la ferroptosis. Además, este derivado de la Artemisinina es bien tolerado en pacientes clínicos y es relativamente asequible (Z. Li et al., 2021).

El investigador Zhong-jie Li y sus colaboradores determinaron que el Artesunato es un buen candidato para que, junto con el Sorafenib, se produzca un efecto sinérgico que ayude a inhibir el hepatocarcinoma (**Figura 16**) (Z. Li et al., 2021). Para ello, demostraron que:

1. El Artesunato sensibiliza a las células de hepatocarcinoma al Sorafenib para inducir muerte celular *in vitro*; el Artesunato por sí mismo, inhibió la proliferación de células HepG2, pero cuando fue combinado con dosis crecientes de Sorafenib, disminuyó aún más la proliferación celular. El efecto sinérgico fue más evidente en células Huh7, SNU-449 y SNU-182, incluso cuando el Sorafenib fue administrado a dosis bajas. Además, en un ensayo de formación de colonias realizado, se observó que el tratamiento combinado disminuyó el crecimiento de colonias después de 10 días de tratamiento.
2. El tratamiento combinado (Artesunato y Sorafenib) inhibe el crecimiento de un tumor de hepatocarcinoma *in vivo* (en ratones) a través de muerte celular extensa; se produjo muerte celular extensa en el tumor, por lo que se retardó el crecimiento tumoral y se redujo el tamaño de los nódulos tumorales. Aunque los tratamientos individuales con Sorafenib y Artesunato también provocaron muerte de las células, las zonas de muerte celular fueron notablemente más pequeñas que con el tratamiento combinado.
3. El tratamiento combinado produce peroxidación lipídica; se produjo peroxidación lipídica como consecuencia del tratamiento combinado, la cual fue prevenida por liproxtatina-1 (inhibe peroxidación lipídica) y N- acetilcisteína (promueve síntesis de glutatión). Además, se utilizaron liproxstamina-1 y DFO que son inhibidores de la ferroptosis para confirmar que el tratamiento combinado induce muerte celular por ferroptosis.
4. El tratamiento combinado afecta las funciones mitocondriales; se incrementó la generación de ROS mitocondriales y aumentó la producción de ROS celulares. También, el tratamiento causó la reducción del potencial de membrana mitocondrial y afectó funciones mitocondriales como la homeostasis mitocondrial de las especies reactivas de oxígeno y la generación de ATP.
5. El tratamiento combinado incrementa la función lisosomal y la degradación de la ferritina; el tratamiento inhibió la expresión de la cadena ligera de la ferritina (FTL) y de la cadena pesada (FTH). Además, disminuyó la expresión de *TFRC* (gen de la

transferrina). Tanto la transferrina como ferritina son importantes proteínas reguladoras de hierro en el cuerpo; la ferritina, almacena hierro en el citoplasma y la transferrina, transporta hierro en la sangre o en los fluidos. Se observó que el tratamiento combinado promovió la degradación lisosomal de FTL y, por ende, el aumento de las concentraciones de Fe^{2+} . Se evidenció la activación lisosomal ocasionada por el tratamiento combinado debido a que se dio un aumento en las actividades de catepsina B y L lisosomales.

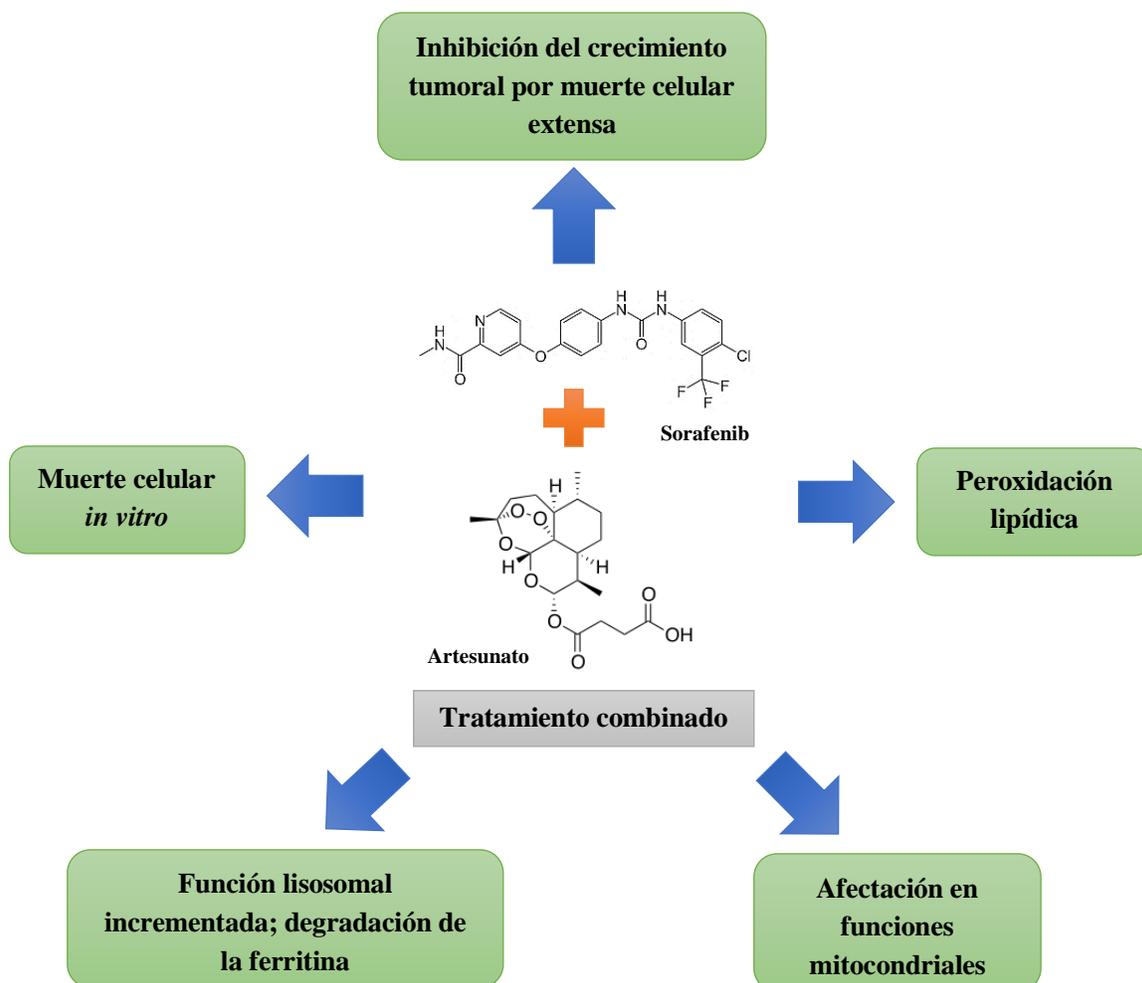


Figura 16. Efectos del tratamiento combinado (Sorafenib y Artesunato) demostrados por Z. Li et al (2021).

9.3.1.2 El Haloperidol (un antagonista del receptor sigma 1) promueve la ferroptosis inducida por Sorafenib en células de hepatocarcinoma

El receptor sigma 1 es un modulador de proteínas que está involucrado en el metabolismo del estrés oxidativo, se encuentra localizado en el retículo endoplásmico, la membrana mitocondrial, la membrana plasmática y la envoltura nuclear. Este receptor es encontrado en

muchos tejidos en humanos, ratas y ratones incluyendo el hígado en donde se encuentra abundantemente, pero su expresión está generalmente concentrada en el sistema nervioso central. Varias clases de fármacos psicotrópicos al receptor sigma 1, incluido el Haloperidol, tienen una alta afinidad hacia el mismo. El Haloperidol es un antagonista del receptor sigma 1 y, se ha reportado que los antagonistas de este receptor disminuyen la supervivencia de células tumorales (Bai et al., 2017).

El investigador Tao Bai y sus colaboradores identificaron que el Haloperidol promueve la ferroptosis inducida por Sorafenib en células de hepatocarcinoma (**Figura 17**) (Bai et al., 2017). Para ello, demostraron que:

1. El Haloperidol tiene la capacidad de promover la muerte celular inducida por Sorafenib; se determinó la viabilidad celular en líneas celulares HepG2 y Huh7 después de los tratamientos aplicados: el primero con Sorafenib en ausencia de Haloperidol y, el segundo con Sorafenib y Haloperidol. El Haloperidol promovió la muerte celular inducida por Sorafenib de manera dependiente de la dosis y el tiempo en ambas líneas celulares.
2. El Haloperidol promueve ferroptosis, pero no apoptosis ni necroptosis; la muerte celular inducida por Sorafenib y promovida por Haloperidol fue inhibida por la Fer-1 (un fuerte inhibidor de la ferroptosis), en cambio al usar ZVAD-FMK (un fuerte inhibidor de la apoptosis) y necrosulfonamida (un fuerte inhibidor de la necroptosis) no hubo un efecto significativo.
3. El Haloperidol acelera la acumulación de hierro y la peroxidación lipídica, además de facilitar la disminución de GSH; el tratamiento combinado (Sorafenib-Haloperidol) incrementó los niveles de malondialdehído (MDA), producto final de la peroxidación lipídica, y Fe^{2+} en comparación con el tratamiento en el que se utilizó únicamente Sorafenib. Fe^{2+} participa en la reacción de Fenton, la cual produce ROS. La acumulación de Fe^{2+} y productos resultantes de la peroxidación lipídica promueve la ferroptosis inducida por Sorafenib. También, el tratamiento combinado aceleró la disminución de GSH provocada por Sorafenib.

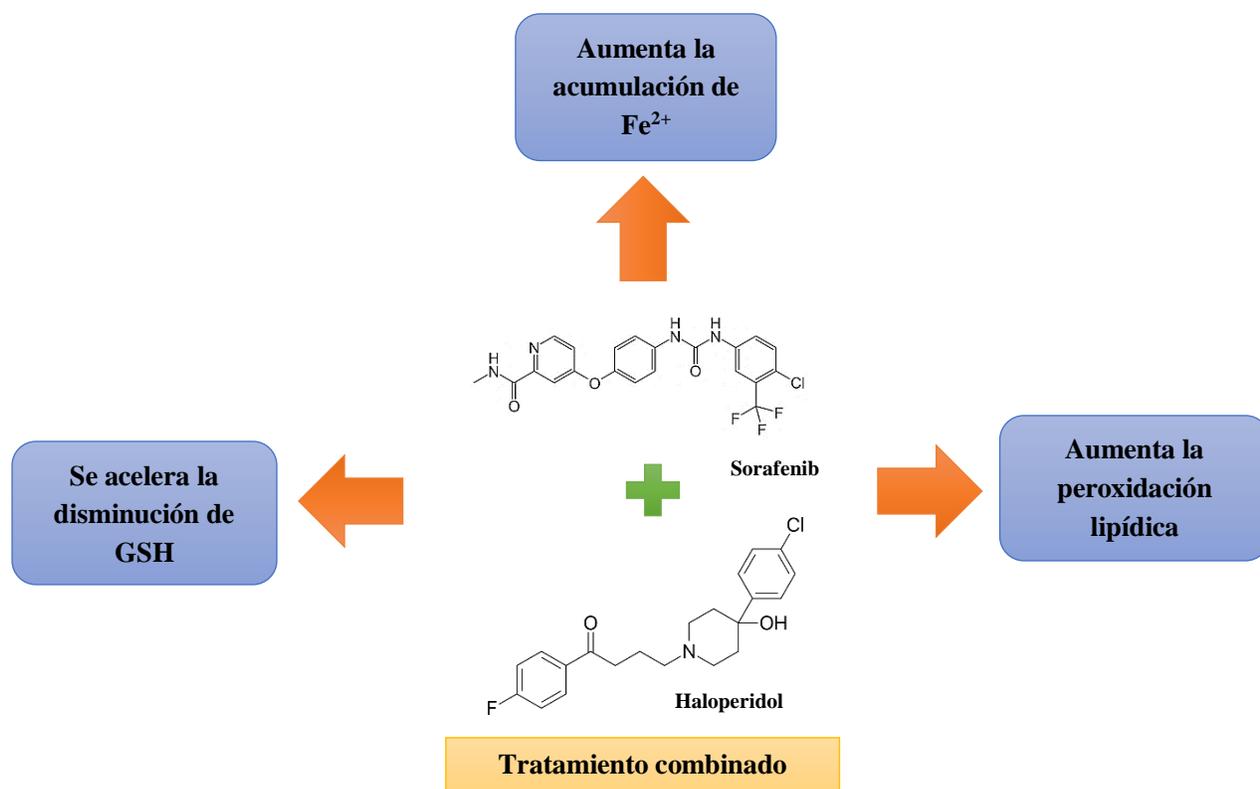


Figura 17. Factores que promueven la ferroptosis en el tratamiento combinado Sorafenib-Haloperidol.

9.3.1.3 La disminución de la expresión de MT-1G mejora la actividad anticancerígena del Sorafenib en células de hepatocarcinoma

La metalotioneinas (MTs) son proteínas de bajo peso molecular ricas en cisteína, las cuales son altamente inducidas en respuesta a diferentes estresores ambientales incluyendo iones metálicos, citocinas y radicales libres. Estas proteínas juegan un rol crítico en la desintoxicación de metales pesados y defensa antioxidante. En los mamíferos existen 4 miembros principales: MT-1, MT-2, MT-3 y MT-4. MT-1 y MT-2, se expresan en varios tejidos, incluyendo el hígado, mientras que MT-3 y MT-4 se expresan principalmente en el tejido cerebral y en las células epiteliales escamosas respectivamente. Aunque las proteínas MT-2, MT-3 y MT-4 están codificadas por un sólo gen, la proteína MT-1 consta de varios subtipos codificados por un conjunto de genes. Los genes *MT-1* activos son ocho: *MT-1A*, *MT-1B*, *MT-1E*, *MT-1F*, *MT-1G*, *MT-1H*, *MT-1M* y *MT-1X*. A estos se añaden cinco pseudogenes que no están expresados en humanos (*MT-1C*, *MT-1D*, *MT-1J* y *MT-1L*). Existe

evidencia que indica que la expresión de MT es un factor pronóstico para la progresión tumoral y la resistencia a fármacos en una gran variedad de neoplasias (X. Sun et al., 2016).

El investigador Xiaofang Sun y sus colaboradores demostraron que la disminución de la expresión de *MT-IG* *in vitro* e *in vivo* mejora la actividad anticancerígena del Sorafenib en células de hepatocarcinoma (**Figura 18**) (X. Sun et al., 2016). Para ello, determinaron que:

1. La disminución de la expresión de *MT-IG* mejora la sensibilidad al Sorafenib; se utilizaron células Huh7 y HepG2 en las que se disminuyó la expresión de *MT-IG* lo que notablemente mejoró la ferroptosis inducida por Sorafenib. Además, la disminución de la expresión de este gen inhibió la proliferación de las células de hepatocarcinoma a largo plazo después de haber sido aplicado el tratamiento con Sorafenib.
2. *MT-IG* es un regulador negativo de la ferroptosis en células de hepatocarcinoma; se trataron células de hepatocarcinoma con la expresión del gen *MT-IG* disminuida utilizando varios inhibidores de muerte celular. Los inhibidores de la ferroptosis (Fer-1 y liproxstatina-1) restablecieron la viabilidad celular después del tratamiento con Sorafenib, en cambio, ZVAD-FMK (inhibidor de la apoptosis) y necrosulfonamida (inhibidor de la necroptosis) no tuvieron influencia en la muerte celular inducida por Sorafenib. Además, se observó que los productos de finales de la peroxidación lipídica como el MDA se incrementaron después del tratamiento con Sorafenib en células en las que la expresión de *MT-IG* estaba reducida. Sin embargo, los niveles de Fe^{2+} no se vieron afectados en estas células después del tratamiento con Sorafenib, tampoco se detectó alguna afectación en los niveles de mRNA de genes encargados del metabolismo del hierro. Esto sugiere que *MT-IG* inhibe la ferroptosis modulando la peroxidación lipídica pero no la producción o el metabolismo de Fe^{2+} . Los niveles de GSH también se vieron afectados por la disminución de la expresión de *MT-IG*; el GSH intracelular disminuyó más después del tratamiento con Sorafenib.
3. La disminución de la expresión de *MT-IG* mejora el efecto anticancerígeno del Sorafenib *in vivo*; se implantaron células Huh7 con la expresión de *MT-IG* disminuida en ratones *nude*, después de algunos días fueron tratados con Sorafenib.

Se observó que el tratamiento con Sorafenib redujo el tamaño de los tumores de manera importante en comparación con el grupo control.

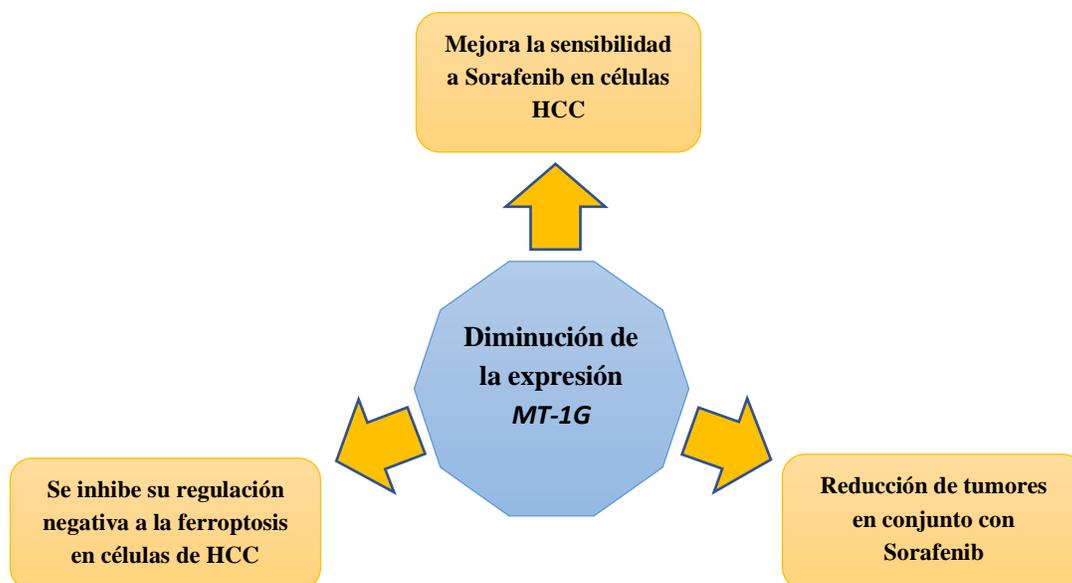


Figura 18. Efecto de la disminución de la expresión de *MT-1G* en la ferroptosis inducida por Sorafenib.

9.3.1.4 La sobreexpresión de Quiescina sulfidril oxidasa 1 (QSOX1) promueve la ferroptosis inducida por Sorafenib en células de hepatocarcinoma

La quiescina sulfidril oxidasa 1 (QSOX1) es una enzima que cataliza la oxidación de tioles durante el plegamiento de las proteínas reduciendo el oxígeno a peróxido de hidrógeno como subproducto. QSOX1 participa en la formación de enlaces disulfuro en varias proteínas y también está involucrada en varios procesos relacionados con el cáncer como la autofagia y la modulación de la matriz extracelular. QSOX1 se localiza principalmente en el aparato de Golgi y en las vesículas intracelulares. Se ha identificado a QSOX1 como un supresor de tumor en hepatocarcinoma. NRF2 es un factor transcripcional que regula genes cuyos productos proteínicos ayudan a controlar importantes procesos biológicos ligados a la reducción de ROS y la defensa contra el estrés oxidativo (Sun et al., 2021).

El investigador Jialei Sun y sus colaboradores demostraron que QSOX1 potencia la ferroptosis inducida por Sorafenib por la inhibición de NRF2 *in vitro* e *in vivo* (**Figura 19**) (Sun et al., 2021). Para ello, determinaron que:

1. QSOX1 promueve la ferroptosis inducida por Sorafenib regulando a la baja NRF2 en células de hepatocarcinoma; después del tratamiento con Sorafenib se observó que la sobreexpresión de QSOX1 resultó en un incremento en la muerte celular o una reducida viabilidad en células MHCC97H, mientras que su inhibición resultó en una menor muerte celular o un incremento en la viabilidad en células Hep3B. Para investigar el tipo de muerte celular asociada con el incremento de la expresión de QSOX1 y el tratamiento con Sorafenib, se evaluó el efecto de la Fer-1 y la DFO (inhibidores de la ferroptosis), así como de ZVAD-FMK (inhibidor de la apoptosis) y necrosulfonamida (inhibidor de la necroptosis). Sólo los inhibidores de la ferroptosis fueron capaces de proteger a las células de la muerte celular inducida por Sorafenib. Esto confirmó que el Sorafenib causa muerte celular por ferroptosis en células de hepatocarcinoma y que QSOX1 mejora el efecto anticancerígeno del mismo mediante la regulación de la ferroptosis. Además, se demostró que la sobreexpresión de QSOX1 promueve la ferroptosis inducida por Sorafenib mediante la regulación a la baja de NRF2 ya que la sobreexpresión de QSOX1 resultó en una mayor disminución de los niveles de GSH los cuales fueron restablecidos por SFN (activador de NRF2). Además, la disminución de la expresión de QSOX1 bloqueó parcialmente el decremento de GSH resultado del tratamiento con Sorafenib en células Hep3B. La reversión de este efecto se dio ante el uso de AT (un inhibidor de NRF2). También, se observó que QSOX1 coopera con el Sorafenib para regular la producción de Fe^{2+} , pero no lo hace sin Sorafenib (la sobreexpresión de QSOX1 junto con Sorafenib incrementa los niveles de Fe^{2+} en comparación con el tratamiento sólo con Sorafenib y, la disminución de la expresión los disminuye). La sobreexpresión de QSOX1 incrementa la peroxidación lipídica inducida por Sorafenib mientras que la disminución frena su incremento.
2. QSOX1 mejora la actividad anticancerígena del Sorafenib *in vivo* mediante la potenciación de la ferroptosis; se utilizaron modelos de xenoinjerto ortotópico en los que el tumor formado por células MHCC97H con sobreexpresión de QSOX1, las cuales presentaron niveles de expresión de NRF2 atenuados. El tratamiento con Sorafenib condujo a la reducción en la expresión de NRF2 en el mismo tipo de células (con QSOX1 sobreexpresada). Asimismo, el tratamiento con Sorafenib resultó en el

incremento tanto del producto de peroxidación lipídica conocido como 4-hidroxinonenal (4-HNE) como de los niveles de expresión de TFRC (que son marcadores de la ferroptosis) en los tumores generados por células MHCC97H con sobreexpresión de QSOX1.

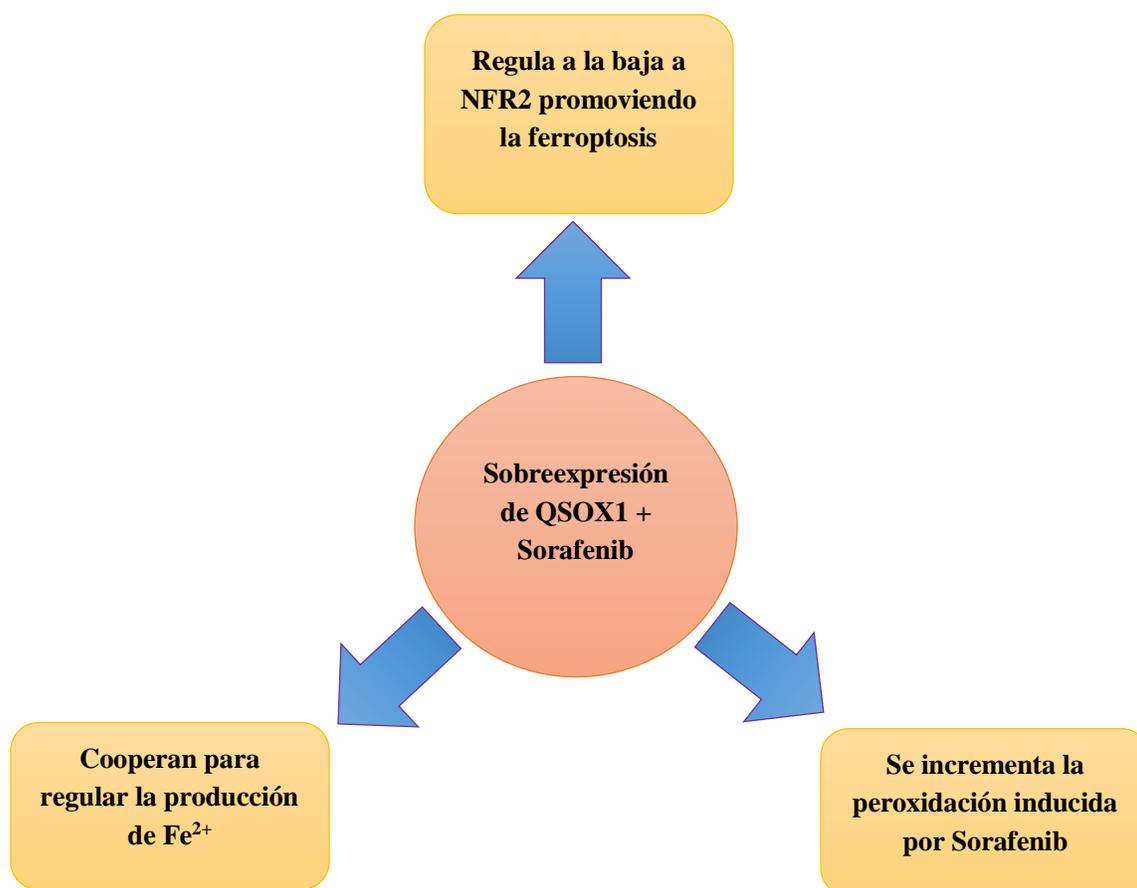


Figura 19. Efectos de la sobreexpresión de QSOX1 en la ferroptosis inducida Sorafenib.

9.3.1.5 La Trigonelina promueve la ferroptosis inducida por Sorafenib en células de hepatocarcinoma

La Trigonelina es un alcaloide que se encuentra presente en cantidades considerables en el café y es el ingrediente farmacológico primario de la *Trigonella foenum-graecum L.* (fenogreco), se presenta de manera abundante en las semillas de esta planta. Se ha reportado que la Trigonelina actúa en NRF2 (lo inhibe) y puede ser usada en una terapia combinada para cáncer de hígado (X. Sun et al., 2016; J. Yu & Wang, 2021).

El investigador Xiaofan Sun y sus colaboradores demostraron que la inhibición de NRF2 por el alcaloide Trigonelina mejora la actividad anticancerígena del Sorafenib *in vitro* e *in vivo* (**Figura 20**). Para ello, se utilizaron células HepG2 y Hepa1-6, en las que se observó que el uso de Trigonelina en conjunto con Sorafenib inhibe la proliferación celular. El alcaloide Trigonelina también mejoró la actividad anticancerígena del Sorafenib en modelos de xenoinjerto subcutáneo disminuyendo el tamaño del tumor. Estos resultados indican que la inhibición de NRF2 ocasiona que las células de hepatocarcinoma sean más sensibles a Sorafenib, demostrando que NRF2 juega un papel crítico en la ferroptosis (X. Sun et al., 2016).

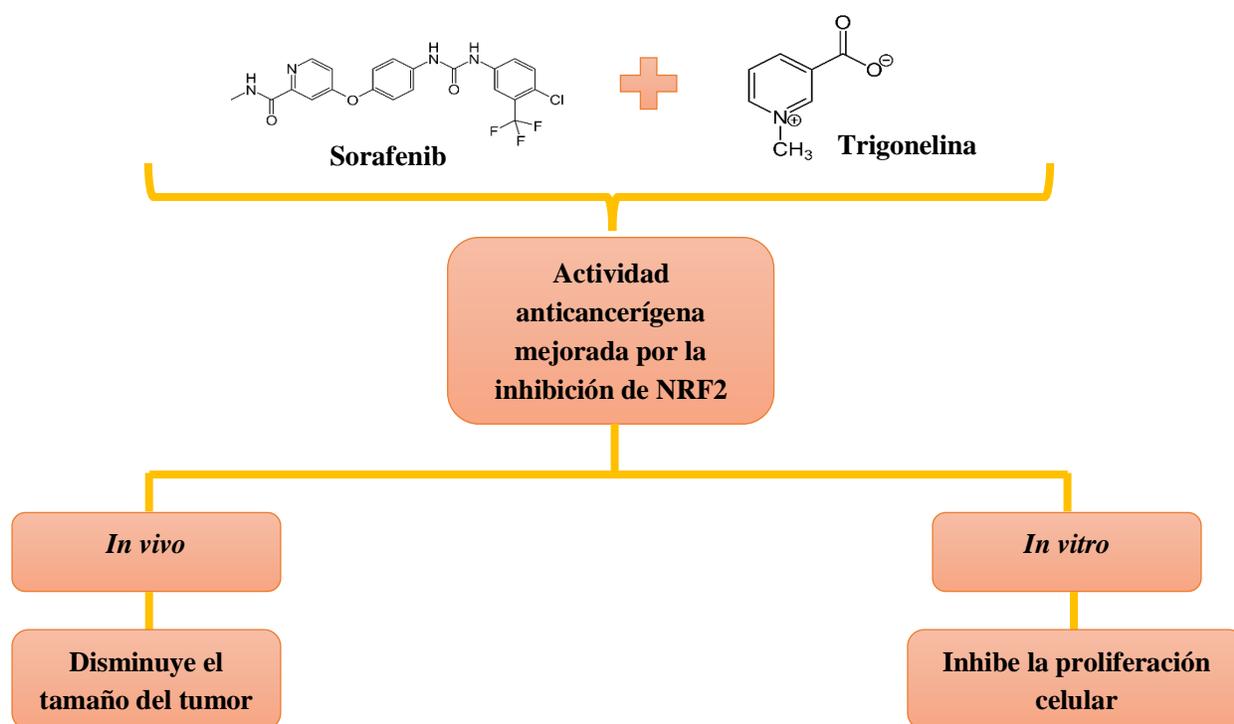


Figura 20. Efectos de la combinación Sorafenib-Trigonelina.

9.3.1.6 Efecto sinérgico anticancerígeno del Sorafenib en combinación con la disminución de GSH en células de hepatocarcinoma

Mantener los niveles de GSH, el antioxidante más abundante en células de mamífero, es esencial para el balance redox y la supervivencia de la célula. El investigador Yanchun Li y sus colaboradores disminuyeron los niveles de GSH de dos maneras: mediante la privación de cisteína en el medio y mediante el tratamiento con un inhibidor específico e irreversible de la cistationina-gamma-liasa (CSE). Después, se aplicó el tratamiento con Sorafenib. Para el medio privado de cisteína se observó que la capacidad antiproliferativa del Sorafenib fue

mejorada (**Figura 21**). La inhibición de la CSE por DL-propargil-glicina exacerbó el inicio de la ferroptosis y la formación de peróxidos lipídicos. Esta perspectiva puede ser usada para el desarrollo de nuevas terapias combinadas con Sorafenib para tratar el hepatocarcinoma avanzado (Y. Li et al., 2021).

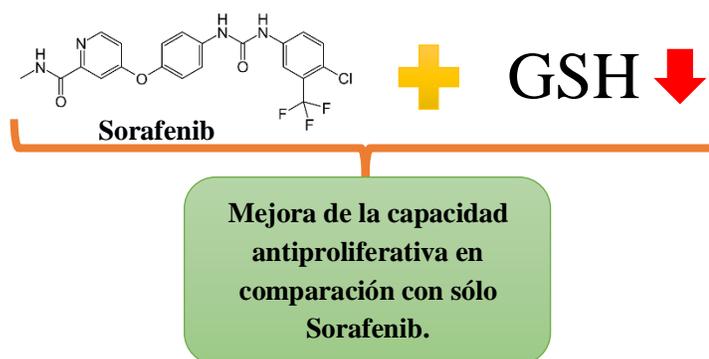


Figura 21. Efecto de la disminución de GSH en conjunto con el tratamiento de Sorafenib.

9.3.1.7 La disminución de la expresión de DAZAP1 promueve la ferroptosis inducida por Sorafenib en células de hepatocarcinoma

La Proteína 1 Asociada a la Deletada en Azoospermia (DAZAP1) es una proteína de unión a RNA (RBP) involucrada no sólo en la espermatogénesis, también se ve involucrada en el crecimiento y el desarrollo normal en mamíferos. Al ser una RBP, DAZAP1 tiene un papel clave en las modificaciones post-transcripcionales; como el *splicing* alternativo y el transporte nucleocitoplasmático. Las funciones y los mecanismos exactos de DAZAP1 en enfermedades malignas humanas permanecen desconocidos. El investigador Wang Qi y sus colaboradores realizaron un estudio en el que demostró que DAZAP1 es un regulador de la proliferación, invasión y migración en hepatocarcinoma (Q. Wang et al., 2021).

El mismo investigador y su equipo determinaron que la disminución de la expresión de DAZAP1 promueve la ferroptosis inducida por Sorafenib en células de hepatocarcinoma (**Figura 22**) (Q. Wang et al., 2021). Para ello, demostraron que:

1. La inhibición de la proliferación de células de hepatocarcinoma producida por Sorafenib es mayor en células en las que se disminuyó la expresión de DAZAP1; al someter a células HepG2 y Hep3B a concentraciones crecientes de Sorafenib se observó que la inhibición de la proliferación celular aumentaba con la concentración.

Esta inhibición se vio mejorada en células en las que se disminuyó la expresión de DAZAP1.

2. La disminución de la expresión de DAZAP1 regula a la baja la expresión de SLC7A11 y GPX4 en células de hepatocarcinoma tratadas con Sorafenib; para demostrar esto se utilizaron células HepG2 y Hep3B en las cuales se disminuyó la expresión de DAZAP1. Éstas fueron tratadas con Sorafenib y, se les determinó la expresión relativa de SLC7A11 y GPX4, la cual resultó disminuida.
3. La disminución de la expresión de DAZAP1 promueve la ferroptosis producida por Sorafenib *in vivo*; para esto, ratones *nude* fueron inoculados subcutáneamente con células HepG2 en las cuales la expresión de DAZAP1 fue disminuida y, fueron tratados con Sorafenib, después de 28 días se demostró que el volumen promedio del tumor en estos ratones disminuyó en comparación con el grupo control. Además, a algunos de los tumores se les determinó la expresión relativa de SLC7A11 y GPX4. Tanto la expresión de SLC7A11 como de GPX4 resultó reducida de forma importante lo que demuestra que la reducción de la expresión de DAZAP1 mejora el efecto terapéutico del Sorafenib al reducir la expresión de SLC7A11 y GPX4.

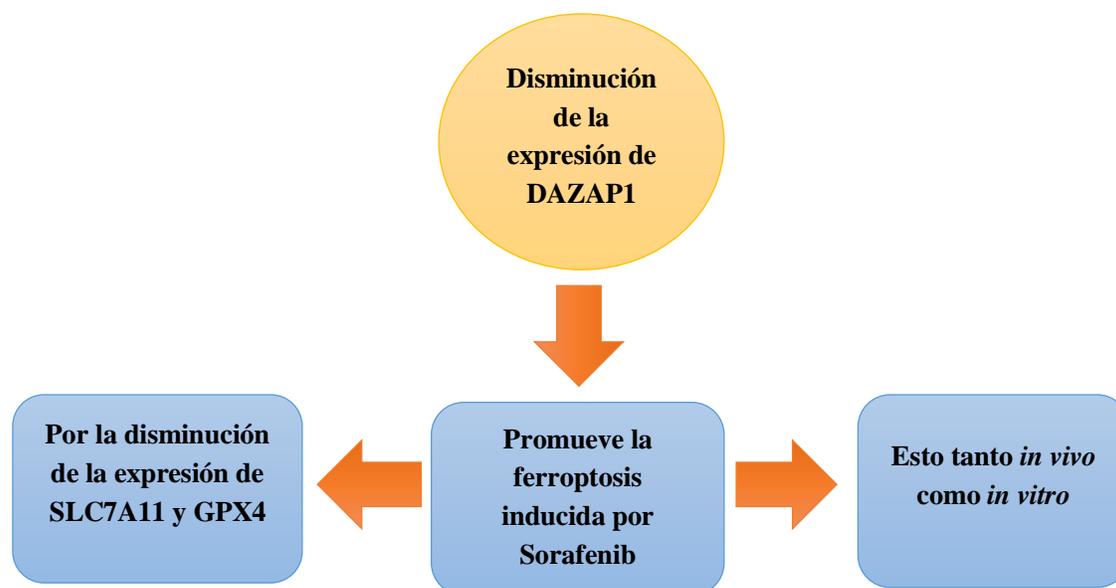


Figura 22. Efecto de la disminución de la expresión de DAZAP1 en la ferroptosis producida por Sorafenib.

9.3.1.8 Glutación S-transferasa Zeta 1 (GSTZ1) sensibiliza a las células de hepatocarcinoma a la ferroptosis inducida por Sorafenib

Las Glutación S-transferasas (GSTs) son una clase de enzimas que catalizan la conjugación de glutatión (GSH) a compuestos electrofílicos endógenos o exógenos. La GSTZ1 es un miembro importante de las GSTs, la cual participa en el catabolismo de fenilalanina/tirosina y cataliza la isomerización de maleilacetoacetato a fumarilacetoacetato. Se ha determinado que en el hepatocarcinoma se presenta una expresión pobre de *GSTZ1* (Wang et al., 2021).

El investigador Qiuji Wang y sus colaboradores determinaron que la sobreexpresión de *GSTZ1* promueve la ferroptosis inducida por Sorafenib (**Figura 23**) (Wang et al., 2021). Para ello, demostraron que:

1. La supresión de *GSTZ1* promueve la resistencia a Sorafenib en células de hepatocarcinoma; se suprimió *GSTZ1* en células HepG2 y SNU449 lo que disminuyó su sensibilidad al Sorafenib y su efecto inhibidor de la proliferación.
2. La sobreexpresión de *GSTZ1* mejora la ferroptosis inducida por Sorafenib en células de hepatocarcinoma; al sobreexpresar *GSTZ1* en células HepG2 y SNU449 aumentó su sensibilidad al Sorafenib. Además, se midieron los niveles de ROS, hierro y peroxidación lipídica, los cuales son la principal causa de ferroptosis; la

sobreexpresión de *GSTZ1* aumentó los niveles de ROS, hierro y malondialdehído (MDA). Este último, es uno de los principales productos finales de la peroxidación lipídica.

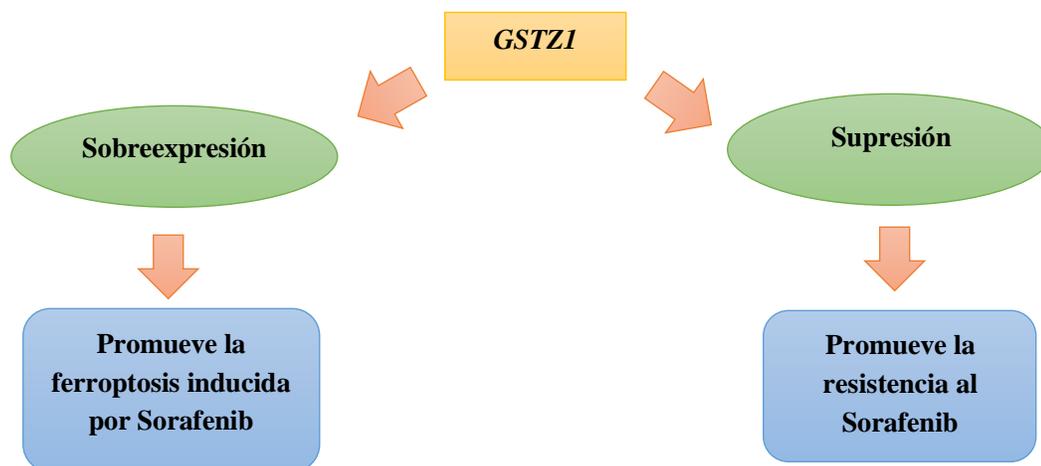


Figura 23. Efecto de la sobreexpresión y la supresión de *GSTZ1* en células de hepatocarcinoma tratadas con Sorafenib.

9.3.1.9 El tratamiento combinado de RSL3, hierro y Sorafenib incrementa la susceptibilidad a la ferroptosis de células de hepatocarcinoma

RSL3 disminuye la actividad enzimática de GPX4 por lo que puede ser utilizado en la terapia contra el cáncer. La investigadora Michela Asperti y sus colaboradores administraron hierro, RSL3 y Sorafenib en conjunto para determinar si la sensibilidad de las células de hepatocarcinoma a la ferroptosis se veía aumentada (**Figura 24**). Para ello, utilizaron células HepG2 y HA22T/VGH, éstas fueron tratadas con Sorafenib, RSL3 y citrato de amonio férrico (FAC). El tratamiento sólo con Sorafenib tuvo poco efecto, sin embargo, el tratamiento con Sorafenib y RSL3 tuvo un mayor efecto; la viabilidad de las células se vio reducida (A 24h, 60% en HepG2 y 20% en HA22T/VGH y, a 72h, 80% en HepG2 y 60% en HA22T/VGH), pero el tratamiento con Sorafenib, RSL3 y FAC potenció aún más el efecto, es decir, provocó una mayor pérdida de viabilidad celular (A 24h, 70% en HepG2 y 60% en HA22T/VGH y, a 72h, 90% en HepG2 y 80% en HA22T/VGH). La combinación entre RSL3 y FAC también fue efectiva en ambas líneas celulares con un importante incremento en la muerte celular comparado con el tratamiento individual. Además, se observó que todos los tratamientos aumentaron la formación de ROS lipídicas. Estos resultados demuestran la eficacia del triple tratamiento y que la muerte celular se produjo mediante ferroptosis (Asperti et al., 2021).

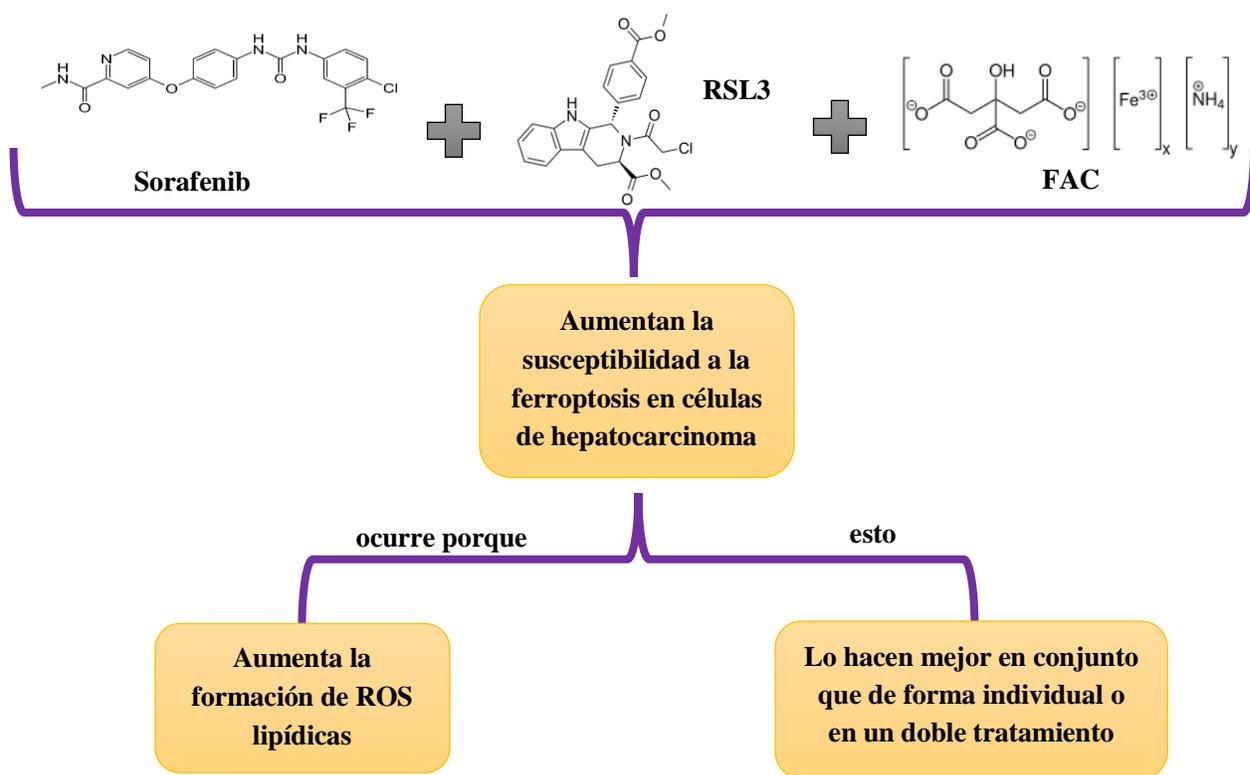


Figura 24. El tratamiento combinado con RSL3, FAC (hierro) y Sorafenib hacen más susceptibles a las células de hepatocarcinoma a la muerte celular por ferroptosis.

9.3.1.10 La disminución de la expresión de ABCC5 promueve la ferroptosis inducida por Sorafenib en células de hepatocarcinoma

ABCC5 es un miembro de la familia de transportadores ABC que regula la salida de metabolitos endógenos, toxinas, iones intracelulares y fármacos. Aunque ha surgido evidencia de que la expresión de ABCC5 es un factor pronóstico para la progresión tumoral y la resistencia a fármacos, el papel de ABCC5 en la actividad anticancerígena del Sorafenib en células de hepatocarcinoma permanece desconocida (W. Huang et al., 2021).

El investigador Wenbin Huang y sus colaboradores identificaron a ABCC5 como nuevo regulador crítico de la ferroptosis, así como blanco terapéutico prometedor para la resistencia adquirida a Sorafenib en células de hepatocarcinoma humano (**Figura 25**) (W. Huang et al., 2021). Para ello, determinaron que:

1. El Sorafenib induce la expresión de ABCC5 en células de hepatocarcinoma humano; se utilizaron células Huh7 que fueron tratadas con Sorafenib por 24 h, para posteriormente determinar los niveles de mRNA de la familia ABCC, se observó que

los niveles más altos de expresión se presentaron para ABCC1, ABCC3 y ABCC5. Asimismo, se determinó la expresión de proteína para ABCC1, ABCC3 y ABCC5, observándose que ABCC5 tuvo un mayor aumento en la expresión con respecto a ABCC1 y ABCC3 después del tratamiento con Sorafenib.

2. ABCC5 está involucrada en la resistencia al Sorafenib; se observó que al sobreexpresar ABCC5 en células Huh7 se inhibió la citotoxicidad inducida por Sorafenib y se vio mejorada al utilizar un inhibidor de ABCC5 (MK571). También, se observó que la disminución de la expresión de ABCC5 en células Sk-Hep-1 intensificó la citotoxicidad inducida por Sorafenib.
3. ABCC5 es un regulador negativo de la ferroptosis al tener efecto sobre SLC7A11; se observó que al sobreexpresar ABCC5 en células Huh7 la peroxidación lipídica causada por Sorafenib se vio aminorada y viceversa. Además, la disminución de la expresión de ABCC5 también provocó que la expresión de la proteína SLC7A11 disminuyera en células Huh7-SR.

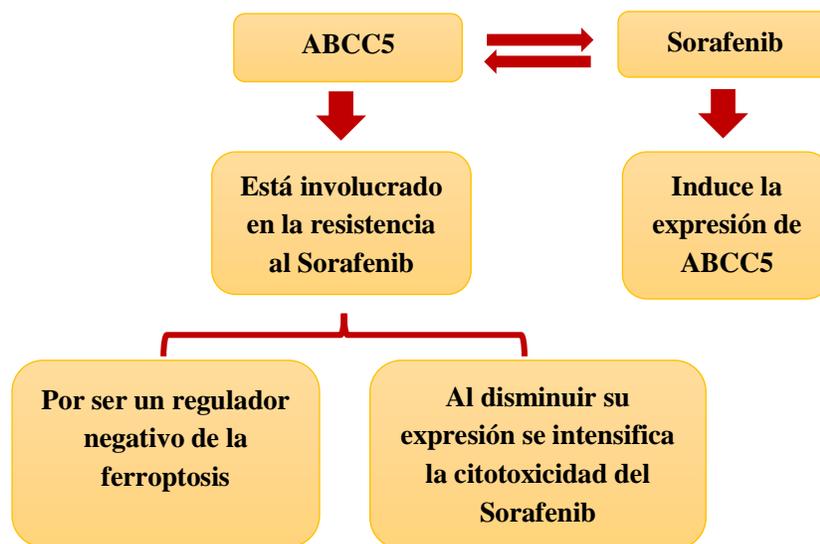


Figura 25. ABCC5 como nuevo blanco para combatir la resistencia a Sorafenib en células de hepatocarcinoma.

9.3.2 Estrategias terapéuticas potenciales que no involucran al Sorafenib ni el uso de nanopartículas

9.3.2.1 La Solasonina promueve la ferroptosis en células de hepatocarcinoma e inhibe su migración

Los productos naturales son fuentes importantes para el descubrimiento de fármacos anticancerígenos con efectos secundarios leves. Los principales glicoalcaloides de *Solanum*

melongena: Solamargina y Solasonina, poseen varios beneficios farmacológicos como actividad prooxidante, inhibición de infecciones provocadas por hongos, además de que promueven la neurogénesis. Se ha encontrado que la Solasonina posee actividad anticancerígena en células de cáncer colorrectal y de pulmón. Sin embargo, su eficacia para el tratamiento del hepatocarcinoma es poco conocida (Jin et al., 2020).

El investigador Mingming Jin y sus colaboradores determinaron que la Solasonina promueve ferroptosis en células de hepatocarcinoma e inhibe la migración de las mismas (**Figura 26**) (Jin et al., 2020). Para ello, demostraron lo siguiente:

1. El tratamiento con Solasonina inhibe la proliferación de células de hepatocarcinoma *in vitro* e *in vivo*; para evaluar el efecto *in vitro* se utilizaron células HepG2 y HepRG las cuales fueron tratadas con Solasonina por 24 horas, como resultado de esto se inhibió la capacidad proliferativa de las células de forma dependiente de la dosis. Para demostrar el efecto *in vivo*, se utilizó un modelo de xenoinjerto de ratón de formación de tumor HepG2 en el cual la Solasonina disminuyó el peso y el volumen del tumor comparado con los controles que no fueron tratados.
2. El tratamiento con Solasonina inhibe la migración de las células de hepatocarcinoma; para caracterizar la eficacia de la Solasonina contra la metástasis en el hepatocarcinoma, células HepG2 y HepRG fueron sometidas a un ensayo de Transwell y a un ensayo de cicatrización de heridas. En el primero, se observó que el tratamiento con Solasonina inhibió la migración de las células de hepatocarcinoma. En el segundo, los resultados mostraron que el tratamiento con Solasonina no permitió que se cerrara la herida. Los resultados de estos dos ensayos demostraron que la Solasonina inhibió la capacidad invasiva de las células de hepatocarcinoma.
3. El tratamiento con Solasonina promueve la ferroptosis en células de hepatocarcinoma; se observó que la expresión de las enzimas glutatión sintetasa (GSS) y GPX4 disminuyó después del tratamiento con Solasonina tanto a nivel mRNA como a nivel proteína. Además, el tratamiento con Solasonina incrementó los niveles de ROS lipídicos, mientras que el tratamiento conjunto con DFO o con Fer-1 (inhibidor de la ferroptosis) impidió la muerte celular inducida por Solasonina mediante la disminución de la producción de ROS.

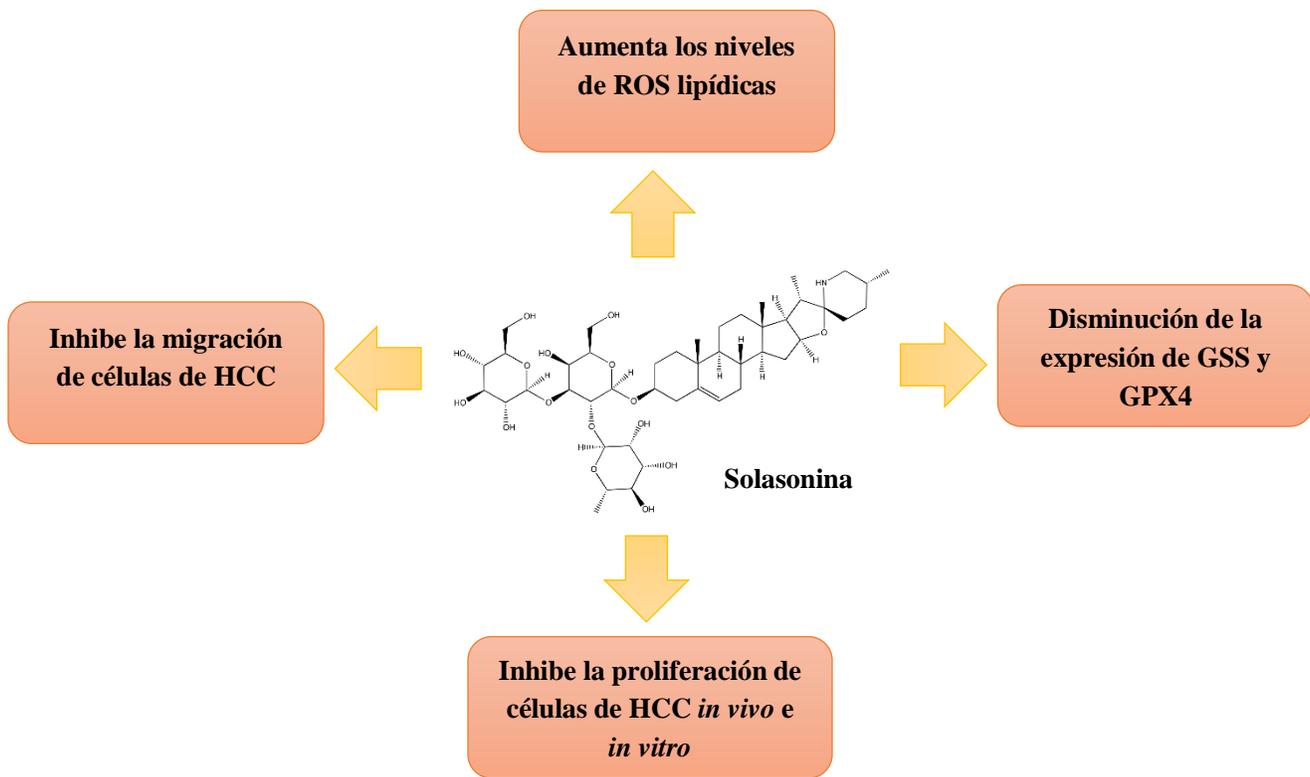


Figura 26. Efectos del tratamiento con Solasonina en las células de hepatocarcinoma.

9.3.2.2 BSO en combinación con Auranofín o con Erastina induce muerte por ferroptosis a células de hepatocarcinoma

BSO y Erastina son inductores de clase 1 (inducen la disminución del GSH). El primero, bloquea la síntesis de GSH y el segundo, inhibe el sistema Xc^- . El sistema tiorredoxina (Trx) es esencial para la homeostasis redox, ya que protege al DNA del daño asociado al estrés oxidativo y de la peroxidación lipídica. Auranofín es un complejo de oro usado en la terapia antirreumática, el cual puede inhibir TrxR-1, una enzima que mantiene el suministro de antioxidante Trx (Lippmann et al., 2020).

La investigadora Jana Lippmann y sus colaboradores demostraron que los tratamientos Auranofín/BSO y Erastina/BSO actúan de forma sinérgica conduciendo a la muerte celular por ferroptosis en células de hepatocarcinoma (**Figura 27**) (Lippmann et al., 2020). Para ello, determinó que:

1. Los tratamientos antes mencionados actúan sinérgicamente provocando muerte celular inducida en células de hepatocarcinoma; se utilizaron células Huh7 y HepG2

la cuales se trataron con BSO, Auranofín y Erastina. Se observó que la combinación Auranofín/BSO y Erastina/BSO redujeron la viabilidad celular comparado con el tratamiento individual con los mismos.

2. Fer-1 inhibe la muerte celular inducida por los tratamientos Auranofín/BSO y Erastina/BSO; se trató a las células con el inhibidor de la ferroptosis, Fer-1, así como con los tratamientos combinados antes mencionados. Se observó que Fer-1 disminuyó la muerte celular inducida por ambos tratamientos. Para descartar que el tipo de muerte celular inducida por los tratamientos se tratara de apoptosis, las células también fueron tratadas con ZVAD.FMK (inhibidor de la apoptosis). Se observó que este inhibidor fue incapaz de proveer protección contra la muerte celular inducida por los dos tratamientos combinados.
3. Ambos tratamientos combinados (Auranofín/BSO y Erastina/BSO) incrementan los niveles de NRF2 y OH-1 y, disminuyen los niveles de GXP4; se observó que ambos tratamientos incrementaron los niveles de NRF2, lo cual es consistente con el estrés oxidativo. También, se dio el aumento de OH-1, lo cual se ha reportado que promueve la peroxidación lipídica debido al incremento de los niveles de Fe^{2+} . Además, la expresión de la proteína GXP4 (la cual reduce los hidroperóxidos) resultó disminuida.

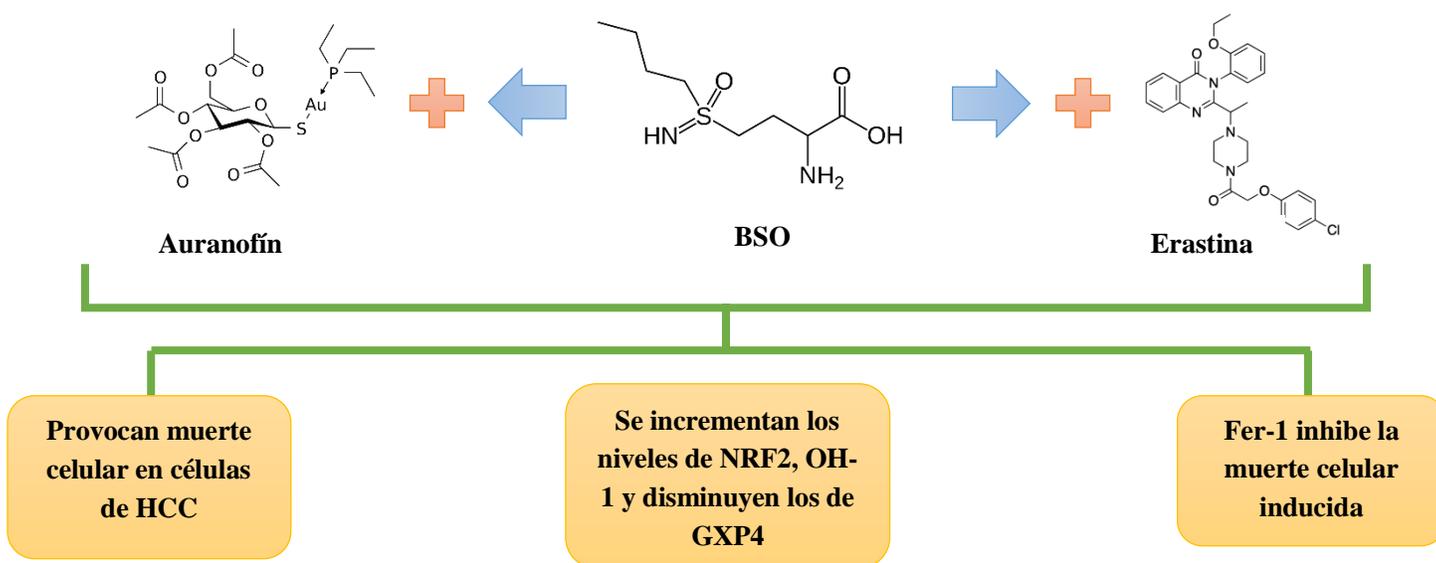


Figura 27. Resultados de ambos tratamientos en células de hepatocarcinoma.

9.3.2.3 La sobreexpresión de la colectrina (CLTRN) aumenta la radiosensibilidad a través de la ferroptosis en células de hepatocarcinoma

La terapia de radiación es uno de los métodos no quirúrgicos para el tratamiento de tumores, sin embargo, posee problemas clínicos como baja efectividad y varios efectos adversos. La terapia de sensibilización genética, la cual consiste en la combinación de terapia genética y terapia de radiación es hacia donde se dirigen las investigaciones. La terapia genética en el hepatocarcinoma puede tener un efecto sinérgico positivo en un tumor, lo que puede conducir a la disminución en la dosis de radiación de la terapia, reduciendo el daño secundario causado por la misma. CLTRN es una glicoproteína transmembranal localizada en la membrana celular que es altamente conservada entre especies. En ratón, la deficiencia de colectrina causa aminoaciduria, la cual involucra tanto aminoácidos neutros como ácidos. Se ha observado que la expresión de CLTRN incrementa después de la terapia con radiación lo que indica que se puede tratar de un blanco terapéutico (Yuan et al., 2021).

El investigador Yin Yuan y sus colaboradores demostraron que la sobreexpresión de CLTRN incrementa la ferroptosis y mejora la radiosensibilidad mediante esa vía (**Figura 28**). Para ello, se utilizaron células HepG2 y SMCC-7721. Las células se dividieron en 3 grupos: control negativo (NC), NC+ radiación ionizante (IR) y clona_CLTRN (sobreexpresión de CLTRN) + IR. Se observó que la radiación por sí sola indujo un incremento en la concentración de iones Fe^{2+} , así como el incremento en los niveles de ROS en los liposomas celulares, sugiriendo que la radiación induce ferroptosis en células de hepatocarcinoma. También, se reveló que, con el tratamiento que sólo involucra radiación, el número de mitocondrias disminuyó, así como el número de crestas mitocondriales, sin embargo, la radiosensibilidad de las células incrementó con la sobreexpresión de CLTRN comparado con el tratamiento utilizando sólo radiación. Además, las células de la clona_CLTRN fueron sometidas a un inhibidor y a un inductor de la ferroptosis. Después del tratamiento con radiación, las ROS en el grupo tratado con el inhibidor disminuyeron, mientras que con el grupo tratado con el inductor incrementaron. También, se observó que los niveles de expresión de GXP4 y SLC7A11 fueron los más bajos en el grupo clona_CLTRN + IR (Yuan et al., 2021).

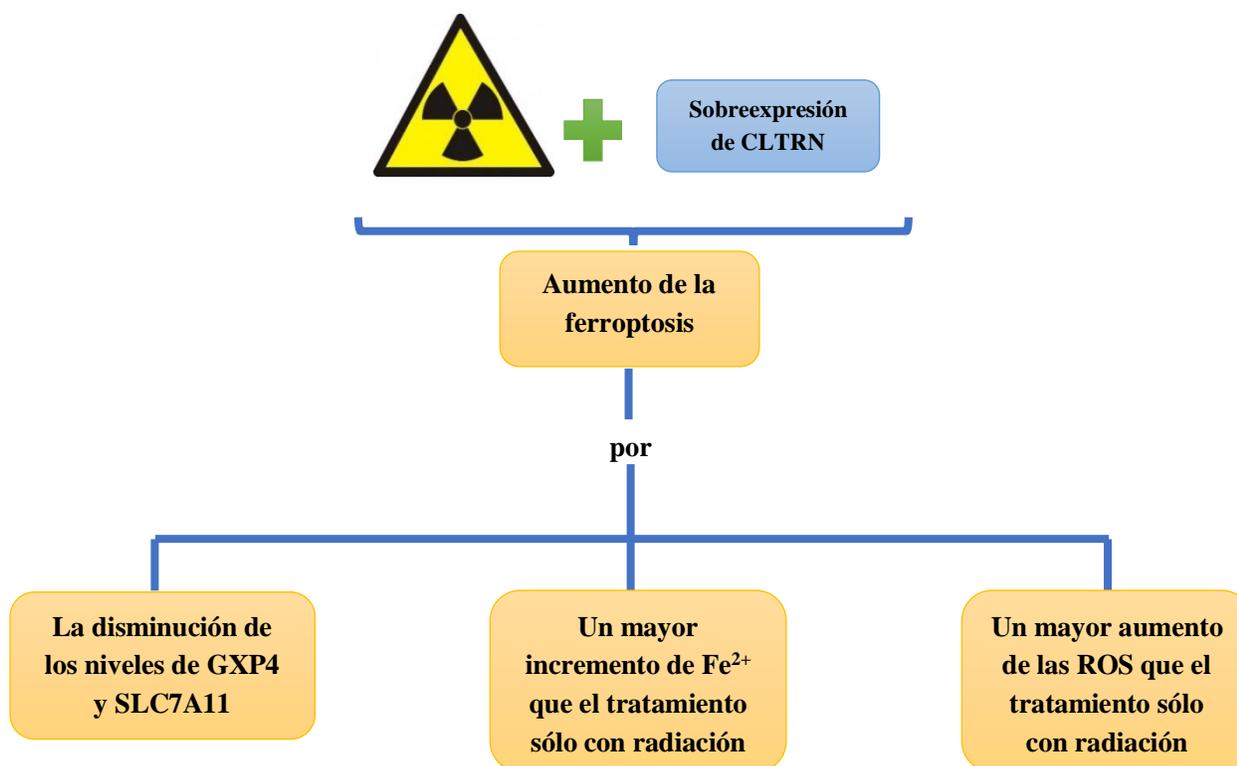


Figura 28. Causas que conducen al aumento de la ferroptosis por la sobreexpresión de CLTRN y el tratamiento con radiación ionizante (IR) en células de hepatocarcinoma.

9.3.2.4 La Formosanina C induce muerte celular por ferroptosis en células de hepatocarcinoma

Aunque los beneficios a la salud de los fitoquímicos han sido adjudicados a sus propiedades antioxidantes, ciertos fitoquímicos también muestran actividad prooxidante y mejoran la eficacia de algunos tratamientos contra el cáncer. El investigador Pin Lun Lin y sus colaboradores identificaron que la Formosanina C (FC) induce ferroptosis en células de hepatocarcinoma (**Figura 29**). Para ello, se utilizaron células Hep3B y HepG2 las cuales fueron tratadas con diferentes fitoquímicos, sin embargo, la FC produjo la mayor citotoxicidad de todos. Para determinar si la ferroptosis estaba involucrada con la disminución de la viabilidad inducida por FC, se les administró en conjunto un inhibidor de la ferroptosis (Fer-1). También, se realizó un tratamiento con Sorafenib para comparar resultados. Se observó que la citotoxicidad inducida por FC fue notablemente inhibida por Fer-1. Además, se identificó que la FC produjo una mayor citotoxicidad comparada con Sorafenib. La FC condujo a la producción de ROS lipídicas el cual es un factor que desencadena la muerte celular por ferroptosis (Lin et al., 2020).

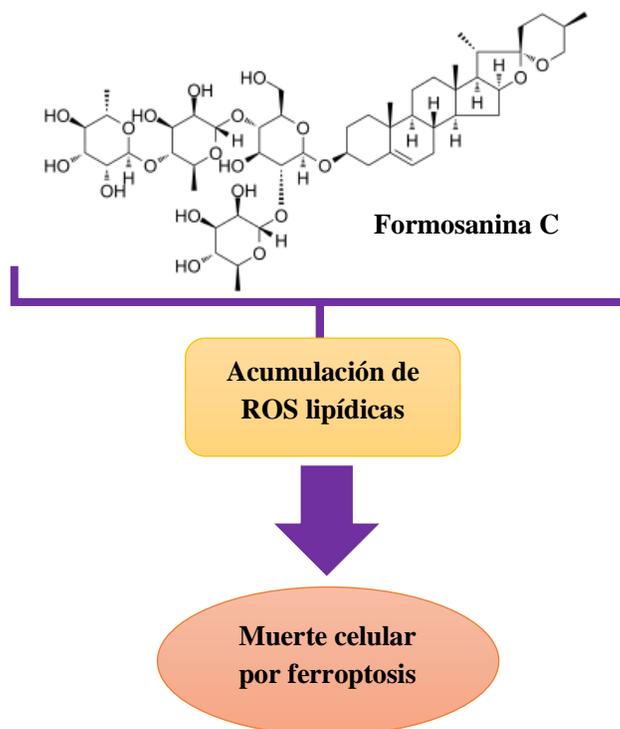


Figura 29. La Formosanina C produce muerte celular por ferroptosis en células de hepatocarcinoma.

9.3.2.5 La disminución de la expresión de ceruloplasmina (CP) promueve la ferroptosis inducida por Erastina y RSL3 en células de hepatocarcinoma

La CP es una proteína que contiene cobre y forma parte de la familia de las multicuprooxidadas. La CP suprime la producción de especies reactivas de oxígeno mediada por Fe^{2+} y es ampliamente aceptada como un agente protector efectivo contra el estrés oxidativo. La CP, la cual juega un papel esencial en la homeostasis del hierro, puede expresarse como un secretado o una proteína de membrana anclada al glicosilfosfatidilinositol (GPI-CP). La CP secretada es sintetizada por el hígado, la cual a su vez es transportada al plasma a través la bilis y, subsecuentemente es tomada por otros tejidos y órganos. Estudios recientes han demostrado que los hepatocitos también expresan la isoforma GPI-CP aparte de la forma secretada (Shang et al., 2020).

El investigador Yuxue Shang y sus colaboradores determinaron que la disminución de la expresión de CP sensibiliza a las células de hepatocarcinoma a la ferroptosis inducida por Erastina y RSL3 (**Figura 30**). Para ello, se utilizaron células HepG2 y Hep3B en las cuales

se disminuyó la expresión de CP, posteriormente fueron tratadas con Erastina y RSL3; se observó que la muerte celular por ferroptosis provocada por Erastina y RSL3 fue promovida por la reducción de CP. La acumulación de hierro y la producción de ROS lipídicas son dos eventos críticos de señalización en la ferroptosis. Debido a lo anterior, se investigó el efecto de CP en los cambios de los niveles de Fe^{2+} encontrándose que los niveles de Fe^{2+} intracelular de las células de hepatocarcinoma con la expresión de CP reducida fueron casi 1.5 veces mayores que en las células control. Esto sugiere que la disminución de la expresión de CP aumenta la acumulación intracelular de hierro inducida por Erastina y RSL3. Además, se demostró que la disminución de la expresión de CP promueve la acumulación de ROS lipídicas inducida por Erastina y RSL3 cerca de 2 veces en células HepG2 y Hep3B. También, la reducción de GSH inducida por Erastina fue mayor al disminuir la expresión de CP (Shang et al., 2020).

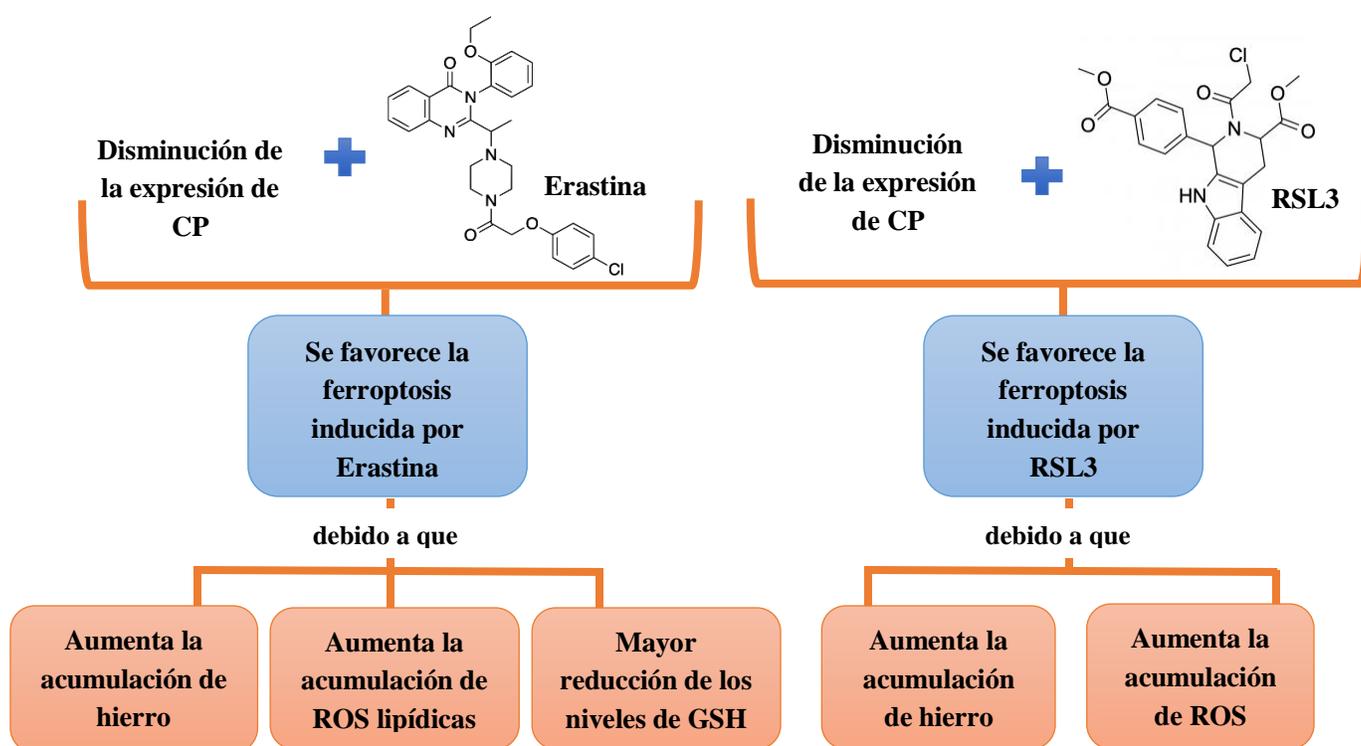


Figura 30. Razones por las que la disminución de la expresión de CP promueve la ferroptosis inducida por RSL3 y Erastina.

9.3.2.6 La inhibición de la proteína nuclear 1 (NUPR1) por ZZW-115 induce ferroptosis en células de hepatocarcinoma

NUPR1 es una proteína inducible por estrés que se activa fuertemente como respuesta a la inducción de la ferroptosis, esta proteína a su vez induce la expresión de lipocalina 2 (LNC2) la cual bloquea la muerte celular por ferroptosis al disminuir la acumulación de hierro. Se ha demostrado que NUPR1 se expresa en la mayoría de los tejidos cancerígenos y, a nivel celular, se ha descrito que NUPR1 participa en varios procesos relacionados con el cáncer incluyendo la regulación del ciclo celular, la apoptosis, la migración y la invasión celular. Además, se ha reportado que la inactivación de NUPR1 detiene el crecimiento de ciertos tipos de cáncer como el hepatocarcinoma (C. Huang et al., 2021).

ZZW-115 es un compuesto relacionado con la trifluoperazina que es capaz de inhibir el crecimiento y provocar la regresión completa del tumor en el hepatocarcinoma. ZZW-115 evita que NUPR1 sea traslocada del citoplasma al núcleo (Huang et al., 2021).

El investigador Can Huang y sus colaboradores demostraron que ZZW-115 induce la acumulación de ROS seguida de la muerte por ferroptosis en células de hepatocarcinoma (**Figura 31**) (C. Huang et al., 2021). Para ello, demostraron que:

1. La muerte celular inducida por ZZW-115 se puede evitar usando Fer-1 y antioxidantes; se utilizaron células HepG2 las cuales fueron expuestas a ZZW-115 en presencia de Fer-1, como resultado de esto, la viabilidad de las células incrementó gracias a la acción del inhibidor de la ferroptosis. Además, para determinar si la acumulación de ROS inducida por ZZW-115 estaba involucrada en la muerte de las células se combinaron diferentes antioxidantes (butilhidroxitolueno, N-acetilcisteína, ácido ascórbico, Trolox y MitoQ) con ZZW-115 y se observó que la viabilidad celular aumentó en todos los casos.
2. ZZW-115 incrementa la peroxidación lipídica; la acumulación de malondialdehído (MDA) se vio incrementada al tratar células de hepatocarcinoma con ZZW-115. El MDA es uno de los productos finales más importantes de la peroxidación lipídica.

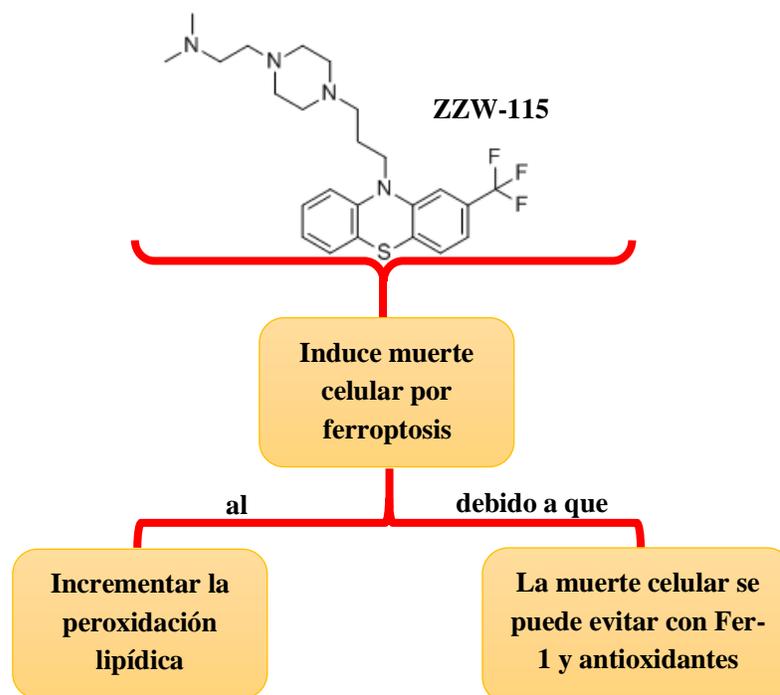


Figura 31. ZZW-115 produce muerte celular por ferroptosis en células de hepatocarcinoma.

9.3.2.7 *Scutellaria barbata* inhibe la tumorigenicidad del hepatocarcinoma al inducir la ferroptosis

La Medicina Tradicional China (TCM) juega un papel activo en el tratamiento del hepatocarcinoma. La TCM ha sido utilizada ampliamente en la prevención de enfermedades; algunos especímenes como *Scutellaria barbata* poseen un efecto preventivo en el hepatocarcinoma (Li et al., 2022).

El investigador Yue Li y sus colaboradores demostraron que *S. barbata* inhibe la proliferación celular y la tumorigenicidad del hepatocarcinoma *in vivo* al inducir la ferroptosis (**Figura 32**) (Li et al., 2022). Para ello, determinaron que:

- 1) *S. barbata* inhibe la proliferación celular de forma dependiente de la dosis; para evaluar el efecto de *S. barbata* en la proliferación se usaron diferentes líneas celulares de hepatocarcinoma (SMMC-7721, HepG2 y Huh7). Los resultados demostraron que la proliferación de las células se vio inhibida por *S. barbata* y que esta inhibición depende de la dosis (al aumentar la dosis el efecto inhibitorio se vio aumentado). Además, el marcador de muerte celular LDH fue detectado y los resultados indicaron

que el tratamiento con *S. barbata* incrementó los niveles de LDH liberada debido a la muerte celular.

- 2) *S. barbata* induce la ferroptosis en células de hepatocarcinoma; se vieron aumentados los niveles de hierro en las células de hepatocarcinoma utilizadas (SMMC-7721, HepG2 y Huh7), así como los niveles de ROS, lo que indica inducción de la ferroptosis.
- 3) *S. barbata* induce ferroptosis a través de genes involucrados en el metabolismo de las ROS lipídicas y la peroxidación de hierro en células de hepatocarcinoma; los niveles de mRNA y de proteína de *GPX4*, *SLC7A11* y *ACSL4* fueron detectados en las líneas celulares de hepatocarcinoma utilizadas (SMMC-7721, HepG2 y Huh7) después del tratamiento con *S. barbata*, viéndose reducidos para *GPX4* y *SLC7A11* y, aumentados para *ACSL4*.
- 4) *S. barbata* inhibe la tumorigenicidad al inducir la ferroptosis en células de hepatocarcinoma *in vivo*; se utilizaron tumores de xenoinjeto en ratones *nude* (con células HepG2 y Huh7), a estos tumores se les midió el volumen, el peso y el tamaño, los resultados mostraron que los tumores que no habían sido expuestos a *S. barbata* eran más grandes y pesados que los que fueron tratados con la misma. Además, se observó que *S. barbata* incrementó la concentración de hierro en los tumores de forma importante.

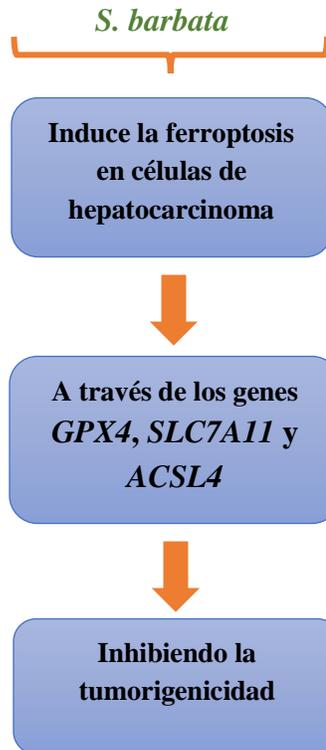


Figura 32. *S. barbata* inhibe la tumorigenicidad del hepatocarcinoma al inducir la ferroptosis.

9.3.2.8 El tratamiento conjunto de Disulfiram/cobre induce muerte celular por ferroptosis en células de hepatocarcinoma la cual se ve favorecida al inhibir NRF2

Disulfiram (DSF) es un medicamento aprobado por la FDA que ha sido usado para tratar el alcoholismo por casi 70 años. Se ha demostrado que DSF puede reaccionar con cobre (Cu^{2+}) para formar un metabolito anticancerígeno ($\text{DSF}/\text{Cu}^{2+}$). Con respecto al hepatocarcinoma, se ha encontrado que $\text{DSF}/\text{Cu}^{2+}$ inhibe la metástasis e induce muerte celular (Ren et al., 2021).

El investigador Xueying Ren y sus colaboradores identificaron que $\text{DSF}/\text{Cu}^{2+}$ mostró un efecto citotóxico en líneas celulares de hepatocarcinoma e inhibió la migración y la invasión de las mismas. También, demostraron que la inhibición farmacológica de NRF2 provocó que las células de hepatocarcinoma fueran más sensibles a la ferroptosis inducida por $\text{DSF}/\text{Cu}^{2+}$ (**Figura 33**) (Ren et al., 2021). Para ello, determinaron que:

- 1) $\text{DSF}/\text{Cu}^{2+}$ inhibe la viabilidad celular, la invasión y la migración de las células de hepatocarcinoma; se utilizaron células Huh7 y SMMC-7721, la cuales fueron tratadas con diferentes concentraciones de $\text{DSF}/\text{Cu}^{2+}$ por 12 y 24h. Los resultados

demonstraron que DSF/Cu²⁺ disminuye la viabilidad de las células de hepatocarcinoma de forma dependiente del tiempo y de la dosis. También, se evaluó la viabilidad a largo plazo y la capacidad de formación de colonias de las células de hepatocarcinoma después del tratamiento con DSF/Cu²⁺. Los resultados indicaron que a bajas concentraciones de DSF/Cu²⁺ se presentan efectos antineoplásicos a largo plazo y, al incrementar la concentración de DSF/Cu²⁺ se presenta una disminución en la formación de colonias. Además, se determinó el efecto de DSF/Cu²⁺ en la invasión y migración de las células de hepatocarcinoma. Los resultados mostraron que DSF/Cu²⁺ inhibe la invasión de células SMMC-7721 así como su migración.

- 2) DSF/Cu²⁺ induce ferroptosis en células de hepatocarcinoma; células Huh7 fueron tratadas con DSF/Cu²⁺ en presencia o ausencia de diferentes inhibidores de muerte celular. Los resultados demostraron que DFO (quelante de hierro), ferrostatina-1 (inhibidor de la ferroptosis), GSH y NAC (antioxidantes) aumentaron la viabilidad celular afectada por el tratamiento con DSF/Cu²⁺. Además, se demostró que el tratamiento con DSF/Cu²⁺ aumenta la peroxidación lipídica y favorece la acumulación de hierro libre. Esto sugiere que la ferroptosis está involucrada en el efecto citotóxico causado por DSF/Cu²⁺.
- 3) La inhibición farmacológica de NRF2 aumenta la sensibilidad de las células de hepatocarcinoma a la ferroptosis inducida por DSF/Cu²⁺; se inhibió a NRF2 de forma farmacológica usando Trigonelina y ML385. Esta inhibición junto con el tratamiento con DSF/Cu²⁺ tuvieron un efecto sinérgico inhibitorio dependiente de la concentración, es decir, disminuyó más la viabilidad celular que con el tratamiento individual con DSF/Cu²⁺. Para confirmar lo anterior, se disminuyó la expresión de *NRF2* de forma genética en células de hepatocarcinoma, esto favoreció la muerte celular inducida por DSF/Cu²⁺ y la peroxidación lipídica.

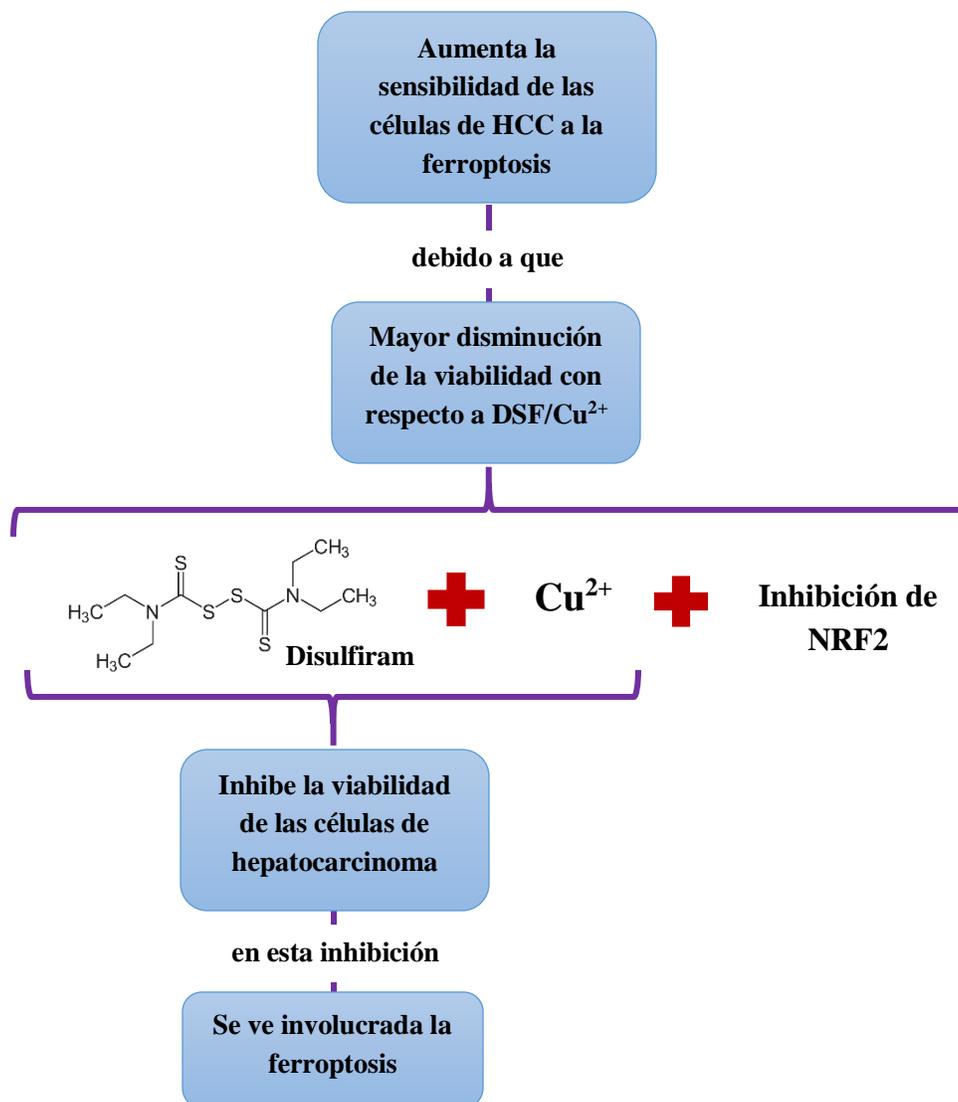


Figura 33. Efectos del tratamiento DSF/Cu²⁺ y la inhibición de NRF2 en células de hepatocarcinoma.

9.3.3 Estrategias terapéuticas potenciales que involucran el uso de nanopartículas

9.3.3.1 Nanopartículas de lipoproteínas de baja densidad de ácido docosaheptaenoico inducen ferroptosis en células de hepatocarcinoma

El investigador Weijun Ou y sus colaboradores diseñaron una nanopartícula de lipoproteína de baja densidad (LDL) reconstituida con ω-3 PUFA, ácido docosaheptaenoico (LDL-DHA). Estos transportadores a nanoescala conservan las propiedades funcionales de LDL que circula en el plasma incluyendo su reconocimiento y captación por el receptor LDL (LDLR) expresado en las células. La nanoplataforma de LDL es un vehículo apropiado para DHA debido a que se sabe que muchos tumores secuestran LDL ávidamente para obtener lípidos

y colesterol que son necesarios para llevar a cabo una rápida proliferación celular. Como un antecedente, se reportó que la administración transarterial de nanopartículas de LDL-DHA a un modelo de ratón singénico de hepatocarcinoma fue capaz de matar a las células cancerígenas de manera selectiva *in situ*, reduciendo el crecimiento del tumor hasta 3 veces en comparación con las ratas tratadas con el control. Los tumores residuales del tratamiento carecían de GSH y nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH), pero contenían altos niveles de ROS y alta peroxidación lipídica. El tejido del hígado que rodeaba a estos tumores no presentó evidencia histológica ni bioquímica de daño (Ou et al., 2017).

El equipo de Weijun Ou demostró que las nanopartículas de LDL-DHA inducen muerte celular por ferroptosis en células de hepatocarcinoma, lo que representa un mecanismo molecular nuevo para la terapia anticancerígena (**Figura 34**) (Ou et al., 2017). Para ello, determinaron que:

1. LDL-DHA induce peroxidación lipídica y muerte en células de hepatocarcinoma; la citotoxicidad de las nanopartículas fue evaluada en células de hepatocarcinoma de humanos y ratas. Cada línea celular fue tratada con dosis crecientes de estas nanopartículas por 72h, después se determinó la viabilidad celular. El tratamiento resultó en una disminución de la viabilidad en todas las líneas celulares mientras que el control no produjo citotoxicidad. También, se observó que en todas las líneas celulares se dio un pronunciado aumento en los hidroperóxidos lipídicos después de 24h de tratamiento con LDL-DHA.
2. LDL-DHA causa la muerte a células de hepatocarcinoma mediante la ferroptosis; las células de hepatocarcinoma tratadas con LDL-DHA fueron también expuestas a la presencia de inhibidores tradicionales de muerte celular: Z-VAD-FMK (inhibidor de la apoptosis), necrostatina-1 (inhibidor de la necrosis) y bafilomicina A1 (inhibidor de la autofagia). Ninguno de los inhibidores anteriormente mencionados fue capaz de prevenir la muerte celular inducida por LDL-DHA. En cambio, estudios realizados con Fer-1 (inhibidor de la ferroptosis) probaron que evita la muerte celular provocada por las nanopartículas LDL-DHA e inhibe la formación de hidroperóxidos lipídicos.
3. LDL-DHA inhibe la actividad de GXP4; GXP4 es una selenoproteína que tiene un residuo de Sec, que es clave, en su sitio catalítico. Por lo que la disponibilidad de

selenio regula la actividad enzimática de GPX4. Al suplementar a las células de hepatocarcinoma con selenito de sodio se inhibió la muerte celular por LDL-DHA y, se bloqueó la producción de hidroperóxidos lipídicos. En un medio con deficiencia de selenio, las células fueron más sensibles al tratamiento con LDL-DHA.

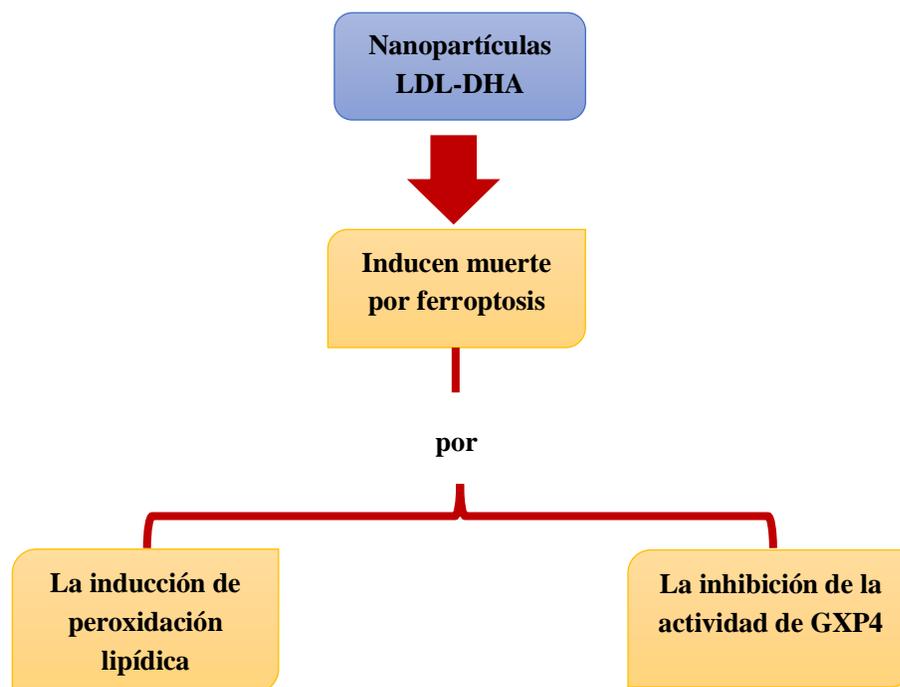


Figura 34. Inducción de la ferroptosis por las nanopartículas LDL-DHA.

9.3.3.2 Nanopartículas duales de manganeso y sílice cargadas con Sorafenib que agotan GSH para inducir ferroptosis en células de hepatocarcinoma

Las nanopartículas de sílice mesoporosas dopadas con manganeso (nanopartículas de sílice-manganeso, abreviadas MMSNs) fueron introducidas por primera vez en el campo de la síntesis catalítica. Debido a su gran área superficial y su volumen de poro, las MMSNs son usadas como transportadores de fármacos biodegradables que pueden desintegrarse en un ambiente con GSH presente en las células tumorales. La escisión de una molécula -Mn-O- consume dos moléculas de GSH. De hecho, la eficiencia del consumo de GSH por la degradación de MMSNs es lo suficientemente alta para disminuir los niveles intracelulares de GSH e inducir ferroptosis en las células, sin embargo, las células pueden adaptarse y tolerar el cambiante microambiente; cuando el GSH es consumido, la síntesis de GSH se acelera y la ferroptosis se inhibe. Por ello, se construyeron MMSNs cargadas con Sorafenib

(MMSN@SO) esperando que tuvieran un efecto aumentado para inducir ferroptosis, debido a que el Sorafenib bloquea el sistema Xc^- y, por ende, la síntesis de GSH. (H. Tang et al., 2019).

El investigador Hongxia Tang y sus colaboradores demostraron que las MMSN@SO indujeron ferroptosis de forma altamente efectiva en células de hepatocarcinoma (**Figura 35**) (H. Tang et al., 2019). Para ello, determinaron que:

1. El mecanismo de muerte celular inducido por las MMSN@SO es la ferroptosis; para determinar esto se utilizaron DFO (quelante de hierro) y Fer-1 (inhibidor de la ferroptosis) ambos incrementaron la viabilidad celular en el tratamiento con las MMSN@SO.
2. Los niveles de GSH intracelular se ven afectados de forma importante por las MMSN@SO; se midió la concentración de GSH de las células HepG2 del grupo tratado con las MMSN@SO y se observó que se redujo más que en el grupo tratado sólo con las MMSNs.
3. Las MMSN@SO afectan de forma importante la expresión y actividad intracelular de GPX4; se observó que las células tratadas con las MMSN@SO tuvieron un mayor efecto inhibitorio en la actividad y expresión de GPX4 que el grupo tratado sólo con las MMSNs.
4. Existe una importante acumulación de peróxidos lipídicos intracelulares en las células; se observó que las células HepG2 tratadas con las MMSN@SO contenían una cantidad más abundante de peróxidos lipídicos que el grupo tratado sólo con las MMSNs.

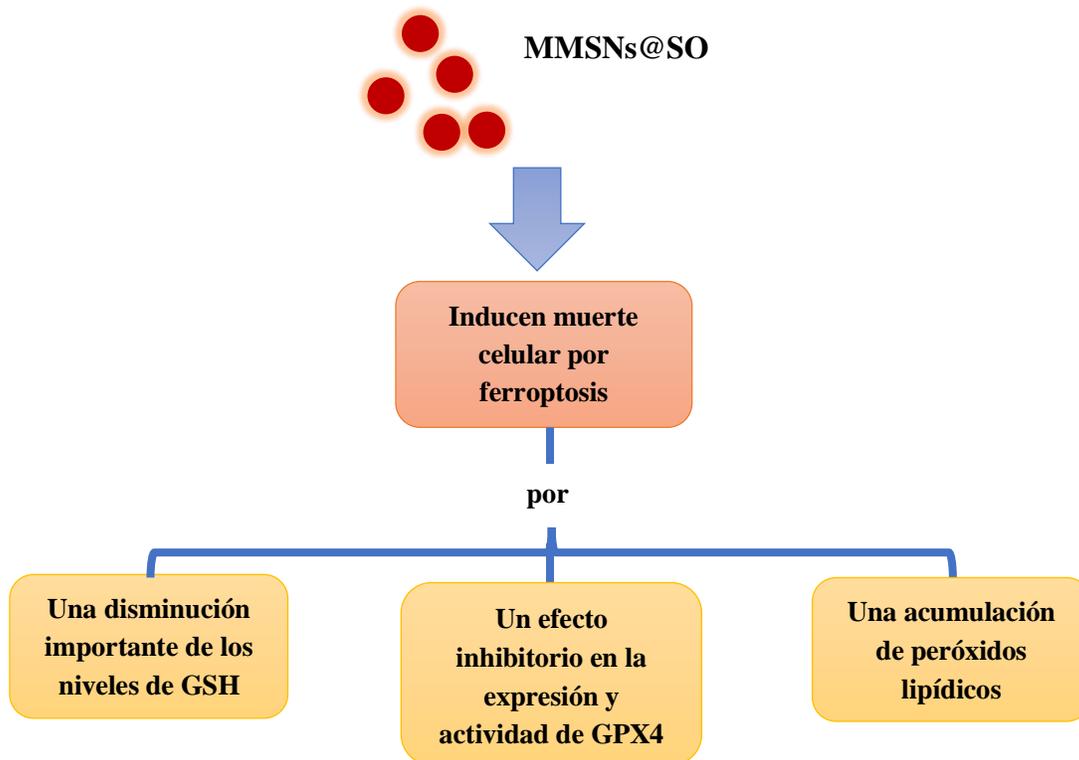


Figura 35. Inducción de muerte celular vía ferroptosis por MMSN@SO

El mismo investigador con otros colaboradores realizaron una modificación a las MMSN@SO para prolongar el tiempo de circulación en sangre y mejorar la eficacia de las nanopartículas; el Propilenglicol (PEG) injertado de folato fue modificado en la superficie externa de MMSN@SO por lo que fue denominado FePEG-MMSN@SO. Se observó en células HepG2 que el tratamiento con FePEG-MMSN@SO disminuyó más los niveles de GSH con respecto a los tratamientos con Sorafenib libre y MMSN@SO. También, el tratamiento con FePEG-MMSN@SO tuvo el efecto inhibitorio más fuerte sobre GPX4 comparado con los otros dos tratamientos antes mencionados. Los niveles de hierro intracelular también se vieron afectados; el tratamiento con FePEG-MMSN@SO los incrementó más que los tratamientos con Sorafenib libre y con MMSN@SO. De igual manera, la mayor acumulación de peróxidos lipídicos tóxicos se observó en el tratamiento con FePEG-MMSN@SO, esto comparado con los otros dos tratamientos ya mencionados (**Figura 36**). Asimismo, se llevó a cabo una evaluación de FePEG-MMSN@SO en ratones

portadores de tumores HepG2, en el cual se observó una marcada reducción del crecimiento del tumor (casi desapareció), además los niveles de GSH y la actividad de GPX4 también disminuyeron notablemente. El crecimiento del tumor, los niveles de GSH y la actividad de GPX4 también se vieron disminuidos en el tratamiento con MMSNs@SO, sin embargo, la disminución fue menor si se compara con el tratamiento usando FePEG-MMSNs@SO (H. Tang et al., 2020).

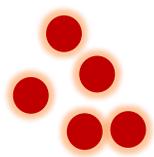
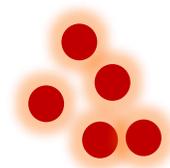
| Simbología | | | | | |
|---|-----------------|----------------|--|-------------------------------|--------------------------------|
| ■ | = disminución | + | = aumento | | |
| | | Niveles de GSH | Niveles de peróxidos lipídicos tóxicos | Expresión y actividad de GPX4 | Niveles de hierro intracelular |
|  | Sorafenib libre | ■ | + | ■ | + |
|  | MMSNs@SO | ■■ | ++ | ■■ | ++ |
|  | FePEG-MMSNs@SO | ■■■ | +++ | ■■■ | +++ |

Figura 36. Capacidad de las nanopartículas diseñadas por Hongxia Tang y sus colaboradores para causar ferroptosis con respecto al Sorafenib libre.

9.3.3.3 Nanopartículas duales de manganeso y sílice cargadas con Dihidroartemisina que agotan GSH y producen OH[•] para inducir ferroptosis en células de hepatocarcinoma

La Artemisina y sus derivados son utilizados en la terapia antimalaria de primera línea. Si bien la mayor atención terapéutica a la Artemisina se ha puesto para el tratamiento de la malaria ha incrementado la evidencia que prueba que los fármacos tipo Artemisina poseen un potencial considerable para tratar o prevenir el cáncer. La Dihidroartemisina (DA) es un derivado activo de la Artemisina y su metabolito en el cuerpo. Se ha reportado que los iones

de metales de transición pueden mejorar el efecto anticancerígeno de la DA. El efecto anticancerígeno mejorado es debido a la reacción productora de OH^\cdot entre la estructura de puente peroxi de la DA y los iones de metales de transición (Fei et al., 2020).

El investigador Weidong Fei y sus colaboradores utilizaron nanopartículas de sílice mesoporosas dopadas con manganeso (MMSNs) al igual que el investigador Hongxia Tang, pero en lugar de utilizar Sorafenib, utilizaron DA para cargarlas; en las nanopartículas resultantes (MMSNs@DA) también fue modificado el PEG injertado de folato (FaPEG) en la superficie externa de MMSNs@DA resultando en FaPEG-MMSNs@DA.

El equipo de Weidong Fei demostró que el mecanismo mediante el cual estas nanopartículas inducen la muerte a células de hepatocarcinoma es la ferroptosis (**Figura 37**). Para ello, se utilizaron células HepG2 a las cuales se les aplicó Fer-1 (un inhibidor de la ferroptosis), posteriormente fueron sometidas a DA libre, MMSNs@DA y FaPEG-MMSNs@DA según fuese el caso, en los tres tratamientos aumentó la citotoxicidad en ese orden. Asimismo, los niveles de GSH disminuyeron, siendo el tratamiento con FaPEG-MMSNs@DA el que más los redujo. También, la acumulación de peróxidos lipídicos tóxicos se incrementó en todos los tratamientos, sin embargo, el tratamiento con FaPEG-MMSNs@DA fue en el que más se incrementaron. La actividad y la expresión de GPX4 se vieron disminuidos en todos los tratamientos, pero se redujeron más en los tratamientos con nanopartículas, en especial con el uso de FaPEG-MMSNs@DA (Fei et al., 2020).

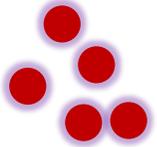
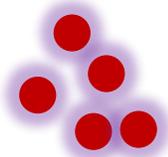
| Simbología | | | | |
|--|----------------|----------------|--------------------------------|-------------------------------|
| ■ | = disminución | + | = aumento | |
| | | Niveles de GSH | Niveles de peróxidos lipídicos | Expresión y actividad de GPX4 |
|  | DA libre | ■ | + | ■ |
|  | MMSNs@DA | ■■ | ++ | ■■ |
|  | FaPEG-MMSNs@DA | ■■■ | +++ | ■■■ |

Figura 37. Capacidad de las nanopartículas diseñadas por Weidong Fei y sus colaboradores para causar ferroptosis con respecto a la DA libre.

9.3.3.4 Coadministración de iRGD con una estructura organometálica a base de hierro cargada con Sorafenib como agente causante de ferroptosis dirigido al tratamiento del hepatocarcinoma

Los nanomateriales a base de hierro sirven como plataforma para la carga directa de inductores de la ferroptosis y, también son capaces de liberar iones de hierro que participan en la reacción de Fenton acelerando la ferroptosis. El investigador Xianchuang Liu y sus colaboradores, diseñaron una estructura orgánica de hierro [MIL-101-(Fe)] debido a su gran capacidad de carga de fármacos, escogieron Sorafenib para cargarlo en las nanopartículas de MIL-101(Fe) para obtener MIL-101(Fe)@Sor. Para mejorar la capacidad de penetración del nanofármaco en el tumor, se utilizó un péptido iRGD. El péptido iRGD puede unirse específicamente al receptor neurofilina-1 (NRP-1), el cual está principalmente localizado en tejidos tumorales y vasculares, en donde activa el transporte endocítico y promueve la

penetración del fármaco en tejidos tumorales. Estudios previos han descrito resultados favorables del tratamiento con iRGD en cáncer de hígado (X. Liu et al., 2021).

El equipo de Xianchuang Liu demostró que el tratamiento con nanopartículas MIL-101(Fe)@Sor en conjunto con iRGD aceleran de forma importante la ferroptosis (**Figura 38**) (X. Liu et al., 2021) . Para ello, determinaron que:

1. El tratamiento con nanopartículas de MIL-101(Fe)@Sor e iRGD causa muerte celular por ferroptosis; se observó que el grupo tratado con MIL-101(Fe)@Sor e iRGD mostró un mayor incremento en la citotoxicidad en comparación con el grupo tratado sólo con MIL-101(Fe)@Sor. Para determinar el mecanismo mediante el cual MIL-101(Fe)@Sor induce muerte celular, las células HepG2 fueron pretratadas con inhibidores de la ferroptosis (Fer-1 y DFO). La presencia de estos inhibidores redujo la citotoxicidad tanto para el grupo tratado con MIL-101(Fe)@Sor como para el grupo tratado con MIL-101(Fe)@Sor e iRGD. También, se observó que en ambos grupos disminuyeron los niveles de GSH lo cual es un indicador de ferroptosis. Además, la expresión de GXP4, otro indicador de ferroptosis, fue consistente con la tendencia a la baja de GSH observándose que con el grupo tratado con MIL-101(Fe)@Sor e iRGD se obtuvo la mayor disminución de la expresión de GPX4.
2. El tratamiento con nanopartículas MIL-101(Fe)@Sor e iRGD induce la generación de peróxidos lipídicos; se evaluaron los niveles de peroxidación lipídica en las células HepG2 y se observó que el grupo MIL-101(Fe)@Sor tuvo una alta peroxidación lipídica sólo superado por el tratamiento conjunto de MIL-101(Fe)@Sor e iRGD.
3. Se presenta supresión tumoral *in vivo* usando el tratamiento conjunto de MIL-101(Fe)@Sor e iRGD; se utilizó un modelo de ratón portador de tumor H22. El grupo de ratones tratados con MIL-101(Fe)@Sor e iRGD tuvieron el más alto grado de inhibición tumoral con un decremento importante en peso del tumor y presentaron una mayor disminución en la expresión de GPX4 en el tejido tumoral, esto en comparación con los grupos tratados con MIL-101(Fe)@Sor y Sorafenib libre.

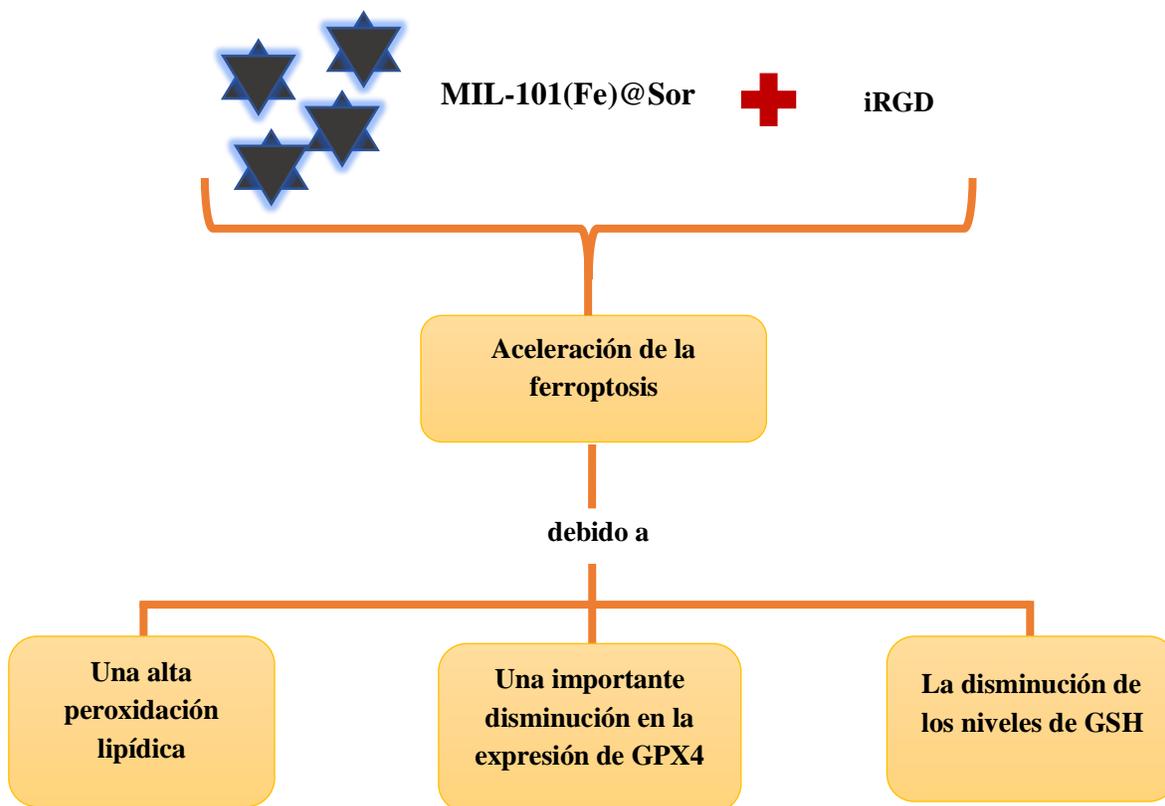


Figura 38. Causas de la ferroptosis acelerada ocasionada por el tratamiento en conjunto de las nanopartículas MIL-101(Fe)@Sor e iRGD.

9.3.3.5 Nanomicelas cargadas con triapina/Ce6 y decoradas con lactosa (TCLMs) proveen de una efectiva terapia quimio-fotodinámica (CT-PDT) para el hepatocarcinoma mediante un aumento en las ROS y un mecanismo inductor de la ferroptosis

El investigador Pengfei Zhang y sus colaboradores desarrollaron un sistema de liberación (DDS) basado en nanomicelas para una terapia quimio-fotodinámica (CT-PDT) combinada contra el hepatocarcinoma. El DDS fue preparado de un copolímero denominado como Flu-pDMAEMA-pAHPMA-Lac el cual está compuesto de dos monómeros de 3-azido-2-hidroxiopropil metacrilato (AHPMA) y 2-(dimetilamino) etil metacrilato (DMAEMA). Uno de los extremos del polímero fue modificado con fluoresceína (Flu), y el grupo azido en pAHPMA fue ligado a lactosa hidrofílica (Lac). El Flu-pDMAEMA-pAHPMA-Lac se autoensambló en nanomicelas denominadas LMs las cuales fueron cargadas con una pequeña molécula de triapina y un fotosensibilizador Ce6 para conformar las TCLMs (**Figura 39**). Las TCLMs están altamente dirigidas a los hepatocitos debido al reconocimiento específico

de la lactosa por el receptor de la asialoglicoproteína (ASGPR) y a su colapso en el microambiente ácido de las células cancerígenas para liberar su carga (Zhang et al., 2021).

La triapina es un compuesto que se une al hierro y ha sido investigada como un agente anticancerígeno. El complejo que se forma entre la triapina y el hierro es capaz de generar el radical hidroxilo ($^{\circ}\text{OH}$) mediante la reacción de Fenton provocando la acumulación de peróxidos lipídicos y, finalmente, ferroptosis. Como un fotosensibilizador, Ce6 produce oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$), otro miembro de las ROS, esto mediante terapia fotodinámica (PDT). Recientes estudios han demostrado que $^1\text{O}_2$ es capaz de potenciar la ferroptosis mediante el consumo de glutatión intracelular (GSH) y la reducción de glutatión peroxidasa 4 (GPX4) (Zhang et al., 2021).

El investigador Pengfei Zhang y sus colaboradores demostraron que la ferroptosis es el mecanismo que está detrás de la actividad contra el hepatocarcinoma de las TCLMs. Para determinar esto, midieron la capacidad de las TCLMs para producir ROS en células de hepatocarcinoma usando dihidroetidio (DHE), el cual reacciona con las ROS y produce fluorescencia color rojo. Mientras que con las nanomicelas decoradas con lactosa (LMs) no se presentó fluorescencia en células HepG2 y Huh7, con las nanomicelas decoradas con lactosa y cargadas con triapina/Ce6 (TCLMs) se presentó fluorescencia sugiriendo que las nanomicelas fueron capaces de ejercer su acción induciendo la producción de ROS. Cuando la radiación infrarroja cercana (NIR) fue aplicada al grupo de células de hepatocarcinoma tratado con TCLMs, la intensidad de la fluorescencia aumentó debido a las ROS adicionales (en especial $^1\text{O}_2$) que se produjeron por la PDT. Además, el inhibidor de la ferroptosis Fer-1 mitigó la citotoxicidad producida por las TCLMs en células Huh7, indicando el papel esencial de la ferroptosis en el efecto anticancerígeno de las TCLMs. También, se encontró que las TCLMs disminuyeron los niveles de GSH, no obstante, las TCLMs en conjunto con NIR (TCLM/NIR) los disminuyeron aún más, esta disminución pudo ser parcialmente restaurada con Fer-1. El grado de peroxidación lipídica fue determinado por la presencia de malondialdehído (MDA), debido a que es un típico producto final de peroxidación lipídica. Los resultados demostraron que las TCLMs incrementaron los niveles de MDA, sin embargo, los niveles se vieron mayormente aumentados en las células tratadas con TCLM/NIR. Además, se utilizó un modelo de ratón HCC de xenoinjerto ortotópico para evaluar el efecto

antitumoral de las TCLMs *in vivo*; se obtuvo como resultado que la región tumoral del grupo tratado con TCLMs/NIR mostró un efecto supresor de tumor mayor que los grupos tratados con triapina, nanomicelas no decoradas con lactosa (TCMs) y nanomicelas no cargadas con Ce6 (TLMs) (Zhang et al., 2021).

Para monitorear la capacidad de dirigirse al tumor, se estableció un modelo de ratones portadores de tumores mediante la inyección subcutánea de células Huh7 en ratones macho BALB/c. Una vez que las TCLMs fueron administradas, la distribución *in vivo* fue investigada mediante el monitoreo de la señal de fluorescencia de Ce6. Se utilizaron como control negativo TCMs debido a su incapacidad de unirse a ASGPR. El grupo tratado con las TCLMs presentó fluorescencia de mayor intensidad en el sitio del tumor a comparación de otros sitios, en cambio, el grupo tratado con TCMs presentó fluorescencia más débil en el sitio, la cual disminuyó rápidamente al pasar el tiempo. Estos resultados indican que la decoración con lactosa es importante para dirigir a las nanomicelas al sitio blanco, así como prolongar su retención en el mismo (Zhang et al., 2021).

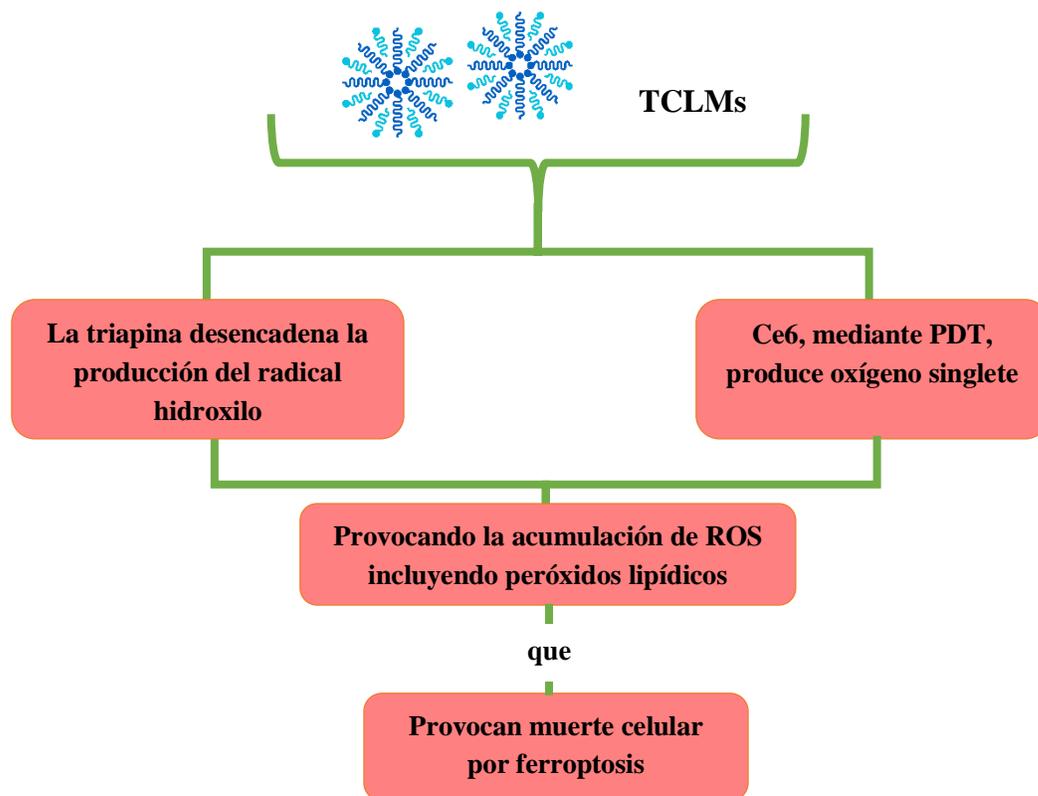


Figura 39. Causas por las que las TCLMs producen muerte celular por ferroptosis en células de hepatocarcinoma.

10 Discusión

Existe un gran número de estrategias terapéuticas que involucran a la ferroptosis, algunas son completamente nuevas y otras, como se pensaba, tienen el objetivo de mejorar la eficacia del Sorafenib. Las estrategias basadas en la combinación del Sorafenib con otros fármacos ya usados en otros padecimientos, pueden ser una buena alternativa a corto plazo, debido a que sólo se debería demostrar que la combinación es segura para su uso en humanos. Sin embargo, estas estrategias al involucrar al Sorafenib sólo podrían ser utilizadas para el tratamiento del hepatocarcinoma avanzado, para el cual está aprobado. En el caso de la combinación Sorafenib-Haloperidol, es necesario hacer más estudios para saber qué tipo de efectos secundarios a largo plazo se pueden presentar debido al uso del Haloperidol (tomando en cuenta que no se usará para pacientes con trastornos psicóticos), también es importante verificar si es posible minorarlos o evitarlos modificando las dosis y, seguir teniendo buenos resultados. Es indispensable asegurar que esta alternativa sólo sea usada si los beneficios exceden los riesgos. Lo mismo se debería verificar para los tratamientos que involucran al Artesunato, Auranofín y Disulfiram debido a que son usados para tratar otros padecimientos diferentes al cáncer. Además, en los tratamientos combinados, se deben establecer las proporciones de cada fármaco, las cuales deben comprobar seguridad y eficacia, por lo que se deben llevar a cabo más estudios con ese objetivo.

El resto de las estrategias tienen potencial, pero aún se requieren llevar a cabo más estudios para demostrar su seguridad y eficacia en humanos. Además, las estrategias que no involucran al Sorafenib tienen el potencial de ser usadas en otras etapas de la enfermedad, no están limitadas al hepatocarcinoma avanzado. En el caso del uso de las nanopartículas, es necesario hacer más estudios encaminados a las vías de metabolización de los componentes de las mismas para asegurar que se metabolicen y no se acumulen y, que sus metabolitos no sean tóxicos provocando daño hepático o renal. En el caso de las estrategias que se basan en la disminución o el aumento de la expresión de algunas proteínas de la célula, es necesario determinar si hay afectaciones a corto y a largo plazo en células sanas. Es importante destacar las estrategias abordadas en el presente trabajo que provienen de fuentes naturales, ya que se evidencia el gran potencial de este tipo de fuentes para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas basadas en la ferroptosis.

Actualmente, la FDA ha aprobado otros inhibidores de quinasas para el tratamiento del hepatocarcinoma además del Sorafenib; como tratamiento de primera línea se aprobó al Levatinib y como tratamiento de segunda línea se aprobó al Regorafenib y al Cabozantinib (mostrado en la **Figura 8**). Sin embargo, no se ha demostrado que alguno de estos nuevos fármacos involucren a la ferroptosis en su mecanismo de acción por lo que es necesario hacer estudios con ese objetivo, ya que, si el mecanismo de acción de alguno de estos nuevos fármacos involucrara a la ferroptosis, sería un parteaguas para el desarrollo de nuevas estrategias.

También, es importante llevar a cabo estudios a largo plazo con el objetivo de determinar si las estrategias para incrementar la eficacia del Sorafenib producen resistencia al igual que el tratamiento individual con el mismo, para decidir si es conveniente aplicar estas estrategias o no. La ferroptosis fue conocida hace relativamente poco tiempo, por lo que aún queda mucho por descubrir sobre sus aplicaciones terapéuticas en el hepatocarcinoma, conforme se vayan dando nuevos avances se espera que más estrategias prometedoras vayan surgiendo. Sin embargo, lo importante no sólo es de que surjan nuevas estrategias, sino que sean investigadas a fondo con el objetivo de probar su seguridad y eficacia en humanos y, puedan convertirse en alternativas para los pacientes con hepatocarcinoma con el fin de incrementar la oferta de tratamientos que en la actualidad es bastante reducida y con poca eficacia, especialmente en etapas avanzadas de la enfermedad.

11 Conclusiones

- A pesar de ser una muerte celular descubierta hace relativamente poco tiempo, existe una gran cantidad de estrategias potenciales para el desarrollo de nuevos tratamientos para el hepatocarcinoma.
- Gran parte de las estrategias presentadas en el este trabajo pretenden mejorar la eficacia del Sorafenib, lo que denota el gran interés que se tiene por combatir la resistencia que desarrollan los pacientes tratados con este fármaco.
- La supervivencia de una persona con hepatocarcinoma avanzado mejora muy poco con el Sorafenib, haciendo totalmente necesario desarrollar y poner a disposición de los pacientes nuevas estrategias que mejoren su esperanza de vida.

- Las nuevas estrategias potenciales mostradas en el presente trabajo que no involucran al Sorafenib tienen potencial para ser usadas en otras etapas de este tipo de cáncer.

12 Bibliografía

- Asperti, M., Bellini, S., Grillo, E., Gryzik, M., Cantamessa, L., Ronca, R., Maccarinelli, F., Salvi, A., de Petro, G., Arosio, P., Mitola, S., & Poli, M. (2021). H-ferritin suppression and pronounced mitochondrial respiration make Hepatocellular Carcinoma cells sensitive to RSL3-induced ferroptosis. *Free Radical Biology and Medicine*, *169*, 294–303. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2021.04.024>
- Bai, T., Wang, S., Zhao, Y., Zhu, R., Wang, W., & Sun, Y. (2017). Haloperidol, a sigma receptor 1 antagonist, promotes ferroptosis in hepatocellular carcinoma cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *491*(4), 919–925. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.07.136>
- Borba, J. V. V. B., Silva, A. C., Lima, M. N. N., Mendonca, S. S., Furnham, N., Costa, F. T. M., & Andrade, C. H. (2021). Chemogenomics and bioinformatics approaches for prioritizing kinases as drug targets for neglected tropical diseases. *In Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*, *124*, 187–223. Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.apcsb.2020.10.006>
- Bteich, F., & Di Bisceglie, A. M. (2019). Current and future systemic therapies for hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology and Hepatology*, *15*(5), 266–272.
- Cao, J. Y., & Dixon, S. J. (2016). Mechanisms of ferroptosis. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *73*(11–12), 2195–2209. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2194-1>
- Capelletti, M. M., Manceau, H., Puy, H., & Peoc'h, K. (2020). Ferroptosis in liver diseases: An overview. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(14), 1–23. <https://doi.org/10.3390/ijms21144908>
- Colagrande, S., Regini, F., Taliani, G. G., Nardi, C., & Inghilesi, A. L. (2015). Advanced hepatocellular carcinoma and sorafenib: Diagnosis, indications, clinical and radiological follow-up. *In World Journal of Hepatology*, *7*(8), 1041–1053. Baishideng Publishing Group Co. <https://doi.org/10.4254/wjh.v7.i8.1041>
- Conrad, M., & Friedmann Angeli, J. P. (2015). Glutathione peroxidase 4 (Gpx4) and ferroptosis: what's so special about it? *Molecular & Cellular Oncology*, *2*(3), e995047. <https://doi.org/10.4161/23723556.2014.995047>
- DeHart, D. N., Fang, D., Heslop, K., Li, L., Lemasters, J. J., & Maldonado, E. N. (2018). Opening of voltage dependent anion channels promotes reactive oxygen species generation, mitochondrial dysfunction and cell death in cancer cells. *Biochemical Pharmacology*, *148*, 155–162. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2017.12.022>
- Denzoin Vulcano, L. A., Luis Soraci, A., & Ofelia Tapia, M. (2013). Glutathione homeostasis. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, *47*(3), 529–539.

- Díaz, L., & Barrera, F. (2015). Clasificación Barcelona Clinic Liver Cancer (BCLC) de carcinoma hepatocelular. *Gastroenterol. Latinoam*, 26, 63–68. <https://doi.org/https://gastrolat.org/DOI/PDF/10.0716/gastrolat2015n100009.pdf>
- Dixon, S. J., Patel, D., Welsch, M., Skouta, R., Lee, E., Hayano, M., Thomas, A. G., Gleason, C., Tatonetti, N., Slusher, B. S., & Stockwell, B. R. (2014). Pharmacological inhibition of cystine-glutamate exchange induces endoplasmic reticulum stress and ferroptosis. *ELife*, 2014(3), 1–25. <https://doi.org/10.7554/eLife.02523>
- Escudier, B., Worden, F., & Kudo, M. (2019). Sorafenib: key lessons from over 10 years of experience. *In Expert Review of Anticancer Therapy*, 19(2), 177–189. Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/14737140.2019.1559058>
- Fei, W., Chen, D., Tang, H., Li, C., Zheng, W., Chen, F., Song, Q., Zhao, Y., Zou, Y., & Zheng, C. (2020). Targeted GSH-exhausting and hydroxyl radical self-producing manganese-silica nanomissiles for MRI guided ferroptotic cancer therapy. *Nanoscale*, 12(32), 16738–16754. <https://doi.org/10.1039/d0nr02396e>
- Hayano, M., Yang, W. S., Corn, C. K., Pagano, N. C., & Stockwell, B. R. (2016). Loss of cysteinyl-tRNA synthetase (CARS) induces the transsulfuration pathway and inhibits ferroptosis induced by cystine deprivation. *Cell Death and Differentiation*, 23(2), 270–278. <https://doi.org/10.1038/cdd.2015.93>
- Huang, C., Santofimia-Castaño, P., Liu, X., Xia, Y., Peng, L., Gotorbe, C., Neira, J. L., Tang, D., Pouyssegur, J., & Iovanna, J. (2021). NUPR1 inhibitor ZZW-115 induces ferroptosis in a mitochondria-dependent manner. *Cell Death Discovery*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41420-021-00662-2>
- Huang, W., Chen, K., Lu, Y., Zhang, D., Cheng, Y., Li, L., Huang, W., He, G., Liao, H., Cai, L., Tang, Y., Zhao, L., & Pan, M. (2021). ABCC5 facilitates the acquired resistance of sorafenib through the inhibition of SLC7A11-induced ferroptosis in hepatocellular carcinoma. *Neoplasia (United States)*, 23(12), 1227–1239. <https://doi.org/10.1016/j.neo.2021.11.002>
- INEGI. (2021). *Comunicado De Prensa Núm . 105 / Estadísticas a Propósito Del Día Mundial Contra El Cáncer*. https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2021/cancer2021_Nal.pdf
- Jin, M., Shi, C., Li, T., Wu, Y., Hu, C., & Huang, G. (2020). Solasonine promotes ferroptosis of hepatoma carcinoma cells via glutathione peroxidase 4-induced destruction of the glutathione redox system. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 129, 110282. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110282>
- Kouakou, Y. I., Tod, M., Leboucher, G., Lavoignat, A., Bonnot, G., Bienvenu, A. L., & Picot, S. (2019). Systematic review of artesunate pharmacokinetics: Implication for treatment of resistant malaria. *International Journal of Infectious Diseases*, 89, 30–44. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2019.08.030>

- Lachaier, E., Louandre, C., Godin, C., Saidak, Z., Baert, M., Diouf, M., Chauffert, B., & Galmiche, A. (2014). Sorafenib induces ferroptosis in human cancer cell lines originating from different solid tumors. *Anticancer Research*, *34*(11), 6417–6422.
- Lemasters, J. J. (2017). Evolution of voltage-dependent anion channel function: From molecular sieve to governor to actuator of ferroptosis. *Frontiers in Oncology*, *7*(DEC), 8–11. <https://doi.org/10.3389/fonc.2017.00303>
- Li, J., Cao, F., Yin, H., Huang, Z., Lin, Z., Mao, N., Sun, B., & Wang, G. (2020). Ferroptosis: past, present and future. *Cell Death & Disease*, *11*(2), 88. <https://doi.org/10.1038/s41419-020-2298-2>
- Li, Y., Xia, J., Shao, F., Zhou, Y., Yu, J., Wu, H., Du, J., & Ren, X. (2021). Sorafenib induces mitochondrial dysfunction and exhibits synergistic effect with cysteine depletion by promoting HCC cells ferroptosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *534*, 877–884. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.10.083>
- Li, Y., Zhang, J., Zhang, K., Chen, Y., Wang, W., Chen, H., Zou, Z., Li, Y., & Dai, M. (2022). Scutellaria barbata Inhibits Hepatocellular Carcinoma Tumorigenicity by Inducing Ferroptosis of Hepatocellular Carcinoma Cells. *Frontiers in Oncology*, *12*. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.693395>
- Li, Z., Dai, H., Huang, X., Feng, J., Deng, J., Wang, Z., Yang, X., Liu, Y., Wu, Y., Chen, P., Shi, H., Wang, J., Zhou, J., & Lu, G. (2021). Artesunate synergizes with sorafenib to induce ferroptosis in hepatocellular carcinoma. *Acta Pharmacologica Sinica*, *42*(2), 301–310. <https://doi.org/10.1038/s41401-020-0478-3>
- Lin, P.-L., Tang, H.-H., Wu, S.-Y., Shaw, N.-S., & Su, C.-L. (2020). Saponin Formosanin C-Induced Ferritinophagy and Ferroptosis in Human Hepatocellular Carcinoma Cells. *Antioxidants*, *9*(8), 682. <https://doi.org/10.3390/antiox9080682>
- Lippmann, J., Petri, K., Fulda, S., & Liese, J. (2020). Redox Modulation and Induction of Ferroptosis as a New Therapeutic Strategy in Hepatocellular Carcinoma. *Translational Oncology*, *13*(8), 100785. <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2020.100785>
- Liu, M., Zhu, W., & Pei, D. (2021). System Xc⁻: a key regulatory target of ferroptosis in cancer. *Investigational New Drugs*. <https://doi.org/10.1007/s10637-021-01070-0>
- Liu, X., Zhu, X., Qi, X., Meng, X., & Xu, K. (2021). Co-Administration of iRGD with Sorafenib-Loaded Iron-Based Metal-Organic Framework as a Targeted Ferroptosis Agent for Liver Cancer Therapy. *International Journal of Nanomedicine*, *16*, 1037–1050. <https://doi.org/10.2147/IJN.S292528>
- Llovet, J. M., Kelley, R. K., Villanueva, A., Singal, A. G., Pikarsky, E., Roayaie, S., Lencioni, R., Koike, K., Zucman-Rossi, J., & Finn, R. S. (2021). Hepatocellular carcinoma. *Nature Reviews Disease Primers*, *7*(1). <https://doi.org/10.1038/s41572-020-00240-3>
- Louandre, C., Ezzoukhry, Z., Godin, C., Barbare, J. C., Mazière, J. C., Chauffert, B., &

- Galmiche, A. (2013). Iron-dependent cell death of hepatocellular carcinoma cells exposed to sorafenib. *International Journal of Cancer*, *133*(7), 1732–1742. <https://doi.org/10.1002/ijc.28159>
- Nie, J., Lin, B., Zhou, M., Wu, L., & Zheng, T. (2018). Role of ferroptosis in hepatocellular carcinoma. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, *144*(12), 2329–2337. <https://doi.org/10.1007/s00432-018-2740-3>
- Ou, W., Mulik, R. S., Anwar, A., McDonald, J. G., He, X., & Corbin, I. R. (2017). Low-density lipoprotein docosahexaenoic acid nanoparticles induce ferroptotic cell death in hepatocellular carcinoma. *Free Radical Biology and Medicine*, *112*(58), 597–607. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.09.002>
- Ren, X., Li, Y., Zhou, Y., Hu, W., Yang, C., Jing, Q., Zhou, C., Wang, X., Hu, J., Wang, L., Yang, J., Wang, H., Xu, H., Li, H., Tong, X., Wang, Y., & Du, J. (2021). Overcoming the compensatory elevation of NRF2 renders hepatocellular carcinoma cells more vulnerable to disulfiram/copper-induced ferroptosis. *Redox Biology*, *46*. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2021.102122>
- Shang, Y., Luo, M., Yao, F., Wang, S., Yuan, Z., & Yang, Y. (2020). Ceruloplasmin suppresses ferroptosis by regulating iron homeostasis in hepatocellular carcinoma cells. *Cellular Signalling*, *72*(5), 109633. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2020.109633>
- Sun, J., Zhou, C., Zhao, Y., Zhang, X., Chen, W., Zhou, Q., Hu, B., Gao, D., Raatz, L., Wang, Z., Nelson, P. J., Jiang, Y., Ren, N., Bruns, C. J., & Zhou, H. (2021). Quiescin sulfhydryl oxidase 1 promotes sorafenib-induced ferroptosis in hepatocellular carcinoma by driving EGFR endosomal trafficking and inhibiting NRF2 activation. *Redox Biology*, *41*, 101942. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2021.101942>
- Sun, X., Niu, X., Chen, R., He, W., Chen, D., Kang, R., & Tang, D. (2016). Metallothionein-1G facilitates sorafenib resistance through inhibition of ferroptosis. *Hepatology*, *64*(2), 488–500. <https://doi.org/10.1002/hep.28574>
- Sun, X., Ou, Z., Chen, R., Niu, X., Chen, D., Kang, R., & Tang, D. (2016). Activation of the p62-Keap1-NRF2 pathway protects against ferroptosis in hepatocellular carcinoma cells. *Hepatology*, *63*(1), 173–184. <https://doi.org/10.1002/hep.28251>
- Tang, D., & Kroemer, G. (2020). Ferroptosis. *Current Biology*, *30*(21), R1292–R1297. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.09.068>
- Tang, H., Chen, D., Li, C., Zheng, C., Wu, X., Zhang, Y., Song, Q., & Fei, W. (2019). Dual GSH-exhausting sorafenib loaded manganese-silica nanodrugs for inducing the ferroptosis of hepatocellular carcinoma cells. *International Journal of Pharmaceutics*, *572*(June), 118782. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.118782>
- Tang, H., Li, C., Zhang, Y., Zheng, H., Cheng, Y., Zhu, J., Chen, X., Zhu, Z., Piao, J. G., & Li, F. (2020). Targeted manganese doped silica nano GSH-cleaner for treatment of liver cancer by destroying the intracellular redox homeostasis. *Theranostics*, *10*(21), 9865–9887. <https://doi.org/10.7150/thno.46771>

- 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., & Wang, X. (2020). The mechanisms of sorafenib resistance in hepatocellular carcinoma: theoretical basis and therapeutic aspects. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 5(1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-0187-x>
- Tunissiolli, N. M., Castanhole-Nunes, M. M. U., Biselli-Chicote, P. M., Pavarino, É. C., da Silva, R. F., da Silva, R. de C. M. A., & Goloni-Bertollo, E. M. (2017). Hepatocellular carcinoma: A comprehensive review of biomarkers, clinical aspects, and therapy. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 18(4), 863–872. <https://doi.org/10.22034/APJCP.2017.18.4.863>
- Villanueva, A. (2019). Hepatocellular Carcinoma. *New England Journal of Medicine*, 380(15), 1450–1462. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1713263>
- Wang, L., Chen, X., & Yan, C. (2020). Ferroptosis: An emerging therapeutic opportunity for cancer. *Genes & Diseases*, xxxx. <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2020.09.005>
- Wang, Q., Bin, C., Xue, Q., Gao, Q., Huang, A., Wang, K., & Tang, N. (2021). GSTZ1 sensitizes hepatocellular carcinoma cells to sorafenib-induced ferroptosis via inhibition of NRF2/GPX4 axis. *Cell Death and Disease*, 12(5). <https://doi.org/10.1038/s41419-021-03718-4>
- Wang, Q., Guo, Y., Wang, W., Liu, B., Yang, G., Xu, Z., Li, J., & Liu, Z. (2021). RNA binding protein DAZAP1 promotes HCC progression and regulates ferroptosis by interacting with SLC7A11 mRNA. *Experimental Cell Research*, 399(1), 112453. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2020.112453>
- Xie, B., Wang, D. H., & Spechler, S. J. (2012). Sorafenib for treatment of hepatocellular carcinoma: A systematic review. *In Digestive Diseases and Sciences*, 57(5), 1122–1129. <https://doi.org/10.1007/s10620-012-2136-1>
- Yang, W. S., & Stockwell, B. R. (2016). Ferroptosis: Death by Lipid Peroxidation. *Trends in Cell Biology*, 26(3), 165–176. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2015.10.014>
- Yu, H., Guo, P., Xie, X., Wang, Y., & Chen, G. (2017). Ferroptosis, a new form of cell death, and its relationships with tumourous diseases. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 21(4), 648–657. <https://doi.org/10.1111/jcmm.13008>
- Yu, J., & Wang, J. qing. (2021). Research mechanisms of and pharmaceutical treatments for ferroptosis in liver diseases. *Biochimie*, 180(100), 149–157. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2020.11.002>
- Yuan, Y., Cao, W., Zhou, H., Qian, H., & Wang, H. (2021). CLTRN, Regulated by NRF1/RAN/DLD Protein Complex, Enhances Radiation Sensitivity of Hepatocellular Carcinoma Cells Through Ferroptosis Pathway. *International Journal of Radiation Oncology*Biophysics*, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2020.12.062>
- Zhang, P., Liu, C., Wu, W., Mao, Y., Qin, Y., Hu, J., Hu, J., Fu, J., Hua, D., & Yin, J.

(2021). Triapine/Ce6-loaded and lactose-decorated nanomicelles provide an effective chemo-photodynamic therapy for hepatocellular carcinoma through a reactive oxygen species-boosting and ferroptosis-inducing mechanism. *Chemical Engineering Journal*, 425. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2021.131543>