



universidad
de león



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES

**PAPEL DE LA AUTOFAGIA EN
HEPATOCARCINOGENÉESIS Y EN EL
TRATAMIENTO DEL HEPATOCARCINOMA**

**ROLE OF AUTOPHAGY IN
HEPATOCARCINOGENESIS AND IN THE
TREATMENT OF HEPATOCARCINOMA**

Autor: Víctor Rodríguez Cordero
GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

Julio, 2020

ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN	1
1.1.	Autofagia	1
	• Mecanismo molecular de la autofagia	3
	• Funciones de la autofagia	5
1.2.	Hepatocarcinoma	7
2.	OBJETIVOS	11
3.	MATERIALES Y MÉTODOS	11
3.1.	Definición pregunta de investigación: Sistema PICOC	11
3.2.	Búsqueda de información	12
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	13
4.1.	Rutas de señalización celular implicadas	13
	• Vía PI3K/AKT/mTOR	13
	• Vía ERK/MAPK o RAF/MEK/ERK	14
	• Vía de Wnt/ β -catenina	14
	• Otras vías implicadas	15
4.2.	Papel dual de la autofagia en CHC	15
	• Rol supresor tumoral de la autofagia	16
	• Rol promotor tumoral de la autofagia	18
4.3.	Autofagia y quimiorresistencia en CHC	22
	• Resistencia a la TACE por autofagia	22
	• Resistencia a tratamientos sistémicos por autofagia	22
4.4.	Valor terapéutico y pronóstico	24
	• Autofagia en el diagnóstico del CHC	24
	• Autofagia en el tratamiento del CHC	25
5.	CONCLUSIONES	26
6.	REFERENCIAS	27

RESUMEN

El hepatocarcinoma o carcinoma hepatocelular (CHC) es el tipo de cáncer hepático más frecuente (90%) y presenta una elevada tasa de mortalidad, debido principalmente a su diagnóstico tardío. La autofagia es un proceso catabólico de degradación lisosomal que permite tanto el reciclaje de elementos celulares como el mantenimiento de la homeostasis en los tejidos.

La relación entre autofagia y CHC varía en función del contexto celular y del estadio del cáncer. Inicialmente la autofagia favorece el mantenimiento de la homeostasis de tejidos y estabilidad genómica parece ser clave en la prevención de la hepatocarcinogénesis. Sin embargo, una vez se ha establecido el tumor, la autofagia adquiere un rol promotor tumoral, permitiendo a las células de CHC soportar el estrés característico del microambiente tumoral, promoviendo tanto su progresión como el posterior desarrollo de quimiorresistencia.

La influencia de la autofagia en la hepatocarcinogénesis y su contribución en la progresión tumoral y en la adquisición de resistencias parece indicar que el empleo de marcadores propios de autofagia, como LC3, así como la modulación autofágica en el tratamiento del CHC, pueden ser estrategias fundamentales para conseguir una mejora en el diagnóstico, tratamiento y, en definitiva, en la supervivencia general de los pacientes de CHC.

Palabras clave: autofagia, hepatocarcinogénesis, hepatocarcinoma, quimiorresistencia

ABSTRACT

Hepatocarcinoma or hepatocellular carcinoma (HCC) is the most frequent type of liver cancer (90%) and presents a high mortality rate, mainly due to its late diagnosis. Autophagy is a catabolic process of lysosomal degradation that allows both the recycling of cellular elements and the maintenance of homeostasis in tissues.

The relationship between autophagy and HCC varies depending on the cellular context and the stage of the cancer. Initially autophagy assists in the maintenance of tissue homeostasis and genomic stability appears to play a key role in the prevention of hepatocarcinogenesis. However, once the tumor has been established, autophagy acquires a tumor-promoting role, allowing HCC cells to withstand the characteristic stress of the tumor microenvironment, promoting both its progression and the subsequent development of chemoresistance.

The influence of autophagy on hepatocarcinogenesis and its contribution to tumor progression and resistance acquisition suggests that the use of autophagy markers, such as LC3, as well as autophagic modulation in the treatment of HCC, may be fundamental strategies to achieve an improvement in the diagnosis, treatment and, ultimately, in the overall survival of HCC patients.

Keywords: autophagy, hepatocarcinogenesis, hepatocarcinoma, chemoresistance

Abreviatura	Significado
3' UTR	Región 3' no traducida
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AFP	Alfa-fetoproteína
AMP	Adenosín monofosfato
AMPK	Proteína quinasa activada por adenosín monofosfato
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ATG	Genes codificantes para proteínas ligadas a autofagia
Atg	Proteínas ligadas a autofagia
ATP	Adenosín trifosfato
Bcl-2	Proteína 2 detectada en linfoma de células B
BCLC	<i>Barcelona Clinic Liver Cancer</i>
BNIP3	Proteína 3 que interactúa con Bcl-2
BNIP3L	Proteína semejante a la proteína 3 que interactúa con Bcl-2
CAT	Ciclo de los ácidos tricarbónicos
CHC	Hepatocarcinoma
CMA	Autofagia mediada por chaperonas
CSC	Células troncales cancerosas
DAMP	Patrones moleculares asociados a daño
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
EMT	Transición epitelio-mesénquima
ERO	Especies reactivas del oxígeno
FIP200	Proteína de 200 kDa de interacción con la familia de las quinasas de adhesión focal
GTP	Guanosín trifosfato
HGDN	Nódulos con alto grado de displasia
HIF-1α	Factor inducible por hipoxia 1 α
Hsc70	Proteína de choque térmico de 70 kDa
IFN-γ	Interferón gamma
IGF	Factor de crecimiento insulínico
IGFR	Receptor del factor de crecimiento insulínico

IL	Interleucina
IR	Resistencia a la insulina
KEAP1	Proteína asociada a ECH tipo Kelch 1
KFERQ	Código pentapéptido de la secuencia de aminoácidos Lys-Phe-Glu-Arg-Gln
LAMP-2A	Proteína de membrana asociada al lisosoma tipo 2A
LC3	Proteína 1 asociada a la cadena ligera 3 de los microtúbulos
LGDN	Nódulos pre-cancerosos con una displasia leve
lncARN	Ácido ribonucleico largo no codificante
LPS	Lipopolisacárido
MAPK	Proteínas quinasas activadas por mitógenos
MDR	Resistencia a múltiples fármacos
miARN	Micro ácido ribonucleico
mTOR	Diana de la rapamicina en mamíferos
mTORC1	Complejo 1 de la diana de la rapamicina en mamíferos
mTORC2	Complejo 2 de la diana de la rapamicina en mamíferos
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NAFLD	Enfermedad de hígado graso no alcohólica
NASH	Esteatohepatitis no alcohólica
ncARN	Ácido ribonucleico no codificante
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NF-κB	Factor de transcripción nuclear kappa B
NIH	<i>National Institutes of Health</i>
NRF2	Factor nuclear eritroide 2
PDGFR	Receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas
PE	Fosfatidiletanolamina
PERK	Quinasa del retículo endoplasmático semejante a la proteína quinasa R
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinasa
PIP2	Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato
PIP3	Fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato
PTEN	Fosfatidilinositol 3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa
PTENP1	Pseudogén 1 de PTEN
RE	Retículo endoplasmático

SNARE	Receptores de proteínas de fijación al factor sensible a N-etilmaleimida soluble
TACE	Quimioembolización transarterial
TAM	Macrófagos asociados al tumor
TERT	Telomerasa transcriptasa inversa
TFEB	Factor de transcripción EB
TNFAIP8	Proteína 8 inducida por el factor de necrosis tumoral α
TNFα	Factor de necrosis tumoral α
ULK	Quinasa semejante a unc-51
UPR	Respuesta a proteínas mal plegadas
UPS	Sistema ubiquitina-proteasoma
VEGFR	Receptor del factor de crecimiento endotelial vascular
VHB	Virus de la hepatitis B
VHC	Virus de la hepatitis C
VPS	Proteína de clasificación vacuolar
WIPI	Proteína que interacciona con fosfoinositoles con repeticiones WD
YAP	Proteína asociada a Yes

1. INTRODUCCIÓN

Durante la actividad celular los componentes celulares sufren desgaste y son sometidos a diversos episodios de estrés, provocando en ellos alteraciones que puedan causar un importante daño celular. De este modo, proteínas y orgánulos con elevada vida media pueden acumularse en la célula y llegar a ser lesivos (Ravanan *et al.*, 2017). El daño celular es por tanto derivado de la propia naturaleza de la célula, aunque factores externos o procesos patológicos pueden suponer un estrés añadido.

Para evitar este deterioro y lograr mantener la homeostasis en órganos y tejidos, las células presentan mecanismos propios encargados de salvaguardar la integridad celular, como pueden ser la apoptosis, el sistema antioxidante asociado al glutatión o la autofagia (Umemura *et al.*, 2016; D'Arcy, 2019).

1.1. AUTOFAGIA

El procedimiento habitual por el cual se eliminan proteínas de corta vida media consiste en su marcaje selectivo con ubiquitina (ubiquitinización) y posterior degradación en proteasoma, constituyendo el denominado sistema ubiquitina-proteasoma (UPS). Sin embargo, proteínas de mayor vida media y orgánulos completos, así como material proveniente de la membrana plasmática y del exterior celular, son degradados por un proceso de autofagia asociado a enzimas lisosomales (Mizushima y Komatsu, 2011).

La autofagia, por tanto, es un proceso catabólico de degradación lisosomal para el reciclaje de elementos celulares, como proteínas mal plegadas, orgánulos dañados o vesículas provenientes del exterior celular. Su acción hace posible la renovación de componentes citosólicos, evitando la acumulación de elementos deteriorados que podrían ocasionar efectos adversos. Al mismo tiempo, la autofagia permite la obtención de moléculas que pueden emplearse posteriormente en la síntesis de nuevos constituyentes (Khandia *et al.*, 2019).

Existen diversas variantes del proceso de autofagia en función de la forma en que se introducen los componentes a degradar en el lisosoma (Figura 1):

- **Autofagia mediada por chaperonas (CMA):** La internalización de proteínas a degradar ocurre por la intervención de chaperonas, principalmente la proteína de choque térmico de 70 kDa (Hsc70), que seleccionan la carga por reconocimiento del

pentapéptido KFERQ. Esta secuencia de aminoácidos suele ubicarse en regiones hidrófobas de la proteína, por lo que solo quedaría expuesta hacia el exterior si el plegamiento no es el adecuado. Así, la CMA constituye un mecanismo por el que las proteínas mal plegadas son identificadas y transportadas al interior del lisosoma para su degradación (Kirchner *et al.*, 2019). En la entrada al lisosoma participa la proteína de membrana asociada al lisosoma tipo 2A (LAMP-2A), que actúa como receptor y permite la posterior internalización de proteínas a través de un complejo multimérico de translocación (Mizushima y Komatsu, 2011).

- **Microautofagia:** La invaginación de la membrana lisosomal permite, de forma no selectiva, la captación directa de proteínas citosólicas. Así, se forman vesículas internas, cuyo interior será degradado por proteasas lisosomales (Ravanan *et al.*, 2017; Khandia *et al.*, 2019).
- **Macroautofagia:** En este caso, la captación de materiales citosólicos se produce mediante la formación de una membrana de aislamiento, el fagóforo, que se va elongando hasta formar una vesícula de doble membrana denominada autofagosoma. Durante este proceso, se produce la captación de materiales citosólicos, ya sea de forma no selectiva o mediante proteínas adaptadoras que permitan la selección de la carga. Según el tipo de carga podemos distinguir diferentes tipos de procesos como mitofagia, lipofagia o xenofagia, las cuales son ejemplos de captación selectiva de mitocondrias, gotas lipídicas o patógenos, respectivamente (Khandia *et al.*, 2019). Se trata así de un procedimiento semejante al UPS, dado que la principal vía de señalización de la carga es su marcaje por ubiquitina (Hewitt y Korolchuk, 2017). Una vez formado, el autofagosoma se fusionará con un lisosoma y dará lugar al autolisosoma, dentro del cual se produce la degradación de la carga (Mizushima y Komatsu, 2011). De forma previa a esta unión, el autofagosoma también puede fusionarse con otros endosomas del citosol y originar un anfisoma (Hewitt y Korolchuk, 2017).

De los tres tipos de autofagia el proceso más común es el tercero (Hewitt y Korolchuk, 2017; Morishita y Mizushima, 2019); así en el presente trabajo, y tal como suele ocurrir en la mayoría de la literatura científica, cuando no se indique lo contrario el término general de autofagia lo usaremos para referirnos a la macroautofagia.

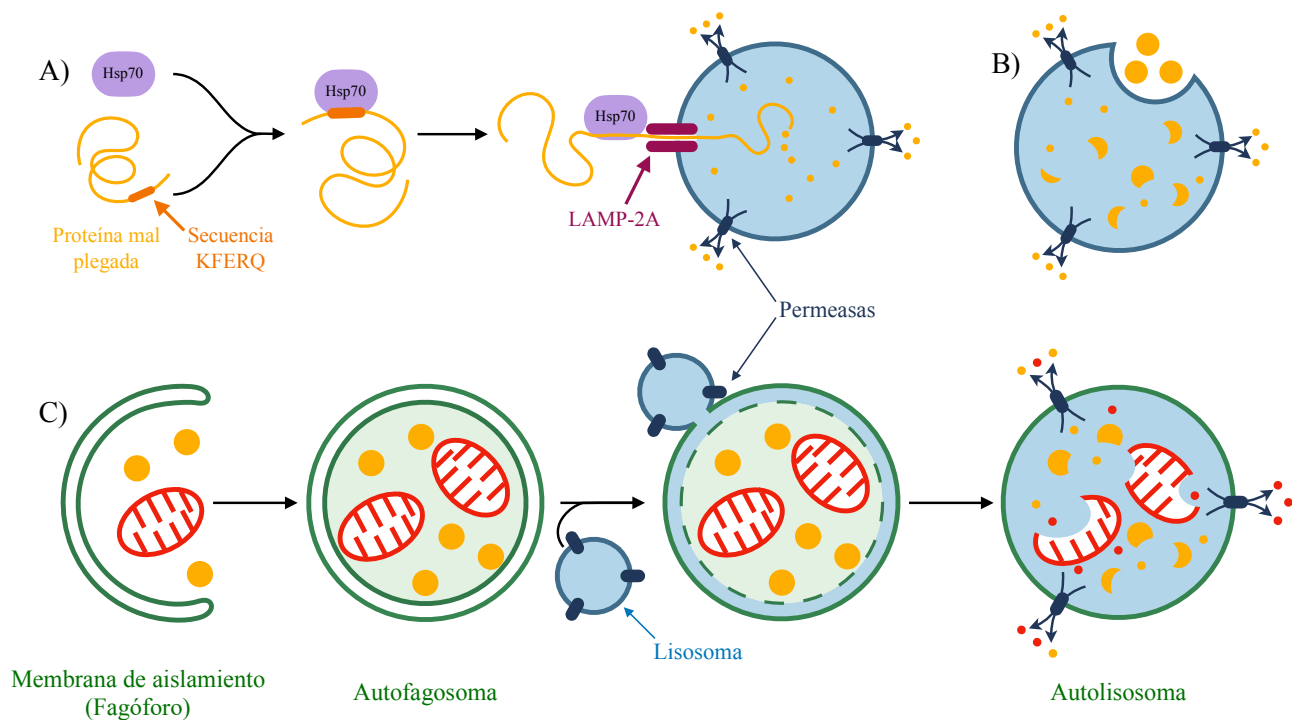


Figura 1: Esquema de los tres tipos distintos de autofagia: A) Autofagia mediada por chaperonas, B) Microautofagia y C) Macroautofagia. Figura de elaboración propia.

- **Mecanismo molecular de la autofagia**

El mecanismo molecular de la autofagia es complejo y se encuentra regulado por una amplia batería de genes que codifican para proteínas ligadas a la autofagia (*ATG*), de las que actualmente hay descritas más de 40 diferentes (Morishita y Mizushima, 2019). El proceso se detalla a continuación, y se representa de forma esquematizada en la Figura 2.

El proceso de **nucleación** o formación del fagóforo se desencadena en situaciones de falta de nutrientes o bajo un determinado estrés celular. En estas circunstancias, el complejo 1 de la diana de la rapamicina en mamíferos (mTORC1) se inactiva, permitiendo el ensamblaje y activación del complejo quinasa semejante a unc-51 (ULK) (Hurley y Young, 2017), el cual se encuentra constituido por distintas proteínas (Figura 2A): ULK1 (Atg1 en levaduras), Atg13, Atg101 y la proteína de 200 kDa de interacción con la familia de las quinasas de adhesión focal (FIP200) (Hewitt y Korolchuk, 2017). Tras su activación, ULK se localiza en el entorno del retículo endoplasmático (RE), donde activa y libera a Beclin-1 (Atg6 en levaduras) de la proteína 2 detectada en linfoma de células B (Bcl-2) (Parzych y Klionsky, 2014; Yu *et al.*, 2018) para el posterior reclutamiento del resto de componentes del complejo fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) (Figura 2B): Atg14L y las proteínas de clasificación vacuolar 34 y 15 (VPS34 y VPS15) (Liu *et al.*, 2017). El complejo produce fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP3) en la membrana del RE, generando dominios enriquecidos en esta molécula con una curvatura

pronunciada en forma de letra griega omega (Ω): el omegasoma. Esta estructura es el principal constituyente que dará lugar al fagóforo, pero también participan endosomas y otros orgánulos como mitocondrias o el aparato de Golgi (Yu *et al.*, 2018).

Una vez concluida la nucleación, se da paso a la etapa de **elongación** o formación del autofagosoma (Parzych y Klionsky, 2014). En esta etapa interviene un sistema de conjugación del tipo ubiquitina, en el que las proteínas Atg7 y Atg10 permiten la formación del complejo Atg12–Atg5-Atg16L1 (Figura 2C), que se asociará a la membrana del fagóforo para promover la elongación de la membrana y se liberará al concluir la formación del autofagosoma (Parzych y Klionsky, 2014). Un segundo sistema de conjugación del tipo ubiquitina actúa sobre la proteína 1 asociada a la cadena ligera 3 de los microtúbulos (LC3) (Figura 2D), una proteína de la familia Atg8 con 3 isoformas distintas (LC3A, LC3B y LC3C), siendo LC3B (de ahora en adelante LC3) la asociada con el nivel de autofagia (Koukourakis *et al.*, 2015; Meng *et al.*, 2020). Inicialmente, LC3 es transformada por Atg4 en LC3-I, un intermediario que posteriormente será transformado en su forma lipídica (LC3-II), es decir, unido a fosfatidiletanolamina (PE), en un proceso facilitado por el complejo Atg12–Atg5-Atg16L1 y dependiente de Atg3 y Atg7 (Parzych y Klionsky, 2014; Hewitt y Korolchuk, 2017). El papel exacto de LC3-II no está del todo determinado, pero sí resulta importante su participación en el proceso de selección de la carga del autofagosoma. En este aspecto, p62, una proteína ampliamente conservada en células animales (Mizushima y Komatsu, 2011), posee distintos motivos de unión que le permiten la interacción con elementos poliubiquitinados y con LC3 (Morishita y Mizushima, 2019). La unión a LC3 implica su anclaje a la superficie de la membrana del fagóforo y, su posterior unión a elementos marcados con ubiquitina, hace que estos materiales sean incorporados al interior del autofagosoma (Mizushima, 2007). Así, pese a que multitud de materiales del citosol son englobados de forma no selectiva durante la formación del autofagosoma, también existen mecanismos específicos para la selección de la carga (Morishita y Mizushima, 2019).

Cuando concluye la formación de la doble membrana del autofagosoma, el citoesqueleto y las proteínas motoras (como la kinesina y la dineina) facilitan la aproximación del lisosoma y el autofagosoma. La interacción de sus receptores de proteínas de fijación al factor sensible a N-etilmaleimida soluble (SNARE) permiten la **fusión** de la membrana lisosomal con la membrana externa del autofagosoma, y la posterior degradación de la membrana interna y de todo el contenido del autolisosoma por acción de las hidrolasas lisosomales (Yu *et al.*, 2018).

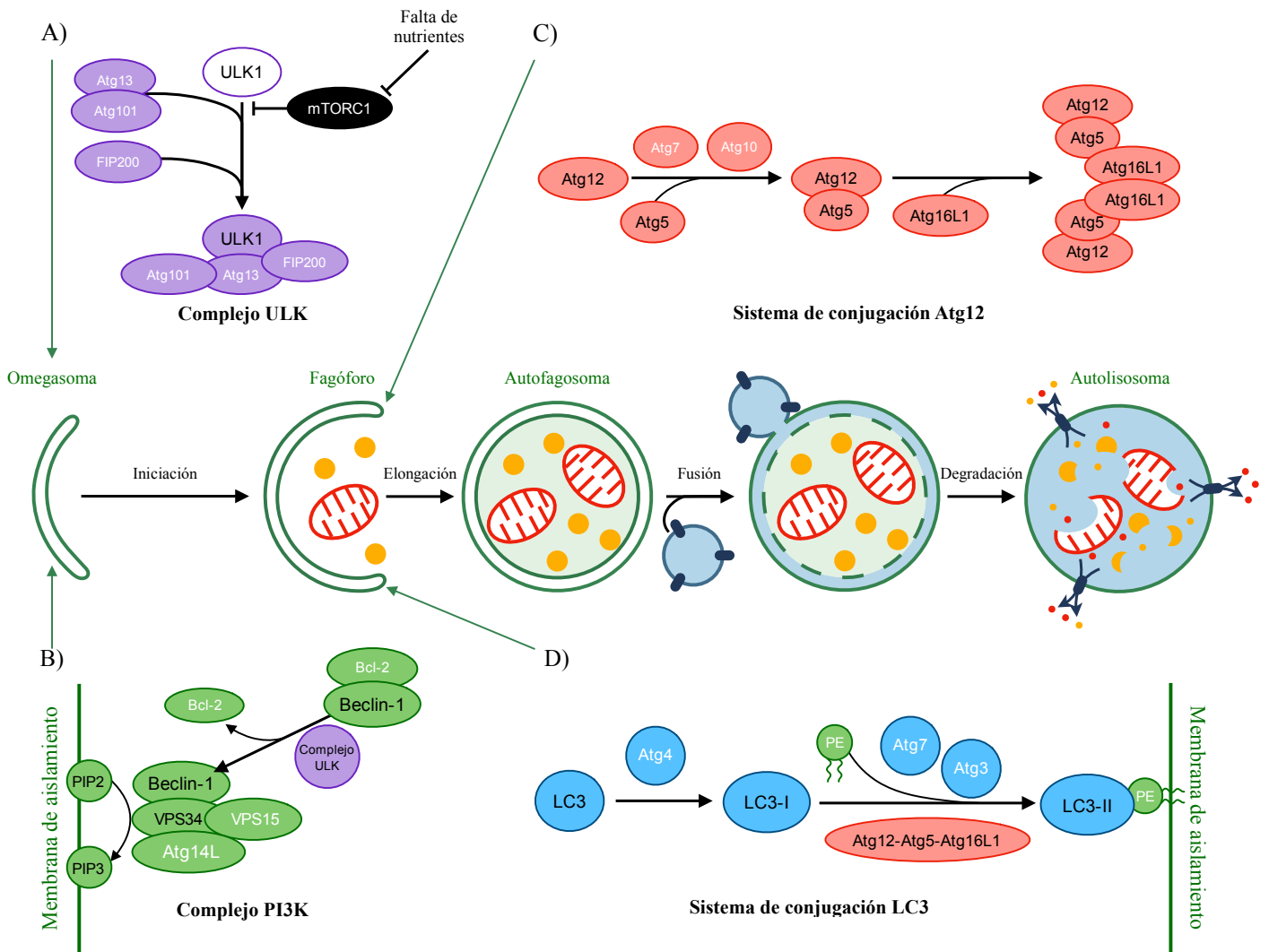


Figura 2: Esquema detallado del mecanismo molecular de la autofagia. En la fase de iniciación o formación del fagóforo se observa la participación de los complejos ULK (A) y PI3K (B). Durante la fase posterior de elongación del fagóforo intervienen los dos sistemas de conjugación del tipo ubiquitina: el sistema de conjugación Atg12 (C) y el sistema de conjugación LC3 (D). Figura de elaboración propia.

Para finalizar, es conveniente remarcar que en todo el mecanismo descrito anteriormente intervienen otras moléculas, como pueden ser Atg9 en el reclutamiento de enzimas requeridas en el proceso o la proteína que interacciona con fosfoinosítoles con repeticiones WD (WIPI) en la formación del autofagosoma y la lipidación de LC3-I a LC3-II (Parzych y Klionsky, 2014; Liu *et al.*, 2017).

• Funciones de la autofagia

Como ya indicamos anteriormente, es importante destacar que la autofagia es un proceso fisiológico, que ocurre a niveles basales para mantener la homeostasis en los tejidos. Así, la autofagia promueve la estabilidad genómica ya sea de forma indirecta, reduciendo los niveles de especies reactivas del oxígeno (ERO) que conducen al daño del ácido desoxirribonucleico

(ADN) mitocondrial; o de forma directa, al degradar algunos de los componentes nucleares implicados en la regulación de la reparación del ADN (Hewitt y Korolchuk, 2017). Estos efectos pro-supervivencia destacan especialmente en el hígado, dado que su alta actividad metabólica hace que los hepatocitos presenten un RE muy desarrollado y gran cantidad de enzimas lisosomales, mitocondrias y gotas lipídicas (Zhou *et al.*, 2018). Estas características hacen de la autofagia un proceso fundamental en este órgano, reduciendo la lipotoxicidad (Ravanan *et al.*, 2017) y la carcinogénesis (Mizushima y Komatsu, 2011).

Determinados tipos de estrés celular pueden activar la autofagia, como pueden ser la falta de oxígeno (hipoxia), la falta de nutrientes (principalmente aminoácidos, aunque también otros como factores de crecimiento), el daño mitocondrial o la infección por patógenos (Hewitt y Korolchuk, 2017). De entre estos tipos de estrés, la autofagia destaca especialmente por su función en situaciones de escasez de nutrientes, algo que ocurre en momentos de ayuno prolongado, en procesos patológicos como el cáncer o en etapas del desarrollo y diferenciación celular (Morishita y Mizushima, 2019). En estas circunstancias, la autofagia permite la obtención de aminoácidos que serán empleados posteriormente para la síntesis de proteínas que intervienen en el propio proceso de autofagia, como pueden ser enzimas lisosomales, antioxidantes u otras proteínas implicadas en la síntesis aminoacídica (Mizushima y Komatsu, 2011). Sin embargo, los aminoácidos liberados también pueden ser transformados en intermediarios del ciclo de los ácidos tricarbónicos (CAT), destinándose de este modo a la producción de energía en forma de adenosín trifosfato (ATP) (Rabinowitz y White, 2010), e incluso existen indicios que señalan la participación de aminoácidos en procesos de gluconeogénesis hepática (Rabinowitz y White, 2010).

Por último, la autofagia también puede relacionarse con células en proceso de muerte. La apoptosis es un tipo de muerte celular programada en la que los componentes celulares son destruidos por la acción de enzimas caspasas y, posteriormente, son incorporados al interior de cuerpos apoptóticos que pueden ser fagocitados para su eliminación final (D'Arcy, 2019). La activación en cascada de las caspasas se desencadena por dos vías distintas: una dependiente de factores liberados por las mitocondrias (vía intrínseca) y otra a partir de la interacción con células dañadas o del sistema inmune (vía extrínseca) (D'Arcy, 2019). La relación entre autofagia y apoptosis es compleja, hasta tal punto que inicialmente no se conocía con exactitud si la autofagia era la causa de la apoptosis o más bien era un mecanismo desencadenado por la célula a fin de intentar librar una última batalla frente a la muerte (Hewitt y Korolchuk, 2017).

El vínculo principal que conecta ambos procesos es la vía intrínseca de la apoptosis, dado que la mitofagia permite la eliminación de mitocondrias dañadas, cuya permeabilidad puede resultar alterada y derivar en la liberación tanto de ERO como de factores pro-apoptóticos localizados en su interior (como el citocromo c o la molécula Smac/Diablo) (Wang, 2015). Además, existen proteínas reguladoras comunes a ambos procesos, como pueden ser p53, Atg5 o la proteína anti-apoptótica Bcl-2, la cual presenta un dominio BH3 de unión a proteínas que le permite unirse a Beclin-1 e impedir la formación del complejo PI3K (Wang, 2015). Todo ello crea una compleja interacción entre ambos procesos en la que, si bien es cierto que la autofagia normalmente previene la activación de la apoptosis, un exceso de actividad de la autofagia puede conducir a la muerte celular por apoptosis, habiéndose incluso descrito procesos de “autosis” en los que la autofagia desencadena la muerte celular por un mecanismo dependiente de la ATPasa Na⁺/K⁺ (Denton y Kumar, 2019).

En este apartado ya se avanza lo que se desarrollará posteriormente, y es que la autofagia es un proceso fundamental tanto para la supervivencia de la célula como para inducir su muerte, jugando así un doble papel que indica su importante contribución en la homeostasis de los tejidos.

1.2. HEPATOCARCINOMA

El cáncer hepático constituye uno de los principales problemas de salud pública. Con casi 782.000 muertes en 2018, es el cuarto tipo de cáncer con mayor mortalidad y el sexto con mayor incidencia en el mundo: más de 840.000 nuevos casos al año (Cancer Today, 2018). Si se atiende a la distribución por sexos, los datos de 2018 afirman que un 70% de los casos fueron diagnosticados en hombres, lo que lo hace el quinto tipo de cáncer más común y el segundo con mayor mortalidad en este sexo (Cancer Today, 2018). Dentro del cáncer primario hepático, el hepatocarcinoma o carcinoma hepatocelular (CHC) constituye entre el 85% y 90% de los casos diagnosticados (Llovet *et al.*, 2016).

La causa principal del CHC es la infección por virus de la hepatitis B (VHB) y C (VHC). El VHB es un virus ADN capaz de causar mutaciones por inserción en el genoma del individuo afectado y suele ir relacionado con un cuadro cirrótico en más del 85% de los casos. Por otro lado, el VHC presenta ácido ribonucleico (ARN) como material genético y conduce, generalmente, al desarrollo de fibrosis y posteriormente cirrosis (Llovet *et al.*, 2016). El hecho de que la causa principal sea la infección por VHB y VHC, hace que la distribución geográfica

del CHC esté notablemente influenciada por la distribución geográfica de estos virus. Así, un 80% de los casos ocurren en zonas de África subsahariana y en el este de Asia (zonas con alta prevalencia a la infección por VHB), mientras que en Norteamérica, Europa y Japón los casos se encuentran principalmente vinculados al VHC (Forner *et al.*, 2018). En estas zonas geográficas, la disminución de la incidencia de la infección crónica por el VHB ha venido determinada por los programas de vacunación contra la hepatitis B, lo que de forma indirecta se manifiesta también en un descenso de la incidencia del CHC (Llovet *et al.*, 2016).

Existen, sin embargo, otros factores de riesgo para el desarrollo del CHC, como son la aflatoxina B1 (especialmente en zonas de África y Asia) o las enfermedades metabólicas hereditarias (como la hemocromatosis o el déficit en α 1-antitripsina). Otros factores etiológicos que están cobrando cada vez más importancia en países más desarrollados son el consumo de alcohol, la diabetes de tipo II, la obesidad y el síndrome metabólico. Precisamente estos últimos factores han sido asociados con enfermedad de hígado graso no alcohólica (NAFLD), esteatohepatitis no alcohólica (NASH) o cirrosis alcohólica, todas ellas ligadas al desarrollo del CHC (Llovet *et al.*, 2016; Forner *et al.*, 2018; Anstee *et al.*, 2019; Villanueva, 2019).

De esta forma, la etiología del CHC es compleja y viene influenciada por otras múltiples patologías hepáticas previas que pueden derivar en el origen de la neoplasia.

En la mayoría de casos, el desarrollo de la enfermedad se produce a partir del estado cirrótico. Así, existe una progresión desde el hígado sano, que dará paso a la inflamación, fibrosis y finalmente un estado de cirrosis, ocasionando un daño hepático crónico que puede derivar en CHC (Villanueva, 2019). Durante la cirrosis, el hígado sufre un depósito de proteínas matriciales (como el colágeno) en el parénquima hepático (Kanda *et al.*, 2019). Esto origina que parte del tejido hepático se estructure en una serie de nódulos separados por cicatrices de tejido conjuntivo. Inicialmente se trata de nódulos pre-cancerosos con una displasia leve (LGDN), que acabarán por originar nódulos con alto grado de displasia (HGDN) y finalmente pueden dar lugar al CHC (Llovet *et al.*, 2016).

Desde el punto de vista molecular, el CHC se puede asociar con distintas mutaciones en el ADN celular. En cada nódulo hay un promedio de 40 modificaciones, por lo que cada uno de ellos presenta una combinación única de alteraciones genéticas y epigenéticas, otorgando gran variabilidad a este tipo de tumores (Llovet *et al.*, 2016). Sin embargo, de entre todas estas mutaciones existen algunas que aparecen con mayor frecuencia, y que por tanto pueden ser las

causantes del desarrollo y la progresión tumoral, ejerciendo de este modo como genes conductores al CHC. Así en la mayoría de los casos (90%), se sobreexpresa la enzima telomerasa, haciendo que el hepatocito logre evitar, al menos en parte, la senescencia celular. Ello es consecuencia de mutaciones producidas principalmente (60% de los casos) en los puntos calientes de mutación localizados en el promotor del gen de la telomerasa transcriptasa inversa (*TERT*) (Llovet *et al.*, 2016; Villanueva, 2019); en estas zonas es frecuente que se produzca la inserción del material genético del VHB asociado a CHC (Kanda *et al.*, 2019). Otras de las mutaciones más frecuentes que afectan al desarrollo del CHC son, por un lado, aquellas que activan las vías de Wnt/ β -catenina (66% de los casos), de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) (30%), de PI3K/AKT/mTOR (45%) y la ruta del factor nuclear eritroide 2 y la proteína asociada a ECH tipo Kelch 1 (NRF2/KEAP1) frente al estrés oxidativo (19%); por otro lado, comprende la inactivación de p53/Retinoblastoma (72% de los casos), además de afectar al estado de la cromatina (67%) y otras regulaciones epigenéticas (Psyrrri *et al.*, 2012; Couri y Pillai, 2019; Kanda *et al.*, 2019).

Ante esta variabilidad en los tumores, a la hora de seleccionar un tratamiento adecuado para la enfermedad se tiene que valorar el estadio y las características específicas del cáncer. Para ello existen guías concretas, entre las que destaca el algoritmo *Barcelona Clinic Liver Cancer* (BCLC) (Figura 3). El algoritmo BCLC categoriza al tumor en 5 estadios distintos con un valor pronóstico y terapéutico determinado. Cada estadio se define por la carga de tumor (incluye tanto el número como el tamaño de los nódulos) y por la existencia o no de invasión a otros tejidos, así como el grado en que se mantiene la función hepática (evaluado siguiendo la escala Child-Pugh) (Psyrrri *et al.*, 2012; Couri y Pillai, 2019).

Como se observa en la Figura 3, la variedad en los tratamientos y las perspectivas de curación dependen del diagnóstico aportado por el BCLC. Los pacientes en estadio temprano (BCLC-A) o muy temprano (BCLC-0) son sometidos a una intervención quirúrgica en el hígado (ablación, resección o trasplante en función del número y tamaño de los nódulos). En este sentido, los pacientes se someten a este tratamiento debido a que presentan mayor capacidad para retomar la función hepática y, además, presentan un mejor pronóstico que en los siguientes casos. Así, en el estadio intermedio (BCLC-B) el paciente presenta pocas posibilidades de recuperarse y de que se elimine completamente el tumor por cirugía, por lo que se emplea quimioembolización transarterial (TACE). En los estadios más avanzados (BCLC-C) la cirugía no se toma como opción, pues el tumor está ampliamente extendido. En estos casos se emplea

un tratamiento sistémico con sorafenib o lenvatinib (fármacos de primera línea frente al CHC avanzado). En caso de que el sorafenib no sea eficaz existen tratamientos de segunda línea como el regorafenib, pero aun así la esperanza de vida de los pacientes no es muy elevada. Si el estadio del CHC es terminal (BCLC-D), la esperanza de vida media del paciente es inferior a 3 meses. En este caso no existen tratamientos disponibles, sino que únicamente se administran cuidados paliativos (Psyrry *et al.*, 2012; American Cancer Society, 2019; Villanueva, 2019).

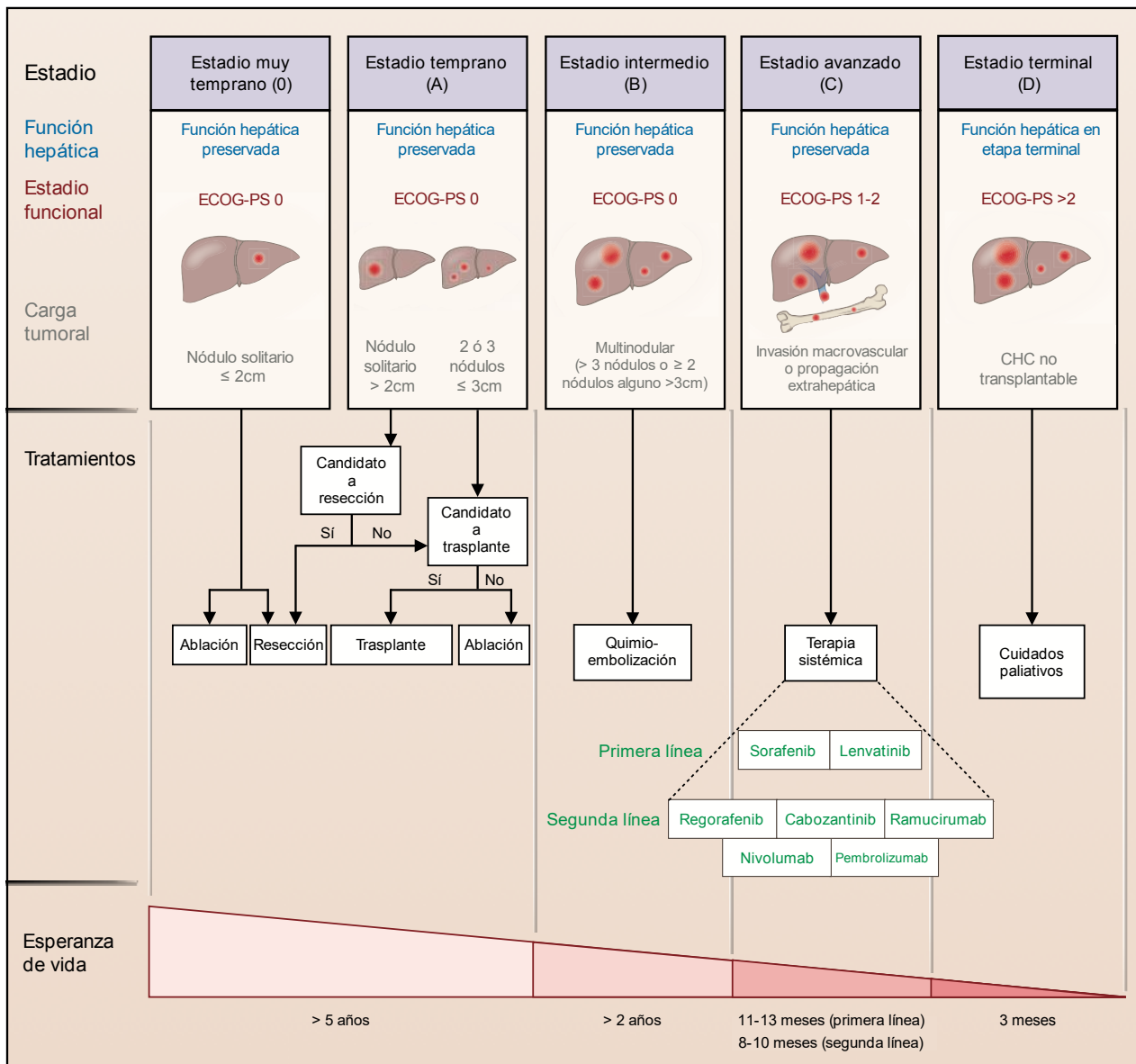


Figura 3: Algoritmo para el diagnóstico clínico del CHC. Se muestra, de arriba hacia abajo la clasificación del CHC según el algoritmo *Barcelona Clinic Liver Cancer* (BCLC), la función que presenta el hígado en ese estadio, su estadio según la guía *European Association for the Study of the Liver*, la carga o grado en el que se encuentra el tumor, los distintos tratamientos asociados a cada estadio del CHC y finalmente la esperanza de vida. Figura modificada de (Villanueva, 2019).

2. OBJETIVOS

Ante la baja supervivencia general, la difícil prognosis y la escasez de terapias disponibles para el tratamiento del CHC, la implicación de la autofagia tanto en la hepatocarcinogénesis como en la progresión tumoral ha hecho que sea considerada una posible diana en la que centrar los esfuerzos para lograr mejorar el diagnóstico y tratamiento de este tipo de cáncer. Por este motivo, el presente trabajo tiene como objetivo general el determinar el papel que juega la autofagia en diversos aspectos del CHC: etiología, diagnóstico y tratamiento. Para ello, nos proponemos los siguientes objetivos específicos:

- Determinar las rutas celulares comunes que se encuentran implicadas tanto en el desarrollo del CHC como en el mecanismo de la autofagia.
- Evaluar el papel que desempeña la autofagia en el proceso de hepatocarcinogénesis y más concretamente en el CHC.
- Identificar moléculas que participen en el proceso de autofagia y que puedan ejercer como marcadores para el diagnóstico del CHC, así como estudiar la modulación de la autofagia como posible diana en el tratamiento del CHC.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

En el trabajo se llevó a cabo una revisión sistemática de la literatura reciente. Con el fin de concretar el ámbito de estudio y formular la pregunta de investigación, se empleó el sistema PICOC (Centre for reviews and dissemination, 2009). Tras ello, se procedió a la búsqueda bibliográfica.

3.1. DEFINICIÓN PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN: SISTEMA PICOC

La estrategia PICOC permite seleccionar la información objeto de estudio. Su nombre hace referencia a las siglas de los elementos que la componen:

- Población (*Population*): Pacientes con CHC.
- Intervención (*Intervention*): Estudiar el papel de la autofagia en el CHC.
- Comparación (*Comparison*): Análisis de distintas fuentes bibliográficas para el estudio de la autofagia y el CHC, tanto por separado como la interacción entre ambos procesos.
- Resultado (*Outcome*): Una vez establecido el papel de la autofagia en el desarrollo del CHC, determinar si se puede obtener algún beneficio terapéutico o pronóstico de este proceso que pueda resultar de utilidad en la población de estudio.
- Contexto (*Context*): Selección de grupos de investigación biomédica, clínica o básica, implicados en el estudio de CHC y/o autofagia.

3.2. BÚSQUEDA DE INFORMACIÓN

Para la búsqueda de información se empleó como principal motor de búsqueda la página web de PubMed (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>), desarrollada por *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) y perteneciente a *National Institutes of Health* (NIH). En el anterior motor de búsqueda se introdujeron las palabras clave detalladas a continuación y se emplearon diversos filtros con el fin de obtener aquella información que resulte de interés. Así, la búsqueda se realizó de la siguiente forma:

- “*Autophagy*” AND (“HCC” OR “*Hepatocellular carcinoma*” OR “*Hepatocarcinogenesis*”), estando estos términos presentes tanto en el título como en el resumen del artículo. Como filtros adicionales se fijaron los siguientes criterios de inclusión: textos libres completos (*Free full text*), escritos en idioma inglés (*English*) y durante el período temporal comprendido entre las fechas 01/01/2016-31/03/2020. El resultado inicial de esta búsqueda fue de 336 artículos.
- Para eliminar resultados en los que el tema central no fuera la autofagia, se refinó la búsqueda anterior utilizando los términos: “*Autophagy*” AND (“HCC” OR “*Hepatocellular carcinoma*” OR “*Hepatocarcinogenesis*”), presentes únicamente en el título del artículo. Se mantuvieron los mismos criterios de inclusión que en la búsqueda anterior. El resultado de esta búsqueda fue de 132 artículos.
- A la búsqueda anterior se le incorporó el término “NOT *erratum*”, un criterio de exclusión con el que se eliminaron artículos retractados o de fuentes que permiten correcciones. La búsqueda resultante dejó un total de 127 artículos.
- Por último, se realizó la selección final de artículos, excluyendo aquellos que se centraran en otras enfermedades y no trataran únicamente sobre CHC. Debido al gran número de artículos y al espacio limitado del trabajo, también se excluyeron artículos en los cuales se evaluaba el papel que ejercían sustancias concretas sobre la autofagia con el fin de encontrar alguna aplicación como fármacos. En esta selección final se trató de incluir aquellos artículos publicados en revistas con mayor índice de impacto y con un mayor número de citas, siempre y cuando se cumplieran los criterios de inclusión/exclusión previamente descritos.

Finalmente, tras el cribado de la información se seleccionaron 35 artículos.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. RUTAS DE SEÑALIZACIÓN CELULAR IMPLICADAS

Las rutas celulares que vinculan autofagia y CHC son diversas (Figura 4) y, como se refleja en la introducción, se encuentran frecuentemente mutadas en células tumorales de CHC. En parte, ello explica la compleja y variable relación entre ambos procesos.

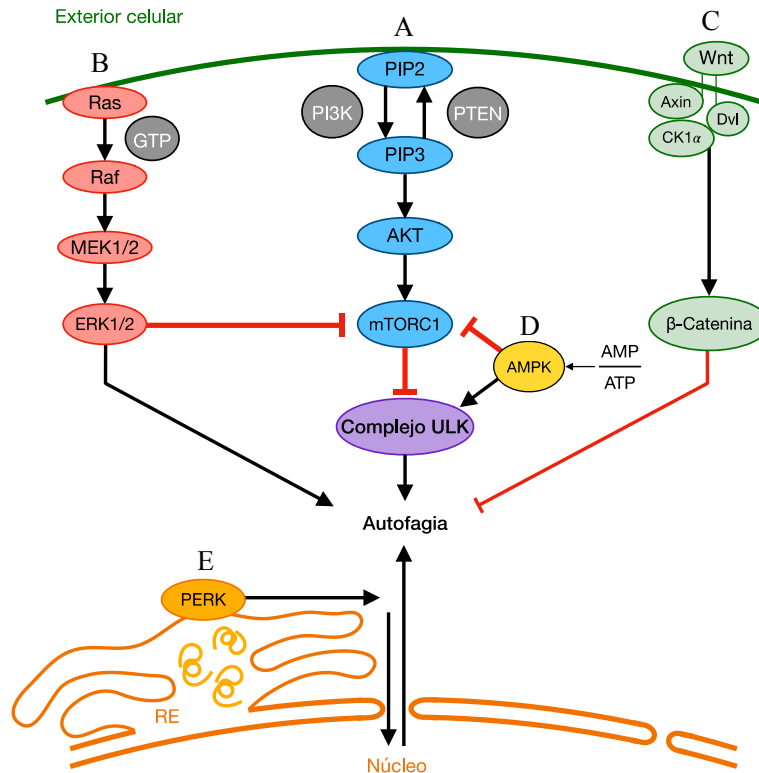


Figura 4: Esquema simplificado de las rutas de señalización intracelular implicadas en el desarrollo del CHC y autofagia. Las principales rutas celulares en las que convergen autofagia y CHC son las vías PI3K/AKT/mTOR (A), ERK/MAPK (B), Wnt/β-catenina (C), AMPK (D) y PERK (E). Figura de elaboración propia.

• Vía PI3K/AKT/mTOR

Tal como se indica en el punto 1.2., esta vía se encuentra mutada en un 45% de los casos de CHC por su capacidad de regular el crecimiento, supervivencia y metabolismo celulares, además de la apoptosis (promueve la síntesis de Bcl-2) (Zhou *et al.*, 2017; Yang *et al.*, 2019). La ruta se inicia cuando los factores de crecimiento activan los receptores localizados en la membrana plasmática, como es el caso del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). El receptor activa la PI3K, que a su vez permite la conversión del fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP2) en PIP3, el cual fosforila la serín-treonín quinasa AKT (Liu *et al.*, 2017). La activación completa de AKT se logra tras su fosforilación por el complejo 2 de mTOR (mTORC2) (Zhou *et al.*, 2017). En su forma activa (fosforilada), AKT actúa sobre múltiples dianas que frecuentemente conducen la inhibición de la autofagia, pero su principal relación con este proceso se produce a través de la fosforilación de mTORC1, un complejo capaz de

inhibir el complejo ULK, responsable de la iniciación de la autofagia (Liu *et al.*, 2017). La actividad de mTORC1 también permite la fosforilación e inhibición del factor de transcripción EB (TFEB), el cual está implicado en la transactivación de genes que codifican proteínas requeridas en la biogénesis de lisosomas, como hidrolasas y proteínas de membrana encargadas de mantener el pH ácido característico del interior lisosomal (Sheng *et al.*, 2018).

En el inicio de la ruta, la actividad de la fosfatidilinositol 3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa (PTEN) permitiría la conversión del PIP3 a su forma de PIP2, inactivando la ruta y los efectos proliferativos y pro-supervivencia que desencadena. PTEN ejerce así un papel supresor tumoral, por lo que suele presentar mutaciones o una expresión reducida en CHC (Liu *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2018a). El interés terapéutico de esta ruta es diverso, puesto que su inhibición dañaría la capacidad de proliferación y migración de células tumorales (Liu *et al.*, 2017), pero causaría un aumento en la autofagia que no siempre resulta beneficioso para el tratamiento del CHC (Yang *et al.*, 2019). Este aspecto se tratará en los siguientes apartados.

- **Vía ERK/MAPK o RAF/MEK/ERK**

Es una vía que también se encuentra frecuentemente mutada en CHC debido a que permite la iniciación y progresión del tumor, puesto que está implicada en la regulación del crecimiento celular, proliferación, supervivencia y diferenciación (Liu *et al.*, 2017). La ruta se inicia con la unión del ligando al receptor, por ejemplo, con la unión del factor de crecimiento insulínico (IGF) o el factor de crecimiento epidérmico (EGF) a sus respectivos receptores (IGFR y EGFR). Esta interacción desencadena una cascada de fosforilaciones sucesivas que se inician con la activación de Ras (proto-oncogén) y su unión al nucleótido guanósín trifosfato (GTP), fosforilando a RAF, esta a MEK y esta última a ERK. Finalmente, la quinasa ERK tiene múltiples sustratos, pero afecta a la autofagia principalmente inhibiendo mTORC1 y activando otros genes que participan en la autofagia, como los que codifican para LC3 o p62 (Yang *et al.*, 2019). La relación de esta vía con la autofagia está menos desarrollada en la bibliografía, pero sí se destaca el papel de la mutación BRAF como marcador pronóstico de alta probabilidad de recurrencia y mortalidad del CHC (Liu *et al.*, 2017).

- **Vía de Wnt/ β -catenina**

Presenta también una gran importancia en el desarrollo del CHC, encontrándose mutada en aproximadamente un 66% de los casos. Esta ruta se vincula con la proliferación celular, migración, invasión, progresión del ciclo celular, metástasis y apoptosis (Yang *et al.*, 2019). La

presencia del ligando Wnt lleva a la liberación de β -catenina, un factor de transcripción que se transloca al interior del núcleo para activar la transcripción de genes implicados en todos los procesos mencionados anteriormente, por lo que una mayor activación se vincula a un peor pronóstico. En situaciones de exceso de nutrientes, la activación de β -catenina inhibe la autofagia al reprimir la expresión de p62, pero cuando los nutrientes escasean, β -catenina se degrada en proteasoma tras su interacción con LC3 (Liu *et al.*, 2017; Yang *et al.*, 2019).

- **Otras vías implicadas**

La vía de la proteína quinasa activada por adenosín monofosfato (AMPK) también se encuentra mutada en un 30% de los casos. Su papel simula un sensor energético, dado que su activación depende del balance entre el adenosín monofosfato (AMP) y el ATP. En situaciones de baja energía el ATP disminuye, por lo que la ratio AMP/ATP aumenta y causa la activación de la AMPK, que induce la autofagia al inhibir mTORC1 y activar el complejo ULK (Sun *et al.*, 2017).

Otra ruta que también se encuentra implicada en la relación de autofagia con CHC es la vía de la quinasa del RE semejante a la proteína quinasa R (PERK). En este caso, la acumulación excesiva de proteínas mal plegadas en el RE ocasiona que se desencadene la respuesta a proteínas mal plegadas (UPR), en la que PERK provoca la activación de diversos factores de transcripción que conducen a la activación de la autofagia. Sin embargo, si la autofagia es insuficiente para vencer este estrés de RE, PERK también puede inducir la muerte celular por apoptosis (Liu *et al.*, 2017; Yang *et al.*, 2019).

4.2. PAPEL DUAL DE LA AUTOFAGIA EN CHC

Como ya se ha remarcado anteriormente, la autofagia presenta una actividad basal constitutiva que sirve de protección a la célula y garantiza el mantenimiento de la homeostasis en los tejidos (Liu *et al.*, 2017). Defectos en la autofagia, pueden llevar a la acumulación de proteínas, lípidos y mitocondrias dañadas, susceptibles de desencadenar diversos procesos patológicos como el cáncer o enfermedades neurodegenerativas. Sin embargo, también se ha descrito un aumento en los niveles de autofagia en células de CHC, hecho que sugiere que este proceso actúa como un arma de doble filo, pudiendo ejercer un papel como supresor o como promotor tumoral según el estadio del tumor (Figura 5) (Yazdani *et al.*, 2019).

- **Rol supresor tumoral de la autofagia**

El papel de la autofagia como supresor tumoral se justifica a través de su contribución en diversos mecanismos que protegen la integridad celular (Figura 5). La alteración de la autofagia es común en diversos tipos de cáncer, incluido el hepático. Concretamente, en CHC suelen detectarse diversas mutaciones que afectan este proceso, como la delección monoalélica y expresión reducida del gen de Beclin-1 (*BECN1*), o las delecciones en genes reguladores de la autofagia como *ATG5* y *ATG7*. Así, modelos animales han demostrado que la delección de cualquiera de estos genes conduce a la formación espontánea de adenomas benignos principalmente a nivel hepático (Liu *et al.*, 2017; Yang *et al.*, 2019; Mao *et al.*, 2020).

El CHC es un tipo de tumor que, desde su origen y durante todo su desarrollo, se encuentra asociado íntimamente a la inflamación. La autofagia es un proceso fundamental que disminuye la inflamación al prevenir la activación del inflammasoma. Además, la autofagia es el mecanismo por el que el interferón gamma (IFN- γ) inhibe la proliferación y promueve la muerte celular en el CHC. Un bloqueo de este proceso eliminaría los efectos del IFN- γ sobre las células del CHC (Liu *et al.*, 2017; Yazdani *et al.*, 2019).

El estrés de RE es otra de las causas vinculadas a la hepatocarcinogénesis, por su capacidad de causar inflamación, inestabilidad genómica, muerte celular y daño hepático. En condiciones fisiológicas, la UPR activa la autofagia mediante la vía PERK, evitando los efectos adversos de este tipo de estrés (Liu *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2017a). Sin embargo, un modelo de hepatocarcinogénesis en ratón ha demostrado que durante el desarrollo de CHC se produce la disminución en la expresión del gen *ATG9b*, causando la conversión defectiva de LC3 en su forma lipídica e impidiendo su interacción con p62. Así, la pérdida de *ATG9b* es suficiente para inhibir la autofagia, causando la formación de acúmulos de p62 con proteínas mal plegadas y derivando en estrés de RE especialmente en los hepatocitos peritumorales (Wang *et al.*, 2017a). La acumulación de p62, a su vez, causa múltiples efectos:

- a) Activación del factor de transcripción nuclear kappa B (NF- κ B) y estabilización de NRF2, los cuales inducen la transcripción de genes relacionados con la proliferación celular y la resistencia frente a estrés oxidativo, respectivamente. Esto contribuye al crecimiento y proliferación celular, dando inicio al CHC (Wang *et al.*, 2017a; Schwertheim *et al.*, 2019). Además, NF- κ B interviene en la respuesta inflamatoria, por lo que es un nexo común entre dos de los aspectos más característicos del CHC: el estrés de RE y la inflamación (Chen *et al.*, 2018).

- b) Formación de ERO e inhibición de la ubiquitinización de la histona H2A, facilitando el daño genético e impidiendo la reparación del ADN (Wang *et al.*, 2017a).
- c) Formación de agregados con proteínas ubiquitinadas que aumentan la expresión de proteínas lisosomales y de autofagia. Cuando el proceso de autofagia está dañado, esto implica el aumento en la acumulación de p62, formando los conocidos como cuerpos hialinos o cuerpos de Mallory-Denk, cuya presencia se vincula a un peor pronóstico del CHC (Schwertheim *et al.*, 2019; Yazdani *et al.*, 2019).

Así, la supresión de la autofagia puede conducir a la iniciación tumoral, puesto que facilita la proliferación y el daño celular e impide la respuesta de reparación del material genético (Schwertheim *et al.*, 2019; Yazdani *et al.*, 2019).

Estudios recientes también han revelado una mayor frecuencia en la presencia de inclusiones intranucleares en las células de CHC con respecto a células sanas (Schwertheim *et al.*, 2019). Estas inclusiones son vesículas membranosas aisladas que presentan en su interior moléculas que intervienen en la autofagia, como p62, LC3 y ubiquitina, junto a otras enzimas lisosomales como catepsina B y D. Además, la presencia de restos procedentes de la degradación de componentes celulares, invita a pensar su relación con las vesículas de autofagia formadas en el citosol. Este estudio, realizado sobre pacientes de CHC, vincula la presencia de estas inclusiones a una mayor supervivencia general en el CHC, pero se requieren estudios adicionales que determinen si esta relación es causal o si bien se trata de una simple correlación (Schwertheim *et al.*, 2019).

Actualmente, se está poniendo el foco en los ARN no codificantes (ncARN), unas moléculas que intervienen en la regulación post-transcripcional de múltiples genes (entre ellos los involucrados en la autofagia) y cuya expresión se ve alterada en el CHC. Dentro de los ncARN, destacan dos grupos concretos: las moléculas largas de ncARN (lncARN) y las moléculas cortas de ncARN o microARN (miARN) (Yang *et al.*, 2019). Los ncARN han sido ampliamente estudiados, pero en este apartado solo se remarcarán aquellos con una implicación relevante en el papel supresor tumoral de la autofagia.

Los miARN son moléculas de 18 a 25 ribonucleótidos que se unen a la región 3' no traducida (3' UTR) de ARN mensajeros (ARNm) complementarios y conduce a su degradación o silenciamiento (Huang *et al.*, 2017). Un ejemplo concreto es miR-3091-3p, un miARN que aumenta su expresión en las células sanas como consecuencia de la llegada de exosomas

procedentes de células tumorales. Este miARN reduce la expresión de *ATG9b*, hecho que, como se ha remarcado anteriormente, es suficiente para inhibir la autofagia. Así, miR-3091-3p facilita la transformación oncogénica de células sanas, por lo que es un promotor tumoral que actúa inhibiendo el papel supresor tumoral que desempeña la autofagia (Wang *et al.*, 2017a).

Por otro lado, los lncARN son moléculas mayores que las anteriores, con una extensión superior a 200 nucleótidos (Yang *et al.*, 2019). Destaca el papel del pseudogén 1 de PTEN (PTENP1), un supresor tumoral que induce la autofagia al disminuir los niveles de miR-17, miR-19b y miR-20a, lo que provoca un aumento de los niveles de ULK1, Atg7 y p62, respectivamente, además de un aumento en la expresión de PTEN (Huang *et al.*, 2018). Así, la sobre-expresión de PTENP1 inhibe la ruta AKT/mTOR y estimula directamente la autofagia, causando la muerte por autofagia en células tumorales (Liu *et al.*, 2017).

Todos estos motivos remarcan el papel **supresor tumoral** de la autofagia, el cual cobra especial relevancia en hígado, donde también evita factores de riesgo como NAFLD, NASH y fibrosis, los cuales pueden derivar en CHC (Yazdani *et al.*, 2019).

- **Rol promotor tumoral de la autofagia**

Pese al importante papel de la autofagia en la protección de la integridad celular y de la estabilidad genómica, la doble cara de este proceso se desvela tras ocurrir la displasia. Esto se debe a que la autofagia desempeña un papel citoprotector tanto en la célula sana como en la célula tumoral, hecho que permite a la célula tumoral contrarrestar diversos tipos de estrés característicos del microambiente tumoral. De esta forma, el proceso en sí no varía, pero una vez comienza el desarrollo tumoral, la autofagia va a adquirir un **rol promotor tumoral** (Liu *et al.*, 2017). De esta forma, la autofagia va a intervenir en diversos mecanismos que permiten la progresión tumoral y el desarrollo de quimiorresistencia (Figura 5).

Como se ha mencionado en el apartado anterior, el CHC se encuentra íntimamente ligado a la inflamación. La autofagia es capaz de regular la respuesta inflamatoria al degradar y liberar distintos patrones moleculares asociados a daño (DAMP), los cuales desencadenan la producción de citoquinas pro-inflamatorias como las interleucinas 1 β (IL-1 β) y 18 (IL-18) en el inflamasoma (Yazdani *et al.*, 2019). Los DAMP que causan la inflamación pueden ser moléculas externas, como el lipopolisacárido (LPS) bacteriano, o moléculas internas como ADN mitocondrial, ERO o ATP (Yazdani *et al.*, 2019).

Esta situación de inflamación crónica también se ve favorecida por el microambiente tumoral. Las células del estroma peritumoral, como monocitos o macrófagos asociados al tumor (TAM), producen componentes pro-inflamatorios solubles como el factor de necrosis tumoral α (TNF α) o IL-1 β , que llegan hasta la periferia del tumor (límite entre el tejido tumoral y no tumoral) (Chen *et al.*, 2018). Estas moléculas conducen al aumento en la autofagia, puesto que estimulan la producción de otras proteínas involucradas en la carcinogénesis, como la proteína 8 inducida por TNF α (TNFAIP8) (Niture *et al.*, 2020). Se ha determinado, tanto *in vivo* como *in vitro*, que TNFAIP8 incrementa la acumulación de lípidos, contribuyendo a la esteatosis celular, pero también inhibe AKT/mTOR y facilita la lipidación de LC3, por lo que induce autofagia. Pese a que inicialmente la autofagia evita la acumulación de lípidos intracelulares, cambios fisiopatológicos dañan su capacidad reguladora del metabolismo lipídico y hacen que el incremento de autofagia sea compatible con la esteatosis. De esta forma, la autofagia inhibiría la apoptosis y estimularía la supervivencia celular, al mismo tiempo que permitiría la acumulación de lípidos, originando un ambiente propicio para el desarrollo del CHC. Además, el incremento en la autofagia también se ha relacionado con la resistencia a fármacos durante el tratamiento (Niture *et al.*, 2020), como se tratará en el apartado 4.3., y con el aumento en la capacidad de migración e invasión de las células cancerosas, facilitando la transición epitelio-mesénquima (EMT) y la progresión del CHC (Chen *et al.*, 2018).

Es conveniente aclarar que, pese a que la autofagia es especialmente activa en la periferia del tumor, los niveles de autofagia se encuentran elevados en todo el tumor en comparación con el tejido sano, indicando que las células cancerosas se sirven de la autofagia para lograr mantener la actividad metabólica y continuar su desarrollo (Chen *et al.*, 2018). Este aspecto es especialmente relevante en las primeras etapas del tumor, puesto que, de forma previa a la angiogénesis (formación de vasos sanguíneos que irrigen al tumor), el aporte sanguíneo de oxígeno y otros nutrientes resulta insuficiente para paliar las elevadas necesidades metabólicas requeridas por las células cancerosas (Yazdani *et al.*, 2019). En este punto, se origina una situación de hipoxia en la que se promueve la autofagia a través de distintas vías:

- a) Por la **estabilización** del factor inducible por hipoxia 1 α (**HIF-1 α**) se aumenta la expresión de la proteína 3 que interactúa con Bcl-2 (BNIP3) y de la proteína semejante a BNIP3 (BNIP3L), las cuales impiden la interacción disruptiva entre Bcl-2 y Beclin-1. Esto evita la muerte de células tumorales y favorece la autofagia (concretamente la mitofagia) y migración celular (Yazdani *et al.*, 2019).

- b) Por el **aumento en la producción de ERO**, desencadenando un potente estrés oxidativo sobre todo en las células del núcleo del CHC (Ciccarone *et al.*, 2019; Yazdani *et al.*, 2019). Las ERO inducen autofagia al: aumentar la expresión y fosforilación de la proteína antiapoptótica Bcl-2, estado en el que permite el ensamblaje del complejo PI3K; activar AKT, que por un lado activa a NF- κ B, y por otro conduce al marcaje con ubiquitina y degradación del supresor tumoral p53 (Huang *et al.*, 2016).

En lo que respecta a este último punto, es importante destacar que las ERO ponen en jaque la supervivencia celular al oxidar elementos celulares, por lo que la inducción de autofagia es un mecanismo protector con el que las células tumorales hacen frente al estrés oxidativo y reducen la generación de ERO (Ciccarone *et al.*, 2019). Así, la autofagia induce la respuesta antioxidante mediante la eliminación de KEAP1 dependiente de p62, lo que estabiliza indirectamente a NRF2, el cual permite la transcripción de enzimas β -oxidantes y otras proteínas que mantienen el balance redox (Yazdani *et al.*, 2019). Por otro lado, la mitofagia es el principal mecanismo de eliminación de ERO, dado que son precisamente las mitocondrias dañadas la principal fuente de estas especies reactivas (Ciccarone *et al.*, 2019).

Las mitocondrias son orgánulos extremadamente dinámicos, puesto que sufren continuos procesos de fisión y fusión que originan lo conocido como red mitocondrial. Esto hace posible que las mitocondrias intercambien material genético y proteínas, lo que otorga una rápida capacidad de reparación y adaptación a los requerimientos celulares. Sin embargo, durante el desarrollo del CHC se potencia el proceso de fisión mitocondrial, originando mitocondrias de menor tamaño y aumentando la génesis de ERO por parte de este orgánulo. Como se acaba de mencionar, las ERO permiten la supervivencia de las células de CHC, puesto que activan la autofagia e inhiben la apoptosis, hecho por el que la fisión mitocondrial se considera un indicador de mal pronóstico (Huang *et al.*, 2016). Además, las mitocondrias también son fundamentales en el mantenimiento de células troncales cancerosas (CSC). Dentro de la heterogeneidad del tumor, las CSC constituyen una población celular específica con capacidad de autorrenovación, pluripotencia y regeneración del tumor en otros tejidos y órganos del organismo, permitiendo así la aparición de metástasis (Liu *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2018b; Lee y Jeon, 2020). Estudios recientes determinan que la autofagia, o más específicamente la mitofagia, permite degradar el supresor tumoral p53 e inducir la expresión del factor de transcripción NANOG para mantener las CSC del cáncer hepático y promover la hepatocarcinogénesis (Liu *et al.*, 2018).

Por último, también existen algunos miARN relacionados con el papel pro-tumoral de la autofagia. Por ejemplo, miR-375 impide la autofagia al silenciar la expresión del gen *ATG7* y bloquear así la maduración de LC3-II, acumulándose mitocondrias dañadas que liberarían proteínas de apoptosis. El acusado descenso en la expresión de miR-375 en células de CHC promueve el papel promotor tumoral de la autofagia, al evitar la muerte celular y favorecer la progresión tumoral (Liu *et al.*, 2017; Yazdani *et al.*, 2019). Otros ejemplos son: miR-7, que degrada el ARNm de mTOR (Wang *et al.*, 2017b; Yazdani *et al.*, 2019); y miR-185, que detiene el ciclo celular al silenciar la expresión de AKT y de quinasas implicadas en su regulación (como mTORC2) (Zhou *et al.*, 2017; Yazdani *et al.*, 2019). miR-7 y miR-185 son supresores tumorales que inhiben la ruta AKT/mTOR, lo que implica un descenso en la división celular y un aumento en la apoptosis celular. Sin embargo, estos miARN también promueven la autofagia, que en este caso sirve de protección a la célula tumoral. Esto se demuestra experimentalmente empleando fármacos que inhiben la autofagia, los cuales aumentan la apoptosis causada por estos miARN (Wang *et al.*, 2017b; Zhou *et al.*, 2017).

Así, la implicación de la autofagia en el CHC es compleja, pasando de un papel protector a un papel promotor en función del estadio y contexto celular. Sin embargo, las células tumorales no presentan una autofagia excesivamente activa, puesto que una eliminación excesiva de componentes celulares puede llevar a una situación de baja energía disponible para el

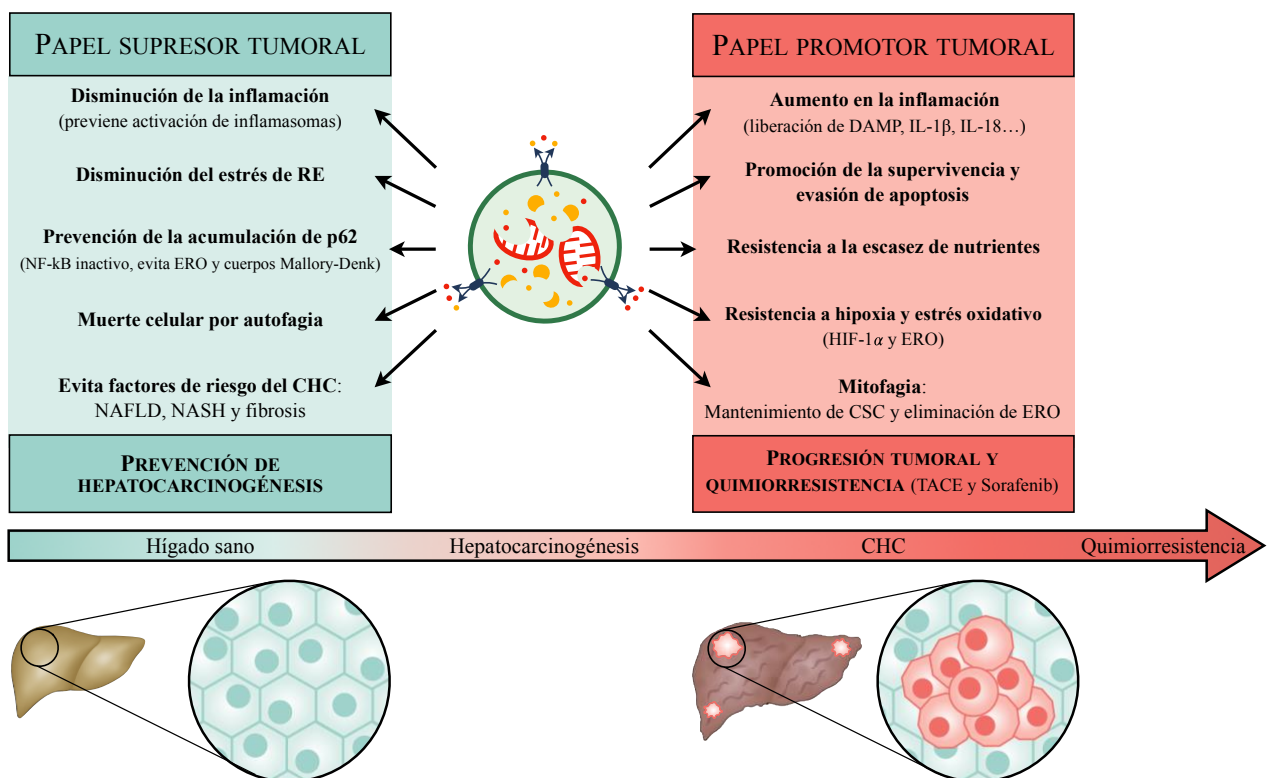


Figura 5: Esquema de las principales acciones que justifican el papel dual de la autofagia en la hepatocarcinogénesis y progresión del CHC. Figura de elaboración propia.

metabolismo celular, dificultando la migración y proliferación en el CHC, al mismo tiempo que favorece la muerte celular por autofagia (Li *et al.*, 2018; Yang *et al.*, 2019; Yazdani *et al.*, 2019).

4.3. AUTOFAGIA Y QUIMIORRESISTENCIA EN CHC

Como se ha reflejado en la introducción, el tratamiento del CHC depende del estadio o grado en el que se encuentre el tumor. Cuando el tumor está poco avanzado, el tratamiento que mejor resultados aporta es la intervención quirúrgica (ablación, resección o trasplante); sin embargo, el difícil diagnóstico del CHC hace que, normalmente, el tumor sea detectado en una etapa avanzada cuando su capacidad de invasión hace inefectivo este tipo de abordajes terapéuticos (Li *et al.*, 2018; Ciccarone *et al.*, 2019). En estos casos, o para intentar reducir el riesgo de recurrencia tras la resección, se emplean tratamientos con quimioterápicos mediante la técnica TACE o bien tratamientos sistémicos (Sheng *et al.*, 2018).

- **Resistencia a la TACE por autofagia**

Durante el tratamiento con TACE, se suelen emplear fármacos quimioterápicos antitumorales tradicionales, como los basados en platino (oxaliplatino o cisplatino), cuya acción genera ERO que causan la muerte celular (Sheng *et al.*, 2018). Sin embargo, tanto el propio fármaco como factores solubles del microambiente tumoral (producidos por TAM), producen la estimulación de la autofagia, creando un mecanismo de resistencia basado en la eliminación de la fuente principal de ERO en la célula: las mitocondrias dañadas (Fu *et al.*, 2019). Estudios experimentales, realizados tanto *in vivo* como *in vitro*, han demostrado que la inhibición de la autofagia reduce la resistencia a quimioterápicos tradicionales y aumenta la eficacia de estos tratamientos (Zhang *et al.*, 2017; Fu *et al.*, 2019; Zhou *et al.*, 2019a).

- **Resistencia a tratamientos sistémicos por autofagia**

El sorafenib es el fármaco de uso sistémico más común, pero únicamente prolonga la supervivencia del paciente unos 3 meses. Se trata de un inhibidor multiquinasa administrado por vía oral que actúa inhibiendo rutas como la ERK/MAPK y receptores como el del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR) o del factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGFR), desempeñando así una acción inhibidora de la angiogénesis y proliferación tumorales y promotora de apoptosis. El mayor inconveniente de este fármaco es que solo es efectivo en el 30% de los casos y, además, es común el desarrollo de resistencia a múltiples fármacos (MDR) lo que reduce su efectividad tras un tratamiento prolongado, dando como

resultado una pobre mejoría en la esperanza de vida de los pacientes y una supervivencia general muy baja (Sun *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2018; Sheng *et al.*, 2018; Ciccarone *et al.*, 2019).

El mejor conocimiento de los mecanismos asociados a MDR ha llevado al estudio de los efectos desencadenados por el sorafenib con el fin de emplear fármacos sinérgicos que aumenten su eficacia. Así, se ha determinado que el sorafenib estimula la autofagia, algo que permite evitar la muerte celular por apoptosis mediante el desarrollo de resistencias a quimioterápicos, puesto que elimina moléculas que hayan sido dañadas por la acción de estos fármacos y aporta constituyentes con los que renovar esas moléculas destruidas (Sun *et al.*, 2017; Sheng *et al.*, 2018). Los efectos del sorafenib se deben a múltiples acciones sobre las rutas celulares, inhibiendo inicialmente la ruta ERK/MAPK, lo que conduce a la inhibición de mTOR y a un descenso de ATP que también deriva en la activación de AMPK (Sun *et al.*, 2017). mTOR inhibe tanto al complejo ULK1 como al TFEB, impidiendo tanto la formación del autofagosoma como la biogénesis lisosomal, respectivamente. Así, la acción del sorafenib no solo promueve la autofagia al inhibir mTORC1, sino que también permite el atrapamiento lisosomal de fármacos, dado que quimioterápicos que químicamente actúen como bases débiles e hidrofóbicas, son reclutados por el bajo pH del lisosoma para ser posteriormente degradados (Sheng *et al.*, 2018). El sorafenib también promueve la génesis de ERO (acción citostática y citotóxica) (Ciccarone *et al.*, 2019) y agrava la hipoxia tumoral por su actividad anti-angiogénica (estabilizando HIF-1 α y, por tanto, inhibiendo mTOR para aumentar la autofagia) (Sheng *et al.*, 2018).

Además, la inflamación y carcinogénesis hepáticas propias del CHC, conducen al desarrollo de resistencia a la insulina (IR), la cual se ha vinculado también a mecanismos intrínsecos de MDR en CHC. Esto se debe a la capacidad de la IR de desencadenar la UPR, promoviendo la autofagia e inhibiendo la apoptosis (Li *et al.*, 2018).

Todos estos datos sugieren que la inhibición de la autofagia conllevaría un aumento en la sensibilidad de las células del CHC a sorafenib. De hecho, esta hipótesis se encuentra ampliamente respaldada por diversos estudios en los que la disminución de la actividad autofágica, ya sea provocada por fármacos o por regulación post-transcripcional de genes clave (como *BECN1*, *ATG5* o *ATG16L1*), va acompañada de un aumento de la capacidad anti-proliferativa y de la muerte por apoptosis causados por el sorafenib (Liu *et al.*, 2017; Sun *et al.*, 2017; Sheng *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2018). Ya se ha indicado anteriormente que la relación

entre apoptosis y autofagia es compleja, estando determinada por diversos elementos comunes en ambas rutas como la promoción de autofagia e inhibición de apoptosis motivada por la liberación de Beclin-1 de otras moléculas de la familia Bcl-2 (Ciccarone *et al.*, 2019). Sin embargo, el exceso de autofagia desencadenado por el propio fármaco y por el estrés de RE derivado del tratamiento, es capaz de producir una respuesta pro-apoptótica o incluso de muerte celular por autofagia (Li *et al.*, 2018; Sheng *et al.*, 2018). Esta última afirmación también se encuentra respaldada por otros estudios, los cuales sostienen que la inhibición de la vía PI3K/AKT/mTOR, pese a conllevar un aumento en la autofagia, también iría acompañada del descenso en la transcripción de genes implicados en la proliferación, migración, supervivencia y angiogénesis, aunque sí es cierto que se requieren más estudios que prueben esta hipótesis (Sheng *et al.*, 2018; Yazdani *et al.*, 2019).

4.4. VALOR TERAPÉUTICO Y PRONÓSTICO

La difícil prognosis del CHC hace que la búsqueda de nuevos marcadores y posibles dianas terapéuticas sea necesaria para reducir la mortalidad debida a esta enfermedad (Liu *et al.*, 2017).

- **Autofagia en el diagnóstico del CHC**

El marcador más frecuentemente usado para el diagnóstico y tratamiento de CHC empleado en la actualidad, la alfa-fetoproteína (AFP), presenta un papel activo en el crecimiento del CHC, dado que se ha relacionado con la inhibición de apoptosis y la activación de la vía PI3K/AKT/mTOR mediante su unión a PTEN, lo que significa mayor capacidad de proliferación, invasión y letalidad (Wang *et al.*, 2018a). Sin embargo, la AFP no facilita la detección temprana del tumor, por lo que un gran número de pacientes no puede someterse al tratamiento de resección quirúrgica, pese a ser el más efectivo (Wang *et al.*, 2018a; Meng *et al.*, 2020). Con el fin de encontrar otros marcadores, se han desarrollado estudios que, aunque requieren más investigaciones para validarse, indican el uso de LC3 como un potencial biomarcador en el CHC, pues su elevada expresión se vincula a un mayor tamaño tumoral. Esta relación podría basarse en la autofagia que se desencadena como respuesta a la hipoxia e isquemia producidas durante el crecimiento tumoral (Meng *et al.*, 2020).

También es conveniente el análisis de LC3 en CHC tras la resección hepática, puesto que su elevada expresión en tejido adyacente no tumoral supone un riesgo menor de sufrir muerte inmediata (en menos de 3 meses tras la intervención) (Lin *et al.*, 2017). Así, la autofagia es importante para recuperar la función hepática tras la resección, pero también para evitar recurrencia del CHC, hecho que se produce en aproximadamente un 60% de los casos

sometidos a cirugía (Hsu *et al.*, 2019). Esto justifica que la expresión reducida de LC3, tanto en tejido tumoral como no tumoral, haya sido relacionada con un mayor riesgo de recurrencia, junto a otros factores como las características del tumor (invasión vascular) y el microambiente hepático (cirrosis), que provocan recurrencia temprana y tardía en enfermos de CHC, respectivamente (Lin *et al.*, 2018a). Por lo tanto, un hígado cirrótico con invasión vascular y baja expresión de LC3 presenta mayor probabilidad de sufrir tanto primera como segunda recurrencia del CHC, e incluso llevar a la muerte inmediata del paciente (Lin *et al.*, 2017; Lin *et al.*, 2018a; Hsu *et al.*, 2019).

En la bibliografía también se remarca el posible uso de otras moléculas como biomarcadores, como puede ser la proteína asociada a Yes (YAP), que se encuentra habitualmente sobre-expresada en células con MDR, promoviendo la proliferación, supervivencia, EMT y metástasis y evitando la muerte celular por autofagia (Zhou *et al.*, 2019b). También CD24 se relaciona con la activación de la autofagia en células resistentes a sorafenib (Lu *et al.*, 2018), e incluso varios miARN han sido relacionados con la adquisición de quimiorresistencias (Espelt *et al.*, 2019). En este último caso, miR-135a es un promotor tumoral que inhibe la autofagia y cuya expresión aumenta en CHC, siendo indicativo de un mal pronóstico (Huang *et al.*, 2017). Así, pese a que LC3 sea posiblemente el marcador con mayor potencial en CHC, la utilización combinada de estos marcadores, junto al análisis en la expresión de otros ATG o de p62, podrían ayudar a mejorar la diagnosis del CHC (Lin *et al.*, 2018b; Meng *et al.*, 2020).

- **Autofagia en el tratamiento del CHC**

Como se ha ido desarrollando a lo largo del presente trabajo, el estudio de la autofagia en el CHC puede ayudar a establecer mejoras en el tratamiento que permitan aumentar la supervivencia en este tipo de cáncer. Si el tumor es detectado en un estadio temprano se recomienda la intervención quirúrgica, preferiblemente la ablación, por ser más segura y menos invasiva que la resección o el trasplante. En estos casos, la inhibición de la autofagia disminuye el riesgo de recurrencia tras la operación, debido a que la autofagia otorga capacidad de crecimiento, proliferación y migración a la fracción residual células de CHC (Wang *et al.*, 2018b; Xu *et al.*, 2019). Cuando el tumor presenta un estado más avanzado, la heterogeneidad en su población celular hace que el tratamiento con un único fármaco sea muy complejo, pues no existe un fármaco con carácter universal. Por este motivo, la coadministración de fármacos que tengan un papel sinérgico puede ayudar notablemente a la terapia del CHC, pues permitiría

combinar la capacidad anti-proliferativa de fármacos como el sorafenib, con otros tratamientos que, por ejemplo, potencien su acción o dificulten el desarrollo de resistencias. Es en este punto donde la autofagia cobra gran importancia, pues el doble papel que juega en el CHC hace de ella un proceso con diversos enfoques terapéuticos. En este aspecto, se están desarrollando estudios que van en dos direcciones, en función del contexto celular: inhibiendo la autofagia por su capacidad de inducir quimiorresistencia o fomentando la autofagia para llevar a las células de CHC a una muerte dependiente de autofagia (Lee y Jeon, 2020). En el primer caso, los inhibidores de la autofagia más empleados son la 3-Metiladenina (inhibe la formación del autofagosoma al nivel de la PI3K), la Bafilomicina A1 (inhibe la fusión autofagosoma-lisosoma) y la cloroquina e hidroxiclороquina (incrementan el pH lisosomal, impidiendo también la fusión autofagosoma-lisosoma) (Zhou *et al.*, 2017; Sheng *et al.*, 2018; Lee y Jeon, 2020). Por otro lado, los inductores de autofagia más comunes son fármacos ya aprobados que inhiben la acción de mTOR, como por ejemplo la rapamicina, la dihidroartemisina o el nilotinib (Lee y Jeon, 2020). La acción conjunta de estos fármacos con otros habitualmente empleados en el tratamiento del CHC ha sido evaluada en distintos estudios, indicando que, pese a que se requiere más investigación en este campo, la combinación de fármacos puede constituir un tratamiento seguro y efectivo del CHC (Rong *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2017; Lee y Jeon, 2020).

5. CONCLUSIONES

- a) Existen diversas rutas celulares capaces de regular la autofagia y que a su vez se relacionan con distintos procesos de supervivencia y progresión tumoral en CHC. La principal ruta que vincula estos dos elementos es la vía PI3K/AKT/mTOR, pero también destacan las vías ERK/MAPK, Wnt/ β -catenina y, en menor medida, AMPK y PERK.
- b) La autofagia es un mecanismo que desempeña un papel dual en la hepatocarcinogénesis y en la progresión tumoral, dependiendo del contexto celular y del estadio en el que se encuentre el CHC. De forma general, la autofagia mantiene la estabilidad genómica en una etapa previa a la formación del tumor pero, tras el establecimiento del mismo, la autofagia permite que este se adapte a los diversos tipos de estrés característicos del microambiente tumoral.
- c) Distintas moléculas implicadas en el proceso de autofagia podrían servir como posibles marcadores que favorezcan el diagnóstico temprano, destacando LC3. Por otro lado, el empleo de inhibidores o inductores de la autofagia en combinación con los tratamientos existentes podría contribuir al incremento en la eficacia del tratamiento para el CHC.

Como conclusión general, pese a que se requieren más estudios que validen esta afirmación, parece que existe una clara contribución de la autofagia en la prevención de la hepatocarcinogénesis, así como en la progresión del CHC y en el desarrollo de MDR una vez se ha establecido el tumor. Por ello, el uso de marcadores asociados a la autofagia podría ser de utilidad para mejorar el diagnóstico y el pronóstico del CHC. Asimismo, la regulación directa de la autofagia, o bien de las vías implicadas en su modulación, podría utilizarse con fines terapéuticos con el objetivo de mejorar los tratamientos actuales y aumentar la supervivencia general del CHC.

6. REFERENCIAS

- American Cancer Society (2019) *Cirugía para el cáncer de hígado*. Disponible en: <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-higado/tratamiento/cirugia.html> (Accedido: 11 de mayo de 2020).
- Anstee, Q. M., Reeves, H. L., Kotsiliti, E., Govaere, O. y Heikenwalder, M. (2019) "From NASH to HCC: current concepts and future challenges", *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 16(7), pp. 411–428.
- Centre for reviews and dissemination (2009) *Systematic reviews: CRD's guidance for undertaking reviews in health care*. 3.^a ed. University of York: York Publishing Services Ltd.
- Chen, D. P., Ning, W. R., Li, X. F., Wei, Y., Lao, X. M., Wang, J. C., Wu, Y. y Zheng, L. (2018) "Peritumoral monocytes induce cancer cell autophagy to facilitate the progression of human hepatocellular carcinoma", *Autophagy*, 14(8), pp. 1335–1346.
- Ciccarone, F., Castelli, S. y Ciriolo, M. R. (2019) "Oxidative Stress-Driven Autophagy acROSs Onset and Therapeutic Outcome in Hepatocellular Carcinoma", *Oxidative medicine and cellular longevity*. doi:10.1155/2019/6050123.
- Couri, T. y Pillai, A. (2019) "Goals and targets for personalized therapy for HCC", *Hepatology International*, 13(2), pp. 125–137.
- D'Arcy, M. S. (2019) "Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy", *Cell Biology International*, 43(6), pp. 582–592.
- Denton, D. y Kumar, S. (2019) "Autophagy-dependent cell death", *Cell Death and Differentiation*, 26(4), pp. 605–616.
- Espelt, M. V., Bacigalupo, M. L., Carabias, P. y Troncoso, M. F. (2019) "MicroRNAs contribute to ATP-binding cassette transporter- and autophagy-mediated chemoresistance in hepatocellular carcinoma", *World Journal of Hepatology*, 11(4), pp. 344–358.
- Fornier, A., Reig, M. y Bruix, J. (2018) "Hepatocellular carcinoma", *The Lancet*, 391(10127), pp. 1301–1314.
- Fu, X. T., Song, K., Zhou, J., Shi, Y. H., Liu, W. R., Shi, G. M., Gao, Q., Wang, X. Y., Ding, Z. Bin y Fan, J. (2019) "Tumor-associated macrophages modulate resistance to oxaliplatin via inducing autophagy in hepatocellular carcinoma", *Cancer Cell International*. doi:10.1186/s12935-019-0771-8.
- Hewitt, G. y Korolchuk, V. I. (2017) "Repair, Reuse, Recycle: The Expanding Role of Autophagy in Genome Maintenance", *Trends in Cell Biology*, 27(5), pp. 340–351.
- Hsu, C. C., Hsieh, P. M., Chen, Y. Sen, Lo, G. H., Lin, H. Y., Dai, C. Y., Huang, J. F., Chuang, W. L., Chen, Y. L., Yu, M. L. y Lin, C. W. (2019) "Axl and autophagy LC3 expression in tumors is strongly associated with clinical prognosis of hepatocellular carcinoma patients after curative resection", *Cancer Medicine*, 8(7), pp. 3453–3463.
- Huang, F., Wang, B. R. y Wang, Y. G. (2018) "Role of autophagy in tumorigenesis, metastasis, targeted therapy and drug resistance of hepatocellular carcinoma", *World Journal of Gastroenterology*, 24(41), pp. 4643–4651.

- Huang, K. T., Kuo, I. Y., Tsai, M. C., Wu, C. H., Hsu, L. W., Chen, L. Y., Kung, C. P., Cheng, Y. F., Goto, S., Chou, Y. W., Chen, C. L., Lin, C. C. y Chen, K. Den (2017) "Factor VII-Induced MicroRNA-135a Inhibits Autophagy and Is Associated with Poor Prognosis in Hepatocellular Carcinoma", *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, 9, pp. 274–283.
- Huang, Q., Zhan, L., Cao, H., Li, J., Lyu, Y., Guo, X., Zhang, J., Ji, L., Ren, T., An, J., Liu, B., Nie, Y. y Xing, J. (2016) "Increased mitochondrial fission promotes autophagy and hepatocellular carcinoma cell survival through the ROS-modulated coordinated regulation of the NFκB and TP53 pathways", *Autophagy*, 12(6), pp. 999–1014.
- Hurley, J. H. y Young, L. N. (2017) "Mechanisms of Autophagy Initiation", *Annual Review of Biochemistry*, 86(1), pp. 225–244.
- Kanda, T., Goto, T., Hirotsu, Y., Moriyama, M. y Omata, M. (2019) "Molecular mechanisms driving progression of liver cirrhosis towards hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis B and C infections: A review", *International Journal of Molecular Sciences*. doi:10.3390/ijms20061358.
- Khandia, R., Dadar, M., Munjal, A., Dhama, K., Karthik, K., Tiwari, R., Yattoo, M. I., Iqbal, H. M. N., Singh, K. P., Joshi, S. K. y Chaicumpa, W. (2019) "A Comprehensive Review of Autophagy and Its Various Roles in Infectious, Non-Infectious, and Lifestyle Diseases: Current Knowledge and Prospects for Disease Prevention, Novel Drug Design, and Therapy", *Cells*, 8(7), p. 674.
- Kirchner, P., Bourdenx, M., Madrigal-Matute, J., Tiano, S., Diaz, A., Bartholdy, B. A., Will, B. y Cuervo, A. M. (2019) "Proteome-wide analysis of chaperone-mediated autophagy targeting motifs", *PLoS biology*, 17(5), p. e3000301.
- Koukourakis, M. I., Kalamida, D., Giatromanolaki, A., Zois, C. E., Sivridis, E., Pouliliou, S., Mitrakas, A., Gatter, K. C. y Harris, A. L. (2015) "Autophagosome proteins LC3A, LC3B and LC3C have distinct subcellular distribution kinetics and expression in cancer cell lines", *PLoS ONE*, 10(9), p. e0137675.
- Lee, Y. G. y Jeon, T. Il (2020) "Modulation of the autophagy-lysosomal pathway in hepatocellular carcinoma using small molecules", *Molecules*, 25(7), p. 1580.
- Li, L., Liu, X., Zhou, L., Wang, W., Liu, Z., Cheng, Y., Li, J. y Wei, H. (2018) "Autophagy plays a critical role in insulin resistance-mediated chemoresistance in hepatocellular carcinoma cells by regulating the ER stress", *Journal of Cancer*, 9(23), pp. 4314–4324.
- Lin, C. W., Chen, Y. Sen, Lin, C. C., Lee, P. H., Lo, G. H., Hsu, C. C., Hsieh, P. M., Koh, K. W., Chou, T. C., Dai, C. Y., Huang, J. F., Chuang, W. L., Chen, Y. L. y Yu, M. L. (2018a) "Autophagy-related gene LC3 expression in tumor and liver microenvironments significantly predicts recurrence of hepatocellular carcinoma after surgical resection article", *Clinical and Translational Gastroenterology*, 9(6), p. 166.
- Lin, C. W., Lin, C. C., Lee, P. H., Lo, G. H., Hsieh, P. M., Koh, K. W., Lee, C. Y., Chen, Y. L., Dai, C. Y., Huang, J. F., Chuang, W. L., Chen, Y. Sen y Yu, M. L. (2017) "The autophagy marker LC3 strongly predicts immediate mortality after surgical resection for hepatocellular carcinoma", *Oncotarget*, 8(54), pp. 91902–91913.
- Lin, P., He, R. Q., Dang, Y. W., Wen, D. Y., Ma, J., He, Y., Chen, G. y Yang, H. (2018b) "An autophagy-related gene expression signature for survival prediction in multiple cohorts of hepatocellular carcinoma patients", *Oncotarget*, 9(25), pp. 17368–17395.
- Liu, K., Lee, J. y Ou, J.-H. J. (2018) "Autophagy and mitophagy in hepatocarcinogenesis", *Molecular & Cellular Oncology*, 5(2), p. e1405142.
- Liu, L., Liao, J. Z., He, X. X. y Li, P. Y. (2017) "The role of autophagy in hepatocellular carcinoma: Friend or foe", *Oncotarget*, 8(34), pp. 57707–57722.
- Llovet, J. M., Zucman-Rossi, J., Pikarsky, E., Sangro, B., Schwartz, M., Sherman, M. y Gores, G. (2016) "Hepatocellular carcinoma", *Nature Reviews Disease Primers*, 2, p. 16018.
- Lu, S., Yao, Y., Xu, G., Zhou, C., Zhang, Y., Sun, J., Jiang, R., Shao, Q. y Chen, Y. (2018) "CD24 regulates sorafenib resistance via activating autophagy in hepatocellular carcinoma article", *Cell Death and Disease*, 9(6), p. 646.
- Mao, D., Zhang, Z., Zhao, X. y Dong, X. (2020) "Autophagy-related genes prognosis signature as potential predictive markers for immunotherapy in hepatocellular carcinoma", *PeerJ*, 8, p. e8383.

- Meng, Y. C., Lou, X. L., Yang, L. Y., Li, D. y Hou, Y. Q. (2020) "Role of the autophagy-related marker LC3 expression in hepatocellular carcinoma: a meta-analysis", *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 146(5), pp. 1103–1113.
- Mizushima, N. (2007) "Autophagy: Process and function", *Genes and Development*, 21(22), pp. 2861–2873.
- Mizushima, N. y Komatsu, M. (2011) "Autophagy: Renovation of cells and tissues", *Cell*, 147(4), pp. 728–741.
- Morishita, H. y Mizushima, N. (2019) "Diverse Cellular Roles of Autophagy", *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 35(1), pp. 453–475.
- Niture, S., Gyamfi, M. A., Lin, M., Chimeh, U., Dong, X., Zheng, W., Moore, J. y Kumar, D. (2020) "TNFAIP8 regulates autophagy, cell steatosis, and promotes hepatocellular carcinoma cell proliferation", *Cell Death and Disease*, 11(3), p. 178.
- Organización Mundial de la Salud (OMS) (2018) *Cancer Today*. Disponible en: http://gco.iarc.fr/today/online-analysis-table?v=2018&mode=cancer&mode_population=continents&population=900&populations=900&key=asr&sex=0&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&group_cancer=1 (Accedido: 24 de marzo de 2020).
- Parzych, K. R. y Klionsky, D. J. (2014) "An overview of autophagy: Morphology, mechanism, and regulation", *Antioxidants and Redox Signaling*, 20(3), pp. 460–473.
- Psyri, A., Arkadopoulos, N., Vassilakopoulou, M., Smyrniotis, V. y Dimitriadis, G. (2012) "Pathways and targets in hepatocellular carcinoma", *Expert Review of Anticancer Therapy*, 12(10), pp. 1347–1357.
- Rabinowitz, J. D. y White, E. (2010) "Autophagy and metabolism", *Science*, 330(6009), pp. 1344–1348.
- Ravanan, P., Srikumar, I. F. y Talwar, P. (2017) "Autophagy: The spotlight for cellular stress responses", *Life Sciences*, 188, pp. 53–67.
- Rong, L. W., Wang, R. X., Zheng, X. L., Feng, X. Q., Zhang, Lei, Zhang, Lin, Lin, Y., Li, Z. P. y Wang, X. (2017) "Combination of wogonin and sorafenib effectively kills human hepatocellular carcinoma cells through apoptosis potentiation and autophagy inhibition", *Oncology Letters*, 13(6), pp. 5028–5034.
- Schwertheim, S., Westerwick, D., Jastrow, H., Theurer, S., Schaefer, C. M., Kälsch, J., Möllmann, D., Schlattjan, M., Wedemeyer, H., Schmid, K. W. y Baba, H. A. (2019) "Intranuclear inclusions in hepatocellular carcinoma contain autophagy-associated proteins and correlate with prolonged survival", *Journal of Pathology: Clinical Research*, 5(3), pp. 164–176.
- Sheng, J., Qin, H., Zhang, K., Li, B. y Zhang, X. (2018) "Targeting autophagy in chemotherapy-resistant of hepatocellular carcinoma", *American Journal of Cancer Research*, 8(3), p. 354.
- Sun, T., Liu, H. y Ming, L. (2017) "Multiple Roles of Autophagy in the Sorafenib Resistance of Hepatocellular Carcinoma", *Cellular Physiology and Biochemistry*, 44(2), pp. 716–727.
- Umemura, A., He, F., Taniguchi, K., Nakagawa, H., Yamachika, S., Font-Burgada, J., Zhong, Z., Subramaniam, S., Raghunandan, S., Duran, A., Linares, J. F., Reina-Campos, M., Umemura, S., Valasek, M. A., Seki, E., Yamaguchi, K., Koike, K., Itoh, Y., Diaz-Meco, M. T., Moscat, J. y Karin, M. (2016) "p62, Upregulated during Preneoplasia, Induces Hepatocellular Carcinogenesis by Maintaining Survival of Stressed HCC-Initiating Cells", *Cancer Cell*, 29(6), pp. 935–948.
- Villanueva, A. (2019) "Hepatocellular carcinoma", *New England Journal of Medicine*, 380(15), pp. 1450–1462.
- Wang, K. (2015) "Autophagy and apoptosis in liver injury", *Cell Cycle*, 14(11), pp. 1631–1642.
- Wang, N., Tan, H. Y., Li, S. y Feng, Y. (2017a) "Atg9b deficiency suppresses autophagy and potentiates endoplasmic reticulum stress-associated hepatocyte apoptosis in hepatocarcinogenesis", *Theranostics*, 7(8), pp. 2325–2338.
- Wang, S., Zhu, M., Wang, Q., Hou, Y., Li, L., Weng, H., Zhao, Y., Chen, D., Ding, H., Guo, J. y Li, M. (2018a) "Alpha-fetoprotein inhibits autophagy to promote malignant behaviour in hepatocellular carcinoma cells by activating PI3K/AKT/mTOR signalling", *Cell Death and Disease*, 9(10), p. 1027.

- Wang, X., Deng, Q., Feng, K., Chen, S., Jiang, J., Xia, F., Ma, K. y Bie, P. (2018b) "Insufficient radiofrequency ablation promotes hepatocellular carcinoma cell progression via autophagy and the CD133 feedback loop", *Oncology Reports*, 40(1), pp. 241–251.
- Wang, Y., Wang, Q. y Song, J. (2017b) "Inhibition of autophagy potentiates the proliferation inhibition activity of microRNA-7 in human hepatocellular carcinoma cells", *Oncology Letters*, 14(3), pp. 3566–3572.
- Xu, W. L., Wang, S. H., Sun, W. B., Gao, J., Ding, X. M., Kong, J., Xu, L. y Ke, S. (2019) "Insufficient radiofrequency ablation-induced autophagy contributes to the rapid progression of residual hepatocellular carcinoma through the HIF-1 α /BNIP3 signaling pathway", *BMB Reports*, 52(4), pp. 277–282.
- Yang, S., Yang, L., Li, X., Li, B., Li, Y., Zhang, X., Ma, Y., Peng, X., Jin, H. y Li, H. (2019) "New insights into autophagy in hepatocellular carcinoma: mechanisms and therapeutic strategies.", *American journal of cancer research*, 9(7), pp. 1329–1353.
- Yazdani, H., Huang, H. y Tsung, A. (2019) "Autophagy: Dual Response in the Development of Hepatocellular Carcinoma", *Cells*, 8(2), p. 91.
- Yu, L., Chen, Y. y Tooze, S. A. (2018) "Autophagy pathway: Cellular and molecular mechanisms", *Autophagy*, 14(2), pp. 207–215.
- Zhang, K., Chen, J., Zhou, H., Chen, Y., Zhi, Y., Zhang, B., Chen, L., Chu, X., Wang, R. y Zhang, C. (2018) "PU.1/microRNA-142-3p targets ATG5/ATG16L1 to inactivate autophagy and sensitize hepatocellular carcinoma cells to sorafenib", *Cell Death and Disease*, 9(3), p. 312.
- Zhang, N., Xie, H., Lu, W., Li, F., Li, J. y Guo, Z. (2017) "Chloroquine Sensitizes Hepatocellular Carcinoma Cells to Chemotherapy via Blocking Autophagy and Promoting Mitochondrial Dysfunction", *International journal of clinical and experimental pathology*, 10(9), pp. 10056–10065.
- Zhou, J., Li, Y., Liu, X., Long, Y. y Chen, J. (2018) "LncRNA-regulated autophagy and its potential role in drug-induced liver injury", *Annals of Hepatology*, 17(3), pp. 355–363.
- Zhou, L., Liu, S., Han, M., Feng, S., Liang, J., Li, Z., Li, Y., Lu, H., Liu, T., Ma, Y. y Cheng, J. (2017) "MicroRNA-185 induces potent autophagy via AKT signaling in hepatocellular carcinoma", *Tumor Biology*. doi:10.1177/1010428317694313.
- Zhou, Y., Chen, E., Tang, Y., Mao, J., Shen, J., Zheng, X., Xie, S., Zhang, S., Wu, Y., Liu, H., Zhi, X., Ma, T., Ni, H., Chen, J., Chai, K. y Chen, W. (2019a) "miR-223 overexpression inhibits doxorubicin-induced autophagy by targeting FOXO3a and reverses chemoresistance in hepatocellular carcinoma cells", *Cell Death and Disease*, 10(11), p. 843.
- Zhou, Y., Wang, Y., Zhou, W., Chen, T., Wu, Q., Chutturghoon, V. K., Lin, B., Geng, L., Yang, Z., Zhou, L. y Zheng, S. (2019b) "YAP promotes multi-drug resistance and inhibits autophagy-related cell death in hepatocellular carcinoma via the RAC1-ROS-mTOR pathway", *Cancer Cell International*, 19(1), p. 179.