



*Potencial valor  
pronóstico y diagnóstico  
de la neuropilina-1 en el  
carcinoma hepatocelular:  
relación con la pérdida de  
sensibilidad al tratamiento  
con lenvatinib*



Paula Fernández Palanca

---



**POTENCIAL VALOR PRONÓSTICO Y  
DIAGNÓSTICO DE LA NEUROPILINA-1  
EN EL CARCINOMA HEPATOCELULAR:  
RELACIÓN CON LA PÉRDIDA DE  
SENSIBILIDAD AL TRATAMIENTO  
CON LENVATINIB**

La edición de esta obra, que obtuvo el XXVII Premio “Mariano Rodríguez para Jóvenes Investigadores” en la convocatoria 2022, ha sido financiada por la “Fundación Carolina Rodríguez”.

Paula Fernández Palanca

**POTENCIAL VALOR PRONÓSTICO Y  
DIAGNÓSTICO DE LA NEUROPILINA-1  
EN EL CARCINOMA HEPATOCELULAR:  
RELACIÓN CON LA PÉRDIDA DE  
SENSIBILIDAD AL TRATAMIENTO  
CON LENVATINIB**



SERVICIO  
DE PUBLICACIONES  
UNIVERSIDAD DE LEÓN

2023

Fernández Palanca, Paula

Potencial valor pronóstico y diagnóstico de la neuropilina-1 en el carcinoma hepatocelular : relación con la pérdida de sensibilidad al tratamiento con lenvatinib / Paula Fernández. -- [León] : Universidad de León, Servicio de Publicaciones, 2023

133 p. : il. col., tablas, gráf. ; 21 cm

Bibliogr.: p. [119]-133. -- XXVII Premio “Mariano Rodríguez para Jóvenes Investigadores” 2022 de la “Fundación Carolina Rodríguez”

ISBN 978-84-19682-10-9

Proteínas. 2. Hígado-Cáncer-Diagnóstico. I. Universidad de León. Servicio de Publicaciones. II. Título.

577.112

543.645.6

616.36-006.6-074

Reservados todos los derechos.

Cualquier forma de reproducción, distribución, comunicación pública o transformación de esta obra solo puede ser realizada con la autorización de sus titulares, salvo excepción prevista por la ley.

Diríjase a CEDRO (Centro Español de Derechos Reprográficos) si necesita fotocopiar o escanear algún fragmento de esta obra.

[www.cedro.org](http://www.cedro.org); 91 702 19 70 / 93 272 04 45



SERVICIO  
DE PUBLICACIONES  
UNIVERSIDAD DE LEÓN

Edita: UNIVERSIDAD DE LEÓN. Servicio de Publicaciones

© Universidad de León. Servicio de Publicaciones.

© Paula Fernández Palanca

ISBN: 978-84-19682-10-9

Depósito legal: DL LE 240-2023

Imprime: Kadmos

Impreso en España / Printed in Spain



Esta editorial es miembro de UNE, lo que garantiza la difusión y comercialización de sus publicaciones a nivel nacional e internacional.

# ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN .....	11
1.1. CARCINOMA HEPATOCELULAR .....	11
1.2. LENVATINIB .....	17
1.3. NEUROFILINA-1 .....	21
1.4. AUTOFAGIA .....	24
1.5. HIPOXIA .....	27
2. OBJETIVOS .....	31
3. MATERIALES Y MÉTODOS .....	33
3.1. REVISIÓN SISTEMÁTICA Y METAANÁLISIS .....	33
3.1.1. <i>Objetivos de la revisión sistemática con metaanálisis y registro del protocolo</i> .....	33
3.1.2. <i>Estrategia de búsqueda</i> .....	34
3.1.3. <i>Criterios de inclusión y exclusión</i> .....	35
3.1.4. <i>Extracción de datos y análisis de calidad</i> .....	35
3.1.5. <i>Análisis estadístico</i> .....	35
3.2. ESTUDIO EXPERIMENTAL .....	36
3.2.1. <i>Bases de datos públicas</i> .....	37
3.2.2. <i>Cultivos celulares y reactivos</i> .....	38
3.2.3. <i>Silenciamiento génico temporal</i> .....	40
3.2.4. <i>Análisis de viabilidad y proliferación celular</i> .....	40
3.2.5. <i>Ensayo de capacidad de formación de colonias</i> .....	41
3.2.6. <i>Análisis de la expresión de RNA mensajero</i> .....	42
3.2.7. <i>Análisis de la expresión proteica por Western blot</i> .....	42
3.2.8. <i>Análisis de la expresión proteica por inmunofluorescencia y microscopía de láser confocal</i> .....	46
3.2.9. <i>Análisis del contenido en autofagosomas-lisosomas</i> .....	47
3.2.10. <i>Ensayo de flujo autofágico</i> .....	48
3.2.11. <i>Análisis estadístico</i> .....	48

4. RESULTADOS .....	51
4.1. REVISIÓN SISTEMÁTICA Y METAANÁLISIS: POTENCIAL VALOR PRONÓSTICO, DIAGNÓSTICO Y CLINICOPATOLÓGICO DE NRP1 EN HCC .....	51
4.1.1. Selección y características de los estudios incluidos .....	51
4.1.2. Asociación clínica de NRP1 con el pronóstico y la patogénesis en el HCC .....	54
4.1.3. Asociación entre NRP1 y parámetros clinicopatológicos en pacientes con HCC .....	55
4.1.4. Evaluación de las fuentes de heterogeneidad .....	57
4.1.5. Análisis de sesgo de publicación .....	62
4.2. PAPEL DE LA MODULACIÓN DE NRP1 MEDIADA POR LOS PROCESOS DE AUTO- FAGIA E HIPOXIA EN LA PÉRDIDA DE SENSIBILIDAD A LENVATINIB EN EL HCC: ESTUDIO EXPERIMENTAL .....	65
4.2.1. Análisis de la expresión de NRP1 y su correlación con el estadio tumoral en muestras de pacientes con HCC .....	65
4.2.2. Caracterización de la expresión de NRP1 y la capacidad migrato- ria de distintas líneas celulares de HCC humano .....	67
4.2.3. Evaluación de la eficacia del lenvatinib in vitro en las líneas de HCC humano .....	69
4.2.4. Evaluación del papel de NRP1 en los efectos del lenvatinib sobre la proliferación y migración celular en HCC.....	71
4.2.5. Identificación del mecanismo responsable de la disminución de la expresión de NRP1 derivada de lenvatinib en las líneas celulares de HCC .....	80
4.2.6. Estudio del papel de la degradación de NRP1 por autofagia en la actividad antitumoral del lenvatinib en las líneas de HCC huma- no .....	84
4.2.7. Evaluación de los efectos derivados de la hipoxia tumoral en la degradación de NRP1 dependiente de autofagia en las líneas de HCC humano .....	93
4.2.8. Determinación del papel de HIF-1 $\alpha$ en la eficacia del lenvatinib a través de la modulación de NRP1 mediada por una autofagia inducida por hipoxia .....	96
5. DISCUSIÓN .....	101
5.1. RELEVANCIA CLÍNICA DE NRP1 COMO BIOMARCADOR PARA EL PRONÓSTICO, DIAGNÓSTICO E INVASIÓN EN PACIENTES CON HCC .....	101
5.1.1. Asociación significativa de NRP1 con un peor pronóstico y la pa- togénesis tumoral en pacientes con HCC .....	102
5.1.2. Correlación entre la sobreexpresión de NRP1 y una menor edad y mayor riesgo de invasión venosa en pacientes con HCC.....	103
5.1.3. Principales limitaciones de la revisión sistemática y metaanálisis	105
5.1.4. Resumen de los principales resultados obtenidos de la revisión sistemática y metaanálisis .....	106

5.2. LA DEGRADACIÓN DE NRPI MEDIADA POR AUTOFAGIA Y LA RESPUESTA A HIPOXIA COMO MECANISMOS CLAVE EN LA PÉRDIDA DE SENSIBILIDAD AL LENVATINIB EN HCC .....	106
5.2.1. <i>La disminución de la expresión de NRPI causada por lenvatinib está implicada en sus efectos antitumorales</i> .....	108
5.2.2. <i>La degradación de NRPI dependiente de autofagia está implicada en la modulación de los efectos antitumorales del lenvatinib en las células de HCC humano</i> .....	109
5.2.3. <i>La respuesta a hipoxia asociada a HIF-1α podría contribuir a la pérdida de sensibilidad a lenvatinib a través de la modulación de la relación NRPI-autofagia en las células de HCC humano</i> .....	111
6. CONCLUSIONES .....	115
7. INFORMACIÓN SUPLEMENTARIA.....	117
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	119



# 1. INTRODUCCIÓN

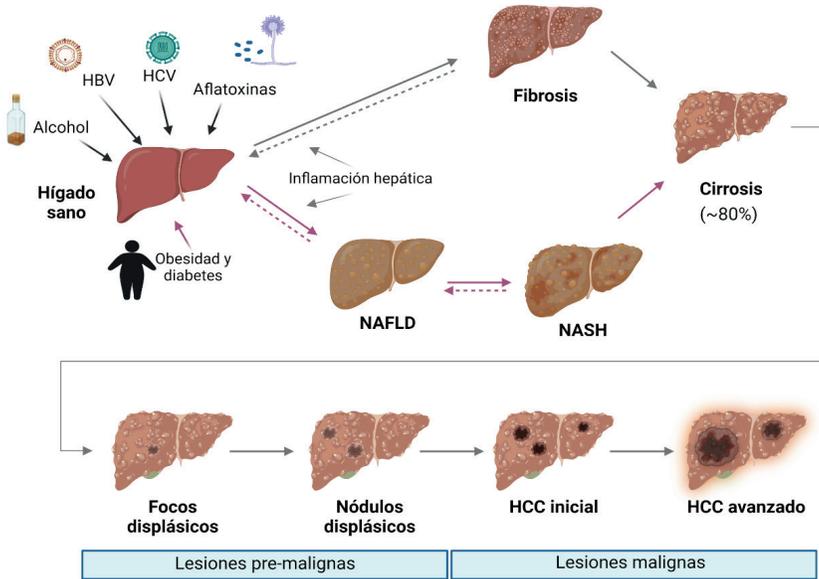
## 1.1. CARCINOMA HEPATOCELULAR

El cáncer hepático primario constituye uno de los tumores con mayor tasa de incidencia y de mortalidad a nivel mundial [1]. Este tipo de cáncer presenta una elevada heterogeneidad genética [2] y se clasifica en distintos tipos de tumores, donde el carcinoma hepatocelular (HCC) representa el 75%-85% de los casos, seguido del colangiocarcinoma intrahepático (iCCA, 10%-15% de los casos) y de otros tumores hepáticos menos frecuentes [1,3,4]. El cáncer de hígado se sitúa como el sexto tipo de tumor más frecuente y la tercera causa de muerte por cáncer a nivel mundial, tras el cáncer de pulmón y el cáncer colorrectal [1]. Asimismo, existen diferencias importantes entre sexos, siendo el quinto y séptimo tumor más frecuente, y el segundo y sexto más mortal en hombres y mujeres, respectivamente [1].

Las elevadas tasas de incidencia y mortalidad del HCC están estrechamente asociadas a la amplia variedad de agentes etiológicos que favorecen su desarrollo o hepatocarcinogénesis [2,5]. Entre los distintos factores de riesgo, las infecciones por el virus de la hepatitis C (HCV) y el virus de la hepatitis B (HBV) se asocian con el 80% de los casos de HCC y son considerados los principales agentes etiológicos [6]. No obstante, el consumo excesivo de alcohol, la diabetes mellitus, la esteatohepatitis no alcohólica (NASH) asociada a obesidad, la enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD), entre otros, también favorecen la hepatocarcinogénesis [5,7]. Aunque las infecciones crónicas por los virus HBV y HCV son factores clave en el desarrollo del HCC, existen diferencias importantes en sus prevalencias en función de la zona geográfica [3]. El desarrollo de HCC asociado a una infección por HBV se produce mayoritariamente en las regiones del este asiático y África [5,6], mientras que las infecciones por HCV son más prevalentes en Europa, Norteamérica y Japón [6,7]. Cabe destacar que, a pesar de que el 80%-90% de los casos de HCC se

desarrollan en un contexto de cirrosis, el HBV es capaz de promover el proceso de hepatocarcinogénesis en ausencia de cirrosis [3,6,7]. Por otro lado, debido al incremento en la prevalencia de diabetes y obesidad en la población de los países desarrollados, los principales factores de riesgo asociados al desarrollo de HCC en estas zonas son las enfermedades de NASH y NAFLD [5,6]. Estas patologías hepáticas son consideradas precursores clave del HCC estrechamente asociadas a los hábitos de vida actuales y al sedentarismo [7,8]. De manera similar, el consumo excesivo de alcohol también representa un factor de riesgo importante y está asociado principalmente al desarrollo de cirrosis hepática [3,6]. En particular, una cirrosis alcohólica se sitúa actualmente como el segundo factor de riesgo más importante en los países de Europa y Estados Unidos [6]. En determinadas zonas de África y Asia donde se cultivan y almacenan grandes cantidades de cereales y semillas oleaginosas, básicos para la nutrición, se encuentran a menudo unas micotoxinas derivadas de determinadas especies de hongos, conocidas como aflatoxinas [3,5,6]. A pesar de que existen más de 20 tipos de aflatoxinas, la aflatoxina B1 destaca por ser uno de las toxinas con mayor actividad hepatocarcinogénica, incrementando el riesgo de desarrollo de HCC en dichas áreas geográficas [3]. Por último, existen otros factores que también contribuyen al proceso de hepatocarcinogénesis, aunque con menor frecuencia, como factores sociodemográficos incluyendo la edad, el género y la etnia [7]; hábitos como el tabaco o la dieta [7]; enfermedades genéticas y metabólicas como la hepatitis autoinmune, la deficiencia en alfa 1-antitripsina o la porfiria, entre otros [3,6]. Por lo tanto, existen numerosos factores y agentes que participan y favorecen el desarrollo del HCC (**Figura 1**), así como la compleja heterogeneidad genética encontrada en este tipo de tumor hepático.

El proceso de hepatocarcinogénesis es muy complejo y está constituido por múltiples pasos donde acontecen distintos mecanismos moleculares [7,9,10]. Existen varias alteraciones genéticas que han sido descritas como clave durante la transformación de los hepatocitos y el desarrollo de HCC [11]. Destacan las mutaciones en el promotor del gen de la transcriptasa reversa de la telomerasa (*TERT*), que conducen a la activación de la telomerasa, mutaciones del gen codificante para la  $\beta$ -catenina *CTNNB1*, o del gen *TP53*, codificante para un regulador clave del ciclo celular [6]. Aunque las mutaciones en estos genes representan los principales promotores de la hepatocarcinogénesis, diversos estudios han identificado mutaciones en múltiples genes con un papel importante en este proceso [9,10]. Asimismo, el estudio de las alteraciones epigenéticas ha desvelado un papel clave de estas en la hepatocarcinogénesis, principalmente de la hipermetilación del DNA, metilación de histonas o la remodelación de los cromosomas, entre otras [4,9].



**Figura 1. Etapas del proceso de hepatocarcinogénesis.** Distintos agentes etiológicos promueven la aparición de daño hepático caracterizado por un microambiente pro-inflamatorio. Los hepatocitos sufren ciclos de necrosis y regeneración, y acumulan alteraciones genéticas y epigenéticas. En este proceso participan distintos tipos celulares que secretan citocinas y factores de crecimientos promoviendo el desarrollo de fibrosis hepática y, posteriormente, de cirrosis. En determinados casos donde se produce un daño hepático por esteatosis, ésta puede avanzar a NAFLD y NASH. Una vez establecida una cirrosis hepática, se generan lesiones pre-neoplásicas que pueden conducir en último término al Desarrollo de un HCC. Imagen creada con BioRender.com.

El desarrollo del HCC es un proceso complejo en el que tienen lugar tanto alteraciones moleculares como celulares [7,10]. Inicialmente, se produce un daño hepático y un ambiente inflamatorio, presentes en el 90% de los casos de HCC [4,10]. El mantenimiento de este daño crónico promueve la activación y reclutamiento de macrófagos, linfocitos, células hepáticas estrelladas (HSCs), que interaccionan con los hepatocitos [7,10]. La activación de estas HSCs favorece la secreción de citocinas y componentes de la matriz extracelular (ECM), generando la aparición de un microambiente fibrótico [4,7,10]. La acumulación de estos componentes de la ECM, colágeno, factores de crecimiento, y factor pro-angiogénicos promueven la aparición de un estroma pro-tumoral donde participan no sólo las HSCs, sino también fibroblastos hepáticos, macrófagos y células endoteliales [4,7,9,10]. Tras el establecimiento de una fibrosis hepática

favorecida por el daño hepático continuado [9,10], la interacción entre los distintos componentes celulares y la acumulación de alteraciones moleculares conduce al desarrollo de una cirrosis, presente en el 80%-90% de los casos de HCC [4,9] (**Figura 1**). En determinados casos, la presencia de NAFLD en el hígado puede avanzar a NASH, desembocando en el desarrollo de un HCC [12,13]. En esta etapa de cirrosis aparecen pequeños nódulos que conforman lesiones pre-neoplásicas, donde se continúan acumulando alteraciones genéticas y epigenéticas hasta la aparición de nódulos tumorales en etapas tempranas [4,10]. Posteriormente, los hepatocitos tumorales continúan proliferando, progresando a HCC avanzado (**Figura 1**) [4,10].

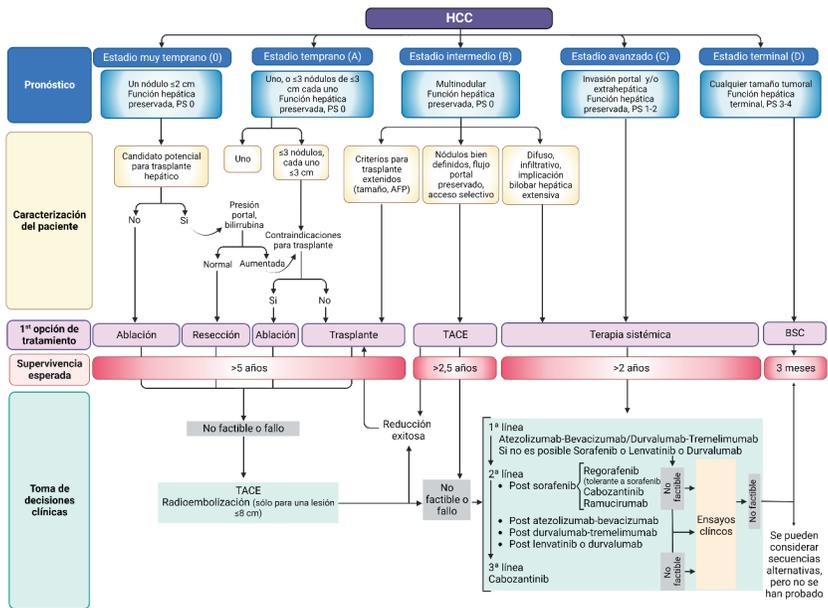
Teniendo en cuenta la complejidad del proceso de hepatocarcinogénesis y la dificultad de distinción entre nódulos tumorales y cirróticos, la mayoría de los casos de HCC son diagnosticados en etapas avanzadas [14,15]. Adicionalmente, en etapas tempranas este tipo de tumor hepático es asintomático lo que favorece su diagnóstico tardío, cuando las opciones de tratamiento curativas ya no están disponibles [14,15]. Como parte de las técnicas de diagnóstico actuales, el uso del biomarcador serológico alfa-fetoproteína (AFP) es una de las más recomendadas para el cribado en pacientes con riesgo de presentar HCC junto con la ultrasonografía [7,14]. La tomografía computarizada (CT) y la resonancia magnética (MRI) también constituyen técnicas de imagen muy utilizadas para el diagnóstico del HCC con elevada sensibilidad y especificidad [7,14]. No obstante, en aquellos casos donde estas herramientas no proporcionan resultados fiables, la biopsia es la técnica recomendada para un diagnóstico adecuado [2,14].

Tras el diagnóstico del HCC, los pacientes son clasificados en grupos pronósticos en base a distintos parámetros clínicos, con el fin de facilitar la elección del tratamiento más adecuado [16]. Aunque existen diversos sistemas de clasificación, el más empleado es el sistema *Barcelona Clinic Liver Cancer* (BCLC) [7,16] (**Figura 2**).

Este algoritmo establece cinco grupos (0, A-D) en los que clasificar a los pacientes diagnosticados con HCC en base al tamaño del tumor, el estado funcional (PS) y la función hepática [14,17] (**Figura 2**).

Una vez establecido el grupo, estos parámetros permiten tomar decisiones sobre la terapia más adecuada, estableciendo un pronóstico para cada paciente [17]. Dentro de la clasificación, los pacientes pueden ser incluidos en grupos de etapas tempranas de HCC, como los grupos 0 o A, donde la cirugía

permanece como el tratamiento de elección [14,17] (**Figura 2**). Sin embargo, cuando se diagnostican en etapas intermedias, grupo B, los tratamientos de elección son la quimioembolización transarterial (TACE) o, en algunos casos el trasplante hepático [14,17] (**Figura 2**). En aquellos casos que el diagnóstico es en estadios avanzados del tumor, grupo C, los pacientes sólo son elegibles para el tratamiento con fármacos de terapia sistémica, como los inhibidores tirosín quinasa (TKIs) o los anticuerpos monoclonales [14,17] (**Figura 2**). Por último, los pacientes clasificados en el grupo D, o estadio terminal, son mayoritariamente sometidos a tratamientos paliativos con el fin de reducir los síntomas [16,17] (**Figura 2**).



**Figura 2. Sistema de clasificación BCLC establecido en 2022.** Algoritmo de clasificación de los pacientes con HCC basado en el tamaño del tumor, el estado funcional (PS), y la función hepática, permitiendo establecer una asociación entre el pronóstico y la toma de decisiones clínicas. Figura adaptada de [17]. BSC, tratamientos paliativos; TACE, quimioembolización transarterial. Figura creada con BioRender.com.



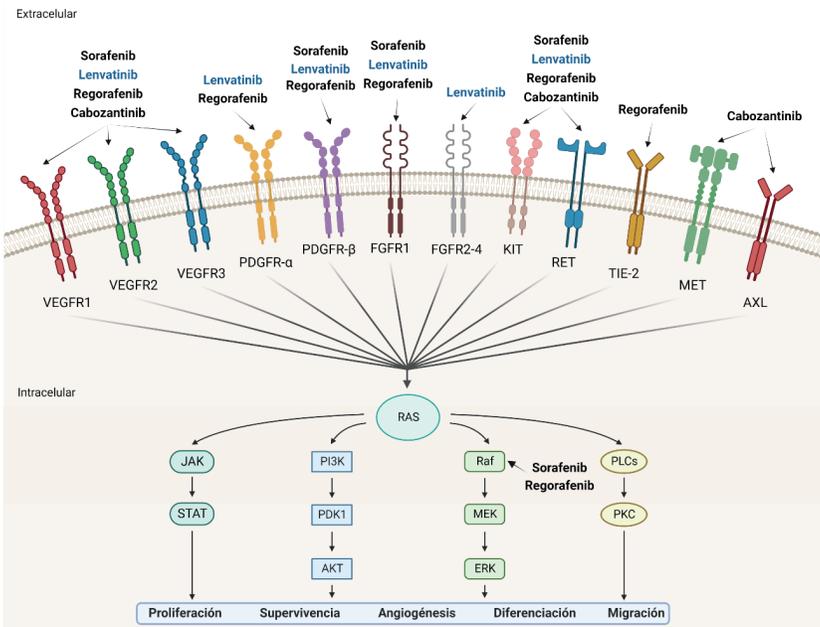
**Figura 3. Línea temporal de los fármacos dirigidos aprobados y actualmente disponibles para el tratamiento del HCC avanzado.** Representación lineal de los fármacos TKIs (parte inferior) y anticuerpos monoclonales (parte superior) disponibles para el tratamiento del HCC Avanzado como terapias de primera línea (rojo) y segunda línea (verde). Creado con BioRender.com.

El objetivo del tratamiento es aumentar la supervivencia del paciente al mismo tiempo que mantener una calidad de vida [2]. Como se ha mencionado anteriormente, en etapas tempranas los pacientes pueden ser sometidos a cirugía, desde trasplante hepático hasta resección hepática parcial, mientras que en etapas intermedias la terapia de elección es TACE [2,18]. Sin embargo, la mayoría de los casos de HCC son diagnosticados en etapas avanzadas, donde sólo se puede aplicar terapia sistémica [2,18]. Dentro de estos tratamientos se distinguen dos grupos de fármacos: TKIs y anticuerpos monoclonales [14]. A pesar de los recientes avances en este campo, inicialmente sólo se encontraba disponible el TKI sorafenib para el tratamiento del HCC avanzado, aprobado en el 2007 por la *Food and Drug Administration* (FDA) [7,10]. Tras más de una década permaneció como la única opción terapéutica para el tratamiento de primera línea frente al HCC, hasta la aprobación del lenvatinib en 2017 [4,19]. Posteriormente, distintos ensayos mostraron resultados positivos, llevando a la aprobación de TKIs como tratamiento de segunda línea frente al HCC con resistencia a sorafenib, así como de anticuerpos monoclonales [7,10] (**Figura 3**).

### 1.2. LENVATINIB

El TKI lenvatinib fue el primer fármaco de este tipo en mostrar resultados no inferiores en términos de supervivencia, y superiores en parámetros secundarios analizados en el ensayo clínico de fase III frente al HCC [20,21]. Al igual que el sorafenib, el lenvatinib actúa inhibiendo receptores tirosín quinasa (RTKs), principalmente el receptor del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGFR) 1-3, el receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR)- $\alpha$  y - $\beta$ , los receptores del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR) 1-4, el receptor del factor de crecimiento de mastocitos/células madre (KIT), y el receptor de tirosín-proteína quinasa proto-oncogén (RET) [21,22] (**Figura 4**).

Además de mostrar diferencias en algunas dianas moleculares con el sorafenib (**Figura 4**), el lenvatinib también ha mostrado ejercer un efecto inhibitorio



**Figura 4. Principales efectos moduladores del lenvatinib y el resto de los TKIs aprobados frente al HCC avanzado sobre los RTKs y las vías de señalización desencadenadas.** Se representan los efectos específicos del lenvatinib (azul) y del resto de TKIs sobre los distintos receptores. AKT, RAC-alfa serina/treonina proteína quinasa; MET, receptor del factor de crecimiento de hepatocitos; PI3K, fosfatidilinositol 3-quinase. Creado con BioRender.com.

más marcado sobre los receptores VEGFR, FGFR y KIT, y el proceso de angiogénesis, definido como la generación de nuevos vasos sanguíneos a partir de los existentes [22]. A nivel celular, el lenvatinib es capaz de bloquear distintos procesos clave en la progresión y supervivencia de las células tumorales del HCC, destacando la inhibición de la angiogénesis, invasión, metástasis [22-24], además de disminuir la proliferación celular e incrementar la muerte celular [23,25-28]. No obstante, a pesar de los resultados obtenidos por estos estudios, aún es necesario dilucidar con exactitud el papel que desempeña el lenvatinib en la respuesta celular y la adaptación de los hepatocitos tumorales en el HCC [22].

A pesar de los beneficios mostrados por los fármacos TKIs sobre la supervivencia de los pacientes, una administración prolongada de los mismos conduce al desarrollo de mecanismos de resistencia por parte de las células tumorales y, en último término, al fracaso terapéutico [29,30]. Se han descrito distintas alteraciones moleculares como parte de los mecanismos subyacentes a la adquisición de resistencia a TKIs, principalmente frente al sorafenib [10,19], aunque estudios recientes se han centrado en el estudio del desarrollo de resistencia a lenvatinib en HCC, donde una gran variedad de mecanismos ha sido descrita [31–56] (**Tabla I**).

A pesar del número creciente de investigaciones que se han centrado en el estudio de los mecanismos implicados en la pérdida de sensibilidad a lenvatinib por las células de HCC, aún es necesario obtener un mejor conocimiento de dichos mecanismos [22,29].

**Tabla I.** Principales resultados obtenidos sobre los posibles mecanismos moleculares asociados a la pérdida de sensibilidad a lenvatinib en HCC.

<b>Mecanismos implicados en la pérdida de sensibilidad a lenvatinib</b>		
<b>Alteraciones moleculares</b>	<b>Proceso celular</b>	<b>Ref.</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>▼ KEAP1 (inactivación)</li> <li>▲ Genes regulados por Nrf2: NQO1, GPX2 y TXNRD1</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▲ Viabilidad celular</li> <li>▼ Producción de ROS</li> </ul>	[31]
<ul style="list-style-type: none"> <li>▲ Eje HGF/c-MET</li> <li>▲ Activación de la vía PI3K/AKT</li> <li>▲ Activación de la vía MAPK/ERK</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▲ Proliferación celular</li> <li>▲ Invasión celular</li> <li>▼ Apoptosis</li> <li>▲ EMT</li> </ul>	[32]

▲ FGFR2	Mantenimiento de la vasculatura tumoral	[33]
▲ Activación de la vía MAPK/ERK ▲ Marcadores de EMT ▲ VEGF, PDGF-AA y angiogenina	▲ Proliferación celular ▲ Invasión celular	[34]
▲ ADAMTSL5	▲ Proliferación celular	[35]
▲ IRF2	▲ Proliferación celular ▼ Apoptosis	[37]
YRDC → traducción de KRAS	▲ Proliferación celular ▲ Migración celular	[36]
▲ Señalización hedgehog	▲ Proliferación celular ▲ Migración celular ▼ Apoptosis	[38]
▲ Activación de EGFR	▲ Proliferación celular	[39]
▼ NF1 → ▲ Señalización PI3K/AKT y MAPK/ERK ▼ DUSP9 → ▲ Señalización MAPK/ERK Inactivación de FOXO3	▲ Proliferación celular ▲ Migración celular	[40]
▲ lncRNA MT1JP	▲ Proliferación celular ▼ Apoptosis	[41]
<b>Mecanismos implicados en la pérdida de sensibilidad a lenvatinib</b>		
<b>Alteraciones moleculares</b>	<b>Proceso celular</b>	<b>Ref.</b>
▲ FGFR1 ▲ Señalización AKT/mTOR y ERK	▲ Proliferación celular ▼ Apoptosis	[42]
▲ ETS-1 → ▲ VEGFR2 ▲ Señalización RAS/MEK/ERK	▲ Proliferación celular ▲ Migración celular	[43]
▲ Señalización ERK	▲ Proliferación celular Arresto del ciclo celular	[44]

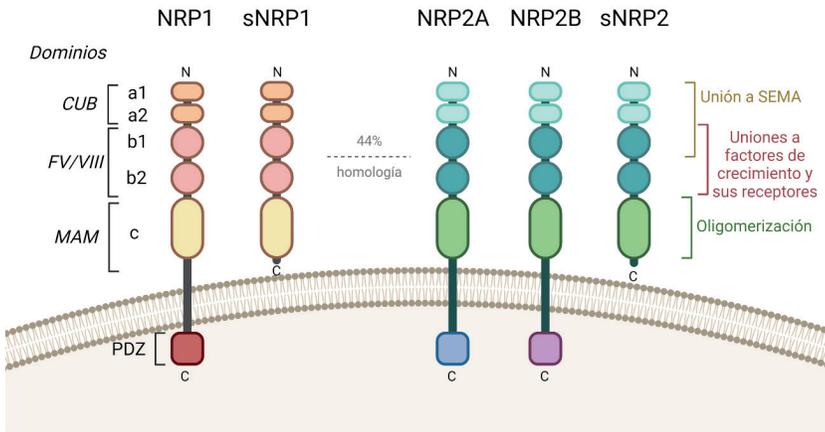
▲ Activación EGFR		
▲ Activación IGF1R/INSR	▲ Proliferación celular	[45]
▲ Niveles de ROS		
▲ ITGB8 → ▲ Estabilización de AKT derivada de HSP90	▲ Proliferación celular	[46]
▲ Eje de señalización EGFR-STAT3-ABCB1	▲ Proliferación celular	[47]
▼ Expresión de DUSP4	▲ Proliferación celular ▲ Migración celular	[48]
▲ METTL1 → Activación de EGFR	▲ Proliferación celular ▼ Apoptosis	[49]
▲ Caspasa-3 → escisión de SREBP2 → biosíntesis de colesterol	▲ Proliferación celular	[50]
▲ LPTM5	▲ Proliferación celular ▲ Autofagia	[51]
▲ MDR1 y BCRP ▲ Señalización EGFR/PI3K	▲ Proliferación celular ▼ Apoptosis	[52]
Interacción de lncRNA AC026401.3 con OCT1 ▲ Activación de la señalización E2F2	▲ Proliferación celular	[53]
▲ FBXO9	▲ Proliferación celular ▲ Migración celular	[54]
▲ c-MET ▼ miR-128-3p	▲ Proliferación celular ▼ Apoptosis	[55]
▲ circMED27	▲ Proliferación celular	[56]

ABCB1, transportador de cassette de unión a ATP B1; ADAMTSL5, proteína 5 similar al motivo de trombospondina tipo 1 que contiene un dominio de metaloproteasa similar a desintegrina; AKT, RAC-alfa serina/treonina proteína quinasa; BCRP, proteína de resistencia a cáncer de mama; circMED27, subunidad 27 del complejo mediador de RNA circular; DUSP9, fosfatasa 9 de especificidad dual; E2F2, factor de transcripción E2F2; EGFR, receptor del factor de crecimiento epidérmico; EMT, transición epitelio mesénquima; ERK, quinasa regulada por señales extracelulares; ETS-1, proteína C-ets-1; FBXO9, proteína 9 de única caja F; FOXO3, proteína de caja de horquilla O3; GPX2, glutatión peroxidasa 2; HGF, factor de crecimiento de hepatocitos; HSP90, proteína de choque térmico 90; IGF1R, receptor 1 del factor de crecimiento de tipo insulina; INSR, receptor de insulina; IRF2, factor 2 regulador del interferón; ITGB8, integrina beta-8; LAPTM5, proteína 5 transmembrana asociada a lisosomas; lncRNA, RNA no codificante largo; MAPK, MAP quinasa; MDR1, proteína 1 de resistencia múltiple; MEK, proteína quinasa quinasa activada por mitógenos; MET, receptor del factor de crecimiento de hepatocitos; METTL1, tRNA (guanina-N(7)-)metiltransferasa; mTOR, rapamicina diana de mamíferos; NF1, neurofibromina; NQO1, NAD(P) H dehidrogenasa [quinona] 1; Nrf2, factor asociado al factor nuclear eritroide 2; OCT1, transportador 1 de cationes orgánicos; PI3K, fosfatidilinositol 3-quinase; Ref, referencia; ROS, especies reactivas de oxígeno; SREBP2, proteína 2 de unión al elemento regulador de esterol; TXNRD1, tiorredoxina reductasa 1; YRDC, treonilcarbamoil-AMP sintasa.

### 1.3. NEUROPILINA-I

Las neuropilinas (NRPs) son proteínas transmembrana de tipo I con funciones pleiotrópicas en distintos procesos fisiológicos y patológicos [57,58]. Inicialmente, las NRPs fueron descritas como proteínas clave en el crecimiento de axones y el desarrollo neural; no obstante, estudios posteriores han destacado su papel en la angiogénesis y otros procesos celulares implicados en la progresión tumoral [58,59].

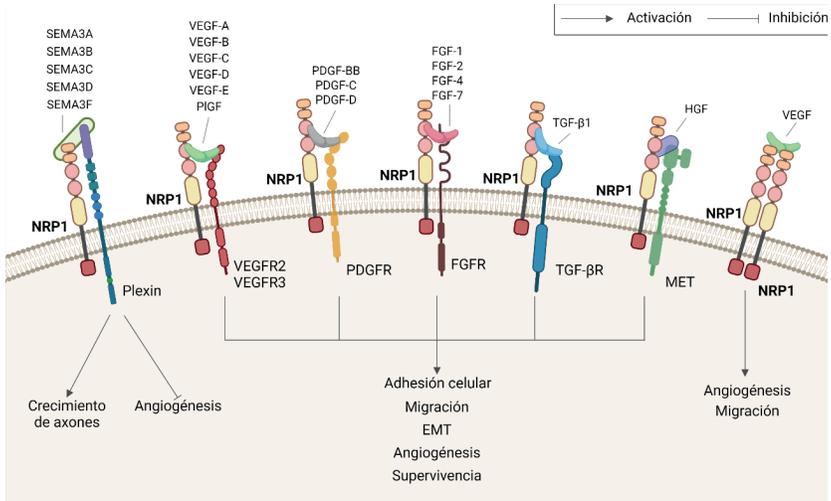
Funcionalmente, estas proteínas se localizan en la membrana de las células actuando como receptores no-tirosín quinasa y se expresan en una gran variedad de tejidos [58,59]. Dentro de la familia de las NRPs hay dos tipos, NRP1 y NRP2, codificadas por dos genes diferentes, pero con una homología del 44% y una estructura proteica similar [58,60,61] (**Figura 5**). Cabe destacar que, aunque estas NRPs se encuentran mayoritariamente en la membrana celular, también existen formas solubles carentes de los dominios transmembrana y citoplásmico, sNRP1 y sNRP2 [61] (**Figura 5**).



**Figura 5. Estructura proteica de los principales tipos de NRPs, NRP1 y NRP2, y sus variantes.** Ambas NRPs presentan dominios con distintas funciones celulares, existiendo formas solubles de ambas, sNRP1 y sNRP2, carentes de los dominios citoplásmico y transmembrana. De NRP2 existen dos variantes por *splicing* diferenciadas en un 89% de homología en el extremo C-terminal. Creado con BioRender.com.

A través de los dominios extracelulares, NRP1 y NRP2 son capaces de interaccionar con proteínas de la familia de las semaforinas de clase 3 (SEMA3) o con proteínas de la familia de VEGF y otros factores de crecimiento, formando complejos de señalización que promueven la activación de distintas rutas de señalización intracelular [58,62] (**Figura 6**). Las principales diferencias entre ambas NRPs radican en sus funciones celulares, habiéndose descrito un papel mayor de NRP1 en la modulación de la angiogénesis y migración celular de células endoteliales y otros tipos celulares presentes en pulmón, hígado, músculo esquelético, riñón y páncreas [58]. Por otro lado, NRP2 es expresado principalmente en células endoteliales de vasos sanguíneos y linfáticos, y en células epiteliales de los túbulos renales distal y proximal [58].

NRP1 destaca por su capacidad de modular procesos clave en el desarrollo y progresión tumoral a través de su interacción con factores de crecimiento y sus receptores, formando heterodímero [58,61] (**Figura 6**). La inducción de angiogénesis mediada por su interacción con VEGF/VEGFR es uno de los principales efectos asociados a NRP1 con un papel clave en cáncer [61,62], aunque se han descrito diversas actividades moduladoras a través de su interacción con otros complejos [58,60,61] (**Figura 6**).



**Figura 6. Interacciones moleculares y efectos derivados ejercidos por NRP1 de unión a membrana.** NRP1 actúa como correceptor de múltiples ligandos y sus receptores, modulando procesos celulares clave como el crecimiento de axones, la angiogénesis, la adhesión celular, la migración, la transición epitelio mesénquima (EMT), y la supervivencia celular. PIGF, factor de crecimiento placentario. Creado con BioRender.com.

En el HCC, el papel de NRP1 no ha sido estudiado en profundidad, aunque se han descrito resultados interesantes que destacan su potencial papel en la progresión y respuesta al tratamiento en este tumor hepático [58]. En concreto, se ha encontrado que NRP1 podría actuar como biomarcador al encontrarse sobreexpresado en el tejido tumoral en comparación con el tejido hepático sano [63–72], así como en muestras serológicas de pacientes con HCC [66,73]. De manera similar, elevados niveles de NRP1 han sido estrechamente asociados con un peor pronóstico y una menor supervivencia de los pacientes con HCC [65,71,74–77], y con otros parámetros asociados al tumor [65,66,71,78]. En esta línea, los procesos de invasión y migración celular han destacado como los principales procesos directamente modulados por NRP1, tanto a nivel clínico como preclínico [63,65,71–73,79–89] (**Figura 7**).

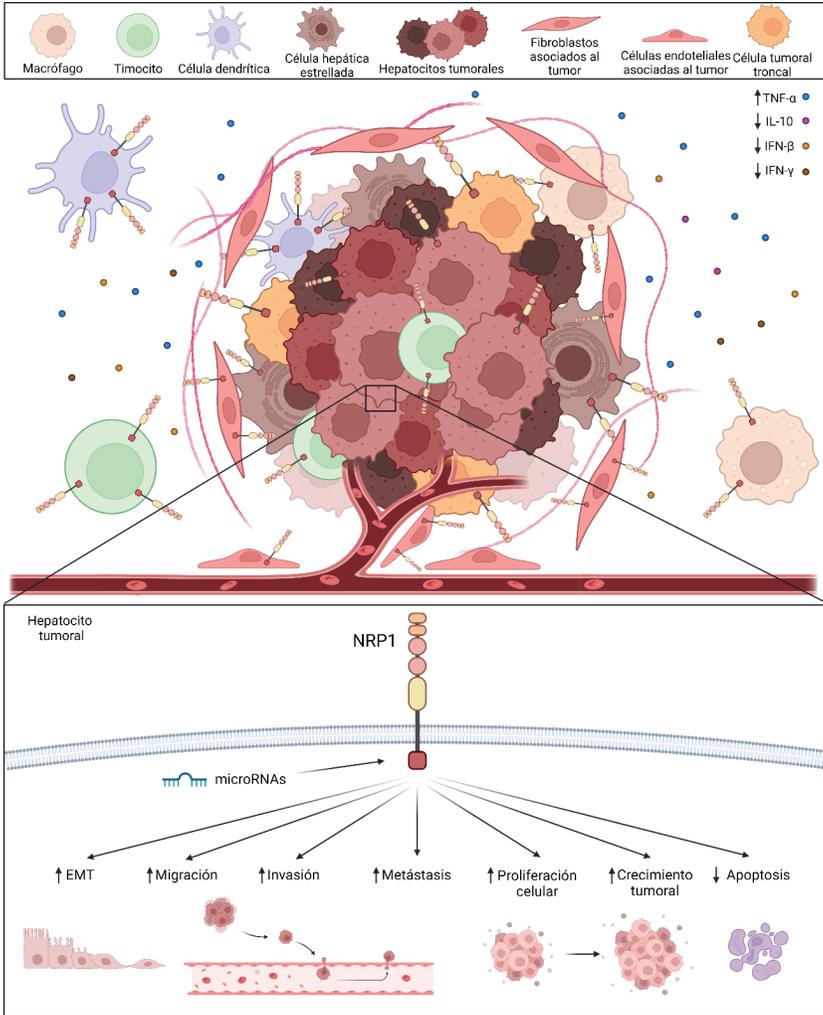
Igualmente, varios estudios se han centrado en los posibles efectos moduladores de NRP1 sobre la supervivencia y muerte celular a través de distintas rutas de señalización, destacando su capacidad de inhibición de la proliferación celular e inducción de la apoptosis [63,66,72,79–85,90–96]. Por otro lado, la potencial asociación de NRP1 con la respuesta inmune también ha sido recientemente

evaluada, aunque en menor medida [77,80,81,97–102]. Una sobreexpresión de NRP1 en distintos tipos celulares del sistema inmune, como macrófagos o timocitos, presentes en el microambiente del HCC ha mostrado una correlación significativa con distintos marcadores de respuesta inmune [77,80,81,97–100] (**Figura 7**), sugiriendo un papel modulador interesante por parte de NRP1 en la respuesta inmune frente al HCC. Como parte del microambiente tumoral, NRP1 también se ha encontrado expresado en altos niveles en distintos tipos celulares, incluyendo células tumorales troncales (CSCs), fibroblastos asociados al tumor (CAFs), células endoteliales asociadas al tumor (TECs) y HSCs [72,76,83] (**Figura 7**), reforzando el interés del estudio de NRP1 en el microambiente tumoral.

Las condiciones de hipoxia intratumoral han sido uno de los principales centros de estudio de la investigación en el HCC, debido a su importante papel en la progresión tumoral [103]. En relación con NRP1, la expresión esta proteína bajo condiciones de hipoxia se ha visto incrementada en varios estudios [88,90], observándose una correlación negativa con el factor inducible por hipoxia  $1\alpha$  (HIF- $1\alpha$ ) [90] (**Figura 7**). De manera similar, los microRNAs (miRNAs), RNAs no codificantes con un papel importante en cáncer, también han mostrado una modulación directa de NRP1 como mecanismo mediador de sus efectos durante la progresión del HCC [83,86,104,105] (**Figura 7**). Por lo tanto, aunque aún son necesarios más estudios para elucidar con exactitud el papel desempeñado por NRP1 en el HCC, los estudios llevados a cabo destacan el potencial efecto modulador de NRP1 en diversos procesos y mecanismos moleculares clave en la progresión y adaptación celular en el HCC.

#### 1.4. AUTOFAGIA

La autofagia es un proceso de degradación de componentes celulares a través de la fusión con lisosomas [106] cuyo papel en cáncer, y en HCC, es clave debido a su papel dual [107]. El proceso de autofagia se caracteriza por la variedad de mediadores que participan en ella: desde la formación de los autofagosomas, principales estructuras encargadas de incorporar los componentes a degradar, la captación de las moléculas y estructuras a degradar, hasta su fusión con los lisosomas y la degradación por enzimas lisosomales [107–109] (**Figura 8**). Aunque existen distintos tipos de autofagia en función del tipo de cargo a eliminar, la macroautofagia, normalmente conocida como autofagia, representa el principal proceso presente en las células [106,108].



**Figura 7. Principales efectos moduladores de NRP1 en los hepatocitos tumorales, así como su papel en el microambiente tumoral en HCC.** NRP1 se expresa tanto en células tumorales hepáticas como en otras poblaciones celulares asociadas al tumor pertenecientes al microambiente tumoral y al sistema inmune. Este receptor, NRP1, se expresa en un gran número de tipos celulares y participa en varios mecanismos celulares y moleculares implicados en el desarrollo y progresión del HCC, modulando procesos clave. IFN-β, interferón beta, IFN-γ, interferón gamma. Creado con BioRender.com.