



**FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

TRABAJO FIN DE GRADO

**PAPEL DEL RECEPTOR TIROSINA QUINASA
EGFR EN LA INFLAMACIÓN HEPÁTICA Y EN
EL CARCINOMA HEPATOCELULAR Y SU
INTERÉS COMO DIANA TERAPÉUTICA**

Autora: VICTORIA JIMÉNEZ RUIZ

Fecha: CURSO 2019/2020

Tutora: ARANZAZU SÁNCHEZ MUÑOZ

ÍNDICE

1. RESUMEN	3
2. ABSTRACT.....	3
3. INTRODUCCIÓN	4
3.1 FACTORES DE RIESGO Y CARACTERÍSTICAS DEL HCC.....	4
3.2 DESCRIPCIÓN DE LA VÍA DEL EGFR	5
4. OBJETIVOS	9
5. METODOLOGÍA	9
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	9
6.1 INFLAMACIÓN Y HCC.....	9
6.2 EL EGFR EN LA FIBROSIS Y EN EL HCC.	13
6.3 TERAPIAS MOLECULARES PARA EL HCC Y SUS RESISTENCIAS	14
7. CONCLUSIONES	18
8. BIBLIOGRAFÍA	19

1. RESUMEN

La inflamación crónica es un factor de riesgo de la fibrosis hepática y del carcinoma hepatocelular (HCC) o hepatocarcinoma. La inflamación crónica puede provocar la apoptosis de los hepatocitos, lo que da lugar a una respuesta compensatoria de proliferación celular descontrolada, que genera mutaciones, las cuales pueden dar lugar al HCC. La vía del EGFR (receptor del factor de crecimiento epidérmico) está fuertemente implicada en este proceso y tanto el EGFR como sus ligandos se encuentran sobreexpresados en HCC. La producción de mediadores inflamatorios en las células de Kupffer, tras la apoptosis de los hepatocitos, induce la expresión de ligandos del EGFR en las células de Kupffer, los hepatocitos y los miofibroblastos, además de la activación de las enzimas de la familia ADAM, encargadas del procesamiento de los ligandos. La unión del EGFR con su ligando activa múltiples vías implicadas en la diferenciación, supervivencia y proliferación celular. Por consiguiente, tanto este receptor como diferentes proteínas implicadas en las vías de señalización activadas por el EGFR pueden considerarse dianas terapéuticas para el tratamiento del HCC. Para ello, es preciso considerar el tipo de célula donde se encuentra expresado el EGFR y el estadio del cáncer.

Palabras claves: inflamación hepática, carcinoma hepatocelular, EGFR, terapias moleculares

2. ABSTRACT

Chronic inflammation is a risk factor of hepatic fibrosis and hepatocellular carcinoma. Furthermore, chronic inflammation leads to hepatocyte apoptosis, which in turn results in a compensatory uncontrolled proliferative response, causing mutations which can lead to HCC. The EGFR's (epidermal growth factor receptor) pathway is highly involved in this process and both EGFR and their ligands are overexpressed in hepatocellular carcinoma. The inflammatory mediators produced in Kupffer cells after hepatocytes's apoptosis induce the production of EGFR's ligands in Kupffer cells, hepatocytes and myofibroblasts as well as the activation of the enzymes involved in the ligand's shedding. Ligand-EGFR binding activates multiple signalling pathways involved in cellular differentiation, survival and proliferation. Consequently, this receptor and the proteins involved in the signalling pathways activated by the EGFR raise as an interesting target for HCC's treatment. For that purpose, it is important to take into consideration the type of cell expressing the EGFR and the stage of the tumor.

Key words: hepatic inflammation, hepatocellular carcinoma, EGFR, molecular therapies.

3. INTRODUCCIÓN

3.1 FACTORES DE RIESGO Y CARACTERÍSTICAS DEL HCC

La infección crónica causada por los virus de la hepatitis B y C es un factor de riesgo de la cirrosis y del carcinoma hepatocelular. Asimismo, la aparición del HCC en personas infectadas por estos virus está influenciada por otros factores como el estilo de vida, la nutrición y el medio ambiente. El mayor número de estos pacientes se encuentra en Europa del este y en el sub-Sahara, ya que la distribución geográfica del virus de la hepatitis B y C es mayor en estos territorios. Otros factores de riesgo del HCC son la hemocromatosis hereditaria, una enfermedad genética autosómica recesiva, caracterizada por un exceso de hierro y el consumo crónico de alcohol (1).

En los últimos años han cobrado más importancia otros factores capaces de desencadenar la enfermedad. Así, se está dando bastante relevancia como factores de riesgo a enfermedades como el síndrome metabólico y la obesidad. En concreto, se ha visto que la enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD), la cual consiste en una acumulación excesiva hepática de lípidos, presente frecuentemente en personas obesas diabéticas, tiene un papel importante inflamatorio y puede desencadenar en el carcinoma hepatocelular. El exceso de lípidos aumenta la expresión del oncogén URI en el hígado. Como consecuencia, se produce daño en el DNA de los hepatocitos y se desencadena una inflamación sistémica que puede conducir a la esteatohepatitis no alcohólica, NASH, mediante la acumulación en el hígado de linfocitos th17, los cuales secretan interleuquina (IL) 17A. Por consiguiente, se produce el reclutamiento de neutrófilos en el tejido graso, lo que a su vez causa resistencia a la insulina y la liberación de ácidos grasos que se acumulan en el hígado (2).

Es decir, pacientes que padecen NAFLD pueden desarrollar NASH, una forma más maligna de la enfermedad, que además de producir acumulación de grasa, presenta inflamación, y puede llegar a causar fibrosis, cirrosis y en última instancia el carcinoma hepatocelular (2).

Todos estos factores de riesgo tienen en común el aumento de señales inflamatorias como IL2, IL7, IL12, IL15 e IFN γ . La inflamación provoca daño en el DNA, modificaciones epigenéticas y alteraciones mitocondriales. En consecuencia, se produce la apoptosis (muerte celular programada) de los hepatocitos, lo que provoca una regeneración compensatoria y fibrosis hepática que finalmente puede dar lugar a la aparición de un tumor. Además, en la lesión crónica del hígado las citoquinas inflamatorias como IL10, IL13, y TGF- β impiden las respuestas antitumorales del sistema inmunitario (figura 1) (3).

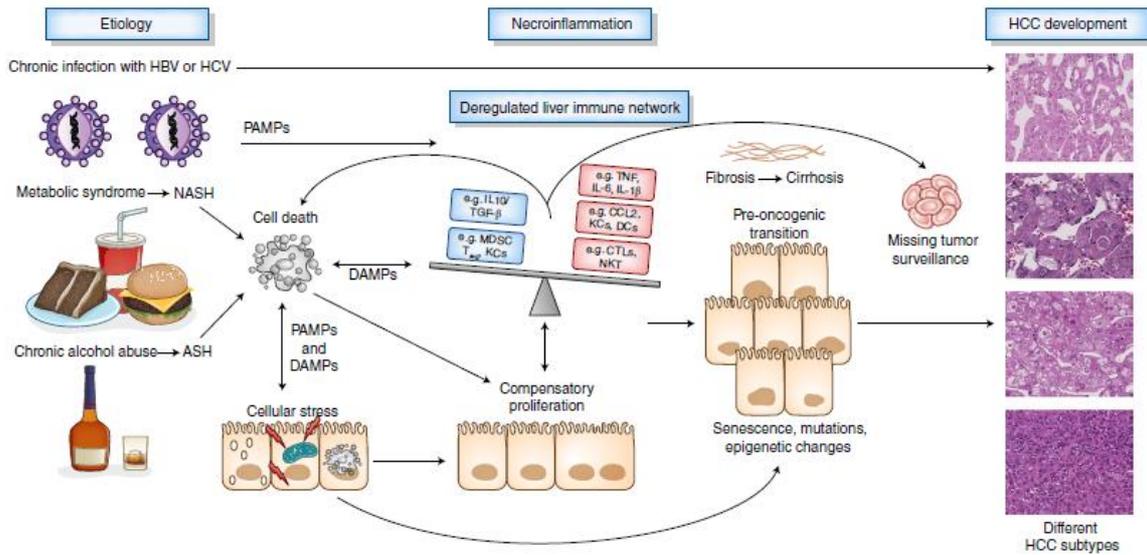


Figura 1. Papel de la inflamación en el desarrollo del tumor. PAMPs: pathogen-associated molecular patterns/ patrones moleculares asociados a patógenos. DAMPs: damage-associated molecular patterns/ patrones moleculares asociados al daño. ASH: esteatohepatitis alcohólica (3).

3.2 DESCRIPCIÓN DE LA VÍA DEL EGFR

La familia del EGFR (también llamado ErbB o HER1 en humanos) está formada por cuatro receptores diferentes de membrana con actividad tirosina quinasa. Su estructura consiste en un dominio extracelular donde se une el ligando, un dominio transmembrana y un dominio intracelular donde está la actividad tirosina quinasa. Este dominio es seguido por una cola carboxi-terminal donde se encuentran los sitios de autofosforilación. El dominio intracelular está altamente conservado en todos los miembros de la familia, excepto en el ErbB3, y como consecuencia ErbB3 no tiene actividad tirosina quinasa. El dominio extracelular, donde se une el ligando, tiene dos regiones ricas en cisteína pero es menos conservado debido a la especificidad con el ligando. Es preciso destacar, que el receptor ErbB2 es el único que no tiene ligandos. Los ligandos de los receptores de la familia EGFR tienen un dominio parecido a EGF (factor de crecimiento epidérmico) causante de la especificidad con el receptor y otros dominios parecidos a inmunoglobulina. Además, pueden contener sitios de glicosilación y sitios de unión con la heparina (4, 5, 6).

Los ligandos se pueden clasificar según la especificidad de unión a los receptores: EGF, anfiregulina (AR) y TGF- α se unen específicamente a ErbB1, mientras que betacelulina, EGF ligado a heparina (HB-EGF) y epirregulina se unen a ErbB1 y ErbB4. Otro tipo de ligandos son las neuregulinas 1 y 2 que se unen a ErbB3 y ErbB4 y las neuregulinas 3 y 4 que son específicas para ErbB4 (4, 5, 6).

Después de la unión ligando-receptor, estos receptores pueden homo o heterodimerizarse y fosforilarse de forma cruzada entre ellos, especialmente ErbB2 y ErbB3. La unión ligando-receptor provoca la autofosforilación en residuos de tirosina. Los sitios fosforilados son reconocidos por proteínas adaptadoras, como Grb2, Grb7, Crk y Shc, capaces de reclutar a otras proteínas/enzimas transductoras. Estas proteínas tienen dominios SH2 o PTB y son

fosforiladas por el receptor con el fin de activarlas. Esto provoca cambios conformacionales y de localización de estas proteínas señalizadoras, lo que activa diferentes rutas intracelulares. Entra las vías de señalización celulares activadas por EGFR destacan (figura 2):

- Vía de Ras/ERKs-MAPK: La unión del ligando EGF a EGFR permite la fosforilación de la proteína Grb2 en su dominio SH2. La señal pasa a Ras a través de Sos. Seguidamente, se forma el complejo Grb2/Sos, el cual se trasloca a la membrana plasmática, y activa a Ras, convirtiendo GDP-Ras en GTP-Ras. Esta última proteína activa por fosforilación a otras proteínas quinasas en cadena como Raf, MEK 1 / 2 y ERK 1/ 2. Las ERKs son unas proteínas serina/treonina quinasas capaces de ir al núcleo y fosforilar factores de transcripción como c- Myc, c-Jun, c-Fos, Elk-1 y p62TCF, los cuales regulan procesos como la diferenciación celular, la supervivencia y la proliferación celular.
- Vía de la PI3K (fosfoinositol 3-quinasa): La unión de receptor EGFR y su ligando provoca la activación de la quinasa PI3K, encargada de la conversión de PIP2 (fosfatidil inositol 4,5 bifosfato) a PIP3 (fosfatidil inositol 3,4,5 trifosfato). En consecuencia, se produce la activación de AKT. AKT es capaz de activar a mTOR y a NF-kB. Esta vía está implicada en la proliferación celular y la supervivencia, ya que inhibe la apoptosis mediada por caspasas.
- Vía de la fosfolipasa C. La fosfolipasa C es activada mediante la fosforilación de sus dominios SH2 por el EGFR. Esta enzima transforma el PIP2 en IP3 (inositol trifosfato) y DAG (diacilglicerol). IP3 (capaz de aumentar la concentración de calcio citosólico) y DAG son los encargados de activar la proteína quinasa C, la cual inhibe la actividad tirosina quinasa del receptor, motivo por el cual esta vía disminuye la señal mitogénica mediada por este receptor. Además, PKC está implicada en numerosos procesos relacionados con la carcinogénesis como la angiogénesis, la metástasis, la invasión y la proliferación celular. Por último, la proteína quinasa C es capaz de transactivar al EGFR.
- Proteínas reguladoras de la transcripción STATs: La unión del ligando con el receptor puede activar a las proteínas STATs. En este trabajo se estudiará específicamente STAT3 en el desarrollo de HCC, que puede actuar como oncogén pero también como anti-oncogén (4, 5, 6).

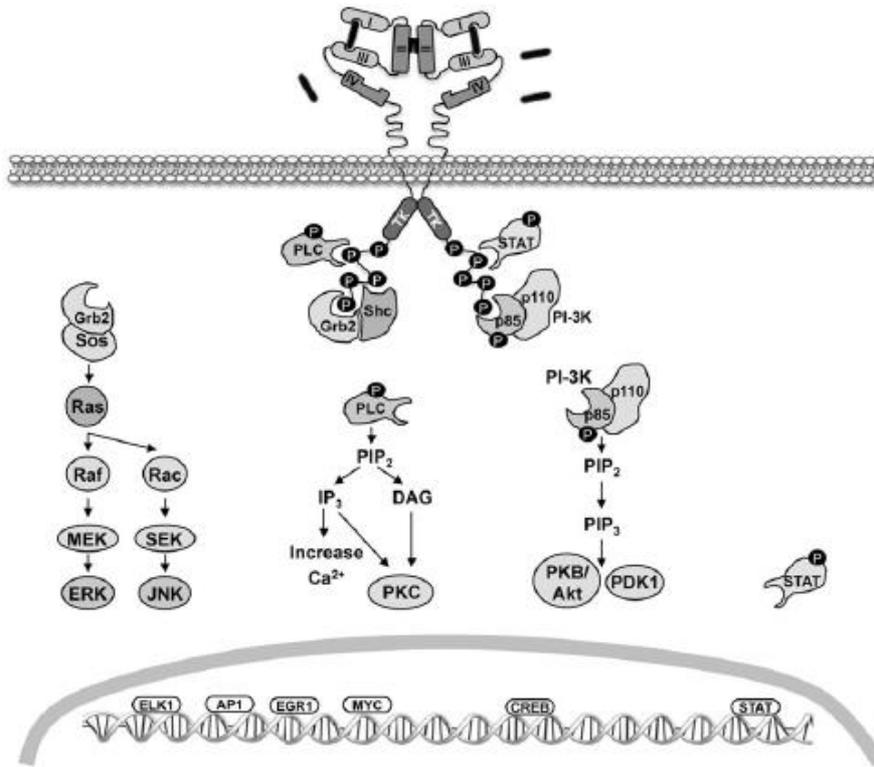


Figura 2. Vías de señalización activadas por EGFR (4).

Los ligandos se encuentran como precursores transmembrana en la superficie celular. Para que se liberen como factores de crecimiento solubles, es necesario un procesamiento proteolítico. Las enzimas encargadas de este proceso son las enzimas de la familia ADAM (desintegrinas y metaloproteasas). En concreto, la ADAM17 tiene un papel muy importante, ya que puede procesar los precursores de AR, TGF- α y HB-EGF. Después de esta transformación proteolítica, el dominio carboxi-terminal puede llegar hasta el núcleo e interactuar con reguladores transcripcionales, lo que puede modificar el ciclo celular. Por tanto, los ligandos pueden actuar de una manera yuxtacrina si están pegados a la superficie celular o de una manera paracrina o autocrina después de su liberación (5).

Es interesante destacar que el EGFR puede ser activado por otros receptores, lo que se conoce como transactivación. Entre los mecanismos de transactivación del EGFR destacan:

- La unión de los receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) con diferentes ligandos como el ácido fosfatídico, la angiotensina II y la IL8 puede activar a las enzimas de la familia ADAM mediante diferentes mecanismos: generación de especies de oxígeno, aumento de concentraciones de calcio citosólico y activación de la proteína quinasa C. La proteína quinasa C es capaz de fosforilar en residuos Serina/reonina o tirosina a las enzimas de la familia ADAM, activándolas. Asimismo, la unión de estos receptores con sus ligandos también puede activar directamente el EGFR por una reacción de fosforilación mediada por c-Src. Los ligandos que han sido liberados por la activación de GPCRs en células cancerosas aumentan las propiedades migratorias e invasivas de las células tumorales (5, 6).

- La activación del receptor del IGF-1 (factor del crecimiento insulínico tipo I) también puede activar a las enzimas de la familia ADAM, lo que da lugar al procesamiento de diferentes ligandos (5).
- La fibronectina es una glucoproteína que está aumentada en la fibrosis hepática y en el HCC. Su unión con el receptor de la integrina αv activa a las enzimas de la familia ADAM, haciendo posible la liberación de los ligandos. Además, la fibronectina contribuye a la proliferación e invasión de células de HCC (5).
- La unión de PGE₂ (prostaglandina E₂) derivada de la ciclooxygenasa 2 con su receptor EP1 activa a la enzima c-Src, la cual mediante fosforilación puede activar al EGFR en células de HCC (5).
- Los mediadores inflamatorios (lipopolisacárido, TNF- α , IL-1 β) y factores citotóxicos (Fas-L y TRAIL) se pueden unir a los TLRs (receptores implicados en la inmunidad innata) y activar a las enzimas de la familia ADAM mediante la generación de especies de oxígeno y la activación de la proteína quinasa C (6).
- En células hepáticas cancerosas las uniones EGF-ErbB1 y PGE₂-EP estimulan la fosforilación del c-Met (receptor del factor de crecimiento de los hepatocitos). En el HCC la sobreexpresión de la vía c-Met está asociada con la angiogénesis, la metástasis y el mal pronóstico (6). Sin embargo, se ha visto que la activación de c-Met disminuye el estrés oxidativo generado por la activación de las vías MAPK/ERK y PI3K/AKT debido a la transactivación del EGFR provocada por la unión lipopolisacárido-TLR. La unión HGF- c-Met hace que SHIP2 se una a c-Met, impidiendo que SHIP2 inhiba a C-cbl, responsable del proceso de degradación del EGFR (por el sistema ubiquinina-proteosoma). Por lo tanto, se produce la degradación del EGFR, lo que provoca la disminución del estrés oxidativo (7).

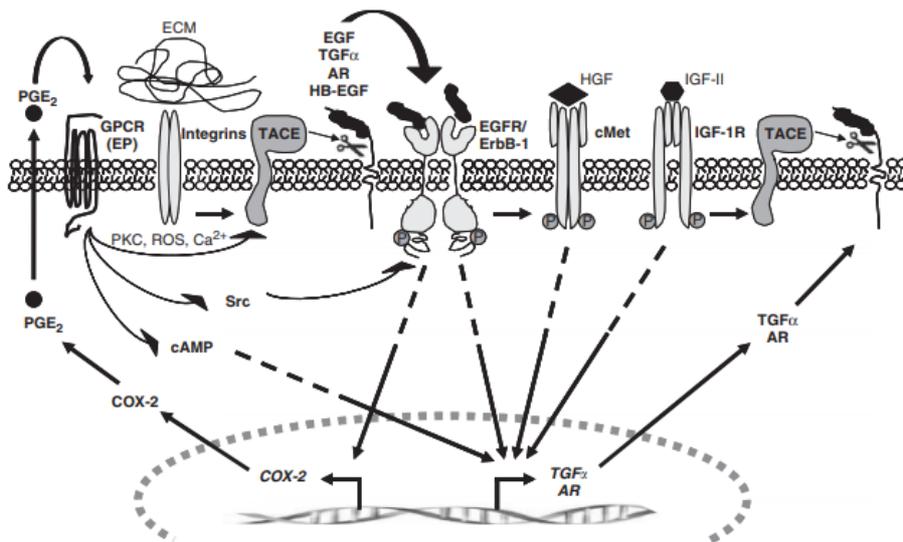


Figura 3: Mecanismos de transactivación del receptor EGFR (5).

La vía del EGFR es esencial para la regeneración hepática y para el funcionalmente normal del hígado ya que protege al hígado de agentes citotóxicos. Sin embargo, el EGFR está altamente implicado en el desarrollo de la fibrosis, la inflamación y el HCC donde se encuentra sobreexpresado y, por lo tanto, hay un aumento de la activación de todas las vías intracelulares que activa este receptor, como se reflejará a continuación.

4. OBJETIVOS

Entre los objetivos de este trabajo bibliográfico destacan:

- Estudiar la vía del EGFR y su implicación en la inflamación y en el HCC.
- Establecer la relación entre inflamación y HCC.
- Estudiar las terapias moleculares disponibles para el HCC cuya diana terapéutica es la vía del EGFR.

5. METODOLOGÍA

Se ha realizado una revisión bibliográfica utilizando la base de datos *Pubmed*. Debido a la revisión de múltiples artículos científicos se ha podido cumplir los objetivos del presente trabajo. Para la búsqueda se han utilizado las siguientes palabras claves: inflamación hepática, EGFR, carcinoma hepatocelular y terapias moleculares. Además, también se han utilizado artículos de periódicos sanitarios como la *Gaceta Médica*.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 INFLAMACIÓN Y HCC

Los mediadores inflamatorios y los factores de crecimiento son esenciales para la respuesta reparadora y regenerativa del hígado. Sin embargo, la inflamación crónica provoca cambios en la estructura del hígado debido a la activación persistente de las células productoras de la matriz extracelular, lo que da lugar a fibrosis. Además, la inflamación crónica puede dar lugar al HCC: (4)

La inflamación crónica causada por virus, toxinas o enfermedades como NASH provoca la apoptosis de los hepatocitos (células del hígado con capacidad metabólica) mediante la inhibición del NF- κ B (factor de transcripción nuclear kappa B).

Los estímulos proinflamatorios liberados tras la apoptosis como IL1- α y diferentes PAMPs o DAMPs se unen a sus receptores, IL1R y TLRs respectivamente, en las células de Kupffer (los macrófagos que residen en el hígado). A través de Myd88, una proteína adaptadora de los TLRs, se activa el NF- κ B y se producen diferentes mediadores inflamatorios como IL6, PGE2, IL1- β y TNF- α , además de ligandos del EGFR. La IL1- β puede actuar de manera autocrina haciendo que se produzcan más mediadores inflamatorios. La producción de IL6 en las células de Kupffer requiere la transactivación del EGFR. Tras la liberación de todos estos

mediadores inflamatorios, se produce la unión de todos ellos con sus respectivos receptores en los hepatocitos. Por consiguiente, se aumenta la expresión de ligandos del EGFR en los hepatocitos. Asimismo, las uniones PGE2-EP, ligando-EGFR y TNF- α -TNFR1 en los hepatocitos activan al NF-kB, mientras que la unión de la IL6 con su receptor activa al transductor de señal y activador de la transcripción 3, STAT3, lo que promueve una proliferación celular descontrolada mediante la expresión de genes como el que codifica para la proteína ciclina D1. Esta proliferación descontrolada genera mutaciones, que pueden dar lugar al HCC. La activación de NF-kB y STAT3 también promueve la supervivencia de los hepatocitos mutados mediante la expresión de genes antiapoptóticos como bcl-x1 y SOD2. Las células cancerosas activadas por los ligandos del EGFR liberados por las células de Kupffer tienen un comportamiento más agresivo (8).

Tanto el NF-kB como STAT3 son los responsables de esta respuesta compensatoria de proliferación celular descontrolada:

El NF-kB es un factor transcripcional dimerico que está presentes en todas las células. Existen siete proteínas diferentes, que pueden formar una variedad de dímeros, que no todos son activos. Estas proteínas son: nfkb1 (p105 y p50), nfkb2 (p100 y p52), RelA (p65), RelB y c-Rel.

Los dímeros que forman el NF-kB se encuentran inactivos en el citoplasma unidos a proteínas inhibitorias (IKB). En respuesta a citoquinas inflamatorias como TNF- α e IL1- β , el complejo IKK (formado por las subunidades catalíticas IKK α e IKK β y la subunidad reguladora IKK γ) se activa y fosforila a las IKB, lo que provoca su degradación mediante un proceso de ubiquitinación. En consecuencia, los dímeros que forman el NF-kB se activan y entran en el núcleo. Entre las funciones del NF-kB destacan la producción de mediadores inflamatorios y la inhibición de la apoptosis, pudiendo promover la aparición de tumores (9). Igualmente, este factor promueve la aparición de tumores por la transición epitelio-mesénquima debido a la regulación de la expresión de E-cadherina, metaloproteasas 2 y 9 y catepsinas B y Z (8).

La inactivación temprana del NF-kB en los hepatocitos provoca la apoptosis de estas células, lo que genera una potente respuesta regenerativa. Esta proliferación compensatoria de los hepatocitos supervivientes en un ambiente inflamatorio y oxidativo incrementa el riesgo de tumorigénesis debido a las mutaciones oncogénicas de los hepatocitos para entrar en el ciclo celular. En consecuencia, la inactivación de este factor en personas con factores de riesgo es contraproducente porque podría desencadenar el cáncer. El mecanismo de esta proliferación compensatoria es la activación de la quinasa JNK1. Sin embargo, la inactivación del NF-kB en hepatocitos en un cáncer avanzado disminuye la inflamación y la progresión del tumor porque la inhibición del NF-kB provoca la apoptosis de células cancerosas. Además, la inactivación del NF-kB en células de Kupffer resulta en una menor producción de citoquinas inflamatorias y mitógenos como TNF- α , IL6 y HGF y, por lo tanto, en la inhibición de la proliferación de hepatocitos y de la hepatocarcinogénesis (8, 9, 10).

Las proteínas STATs se pueden activar mediante la unión de las citoquinas IL-6, IL-22 y TGF- α con sus receptores o por receptores con actividad tirosina quinasa como EGFR y VEGFR.

Al unirse la IL6 con su receptor, se produce el reclutamiento de las quinasas Janus vía los dominios FERM. Las JAKs activadas fosforilan residuos de tirosina en los dominios intracelulares del receptor creando sitios específicos para las proteínas STATs, por lo que se produce su fosforilación y su translocación al núcleo. La señal JAK-STAT está aumentada en la inflamación hepática y en HCC. La pérdida de SOC3 (inhibidor de STAT3) en hepatocitos

aumenta la proliferación celular durante la regeneración hepática y la susceptibilidad de transformación neoplásica (8, 9).

Asimismo, la proteína STAT3 también puede actuar como oncogén o anti-oncogén, ya que STAT3 induce la expresión de proteínas y genes involucrados en la supervivencia y la proliferación celular como survivina, ciclina D1, bcl-x, c-myc y ref-1 que previenen el carcinoma hepatocelular. Estos genes impiden la apoptosis celular y, por lo tanto, la proliferación compensatoria que da lugar a la tumorigénesis. Sin embargo, estos genes promueven la supervivencia de células cancerosas y su proliferación cuando el HCC está ya establecido. STAT3 también disminuye p53, el cual es un supresor de tumores. Además, STAT1 es capaz de generar especies reactivas de oxígeno y de activar a las caspasas, lo que provoca la apoptosis de las células. STAT3 es capaz de inhibir a STAT1, lo que impide la apoptosis celular. Por todo esto, inhibir la proteína STAT3 puede ser beneficioso para tratar a pacientes con HCC avanzado pero puede facilitar el cáncer en personas con factores de riesgo.

Existen otros mecanismos mediante los cuales STAT3 promueve la hepatocarcinogénesis, como por ejemplo:

- La función oncogénica de STAT3 puede depender de SHP2. SHP2 es una tirosina fosfatasa y por lo tanto un regulador negativo de STAT3. Se ha visto que los hepatocitos que carecen de IKKb, además de mostrar una actividad reducida del NF-kB, muestran una acumulación de especies reactivas de oxígeno. La ausencia del IKKb también disminuye la actividad de SHP1/ SHP2, lo que resulta en una fosforilación continua de STAT3 y, por lo tanto, en un aumento de la actividad de STAT3 que conduce a la formación de HCC.
- STAT3 puede promover la hepatocarcinogénesis por cambios epigenéticos que involucran a algunos microARNs (miRs). La señal IL6/ STAT3 aumenta la expresión de miR-24 y miR-629, los cuales regulan negativamente a HNF4 α , el cual es un factor hepático diferenciador y supresor de la formación de HCC. Además, la supresión de HNF4 α hace que no se exprese miR-124, el cual disminuye la expresión del receptor de IL-6. En consecuencia, aumenta la unión de la IL6 con su receptor pudiendo desencadenar la hepatocarcinogénesis.
- La activación de STAT3 tiene efectos protumorigénicos en células estromales porque bloquea la maduración de células dendríticas y la activación de células T haciendo que el sistema inmune no pueda luchar contra las células cancerosas. La activación de STAT3 en macrófagos derivados del tumor aumenta la expresión de genes implicados en la angiogénesis y la metástasis (MMP9, CCL2, CXCL2, VEGF, IL1- β , HIF1 α). (11).

La IL6 es una citoquina inflamatoria que está altamente implicada en el HCC. Esta citoquina puede transmitir señales mediante su unión a su receptor, IL6R (subunidad alfa), localizado en la superficie de la membrana celular. IL6-IL6R se une con gp130 en la superficie de la membrana celular formando un complejo hexamérico, lo que se conoce como la vía clásica. Sin embargo, la ADAM17 también puede procesar proteolíticamente el IL6R de la membrana, liberándolo como un receptor soluble. Así pues, la IL6 se puede unir con su receptor en forma soluble y después con gp130, lo que se conoce como la vía trans. Esta citoquina induce la respuesta proliferativa compensatoria tras la apoptosis de los hepatocitos, además de contribuir a la proliferación del tumor por el aumento de b-catenina (12). La b-

catenina acumulada en el citoplasma puede traslocarse al núcleo donde actúa como un factor de transcripción de genes involucrados en la proliferación y diferenciación celular como c-myc y el gen que codifica para la proteína ciclina D1. Además, la b-catenina favorece la angiogénesis y la metástasis mediante la proliferación de células epiteliales y la expresión de IL8, un factor angiogénico inducido por hipoxia. Asimismo, la IL8 puede aumentar la expresión de metaloproteasas. Las metaloproteasas juegan un papel significativo en el HCC porque degradan los componentes de la matriz extracelular para que el tumor pueda crecer e invadir tejido (13). Es importante destacar que la vía de señalización trans es la que contribuye a todos estos procesos que dan lugar a la hepatocarcinogénesis, es decir, IL6 tiene efectos tumorigénicos cuando se une al receptor que ha sido liberado desde la superficie celular como un receptor soluble. La vía clásica está menos implicada en estos procesos de hepatocarcinogénesis (12).

La producción de IL6 está regulada negativamente por el receptor estrógeno α . Por otra parte, la IL6 aumenta la expresión del receptor de andrógeno en el hepatocito, el cual suprime la expresión de la proteína p53 con acción antitumoral y produce especies reactivas de oxígeno, lo que induce daño en el DNA. Por ello, el HCC tiene mayor incidencia en hombres (10).

En la enfermedad hepática crónica se encuentran niveles elevados de lipopolisacárido debido a la traslocación de bacterias intestinales al hígado. La unión del lipopolisacárido con su receptor, TLR4, en las células estrelladas hepáticas (HSCs) activa a la quinasa c-Src, que fosforila y activa al receptor EGFR. Seguidamente, se activa el factor NF- κ B y se producen mediadores inflamatorios como IL6, TNF- α e IL1- β . Por consiguiente, se promueve la proliferación y activación de HSCs y su diferenciación a miofibroblastos, lo que genera fibrosis (14). La quimioquina CXCL6 también contribuye a la generación de la fibrosis. En las células de Kupffer se produce CXCL6, la cual induce la fosforilación del EGFR y la expresión de TGF- β , un factor profibrogénico que contribuye a la activación de HSCs (15). Los ligandos del EGFR también contribuyen a la activación de las células estrelladas hepáticas y estimulan las propiedades proliferativas y migratorias de estas células. Además, estas células pueden producir ligandos del EGFR como TGF- α y AR, que actúan de una manera autocrina en el EGFR presente en estas células, el cual está sobreexpresado (4, 5, 6). Por consiguiente, se ve la implicación de los ligandos del EGFR en la fibrosis, que puede conducir al desarrollo del HCC.

Igualmente, la IL1- β estimula la quinasa c-jun N-terminal quinasa (JNK), lo que facilita la invasión hepática y la reducción de la actividad supresora de tumores mediada por TGF- β . Se ha comprobado que los pacientes con el polimorfismo C31T en IL1- β tiene mayor riesgo de desarrollar cáncer (16).

Por otra parte, las células estrelladas hepáticas producen tenascina C, una proteína de la matriz extracelular. Igualmente, la tenascina C es capaz de activar la señal del TLR4. En pacientes con HCC TLR4 y TLR9 están sobreexpresados y se asocia a mal pronóstico (10). La activación de los TLRs en el HCC induce la expresión de mediadores inflamatorios y de ligandos del EGFR en las células de Kupffer, lo que contribuye a la transformación maligna de los hepatocitos. En el HCC asociado a la enfermedad NASH el TLR4 expresado en los macrófagos tiene un papel muy importante, mientras que en el modelo de tratamiento combinado con DEN (tratamiento con dietilnitrosamina para inducir el HCC) y CCL4 (tetracloruro de carbono) el TLR4 expresado en los hepatocitos o en las células estrelladas hepáticas tiene un papel importante (10).

Es interesante destacar que la vía del EGFR es esencial para inducir la expresión de los TLRs. Asimismo, la unión de los TLRs con su ligando es capaz de activar a las enzimas de la familia

ADAM, estableciéndose así una relación entre la vía del EGFR y la inflamación en la hepatocarcinogénesis (6).

La COX2 también contribuye al desarrollo del HCC, ya que la expresión de la COX2 está elevada en la inflamación crónica hepática, en la cirrosis y en el HCC. Niveles altos de PGE2 se asocian con la proliferación, supervivencia de células tumorales, invasión y metástasis. PGE2 puede inducir directamente la expresión de ligandos como AR y a su vez EGF es capaz de inducir la expresión de COX-2 en células cancerosas hepáticas (5).

La activación persistente de la vía EGF-EGFR modula la proliferación del tumor, la diferenciación, la transición epitelio-mesénquima y la angiogénesis. El ligando EGF hace que las células tumorales produzcan mediadores inflamatorios como IL8, CXCL12, IL6 e IL1 con el fin de atraer leucocitos desde la circulación al tejido tumoral, contribuyendo a la inflamación. Asimismo, el ligando EGF es capaz de producir CXCL5 (citoquina relacionada con mal pronóstico: menor supervivencia y recurrencia del tumor) y CXCL8, responsables del movimiento de las células tumorales y del reclutamiento local de los leucocitos circulantes. Además, EGF puede transformar las células tumorales con bajo potencial metastásico a células con alto potencial metastásico. Igualmente, se ha visto que CXCR2, el correceptor de CXCL5 Y CXCL8, es capaz de transactivar al EGFR (17).

6.2 EL EGFR EN LA FIBROSIS Y EN EL HCC

El EGFR es imprescindible para la regeneración hepática después de una hepatectomía parcial, por lo que en esta situación se encuentra sobreexpresados tanto el receptor, como los ligandos y las enzimas de la familia ADAM, lo que es beneficioso. Sin embargo, tanto el EGFR como sus ligandos y las enzimas de la familia ADAM están sobreexpresados en lesiones inflamatorias crónicas de hígado y en HCC, lo que se relaciona con proliferación intensa, metástasis intrahepática, baja diferenciación del carcinoma y mal pronóstico. Los niveles de mRNA de EGF y TGF- α en tejidos cancerosos son de utilidad para realizar el pronóstico de los pacientes con cáncer hepático. En estadios tempranos de carcinogénesis se ha observado como la producción de ligandos del EGFR influye en el crecimiento de células premalignas (4).

ErbB3 y EGFRviii son los receptores que más se han visto implicados en el HCC. EGFRviii es una forma mutante del receptor al que le faltan 801 pares de bases en los exones 2 y 7 y puede estar activado sin la unión con el ligando. Esta forma no está presente en tejidos normales pero sí en el 60 por ciento de tejidos hepáticos cancerosos. ErbB3 se relaciona con invasión portal y metástasis (18). Asimismo, se identificó el polimorfismo funcional en la región 5' no traducible (5'UTR) del gen EGF como un factor de riesgo alto de desarrollar HCC en pacientes con cirrosis debido al incremento de la expresión de EGF que se relaciona con un aumento de fosforilación del EGFR en tejidos cirróticos (4).

Existen genes que regulan al receptor EGFR, por lo que se pueden considerar mecanismos implicados en la sobre-activación de la señalización del EGFR en tumores. La ausencia de MIG-6 en hepatocitos es frecuente en la mayoría de tumores y se relaciona con un incremento de la proliferación celular, por lo tanto, MIG-6 es un regulador negativo del EGFR. Por otro lado, MUC15 es capaz de internalizar el receptor y provocar su degradación. La expresión de

este gen se ha visto disminuida en el HCC, por lo que esta función de degradar al receptor EGFR se pierde, lo que favorece la activación de la vía EGFR (4).

El ligando más estudiado y el que mayor papel juega en hígado es sin duda AR. En distintos estudios se ha visto que este ligando es esencial para la proliferación de los hepatocitos, al igual que HB-EGF. Asimismo, este ligando es capaz de aumentar la expresión de TGF- β y CTGF, es decir, es un factor de supervivencia y proliferativo para células fibrogénicas y para células estrelladas hepáticas (6). Igualmente, TGF- β induce la expresión de HB-EGF y TGF- α a través de la activación de NF- κ B y estimula la ADAM17, haciendo que se liberen ligandos. La sobreexpresión de AR y EGFR es capaz de promover la proliferación celular, la supervivencia y la resistencia a factores citotóxicos, concretamente a la apoptosis mediada por TGF- β y a la apoptosis inducida por TNF- α y TRAIL en células de HCC. Esta resistencia a la apoptosis protege a las células tumorales de su eliminación. Además, la supresión de AR en hepatocitos se ha relacionada con la disminución de la señal ERK y PI3K/AKT por parte de TNF- α (6). Al contrario que AR, HB-EGF es capaz de antagonizar la actividad profibrogénica de TGF- β en células productoras de la matriz celular (4).

6.3 TERAPIAS MOLECULARES PARA EL HCC Y SUS RESISTENCIAS

En la figura 4 se pueden ver los diferentes tratamientos para el HCC, según el estadio del tumor.

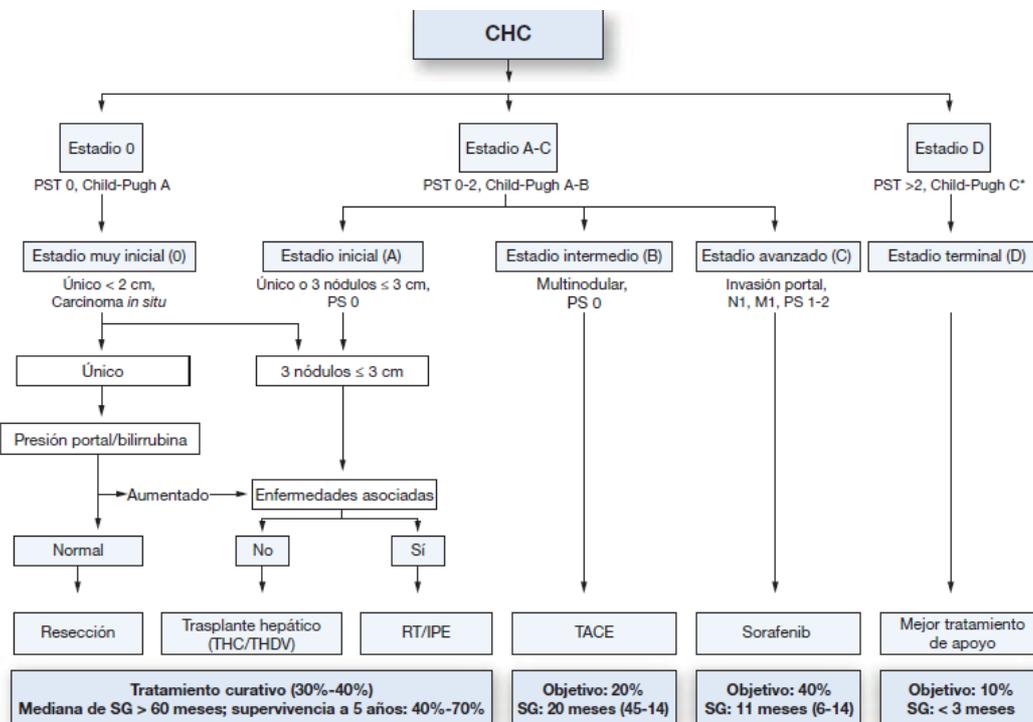


Figura 4. RT: radioterapia. IPE: inyección percutánea de alcohol etílico. TACE: Quimioembolización transarterial (19).

Las terapias moleculares dirigidas cada vez están cobrando mayor importancia. El sorafenib es la primera y única terapia molecular sistémica aprobada para el tratamiento del HCC en estadios avanzados. Actualmente, se están investigando numerosos agentes moleculares para tratar el HCC: (18)

Existen dos tipos de fármacos capaces de inhibir el EGFR: moléculas pequeñas que inhiben la actividad tirosina quinasa del receptor, ya que compiten con el ATP en el dominio intracelular donde está la actividad tirosina quinasa como gefitinib y erlotinib (TKIs) y anticuerpos monoclonales que compiten con el ligando en el dominio extracelular del receptor como el cetuximab. La unión del cetuximab con el EGFR provoca la internalización y la degradación del receptor, por lo que se inhibe la vía. En ensayos clínicos estos fármacos fueron capaces de provocar la apoptosis de células cancerosas humanas. Sin embargo, estos fármacos no están aprobados para el tratamiento del HCC debido a las numerosas resistencias que presentan: (4,5)

El efecto terapéutico del gefitinib se consigue al inhibir el IGF-1R, además de al inhibir el EGFR. La inhibición del IGF1-R disminuye la liberación de AR estimulada por IGF-1R. Sin embargo, se ha visto que las células hepáticas cancerosas crean resistencia a esta inhibición del IGF-1R a través de la activación de EGFR3.

En las células hepáticas cancerosas el EGFR interactúa con el receptor c-Met. El tratamiento con HGF (factor de crecimiento de hepatocitos) inhibe la actividad tirosina quinasa del EGFR, y hace que este receptor establezca numerosas proteínas relacionadas con el cáncer como los receptores tirosina quinasa EphA2 y Axl, los cuales incrementan la capacidad de supervivencia de células cancerosas incluso en presencia de fármacos inhibidores del EGFR. La inhibición del receptor c-Met aumenta la sensibilidad del gefitinib.

Otro mecanismo de resistencia es la localización nuclear del EGFR, ya que este receptor también puede actuar como un factor de transcripción. Esta localización nuclear está presente en el HCC asociado a la sobreexpresión de ligandos del EGFR y a la resistencia de los TKIs.

Otro fenómeno asociado a la resistencia es la transición epitelio-mesénquima. Las células epiteliales responden mejor al tratamiento. La resistencia de las células mesenquimales es debido a la habilidad que tienen para activar la señal AKT a través de diferentes mecanismos independientes del EGFR. Se ha visto que la inhibición de las ILK (quinasas ligadas a integrinas, unas proteínas de la familia de las proteínas RAS) reduce la activación de AKT y, por lo tanto, disminuye la resistencia al gefitinib.

Ras y Jak/STAT también son otras vías intracelulares importantes que están activadas en HCC y contribuyen al crecimiento y supervivencia de células cancerosas. La activación persistente de estas vías puede ser mediada por el microambiente tumoral rico en citoquinas y factores de crecimiento pero también por la epigenética. La constante activación de estas vías puede dar lugar a resistencias.

En relación a la vía AKT, se ha visto que la sobreexpresión de MVP (proteína de bóveda principal) y CIP2A (inhibidor de fosfatasa 2A) contribuyen a la resistencia del gefitinib.

La producción del ligando AR por parte de los mastocitos también es un mecanismo de resistencia. El ligando AR es capaz de activar a las células Treg, que junto con los mastocitos, se acumulan en la región protumoral y contribuyen al ambiente inmunosupresor, lo que facilita el crecimiento tumoral.

Las mutaciones concentradas en los exones del 18 al 21, la diana de estos fármacos, puede ser la causa de la ineffectividad de los TKIs. La combinación de un inhibidor de tirosina y un anticuerpo contra el receptor hace disminuir las resistencias y mejorar la eficacia (4).

La eficacia de los inhibidores del EGFR solamente ha sido demostrada en pacientes con HCC que expresan el EGFR en los macrófagos, ya que las células de Kuppfer son las responsables de la producción de IL6 dependiente del EGFR, el cual es inducido en condiciones patológicas en las células de Kuppfer. Por el contrario, se ha visto que la inhibición del EGFR en los hepatocitos promueve el HCC, ya que esta inhibición en personas con factores de riesgo provoca la apoptosis de los hepatocitos y la respuesta proliferativa descontrolada que puede dar lugar al cáncer. Sin embargo, la inhibición del EGFR en hepatocitos en pacientes con HCC avanzado da lugar a la destrucción de células cancerosas. Asimismo, las células de Kuppfer que expresan el EGFR promueven la formación del tumor solo en estados tempranos del HCC. Por ello, los inhibidores del EGFR son beneficiosos para las personas que expresen el EGFR en las células de Kuppfer y en estadios tempranos del desarrollo tumoral (19).

En cuanto a los efectos adversos, los TKIs son menos tóxicos que las drogas citotóxicas tradicionales pero están asociados a varios efectos adversos como la toxicidad de la piel, deficiencias hematológicas, náuseas, vómitos, diarreas y dolor de cabeza (20).

El tratamiento con los TKIs puede activar al sistema inmunológico de dos formas totalmente diferentes: los TKIs pueden inducir la expresión de proteínas CMH I y CMHII, cuya función es la presentación de antígenos a linfocitos Th, y la expresión de CXCL10 y CCL5. Por consiguiente, se activan las células T CD8 positivas, Th1 y las células natural killer, las cuales son capaces de destruir a las células cancerosas. Sin embargo, la célula cancerosa, en respuesta a los inhibidores de tirosina quinasa, también puede expresar IL6, TGF, IL32 y CCL28. Por consiguiente, se activan los linfocitos Th17, las células Tregs y los macrófagos M2, los cuales tienen efectos protumorigénicos. (20)

Con lo que respecta a la inmunoterapia, se han investigado inhibidores de PD1-PDL1 (inmunosupresor) como tratamiento para el HCC. Estos fármacos consiguen que los linfocitos T CD4 y T CD8 inhiban el crecimiento del tumor. Sin embargo, no es conveniente combinar un inmunosupresor con un TKI, ya que esta combinación aumenta la frecuencia y gravedad de los efectos adversos. (20)

Algunas proteínas que forman parte de las diferentes vías intracelulares que activa el EGFR pueden considerarse dianas terapéuticas para tratar el HCC avanzado (figura 5). Es de verdadera importancia resaltar que estas vías intracelulares implicadas en el HCC pueden ser activadas por otros mecanismos, independientes del EGFR:

- Señalización Ras/MAPK: está activada continuamente en la mayoría de los HCC avanzados. La activación de esta vía se asocia a la hipermetilación de genes que controlan la proliferación y diferenciación celular como c-Fos y c-Jun. Sorafenib y regorafenib bloquean parcialmente esta cascada, lo que reduce la proliferación celular (18).

Asimismo, se ha demostrado que la metilación específica de proteínas RAF por la enzima arginina metiltransferasa disminuye la señal ERK activada por factores de crecimiento en los hepatocitos. Se ha visto que la inhibición de esta metilación específica puede ser beneficiosa para pacientes con HCC establecido, ya que provoca una activación fuerte de esta vía. Una activación fuerte de esta vía puede dar lugar a la parada del ciclo celular (21).

- Vía PI3K/PTEN/mTOR: esta vía está activada en torno al 50 % de los casos de HCC donde se encuentra alterada. MK2206 es un inhibidor alostérico de Akt1 y Akt2. La combinación de este fármaco con sorafenib presenta menor resistencia comparado con la administración única del sorafenib. La rapamicina y everolimus son inhibidores selectivos de mTOR C1. Sin embargo, se ha visto que es más eficiente inhibir los dos tipos de mTOR, mTOR C1 y mTOR C2. Además, se ha visto que la inhibición de la proliferación se consigue al inhibir la isoforma p110 α de la PI3K, no la p110 β . Por último cabe destacar, BEZ235, capaz de inhibir conjuntamente la actividad de mTOR y las isoformas de la clase I de PI3K. Estos fármacos están en investigación (22).
- La señal JAK/STAT y el factor NF-kB también pueden considerarse dianas terapéuticas. Por ejemplo, la inhibición de la vía Raf/ Mapk por parte del sorafenib disminuye la actividad de STAT3 dependiente de MAPKT y AKT. Asimismo, el inhibidor de la proteína STAT3, AZD9150, se encuentra en investigación para tratar el HCC avanzado. AZD9150 muestra mayor eficacia cuando en las células diana se expresa la proteína p19arf, ya que esta proteína modula la actividad oncogénica de STAT3 (11).

La señalización del factor del crecimiento vascular, responsable de la angiogénesis, también puede considerarse una diana terapéutica para inhibir el crecimiento del tumor. Existen anticuerpos monoclonales como el bavacizumab dirigido contra VEGF o fármacos inhibidores de la actividad tirosina quinasa del VEGF como sorafenib, sunitininb, brivanib, linifanib, valatanib y cediranib, todos ellos capaces de inhibir la angiogénesis. El sorafenib también es capaz de inhibir esta vía (18).

Función	Diana	Fármaco (tipo de fármaco)
Angiogénesis	Receptor factor de crecimiento	(TKI)=Brivanib, Sunitinib, Sorafenib, TSU 68, Cediranib, Valatanib, análogos de la talidomida
	Factor de crecimiento	(TKI)=Sunitinib, Sorafenib, Imatinib, TSU-68
	Permeabilidad vascular	(MAb)=Bevacizumab, IMC1121B NGR-hTNF actúa sobre aminopeptidasaN/CD13 afectando la permeabilidad vascular.
Apoptosis	Vía intrínseca	(TKI)=Imatinib, Oblimersen, GX15-070
	Vía Extrínseca	(Mab)=Mapatumumab, Apomab, rhApo/TRAIL, (TKI)=AMG-655
Transducción de señal	Receptor factor de crecimiento	(TKI)=Gefitinib, Erlotinib, Lapatinib, (Mab)=Cetuximab, Panitumumab
		(TKI)=Lapatinib/ (Mab)=Trastuzumab
		(TKI)=Lestaurtinib, PKC 412, Sunitinib, Imatinib
		(TKI)=Imatinib, Sunitinib, Sorafenib
		(Mab)=IMC-A12
		(TKI)=SU11274, JNJ38877605, ARQ197
		(TKI)=Dasatinib, Imatinib, Sorafenib
Señalización Intracelular	Ras	(TKI)=Tipifarnib –Inhibidor de Farnesyl transferasa-
	Raf	(TKI)=Sorafenib
	MEK	(TKI)=Vandetanib, AZD6244
	P13k	(TKI)=wortmannin, LY294002
	AKT	(TKI)=alkylphospholid perifosine
	MTor	(TKI)=Temozolimus, Everolimus, Rapamicin
Ciclo celular	CDKs	(CDKI)=Flavopiridol
	Histona deacetilasa	(HDAC inhibidor)=belinostat (PXD101)
	Función de microtúbulo	Epothilone patipilone
Migración e Invasión	SRC	(TKI)=Dasatinib, XL558
	Recambio proteico	(TKI)=Bortezomib –también otras dianas-

Figura 5. Terapias moleculares clasificadas según su función y diana terapéutica para tratar el HCC avanzado (23).

El sorafenib también presenta resistencias. FGF19, el factor de crecimiento fibroblástico 19, puede inhibir la generación de especies de oxígeno y, por lo tanto, la apoptosis causada por el sorafenib. FGF19 y su receptor, FGFR4, están sobreexpresados en el HCC, lo que contribuye a la invasión tumoral (24).

Interesantemente, se ha visto que algunos micro-ARNs contribuyen a la disminución de las resistencias de estos fármacos. Por ejemplo, la sobreexpresión de miR206 en células hepáticas cancerosas regula negativamente la expresión del EGFR. Asimismo, la sobreexpresión de miR206 aumenta la sensibilidad del sorafenib y del gefitinib e inhibe la capacidad de auto-renovación de las células madre cancerosas presentes en el tumor del hígado (25). Igualmente, miR 126-5p puede inhibir la expresión endógena del EGFR y disminuir la proliferación, la viabilidad celular y la invasión (26). Por último, hsa-miR-486 -3p se encuentra disminuido en las células resistentes al sorafenib y su expresión es capaz de mejorar la respuesta del sorafenib, actuando sobre el FGFR4 y el EGFR (24). En pacientes con HCC los niveles de estos miRs se encuentran reducidos. Por lo tanto, se ha visto que la inyección de lentivirus sobreexpresando estos micro-ARNs aumenta la eficacia del sorafenib y de otras terapias moleculares dirigidas. Los niveles de otros micro-ARNs como miR-340, miR-126, miR-R26a, miR-122 y miR26a se encuentran disminuidos en el HCC. Estos miRs son capaces de inhibir la señal del receptor del factor de crecimiento de los hepatocitos (c-Met), por lo que la sobreexpresión de estos miRs podría ser beneficiosa para tratar el HCC, ya que este receptor también se encuentra sobreexpresado en el HCC (27).

7. CONCLUSIONES

Los mediadores inflamatorios producidos tras la apoptosis de los hepatocitos debido a la inflamación crónica estimulan la producción y liberación de los ligandos del EGFR en las células de Kupffer, miofibroblastos y hepatocitos. En consecuencia, se produce una respuesta compensatoria de proliferación descontrolada, que puede dar lugar al HCC. Además, la unión de los mediadores inflamatorios con los TLRs activa a las enzimas de la familia ADAM, produciéndose el procesamiento y la liberación de los ligandos. La producción de IL6, citoquina implicada en la hepatocarcinogénesis, en las células de Kupffer es dependiente del EGFR. Por consiguiente, tanto el EGFR como sus ligandos y las enzimas de la familia ADAM se encuentran sobreexpresados en la inflamación hepática y en el HCC, lo que aumenta las señales de proliferación y supervivencia celular. Por ello, tanto el EGFR como las proteínas implicadas en las numerosas vías de señalización intracelulares activadas por el EGFR pueden considerarse dianas terapéuticas.

Sin embargo, hay que tener en cuenta tanto la etiología del cáncer como el estadio del cáncer. Por ejemplo, tanto NF-kB como STAT3 implicados en la proliferación descontrolada de los hepatocitos se pueden comportar como oncogén o anti-oncogén según las circunstancias, como se ha visto en este trabajo. Asimismo, el tratamiento con los TKIs únicamente es eficaz cuando el EGFR se expresa en las células de Kupffer y en estadios tempranos del desarrollo tumoral.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Voiculescu, M. Winkler, R.E. Moscovici, M. Neuman. M.G. *Chemotherapies and Targeted Therapies in advanced Hepatocellular Carcinoma: from Laboratory to clinic.* J Gastrointestin Liver Dis. September 2008 Vol 17 NO 3, 315-322.
2. https://gacetamedica.com/hemeroteca/il-17a-es-clave-en-el-desarrollo-de-la-esteatohepatitis-no-alcoholica-nash-lylg_992339/
3. Ringelhan, M. Pfister, D. O'Connor, T. Pikarsky, E. Heikenwalder, M. *The immunology of hepatocellular carcinoma.* Nature Immunology 2018. <https://doi.org/10.1038/s41590-018-0044-z>.
4. Berasain, C. Avila, M.A. *The EGFR signalling system in the liver: from hepatoprotection to hepatocarcinogenesis.* J gastroenterol (2014) 49:9-23. DOI: 10.1007/s00535-013-0907-x-
5. Berasain, C. Castillo, J. Prieto, J. Avila, M.A. *New molecular targets for hepatocellular carcinoma: the ErbB1 signaling system.* Liver international (2007) ISSN 1478-3223. DOI: 10.1111/j.1478-3231.2006.01424.x
6. Berasain, C. Perugorria, M.J. Latasa, M.U. Catillo, J. Goñi, S. Santamaría, M. Prieto, J. Avila. M.A. *The epidermal Growth Factor Receptor: A Link Between Inflammation and Liver Cancer.* Exp Biol med 2009 234: 713. DOI: 10.3181/0901-MR-12.
7. Shimizu, K. Taniyama, Y. Sanada, F. Azuma, J. Iwabayashi M. Iekushi, K. Rakugi, H. Morishita, R. *Hepatocyte Growth factor inhibits lipopolysaccharide-induced oxidative stress via Epithelial Growth Factor Receptor Degradation.* From the Departments of Clinical Gene Therapy and Geriatric Medicine and Nephrology. Osaka University Graduate School of Medicine, Yamadaoka, Suita, Japan. November 2012. DOI: 10.1161/ATVBAHA.112.300041
8. Berasain, C. Castillo, J. Perugoria, M.J. Latasa, M.U. Prieto, J. Avila, M.A. *Inflammation and Liver cancer: New Molecular links.* Steroid Enzymes and Cancer; Ann.N.Y. Acad. Sci 1155: 206-221 (2009) DOI: 10.1111/j.1749-6632.2009.03704.x
9. Guobin He, Michael Karin. *NF- κ B and STAT3 – key players in liver inflammation and Cancer.* Cell Research (2011) 21:159-168.
10. Yang, Y.M. Kim, S.Y. Seki, E. *Inflammation and Liver Cancer: Molecular Mechanisms and Therapeutic Targets.* Division of Digestive and Liver Diseases, Department of Medicine, Cedars-Sinai Medical Center, Los Angeles, California. ISSN 0272-8087 <https://doi.org/10.1055/s-0038-1676805>
11. Jasmin Svinka, Wolfgang Mikulits, & Robert Eferl. *STAT3 in hepatocellular carcinoma: new perspectives.* Hepatic Oncol. (2014) 1(1), 107–120. ISSN 2045- 0923.

12. Bergamann, J. Müller, M. Baumann, N. Reichert, N. Heneweer, C. Bolik, J. Lucke, K. Gruber, S. Carambia, A. Boretius, S. Leuschner, I. Becker, T. Rabe, B. Herkel, J. Wunderlich, T. Mitrucker, H-W. Rose- John, S. Schmidt-Arras, D. *IL.6 trans-signaling is essential for the development of hepatocellular carcinoma*. 2016 doi:10.1002/hep.28874
13. Lai, T-Y. Su, C-C. Kuo, W-W. Yeh, Y-L. Kuo, W-H. Tsai, F-J. Tsai, C-H. Weng, Y-J. Huang, C-Y. Chen, L-M. *β - catenin plays a key role in metástasis of human hepatocellular carcinoma*. *Oncology reports* 26: 415-422, 2011 DOI: 10.3892/or.2011.1323
14. Qian, Y. Han, J. Zhou, L. Yu, Q. Xv, J. Jin, Z. Yang, Y. Jiang, L. Lou, D. *Inhihibition of epidermal growth factor Receptor reduces Lipopolysaccharide (LPS)-induced activation and inflammaory Cytokines in Hepatic Stellate Cells in Vitro*. *Med Sci Monit*, 2018 ; 24: 5533-5541. DOI: 10.12659/MSM.909901
15. Cai, X. Li, Z. Zhang, Q. Qu, Y. Xu, M. Wan, X. *CXCL6-EGFR-induced Kupffer cells secrete TGF.B1 promoting hepatic stellate cell activation via SMAD2/BRD4/C-MYC/EZH2 pathway in liver fibrosis*. *J cell Mol Med*.2018;22:5050-5061. DOI: 10.1111/jcmm.13787
16. Bishayee, A. *The Role of Inflammation in Liver Cancer*
17. Huang, P. Xu, X. Wang, L. Zhu, B. Wang, X. Xia, J. *The role of EGF-EGFR signalling pathway in hepatocellular carcinoma inflammatory microenvironment*. *J Cell. Mol. Med*. Vol18, No, 2, 2014 pp. 218-230. DOI: 10.1111/jcmm.12153
18. Guías de Práctica Clínica de EASL–EORTC: *Tratamiento del carcinoma hepatocelular*. European Association for the Study of the Liver. European Organisation for Research and Treatment of Cancer
19. Lanaya, H. Natarajan, N. Komposch, K. Li, L. Amberg, N. Chen, L. Wculek, S.K., Hammer, M. Zenz, R. Peck- Radosavljevic, M.. Sieghart, W. Trauner, M. Wang, H. Sibia, M. *EGFR has a tumor- promoting role in liver macrophages during hepatocellular carcinoma formation*. *Nat Crll Bio*. 2014 October; 16(10): 972-7
20. Gurule, N.J. Heasley, L.E. *Linking tyrosine kinase inhibitor-mediated inflammation with normal epithelial cell homeostasis and tumor therapeutic responses*. *Cancer drug resist*. 2018; 1; 118-125. DOI: 10.20517/cdr.2018.12.
21. Berasain, C. Nicou, A. Garcia- Irigoyen, O. Latasa, M.U. Urtasun, R. Elizalde, M. Salis, F. Perugorria, M.J. Prieto, J. Recio, J.A. Corrales, F.J Avila. M.A. *Epidermal Growth Factor Signaling in Hepatocellular Carcinoma: Inflammatory Activation and a New Intracellular Regulatory Mechanism*. *Dig Dis* 2012;30:524-531. DOI: 10.1159/000341705.
22. Qian Zhou¹ , Vivian WY Lui^{†2} & Winnie Yeo¹. *Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway in hepatocellular carcinoma*. *Future Oncology*, 7(10),1149-1167

23. Forner, A. Rodríguez De Lope, C. Reig, M. Bruix, J. *Tratamiento del hepatocarcinoma avanzado*. Gastroenterol Hepatol. 2010;33(6):461–468
24. Ji1, L. Lin, Z. Wan, Z. Xia, S. Jiang, S. Cen, D, Cai, L. Xu, J. Cai, X. *miR-486-3p mediates hepatocellular carcinoma sorafenib resistance by targeting FGFR4 and EGFR*. Ji et al. Cell Death and Disease (2020) 11:250 <https://doi.org/10.1038/s41419-020-2413-4>
25. Caifeng Liu, Jun Li, Wei Wang, Xinyang Zhong, Feng Xu & Junhua Lu (2020): *miR-206 inhibits liver cancer stem cell expansion by regulating EGFR expression*, Cell Cycle, DOI:10.1080/15384101.2020.1739808
26. Zhao, y. Ye,L. Yu,Y. *MicroRNA-126-5p supresses cell proliferation, invasión and migration by targeting EGFR liver cancer*. <https://doi.org/10.1016/j.clinre.2020.03.025>
27. García- Vilas, J.A. Medina, M.A. *Updates on the hepatocyte growth factor/c-met axis in hepatocellular carcinoma and its therapeutic implications*. World J. Gastroenterol 2018. September7: 24(33): 3695-3708