



Università degli Studi di Milano
Scuola di Dottorato in Medicina Molecolare



Curriculum in Oncologia Molecolare

Ciclo XXV

Anno Accademico 2011-2012

Settore disciplinare MED/08

Dottorando: Gaia SPAGNUOLO

**MARCATORI MOLECOLARI AD IMPATTO
TRASLAZIONALE NEL CARCINOMA
EPATOCELLULARE**

Direttore della Scuola: Ch.mo Prof. Mario Clerici

Tutore: Prof. Massimo Roncalli

Correlatore: Dott.ssa Annarita Destro

Tesi svolta presso Istituto Clinico Humanitas, Rozzano (Mi)

*In ogni cristallo di ghiaccio e
nel candore della neve,
in ogni bocciolo di fiore e
nel suo profumo,
in ogni caldo raggio di sole
e in ogni colore della Natura che muta,
la tua presenza costante mi accompagna.*

*Sei infinitesimamente divisa in ogni cellula del mio corpo
eppure, Mamma, mi manchi così tanto.*

RINGRAZIAMENTI

Ringrazio il Prof. Massimo G. Roncalli, Facoltà di Medicina e Chirurgia (Università degli Studi di Milano) e Responsabile dell'Unità Operativa di Anatomia Patologica dell'Istituto Clinico Humanitas (Rozzano, Mi) per avermi concesso di svolgere il tirocinio presso il suo laboratorio di ricerca per il conseguimento del Dottorato di Ricerca. Ringrazio inoltre il Prof. Silvano Bosari, Facoltà di Medicina e Chirurgia (Università degli Studi di Milano) e Responsabile dell'Unità Operativa di Anatomia Patologica dell'Ospedale Maggiore Policlinico di Milano e la Dott.ssa Claudia Augello, con i quali ho collaborato ad una parte di questo progetto di Tesi.

I miei ringraziamenti vanno anche a tutti i medici dell'Unità Operativa di Anatomia Patologica dell'Istituto Clinico Humanitas con i quali ho positivamente collaborato nel corso di questi anni e che hanno soddisfatto sempre le mie curiosità "anatomico-patologiche" e al Dottor Bogdan Pinteau per la disponibilità e la gestione di alcuni risultati di questo lavoro di Tesi.

Un affettuoso ringraziamento è rivolto alle mie colleghe di Laboratorio, Annarita, Silvia, Chiara, Elisa e Roberta, con le quali ho condiviso tutti i momenti che lo stare insieme quotidianamente ci ha regalato.

Un infinito grazie ad Annarita, non solo correlatrice di questa Tesi, ma anche mia grande amica: grazie al tuo aiuto, alla tua comprensione e complicità mi sei stata vicina in un periodo tanto difficile, permettendomi ugualmente di raggiungere l'obiettivo finale di questo lavoro. Grazie!

Un grazie speciale a Luca, costantemente presente nella mia vita: grazie per avermi aiutato nella comprensione statistica di parte di questo progetto, ma soprattutto grazie per essermi stato sempre vicino in questo periodo estremamente delicato. La tua presenza, il tuo supporto e il tuo credere in me mi sono stati di fondamentale aiuto per il raggiungimento di questo traguardo. Persone speciali come te difficilmente si incontrano e per questo motivo mi ritengo estremamente fortunata!

Un enorme grazie a mia sorella Azzurra che con la sua forza e determinazione ha fatto sì che niente e nessuno ostacolasse i nostri studi e vanificasse i nostri sacrifici: negli ultimi anni la nostra unione è diventata ancora più indissolubile e grazie ad essa abbiamo superato prove veramente difficili. Io e te siamo una Famiglia straordinaria!!!

I miei sinceri ringraziamenti vanno anche alle mie zie, agli zii, cugini e cugine che, seppur a distanza, hanno sempre sostenuto i miei studi, condiviso gioie e dolori e creduto nelle mie capacità: grazie per quello che fate per il bene mio e di Azzurra.

Un sentito ringraziamento ai miei amici Adamo Cirillo, Marco Primi e alla carissima Luisa per l'estrema disponibilità, l'aiuto e la vicinanza rivoltami in tutti questi mesi.

Infine un particolare ringraziamento va alla piccola Enya che con la sua presenza in potenza, ma non ancora in atto, ha allietato gli ultimi mesi di questo percorso di studi: il tuo Essere è la chiara dimostrazione che nella vita nulla è impossibile!

SOMMARIO

L'epatocarcinoma (EC) è un tumore maligno ad elevata morbilità e mortalità la cui speranza di cura è basata su diagnosi precoce e terapia individualizzata. Ad oggi il trattamento di elezione è rappresentato dalla chirurgia e l'unico farmaco con comprovata efficacia terapeutica è un presidio biologico di recente introduzione ad azione anti-tirosinochinasica (Sorafenib). La gestione ottimale del paziente con EC è sempre più influenzata dalla possibilità di disporre di marcatori molecolari da utilizzarsi nella pratica clinica a significato diagnostico, prognostico e predittivo. Il presente lavoro si propone come contributo all'identificazione e validazione di specifici indicatori biologici nella diagnostica del piccolo EC, predizione della recidiva del tumore resecato e della sensibilità individuale alla risposta al trattamento farmacologico nella forma avanzata.

E' già stato dimostrato che l'accuratezza della diagnosi precoce di EC su biopsia epatica può essere migliorata in maniera significativa dalla valutazione dell'espressione combinata di alcuni marcatori recentemente proposti e già utilizzati nella pratica clinica. Abbiamo cercato di ottimizzare questo pannello valutando il contributo aggiuntivo della catena pesante della clatrina (CHC) che è componente essenziale nel sistema di trasporto vescicolare intra ed extracellulare, già segnalato come sovraregolato negli epatociti tumorali maligni. Utilizzando una casistica di EC di piccole dimensioni e di lesioni precancerose di controllo e documentando l'espressione della molecola con tecnica immunocitochimica, abbiamo verificato la sua efficacia in termini di accuratezza diagnostica. In particolare l'introduzione di CHC si è dimostrata in grado di incrementare la sensibilità del pannello dal 46,8% al 63,8% a fronte del mantenimento di una specificità assoluta.

E' noto come il processo di carcinogenesi epatica origini anche sulla base di alterazioni delle vie molecolari che governano i processi di tipo ossidativo, con importante ruolo di protezione svolto dalla famiglia dei citocromi. Alcuni studi di espressione genica hanno già evidenziato che la recidiva di malattia tumorale nel fegato sia influenzata dalla disregolazione di alcuni citocromi, tra cui CYP1A2. Abbiamo inteso verificare e validare il ruolo del citocromo CYP1A2 nella qualità di possibile marcatore ad impatto traslazionale nella recidiva dell'EC attraverso il suo dosaggio immunocitochimico nel parenchima epatico non tumorale. Utilizzando una casistica omogenea di pazienti portatori di EC ad eziologia virale (virus C dell'epatite) e a follow-up noto, il dosaggio di CYP1A2 è risultato associato in maniera statisticamente significativa, sia in analisi univariata che multivariata al tempo libero da recidiva tumorale ($p=0.012$). In particolare la ridotta espressione del citocromo negli epatociti non tumorali, interpretabile come background più suscettibile alla trasformazione neoplastica "de novo", risultava in grado di predire una più rapida ripresa della malattia.

La terapia farmacologica dell'EC è attualmente somministrata a pazienti portatori di forme avanzate senza tenere conto della reale e individuale suscettibilità all'azione del farmaco. Vi è una forte esigenza clinica di selezionare i pazienti candidabili al trattamento anche per gli elevati costi della terapia, ma nessun marcatore, sia esso tissutale o sierologico, si è rivelato ad oggi capace di soddisfare questi requisiti. Abbiamo inteso esplorare se i miRNA, che costituiscono una famiglia eterogenea ma fondamentale di molecole regolatrici della traduzione, potessero a loro volta candidarsi a possibili marcatori biologici di predizione della sensibilità al trattamento farmacologico dell'EC. A questo scopo, partendo da un pool amplissimo di miRNA, abbiamo proceduto ad una loro progressiva selezione sulla base della loro disregolazione nonché associazione con il tempo di progressione della malattia dopo trattamento. Lo studio è stato condotto su biopsie epatiche pretrattamento di EC di pazienti omogeneamente trattati con Sorafenib. La selezione delle molecole e la validazione delle stesse è stata condotta in due casistiche distinte di cui la seconda utilizzata come coorte di validazione. Abbiamo così potuto individuare un unico miRNA con meccanismo di azione e geni targets poco conosciuti, il cui sovradosaggio valutato con tecnica di real-time PCR risultava fortemente e statisticamente associato ad una prolungata stabilizzazione della malattia tumorale ($p=0.009$).

L'insieme di questi risultati dimostra che la crescente domanda di marcatori di medicina personalizzata per ottimizzare la gestione del paziente oncologico (con EC nel nostro caso), possa essere soddisfatta attraverso l'applicazione di tecniche relativamente semplici e riproducibili quali l'immunocitochimica e l'analisi quantitativa del messaggero, condotte sia su tessuti tumorali che non tumorali. Naturalmente affinché il dosaggio di una molecola possa entrare nella pratica clinica corrente, candidandosi come un autentico marcatore molecolare, è necessaria, come nei nostri casi, un'ulteriore validazione in studi di tipo prospettico.

ABSTRACT

Hepatocellular carcinoma (HCC) is a malignant tumor with high morbidity and mortality worldwide. The treatment is based on early diagnosis and individualized therapy. Today surgery is the primary strategy for patients with HCC and Sorafenib, an anti tyrosine kinase drug, represents the only available drug with proven efficacy. The discovery of new molecular markers (diagnostic, prognostic and predictive) that can be translate in the clinical practice represents the improvement in the management of these patients.

The present research is aimed at identifying and validating biological markers related to the early HCC diagnosis and to predict HCC relapse. In addition the individual sensibility to pharmacological treatment in patients with advanced HCC is also evaluated.

It has been shown that the accuracy of the HCC early diagnosis on the liver biopsy can be significantly improved by combining histological features with molecular markers, recently proposed and applied in the clinical practice. We have optimized this molecular panel for evaluating the contribution of the clathrin heavy chain (CHC), which is an essential component of intra and extracellular vesicular transport, and previously reported as an up-regulated molecule in malignant liver cells. Using a series of small HCC and control precancerous lesions we tested, by immunohistochemical analysis, whether CHC expression contribute to improve the histopathological diagnostic accuracy. We found that the introduction of CHC increases the sensitivity from 46,8% to 63,8% and maintains an absolute specificity.

It is now ascertained that hepatocarcinogenesis is based on alterations in a wide variety of molecular pathways controlling oxidative processes and that cytochromes family plays a protective role in this context. Additionally, gene expression profiles have shown that relapse of HCC is caused by some cytochromes deregulations (i.e. CYP1A2). We verified and validated the CYP1A2 role in relation to relapse of disease by immunohistochemistry and its quantification in non-tumoral liver parenchyma. By investigating a homogeneous series of HCC patients with HCV infection and known follow-up, we demonstrated that the CYP1A2 dosage was associated with the recurrence-free survival ($p=0,012$) in both univariate and multivariate analyses. Moreover, CYP1A2 expression decreased in non-tumoral hepatocytes, the most susceptible background to “de novo” neoplastic transformation, predicted a faster recurrence of disease.

The pharmacological therapy of HCC is currently administered to patients with advanced disease, without any discrimination according to the individual drug susceptibility. There is a compelling clinical need to select patients more suitable to underwent pharmacological treatment, because of

the elevated cost. Furthermore, there is no still histological and/or serological biomarker, capable to satisfy these requirements. For this reason, we explored whether miRNA, heterogeneous family of regulatory molecules of translation, can be used as new molecular predictive markers of sensitivity to HCC treatment. For this purpose, starting from a wide pool of miRNA, we progressively selected those deregulated and associated with time to progression of disease after treatment. This research was conducted on liver biopsies sampled before treatment in patients treated with Sorafenib. The selection and validation of miRNA were conducted on two distinct series of patients. Among these the second group of patients has been used as a validation set. We identified a single miRNA, with mechanism of action ad genes target unknown, which when appears overexpressed, by real-time PCR analysis, was strongly and statistically associated with prolonged stabilization of tumor disease ($p=0,009$).

The above findings all suggest that the increasing demand for customized markers to optimized the management of HCC patients can be investigated through the application of relatively simple and reproducibly techniques (including immunohistochemistry and real-time PCR) on both tumoral and non-tumoral tissue. Further validation in prospective studies is required to pursue a personalized dosage of new molecular markers to be introduced in the current clinical practice.

INDICE

1. RILEVANZA EPIDEMIOLOGICA DELL'EPATOCARCINOMA ED IMPORTANZA DI UNA DIAGNOSI PRECOCE	1
2. PATOGENESI MORFOLOGICA, ETEROGEINEITA' MORFOLOGICA ED ETEROGENEITA' MOLECOLARE NELL'EPATOCARCINOMA	4
<i>2.1 Il background epatitico e la cirrosi epatica nell'epatocarcinogenesi</i>	<i>4</i>
<i>2.2 L'epatocarcinoma da epatociti maturi o da epatociti progenitor: ipotesi di classificazione morfotipica</i>	<i>7</i>
<i>2.3 Eterogeneità morfologica ed eterogeneità molecolare: proposte di classificazione molecolare</i>	<i>9</i>
3. LA PROGRESSIONE TUMORALE DELL'EPATOCARCINOMA SI INSCRIVE NELLE PRINCIPALI VIE MOLECOLARI COINVOLTE: IPOTESI DI BIOMARCATORI MOLECOLARI ASSOCIATI A RECIDIVA DI MALATTIA	21
4. STADIAZIONE DELL'EPATOCARCINOMA E SUO ATTUALE TRATTAMENTO	26
5. SCOPO DEL LAVORO	27
6. MARCATORI MOLECOLARI AD IMPATTO TRASLAZIONALE NELLA DIAGNOSTICA DEL PICCOLO EPATOCARCINOMA	28
<i>6.1 Introduzione</i>	<i>28</i>
<i>6.2 Materiali e metodi</i>	<i>35</i>
6.2.1 La casistica	35
6.2.2 Analisi immunoistochimica	36
6.2.3 Valutazione dei preparati istologici	38
6.2.4 Analisi statistica	39
<i>6.3 Risultati</i>	<i>39</i>
6.3.1 Valutazione preliminare dell'espressione immunoistochimica di CHC	39
6.3.2. Valutazione dell'espressione di GPC3, GS, HSP70 e CHC in epatocarcinomi di piccole e grandi dimensioni	40
<i>6.4 Discussione</i>	<i>43</i>
7. MARCATORI MOLECOLARI PROGNOTICI AD IMPATTO TRASLAZIONALE NELLA PREDIZIONE DELLA RECIDIVA DELL'EPATOCARCINOMA	46
<i>7.1 Introduzione</i>	<i>46</i>

7.2 Materiali e metodi	47
7.2.1 La casistica	47
7.2.2 Analisi immunoistochimica	48
7.2.3 Valutazione dei preparati istologici	50
7.2.4 Analisi statistica	51
7.3 Risultati	51
7.4 Discussione	54
8. MARCATORI MOLECOLARI AD IMPATTO TRASLAZIONALE SULLA PREDIZIONE DELLA RISPOSTA AL TRATTAMENTO CON SORAFENIB	57
8.1 Introduzione	57
8.2 Materiali e metodi	61
8.2.1 La casistica	61
8.2.2 Microdissezione laser, estrazione e purificazione dell'RNA	64
8.2.3 Retrotrascrizione dell'RNA e analisi di espressione genica dei miRNA totali	65
8.2.4 Retrotrascrizione dell'RNA e analisi di espressione genica di singoli miRNA	68
8.2.5 Analisi statistica	72
8.3 Risultati	73
8.3.1 Analisi dell'espressione genica dei microRNA totali	73
8.3.2 Identificazione di un numero ristretto di miRNA legati al follow-up e loro validazione	75
8.4 Discussione	79
9. CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE	81
10. BIBLIOGRAFIA	83
11. PUBBLICAZIONI ED ABSTRACT	89

ABBREVIAZIONI

EC: epatocarcinoma

LGDN: low grade dysplastic nodule

HGDN: high grade dysplastic nodule

HBV: hepatitis B virus

HCV: hepatitis C virus

BCLC: Barcelona Clinic Liver cancer

AASLD: American Association for the Study of Liver Diseases

OS: overall survival

OS_T: overall survival dall'inizio del trattamento con Sorafenib

OS_G: overall survival globale

TTP: time to progression

PFS: progression-free survival

RFS: recurrence-free survival

PS: performance status

GPC3: glypican-3

GS: glutamine synthetase

HSP70: heat shock protein 70

CHC: clathrin heavy chain

3M: pannello di 3 marcatori

4M: pannello di 4 marcatori

miRNA: microRNA

p: p value

1. RILEVANZA EPIDEMIOLOGICA DELL'EPATOCARCINOMA ED IMPORTANZA DI UNA DIAGNOSI PRECOCE

L'epatocarcinoma (EC) rappresenta una delle principali cause di morte al mondo per neoplasia, con più di 600.000 morti all'anno. L'incidenza di questa neoplasia varia notevolmente in funzione della regione geografica, con aree in cui la sua frequenza è drammaticamente elevata, quali Asia e alcuni Stati dell'Africa orientale, ed aree a bassa incidenza come i paesi Europei o gli Stati Uniti. In relazione al sesso, l'EC si sviluppa più frequentemente in quello maschile rispetto a quello femminile con un rapporto di 1:2 (F:M) [1].

Circa il 90% di EC è associato a fattori di rischio noti: i più frequenti includono infezioni virali da HBV e HCV, assunzione di alcool ed esposizione ad aflatossina B. In Africa e nella maggior parte dell'Asia si ha una prevalenza di infezione da HBV, mentre nel mondo Occidentale è più diffuso il virus dell'epatite C. Nella popolazione mondiale gli EC da epatite B costituiscono il 54% dei casi, quelli da epatite C il 31%.

L'80-90% degli EC insorge su un quadro di cirrosi epatica, importante fattore di rischio spesso conseguente ad una epatite virale cronica, oppure in misura minore a causa di un danno epatico indotto da alcool, di malattie metaboliche (emocromatosi o deficit di alfa-1-antitripsina) o malattie dismetaboliche quali steatoepatiti che conferiscono resistenza insulinica (malattie epatiche non alcoliche). L'incidenza di sviluppare tumore aumenta in particolar modo in pazienti con infezione virale, come conseguenza sia della carica virale che della durata dell'infezione [2].

Tra i principali fattori di rischio figurano le infezioni virali da HBV e HCV: il virus dell'epatite B appartiene alla famiglia degli *Hepadnaviridae*, con genoma a DNA, e il virus dell'epatite C della famiglia dei *Flaviviridae*, con genoma a RNA, agiscono in maniera diversa nell'induzione del danno epatico, attivando differenti meccanismi molecolari.

Un altro co-fattore implicato nello sviluppo dell'EC è l'aflatossina B1, micotossina prodotta da due specie funginee *Aspergillus flavus* ed *Aspergillus parasiticus*, diffuse in maniera ubiquitaria in natura, ma contaminanti numerosi alimenti base nelle regioni tropicali o subtropicali dell'Asia e Africa. Studi epidemiologici hanno dimostrato come esista una forte correlazione tra l'assunzione alimentare della tossina e l'incidenza di EC con mutazioni di p53, in particolar modo in soggetti HBV positivi.

In molti paesi Europei e negli Stati Uniti un altro co-fattore coinvolto nella formazione di tumore epatico è l'assunzione di alcool, che agisce attraverso meccanismi di carcinogenesi indiretta, in

virtù di un effetto epatotossico dose-dipendente. Per quanto riguarda altri fattori di rischio, pazienti con emocromatosi sviluppano EC nel 45% dei casi, frequentemente su un background cirrotico e anche in pazienti affetti da deficit di alpha-1-antitripsina, lo sviluppo del tumore è complicanza della cirrosi generatasi [2].

Nell'ambito dei fattori di rischio genetici, lo studio condotto da White DL et al. ha valutato la relazione che intercorre tra polimorfismi nei geni che codificano per isoenzimi coinvolti nella detossificazione cellulare e il rischio di sviluppare EC. Gli autori evidenziano come soggetti mancanti dei geni GSTM1 e GSTT1 abbiano un aumentato rischio di sviluppare la neoplasia [3]. Un secondo studio basato sull'analisi di polimorfismi interessanti il gene EGF (Epidermal Growth Factor), predisponenti all'EC, dimostra come in pazienti cirrotici con genotipo G/G il rischio di sviluppare tumore sia aumentato di quattro volte rispetto ad una popolazione controllo [4, 5].

In Tabella 1.1. è riportata la distribuzione geografica mondiale dei principali fattori di rischio per lo sviluppo di EC, suggerita dalle linee guida della EASL-EORTC.

Tabella 1.1. Distribuzione geografica mondiale dei principali fattori di rischio per lo sviluppo di EC (Adattata da EASL-EORTC Clinical Practice Guidelines, European Journal of Cancer, 2012).

Geographical distribution of main risk factors for hepatocellular carcinoma (HCC) worldwide					
Geographic area	AAIR M/F	Risk factors		Alcohol (%)	Others (%)
		HCV (%)	HBV (%)		
Europe	6.7/2.3	60–70	10–15	20	10
Southern	10.5/3.3				
Northern	4.1/1.8				
North America	6.8/2.3	50-60	20	20	10 (NASH)
Asia and Africa		20	70	10	10 (Aflatoxin)
Asia	21.6/8.2				
China	23/9.6				
Japan	20.5/7.8	70	10–20	10	10
Africa	1.6/5.3				
WORLD	16/6	31	54	15	

AAIR, age-adjusted incidence rate.

Ancora oggi a livello mondiale il tasso di morbilità relativo all'EC corrisponde quasi interamente a quello di mortalità: per questo motivo, non esistendo un trattamento farmacologico specifico per

questo tipo di neoplasia, assume un ruolo fondamentale la possibilità di intervenire tempestivamente con una diagnosi precoce. Già a partire dagli anni '80 è stato proposto un meccanismo attraverso il quale selezionare pazienti ad elevato rischio di sviluppare EC: soggetti con epatiti croniche da infezione da virus B o cirrosi, che nel corso degli anni potrebbero sviluppare EC, diventano quindi il target principale di progetti di screening utili alla formulazione di una diagnosi precoce. In numerose aree del mondo (Europa, Nord America, Giappone, Sud Corea), sia che presentino elevata incidenza di malattia o meno, sono stati attuati nel corso degli ultimi anni progetti di sorveglianza al fine di identificare pazienti con tumori piccoli, asintomatici e più facilmente curabili [2, 6].

2. PATOGENESI MORFOLOGICA, ETEROGENEITA' MORFOLOGICA ED ETEROGENEITA' MOLECOLARE NELL'EPATOCARCINOMA

2.1 Il background epatitico e la cirrosi epatica nell'epatocarcinogenesi

L'epatocarcinogenesi è un processo complesso e multifasico, caratterizzato da alterazioni genetiche ed epigenetiche interessanti gli epatociti, che esitano in un aumento di proliferazione e sopravvivenza, riduzione dell'apoptosi e selezione di popolazioni clonali, il tutto sostenuto e promosso da una progressiva neovascolarizzazione.

Le infezioni virali da HBV e HCV sono la causa principale di instaurazione di un quadro di epatite cronica, nel quale la morfologia del tessuto e la necrosi si presentano in modalità differenti a seconda della severità di malattia: il perdurare dello stato di epatite/infiammazione e della necrosi genera un danno epatico progressivo con deposito di tessuto fibroso, che è il migliore indicatore di alterazione epatica irreversibile. La continua perdita di epatociti e la fibrosi danno luogo alla cirrosi, caratterizzata dalla presenza di setti fibrotici e da noduli di rigenerazione.

La cirrosi appare quindi come la prima forma severa di alterazione del parenchima, stadio finale di molte forme di danno epatico, caratterizzata da formazione di noduli di rigenerazione dovuti all'aumentata proliferazione di epatociti senescenti ed altamente instabili.

Nell'epatocarcinogenesi (Figura 2.1.1) le prime alterazioni che si manifestano consistono in lesioni displastiche che danno origine a foci microscopici, che evolvono successivamente in noduli displastici, a basso ed alto grado. Questa fase è molto importante perché in grado di selezionare pazienti maggiormente predisposti a sviluppare EC [7].

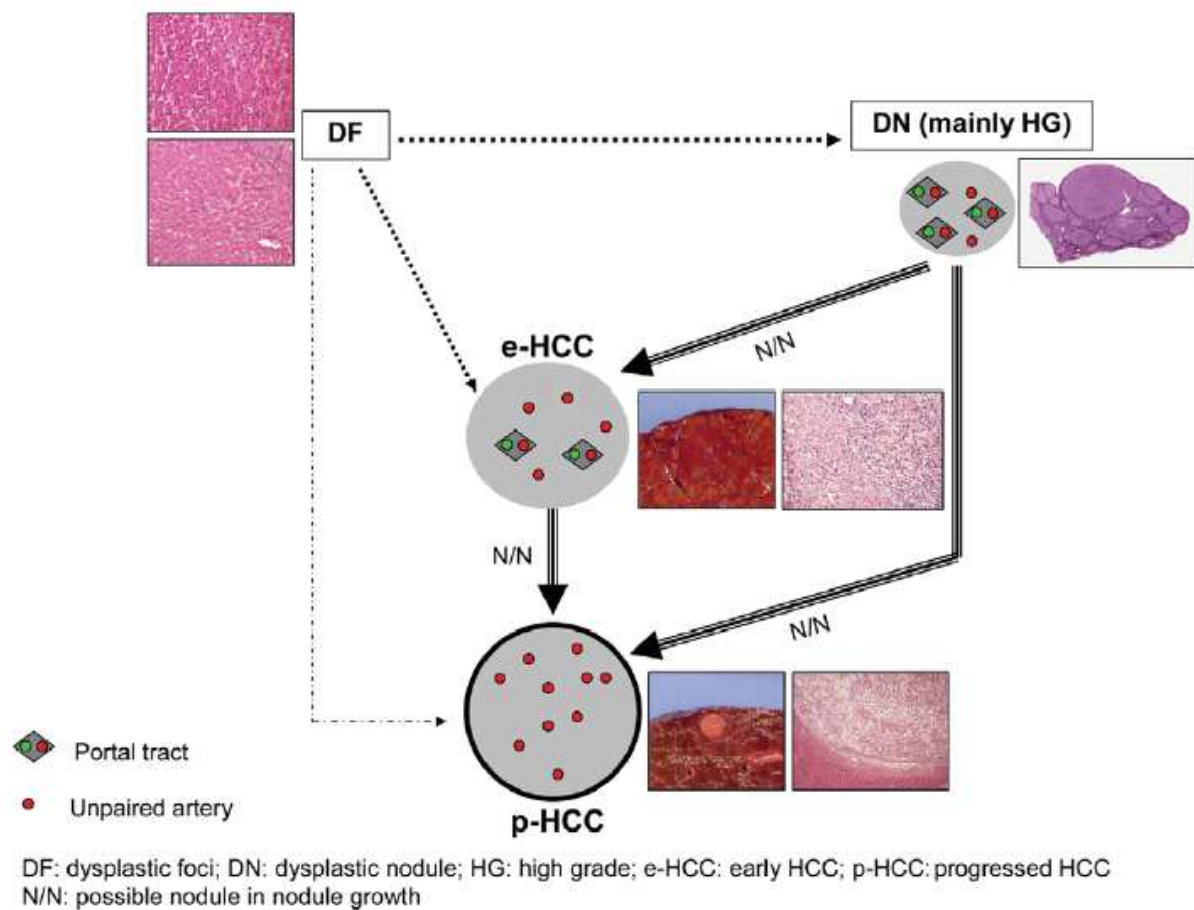


Fig. 2.1.1: Principali lesioni microscopiche e macroscopiche caratterizzanti l'eptocarcinogenesi (Adattata da M. Roncalli, *Digestive and Liver Disease*, 2010)

I foci displastici sono caratterizzati da epatociti alterati, in un background cirrotico, che presentano una riduzione del volume cellulare ed un aumento del rapporto nucleo/citoplasma, conferendo un'impressione di affollamento nucleare. Alterazioni molecolari sono costituiti da acquisizione di elevata capacità proliferativa rispetto agli epatociti circostanti sani, accorciamento dei telomeri e inattivazione del checkpoint del ciclo cellulare regolato dalla proteina p21 [8]. I foci displastici evolvono in veri e propri noduli, costituenti una lesione distinta, che differisce dal parenchima circostante per dimensione, colore e consistenza; possono essere singoli o multipli, a basso o alto grado a seconda del grado di atipia cellulare (Fig. 2.1.2). La differenza tra un nodulo displastico a basso grado e un nodulo rigenerativo è spesso difficile da definire a causa delle numerose caratteristiche istologiche comuni, così come è difficile discriminare tra un nodulo displastico ad alto grado ed un EC iniziale e ben differenziato. Anche a livello dei noduli displastici è evidenziabile un aumento dell'attività telomerasica, con riduzione della lunghezza dei telomeri, e inattivazione del checkpoint regolato dalla proteina p21 [8].

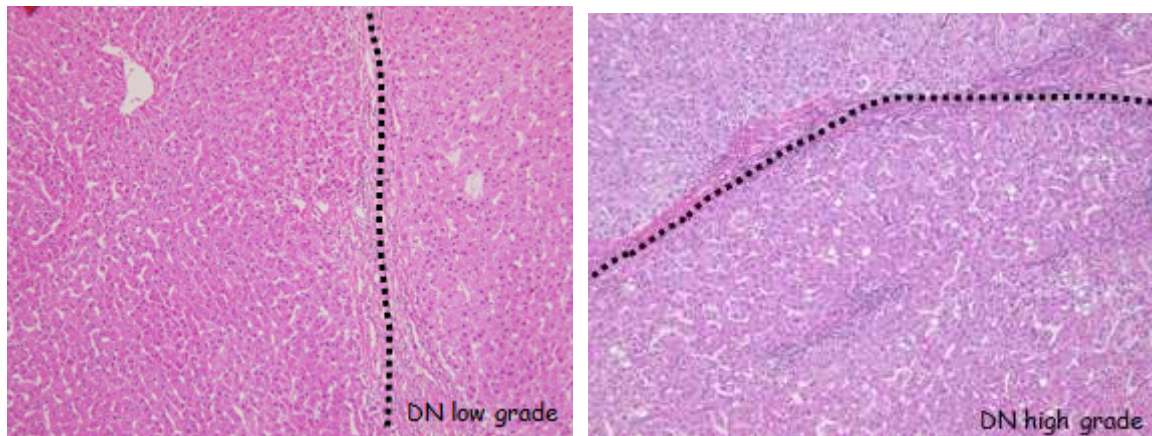


Fig. 2.1.2. Ematossilina eosina di un nodulo a basso grado (sinistra) ed uno ad alto grado (destra). Ingrandimento 5X.

I piccoli EC ≤ 2 cm si suddivono in due principali categorie caratterizzate da differente esito prognostico: piccoli EC early, ben differenziati, vagamente nodulari e con prognosi migliore rispetto a piccoli EC avanzati, moderatamente differenziati, con aspetto nodulare e a prognosi infausta. In entrambi i casi queste diverse forme tumorali si presentano come asintomatiche, ma grazie alle tecniche di diagnosi precoce esistenti è possibile intervenire tempestivamente al fine di evitare un'eccessiva crescita della massa e la comparsa di sintomi clinici.

Un early EC, definito anche *in situ* carcinoma, è caratterizzato da una massa inferiore ai 2 cm di diametro, vagamente nodulare, molto ben differenziata (G1) e con una neovascolarizzazione incompleta: le cellule neoplastiche appaiono piccole e con una densità due volte maggiore rispetto il parenchima circostante, con sottili strutture trabecolari e pseudoghiandolari. L'EC early è in grado di infiltrare i tratti portalari, ma non i vasi, a differenza delle forme avanzate (Fig.2.1.3.) [7, 8].

L'EC avanzato si sviluppa a partire da una displasia preesistente oppure da un EC early; nelle fasi precoci può essere inferiore ai 2 cm oppure assumere dimensioni maggiori. Morfologicamente è caratterizzato da una crescita espansiva con una completa neoangiogenesi a carico delle arterie ed una frequente invasione vascolare, e da una capsula fibrosa che lo circonda (Fig.2.1.3.). Istologicamente EC piccoli ma di stadio avanzato solitamente hanno un grado differenziativo moderato (G2) e raramente appaiono steatosici, ma possono manifestarsi anche come masse scarsamente differenziate (G3) caratterizzate da un aumento dimensionale.

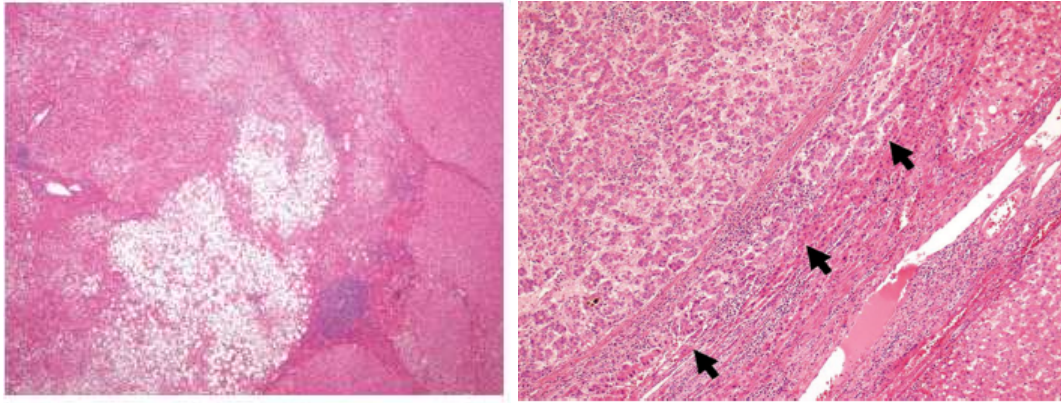


Fig. 2.1.3. Ematossilina eosina di un EC early (sinistra) ed uno avanzato (destra) dove le frecce indicano l'invasione tumorale della capsula (Ingrandimento 5X).

2.2 L'epatocarcinoma da epatociti maturi o da epatociti progenitor: ipotesi di classificazione morfo-fenotipica

Epatociti differenziati così come cellule epatiche progenitrici sono caratterizzate da un lento turnover e una prolungata sopravvivenza, in grado di dare origine a popolazioni clonali, tipiche delle fasi iniziali di epatocarcinogenesi. E' stato ipotizzato che gli EC avanzati si classifichino in due grandi categorie a seconda del fenotipo cellulare di cui si costituiscono: fenotipo epatocitario maturo e fenotipo epatobiliare costituito da una proporzione variabile di cellule a componente immatura (progenitori staminali) [7].

La figura 2.2.1. illustra un possibile schema classificativo del carcinoma primitivo del fegato. Avvalendosi dell'utilizzo di specifici marcatori tissutali è possibile identificare i diversi istotipi di EC: i marcatori tumorali infatti sono proteine espresse dalle cellule neoplastiche in grado di segnalare la presenza di un tumore o sue particolari caratteristiche.

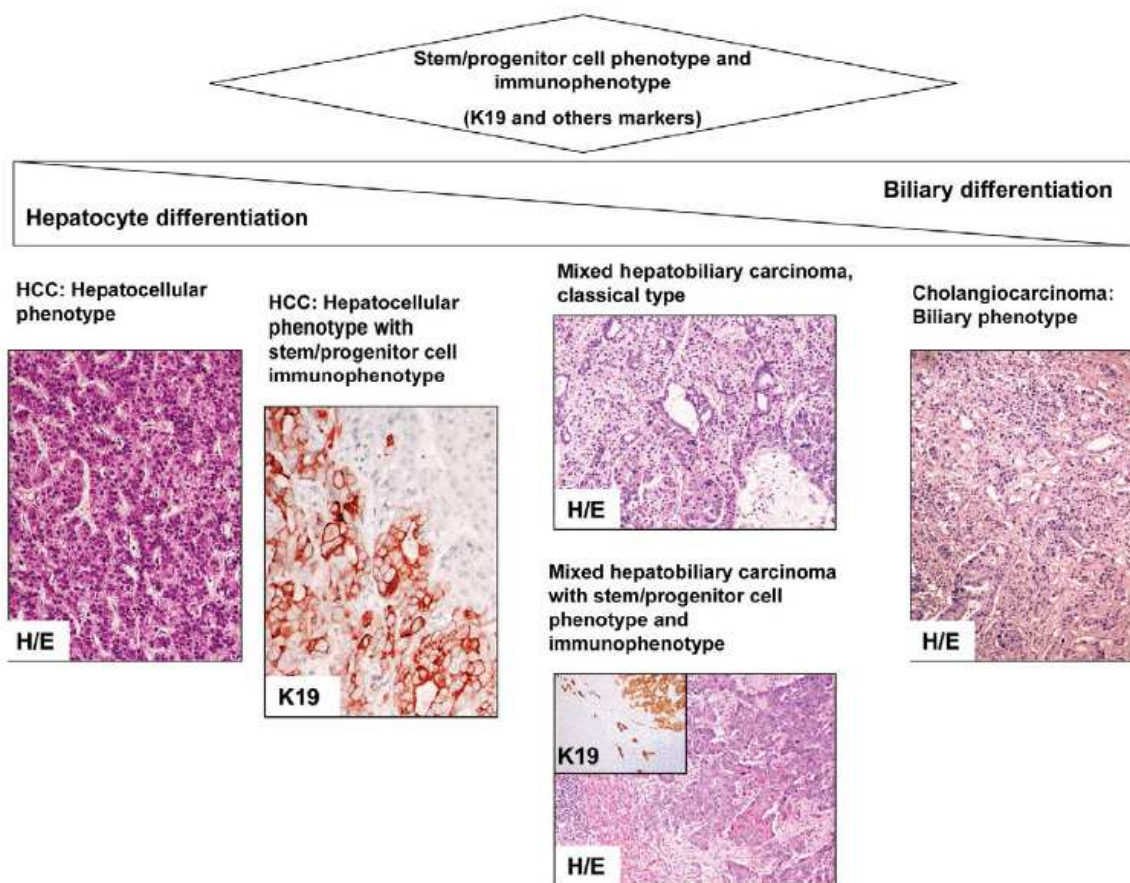


Fig. 2.2.1. Classificazione dell'EC a seconda del differenziamento epato-biliare, utilizzando criteri morfologici e immunofenotipici (Adattata da M. Roncalli, *Digestive and Liver Disease*, 2010).

Le forme più diffuse di EC con fenotipo epatocellulare sono caratterizzate da crescita distruttiva e frequente invasione vascolare. Le cellule tumorali si presentano moderatamente differenziate (G2), ma talvolta possono apparire anche scarsamente differenziate (G3), tipicamente in masse tumorali di grandi dimensioni. Durante le fasi di progressione si possono sviluppare differenti popolazioni clonali con caratteristiche morfologiche ben distinte, visualizzabili soprattutto nelle forme avanzate (morfologia pseudoghiandolare, solida, macrotrabecolare, sarcomatoide, ecc) [7].

Tra gli EC con immunofenotipo staminale/progenitore esiste un sottotipo di EC avanzato (principalmente G2/G3) nel quale una piccola frazione cellulare (>5%) esprime marcatori tipici di progenitori staminali, quali K19, K7, CD133 ed EpCAM, caratterizzanti un fenotipo molto aggressivo ed un' aumentata probabilità di ricorrenza di malattia dopo resezione epatica, resistenza a chemio e radioterapia e aumentato rischio di sviluppare metastasi a distanza. Si suppone che questa forma di malattia rappresenti un peculiare EC con fenotipo biliare, dal momento che il marcatore K19 risulta essere espresso sia nell'epitelio biliare che a livello dei progenitori staminali [7, 9-16]. Si ritiene quindi che l'utilizzo di questi immunomarcatori specifici possa essere utile nella selezione di pazienti con EC particolarmente aggressivo.

Un altro sottotipo molto raro di EC avanzato (2,5% di incidenza) è la forma mista epatobiliaria, ovvero una combinazione di epatocarcinoma e colangiocarcinoma, con aree tumorali ben distinte e con prognosi molto avversa; anche alcuni di questi EC a forma mista presentano fenotipi di staminalità che determinano un'aggressività tumorale ancora più marcata [7]. La conferma di un differenziamento epatocellulare può essere ben supportata dall'immunoistochimica per HerPar1 (antigene epatocitario specifico), pCEA e CD10; al contrario la componente di colangiocarcinoma viene evidenziata da K7 e K19. Inoltre la mucina identifica gli epatociti con differenziamento biliare maturo mentre la componente progenitrice/staminale di questo tumore viene evidenziata attraverso la valutazione dell'espressione dei marcatori NCAM, CD56, K7, K19, c-kit ed EpCAM [7].

Infine è stata riportata l'esistenza di un sottotipo di carcinoma epatobiliare misto con fenotipo ed immunofenotipo staminale/progenitore nel quale la maggior parte delle cellule tumorali mostra caratteristiche intermedie tra progenitori staminali di epatociti e di colangiociti [7].

2.3 Eterogeneità morfologica ed eterogeneità molecolare: proposte di classificazione molecolare

La patogenesi molecolare dell'EC è un processo multifasico e molto articolato, costituito da una serie di eventi mutazionali che si manifestano nell'epatocita maturo o nella cellula progenitrice epatica, in seguito ai quali si selezionano specifiche popolazioni clonali, che sviluppano un vantaggio selettivo sia per quanto riguarda la crescita che la proliferazione cellulare. Alterazioni addizionali, quali mutazioni genetiche o epigenetiche, sono necessarie per indurre nell'epatocita un fenotipo completo di malignità e supportare la crescita tumorale. I numerosi pathway molecolari coinvolti si possono ascrivere a due grandi categorie: pathway di sopravvivenza cellulare e pathway di proliferazione. Si conoscono oggi numerose informazioni riguardo ai meccanismi molecolari dei pathway coinvolti nell'epatocarcinogenesi, ma poche molecole sono state riconosciute come marcatori ad impatto traslazionale. Da qui ne deriva la necessità di identificare nuovi marcatori utili ai fini della quotidiana pratica clinica.

La prima proposta di classificazione molecolare, derivante dall'unione di informazioni cliniche e biologiche, è stata avanzata da Boyault et al. nel 2007: attraverso analisi trascrittomiche, genotipiche e fenotipiche sono stati identificati sei differenti sottogruppi di EC (G1-G6), ognuno caratterizzato da specifiche alterazioni molecolari (Fig. 2.3.1.).

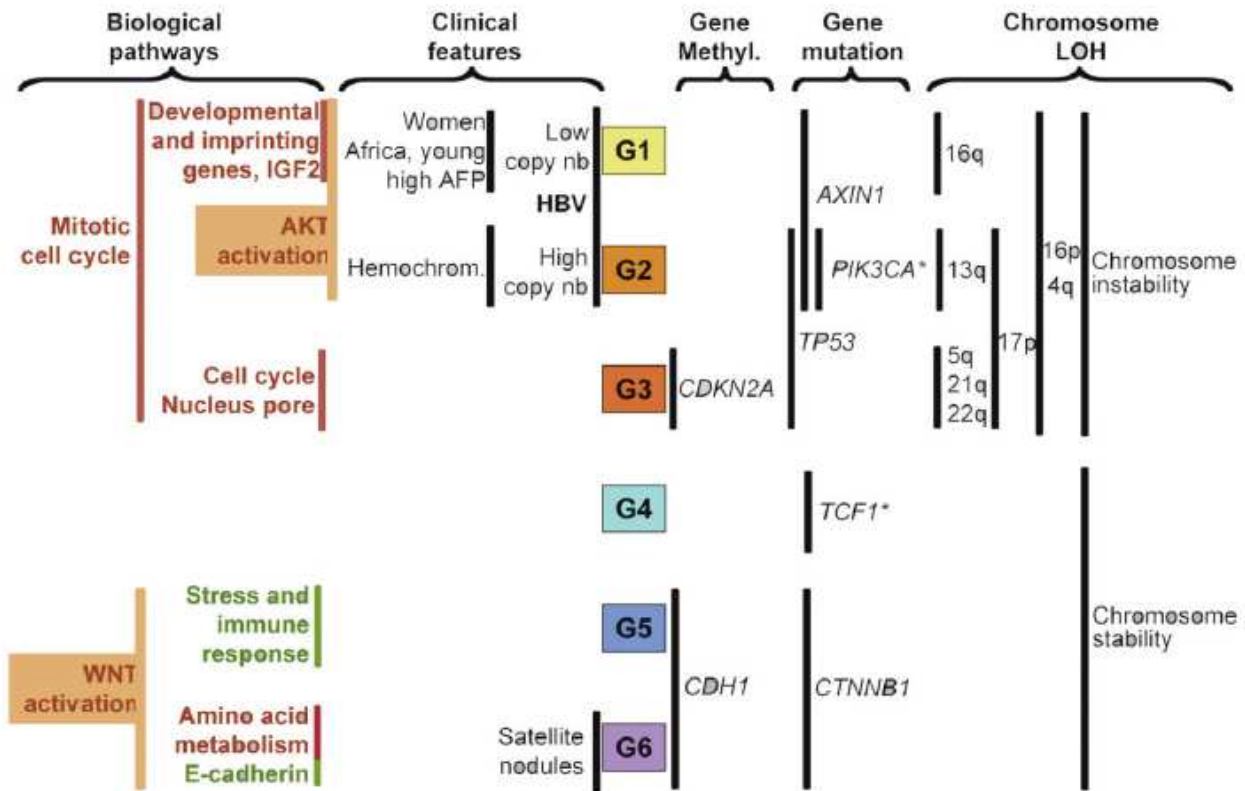


Fig. 2.3.1. Schematizzazione dei 6 differenti sottogruppi di EC (G1-G6) derivanti dall'analisi trascrittomica e correlati con le caratteristiche cliniche e genetiche. Le linee nere verticali indicano le caratteristiche più significative associate ai diversi sottogruppi; in rosso è mostrata overespressione genica e in verde downregolazione (Adattata da S. Boyault, *Hepatology*, 2007).

Da questa classificazione emerge che i tumori del gruppo G1 presentano alterazioni principalmente in geni espressi a livello del fegato embrionale che controllano i processi di imprinting parentale; il gruppo G2 include rari casi di EC con mutazioni in PIK3CA; nel gruppo G3 risultano overespressi geni che codificano per proteine del poro nucleare e del ciclo cellulare; il gruppo G4 racchiude eterogeneità tumorale; il gruppo G5 è principalmente caratterizzato dall'attivazione del pathway di Wnt/ β -catenina e dalla downregolazione di E-caderina, così come è risultato nel gruppo G6, caratterizzato inoltre da presenza di noduli satelliti [17].

Questo lavoro denota come pazienti con EC HBV positivo, classificabili in una specifica sottoclasse (G1-G6), mostrano a livello molecolare delle importanti differenze rispetto alle altre forme di EC: tumori derivanti da infezioni con HCV e da abuso di alcool sono distribuiti invece nei sottogruppi G3-G6. E' stato inoltre dimostrato che pazienti appartenenti ai sottogruppi G4-G6 mostrano una sopravvivenza maggiore rispetto a pazienti con tumori G1-G3 [17].

Il differente andamento di malattia di pazienti con EC positivi ad infezioni virali deriva sostanzialmente dalle diverse alterazioni molecolari indotte da HBV e HCV. Il virus dell'epatite B

determina danno epatico cronico caratterizzato da una persistente necro-infiammazione e attività rigenerativa, che esita in un aumentato turnover epatocitario. Le caratteristiche oncogeniche di questo virus sono determinate dalla natura del suo genoma a DNA, in grado di integrarsi in quello della cellula ospite in siti multipli, sin dalle prime fasi di infezione. L'integrazione determina numerose conseguenze a livello mutazionale, con fenomeni di duplicazioni, delezioni, amplificazioni e traslocazioni, generando instabilità cromosomica. La trasformazione maligna, conseguenza di queste alterazioni, conferisce un vantaggio selettivo per la crescita ed espansione delle cellule tumorali (Fig.2.3.2.). La misura preventiva attuata nei confronti delle infezioni da HBV consiste nella somministrazione di un specifico vaccino, mentre in pazienti già infettati la strategia migliore rimane il trattamento antivirale con potenti farmaci, quali entecavir o tenofovir, in grado di sopprimere per lunga durata la replicazione virale, con un rischio molto basso di resistenza farmacologica.

Il virus dell'epatite C è caratterizzato da un genoma a RNA a singolo filamento che codifica tre proteine strutturali e 4 funzionali. A differenza di HBV, HCV non possiede attività retrotrascrittivica inversa, di conseguenza non vi è possibilità di integrazione nel genoma della cellula ospite; dal momento che HCV è un virus a replicazione prettamente citoplasmatica, l'ipotesi più attendibile di azione carcinogenica consiste nell'attivazione di pathway legati all'infiammazione cronica e al danno epatocellulare (Fig.2.3.2.). Ad oggi non esiste ancora un vaccino selettivo contro HCV, di conseguenza le uniche strategie di prevenzione consistono nello screening del sangue destinato a trasfusioni oppure in terapie basate sull'utilizzo di interferone per pazienti con epatite cronica HCV positiva [18, 19].

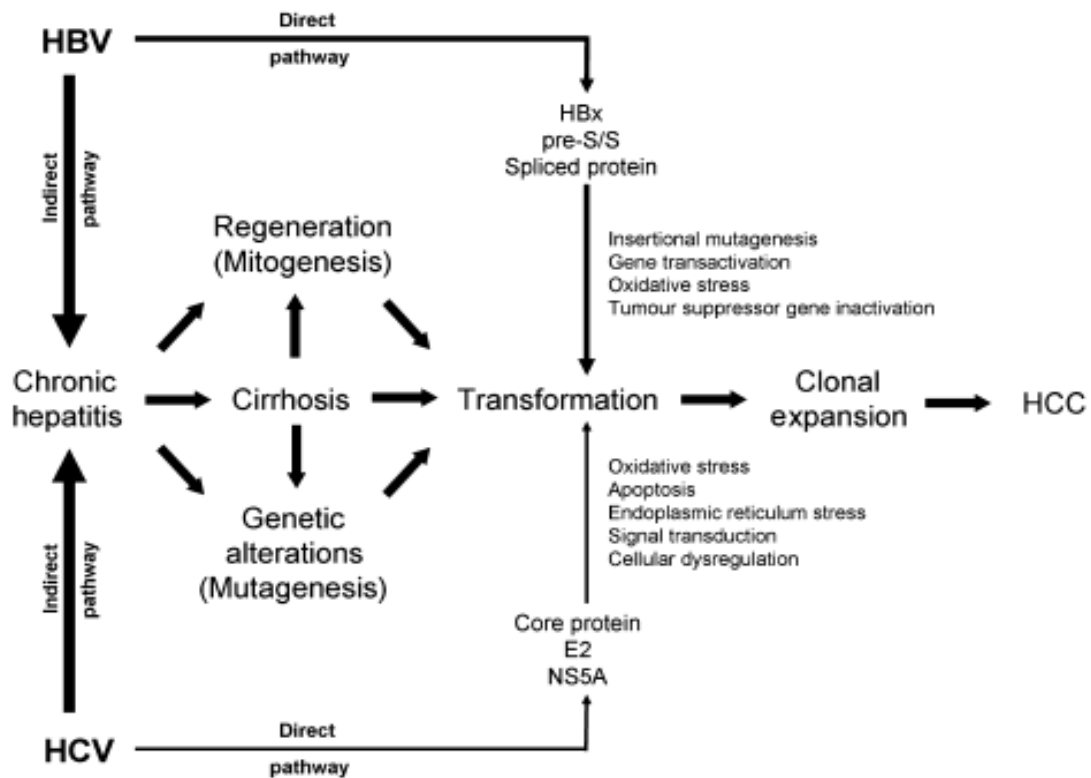


Fig. 2.3.2. Meccanismi di epatocarcinogenesi attivati da infezione virale da HBV e HCV (Adattata da J. Fung, *Clin. Microbiol. Infect.*, 2009).

Lo studio di Boyault et al., così come numerosi lavori presenti in letteratura, identifica il pathway di Wnt/ β -catenina come il più frequente alterato durante il processo di epatocarcinogenesi (Fig.2.3.2): il ligando Wnt lega il suo recettore Frizzled sulla membrana cellulare, attivando sia la via canonica di segnalazione intracellulare mediata da beta-catenina sia la via non canonica di attivazione delle chinasi JNK e PKC. Se il pathway di Wnt è attivato, beta-catenina si distacca da E-caderina, che la vincola alla membrana, ed è libera di traslocare nel nucleo, andando a regolare la trascrizione di oncogeni quali c-myc, survivina e ciclina D.

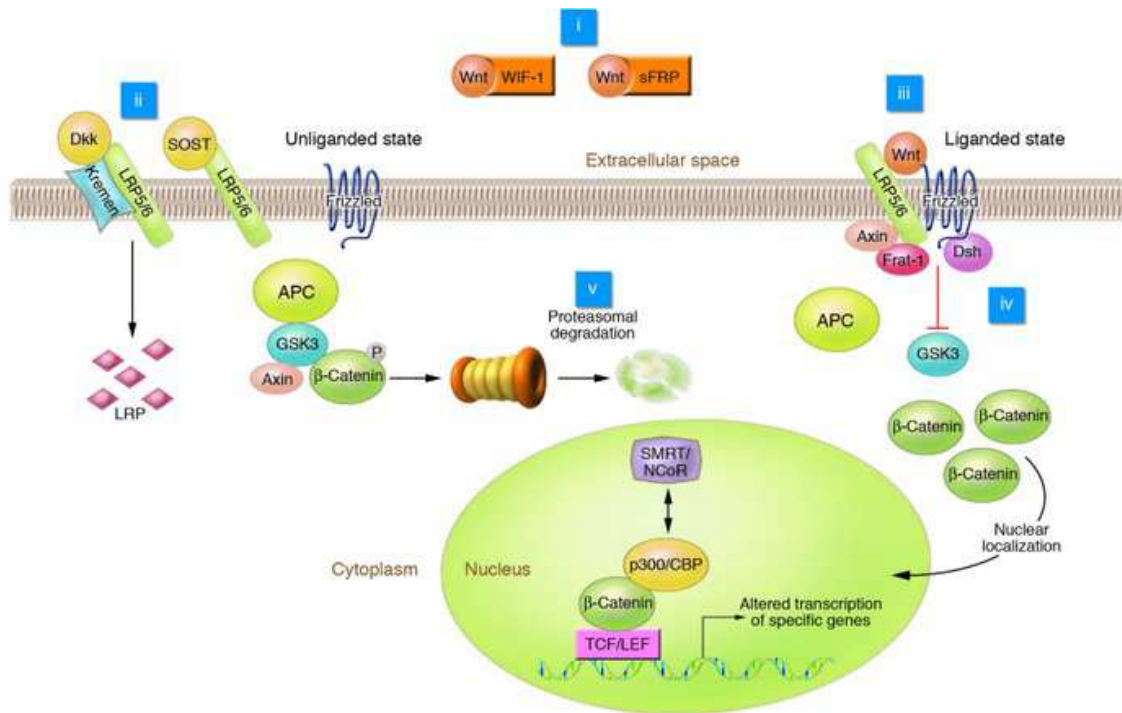


Fig. 2.3.2. Pathway molecolare di Wnt/beta catenina (Adattata da V. Khrishnan, *Journal of Clinical Investigators*, 2006).

Le mutazioni in β -catenina (marcatore immunoistochimico utilizzato ampiamente nella pratica clinica) rappresentano la seconda mutazione piú frequente nell'EC e il signaling di Wnt è principalmente attivato in EC HCV positivi (Figura 2.3.3).

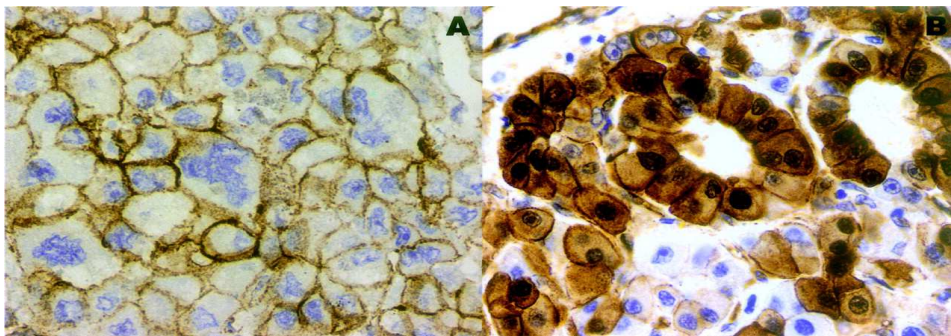


Fig. 2.3.3. Espressione di beta-catenina in EC: membrana (sinistra) e nucleo-citoplasmatica (destra). Ingrandimento 40X (Adattata da MJ Zenali, *Ann Clin Lab Sci*, 2010)

Un altro pathway cruciale descritto nell'EC è il pathway di Hedgehog (Hh): le proteine sonic Hh (SHH) e smoothened (SMO) risultano frequentemente overespresso nell'EC e determinano l'attivazione del signaling intracellulare, contribuendo all'epatocarcinogenesi. Il regolatore negativo

Hh interacting protein (HHIP) è invece downregolato attraverso meccanismi epigenetici di ipermetilazione del promotore e/o di perdita di eterozigosi [20, 21].

Numerosi sono i pathway molecolari coinvolti nei fenomeni di proliferazione e apoptosi cellulare, attivati principalmente da fattori di crescita quali hepatocyte growth factor (HGF), insuline-like growth factor (IGF), fosfoinositol-3-chinasi (PI3K) ed epidermal growth factor receptor (EGFR). A livello epatico il fattore di crescita che occupa un ruolo predominante è rappresentato da HGF e dal suo recettore c-Met, che giocano un ruolo fondamentale nella risposta cellulare, nella crescita invasiva durante la cancerogenesi, nella rigenerazione tissutale, nell'angiogenesi, proliferazione e migrazione (Fig.2.3.3). Nell'EC HGF è spesso overespresso e il suo recettore presenta un'attivazione aberrante, oltre che amplificazione genica, generando dei loop autocrini di attivazione continua del signaling: è stato dimostrato come i livelli di espressione di c-Met siano inversamente correlati alla sopravvivenza del paziente e l'aumentata espressione di HGF, sia nel fegato cirrotico che nel siero determini una prognosi infausta in seguito a resezione tumorale.

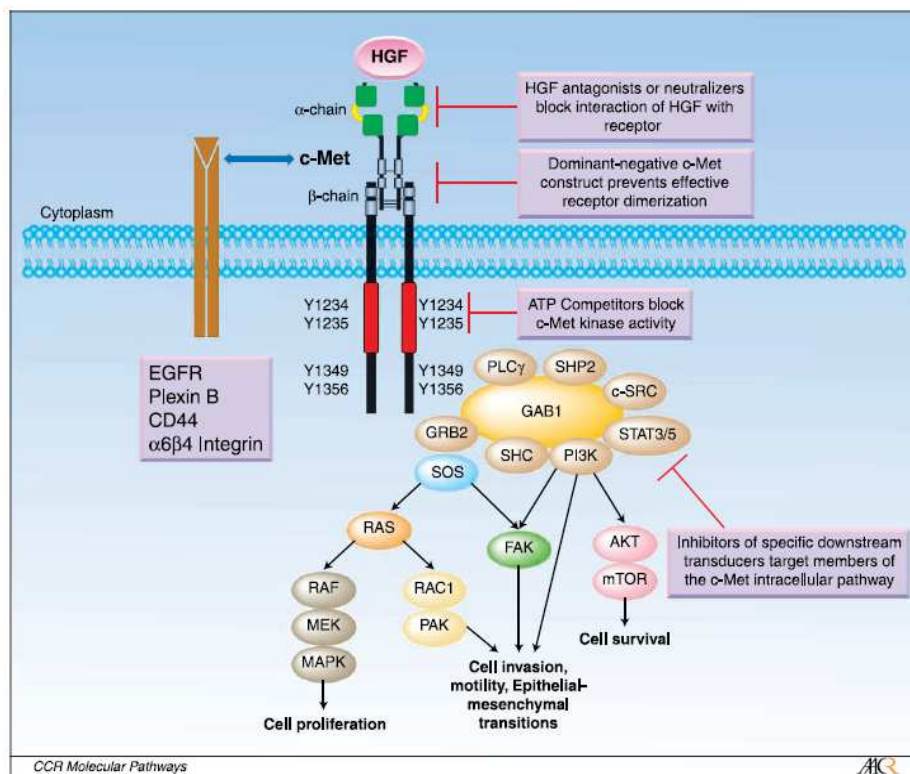


Fig.2.3.3. Pathway molecolare di HGF (Adattata da JP Eder, *Clinical Cancer Research*, 2009)

L'EC, come la maggior parte dei tumori, presenta modificazioni genetiche ed epigenetiche, che contribuiscono a determinare una disregolazione cellulare a vantaggio del tumore. Nell'EC i più frequenti cambiamenti strutturali consistono in amplificazioni, delezioni e mutazioni, con

conseguente generazione di instabilità cromosomica. Le amplificazioni cromosomiche più note (1q, 6p, 8q, 17q e 20q) e le delezioni più ricorrenti (4q, 8p, 13q, 16q e 17p) determinano alterazione di numerosi geni identificati come cruciali nell'epatocarcinogenesi, quali c-myc, PTEN, E-caderina, AXIN1, p53, Rb1, ciclina D1 e IGF-R2. Le mutazioni a carico di p53 e beta-catenina sono le più frequenti e meglio descritte nell'EC: l'oncosoppressore p53 risulta mutato nel 27% dei tumori epatici [21], mentre beta-catenina ha una frequenza di mutazione massima del 44% [21]. Entrambe le proteine mutate comportano distruzione del ciclo cellulare, annullamento dei fenomeni di riparo dei danni al DNA, deregolazione dei processi proliferativi e apoptotici e attivazione del pathway molecolare di Wnt. Infine, in più dell'80% degli EC l'attività telomerasica risulta aumentata, il che determina un incremento dell'instabilità cromosomica.

Le più frequenti alterazioni epigenetiche descritte in letteratura consistono in metilazione del DNA, modificazioni a carico degli istoni e rimodellamento dei nucleosomi: l'ipometilazione in differenti siti del genoma (evento molto diffuso nei tumori) e l'ipermetilazione a carico delle isole CpG nel promotore di diversi geni, sono responsabili di instabilità cromosomica e silenziamento genico. Nell'EC i geni principalmente coinvolti in questi fenomeni epigenetici sono p53, CASP8, p16, c-myc, RASSF1, IGFBP3, E-caderina e SOCS1 [21].

Dopo la classificazione esposta dal gruppo di Boyault, negli anni seguenti sono state formulate nuove classificazioni dell'EC da parte di diversi gruppi di ricerca, allo scopo di unificare aspetti legati all'eterogeneità morfologica con nozioni ottenute dagli studi di patogenesi molecolare. Grazie a studi di profili di espressione genica attraverso piattaforme microarray o analisi quantitative in Real-Time PCR, sono state individuate specifiche firme molecolari corrispondenti alle diverse fasi di epatocarcinogenesi, alcune delle quali utili anche alla stratificazione prognostica del paziente. In una recente review Villanueva et al. hanno riportato i lavori più rilevanti nella definizione delle principali firme molecolari descritte nell'EC [22].

Tabella 2.3.2. *Principali proposte di classificazione molecolare dell'EC in associazione alle caratteristiche cliniche-patologiche e principali firme molecolari legate a progressione di malattia.*

REFERENZE BIBLIOGRAFICHE	POTENZIALI MARCATORI	CORRELAZIONE CARATTERISTICHE CLINICHE	FIRMA MOLECOLARE
Laurent-Puig et al. [23]	Mutazioni in p53, β -catenina, AXIN1; alterazioni cromosomiche strutturali	Infezione da HVB, tumori scarsamente differenziati con prognosi infausta	Proposta di classificazione molecolare
Boyault et al. [17]	Mutazioni in p53, β -catenina, AXIN1, PI3KCA; attivazione di Akt; ipermetilazione E-caderina; alterazioni cromosomiche strutturali	Infezioni da HBV in donne giovani; emocromatosi; aumentati livelli di AFP, presenza di noduli satelliti	Proposta di classificazione molecolare
Chiang et al. (dati non pubblicati)	Mutazioni in β -catenina; attivazione pathway IGF e mTOR; overespressione geni indotti da INF, c-myc, COBL, SMO	Invasione vascolare con elevati livelli di AFP	Proposta di classificazione molecolare
Ye et al. [24]	Overespressione di osteopontina	Prognosi peggiore	Firma di progressione di malattia
Kurokawa e al. [25]	Signature molecolare di CDH1, IGF2R, RB1, NRG2	Prognosi avversa con elevato rischio di ricorrenza precoce di malattia	Firma di progressione di malattia
Lee et al. [26]	Overespressione di marcatori proliferativi e geni coinvolti nella ubiquitinazione e sumoilazione	Prognosi avversa	Firma di progressione di malattia
Lee et al. [27]	Overespressione fattori di trascrizione AP-1, FOS, JUN e di marcatori di cellule progenitrici KRT7, KRT19, VIM	Prognosi avversa	Firma di progressione di malattia
Budhu et al. [28]	Firma molecolare di 17 geni legati ai circuiti immunitari/infiammatori in grado di selezionare pazienti con o senza metastasi	Predizione del potenziale metastatico con riduzione significativa della sopravvivenza e del tempo di ricorrenza di malattia	Firma di progressione di malattia
Katoh et al. [29]	Alterazioni strutturali cromosomiche e attivazione pathway mTOR	Prognosi avversa	Firma di progressione di malattia

2.4 Ruolo dei microRNA nella patogenesi molecolare dell'epatocarcinoma

Negli ultimi anni è stato dimostrato che anche i microRNA (miRNA) risultano fortemente coinvolti nei pathway molecolari che promuovono l'epatocarcinogenesi: questi piccoli RNA non codificanti, lunghi dai 19 ai 24 nt ad attività regolatoria, sono stati scoperti e studiati per la prima volta nel nematode *C. elegans* da Victor Ambros et al. nel 1993 [30, 31]. I microRNA sono coinvolti in processi cruciali della vita cellulare, quali la proliferazione, l'apoptosi, lo sviluppo, il differenziamento e il metabolismo: la loro disregolazione ha come conseguenza l'alterazione di questi meccanismi ed un loro diretto coinvolgimento in pathway promuoventi la crescita e lo sviluppo tumorale.

Nel corso degli anni i ricercatori hanno indagato la relazione che intercorre tra le localizzazioni genomiche dei miRNA e le regioni genomiche coinvolte nella cancerogenesi; sorprendentemente è emerso che il 50% dei miRNA è localizzato all'interno o nelle vicinanze di siti fragili del genoma e in piccole porzioni di DNA che se alterate potrebbero determinare perdita di eterozigotità e amplificazioni geniche oppure in prossimità di rotture genomiche associate ai tumori [32].

In letteratura esistono numerosissimi lavori in cui è stato studiato il ruolo svolto da differenti miRNA nell'EC, sia per quanto riguarda l'aspetto di patogenesi molecolare, che per quanto riguarda il loro possibile utilizzo come marcatori diagnostici, prognostici e possibili target terapeutici. Negli ultimi anni, grazie ad un numero consistente di lavori scientifici (Tabella 2.4.1.) è stato possibile identificare i principali miRNA coinvolti nella patogenesi molecolare dell'EC: la maggior parte di essi agisce come oncomir, ovvero miRNA a caratteristiche oncogeniche che promuovono crescita, progressione e invasione tumorale.

Il primo lavoro scientifico che lega il ruolo svolto dai miRNA a specifici circuiti molecolari di tipo infiammatorio è stato proposto da Hatzia Apostolou et al.: è stato dimostrato come la proteina codificata dal gene HNF4 α , essenziale per lo sviluppo del fegato e la corretta funzionalità epatocitaria, sia in grado di promuovere la trasformazione maligna delle cellule, attraverso l'attivazione di un feedback infiammatorio costituito da miR-124, IL6R, STAT3, miR-24 e miR-629 (Figura 2.4.1.). Quando questo circuito infiammatorio è attivato, HNF4 α viene mantenuto in forma inattiva, favorendo il processo tumorigenico, mentre se viene somministrato in maniera sistemica il miR-124, è possibile modulare il signaling infiammatorio generatosi, prevedendo e spegnendo le fasi di epatocarcinogenesi e inducendo apoptosi [33]. Questo importante modello di patogenesi molecolare proposto richiede successive validazioni in vitro, potenzialmente traslabili nell'uomo, al fine di un eventuale utilizzo clinico.

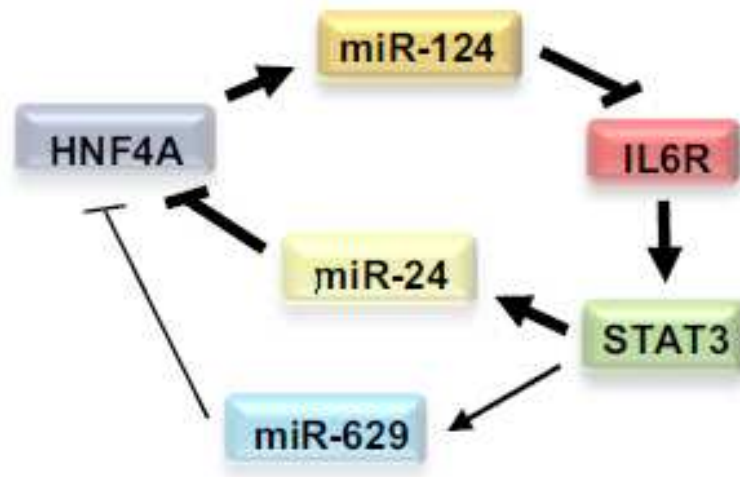


Fig.2.4.1. Rappresentazione schematica del circuito infiammatorio che si genera durante l'epatocarcinogenesi (Adattata da M. Hatzia Apostolou, Cell, 2011).

I miRNA maggiormente studiati e più frequentemente upregolati nell'EC sono miR-221 e miR-222 [34]: nel fegato adulto il miR-122, il cui target principale è la ciclina G1, costituisce il 70% di tutti i miRNA epatici ed è attivamente coinvolto nella regolazione sia del metabolismo del colesterolo e degli acidi grassi che della replicazione virale [35, 36]. Diversi studi hanno confermato che la perdita di miR-122 nell'EC correla con un distinto profilo di espressione genica, caratteristico di progressione tumorale, in cui si genera un quadro di soppressione del fenotipo differenziativo epatico e si favorisce l'acquisizione di caratteristiche metastatiche [37-40]. Un altro miRNA fondamentale nella patogenesi molecolare dell'EC è miR-181 che correla positivamente con l'espressione di beta-catenina nell'EC e i cui livelli di espressione appaiono particolarmente elevati in tumori EpCAM positivi a progenitori staminali, fenomeno giustificato dal fatto che l'espressione di questo miRNA è altamente riscontrabile nel fegato embrionale e nelle cellule staminali epatiche [41, 42]. Studi di profili di espressione genica hanno messo in evidenza l'esistenza di specifiche firme molecolari caratterizzanti la condizione tumorale e la controparte sana: per esempio, Varnholt et al. hanno identificato cinque miRNA con espressione aberrante nell'EC, ovvero miR-122, miR-100 e miR-10a che risultano overespressi e miR-198 e miR-145 downregolati di 5 volte nel tumore rispetto al parenchima epatico normale [43].

L'insieme dei miRNA che più recentemente sono stati studiati in relazione alla patogenesi molecolare dell'EC è riportato in Tabella 2.4.1.

Tabella 2.4.1. Elenco dei miRNA principalmente coinvolti nella patogenesi molecolare dell'EC.

POTENZIALI MARCATORI	RUOLO NELL'EPATOCARCINOMA	REFERENZE BIBLIOGRAFICHE
miR-122	↑ ciclina G1 e crescita cellule tumorali	Gramantieri L. et al. [44]
	Stimola la traduzione delle proteine del virus HCV	Henke J. I. et al. [36]
miR-221, miR-222	↑ crescita cellule tumorali	Pineau P. et al. [34]
miR-216a	Inibisce l'oncosoppressore TSLC1, frequentemente espresso in pazienti di sesso maschile	Chen P. J. et al. [45]
miR-22	↓ recettore alpha degli estrogeni (E α) e ↑ IL1 α	Jiang R. et al. [46]
miR-92	↑ attività telomerasica	Cardin R. et al. [47]
miR-373	↑ proliferazione cellulare inibendo PPP6C	Wu N. et al. [48]
miR-122, miR-100, miR-10a, miR-198, miR-145	Deregolati nell'EC	Varnholt H. et al. [43]
miR-124, miR-24, miR-629	Attivano un feedback infiammatorio e promuovono la trasformazione maligna dell'epatocita	Hatziapostolou M. et al. [33]
miR-376a	↓ la proliferazione agendo su p85 α	Zheng Y. et al. [49]
miR-449	↓ i livelli di cMET ed induce apoptosi	Buurman R. et al. [50]
miR-125b	Inibisce l'espressione del gene Bcl-2	Zhao A. et al. [51]
miR-138	Downregolato nell'80% degli EC, riduce la sopravvivenza cellulare e la formazione di colonie	Wang W. et al. [52]
miR-637	Blocca il signaling di STAT3	Zhang J.F. et al. [53]
miR-375	Impedisce proliferazione e migrazione; agisce su AEG-1	He X. X. et al. [54]
miR-198	↓ c-MET sia a livello di trascrizione che traduzione	Tan S. et al. [55]
miR-145, miR-199b	↓ nei LGDN fino all'EC conclamato	Gao P. et al. [56]

I microRNA possono fungere anche da innovativi marcatori molecolari prognostici: numerose evidenze scientifiche hanno infatti selezionato una serie di singoli miRNA particolarmente correlati a prognosi infausta, poiché in grado di agire e perturbare pathway molecolari coinvolti nei fenomeni di progressione di malattia, invasione e metastatizzazione. In aggiunta, alcuni gruppi di ricercatori sono stati in grado di selezionare delle vere e proprie firme molecolari di miRNA per

l'identificazione di pazienti predisposti a sviluppare ricorrenza di malattia e metastasi rispetto a pazienti che invece beneficerebbero di una prognosi migliore (Tabella 2.4.2.). Questi risultati appaiono sicuramente importanti, ma necessitano di future validazioni al fine di un possibile utilizzo nella pratica clinica.

Tabella 2.4.2. Singoli miRNA quali potenziali marcatori prognostici identificati nell'EC.

POTENZIALE MARCATORE	RUOLO NELL'EPATOCARCINOMA	REFERENZE BIBLIOGRAFICHE
miR-122	Favorisce l'acquisizione di caratteristiche metastatiche	Braconi C. et al. [37]; Budhu A. et al. [38]; Coulouarn C. et al. [39]; Girard M. et al. [40]
miR-590-5p	Agisce su TGFBR2 aumentando proliferazione cellulare e invasione	Jiang X. et al. [57]
miR-181	↑ beta-catenina; particolarmente upregolato in EC EpCAM positivi	Ji J. et al. [41, 42]
miR-210	Favorisce la metastatizzazione indotta da ipossia	Ying Q. et al. [58]
miR-199b	Bersaglia HIF-1 α ; correla con ridotta sopravvivenza	Wang C. et al. [59]
miR-219-5p	Bersaglia GPC3; correla con ridotta sopravvivenza	Huang N. et al. [60]
miR-135a	Favorisce invasione tumorale	Liu S. et al. [61]
20 miRNA	Identificano pazienti predisposti a sviluppare metastasi	Budhu A. et al. [38]
19 miRNA	Elevati livelli correlano con buona prognosi	Jiang J. et al. [62]
6 miRNA	Predicono ricorrenza di malattia	Han Z. B. et al. [63]
6 miRNA	Aumentata espressione correla con aumento della sopravvivenza	Huang Y. H. et al. [45]
4 miRNA (cluster C19MC)	Predittore di prognosi infausta	Augello C. et al. [64]

3. LA PROGRESSIONE TUMORALE DELL'EPATOCARCINOMA SI INSCRIVE NELLE PRINCIPALI VIE MOLECOLARI COINVOLTE: IPOTESI DI BIOMARCATORI MOLECOLARI ASSOCIATI A RECIDIVA DI MALATTIA

I numerosi studi di espressione genica condotti negli ultimi anni hanno fornito importanti conoscenze molecolari riguardo ai meccanismi e alle molecole attivamente coinvolte nella progressione dell'EC. Per questo motivo riveste notevole importanza utilizzare le informazioni molecolari di cui si è conoscenza per identificare nuovi possibili biomarcatori utili ai fini della quotidiana pratica clinica e in grado di selezionare pazienti potenzialmente predisposti a sviluppare recidiva di malattia.

L'EC può recidivare in due differenti modalità, correlate a prognosi sostanzialmente differente: recidiva per via metastatica o formazione di tumori *de novo*.

La recidiva per via metastatica, dovuta a disseminazione di cellule derivanti dal tumore primitivo, (entro i due anni dal trattamento) è correlata a prognosi particolarmente infausta; la formazione di nuovi tumori intraepatici indipendenti dalla massa primaria (solitamente due anni dopo il trattamento) è un evento causato dall'effetto mutagenico dell'alterato parenchima epatico già sede di un tumore primitivo e, rispetto alla disseminazione metastatica, correlato a prognosi migliore (Figura 3.1.) [65].

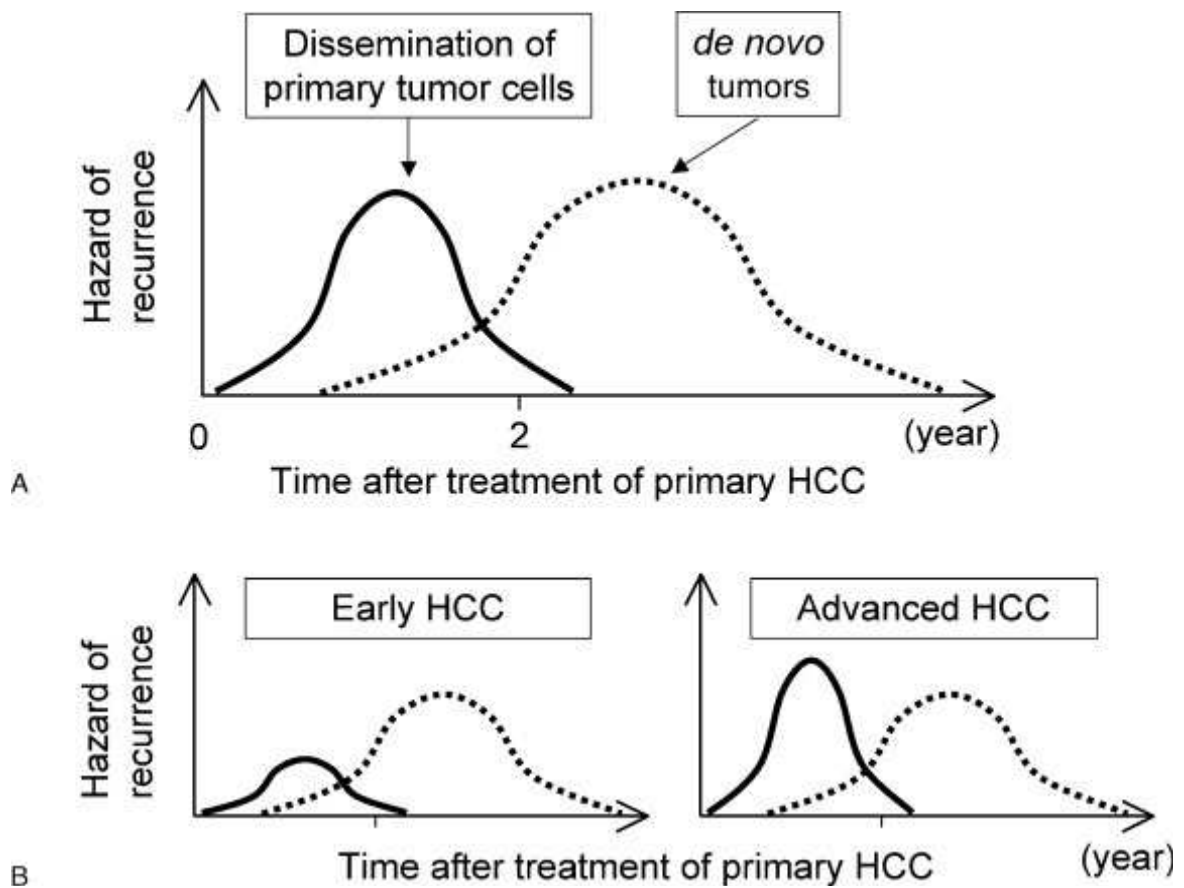


Fig. 3.1. A) Rischio di sviluppare ricorrenza di EC in accord ai due diversi meccanismi di recidiva. B) Rischio di sviluppare ricorrenza di malattia in EC early ed avanzati (La linea continua indica la recidiva di tipo metastatico; la linea tratteggiata indica la formazione di tumori de novo) (Adattata da Y. Hoshida, *Semin. Liver Dis*, 2010).

Negli ultimi anni alcuni lavori scientifici hanno ricercato possibili nuovi biomarcatori in grado di predire il tipo di ricorrenza di malattia in pazienti con EC, sia studiando il tessuto tumorale che il parenchima circostante in cui il tumore si forma. In un recente studio sono state identificate le variabili clinico-patologiche e molecolari statisticamente significative quando associate sia a ricorrenza di malattia generale (Tabella 3.1) che a recidiva precoce (Tabella 3.2).

Tabella 3.1. Analisi statistica univariata e multivariata delle variabili cliniche e molecolari relative a ricorrenza generale di malattia (in grossetto i valori statisticamente significativi) (Adattata da A. Villanueva, Gastroenterology, 2011)

Variables	Univariate analysis				Multivariate analysis			
	n	P value	HR	95% CI	n	P value	HR	95% CI
Origin (Japan)	244	.766	1.05	0.75–1.49				
Male sex	244	.520	1.13	0.78–1.62				
Age >60 y	241	.556	0.91	0.66–1.25				
Etiology, hepatitis C virus	242	.240	1.22	0.88–1.70				
Size >2 cm	244	.471	1.14	0.80–1.63				
Albumin level <3.5 g/L	237	.090	1.49	0.94–2.37				
Bilirubin level >1 mg/dL	240	.341	0.85	0.61–1.19				
Platelet count <100,000/mm ³	240	.423	1.17	0.80–1.72				
AFP level >100 mg/dL	234	.330	0.830	0.57–1.20				
Vascular invasion	239	.321	1.18	0.85–1.65				
Satellites	241	.016	1.70	1.10–2.62	198	.041	1.66	1.02–2.71
Degree of differentiation, moderate or poor	241	.548	1.12	0.77–1.62				
BCLC stage A	244	.509	1.15	0.76–1.76				
Signature of metastatic HCC	244	.383	0.64	0.24–1.74				
G3 signature	244	.011	1.55	1.11–2.16	198	.003	1.75	1.20–2.53
Proliferation class	244	.665	1.07	0.78–1.49				
CK19 signature	244	.971	1.01	0.72–1.41				
CK19 rat signature	244	.828	1.04	0.74–1.47				
Vascular invasion signature	244	.921	0.98	0.66–1.45				
Late TGFB	244	.517	0.88	0.60–1.29				
Cluster A	244	.496	1.12	0.80–1.58				
MET signature	244	.891	1.03	0.66–1.61				
HCC recurrence signature	244	.490	0.88	0.62–1.26				
EpCAM signature	244	.506	0.83	0.49–1.42				
Hepatoblastoma C2	244	.661	0.87	0.47–1.61				
Class S1	244	.883	1.03	0.72–1.47				
Class S2	244	.791	1.06	0.69–1.63				
Cholangiocarcinoma signature	244	.485	0.88	0.64–1.23				
Poor survival signature^a	201	.007	1.67	1.15–2.44	198	.004	1.74	1.19–2.55

^aSignature generated in adjacent nontumoral cirrhotic tissue.

Tabella 3.2. Analisi statistica univariata e multivariata delle variabili cliniche e molecolari relative a ricorrenza precoce (in grossetto i valori statisticamente significativi) (Adattata da A. Villanueva, Gastroenterology, 2011)

Variable	Univariate analysis				Multivariate analysis			
	n	P value	HR	95% CI	n	P value	HR	95% CI
Origin (Japan)	244	.325	1.26	0.80–1.98				
Male sex	244	.522	1.17	0.72–1.92				
Age >60 y	241	.412	0.84	0.54–1.28				
Etiology (hepatitis C virus)	242	.809	0.95	0.62–1.46				
Size >2 cm	244	.037	1.78	1.03–3.06	193	.109	1.62	0.89–2.92
Albumin level <3.5 g/L	237	.085	1.65	0.93–2.94				
Bilirubin level >1 mg/dL	240	.595	1.13	0.73–1.75				
Platelet count <100,000/mm ³	240	.939	1.02	0.61–1.72				
AFP level >100 mg/dL	234	.607	1.13	0.70–1.81				
Vascular invasion	239	.039	1.57	1.02–2.40	193	.950	1.01	0.59–1.73
Satellites	241	.012	1.91	1.15–3.18	193	.041	1.80	1.02–3.18
Degree of differentiation, moderate or poor	241	.059	1.71	0.98–2.99				
BCLC stage A	244	.24	1.46	0.78–2.27				
Signature of metastatic HCC	244	.572	0.67	0.16–2.71				
G3 signature	244	.001	1.99	1.30–3.05	193	.033	1.71	1.04–2.81
Proliferation class	244	.073	1.47	0.96–2.25				
CK19 signature	244	.135	1.39	0.90–2.14				
CK19 rat signature	244	.242	1.30	0.84–2.04				
Vascular invasion signature	244	.38	1.25	0.76–2.04				
Late TGFB	244	.193	1.37	0.85–2.19				
Cluster A	244	.142	1.39	0.90–2.14				
MET signature	244	.865	0.95	0.52–1.74				
HCC recurrence signature	244	.534	0.86	0.52–1.40				
EpCAM signature	244	.247	0.61	0.27–1.41				
Hepatoblastoma C2	244	.889	0.94	0.41–2.16				
Class S1	244	.84	1.05	0.65–1.69				
Class S2	244	.347	1.30	0.75–2.23				
Cholangiocarcinoma signature	244	.441	1.18	0.77–1.81				
Poor survival signature^a	201	.007	1.88	1.18–2.98	193	.006	1.92	1.20–3.06

Note: Boldface indicates variables with statistical significant values ($P < .05$).

^aSignature generated in adjacent nontumoral cirrhotic tissue.

In questo lavoro è stato studiato il profilo genomico sia del tessuto tumorale che del tessuto adiacente al fine di definire la prognosi di pazienti sottoposti ad epatectomia. I risultati ottenuti indicano che l'espressione genica degli stadi iniziali di malattia riflette la potenziale origine del tumore da un progenitore epatocitario, non associato a prognosi infausta.

La predizione di ricorrenza di malattia rappresenta una sfida clinica importante: la duplice modalità attraverso la quale un EC può recidivare dipende sia dall'aggressività del tumore primitivo che dal potenziale carcinogenico presente nel tessuto adiacente. L'aggressività del tumore può essere stimata in base ad alcuni parametri clinici (dimensioni massa, valori di AFP, invasione vascolare, presenza di noduli satelliti), mentre il rischio di sviluppare tumori *de novo* è molto più difficile da definire [66].

In letteratura esiste un ristretto numero di lavori scientifici volti allo studio di firme molecolari in grado di predire lo sviluppo di recidiva: Budhu et al. hanno studiato profili di espressione genica a carico del parenchima del tessuto epatico non tumorale in grado di individuare pazienti potenzialmente suscettibili a sviluppo di metastasi venose intraepatiche. Dalla loro analisi è emersa una specifica firma molecolare costituita da 17 geni principalmente di tipo immunitario/infiammatorio in grado di selezionare in maniera accurata pazienti inclini allo sviluppo di metastasi: è stato osservato che questa categoria di pazienti mostra un profilo citochinico predominante di tipo Th2 (aumento di IL4, IL5, IL8 e IL10) ed una diminuzione della citochine Th1 (IL1A, IL1B, IL2, IFNG, TNF) a dimostrazione che le alterazioni a carico del microambiente tumorale svolgono un ruolo cruciale nella definizione della prognosi del paziente [28].

In un successivo studio è stata proposta un nuovo sistema di classificazione basato sull'invasione microvascolare, capace di predire la prognosi dei pazienti con EC dopo resezione (Tabella 3.3): i parametri statisticamente significati ottenuti riguardano l'invasione della parete vascolare ($p=0.002$) e la distanza del sito di invasione ($p=0.001$). L'analisi multivariata ha identificato nella sola invasione della parete vascolare il parametro indipendente in grado di predire la prognosi del paziente.

Tabella 3.3. Nuovo sistema di classificazione di EC dopo resezione basato sul grado di invasione vascolare (Adattato da S. Roayaie, *Gastroenterology*, 2009).

Class	Extent of vascular invasion	No.	Survival (mo) ^a	Time to recurrence (mo) ^a
A	None	109	87.7 ± 15.7	29.8 ± 7.1
B1	Microscopic invasion with no risk factors	58	72.1 ± 22	27.1 ± 5.1
B2	Microscopic invasion with 1 risk factor	58	36.9 ± 16	19.0 ± 7.7
B3	Microscopic invasion with 2 risk factors	15	8.2 ± 1.2	7.1 ± 1.9
C	Gross invasion	111	12.2 ± 1.9	6.7 ± 0.9

^aMedian ± standard error.

Le alterazioni molecolari che avvengono nel parenchima epatico/cirrotico, in cui la lesione si genera, è risaputo essere in grado di influenzare l'andamento della progressione di malattia e di conseguenza la prognosi del paziente. Si è ipotizzato che fenomeni di ricorrenza tardiva di malattia possano essere causati non tanto dal tumore primitivo quanto piuttosto da una serie di stimoli carcinogenici provenienti dal parenchima cirrotico circostante (definito *field-effect*). A questo proposito Hoshida et al. hanno condotto studi di gene expression profiling confrontando il tessuto tumorale con il rispettivo parenchima adiacente e identificando una precisa firma molecolare costituita da 186 geni espressi nel tessuto cirrotico in grado di modulare la prognosi del paziente [67]. A seconda di quali geni vengano espressi nel tessuto extralesionale sono state caratterizzate due classificazioni molecolari in grado di distinguere una prognosi buona o infausta: i geni identificati come correlati a buona prognosi sono principalmente associati ai processi di funzionalità epatica e includono le proteine plasmatiche C4, C5, C8, C9 e F9 e numerosi enzimi deputati al metabolismo dei farmaci, quali le alcoldeidrogenasi ADH5 e ADH6, l'aldochetoreduccasi AKR1A1 e AKR1D1, l'aldeideidrogenasi ALDH9A1, il citocromo P450 CYP2B6 e le lipasi epatiche (LIPC). Al contrario i geni che correlano con prognosi infausta appartengono ai pathway infiammatori, incluso il signaling legato all'interferone, al pathway di NF- κ B e TNF α ; inoltre è stato dimostrato attraverso esperimenti murini che i geni target di IL6 sono fortemente associati a prognosi sfavorevole [67, 68]. Le firme molecolari identificate evidenziano differenze statisticamente significative nel predire la sopravvivenza del paziente, sottolineando il ruolo fondamentale svolto dal parenchima non tumorale (Figura 3.2.). I risultati ottenuti da questo lavoro mostrano come le forme di ricorrenza precoce siano associate ai parametri clinico-patologici del paziente, mentre le riprese tardive di malattia siano direttamente correlate all'espressione di specifici geni nel parenchima adiacente non tumorale [66].

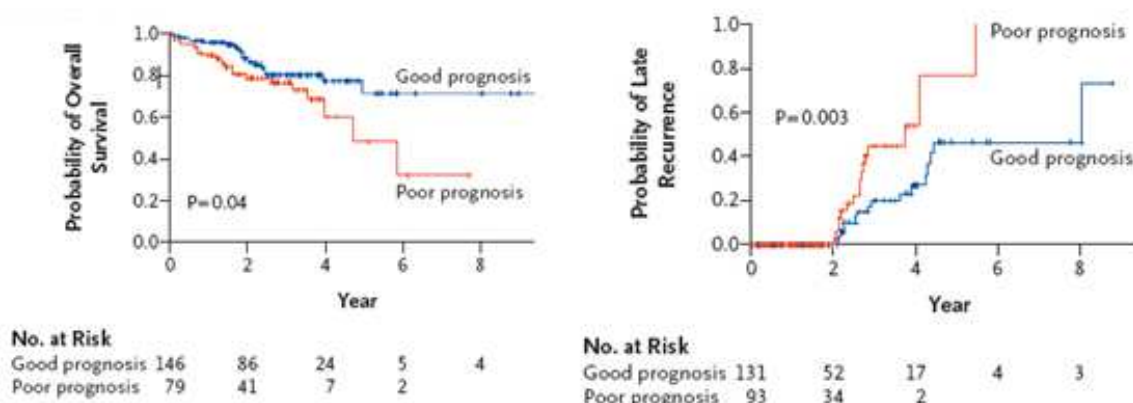
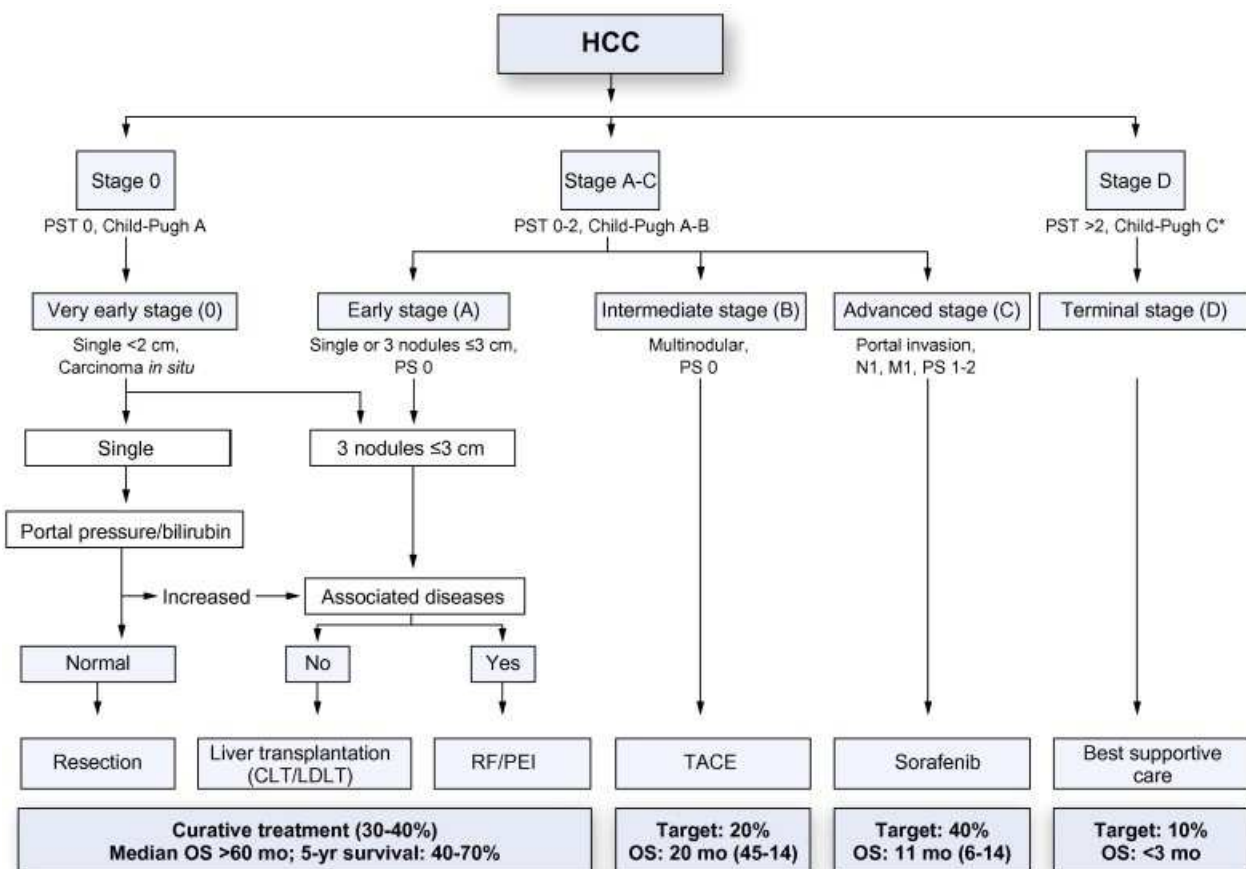


Fig. 3.2. Curve di predizione di sopravvivenza generale (sinistra) e probabilità di ricorrenza di malattia (destra) in relazione alla firma molecolare espressa nel tessuto extralesionale (Adattata da Y. Hoshida, *New Journal of England*, 2008).

4. STADIAZIONE DELL'EPATOCARCINOMA E SUO ATTUALE TRATTAMENTO

Ad oggi il sistema di stadiazione per l'EC maggiormente utilizzato è il sistema BCLC (Barcelona Clinic Liver Cancer) proposto nel 1999 come strumento finalizzato a suddividere in categorie i pazienti suscettibili di trattamento curativo (resezione, trapianto) rispetto a quelli proponibili per il solo trattamento palliativo (Tabella 4.1). Questo sistema categorizza i pazienti unicamente sulla base di parametri grossolani, quali le dimensioni della massa tumorale, il numero di noduli, il Performace Status e la presenza di invasione vascolare. A ciascun gruppo corrisponde un diverso approccio terapeutico: gruppo A, stadio iniziale, candidato a terapia radicale (resezione, trapianto, radiofrequenza); gruppo B e C, stadio intermedio ed avanzato, per i quali non è possibile applicare una terapia curativa, ma candidati a terapia palliativa; gruppo D, pazienti terminali, per i quali è proponibile solo terapia sintomatica. Come conseguenza di ciò è evidente che la scelta terapeutica risulti basata per la maggior parte su parametri non selettivi, dissociandosi completamente dalla complessità molecolare di questa patologia.

Tabella 4.1. Stadiazione dei pazienti secondo i criteri di Barcelona Clinic Liver Cancer (BCLC) (Adattata da EASL-EORTC Clinical Paractice Guideline, 2012)



5. SCOPO DEL LAVORO

Lo scopo di questo lavoro si ascrive a tre distinte sezioni, che presentano come denominatore comune lo studio di nuovi biomarcatori tissutali. L'importanza di identificare e selezionare nuovi marcatori molecolari diagnostici, prognostici e predittivi di risposta ad uno specifico trattamento farmacologico è fondamentale per il supporto della quotidiana pratica clinica.

1. Studio di marcatori molecolari ad impatto traslazionale nella diagnostica del piccolo EC:
 - Analisi immunohistochimica di un nuovo marcatore molecolare (CHC) in una serie omogenea di 86 campioni di EC, attraverso analisi di biopsie epatiche ottenute con ago estremamente sottile (20-21 gauge) al fine di testare l'accuratezza diagnostica dell'utilizzo di un pannello di 4 marcatori immunohistochimici.
2. Studio di marcatori molecolari prognostici ad impatto traslazionale nella predizione della recidiva dell'EC:
 - Validazione, attraverso analisi immunohistochimica, del ruolo prognostico svolto dal marcatore molecolare (CYP1A2) nel parenchima epatico extralesionale (epatitico/cirrotico) in una casistica di 54 pazienti con EC HCV positivo.
3. Studio di marcatori molecolari ad impatto traslazionale sulla predizione terapeutica di pazienti con EC avanzato trattati con Sorafenib:
 - Analisi del profilo di espressione genica di 670 miRNA maturi in una casistica di 25 pazienti con tumore in stadio avanzato.
 - Selezione di miRNA potenzialmente predittivi di risposta al trattamento farmacologico e loro validazione in una seconda casistica indipendente, costituita da 56 pazienti con EC avanzato.
 - Identificazione di un parametro di selezione di pazienti sensibili al trattamento con Sorafenib, potenzialmente utile nella pratica clinica.

6. MARCATORI MOLECOLARI AD IMPATTO TRASLAZIONALE NELLA DIAGNOSTICA DEL PICCOLO EPATOCARCINOMA

6.1 Introduzione

Nella diagnosi di epatocarcinoma, l'esame di eccellenza utilizzato è quello radiologico; grazie alla TAC è possibile rilevare più del 90% degli EC > 2cm. Quando invece le caratteristiche radiologiche dei noduli epatici in cirrosi si presentano atipiche, le linee guida della AASLD (American Association for the Study of Liver Diseases) consigliano l'utilizzo della biopsia epatica [69]. Ad oggi vi è la necessità di selezionare nuovi marcatori immunocitochimici sufficientemente sensibili e specifici nella diagnosi di EC su biopsia epatica.

Numerosi singoli biomarcatori sono stati validati al fine di supportare la diagnosi di EC: tra essi figurano AFP e DCP (marcatori sierici) e CD34, p53, PCNA, Ki-67, CK7 (marcatori tissutali). AFP e DCP marcatori quantificati a livello sierico risultano non sufficientemente sensibili nell'identificare un early EC [70]; CD34 è comunemente utilizzato come marcatore vascolare e la sua espressione tende ad aumentare a partire dalle forme displastiche fino all'EC conclamato [71]; PCNA e ki-67 sono marcatori di proliferazione cellulare i cui valori risultano progressivamente aumentati con il progredire della malattia così come l'immunoreattività di p53 è più facilmente riscontrabile in tumori avanzati e poco differenziati [72], mentre CK7 viene utilizzato per identificare l'invasione stromale del tumore [73].

In letteratura sono riportati studi di firme molecolari relative all'ambito diagnostico: Paradis et al. hanno analizzato, attraverso Real-Time PCR, l'espressione di 219 geni con lo scopo di selezionare un indice molecolare diagnostico [74]; un altro studio si è focalizzato sull'analisi dei profili trascrizionali di 50 lesioni nodulari comprendenti noduli displastici a basso grado, ad alto grado ed EC primari (tutti HBV positivi) giungendo alla conclusione che esiste un set di 240 geni in grado di classificare accuratamente il tumore in base al grado istologico [75]; nello studio del 2006 del gruppo di Llovet, condotto su campioni di noduli displastici ed EC HCV positivi, è stata identificata una serie di 12 geni differenzialmente espressi nell'EC precoce rispetto alla forma premaligna, che include i geni TERT, GPC3, gankirina, survivina, TOP2A, LYVE1, E-caderina, IGF3, PDGFRA, TGFA, ciclina D1 e HGF [72]. Nel 2007, Wurmbach et al. hanno identificato una firma molecolare in grado di descrivere accuratamente la progressione della malattia ad ogni suo stadio: sono stati individuati infatti 8 geni differenzialmente espressi tra fegato sano e cirrosi, 24 tra cirrosi e displasia, 93 tra displasia e tumore iniziale e 9 tra tumore iniziale e forma avanzata [76].

Dall'insieme di tutti gli studi di espressione genica condotti con differenti approcci metodologici per l'identificazione di marcatori molecolari sufficientemente sensibili e specifici nella diagnosi di EC, sono emerse quattro proteine di importante significato biologico, rivelatesi utili dal punto di vista diagnostico: glypican 3 (GPC3), glutamina sintetasi (GS), heat shock protein 70 (HSP70) e la catena pesante della clatrina (CHC).

Glypican 3. Glypican 3 (GPC3) è un membro della famiglia dei proteoglicani eparan-solfato di membrana, vincolati alla superficie della cellula attraverso un'ancora di glicosilfosfatidilinositolo. È stato dimostrato che GPC3 funge da regolatore negativo della proliferazione cellulare e regolatore positivo dell'apoptosi in alcuni tipi di cellule tumorali [77]: non è sorprendente quindi riscontrare una downregolazione di GPC3 in tumori di differente origine, in cui l'espressione della proteina viene persa in seguito ad ipermetilazione del promotore [78]. Dal momento che GPC3 è altamente espresso nel fegato embrionale e nell'intestino e silenziato nei corrispondenti tessuti adulti, si è supposto che questa proteina agisca a livello di questi organi come proteina oncofetale, che non gioca un ruolo specifico nella progressione tumorale, ma piuttosto viene utilizzata come marcatore di neoplasia. A seconda del tessuto in cui GPC3 è presente, si visualizzano diversi pattern di espressione in relazione alla progressione tumorale: in tessuti in cui GPC3 è espresso nell'organo adulto, la sua espressione viene ridotta durante la cancerogenesi, promuovendo un fenotipo cellulare di malignità; in tumori che originano da tessuti che esprimono GPC3 solo a livello embrionale, la proteina tende ad essere riespressa nell'organo adulto durante la trasformazione maligna [78].

Glypican 3 è in grado di stimolare nelle cellule di EC il pathway di Wnt, attivando il signaling canonico: Filmus et al. sostengono infatti che la capacità stimolatoria di questa proteina dipenda dalla sua abilità nel facilitare e stabilizzare l'interazione tra Wnt e il suo recettore Frizzled (Figura 6.1.1.) [79]; di conseguenza nelle cellule tumorali in cui il pathway di Wnt gioca un ruolo fondamentale nella regolazione della proliferazione cellulare, l'overespressione di GPC3 promuove la crescita neoplastica [80]. Un secondo meccanismo attraverso il quale GPC3 media l'oncogenesi consiste nella stimolazione della fosforilazione di IGF-1R e nell'attivazione della cascata del segnale intracellulare delle MAP chinasi. (Figura 6.1.2.) [81].

Glypican 3 è stato introdotto per la prima volta come possibile marcatore tumorale in seguito all'osservazione di elevati livelli di questa proteina nel siero di pazienti con EC (non presente invece nel siero di donatori sani o pazienti con malattie epatiche benigne), rivelandosi un marcatore più sensibile e specifico rispetto l'alfafetoproteina nell'identificare EC inferiori a 3 cm [82]; i successivi studi immunocistochimici hanno dimostrato che GPC3 risulta espresso nel 70-90% degli EC nell'adulto e nel 100% degli epatoblastomi infantili [83], evidenziando maggiore sensibilità rispetto Hep Par 1 nell'identificazione di tumori scarsamente differenziati [84, 85].

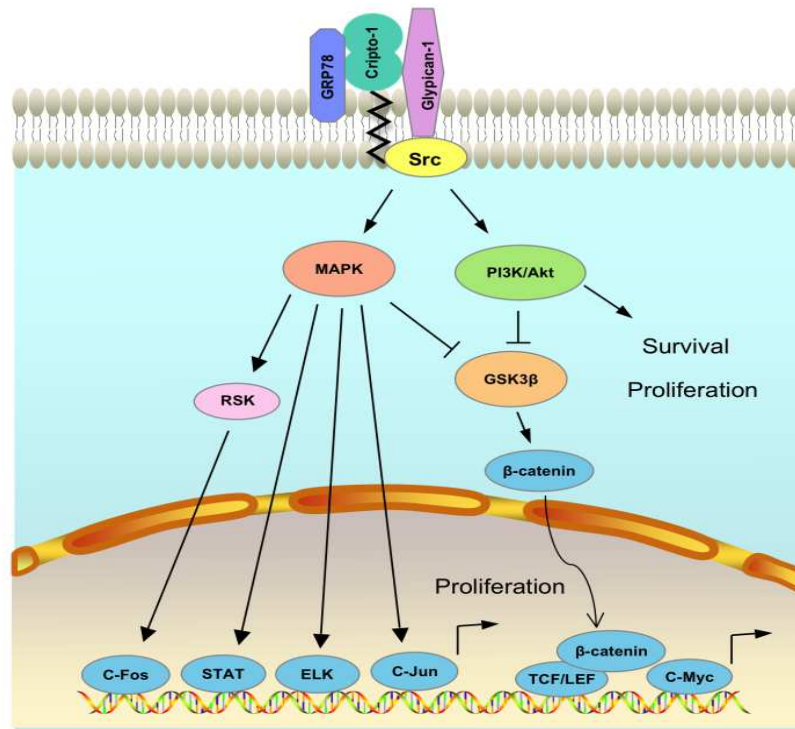


Figura 6.1.1. Pathway molecolare intracellulare attivato dai membri della famiglia dei Glypican (Adattato da N. Pereira Castro, "Embryonic stem cells – Basic Biology to bioengineering", 2011).

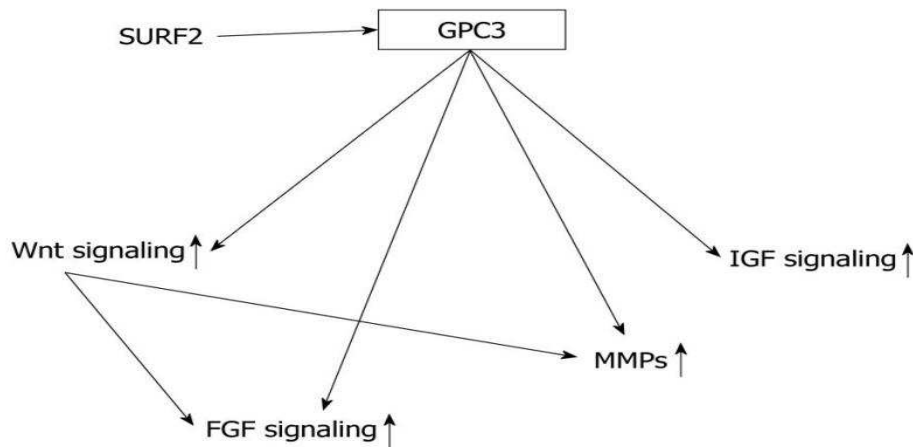


Figura 6.1.2. Pathway molecolari direttamente attivati da GPC3 a supporto dell'epatocarcinogenesi (Adattata da N. Akutsu, World Journal of Gastroenterology, 2010).

Glutamina sintetasi. La glutamina sintetasi (GS) è un enzima che catalizza a livello epatico la sintesi della glutamina, la maggior fonte di energia per le cellule tumorali, a partire da glutammato e ammoniaca (Figura 6.1.3.) Essa agisce in particolar modo negli epatociti localizzati

intorno alle vene terminali epatiche, come conseguenza dell'interazione cellula-cellula e cellula-matrice che avviene durante lo sviluppo [86-88]. La GS svolge un ruolo cruciale anche nella detossificazione dell'ammoniaca, nel bilancio dell'azoto e nella regolazione del pH a livello epatico.

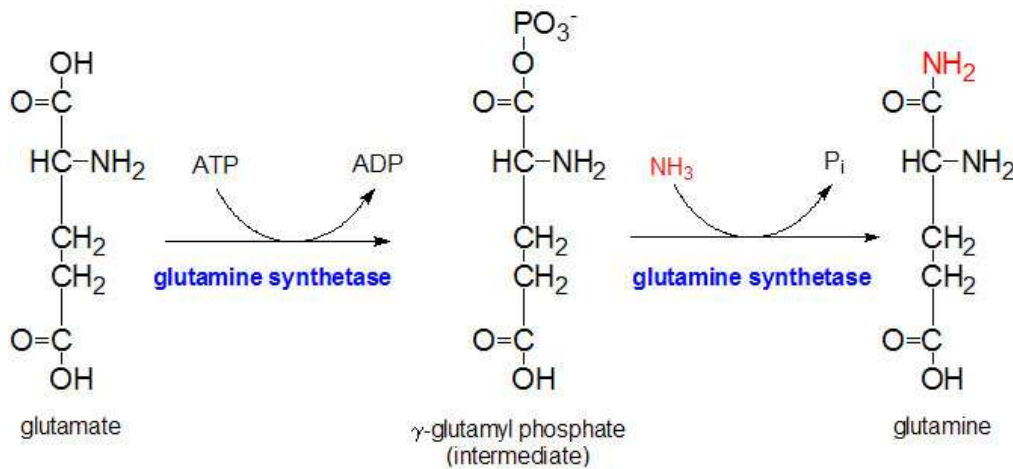


Figura 6.1.3. Sintesi della glutammina mediata da GS a partire da glutammato e ammoniaca (Adattata da M.W. King, "Nitrogen metabolism and the urea cycle", 2009).

In passato diversi studi hanno confermato che la concentrazione sierica della glutammina tende a diminuire in pazienti con tumore in fase avanzata [89-91]: nonostante ciò le cellule di EC che esprimono la GS sono in grado di acquisire un vantaggio selettivo di crescita anche in assenza di glutammina, assumendo una crescita nel tessuto definita nodule in nodule [92]. Dal momento che le cellule tumorali positive per GS mostrano un vantaggio di crescita rispetto alle negative, l'espressione di GS potrebbe fungere da marcatore prognostico, permettendo l'identificazione di pazienti ad alto rischio di sviluppare ripresa di malattia in seguito ad epatectomia [93].

Dal punto di vista molecolare un aspetto molto importante è rappresentato dal legame di GS con il pathway di Wnt: più nel dettaglio, GS risulta essere il target di regolazione della beta-catenina nucleare. Austinat et al. hanno identificato differenti mutazioni a carico di beta-catenina, capaci di attivare la trascrizione dei geni bersaglio, tra cui GS [94].

Heat shock protein 70. La heat shock protein 70 (HSP70), appartiene ad una classe di proteine implicate nella tumorigenesi, nella regolazione del ciclo cellulare e dell'apoptosi, overespresso in un gran numero di tumori ed utili nel supportare la loro diagnosi [95]. Alcune delle più importanti funzioni svolte nella cellula dalle heat shock proteins consistono nel trasporto di proteine all'interno dei diversi compartimenti intracellulari, nel controllo di proteine regolatorie e nel refolding di proteine foldate in maniera scorretta. Il contributo fornito da queste proteine nel processo di cancerogenesi potrebbe essere attribuito proprio alle loro molteplici attività di chaperones molecolari. La capacità di prevenire l'apoptosi indotta da farmaci antitumorali o da stimoli di altra

natura, spiega inoltre come queste proteine possano limitare l'efficacia terapeutica in pazienti oncologici. Un'elevata espressione di heat shock proteins, in particolare HSP27 e HSP70, è associata a prognosi infausta, metastasi e resistenza alla chemio o radioterapia in pazienti con tumore alla mammella, endometrio e stomaco [96].

La figura 6.1.4 mostra le principali funzioni in cui è coinvolta HSP70 nella regolazione del pathway apoptotico.

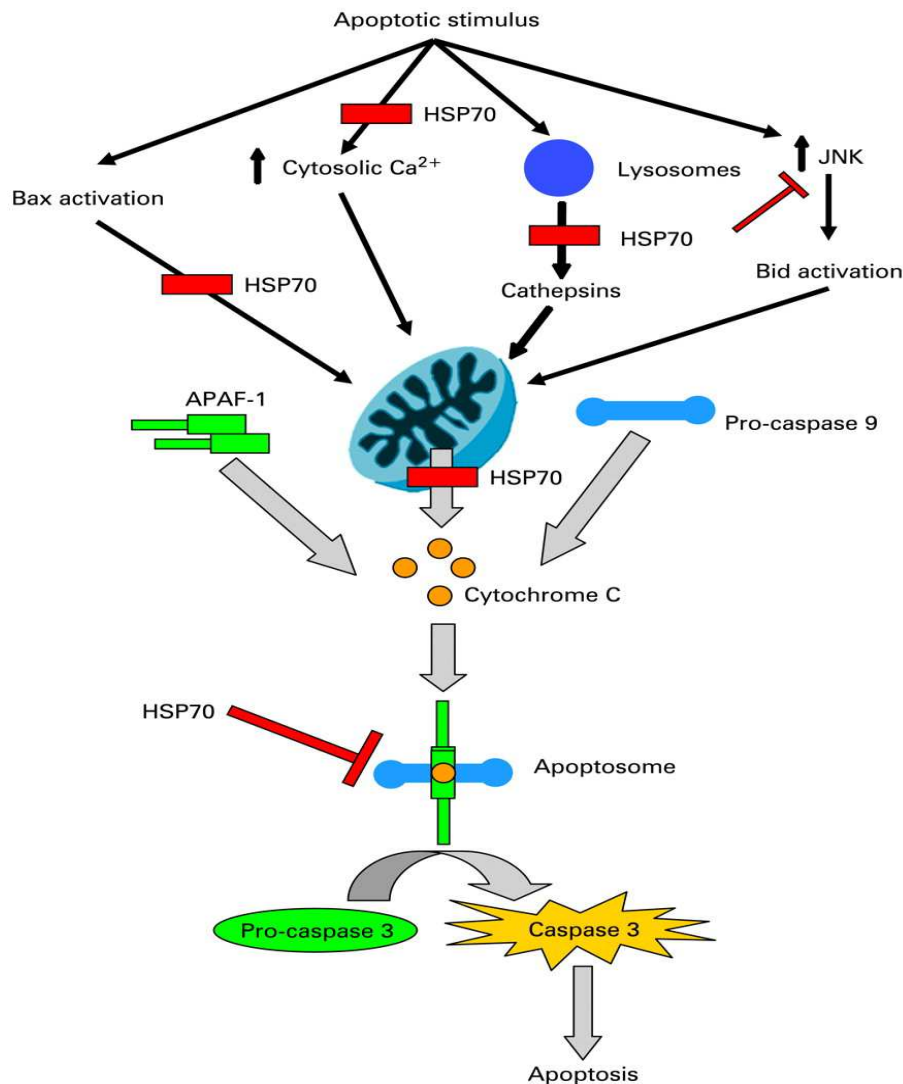


Figura 6.1.4. Siti di azione di HSP70 a livello del pathway intrinseco di apoptosi (Adattato da V. Dudeja, Gut, 2009).

Catena pesante della Clatrina. La clatrina (CHC) è una proteina citosolica, reclutata a livello della membrana plasmatica, che funziona come trasportatore di vescicole, richiesta per l'internalizzazione di alcuni recettori indotti da ligando, tra cui EGFR, ma anche per l'assorbimento

di nutrienti e per il sorting delle proteine coinvolte nel network del trans-Golgi durante la fase di secrezione (Figura 6.1.5.) [97, 98].

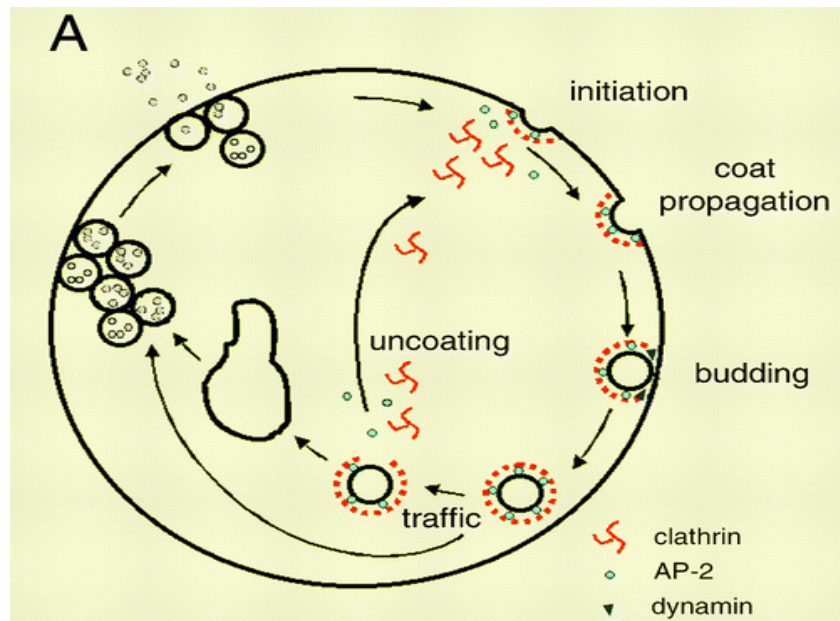


Figura 6.1.5. Ruolo svolto da CHC nella formazione di vescicole rivestite (Adattata da T. Kirchhausen, *Annual Review of Biochemistry*, 2000).

Nel 2005 è stato dimostrato che la clatrina è una proteina essenziale per la mitosi, in quanto stabilizza le fibre del fuso mitotico, permettendo il corretto movimento dei cromosomi: dal momento che la deregolazione del processo mitotico determina instabilità cromosomica, condizione utilizzata come marcatore tumorale, lo studio di questa proteina in relazione al fenomeno mitotico potrebbe aiutare nella comprensione delle alterazioni cromosomiche riscontrabili in numerosi tumori [99]. Recentemente è stato dimostrato che CHC non è presente esclusivamente nel citoplasma della cellula, ma anche nel nucleo, dove viene richiesta per la transattivazione dei geni target di p53: CHC lega sequenze specifiche presenti nel promotore di p53, stabilizzando l'interazione p53-p300 e promuovendo la trascrizione p53 mediata (Figura 6.1.6.) [100]. E' stato successivamente rilevato che p53 è in grado di interagire con CHC anche a livello citoplasmatico, regolando l'endocitosi mediata da clatrina, in seguito al legame con essa [101]. E' stato inoltre sperimentato che l'espressione del gene che codifica per CHC è essenziale per la sopravvivenza cellulare: la sua completa deplezione infatti perturba l'attività dei pathway di Akt e delle MAP chinasi, inducendo apoptosi [102].

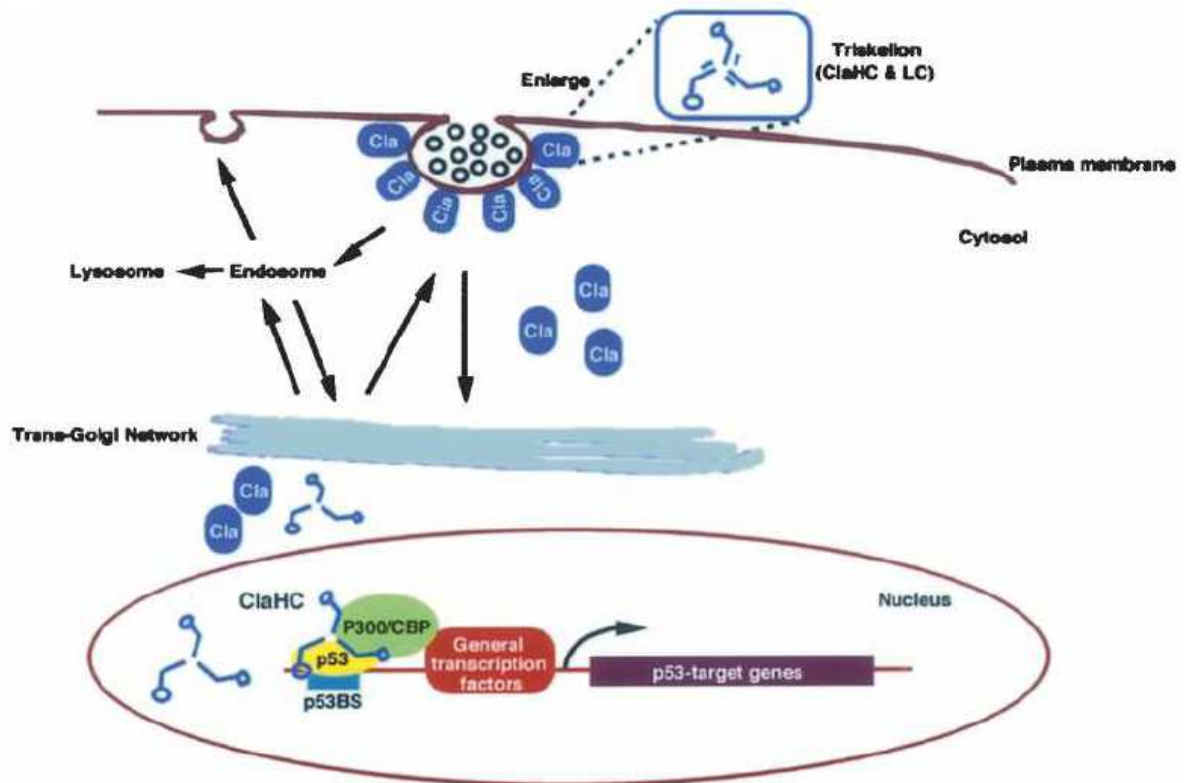


Figura 6.1.6. Ruolo di CHC nella trascrizione p53-mediata (Adattata da M. Enari, *Gene & Development*, 2012).

Nel 2008 il gruppo di Seimiya ha condotto uno studio proteomico su tessuti di EC e controparte sana, al fine di identificare nuovi biomarcatori, utili nella diagnosi di EC. Dall'analisi immunostochimica è emerso che CHC risulta espressa a livello della membrana plasmatica e nella faccia citoplasmatica degli organelli intracellulari, mentre non è presente nel tessuto circostante non tumorale: l'overespressione della clatrina è stata confermata attraverso immunoblotting ribadendo che la maggior parte degli EC mostra un'intensa espressione della proteina [103]. Nonostante l'overespressione di CHC non sia stata riportata in nessun altro lavoro condotto su tumori primari umani, la fusione del gene CHC con altri geni, quali ALK e TFE3, è stata documentata in linfomi B a grandi cellule, in adenocarcinomi renali pediatrici e in tumori infiammatori di tipo miofibroblastico [104-107]. I risultati ottenuti da Seimiya et al. evidenziano che CHC potrebbe svolgere un importante ruolo nel processo di tumorigenesi e l'upregolazione osservata potrebbe essere causa di una scorretta segregazione cromosomica, che contribuirebbe allo sviluppo dell'EC [103].

L'applicabilità dell'utilizzo di queste quattro proteine in ambito clinico diagnostico è stata comprovata da due lavori pubblicati nel 2007 e nel 2009: un iniziale studio condotto su campioni di EC chirurgici [108] e un successivo studio di validazione, effettuato su biopsie tumorali [109],

hanno confermato che, l'utilizzo di un pannello di tre marcatori (GPC3, GS e HSP70) potrebbe essere utile nella pratica clinica, per discriminare EC piccoli e ben differenziati da noduli displastici ad alto grado. Recentemente le linee guida internazionali della AASLD (American Association for the Study of Liver Diseases) hanno approvato l'utilizzo di questi marcatori molecolari a scopo diagnostico nella pratica clinica mondiale [110]. Nonostante ciò si ritiene necessario identificare un quarto marcatore da utilizzare su piccole biopsie, per discriminare in maniera migliore e più accurata EC early da noduli displastici ad alto grado.

6.2 Materiali e metodi

6.2.1 La casistica

Lo studio è stato condotto su una casistica costituita da 86 pazienti con EC generatosi su background cirrotico, operati presso l'Ospedale Policlinico di Milano e l'Ospedale di Melegnano, in un periodo di tempo compreso tra il 2005 e il 2009. La diagnosi di EC è stata effettuata in accordo con le linee guida internazionali AASLD. In Tabella 6.2.1.1 sono riportate le caratteristiche clinico patologiche dei pazienti. I pazienti sono stati suddivisi in due gruppi in base alla grandezza del tumore: piccoli EC ≤ 2 cm (n = 47) ed EC > 2 cm (n = 39). Tessuto extralesionale sano è disponibile solo per 30 casi; in aggiunta sono stati raccolti presso l'Istituto Clinico Humanitas di Rozzano 15 casi di noduli displastici a basso grado (LGDN) e 16 casi di noduli displastici ad alto grado (HGDN), tutti definiti non maligni perché durante il follow-up di almeno 12 mesi non sono evoluti in EC.

Tabella 6.2.1.1 Caratteristiche clinico-patologiche dei pazienti

	EC ≤ 2cm (n = 47)	EC > 2 cm (n = 39)
Età media (range)	70.5 (40-85)	71.5 (24-86)
Sesso (%)		
Maschi	30 (63.8)	29 (74.4)
Femmine	17 (36.2)	10 (25.6)
Dimensioni tumore (range)	1.6 (1-2)	4.2 (2.1-10)
Grado (%)		
G1	30 (63.8)	17 (43.6)
G2-G3	17 (36.2)	22 (56.4)
Eziologia (%)		
Virus epatite C	36 (76.7)	23 (59.0)
Virus epatite B	2 (4.2)	5 (12.8)
Virus epatite C + B	1 (2.1)	0
Alcool	3 (6.4)	4 (10.3)
Altro	5 (10.6)	7 (17.9)

6.2.2 Analisi immunoistochimica

Per ogni caso selezionato, fissato in formalina neutra tamponata (Medita) e successivamente incluso in blocchetti di paraffina (Kendal Paraplast), vengono allestite 5 sezioni da 2 µm ciascuna, sulle quali effettuare le analisi immunoistochimiche per i quattro anticorpi, secondo protocollo.

Protocollo

- Deparaffinare con xilolo, due volte per 10 minuti e reidratare le sezioni in scala alcolica, con immersioni sequenziali di 5 minuti ciascuna in etanolo 100% per due volte, etanolo 90% ed etanolo 70%;
- Pretrattare il tessuto con W-CAP Tampone Citrato pH=6 10 mM (Bio-Optica) in bagnetto a 98°C per 20 minuti;
- Lasciar raffreddare poi lavare 2 volte con PBS 1X 0,05% Tween-20 per 3 minuti;
- Trattare i vetrini al buio per 20 minuti con H₂O₂ al 3% preparata a partire da una concentrazione iniziale di H₂O₂ al 30% (Sigma), allo scopo di bloccare le perossidasi endogene;

- Lavare 2 volte con PBS 1X 0,05% Tween-20 per 3 minuti;
- Circondare la sezione di tessuto mediante PAP PEN (DIAPATH) in modo che i reagenti che verranno successivamente depositati restino confinati in una precisa area del vetrino;
- Incubare 1 ora con 100-200 µl di anticorpo primario a concentrazioni descritte in Tabella 6.2.2.1;
- Lavare 2 volte con PBS 1X 0,05% Tween-20 per 3 minuti;
- Incubare 30 minuti con 100-200 µl di anticorpo secondario EnVision (DAKO);
- Lavare 2 volte con PBS 1X 0,05% Tween-20 per 3 minuti;
- Incubare 5 minuti con il substrato DAB al buio (Liquid DAB + Substrate Chromogen System, DakoCytomation). Essendo la DAB un substrato fotosensibile viene preparata al momento diluendo 20 µl di DAB in 1 ml del suo Buffer;
- Lavare in H₂O distillata e contro-colorare i nuclei per 1 minuto in ematossilina (DAKO) diluita in H₂O 1 : 5;
- Sciacquare in acqua corrente e disidratare mediante immersioni sequenziali di 2 minuti in etanolo al 70%, in etanolo al 90% e due volte in etanolo al 100%
- Immergere per 2 volte ciascuna di 2 minuti i vetrini in xilolo e montare con coprioggetto 25 X 50 mm (Pasquali) deponendo su esso una goccia di montante oleoso (Micromount, DIAPATH), cercando di eliminare le eventuali bolle d'aria che possono formarsi attraverso una leggera pressione esercitata sul coprioggetto.

Le colorazioni sono state eseguite con Immunocoloratore (Dako) e per ognuna di esse è stato inserito un idoneo controllo positivo, per confermare l'avvenuta reazione.

Tabella 6.2.2.1. Informazioni tecniche relative agli anticorpi utilizzati in questo studio

	Source	Code	Origin	Dilution	Pretreatment	Detection System
HSP70	Santa Cruz Biotech	SC-34	Mouse	1:100	Citrate	Envision (Dako Cytomation)
GPC3	Biomosaics	B0025	Mouse	1:100	Citrate	Envision (Dako Cytomation)
GS	Chemicon	MAB302	Mouse	1:500	Citrate	Envision (Dako Cytomation)
CHC	BD Biosciences Pharmigen	610500	Mouse	1:200	Citrate	Envision (Dako Cytomation)

Prima della colorazione dell'intera casistica con i quattro anticorpi differenti, è stata effettuata una colorazione preliminare solo per CHC su 15 lesioni neoplastiche (8 EC e 7 HDGN) e 5 lesioni iperplastiche (iperplasia nodulare focale), tutte rimosse chirurgicamente.

6.2.3 Valutazione dei preparati istologici

Al termine dell'indagine immunoistochimica si analizzano i vetrini per valutare i livelli di positività della reazione.

Campioni immunocolorati con anticorpi per HSP70 e GPC3 sono definiti positivi quando almeno il 10% delle cellule maligne mostra immunoreattività di membrana o citoplasmatica (per GPC3) o nucleo-citoplasmatica (HSP70), mentre l'immunoreattività per GS è definita positiva quando almeno il 50% delle cellule tumorali mostra colorazione nucleo-citoplasmatica. Per quanto riguarda CHC, la sua positività è stimata quando almeno il 10% degli epatociti maligni mostra un'overespressione citoplasmatica dell'antigene.

Per confermare la specificità del pannello di quattro marcatori sono stati immunocolorati con i quattro anticorpi una serie di casi di cirrosi adiacenti al tumore (n = 30) e alcune biopsie di noduli displastici a basso (n = 15) e ad alto grado (n = 16), tutti rappresentanti controlli negativi.

Infine sono state valutate e confrontate la sensibilità, specificità ed accuratezza (in due gruppi: EC \leq 2 cm *versus* EC $>$ 2 cm), del pannello di 3 marcatori (senza CHC) e 4 marcatori (con CHC), al fine di verificare se l'aggiunta di un quarto marcatore sia in grado di determinare un guadagno in potenzialità diagnostica.

6.2.4 Analisi statistica

Nell'analisi statistica i dati sono stati riportati sottoforma di numeri, percentuali, medie o range, quando necessario. Per i calcoli relativi a sensibilità, specificità ed accuratezza è stato utilizzato il programma statistico Stata 10 (<http://www.stata.com>). La sensibilità è stata calcolata come la proporzione di campioni positivi identificati dal test come immunoreattivi; la specificità è data dalla proporzione di casi negativi risultati non immunocolorati dal test (al fine di escludere i falsi positivi). Per accuratezza si intende la quantità di diagnosi corrette, ovvero la somma dei veri positivi e dei veri negativi, sul numero totale dei campioni.

Per eliminare l'eventuale variabilità nella valutazione dei preparati istologici effettuata da diversi osservatori, i risultati ottenuti sono stati normalizzati attraverso il valore di coefficiente K di Cohen (>0.80).

6.3 Risultati

6.3.1 Valutazione preliminare dell'espressione immunoistochimica di CHC

Da una prima analisi morfologica dei campioni è emerso che l'immunoreattività di CHC è visualizzabile a livello delle cellule endoteliali e sinusoidali del parenchima cirrotico e dei noduli displastici e assente a livello epatocitario; anche cellule infiammatorie dei setti fibrosi e i dotti biliari a livello della superficie luminale risultano immunocolorati (Fig. 6.3.1.1).

Da uno studio preliminare condotto su 8 EC e 7 HGDN è stata individuata immunoreattività a livello epatocitario per CHC in un unico caso di HGDN, mentre negli EC gli epatociti maligni appaiono CHC positivi con colorazione diffusa ($>50\%$ delle cellule) in 5 di 8 casi (62.5%) e con colorazione focale (10-50 % delle cellule) in 3 casi (37.5%). L'immunoreattività di CHC è rappresentata da un'overespressione di antigene rispetto al parenchima circostante non maligno. Nessun caso di iperplasia nodulare focale ha evidenziato positività per CHC.

La valutazione dell'immunoreattività di CHC è risultata in accordo tra i due patologi, junior ($k = 0.86$) e senior ($k = 0.92$).

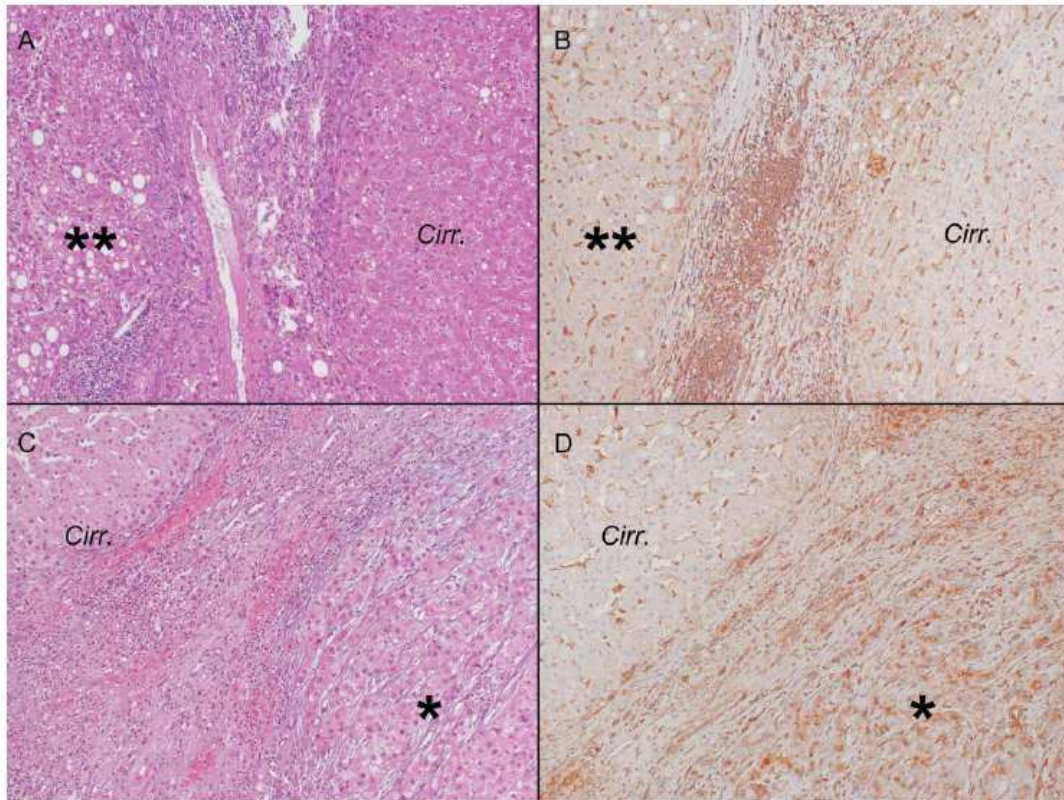


Figura 6.3.1.1 Esempio di un caso di HGDN segnato con due asterischi (A,B) e di un EC ben differenziato marcato con singolo asterisco (C,D), colorato con ematossilina eosina (A,C) e con CHC (B,D), più rispettiva controparte cirrotica (Cirr.). Gli epatociti cirrotici e i noduli displastici risultano immunonegativi, mentre gli epatociti tumorali overesprimono CHC se confrontati con il parenchima cirrotico circostante (ingrandimento 10X).

6.3.2. Valutazione dell'espressione di GPC3, GS, HSP70 e CHC in epatocarcinomi di piccole e grandi dimensioni

In figura 6.3.2.1. è possibile osservare un esempio di immunoreattività per i 4 marcatori in una biopsia di EC e relativa controparte cirrotica.

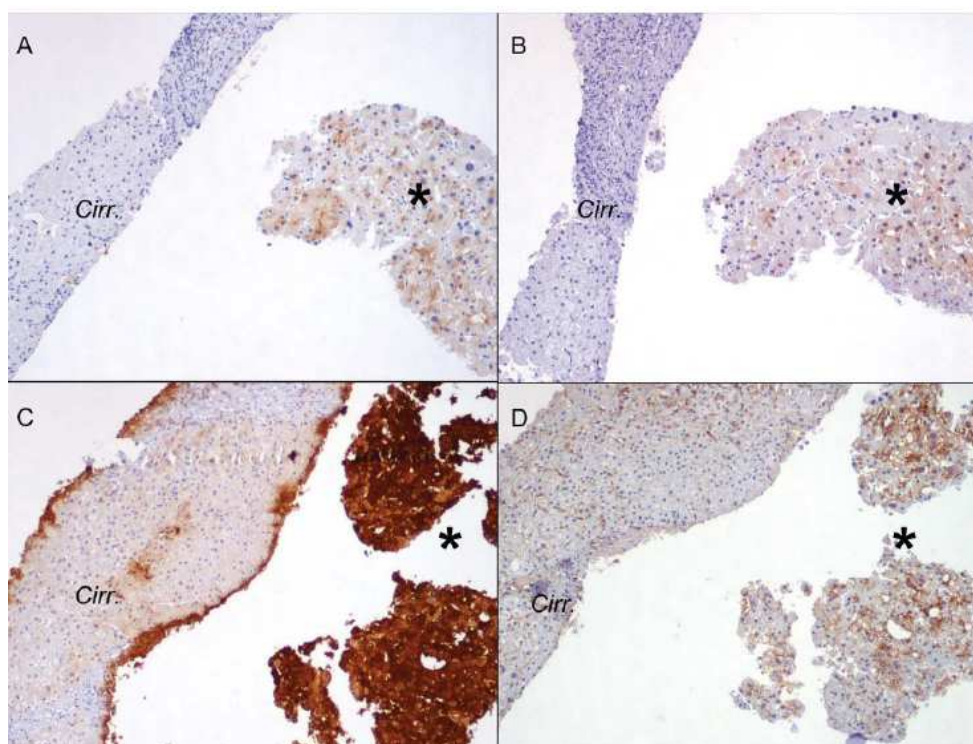


Figura 6.3.2.1 Esempio di colorazione di un caso di EC (segnato con asterisco) con controparte cirrotica (Cirr.) colorato con GPC3 (A), HSP70 (B), GS (C) e CHC (D). E' possibile riconoscere overespressione dei 4 marcatori negli epatociti maligni rispetto al parenchima sano circostante (ingrandimento 5X).

Sei casi di 47 EC \leq 2 cm (12.8%) e 1 caso di 39 EC $>$ 2 cm (2%) sono risultati negativi per tutti i marcatori e sono rappresentativi di tumori ben differenziati G1. Anche le cirrosi risultano per la maggior parte dei casi totalmente negative (25 casi di 30, 83.3%); solo 5 casi di 20 (16%) risultano focalmente positivi per un marcatore (4 casi positivi per CHC e 1 caso per GPC3), ma mai per due marcatori. Uno di 15 LGDN (6.7%) è risultato positivo per CHC; 3 HGDN di 16 (18.8%) sono risultati positivi per un marcatore (2 casi per CHC e un caso per GPC3), ma mai contemporaneamente positivi per due marcatori (Tabella 6.3.2.1).

Tabella 6.3.2.1. Risultati della colorazione dell'intera casistica con il pannello di 4 marcatori (Adattata da L. Di Tommaso, *Hepatology*, 2011).

Positive Marker	Nonmalignant Nodule (n = 61)			HCC \leq 2 cm (n = 47)		HCC $>$ 2 cm (n = 39)	
	Cirrhosis (n = 30)	LGDN (n = 15)	HGDN (n = 16)	G1 (n = 30)	G2/G3 (n = 17)	G1 (n = 17)	G2/G3 (n = 22)
All four	0	0	0	4	5	4	8
At least three	0	0	0	8	11	9	14
At least two	0	0	0	15	15	15	21
At least one	5	1	3	24	17	16	22
HSP70	0	0	0	9	9	9	17
GPC3	1	0	1	10	12	10	12
GS	0	0	0	14	13	10	15
CHC	4	1	2	21	14	15	21

Dall'analisi dei dati riportati in Tabella 6.3.2.1. emerge una specificità del 100% nel riconoscere un EC quando almeno 2 marcatori risultano positivi. L'utilizzo di un pannello 4M (grazie all'aggiunta della CHC) rispetto al classico pannello di 3M si dimostra particolarmente utile nel rilevare EC piccoli da EC > 2 cm, quando i marcatori risultano positivi.

In particolare, grazie all'utilizzo di un marcatore aggiuntivo si ottiene un aumento della sensibilità nell'identificare un EC piccolo rispetto a quella ottenuta da un pannello di 3M (63.8% versus 46.8%) e di conseguenza un incremento dell'accuratezza diagnostica (84.3% versus 76.9%) (Tabella 6.3.2.2).

L'accuratezza diagnostica è stata anche valutata in relazione alla distinzione di un EC iniziale G1 da un HGDN. A questo proposito HGDN che non sono evoluti in EC durante il follow-up dei pazienti sono stati utilizzati come controlli negativi. La specificità assoluta si ottiene quando almeno due marcatori risultano positivi, con una sensibilità del 50% per 4M rispetto 33.3% del pannello di 3M ed una accuratezza del 67.4% con 4M rispetto 56.5% con 3M (Tabella 6.3.2.3).

Tabella 6.3.2.2. Sensibilità, specificità ed accuratezza diagnostica in piccoli EC con 3M e 4M. (Adattata da L. Di Tommaso, Hepatology, 2011).

Positive Marker	Nonmalignant Nodule (n = 61)	Malignant Nodule ≤ 2 cm (n = 47)	Sensitivity (%)	Specificity (%)	Accuracy (%)	Malignant Nodule > 2 cm (n = 39)	Sensitivity (%)	Specificity (%)	Accuracy (%)
4M panel									
All four	0	9	19.1	100.0	64.8	12	30.8	100.0	73.0
At least three	0	19	40.4	100.0	74.1	23	59.0	100.0	84.0
At least two	0	30	63.8	100.0	84.3	36	92.3	100.0	97.0
At least one	9	41	87.2	85.2	86.1	38	97.4	85.2	90.0
3M panel									
All three	0	10	21.3	100.0	65.7	12	30.8	100.0	73.0
At least two	0	22	46.8	100.0	76.9	25	64.1	100.0	86.0
At least one	2	32	68.1	96.7	84.3	36	92.3	96.7	95.0

Tabella 6.3.2.3. Accuratezza diagnostica nel distinguere un EC di piccole dimensioni da un HGDN utilizzando il pannello 4M e 3M. (Adattata da L. Di Tommaso, Hepatology, 2011).

Positive Marker	HGDN (n = 16)	G1 HCC ≤ 2 cm (n = 30)	Sensitivity (%)	Specificity (%)	Accuracy (%)
4M panel					
All four	0	4	13.3	100.0	43.5
At least three	0	8	26.7	100.0	52.2
At least two	0	15	50.0	100.0	67.4
At least one	3	24	80.0	81.3	80.4
3M panel					
All three	0	4	13.3	100.0	43.5
At least two	0	10	33.3	100.0	56.5
At least one	1	16	53.3	93.8	67.4

Infine, è stata valutata l'utilità del pannello di 4M nel distinguere gli EC in base al grado (G1 versus G2/G3) e in base alle dimensioni (piccoli EC versus EC > 2 cm). E' stato osservato (Tabella 6.3.2.4) che quando la colorazione è positiva per almeno due marcatori su quattro si ottiene una

buona accuratezza nel riconoscere sia EC piccoli che maggiori di 2 cm di grado G2/G3 (93.9% e 97.4% rispettivamente) ed EC > 2 cm di grado G1 (93.9%). Al contrario l'accuratezza diagnostica di piccoli EC G1 decresce di valore (67.4%) poiché la sensibilità di riconoscere un EC si abbassa drasticamente al 50%, nonostante la specificità resti assoluta. Nello stesso gruppo di EC piccoli G1 si ottiene una maggiore sensibilità (80%) ed accuratezza (80.4%) quando si considera la positività per un unico marcatore, a discapito però della specificità che decresce al 81.3%.

Tabella 6.3.2.4 Confronto tra positività per uno o due marcatori nel discriminare EC in base al grado differenziativo ed alle dimensioni (Adattata da L. Di Tommaso, *Hepatology*, 2011).

		At Least Two Positive Markers			At Least One Positive Marker		
		Sensitivity (%)	Specificity (%)	Accuracy (%)	Sensitivity (%)	Specificity (%)	Accuracy (%)
G1 HCC	≤2 cm	50.0	100	67.4	80.0	81.3	80.4
	>2 cm	88.2	100	93.9	94.1	81.3	87.9
G2/G3 HCC	≤2 cm	88.2	100	93.9	100	81.3	90.9
	>2 cm	95.5	100	97.4	100	81.3	92.1

6.4 Discussione

Numerosi lavori scientifici, focalizzati sullo studio dei processi caratterizzanti l'epatocarcinogenesi umana [72, 74-76, 108, 111], sono stati condotti al fine di identificare marcatori molecolari tissutali che in associazione ai classici criteri morfologici di malignità, possano essere di ausilio nella pratica clinica quotidiana. Alcuni di essi sono stati recentemente validati e il loro uso diagnostico è suggerito dalle linee guida della AASLD [110]. L'utilizzo di questi nuovi biomarcatori è particolarmente valido nel discriminare forme di EC early da noduli displastici ad alto grado: questi tumori, piccoli e difficili da riconoscere radiologicamente, risultano nello stesso tempo i più facilmente trattabili e curabili.

La prima parte di questo studio è stata condotta su una casistica omogenea di piccoli EC (≤ 2 cm) ed una di controllo costituita da EC >2 cm, su biopsia ottenuta con ago estremamente sottile (20-21 gauge), al fine di verificare se l'aggiunta di un quarto marcatore (CHC) al pannello di tre marcatori precedentemente validato [108, 109], aumenti l'accuratezza diagnostica relativa al riconoscimento di EC piccoli.

La CHC è stata scelta in quanto marcatore endoteliale overespresso nel citoplasma degli epatociti maligni: nel lavoro di Seimiya et al. [103] è stato confermato, attraverso analisi di immunoblotting, che molti EC mostrano una forte e focale immunoreattività a livello di citoplasma e membrane plasmatiche. L'overespressione di questa proteina non è stata riportata in alcun altro tumore umano primitivo, ma è stato dimostrato che il suo gene è in grado di fondersi con i geni che

codificano per le proteine ALK e TFE3, ampiamente documentati nei linfomi B a grandi cellule, negli adenocarcinomi renali infantili e nei tumori miofibroblastici di tipo infiammatorio [104-107].

Analogamente a quanto riportato da Seimiya anche nel nostro studio la maggior parte degli epatociti non maligni è risultata negativa per CHC o debolmente positiva, concludendo che l'overespressione di CHC può essere valutata in maniera ottimale, soprattutto se confrontata con il parenchima adiacente non tumorale. Nello stesso articolo Seimiya analizza l'utilizzo di CHC in associazione a GPC3, su campioni chirurgici di EC, al fine di attestarne la validità diagnostica. Ad oggi ancora nessun lavoro scientifico ha validato l'utilizzo di CHC su campioni bioptici: a questo proposito il nostro lavoro ha verificato l'utilizzo di questa proteina in aggiunta ad un pannello di 3 marcatori già precedentemente validato (GPC3, GS, HSP70) dimostrando come la performance ottenuta dall'utilizzo di 4M sia significativamente superiore rispetto a quella derivante dal pannello di 3M. Quando almeno due marcatori risultano positivi l'accuratezza diagnostica in EC piccoli e >2 cm è pari a 97% e 84.3% rispettivamente (4M) rispetto a 86% e 76.9% (3M). Inoltre per quanto riguarda gli EC piccoli, l'aggiunta della CHC determina un aumento della sensibilità diagnostica da 46.8% a 63.8% (Tabella 6.3.2.2).

L'osservazione interessante che è emersa riguarda gli EC > 2cm, in quanto nonostante il materiale bioptico venga prelevato con aghi molto sottili (20-21 gauge), l'accuratezza aumenta con l'utilizzo del nuovo pannello di marcatori (97%) rispetto al pannello 3M (78.4%) e risulta anche aumentata rispetto ad una serie analoga di EC bioptici ottenuti con aghi di calibro maggiore (16-18 gauge) [109]. Questo significa che l'aggiunta di CHC non solo controbilancia l'eventuale perdita di sensibilità dovuta all'utilizzo di aghi fini e il prelevamento di minor materiale biologico, ma addirittura incrementa l'accuratezza diagnostica.

Tenendo in considerazione non solo le dimensioni della massa tumorale, ma soprattutto il grado differenziativo del tumore, è stato dimostrato che l'accuratezza rimane molto soddisfacente (>90%) per EC di grado G2-G3 (Tabella 6.3.2.4). Per quanto riguarda invece tumori ben differenziati (G1), l'accuratezza rimane più che apprezzabile per tumori >2 cm (93.9%), mentre diminuisce drasticamente nei piccoli EC (67.4%) (Tabelle 6.3.2.3, 6.3.2.4). Inoltre, nonostante si utilizzi il pannello 4M la sensibilità di riconoscere EC piccoli ben differenziati, quando almeno 2 marcatori risultano positivi, è pari solo al 50%: il 20% (6 di 30 casi) di questi ultimi mostra negatività per tutti i marcatori (Tabella 6.3.2.1). La spiegazione più attendibile di questo fenomeno consiste nel definire la vera natura di questa forma tumorale ben differenziata, in quanto EC G1 >2 cm ed EC G1 ≤ 2 cm non rappresentano la stessa malattia: recentemente è stata identificata e riconosciuta a livello mondiale una nuova classificazione di EC ≤ 2 cm G1, definito very early EC [112]. Questa nuova entità rappresenta la forma più precoce esistente di EC e dal punto di vista morfologico rappresenta un link tra la displasia ad alto grado e l'EC progredito. In questo lavoro sosteniamo

che una frazione dei casi di EC ≤ 2 cm G1 sia rappresentativa della forma very early EC. La differenza tra un nodulo HGDN ed un early EC è estremamente difficile da definire su una biopsia epatica, in quanto spesso le caratteristiche di malignità, quali spessore uniforme della disposizione cellulare, prominente formazione pseudoghiandolare e perdita della reticolina, spesso sono assenti nell'early EC. Anche l'invasione vascolare è difficile da riconoscere in una forma iniziale di tumore, così come l'invasione stromale che discrimina una forma early da un HGDN [84]. Un'equivoca diagnosi di piccolo EC può determinare delle implicazioni cliniche severe, in quanto questa forma precoce di neoplasia ha un'elevata possibilità di cura e permette inoltre di scegliere la terapia più adeguata, come la resezione o l'ablazione. A questo proposito, l'identificazione e la validazione a livello clinico di nuovi biomarcatori tissutali assume estrema importanza e necessita di sempre maggior interesse da parte dei ricercatori.

In conclusione, i nostri risultati suggeriscono che EC piccoli G1 includono un sottogruppo di EC very early caratterizzati da un fenotipo molecolare relativamente silente, accompagnato da una graduale e progressiva acquisizione dei marcatori da noi analizzati. L'utilizzo del pannello di 4 marcatori, con l'aggiunta di CHC, supporta e facilita il riconoscimento sia di piccoli che grandi EC, anche su tessuto relativamente esiguo come quello bioptico [113].

7. MARCATORI MOLECOLARI PROGNOSTICI AD IMPATTO TRASLAZIONALE NELLA PREDIZIONE DELLA RECIDIVA DELL'EPATOCARCINOMA

7.1 Introduzione

Negli ultimi anni, lo studio del parenchima extralesionale ha acquisito notevole importanza al fine di chiarire le alterazioni molecolari caratterizzanti il tessuto circostante alla neoplasia per identificare possibili marcatori utili a scopo prognostico; è stato dimostrato infatti che tumori avanzati tendono a recidivare rapidamente dopo resezione rispetto a tumori agli stadi iniziali, che solitamente mostrano ripresa di malattia dopo oltre due anni dall'intervento chirurgico. Si è ipotizzato che fenomeni di ricorrenza tardiva di malattia possano essere causati non tanto dal tumore primitivo quanto piuttosto da una serie di stimoli carcinogenici provenienti dal parenchima cirrotico circostante [67] (vedi capitolo 3).

La predizione della ricorrenza di malattia è uno strumento utile per definire in maniera ottimale l'andamento della prognosi del paziente: con questa intenzione Tanaka et al., attraverso studi di gene expression profiling, hanno studiato il profilo di espressione genica del tessuto tumorale e non tumorale in pazienti con ricaduta di malattia in seguito ad epatectomia. Da questo lavoro è emerso che il citocromo CYP1A2 rappresenta un ottimo marcatore per identificare pazienti a rischio di ricaduta post operatoria: diminuiti livelli di espressione nel parenchima epatitico o cirrotico circostante (>2 fold change) sono fortemente associati a rapida ripresa di malattia. Da questo studio nasce l'interesse di indagare in maniera più dettagliata il ruolo svolto da CYP1A2 nel parenchima epatico, in relazione alla generazione di tumori *de novo* [114].

Nella patogenesi delle infezioni virali indotte da HCV un ruolo importante è svolto dal danno epatico mediato dai processi immunitari e dalla citotossicità e stress ossidativi che si generano in seguito ai prodotti virali rilasciati nelle cellule dell'ospite [115]; da ciò consegue che l'aumentato turnover cellulare dovuto agli stimoli infiammatori e ossidativi potrebbe facilitare l'accumulo di alterazioni genetiche ed epigenetiche, che potrebbero determinare l'evoluzione del tessuto in EC [116]. L'infezione virale induce la sintesi di varie citochine, tra cui IL1, IL6, TNF α , interferon- γ che generano specie reattive dell'ossigeno (ROS), attivando i pathway di stress ossidativi, con conseguente diminuzione dei livelli di espressione degli enzimi epatici preposti a metabolizzare i farmaci [117]: Barker et al. hanno riportato che CYP1A2 viene downregolato dalla presenza di stress ossidativo intracellulare [118]. CYP1A2 è il citocromo maggiormente implicato a livello epatico nel metabolismo e detossificazione dei farmaci e nella sintesi del colesterolo [119]; i suoi livelli di espressione correlati a queste funzioni, rappresentano uno specifico marcatore di danno epatico di tipo ossidativo. In letteratura è stato descritto che la diminuzione dei livelli di CYP1A2 si

mostra significativamente correlata con la progressione dello stato fibrotico e con il grado di infiammazione in pazienti con infezioni croniche da HCV [120].

Dall'importante dato ad impatto prognostico ottenuto da Tanaka et al. riguardo il ruolo svolto da CYP1A2 noi ipotizziamo che la riduzione dell'espressione di tale citocromo nel parenchima epatico, durante il processo di stress ossidativo, renda il tessuto più suscettibile a sviluppare recidiva precoce o tardiva in termini di *de novo* carcinogenesi. L'importanza della deregolazione dei citocromi a livello epatico quali fattori di predisposizione a sviluppo di ricorrenza di malattia è stata evidenziata anche nel lavoro di Hoshida et al.: alcuni membri della famiglia dei citocromi sono stati evidenziati come deregolati in differenti firme molecolari (CYP3A7, CYBA, CYBB, CYP1B1, CYB5A, CYP3A7, CYP2C9, CYP2J2, CYP21A2, CYP27A1, CYB5A, CYB5A, CYP2B6), ma tra questi non figura CYP1A2 [67]. In ragione di questa evidenza il nostro interesse è ancora più marcato nel chiarire il possibile ruolo svolto da CYP1A2 nella predizione della ricorrenza di malattia epatica.

7.2 Materiali e metodi

7.2.1 La casistica

Lo studio è stato condotto su una casistica di 54 pazienti HCV positivi con EC, operati presso gli ospedali Istituto Clinico Humanitas, Rozzano (Mi), Regional Institute of Gastroenterology and Hepatology di Cluj-Napoca (Romania) e Hôpital Pellegrin di Bordeaux (Francia), in un periodo di tempo compreso tra il 2005 e il 2010. I pazienti sono stati divisi in due gruppi a seconda del background di malattia epatica presente ovvero 24 pazienti con EC con fibrosi avanzata senza cirrosi (Metavir F3) e 30 pazienti con EC con cirrosi conclamata (Metavir F4). In tabella 7.2.1.1. sono riportate le caratteristiche clinico-patologiche dei pazienti. L'intervento chirurgico è stato disposto solo per pazienti con conservazione di sufficiente funzionalità epatica, mentre sono stati scartati dallo studio pazienti con score di Child-Pugh C, in quanto indice di malattia avanzata e controindicato per interventi di epatectomia. Inoltre, la presenza di invasione vascolare macroscopica e di metastasi extraepatiche sono stati ritenuti parametri da escludere, poiché fortemente correlati con prognosi avversa. Il follow-up di ogni paziente è stato aggiornato ogni 3 mesi in base alla valutazione concomitante di valori di AFP sierici ed indagini di medicina nucleare.

Tabella 7.2.1.1 Caratteristiche clinico-patologiche dei pazienti.

	Casistica n=54
Età media (range)	67 (42-80)
Sesso (%)	
Maschi	38 (70)
Femmine	16 (30)
Parenchima circostante al tumore (%)	
Epatite cronica	24 (45)
Cirrosi	30 (55)
BCLC (%)	
0-A	34 (63)
B	20 (37)
AFP (%)	
<40ng/ml	33 (61)
>40ng/ml	21 (39)
Numero di noduli (%)	
Uninodulare	31 (57)
Multinodulare	23 (43)
Dimensioni tumore (%)	
≤ 2cm	9 (17)
> 2cm	45 (83)
Grado (%)	
G1	11 (20)
G2-G3	43 (80)
Angioinvasione (%)	
Assente	33 (61)
Presente	21 (39)
Margini di resezione (%)	
Negativo	44 (81)
Positivo	10 (19)

7.2.2 Analisi immunoistochimica

Per ogni caso selezionato, fissato in formalina neutra tamponata (Medita) e successivamente incluso in blocchetti di paraffina (Kendal Paraplast), vengono allestite sezioni da 2 µm ciascuna, sulle quali effettuare l'analisi immunoistochimica. Il tessuto non neoplastico è stato valutato in un'area distante dal tumore al fine di eliminare alterazioni dovuti a fenomeni infiammatori e

fibrotici causati dalla prossimità sito tumorale stesso. Il grado di fibrosi è stato definito in accordo con il sistema Metavir. Il protocollo per l'analisi immunohistochimica di CYP1A2 è il seguente:

- Deparaffinare con xilolo, due volte per 10 minuti e reidratare le sezioni in scala alcolica, con immersioni sequenziali di 5 minuti ciascuna in etanolo 100% per due volte, etanolo 90% ed etanolo 70%;
- Pretrattare il tessuto con W-CAP Tampone Citrato 6 10 mM (Bio-Optica) in bagnetto a 98°C per 20 minuti;
- Lasciar raffreddare poi lavare 2 volte con PBS 1X 0,05% Tween-20 per 3 minuti;
- Trattare i vetrini al buio per 20 minuti con H₂O₂ al 3% preparata a partire da una concentrazione iniziale di H₂O₂ al 30% (Sigma), allo scopo di bloccare le perossidasi endogene;
- Lavare 2 volte con PBS 1X 0,05% Tween-20 per 3 minuti;
- Circondare la sezione di tessuto mediante PAP PEN (DIAPATH) in modo che i reagenti che verranno successivamente depositati restino confinati in una precisa area del vetrino;
- Bloccare i siti aspecifici con 100-200 µl di Background Sniper (MACH1 Universal HRP-Polymer Detection kit, Biocare Medical) e successivamente scrollare il vetrino;
- Incubare 1 ora con 100-200 µl di anticorpo primario CYP1A2 1:500 (CYP1A2 Santu Cruz Biotechnology #sc-53614)
- Lavare 2 volte con PBS 1X 0,05% Tween-20 per 3 minuti;
- Incubare 15 minuti con 100-200 µl di Mouse Probe (MACH1 Universal HRP-Polymer Detection kit, Biocare Medical);
- Lavare 2 volte con PBS 1X 0,05% Tween-20 per 3 minuti;
- Incubare 30 minuti con 100-200 µl di anticorpo secondario MACH1 (MACH1 Universal HRP-Polymer Detection kit, Biocare Medical);
- Lavare 2 volte con PBS 1X 0,05% Tween-20 per 3 minuti;
- Incubare 5 minuti con il substrato DAB al buio (Liquid DAB + Substrate Chromogen System, DakoCytomation). Essendo la DAB un substrato fotosensibile viene preparata al momento diluendo 20 µl di DAB in 1 ml del suo Buffer;
- Lavare in H₂O distillata e contro-colorare i nuclei per 1 minuto in ematossilina (DAKO) diluita in H₂O 1 : 5;

- Sciacquare in acqua corrente e disidratare mediante immersioni sequenziali di 2 minuti in etanolo al 70%, in etanolo al 90% e due volte in etanolo al 100%
- Immergere per 2 volte ciascuna di 2 minuti i vetrini in xilolo e montare con coprioggetto 25 X 50 mm (Pasquali) deponendo su esso una goccia di montante oleoso (Micromount, DIAPATH), cercando di eliminare le eventuali bolle d'aria che possono formarsi attraverso una leggera pressione esercitata sul coprioggetto.

Le colorazioni sono state eseguite con Immunocoloratore (Dako) e per ognuna di esse è stato inserito un idoneo controllo positivo, per confermare l'avvenuta reazione.

7.2.3 Valutazione dei preparati istologici

Al termine dell'indagine immunohistochimica è stata valutata l'immunoreattività di CYP1A2 nei citoplasmi degli epatociti non tumorali: la Tabella 7.2.3.1. riporta i parametri di valutazione dei preparati; nella Figura 7.2.3.1. è osservabile un esempio di colorazione di un caso con iperespressione ed uno con ipoespressione di CYP1A2 nel tessuto extralesionale.

Tabella 7.2.3.1. Valutazione dell'analisi immunohistochimica di CYP1A2.

	VALUTAZIONE
% CELLULE IMMUNOREATTIVE	
< 25%	0 punti = negativo
> 25%	1 punto = positivo
INTENSITA' REAZIONE	
1+/2+	0 punti = debole
3+	1 punto = intensa
SCORE FINALE (Immunoreattività + intensità)	PUNTI=0-1 → NON OVERESPRESSO PUNTI=2 → OVERESPRESSO

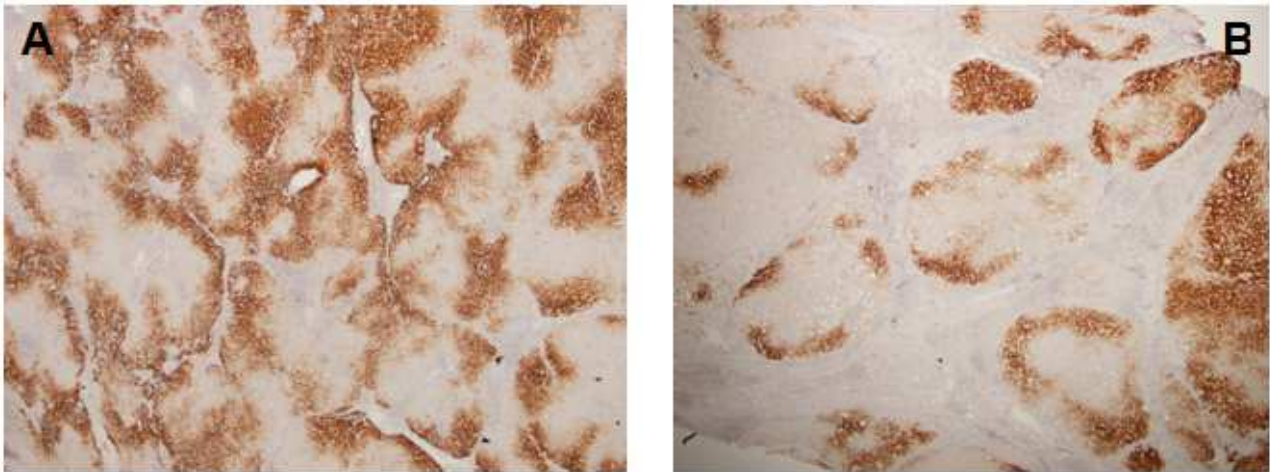


Fig. 7.2.3.1. Esempi di colorazioni con anticorpo anti-CYP1A2 su diversi campioni epatici: A) fibrosi avanzata con iperespressione di CYP1A2 (ingrandimento 5X); B) noduli cirrotici ipoesprimenti la proteina (ingrandimento 5X).

7.2.4 Analisi statistica

Nell'analisi statistica i dati sono stati riportati sottoforma di numeri, percentuali, medie o range, quando necessario. Grazie al modello statistico di Cox è stata effettuata un'analisi univariata dei parametri associati alla ricorrenza di malattia. Per aumentare il potere dell'analisi univariata sono stati analizzati i parametri quantitativi (età, dimensioni, grado di steatosi, valori di AFP prima dell'intervento chirurgico e al momento della ricorrenza) come parametri dicotomici e sottoposti ad analisi multivariata.

Le curve di sopravvivenza dei pazienti sono state stimate secondo il metodo di Kaplan-Meier e i dati ottenuti sono stati comparati tra i due gruppi attraverso il log-rank test. Un valore di p value <0.05 è stato considerato statisticamente significativo nell'analisi statistica, effettuata grazie al programma SPSS version 17.0.

7.3 Risultati

Dall'analisi immunoistochimica condotta su una casistica totale di 54 paziente è emerso che il 37% di essi (20 di 54) presenta overespressione di CYP1A2.

Il tempo medio di follow-up è risultato di 23.88 mesi (range 2-73 mesi) e nessun paziente è stato perso al follow up. La frequenza totale di ricorrenza di malattia è simile tra i due gruppi di pazienti: 62,5% in pazienti con EC F3 e 66,33% in pazienti con EC F4. Come atteso, la frequenza mediana

di ricorrenza di malattia (RFS) è migliore in pazienti con EC F3 32,05 mesi (range 6-73) rispetto a pazienti con EC F4 17,61 mesi (range 2-44) (Figura 7.3.1.).

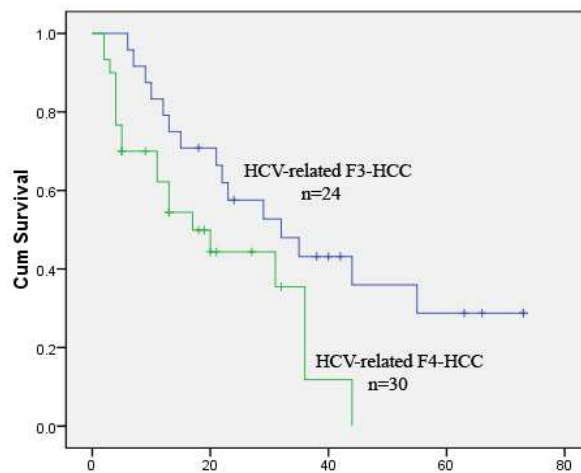


Fig. 7.3.1. Curva di Kaplan-Meier che mostrano l'andamento della RFS in relazione all'espressione alla natura morfologica del tessuto extratumorale.

Dall'analisi univariata condotta sull'intera casistica sono emersi tre parametri significativamente associati ad una migliore RFS, ovvero la presenza di tumori inferiori a 3 cm di diametro ($p=0.045$), di parenchima epatico di tipo F3 (0.04) e di overespressione di CYP1A2 ($p=0.002$) (Tabella 7.3.1.). La successiva analisi multivariata ha identificato l'overespressione di CYP1A2 come fattore prognostico indipendente di prolungata RFS (HR, 0.363; 95% CI, 0.165-0.798; $p=0.012$) (Tabella 7.3.2.).

Tabella 7.3.1. Analisi univariata per l'identificazione di variabili correlate alla sopravvivenza libera da ricorrenza (RFS)

Variabili	HR (95% CI)	p value
Parametri clinici		
Età (<70 anni / ≥70 anni)	0.779 (0.392-1.547)	0.476
Sesso (Maschi vs Femmine)	0.849 (0.381-1.888)	0.688
Stadio BCLC, (0-A / B)	0.575 (0.289-1.144)	0.115
AFP, ng/mL, (<40 / ≥40)	0.592 (0.286-1.223)	0.157
Caratteristiche patologiche		
N° lesioni (uninodulare / multinodulare)	0.717 (0.361-1.397)	0.322
Dimensioni tumore (<3cm/ ≥3cm)	0.462 (0.217-0.985)	0.045
Grado (early-HCC+G1 / G2+G3)	0.398 (0.139-1.138)	0.085
Invasione microvascolare (assente / presente)	1.166 (0.581-2.339)	0.665
Margini di resezione (negativi / positivi)	0.524 (0.212-1.296)	0.162
Parenchima epatico (epatite F3 / cirrosi)	0.473 (0.231-0.967)	0.040
CYP _{1A2} (overespresso / non overespresso)	0.302 (0.140-0.647)	0.002

Tabella 7.3.2. Analisi multivariata per l'identificazione di variabili significativamente correlate alla RFS.

Variabili	HR (95% CI)	p value
Dimensioni tumore (<3cm/ ≥3cm)	0.732 (0.314-1.710)	0.472
Parenchima epatico (epatite F3 / cirrosi)	0.522 (0.247-1.104)	0.089
CYP _{1A2} (overespresso / non overespresso)	0.363 (0.165-0.798)	0.012

Graficamente si può osservare (Figura 7.3.2.) come pazienti che mostrano overespressione di CYP1A2 nel tessuto extralesionale presentino una RFS più prolungata rispetto a pazienti con bassa espressione della proteina.

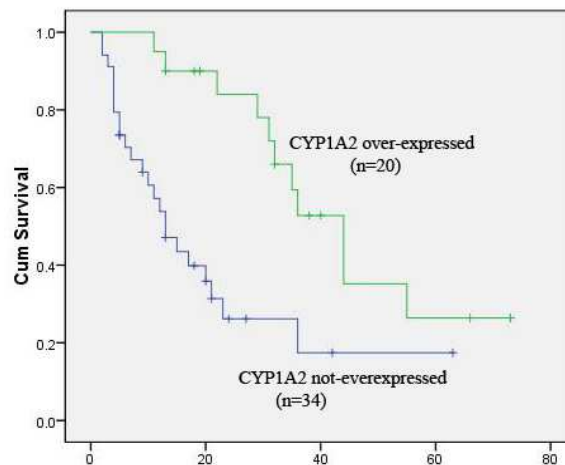


Fig. 7.3.2. Curva di Kaplan-Meier che esamina la RFS in relazione all'espressione di CYP1A2.

7.4 Discussione

La predizione della ricorrenza di malattia in pazienti sottoposti ad intervento chirurgico rappresenta attualmente un'importante sfida clinica: la modalità con cui si manifesta la ricorrenza di malattia dipende sia dall'aggressività del tumore che dalle sostanze cancerogene prodotte e rilasciate dal tessuto circostante [66]. L'aggressività tumorale è principalmente definita da informazioni cliniche (tra cui grandezza della massa e valori di AFP) e patologiche (tra cui invasione vascolare e presenza di noduli satelliti); al contrario il rischio di sviluppare un tumore *de novo* è un parametro molto più difficile da definire. Nell'ultima decade numerosi gruppi di ricerca hanno focalizzato la loro attenzione sullo studio di particolari firme molecolari in grado di definire specifici pathway intracellulari fortemente implicati nell'epatocarcinogenesi e signaling molecolari capaci di incidere sull'andamento della malattia e fornire informazioni sulla prognosi del paziente. La quantità e la natura delle diverse firme molecolari identificate nel corso di questi ultimi anni ha però generato una certa confusione nel comprendere quali di esse abbiano realmente rilevanza prognostica: in aggiunta, il dato innovativo che emerge da alcuni lavori fa riferimento all'analisi molecolare dei geni espressi nel tessuto adiacente non tumorale [66]. In un importante lavoro pubblicato su *The New England Journal of Medicine* è stata identificata una ben distinta firma molecolare che riflette le alterazioni geniche presenti all'interno del tessuto non tumorale, definita "field effect": è stato dimostrato che questi cambiamenti molecolari governano i processi di disfunzione epatica e aumentano il rischio di sviluppo di EC e della sua disseminazione. Tale firma molecolare è quindi in grado di predire accuratamente la sopravvivenza dei pazienti con EC, sottoposti ad epatectomia [67], ma anche lo scompenso epatico, il rischio di sviluppare EC e la morte in un gruppo di pazienti cirrotici seguiti con un follow-up di 10 anni. Nel complesso queste informazioni suggeriscono che le alterazioni che costituiscono il "field effect" conferiscono un carattere più aggressivo sia in termini

di progressione di malattia epatica che di promozione dello sviluppo tumorale e della sua metastatizzazione [66].

Tarao K. et al. hanno dimostrato l'esistenza di una significativa associazione tra il grado istologico di epatite e la ripresa di malattia nel fegato circostante, come causa di ricorrenza multicentrica in pazienti con EC HCV positivi, sottoposti ad epatectomia curativa [121]. Nel 2006 Okamoto et al. hanno identificato una firma molecolare costituita da 36 geni, alcuni associati ad EC ed altri a ricorrenza di EC, al fine di selezionare uno score predittivo di ricorrenza di malattia [122]. In un contesto analogo Tanaka et al. hanno identificato in CYP1A2 un valido marcatore prognostico di ricorrenza di EC, quando valutato nel tessuto adiacente non tumorale di pazienti con danno epatico cronico ed infezione da HCV [114]. CYP1A2 è il citocromo più diffuso a livello epatico e ampiamente coinvolto nel metabolismo dei farmaci e nella sintesi del colesterolo; la diminuzione dei suoi livelli di espressione correla con la progressione dello stato di fibrosi in pazienti con epatite da virus C.

Dal momento che nel lavoro di Hoshida et al., tra i numerosi citocromi identificati, non sia stato identificato CYP1A2 come marcatore prognostico di recidiva di malattia, il nostro lavoro ha voluto chiarire la discrepanza di risultati ottenuti da Tanaka e Hoshida.

Nel nostro studio è stato confermato il valore prognostico svolto da CYP1A2 in pazienti con EC HCV positivi presentanti o background epatitico F3 oppure cirrotico avanzato F4. Dall'analisi immunohistochimica è emerso che il 37% dei pazienti presenta overespressione di CYP1A2 nel tessuto extratumorale epatico; l'analisi statistica univariata condotta sull'intera casistica (pazienti con EC HCV positivi F3 e con EC HCV positivi F4) ha identificato tre parametri statisticamente significativi quando associati alla sopravvivenza libera da ricorrenza (RFS), ovvero tumori la cui massa è inferiore ai 3 cm di diametro ($p=0.045$), la presenza di un background epatitico privo di cirrosi ($p=0.04$) e soprattutto l'overespressione di CYP1A2 nel parenchima circostante ($p=0.002$). Dall'analisi multivariata solo l'upregolazione di CYP1A2 è stata identificata come fattore prognostico indipendente ($p=0.012$) di miglior prognosi.

In conclusione, così come nel lavoro di Tanaka, anche il nostro studio di validazione ha identificato in CYP1A2 un possibile nuovo biomarcatore molecolare ad impatto traslazionale prognostico, particolarmente informativo soprattutto in relazione alla natura morfologica del tessuto extralesionale (epatitica o cirrotica).

I pathway molecolari associati a CYP1A2 comprendono principalmente proteine ad attività perossidasi e riduttasi: i perossisomi sono piccoli organelli che partecipano non solo alla generazione dei radicali liberi dell'ossigeno, ma anche ai fenomeni di "salvataggio cellulare" in presenza di effetti dannosi provocati dalle specie reattive dell'ossigeno. Dal momento che la

diminuzione dei livelli epatici di CYP1A2 potrebbe fungere da marcatore di danno ossidativo associato all'epatocarcinogenesi, l'analisi di questo citocromo sembra essere promettente nello screening su biopsia epatica di pazienti con epatite cronica ad alto rischio di sviluppare EC.

8. MARCATORI MOLECOLARI AD IMPATTO TRASLAZIONALE SULLA PREDIZIONE DELLA RISPOSTA AL TRATTAMENTO CON SORAFENIB

8.1 Introduzione

Tra i farmaci di nuova generazione a bersaglio molecolare, il più importante nel trattamento di EC avanzati è il Sorafenib (Nexavar, Bayer pharmaceuticals), piccola molecola che agisce a livello intracellulare, in grado di inibire la proliferazione cellulare e l'angiogenesi e aumentare il numero di cellule destinate all'apoptosi (Figura 8.1.1.).

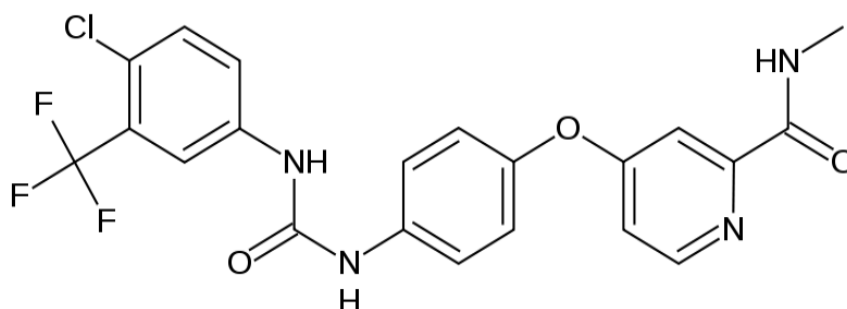


Fig. 8.1.1. Formula chimica del Sorafenib (Nexavar, Bayer pharmaceuticals).

Più nel dettaglio, il Sorafenib agisce inibendo le serin-treonina chinasi Raf-1 e b-Raf e di conseguenza l'attività dei recettori tirosin-chinasici quali vascular endothelial growth factor (VEGFRs) 1, 2 e 3 e platelet-derived growth factor receptor beta (PDGFR-beta) (Fig. 8.1.2.).

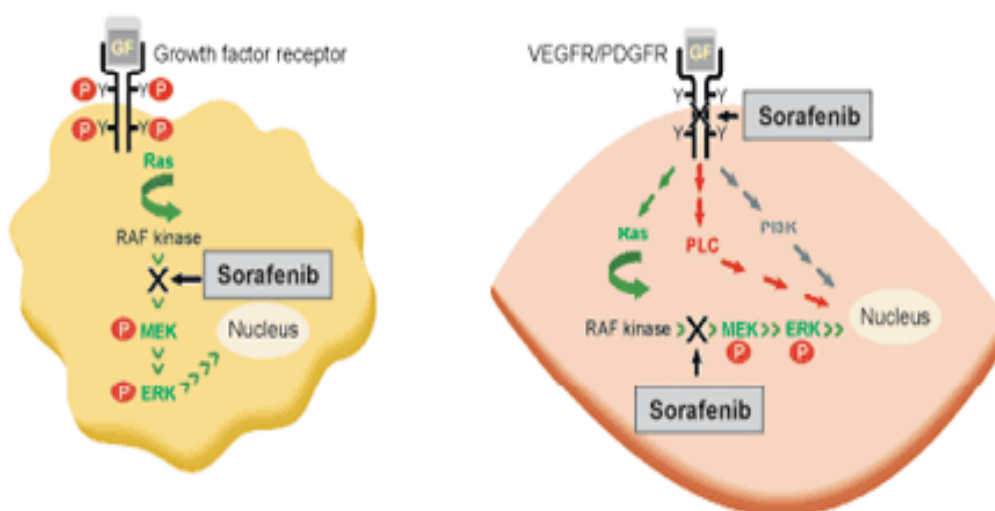


Fig. 8.1.2. Pathway molecolari su cui agisce il Sorafenib (Adattata da D. Strumberg, *Drugs of Today*, 2005).

I primi due grandi studi volti a comprendere il potenziale farmacologico del Sorafenib, come agente singolo nel trattamento dell'EC avanzato, sono stati lo studio SHARP (Sorafenib HCC Assessment Randomized Protocol) e il trial clinico Asia-Pacific. Nello studio SHARP multicentrico di fase III, in doppio cieco e con un gruppo placebo di controllo, sono stati arruolati 602 pazienti con EC avanzato che non hanno mai ricevuto precedentemente un trattamento sistemico, alcuni dei quali trattati con Sorafenib (400mg per due volte al giorno) ed altri con placebo: risultati promettenti sono stati ottenuti sia per quanto riguarda l'aumento della sopravvivenza totale (OS) che il tempo libero da progressione radiologica (TTP). Come si può vedere nell'immagine 8.1.3, nel gruppo dei pazienti trattati con Sorafenib l'OS risulta di 10.7 mesi rispetto i 7.9 mesi dei pazienti controllo, mentre il tempo libero da progressione radiologica è per i primi di 5.5 mesi e per i secondi di 2.8 mesi (non sono state invece evidenziate differenze tra i due gruppi per quanto concerne il tempo libero da progressione sintomatica). Dal punto di vista della risposta al trattamento nel gruppo trattato con Sorafenib solo il 2% dei pazienti ha mostrato risposta parziale alla terapia, il 71% stabilità di malattia e in nessun paziente è stata evidenziata una risposta completa; in alcuni dei pazienti spesso il trattamento è stato interrotto a causa della comparsa di effetti collaterali quali diarrea, perdita di peso, reazioni cutanee, alopecia, anoressia ed affaticamento [123, 124].

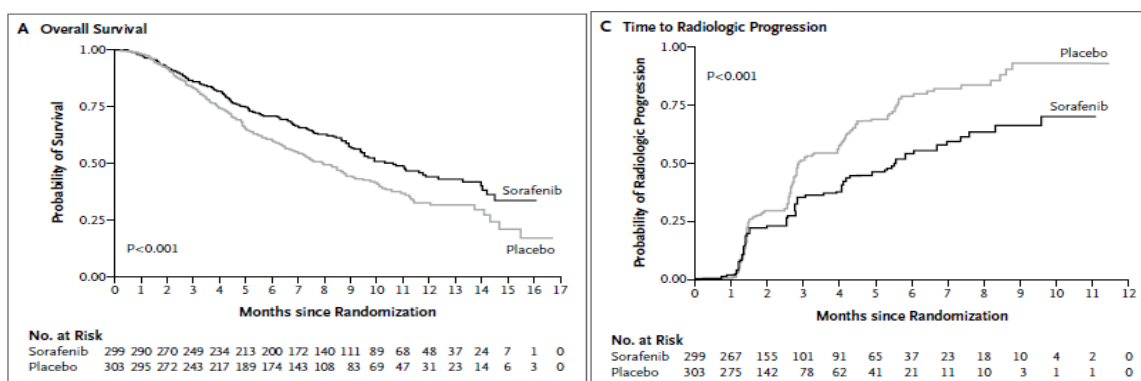


Figura 8.1.3. Curve di Kaplan-Meier riferite a sopravvivenza totale (sinistra) e tempo libero da progressione radiologica (destra) in pazienti trattati con Sorafenib rispetto al gruppo trattato con placebo (Adattata da JM. Llovet, *New England Journal of Medicine*, 2008).

Nella regione Asiatica la maggior parte dei pazienti affetti da EC presenta infezione da HBV: nello studio multinazionale Asia-Pacific di fase III, in doppio cieco e con un gruppo placebo di controllo, sono stati arruolati 271 pazienti mai sottoposti ad alcun trattamento sistemico, alcuni dei quali trattati con il farmaco, altri con placebo. Anche questo studio, come lo studio SHARP, ha dimostrato un aumento sia in termini di sopravvivenza per i pazienti trattati rispetto al gruppo controllo (6.5 mesi *versus* 4.2 mesi), sia in termini di malattia libera da progressione radiologica

(2.8 versus 1.4 mesi). A conferma dei risultati già ottenuti nello studio di Llovet, anche il trial Asia-Pacific ha confermato l'importanza e il potenziale terapeutico svolto da Sorafenib come unico agente di trattamento in pazienti in stadio avanzato di malattia (Figura 8.1.4) [124, 125].

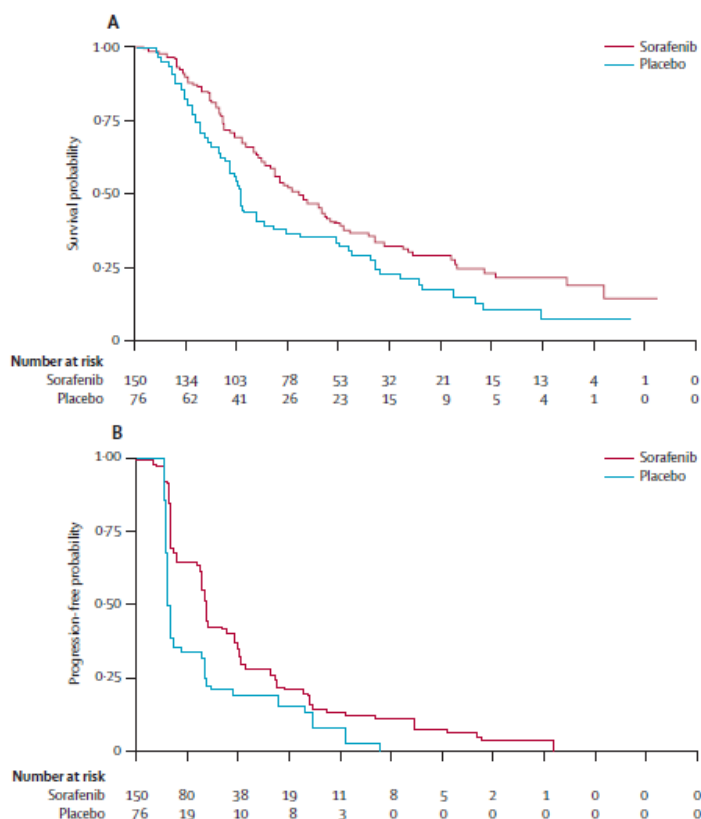


Figura 8.1.4. Curve di Kaplan-Meier riferite a sopravvivenza totale (in alto) e tempo libero da progressione radiologica (in basso) in pazienti trattati con Sorafenib rispetto al gruppo trattato con placebo (Adattata da AL Cheng, *Lancet Oncology*, 2009).

Oltre al Sorafenib, esiste un'ampia gamma di farmaci di nuova generazione a bersaglio molecolare, impiegati nel trattamento dell'EC, volti a bloccare specifici pathway implicati nella genesi e nello sviluppo della neoplasia [20, 126-132]. Tra i pathway molecolari di maggiore importanza a livello terapeutico spicca il signaling attivato da VEGF/VEGFR, FGF/FGFR e PDGF/PDGFR: VEGF, molecola primaria nel promuovere l'angiogenesi tumorale, risulta upregolata in numerosi tumori, compreso l'EC, e svolge un ruolo di predittore prognostico negativo, sia se aumentato a livello tissutale che sierico. Il Bevacizumab, anticorpo monoclonale umanizzato, è in grado di legare e inibire il VEGFR, bloccando l'attivazione del signaling intracellulare ed è utilizzato sia come agente singolo che in associazione a chemioterapici, ma nonostante molti studi affermino che sia ben tollerato dai pazienti, i numerosi effetti avversi che si manifestano devono ancora essere ben studiati [20]. Il Brivanib, inibitore selettivo sia di VEGF che di FGF, è stato valutato come agente utilizzato in prima linea nel trattamento di pazienti con EC

non resecabile, avanzato e metastatico: è ancora in corso uno studio di fase III basato sull'utilizzo di Brivanib *versus* Sorafenib in pazienti che non hanno ricevuto precedentemente alcun trattamento sistemico. Benefici clinici riguardo l'utilizzo di questo composto sono stati ottenuti in pazienti in cui è fallito il trattamento con Sorafenib, suggerendo l'importanza che Brivanib può assumere come opzione terapeutica in un particolare sottogruppo di pazienti [127]. Il Linifanib è un altro potente inibitore selettivo di VEGFR e PDGFR: uno studio di fase II condotto su 44 pazienti con EC ha ottenuto buoni risultati, indicando questo farmaco come clinicamente attivo nel trattamento dell'EC e con un accettabile profilo di sicurezza [20]. Infine è stato recentemente dimostrato come Tivantinib, inibitore selettivo di MET, sia particolarmente indicato in seconda linea di trattamento in pazienti con EC avanzato, sia in monoterapia che in associazione a Sorafenib, soprattutto in presenza di tumori fortemente esponenti MET [133].

Ad oggi esistono pochi lavori in cui sono stati ricercati marcatori predittivi di risposta al trattamento con Sorafenib. In letteratura sono riportate alcune molecole quantificate a livello sierico in grado di predire la risposta terapeutica: tra queste molecole, spiccano HGF e c-kit, i cui bassi livelli del primo ed alti del secondo, correlano con un aumento di sopravvivenza globale; altre molecole quali Ang-2, FST, G-CSF, HGF, leptina, PDGF-BB, PECAM-1/CD31 e VEGF sembrano correlare con un'iniziale risposta a Sorafenib, quando valutati basalmente. Inoltre gli stessi livelli basali di Ang-2, G-CSF, HGF e leptina risultano associati a PFS, quando valutati dopo trattamento [134]. Anche la diminuzione dei livelli di AFP correla positivamente con la risposta al trattamento e con l'aumento della sopravvivenza del paziente [135]. Attualmente è riportato che p-ERK è l'unico marcatore molecolare tissutale associato a risposta a Sorafenib [136]: attraverso analisi immunostochimica è stato dimostrato che tumori con un elevato numero di cellule positive per p-ERK (valutate prima del trattamento) correlano con un migliore TTP rispetto tumori con bassa espressione di p-ERK ($p=0.0034$). Questi risultati suggeriscono che tumori esponenti elevati livelli di p-ERK appaiono più sensibili e responsivi al trattamento con Sorafenib [136].

Nel corso degli ultimi tre anni sono stati pubblicati pochissimi studi riguardanti l'effetto predittivo svolto da alcuni miRNA in pazienti con EC trattati con Sorafenib. Nel 2009 Bai et al. hanno dimostrato, attraverso studi cellulari, che la ri-espressione di miR-122 (che tende ad essere downregolato) in cellule di EC, le rende sensibili all'azione mediata da Sorafenib: risultati ottenuti sia su HepG2 che su Hep3B, linee cellulari entrambe esponenti miR-122, hanno evidenziato come la sopravvivenza risulti significativamente ridotta all'aumentare della concentrazione del farmaco e l'apoptosi aumenti del 35%, rispetto a cellule controllo [137]. E' stato inoltre dimostrato come Sorafenib sia in grado di downregolare Mcl-1, proteina anti-apoptotica, in cellule Huh7 transfettate con il miRNA *let-7c*, che bersaglia direttamente Mcl-1 ed agisce sinergicamente con il farmaco, determinando una diminuzione della vitalità cellulare ed un aumento dell'apoptosi e della tossicità

[138]. Un altro miRNA in grado di agire negativamente su Mcl-1 è miR-193b, la cui azione volta a diminuire i livelli di Mcl-1 e l'attività basale delle caspasi 3 e 7, è accompagnata da un aumento delle sensibilità delle cellule tumorali a Sorafenib, in pazienti con EC HCV positivo [139]. Altri studi cellulari effettuati sulla linea HepG2 hanno dimostrato come, in seguito a trattamento con Sorafenib, si verifici un cambiamento di espressione genica per 14 specifici miRNA: tra essi, il miR-1274a mostra un'abbondante espressione intracellulare ed esplica la sua azione regolatoria andando ad inibire la metalloproteinasi ADAM9, coinvolta nel meccanismo di distacco del complesso maggiore di istocompatibilità dalle cellule tumorali, favorendo l'*escape* tumorale e la perdita di sensibilità da parte delle cellule NK nei confronti degli antigeni tumorali. Questo studio dimostra come l'upregolazione di miR-1274a, in seguito ad azione farmacologica, sia in grado di diminuire fortemente l'espressione di ADAM9 e aumentare la risposta anti-tumorale, mediata dal sistema immunitario [140].

Nonostante in letteratura siano presenti moltissimi studi clinici e funzionali riguardanti i miRNA in relazione all'EC, ad oggi ancora nessun lavoro si è focalizzato sull'identificazione di miRNA che possano fungere da marcatori di sensibilità al trattamento con Sorafenib, potenzialmente utilizzabili nella pratica clinica quotidiana.

8.2 Materiali e metodi

8.2.1 La casistica

Questo studio è stato condotto su due distinte casistiche: la prima, definita training set, è costituita da 26 pazienti affetti da EC (di cui uno escluso dallo studio per morte accidentale), in cura presso gli Ospedali Riuniti di Bergamo; la seconda, denominata validation set e più ampia è costituita da 56 pazienti trattati presso l'Istituto Clinico Humanitas di Rozzano. I pazienti di entrambe le casistiche sono stati trattati con Sorafenib, secondo le linee guida internazionali e la somministrazione del farmaco è stata effettuata fino a progressione di malattia ed interrotta in caso di eccessiva tossicità.

Nel training set è stata calcolata un'overall survival (OS) in un range compreso tra 3 e 14.5 mesi (mediana: 9 mesi) e una progression-free survival (PFS) in un range compreso tra 0.4 e 14.3 mesi (mediana: 4.5 mesi); nella casistica di validazione l'OS è compresa tra di 2 e 45 mesi (mediana: 12 mesi), mentre la PFS tra 1.4 e 25.5 mesi (median: 4.4 mesi). All'ultimo follow-up 5 pazienti del training set risultano vivi e 3 presentano stabilità di malattia; nella casistica di validazione 3 pazienti sono vivi, di cui 2 con malattia stabile.

Le caratteristiche clinico-patologiche dei pazienti sono riportate in Tabella 8.2.1.1

Per identificare miRNA predittivi di risposta al trattamento con Sorafenib, in pazienti con EC avanzato, è stata valutata l'espressione di circa 700 miRNA nel training set; successivamente i miRNA identificati sono stati nuovamente validati internamente al training set attraverso una procedura di validazione definita leave-one-out cross validation (BRB tool analysis). I miRNA che mostrano una correlazione con le caratteristiche cliniche sono stati in seguito validati nella seconda casistica, mentre le correlazioni di tutti i marcatori molecolari o delle caratteristiche clinico-patologiche in relazione al tempo di sopravvivenza sono state analizzate sulla sommatoria dei pazienti delle due casistiche. Una terza serie di 61 EC chirurgici di pazienti non trattati con Sorafenib [64] è stata utilizzata come casistica di controllo, al fine di escludere che i marcatori molecolari identificati siano associati alla sopravvivenza generale del paziente indipendentemente dal trattamento farmacologico.

Tabella 8.2.1.1 Caratteristiche clinico-patologiche dei pazienti arruolati nelle due distinte casistiche

	Training Set (n = 25)	Set di validazione (n = 56)	Casistica generale (n = 81)
Età media (range)	68 (58-81)	70 (46-83)	70 (46-83)
Sesso (%)			
Maschi	17 (68)	50 (89)	67 (83)
Femmine	8 (32)	6 (11)	14 (17)
ECOG performance status – no. (%)			
0	18 (72)	26 (46)	44 (54)
1	6 (24)	26 (46)	32 (39)
2	1 (4)	4 (7)	5 (6)
Eziologia (%)			
Virus epatite C	11 (43)	30 (54)	41 (50)
Virus epatite B	6 (24)	8 (14)	14 (17)
Virus epatite B+D	1 (4)	-	1 (1)
Virus epatite B+C	2 (8)	-	2 (3)
Alcool	1 (4)	8 (14)	9 (11)
Dismetabolica	1 (4)	2 (4)	3 (4)
Autoimmune	2 (8)	-	2 (3)
Sconosciuta	1 (4)	8 (14)	9 (11)

Child-Pugh (%)			
Classe A	18 (72)	52 (93)	70 (86)
Classe B	7 (28)	4 (7)	11 (14)
Metastasi (%)			
Assenti	14 (56)	21 (38)	35 (43)
Presenti	10 (40)	35 (62)	45 (56)
Dato non disponibile	1 (4)	-	1 (1)
Invasione vascolare (%)			
Assente	18 (72)	39 (70)	57 (71)
Presente	6 (24)	16 (28)	22 (27)
Dato non disponibile	1 (4)	1 (2)	2 (3)
Tempo dalla diagnosi di EC fino alla somministrazione di Sorafenib in mesi (range)	14.3 (0-68)	21.5 (0-78)	19.3 (0-78)
BCLC stadio (%)			
A (precoce)	1 (4)	-	1 (1)
B (intermedio)	13 (52)	16 (29)	29 (36)
C (avanzato)	11 (44)	40 (71)	51 (63)
Valori di alfa-fetoproteina (%)			
<200 ng/mL	12 (48)	17 (30)	29 (36)
>200 ng/mL	11 (44)	39 (70)	50 (62)
Non disponibili	2 (8)	-	2 (2)
Trattamenti precedenti (%)			
Chemoembolizzazione	11 (44)	25 (45)	36 (44)
Resezione epatica	2 (8)	23 (41)	25 (31)
Ablazione con radiofrequenza	9 (36)	7 (13)	16 (20)
Interferone	3 (12)	-	3 (4)
Radioterapia	-	2 (4)	2 (2)
Iniezione percutanea di etanolo	1 (4)	-	1 (1)
Nessun trattamento	10 (40)	16 (29)	26 (32)

8.2.2 Microdissezione laser, estrazione e purificazione dell'RNA

Per ogni paziente è stato estratto l'RNA a partire da tessuto epatico fissato in formalina ed incluso in paraffina, grazie all'utilizzo di un microscopio con funzionalità di microdissettore laser (Leica Microsystems). La microdissezione laser è una nuova tecnologia che permette di delimitare la popolazione epatocitaria di interesse dalle circostanti componenti mesenchimali, infiammatorie e da cellule biliari, la cui presenza potrebbe inficiare il risultato dello studio. La tecnologia è basata sull'utilizzo di un rivestimento costituito da un polimero termoplastico attaccato ad un supporto rigido che viene messo a diretto contatto con il tessuto e si lega ai gruppi di cellule selezionate microscopicamente attraverso un impulso laser infrarosso. Il tessuto, tagliato dal raggio laser, cade per forza di gravità all'interno di una provetta, fissata in un supporto sottostante, così da evitare alcun tipo di contaminazione da parte dell'operatore.

L'RNA totale è stato purificato attraverso MasterPure RNA purification Kit (Epicentre Biotechnologies), seguendo il protocollo riportato:

- Aggiungere 2 µl di Proteinasi K in 300 µl di T and C Lysis Solution e mischiare x inversione;
- Isolare le provette con parafilm e mettere in bagnetto;
- Incubare a 65°C per 30 minuti;
- Mettere il campione in ghiaccio per 5 minuti;
- Aggiungere 175 µl di MPC Protein Precipitation Reagent in ogni campione (58 µl in caso di biopsia) e vortexare vigorosamente;
- Centrifugare a 12000 rpm per 10 minuti per far depositare lo scarto;
- Trasferire il surnatante in una nuova provetta pulita e buttare il pellet;
- Aggiungere 500 µl di isopropanolo (250 µl per le biopsie + 1 µl di glicogeno), invertire le provette e lasciare precipitare overnight;
- Centrifugare a 12000 rpm per 10 minuti a 4°C;
- Eliminare l'isopropanolo capovolgendo la provetta, facendo attenzione a non smuovere il pellet;
- Lavare 2 volte con 500 µl di EtOH 75% centrifugando ogni volta a 10000 rpm per 5 minuti a temperatura ambiente;
- Seccare il pellet a temperatura ambiente per eliminare qualsiasi residuo di EtOH;
- Risospendere l'RNA in 30 µl di acqua RNAsi free;

- Lasciar riposare 1 ora in ghiaccio per far risospendere bene l'RNA;
- Quantificare con spettrofotometro la concentrazione dell'RNA diluito di 1:50;
- Conservare i campioni a -80 °C.

Prima di procedere con la retroscrizione dell'RNA a cDNA è necessario diluire i campioni fino ad ottenere una concentrazione finale di acido nucleico pari a 100ng/μl, in un volume finale di 10 μl.

8.2.3 Retrotrascrizione dell'RNA e analisi di espressione genica dei miRNA totali

Per la retrotrascrizione dei campioni di RNA in cDNA sono stati utilizzati il TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit e Megaplex RT primers Human Pool sets A e B (Applied Biosystems), secondo il seguente protocollo:

- Prima di iniziare, assicurarsi di conservare in ghiaccio tutti i reagenti;
- Preparare la Master mix per ciascun campione come segue:

COMPONENTI	VOLUMI
Megaplex RT primers (10X)	0.80 μl
100mM dNTPs (con dTTP)	0.20 μl
MultiScribe Reverse transcriptase, 50 U/μl	1.50 μl
10X Reverse Transcription Buffer	0.80 μl
MgCl ₂ (25mM)	0.90 μl
RNase Inhibitor, 20U/μl	0.10 μl
Nuclease-free water	0.20 μl
Volume totale	4.50L

- Mischiare delicatamente la mix e riporre in ghiaccio;
- Aliquotare 4.5 μl di RT mix per ogni campione, poi aggiungere 3 μl di RNA, mischiare e incubare il tutto per 5 minuti in ghiaccio;

- Procedere con la reazione di retrotrascrizione in un termociclatore, secondo il seguente programma:

CICLI	TEMPO	TEMPERATURA
40 cicli	2 minuti	16 °C
	1 minuti	42 °C
	1 secondo	50 °C
1	5 minuti	85 °C
1	∞	4 °C

- Il cDNA può essere conservato per una settimana da -15 fino a -25 °C.

Quando il materiale di partenza è costituito da piccole quantità, ovvero inferiore a 350 ng di RNA, è necessario effettuare una reazione di pre-amplificazione a partire da cDNA, come segue:

- La reazione di pre-amplificazione prevede un volume finale di 25 µl e contiene 2.5 µl di prodotto di RT e 22.5 µl di mix di reazione;
- La preparazione della mix per ogni campione è la seguente:

COMPONENTI	VOLUMI
TaqMan PreAmp Master Mix (2X)	12.5 µl
Megaplex PreAmp Primers (10X)	2.5 µl
Nuclease-free water	7.5 µl
Volume totale	22.5MI

- Mischiare delicatamente la mix, aliquotare 22.5 µl per ciascun campione e aggiungere 2.5 µl di reazione di retrotrascrizione;
- Incubare i campioni per 5 minuti in ghiaccio;

- Effettuare la reazione di pre-amplificazione in un termociclatore, secondo il seguente programma:

CICLI	TEMPO	TEMPERATURA
1	10 minuti	95°C
1	2 minuti	55 °C
1	2 minuti	72 °C
12 cicli	15 secondi	95 °C
	4 minuti	60 °C
1	10 minuti	99.9 °C
1	∞	4°C

- Alla fine della reazione centrifugare brevemente i campioni e aggiungere in ognuno 75 µl di Buffer TE 0.1X pH= 8.0;
- Invertire i campioni 5 o 6 volte, poi spinnare velocemente e conservare in ghiaccio.

Per l'analisi dell'espressione genica di 754 miRNA maturi è stato utilizzato il kit TaqMan Array miRNA Cards A + B set v3.0 (Applied Biosystems), un supporto preposto all'amplificazione dei miRNA presenti nei campioni, basato su tecnologia microfluidica. Le card sono delle piastre pre-configurate dal produttore, all'interno delle quali si trovano liofilizzati i primers e la sonda TaqMan specifica per i miRNA ricercati. Le reazioni di real-time PCR vengono effettuate con strumento 7900 HT Sequence detection System (Applied Biosystems).

- Mischiare la TaqMan Universal PCR Master Mix e poi dare una breve spinnata
- Preparare la miscela di reazione da inserire nelle card, come segue:

COMPONENTI	VOLUME PER UN ARRAY
TaqMan Universal PCR Master Mix, 2x	450 µl
Prodotti di pre-amplificazione diluiti	9 µl
Nuclease-free water	441 µl
Volume totale	900 µl

- Effettuare la reazione di real-time PCR secondo il seguente programma:

CICLI	TEMPO	TEMPERATURA
1	2 minuti	50 °C
1	10 minuti	95 °C
40 cicli	15 secondi	95 °C
	1 minuto	60 °C
1	∞	4 °C

I dati grezzi ottenuti dall'amplificazione dei miRNA (Ct) sono stati convertiti in quantità relative, utilizzando come fattore di normalizzazione la media geometrica di tre trascritti di riferimento presenti nella piattaforma array (snoRNA6B, RNU44 e RNU 48) e applicando la formula $2^{-\Delta Ct}$.

8.2.4 Retrotrascrizione dell'RNA e analisi di espressione genica di singoli miRNA

Dall'analisi statistica condotta sui risultati di espressione genica dei miRNA totali (vedi successivo paragrafo 8.2.5) è stato identificato un numero ristretto di miRNA, associati a risposta a Sorafenib, validati in reazioni singole sulla casistica di validazione (n = 56 pazienti).

Per la retrotrascrizione di un singolo miRNA il protocollo prevede:

- Diluire i primer di RT ad una concentrazione 5X utilizzando buffer TE 0.1X;
- Preparare la mix di reazione, come segue:

COMPONENTI	VOLUMI
100mM dNTPs (con dTTP)	0.15 µl
MultiScribe Reverse transcriptase, 50 U/µl	1.00 µl
10X Reverse Transcription Buffer	1.50 µl
RNase Inhibitor, 20U/µl	0.19 µl
Nuclease-free water	4.16 µl
Volume totale	7.00 µl

- Mescolare la mix e centrifugare velocemente, poi conservare in ghiaccio:
- Aliquotare 7 µl di mix per ogni campione, aggiungere 5 µl di RNA totale e 3 µl di RT primer 5X;
- Agitare per inversione 5 o 6 volte ed incubare in ghiaccio per 5 minuti;
- Procedere con la reazione di retrotrascrizione in un termociclatore, secondo il seguente programma:

TEMPO	TEMPERATURA
30 minuti	16 °C
30 minuti	42 °C
5 minuti	85 °C
∞	4 °C

- Il cDNA può essere conservato per una settimana da -15 fino a -25 °C.

Quando il materiale di partenza è costituito da piccole quantità, ovvero inferiore a 350 ng di RNA, è necessario effettuare una reazione di pre-amplificazione a partire da cDNA, come segue:

- La reazione di pre-amplificazione prevede un volume finale di 25 µl e contiene 2.5 µl di prodotto di RT e 22.5 µl di mix di reazione;

- Preparare la mix come segue:

COMPONENTI	VOLUMI
TaqMan PreAmp Master Mix (2X)	12.5 μ l
Megaplex PreAmp Primers (10X)	2.5 μ l
Nuclease-free water	7.5 μ l
Volume totale	22.5 μl

- Mischiare delicatamente la mix, aliquotare 22.5 μ l per ciascun campione e aggiungere 2.5 μ l di reazione di retrotrascrizione;
- Incubare i campioni per 5 minuti in ghiaccio;
- Effettuare la reazione di pre-amplificazione in un termociclatore, secondo il seguente programma:

CICLI	TEMPO	TEMPERATURA
1	10 minuti	95°C
1	2 minuti	55 °C
1	2 minuti	72 °C
12 cicli	15 secondi	95 °C
	4 minuti	60 °C
1	10 minuti	99.9 °C
	∞	4 °C

- Alla fine della reazione centrifugare brevemente i campioni e aggiungere in ognuno 75 μ l di Buffer TE 0.1X pH= 8.0;
- Invertire i campioni 5 o 6 volte, poi spinnare velocemente e conservare in ghiaccio.

Per l'analisi dell'espressione genica di ogni singolo miRNA maturo, la valutazione dei valori d'espressione viene condotta in triplicato, aggiungendo ad ogni reazione un controllo interno (RNU44). Il volume finale di reazione è di 10 µl e contiene:

COMPONENTI	VOLUMI
TaqMan Universal PCR Master Mix, 2x	5 µl
Prodotti di pre-amplificazione diluiti	1 µl
Primer per specifico miRNA	0.5 µl
Nuclease-free water	3.5 µl
Volume totale	10 µl

- Effettuare la reazione di real-time PCR secondo il seguente programma:

CICLI	TEMPO	TEMPERATURA
1	2 minuti	50 °C
1	10 minuti	95 °C
40 cicli	15 secondi	95 °C
	1 minuto	60 °C
1	∞	4 °C

I dati grezzi ottenuti dall'amplificazione dei miRNA (Ct) sono stati convertiti in quantità relative, utilizzando come fattore di normalizzazione la media geometrica di un trascritto di riferimento (RNU44) e applicando la formula $2^{-\Delta Ct}$. La lista dei primer e delle sonde (Applied Biosystems) utilizzate per l'analisi di ogni singolo miRNA è riportata di seguito:

miRNA ID	ABI ID
hsa-miR-10b	2218
hsa-miR-101	2253
hsa-miR-155	2623
hsa-miR-185	2271
hsa-miR-***	****
hsa-miR-579	2398
hsa-miR-629	2436

8.2.5 Analisi statistica

I risultati ottenuti dai dati di espressione genica dei miRNA totali (casistica training set) sono stati analizzati mediante analisi di tipo non-supervisionato (Hierarchical clustering, dChip Software, www.dchip.org) e di tipo supervisionato (Class Prediction Analysis, BRB Tool, Biometrics research Branch, NCI, Bethesda, MD, USA), al fine di identificare un ristretto numero di miRNA associati a risposta al Sorafenib e al follow-up dei pazienti (tempo di progressione di malattia TTP, tempo di sopravvivenza libero da progressione PFS e sopravvivenza generale OS_T). TTP, PFS e OS_T sono intervalli temporali calcolati a partire dall'inizio del trattamento con Sorafenib. La sopravvivenza globale (OS_G) è calcolata dal momento della diagnosi fino all'ultimo follow-up o evento clinico (per esempio la morte). Per TTP si intende il tempo compreso tra l'inizio del trattamento con Sorafenib e la prima manifestazione radiologica di avanzamento della malattia (senza tenere in considerazione pazienti deceduti), mentre il PFS rappresenta il tempo che intercorre tra l'inizio della somministrazione del farmaco e la progressione di malattia o l'evento di morte (in accordo con le guide FDA).

I dati di espressione genica dei miRNA sono stati analizzati attraverso il modello statistico di Cox (p value <0.05), al fine di individuare miRNA che possano ipoteticamente fungere da predittori di sopravvivenza. Da un'iniziale analisi statistica basata su Log Rank Test (MedCalc Software) si è valutata la possibilità di separare i pazienti in due gruppi con differente sopravvivenza, e un successivo test di validazione, chiamato metodo di cross-validazione Leave-one-out, è stato utilizzato per attestare che i risultati ottenuti siano riproducibili e validabili in altre casistiche, perché indipendenti dai fattori studiati.

Successivamente è stata effettuata un'analisi statistica univariata, con valutazione dei livelli di espressione genica in continuo, basata sul test di Wald, ovvero una prova statistica che esamina

se una variabile indipendente ha un rapporto statisticamente significativo con la variabile dipendente. Per evitare di prendere in considerazione miRNA falsi positivi è stato effettuato un test di permutazione, basato su 10000 permutazioni random (multivariate permutations tests) con un *p value* < 0.01.

Per l'analisi di singoli miRNA, condotta nella casistica di validazione e nella popolazione generale (unione delle due casistiche), è stato utilizzato il modello Cox proportional hazards model (*p value* <0.05), analizzando il profilo dei miRNA come variabili continue, mentre i profili di espressione sono stati considerati variabili categoriche, quando analizzati in relazione alle caratteristiche clinico-patologiche dei pazienti. Successivamente è stata condotta un'analisi multivariata (MedCalc Software) prendendo in considerazione solo le variabili molecolari e clinico-patologiche risultanti statisticamente significative dall'analisi univariata.

Per la creazione delle curve di sopravvivenza è stato utilizzato il metodo di Kaplan Meier, categorizzando i pazienti in due gruppi, a seconda della variabile presa in considerazione. Per quanto riguarda i miRNA, i pazienti sono stati divisi a seconda dei livelli di espressione in bassa o elevata espressione, stimando come valore soglia di alta o bassa espressione il valore di espressione mediana dei trascritti. Le differenze tra le curve di sopravvivenza sono state calcolate utilizzando Log Rank Test (MedCalc Software), mentre le variazioni di espressione dei miRNA nei due gruppi di pazienti sono state analizzate attraverso Class Comparison Function (BRB Tool program) per la casistica di training set o con *t* statistic test per la casistica di validazione e la casistica generale. Valori di *p value* <0.05, ottenuti da queste analisi, sono stati ritenuti statisticamente significativi.

8.3 Risultati

8.3.1 Analisi dell'espressione genica dei microRNA totali

Lo studio dei profili di espressione genica totale dei miRNA, condotto sulla casistica di training set (n=25) attraverso piattaforma card array, ci ha consentito di selezionare miRNA differenzialmente espressi tra tessuto tumorale e cirrosi adiacente: applicando a questi dati un'analisi di tipo non supervisionato (Hierarchical Clustering) e di tipo supervisionato (Anova e Class Prediction) sono stati identificati 522 miRNA (*p*=0.002) con variazione di espressione. Successivamente ai valori di espressione dei 522 miRNA è stata applicata l'analisi della varianza, restringendo il numero di miRNA di interesse a 114 (*p*<0.001).

In seguito, attraverso analisi di Class Prediction, utilizzando criteri di selezione più stringenti (cut-off di espressione differenziale con una differenza di almeno 1.5 volte tra le due classi in esame ed un *p value* <0.001) è stato determinato il numero minimo di miRNA in grado di classificare

correttamente un caso cirrotico da uno tumorale: il numero di miRNA identificato è pari a 71 che sul totale dei 114 miRNA rappresenta il 62% di essi. In particolare, 46 miRNA appaiono overespressi e 25 downregolati nell'EC rispetto la cirrosi.

Dall'analisi dei valori di espressione di tutti i miRNA individuati, sono emersi 7 miRNA significativamente associati a TTP (Tabella 8.3.1.1), a PFS (Tabella 8.3.1.2) ed a OS_T (Tabella 8.3.1.3).

Tabella 8.3.1.1. miRNA statisticamente significativi associati a TTP, valutati nella casistica training set

p-value parametrico	p-value di permutazione	HR	SD of log intensities	miR id
0.003	0.001	0.74	2.79	hsa-miR-***
0.004	0.005	3.66	0.69	has-miR-155
0.009	0.010	0.48	1.00	hsa-miR-629
0.017	0.017	0.68	2.34	hsa-miR-10b
0.037	0.044	0.51	0.93	hsa-miR-101
0.038	0.040	0.59	1.13	hsa-miR-579

Tabella 8.3.1.2. miRNA statisticamente significativi associati a PFS, valutati nella casistica training set

p-value parametrico	p-value di permutazione	HR	SD of log intensities	miR id
0.005	0.006	3.19	0.69	has-miR-155
0.005	0.004	0.66	2.34	hsa-miR-10b
0.009	0.008	0.79	2.79	hsa-miR-***
0.016	0.017	0.57	1.13	hsa-miR-579
0.019	0.024	0.56	1.00	hsa-miR-629
0.030	0.033	0.52	0.93	hsa-miR-101

Tabella 8.3.1.3. miRNA statisticamente significativi associati a OS_T, valutati nella casistica training set

p-value parametrico	p-value di permutazione	HR	SD of log intensities	miR id
0.002	0.002	0.67	2.34	hsa-miR-10b
0.005	0.004	0.35	0.74	hsa-miR-185
0.006	0.007	0.51	1.13	hsa-miR-579
0.027	0.025	0.81	2.79	hsa-miR-***
0.043	0.045	1.75	0.69	has-miR-155

8.3.2 Identificazione di un numero ristretto di miRNA legati al follow-up e loro validazione

Dalle liste di miRNA, i cui valori di espressione risultano statisticamente significativi, sono stati identificati in totale 7 miRNA (Tabelle 8.3.1.1-8.3.1.3) che appaiono alterati sia in relazione a TTP, PFS e OS_T, (miR-***, miR-155, miR-10b e miR-579), che in relazione solo a TTP o PFS (miR-629 e miR-101) oppure esclusivi solo per OS_T (miR-185).

I sette miRNA identificati sono stati successivamente confermati in una seconda casistica indipendente di pazienti trattati con Sorafenib (casistica di validazione, n=56) (Tabella 8.3.2.1.) e nella casistica globale (n=81) (Tabella 8.3.2.2.) attraverso modello Cox proportional hazards model. miR-*** è l'unico miRNA che si mantiene significativamente associato a TTP e PFS sia nella casistica di training (p=0.003 e p= 0.009 rispettivamente) che nella casistica di validazione (p=0.003 e p=0.001 rispettivamente) (Tabella 8.3.2.1); risultato analogo è stato ottenuto anche dell'analisi della casistica generale (n=81) in relazione a TTP (p=0.002) e PFS (0.009) (Tabella 8.3.2.2). Da questi risultati sorge il nostro interesse nell'analizzare unicamente miR-*** come possibile nuovo biomcatore predittivo di risposta a Sorafenib.

Tabella 8.3.2.1. p-value dei 7 miRNA selezionati calcolati nelle due casistiche di pazienti

miRNA	TTP		PFS		OS _T	
	Training	Validation	Training	Validation	Training	Validation
miR-10b	0.017	0.24	0.005	0.51	0.002	0.4
miR-101	0.037	0.15	0.03	0.16	ns	0.18
miR-155	0.004	0.62	0.005	0.54	0.043	0.87
miR-185	ns	0.81	ns	0.96	0.005	0.29
miR-***	0.003	0.003	0.009	0.001	0.027	0.12
miR-579	0.038	0.42	0.016	0.33	0.006	0.46
miR-629	0.009	0.74	0.019	0.9	ns	0.85

Tabella 8.3.2.2. Analisi con Cox proportional hazards model nella casistica globale e correlazione con il follow-up clinico (in arancione sono evidenziati i valori statisticamente significativi).

Covariate	TTP			PFS			OS _T		
	P	HR	95% CI of HR	P	HR	95% CI of HR)	P	HR	95% CI of HR
miR-10b	0.01	0.90	0.8 to 0.9	0.02	0.91	0.8 to 0.9	0.59	0.98	0.9 to 1.0
miR-101	0.20	0.83	0.6 to 1.1	0.25	0.85	0.6 to 1.1	0.30	0.88	0.6 to 1.1
miR-155	0.22	1.17	0.9 to 1.4	0.23	1.16	0.9 to 1.4	0.35	1.10	0.9 to 1.3
miR-185	0.12	0.81	0.6 to 1.0	0.14	0.83	0.6 to 1.0	0.08	0.82	0.6 to 1.0
miR-***	0.002	0.80	0.6 to 0.9	0.009	0.83	0.7 to 0.9	0.30	0.92	0.7 to 1.0
miR-579	0.04	0.93	0.8 to 0.9	0.06	0.93	0.8 to 1.0	0.47	1.03	0.9 to 1.0
miR-629	0.006	0.74	0.5 to 0.9	0.04	0.82	0.6 to 0.9	0.15	0.89	0.7 to 1.0

Il dato interessante emerso da questi studi di espressione genica è rappresentato dal possibile significato predittivo svolto da miR-***: esso infatti risulta fortemente correlato a TTP e a PFS sia nella casistica di validazione che nella casistica generale. Inoltre, è stato dimostrato che elevati livelli di espressione sono positivamente associati ad un maggior tempo trascorso tra l'inizio del trattamento con Sorafenib fino al manifestarsi di un evento clinico (TTP) (Figura 8.3.2.1 A) o alla constatazione di progressione di malattia (PFS) (Figura 8.3.2.1 B).

Nonostante l'espressione analizzata in continuo non sia risultata associata in modo statisticamente significativo alla OS_T, i livelli di miR-*** al di sopra del valore mediano calcolato sulla casistica generale (pazienti definiti alti espressori) sono significativamente associati ad un tempo di sopravvivenza maggiore rispetto a pazienti con bassa espressione del miRNA (p=0.025, HR 1.7, Figura 8.3.2.1 C).

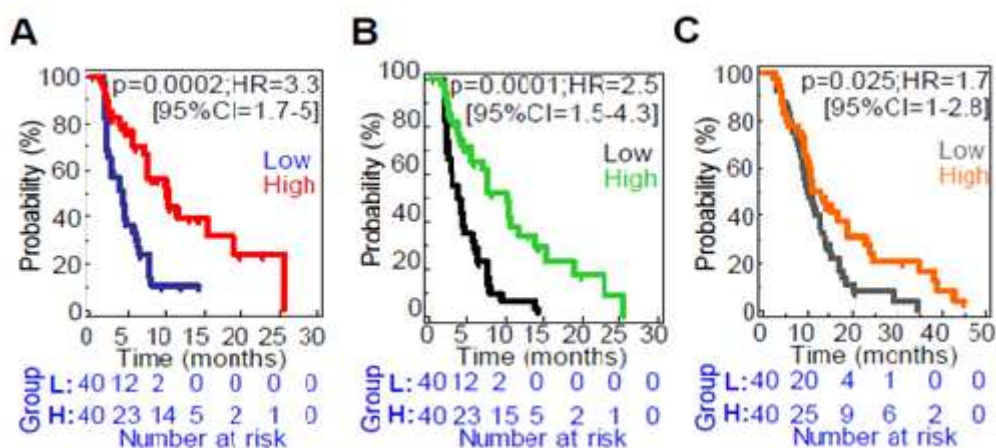


Figura 8.3.2.1. Curve di sopravvivenza ottenute in riferimento ai valori di espressione di miR-*** e PPT (A), PFS (B), differenza di sopravvivenza tra pazienti alti e bassi espressori del miRNA (C).

Al fine di comprendere se miR-*** possa essere considerato un fattore predittivo indipendente, utile nella pratica clinica, è stata realizzata un'analisi multivariata in seguito alla quale è emerso che tale miRNA risulta essere il miglior fattore predittivo indipendente di progressione di malattia durante il trattamento con Sorafenib (Tabella 8.3.2.3).

Tabella 8.3.2.3. Analisi multivariata per l'identificazione di variabili clinico-patologiche e molecolari indipendentemente associate al follow-up (TTP, PFS, OS_T) (in rosso i valori statisticamente significativi con *p* value < 0.05).

Analisi	Covariata	P	Exp(b)	95% CI of Exp(b)
TTP	Eziologia	0.02	2.3	1.1 to 4.7
	BCLC	0.58	0.8	0.33 to 1.8
	PS al trattamento	0.1	3.4	0.78 to 17.5
	Invasione vascolare	0.5	1.6	0.79 to 3.4
	miR-***	0.001	0.7	0.64 to 0.9
PFS	PS al trattamento	0.6	1.1	0.6 to 2.0
	Invasione vascolare	0.02	2.1	1.1 to 4.0
	miR-***	0.002	0.7	0.6 to 0.9
OS _T	PS al trattamento	0.018	3.5	1.2 to 10.1
	Invasione vascolare	0.011	2.1	1.1 to 3.6

Essendo nostra intenzione identificare miRNA non associati alla progressione tumorale definita dalla biologia stessa del tumore, abbiamo verificato se miR-*** sia correlato alla sopravvivenza globale dei pazienti (OS_G dalla diagnosi all'ultimo follow-up) o alle caratteristiche clinico-patologiche. L'analisi univariata condotta in relazione alle caratteristiche clinico-patologiche dei pazienti non ha identificato alcuna relazione significativa dal punto di vista statistico tra l'espressione di miR-*** e i parametri valutati (Tabella 8.3.2.4); analogamente non è stata identificata alcuna correlazione significativa tra i valori di miR-*** e la OS_G valutata sia nella serie cumulativa di pazienti trattati con Sorafenib che in una serie di controllo precedentemente descritta [64].

Tabella 8.3.2.4. Risultati dell'analisi univariata al fine di identificare correlazioni statisticamente significative tra l'espressione di miR-*** e le caratteristiche clinico-patologiche dei pazienti.

Variabili cliniche	miR-***
Metastasi	0.117
Età all'inizio del trattamento (>70anni)	0.999
Eziologia	0.229
CHILD (A-B)	0.320
Invasione vascolare	0.724
BCLC (B-C)	0.053
Precedente terapia	0.333
PS al trattamento (0-1)	0.853
Malattia (stabile-progredita)	0.358
Stato (vivo-morto)	0.065

Infine si è provveduto ad identificare uno strumento di selezione di pazienti in grado di beneficiare del trattamento con Sorafenib: abbiamo valutato i livelli di espressione di miR-*** nel parenchima cirrotico associato alla neoplasia e creato un valore numerico derivante dal rapporto tra i livelli di espressione nei due tessuti per ciascun paziente della casistica di validazione (n=56). In pazienti con stabilità di malattia (n=18) i livelli di miR-*** appaiono più elevati all'interno del tumore rispetto al parenchima cirrotico circostante (valore medio nel tumore=2.1; valore medio nella cirrosi=0.9, Figura 8.3.2.2. A). Al contrario in pazienti con progressione di malattia (n=38) è stata identificata un'overespressione di miR-*** nel tessuto cirrotico rispetto al tumore (p=0.01, Figura 8.3.2.2. A). Per ogni paziente è stato successivamente calcolato il rapporto tra i livelli di miR-*** nel tumore e nel parenchima cirrotico (miR-*** ratio=EC/cirrosi, Figura 8.3.2.2. B), sottolineando come pazienti con malattia progredita mostrino una significativa diminuzione nel rapporto miR-*** EC/cirrosi (p=0.004). Valutando il rapporto di espressione di miR-*** in EC/cirrosi in riferimento al TTP è stato dimostrato che un valore >1 appare significativamente associato a prognosi migliore (p=0.03, Figura 8.3.2.2. C).

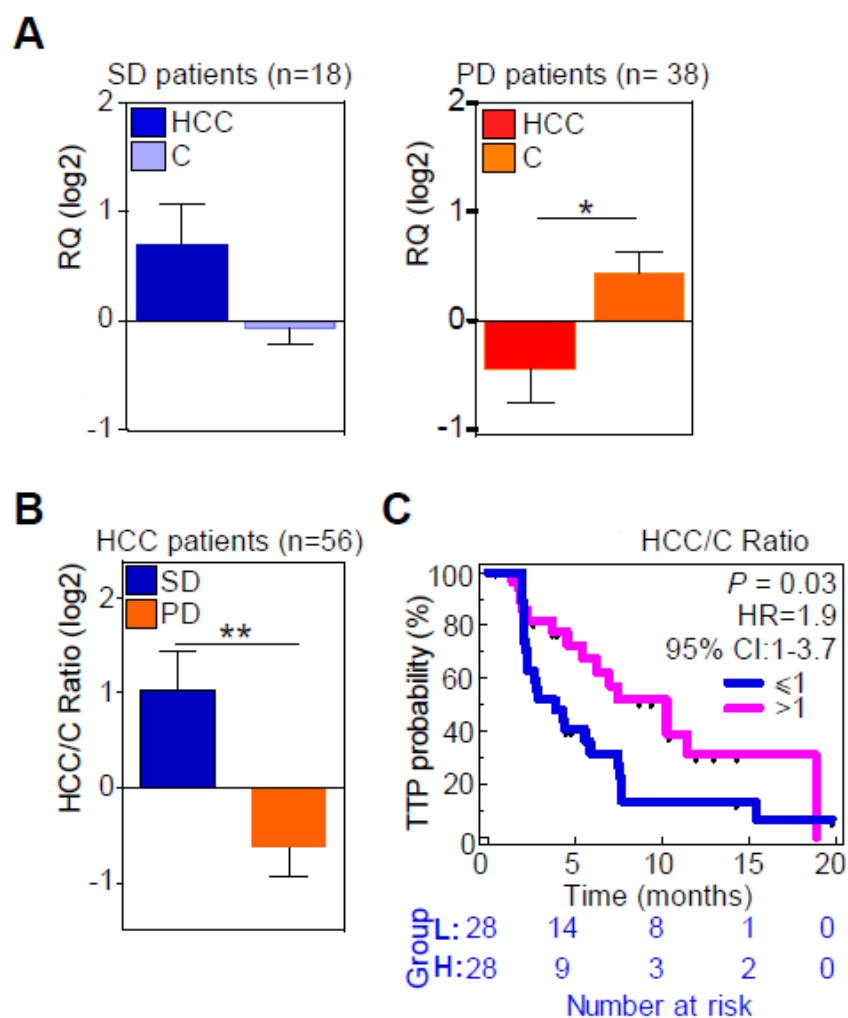


Figura 8.3.2.2. Rapporto tra i livelli di espressione di miR-*** nell'EC e nella cirrosi adiacente: A) Valutazione dell'espressione di miR-*** nella cirrosi di pazienti con stabilità di malattia (sinistra) e progressione (destra) attraverso qPCR. I risultati sono stati trasformati in log2 ($p=0.01$ paired t test), RQ=relative quantity; B) Rapporto EC/cirrosi dei livelli di miR-*** per ogni paziente trattato con Sorafenib ($n=56$) ($p=0.0049$); C) Curve di Kaplan-Meier per confrontare pazienti con EC in relazione ai valori del rapporto miR-*** EC/cirrosi (>1 versus ≤ 1). p values ottenuti da Log-Rank test. HR, Hazard Ratios. 95% CI, 95% Confidence Interval.

8.4 Discussione

Questo lavoro è stato incentrato sull'identificazione di marcatori molecolari predittivi di risposta al trattamento con Sorafenib in pazienti con EC avanzato. A questo fine l'attenzione è stata rivolta ai microRNA, piccoli RNA regolatori che svolgono un ruolo attivo sulla regolazione dei processi di espressione genica, ma che possono fungere anche da biomarcatori diagnostici, prognostici e predittivi di risposta ad un trattamento farmacologico.

Dall'analisi di espressione genica sono stati evidenziati 71 geni con espressione differenziale tra tessuto tumorale e controparte cirrotica: i livelli di espressione genica sono stati correlati con il follow-up, ovvero TTP, PFS e OST, al fine di selezionare un ristretto numero di miRNA significativamente associato ad essi (Tabelle 8.3.1.1 – 8.3.1.3). Abbiamo pertanto identificato 7

miRNA (miR-***, miR-155, miR-629, miR-101, miR-10b, miR-185 e miR-579) che sono stati successivamente validati in una seconda casistica di pazienti con EC trattati con Sorafenib.

Il risultato più che soddisfacente emerso da questa analisi riguarda il miR-***, che si è dimostrato essere fortemente associato a TTP e PFS: i suoi aumentati livelli di espressione risultano positivamente associati ad un maggior tempo trascorso tra l'inizio del trattamento con Sorafenib fino al manifestarsi di un evento clinico (TTP) (Figura 8.3.2.1 A) o alla constatazione di progressione di malattia (PFS) (Figura 8.3.2.1 B). Inoltre pazienti con elevati livelli di miR-*** mostrano una sopravvivenza maggiore rispetto a pazienti con bassa espressione ($p=0.025$, HR 1.7, Figura 8.3.2.1 C). Anche l'analisi multivariata conferma che miR-*** risulta essere il miglior fattore predittivo indipendente di progressione di malattia durante il trattamento con Sorafenib (TTP e PFS, Tabella 8.3.2.3). Non stupisce che, essendo miR-*** un oncosoppressore, aumentati livelli della sua espressione comportino un guadagno funzionale per il paziente a discapito della neoplasia. In letteratura non è presente alcun lavoro scientifico che abbia analizzato il ruolo svolto da miR-*** in relazione alla risposta a Sorafenib: pochi lavori, che hanno indagato il ruolo di questo microRNA nel contesto tumorale, si limitano a confermare la sua presenza costante in firme molecolari derivanti da studi di high-throughput relativi al cancro del colonretto [141] e della laringe [142], dove, nel caso di quest'ultimo, funge anche da marcatore di predizione dello sviluppo di metastasi linfonodali; inoltre in pazienti con carcinoma dell'esofago, trattati con 5-fluorouracile, è stata analizzata l'espressione di miR-***, insieme a quella di un ristretto numero di miRNA, poiché risulta spesso alterata in seguito al trattamento farmacologico [143].

Il nostro studio appare innovativo anche grazie all'identificazione di un parametro numerico in grado di selezionare pazienti maggiormente responsivi al trattamento con Sorafenib, sulla base della valutazione dell'espressione differenziale di miR-*** tra tessuto tumorale e parenchima cirrotico adiacente, condotta su biopsie epatiche.

In conclusione, l'informazione ottenuta da questo parametro numerico, grazie al quale identificare pazienti maggiormente suscettibili a risposta terapeutica, è un interessante dato molecolare utile nel supporto della pratica clinica e nella stratificazione di pazienti con EC avanzato, candidati a terapia con Sorafenib.

9. CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE

L'identificazione e validazione di marcatori molecolari in oncologia è un obiettivo primario della cosiddetta medicina traslazionale. L'EC è una neoplasia estremamente complessa per eziologia e comportamento clinico, la cui gestione è principalmente affidata a criteri clinico-radiologici. Questi ultimi riflettono in maniera insufficiente l'eterogeneità tumorale ponendo il problema della necessità di marcatori biologici che guidino in maniera più appropriata le scelte cliniche e terapeutiche. Questo studio rappresenta un contributo all'identificazione di nuovi marcatori molecolari ad uso clinico nell'EC, attraverso l'impiego di tecniche relativamente semplici ma familiari e standardizzate al biologo molecolare. In particolare sul versante diagnostico dell'EC di piccole dimensioni, l'utilizzo della molecola CHC dosata con tecnica immunocitochimica, rappresenta nelle nostre mani un valido strumento per migliorare l'accuratezza diagnostica della biopsia epatica. Il valore aggiunto del nostro contributo è stato quello di analizzare, attraverso una casistica del tutto indipendente ma rigorosamente testata, una molecola già proposta ma non ancora validata. Infatti la validazione di un marcatore e il suo utilizzo nella pratica clinica ne richiedono la positiva verifica da parte di almeno due gruppi di ricerca indipendenti, utilizzando la stessa tecnologia e casistiche relativamente omogenee.

Sul versante prognostico ci siamo occupati di un marcatore coinvolto nelle vie molecolari di stress ossidativo quale CYP1A2, che sono particolarmente importanti nell'EC per la ripresa di malattia, nel contesto della cosiddetta carcinogenesi de novo. La disregolazione dell'attività di questo citocromo era già stata suggerita, ancorchè non validata, come indicatore predittivo di ripresa tumorale, dopo resezione. Abbiamo perseguito la validazione di questo marcatore, a fronte di altri appartenenti alla stessa famiglia e già segnalati come disregolati nell'ambito di complesse firme molecolari associate a ripresa di malattia. Utilizzando un dosaggio immunocitochimico applicato al tessuto peritumorale abbiamo confermato come l'accresciuta espressione del citocromo CYP1A2 sia in grado di selezionare tumori caratterizzati da una ripresa più tardiva di malattia e dunque ottimali per una exeresi chirurgica. Il trasferimento di questa informazione in ambito clinico ci sembra di particolare interesse per la possibilità potenziale di offrire la terapia più adeguata (chirurgica, ablativa o farmacologica) a pazienti che altrimenti non sarebbero discriminabili in base alle attuali variabili clinico-radiologiche. Un necessario sviluppo di questo studio che intendiamo perseguire nel prossimo futuro è legato alla validazione dell'espressione del citocromo CYP1A2 su biopsie epatiche rispetto a campioni chirurgici. Una sostanziale riproducibilità del pattern di immunoreattività è un prerequisito per trasferire l'analisi di espressione di CYP1A2 su biopsie epatiche di pazienti con EC pretrattamento, che rappresentano la coorte ideale per le potenzialità applicative di questo marcatore.

Per ultimo abbiamo voluto esplorare uno degli ambiti al centro di un interesse esponenziale in oncologia ovvero quello dell'identificazione di marcatori predittivi di sensibilità terapeutica. Una molecola ad attività anti-tirosinochinasica è attualmente considerata lo standard of care delle forme avanzate di EC, ma a differenza di altri farmaci antitumorali (vedi Cetuximab e Gefitinib rispettivamente nei carcinomi del colonretto e del polmone) essa viene somministrata indipendentemente dall'accertamento della suscettibilità individuale all'azione del farmaco. Cio' a causa della mancanza di marcatori biologici idonei a selezionare i pazienti potenzialmente responsivi. Esplorando la famiglia dei miRNA, regolatori cruciali dei processi cellulari, ad azione in generale inibitoria della traduzione del messaggero, abbiamo progressivamente selezionato un numero ristretto di queste molecole, sino alla validazione, in due casistiche omogenee, di un unico miRNA. In particolare il rapporto quantitativo di espressione di detto miRNA tra tessuto tumorale e non tumorale si è rivelato in grado di predire, meglio di altre variabili biologiche e cliniche e con potenza statistica significativa, la risposta della neoplasia al trattamento. Con questo studio crediamo di avere compiuto un primo passo per la traduzione di tale informazione fondamentale in sede clinica. Di particolare interesse ci sembra l'aver generato non un valore assoluto potenzialmente influenzabile dalla tecnologia e dalla qualità di conservazione dei tessuti, bensì un parametro basato su un rapporto tra livelli di espressione del tessuto tumorale e non tumorale e dunque più facilmente riproducibile. Crediamo tuttavia essenziale la validazione di questo marcatore nell'ambito di una serie prospettica di casi come parte essenziale dello sviluppo futuro di questi studi.

10. BIBLIOGRAFIA

1. Ferenci, P., et al., *World Gastroenterology Organisation Guideline. Hepatocellular carcinoma (HCC): a global perspective*. J Gastrointest Liver Dis, 2010. **19**(3): p. 311-7.
2. *EASL-EORTC clinical practice guidelines: management of hepatocellular carcinoma*. Eur J Cancer, 2012. **48**(5): p. 599-641.
3. White, D.L., et al., *Genetic variants of glutathione S-transferase as possible risk factors for hepatocellular carcinoma: a HuGE systematic review and meta-analysis*. Am J Epidemiol, 2008. **167**(4): p. 377-89.
4. Tanabe, K.K., et al., *Epidermal growth factor gene functional polymorphism and the risk of hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis*. JAMA, 2008. **299**(1): p. 53-60.
5. Villanueva, A., et al., *New strategies in hepatocellular carcinoma: genomic prognostic markers*. Clin Cancer Res, 2010. **16**(19): p. 4688-94.
6. Lopez, J.B., *Recent developments in the first detection of hepatocellular carcinoma*. Clin Biochem Rev, 2005. **26**(3): p. 65-79.
7. Roncalli, M., Y.N. Park, and L. Di Tommaso, *Histopathological classification of hepatocellular carcinoma*. Dig Liver Dis, 2010. **42 Suppl 3**: p. S228-34.
8. Park, Y.N., *Update on precursor and early lesions of hepatocellular carcinomas*. Arch Pathol Lab Med, 2011. **135**(6): p. 704-15.
9. Ding, S.J., et al., *From proteomic analysis to clinical significance: overexpression of cytokeratin 19 correlates with hepatocellular carcinoma metastasis*. Mol Cell Proteomics, 2004. **3**(1): p. 73-81.
10. Durnez, A., et al., *The clinicopathological and prognostic relevance of cytokeratin 7 and 19 expression in hepatocellular carcinoma. A possible progenitor cell origin*. Histopathology, 2006. **49**(2): p. 138-51.
11. Ma, S., et al., *Identification and characterization of tumorigenic liver cancer stem/progenitor cells*. Gastroenterology, 2007. **132**(7): p. 2542-56.
12. Uenishi, T., et al., *Cytokeratin 19 expression in hepatocellular carcinoma predicts early postoperative recurrence*. Cancer Sci, 2003. **94**(10): p. 851-7.
13. Wu, P.C., et al., *Classification of hepatocellular carcinoma according to hepatocellular and biliary differentiation markers. Clinical and biological implications*. Am J Pathol, 1996. **149**(4): p. 1167-75.
14. Yamashita, T., et al., *EpCAM and alpha-fetoprotein expression defines novel prognostic subtypes of hepatocellular carcinoma*. Cancer Res, 2008. **68**(5): p. 1451-61.
15. Yamashita, T., et al., *EpCAM-positive hepatocellular carcinoma cells are tumor-initiating cells with stem/progenitor cell features*. Gastroenterology, 2009. **136**(3): p. 1012-24.
16. Yoon, D.S., et al., *Expression of biliary antigen and its clinical significance in hepatocellular carcinoma*. Yonsei Med J, 1999. **40**(5): p. 472-7.
17. Boyault, S., et al., *Transcriptome classification of HCC is related to gene alterations and to new therapeutic targets*. Hepatology, 2007. **45**(1): p. 42-52.
18. Forner, A., J.M. Llovet, and J. Bruix, *Hepatocellular carcinoma*. Lancet, 2012. **379**(9822): p. 1245-55.
19. Fung, J., C.L. Lai, and M.F. Yuen, *Hepatitis B and C virus-related carcinogenesis*. Clin Microbiol Infect, 2009. **15**(11): p. 964-70.
20. Cervello, M., et al., *Targeted therapy for hepatocellular carcinoma: novel agents on the horizon*. Oncotarget, 2012. **3**(3): p. 236-60.
21. Lachenmayer, A., et al., *Molecular approaches to treatment of hepatocellular carcinoma*. Dig Liver Dis, 2010. **42 Suppl 3**: p. S264-72.
22. Villanueva, A., S. Toffanin, and J.M. Llovet, *Linking molecular classification of hepatocellular carcinoma and personalized medicine: preliminary steps*. Curr Opin Oncol, 2008. **20**(4): p. 444-53.
23. Laurent-Puig, P., et al., *Genetic alterations associated with hepatocellular carcinomas define distinct pathways of hepatocarcinogenesis*. Gastroenterology, 2001. **120**(7): p. 1763-73.

24. Ye, Q.H., et al., *Predicting hepatitis B virus-positive metastatic hepatocellular carcinomas using gene expression profiling and supervised machine learning*. Nat Med, 2003. **9**(4): p. 416-23.
25. Kurokawa, Y., et al., *Molecular-based prediction of early recurrence in hepatocellular carcinoma*. J Hepatol, 2004. **41**(2): p. 284-91.
26. Lee, J.S., et al., *Classification and prediction of survival in hepatocellular carcinoma by gene expression profiling*. Hepatology, 2004. **40**(3): p. 667-76.
27. Lee, J.S., et al., *A novel prognostic subtype of human hepatocellular carcinoma derived from hepatic progenitor cells*. Nat Med, 2006. **12**(4): p. 410-6.
28. Budhu, A., et al., *Prediction of venous metastases, recurrence, and prognosis in hepatocellular carcinoma based on a unique immune response signature of the liver microenvironment*. Cancer Cell, 2006. **10**(2): p. 99-111.
29. Katoh, H., et al., *Genetically distinct and clinically relevant classification of hepatocellular carcinoma: putative therapeutic targets*. Gastroenterology, 2007. **133**(5): p. 1475-86.
30. Lee, R.C., R.L. Feinbaum, and V. Ambros, *The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14*. Cell, 1993. **75**(5): p. 843-54.
31. Wightman, B., I. Ha, and G. Ruvkun, *Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in C. elegans*. Cell, 1993. **75**(5): p. 855-62.
32. Calin, G.A., et al., *Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(9): p. 2999-3004.
33. Hatzia Apostolou, M., et al., *An HNF4alpha-miRNA inflammatory feedback circuit regulates hepatocellular oncogenesis*. Cell, 2011. **147**(6): p. 1233-47.
34. Pineau, P., et al., *miR-221 overexpression contributes to liver tumorigenesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(1): p. 264-9.
35. Gramantieri, L., et al., *MicroRNA involvement in hepatocellular carcinoma*. J Cell Mol Med, 2008. **12**(6A): p. 2189-204.
36. Henke, J.I., et al., *microRNA-122 stimulates translation of hepatitis C virus RNA*. EMBO J, 2008. **27**(24): p. 3300-10.
37. Braconi, C. and T. Patel, *MicroRNA expression profiling: a molecular tool for defining the phenotype of hepatocellular tumors*. Hepatology, 2008. **47**(6): p. 1807-9.
38. Budhu, A., et al., *Identification of metastasis-related microRNAs in hepatocellular carcinoma*. Hepatology, 2008. **47**(3): p. 897-907.
39. Coulouarn, C., et al., *Loss of miR-122 expression in liver cancer correlates with suppression of the hepatic phenotype and gain of metastatic properties*. Oncogene, 2009. **28**(40): p. 3526-36.
40. Girard, M., et al., *miR-122, a paradigm for the role of microRNAs in the liver*. J Hepatol, 2008. **48**(4): p. 648-56.
41. Ji, J., et al., *Identification of microRNA-181 by genome-wide screening as a critical player in EpCAM-positive hepatic cancer stem cells*. Hepatology, 2009. **50**(2): p. 472-80.
42. Ji, J., T. Yamashita, and X.W. Wang, *Wnt/beta-catenin signaling activates microRNA-181 expression in hepatocellular carcinoma*. Cell Biosci, 2011. **1**(1): p. 4.
43. Varnholt, H., et al., *MicroRNA gene expression profile of hepatitis C virus-associated hepatocellular carcinoma*. Hepatology, 2008. **47**(4): p. 1223-32.
44. Gramantieri, L., et al., *Cyclin G1 is a target of miR-122a, a microRNA frequently down-regulated in human hepatocellular carcinoma*. Cancer Res, 2007. **67**(13): p. 6092-9.
45. Chen, P.J., et al., *Androgen pathway stimulates microRNA-216a transcription to suppress the tumor suppressor in lung cancer-1 gene in early hepatocarcinogenesis*. Hepatology, 2012. **56**(2): p. 632-43.
46. Jiang, R., et al., *miR-22 promotes HBV-related hepatocellular carcinoma development in males*. Clin Cancer Res, 2011. **17**(17): p. 5593-603.
47. Cardin, R., *Oxidative dna damage correlates with cell immortalization and mir-92 expression in hepatocellular carcinoma*. BMC Cancer, 2012. **12**.
48. Wu, N., et al., *MicroRNA-373, a new regulator of protein phosphatase 6, functions as an oncogene in hepatocellular carcinoma*. FEBS J, 2011. **278**(12): p. 2044-54.

49. Zheng, Y., et al., *miR-376a suppresses proliferation and induces apoptosis in hepatocellular carcinoma*. FEBS Lett, 2012. **586**(16): p. 2396-403.
50. Buurman, R., et al., *Histone deacetylases activate hepatocyte growth factor signaling by repressing microRNA-449 in hepatocellular carcinoma cells*. Gastroenterology, 2012. **143**(3): p. 811-20 e1-15.
51. Zhao, A., et al., *MicroRNA-125b induces cancer cell apoptosis through suppression of Bcl-2 expression*. J Genet Genomics, 2012. **39**(1): p. 29-35.
52. Wang, W., et al., *MiR-138 induces cell cycle arrest by targeting cyclin D3 in hepatocellular carcinoma*. Carcinogenesis, 2012. **33**(5): p. 1113-20.
53. Zhou, J., et al., *Plasma microRNA panel to diagnose hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma*. J Clin Oncol, 2011. **29**(36): p. 4781-8.
54. He, X.X., et al., *MicroRNA-375 targets AEG-1 in hepatocellular carcinoma and suppresses liver cancer cell growth in vitro and in vivo*. Oncogene, 2012. **31**(28): p. 3357-69.
55. Tan, S., et al., *miR-198 inhibits migration and invasion of hepatocellular carcinoma cells by targeting the HGF/c-MET pathway*. FEBS Lett, 2011. **585**(14): p. 2229-34.
56. Gao, P., et al., *Deregulation of microRNA expression occurs early and accumulates in early stages of HBV-associated multistep hepatocarcinogenesis*. J Hepatol, 2011. **54**(6): p. 1177-84.
57. Jiang, X., et al., *MicroRNA-590-5p regulates proliferation and invasion in human hepatocellular carcinoma cells by targeting TGF-beta RII*. Mol Cells, 2012. **33**(6): p. 545-51.
58. Ying, Q., et al., *Hypoxia-inducible microRNA-210 augments the metastatic potential of tumor cells by targeting vacuole membrane protein 1 in hepatocellular carcinoma*. Hepatology, 2011. **54**(6): p. 2064-75.
59. Wang, C., et al., *Underexpressed microRNA-199b-5p targets hypoxia-inducible factor-1alpha in hepatocellular carcinoma and predicts prognosis of hepatocellular carcinoma patients*. J Gastroenterol Hepatol, 2011. **26**(11): p. 1630-7.
60. Huang, N., et al., *MiR-219-5p inhibits hepatocellular carcinoma cell proliferation by targeting glypican-3*. FEBS Lett, 2012. **586**(6): p. 884-91.
61. Liu, S., et al., *MicroRNA-135a contributes to the development of portal vein tumor thrombus by promoting metastasis in hepatocellular carcinoma*. J Hepatol, 2012. **56**(2): p. 389-96.
62. Jiang, J., et al., *Association of MicroRNA expression in hepatocellular carcinomas with hepatitis infection, cirrhosis, and patient survival*. Clin Cancer Res, 2008. **14**(2): p. 419-27.
63. Han, Z.B., et al., *Identification of recurrence-related microRNAs in hepatocellular carcinoma following liver transplantation*. Mol Oncol, 2012. **6**(4): p. 445-57.
64. Augello, C., et al., *MicroRNA profiling of hepatocarcinogenesis identifies C19MC cluster as a novel prognostic biomarker in hepatocellular carcinoma*. Liver Int, 2012. **32**(5): p. 772-82.
65. Hoshida, Y., et al., *Molecular classification and novel targets in hepatocellular carcinoma: recent advancements*. Semin Liver Dis, 2010. **30**(1): p. 35-51.
66. Villanueva, A., et al., *Combining clinical, pathology, and gene expression data to predict recurrence of hepatocellular carcinoma*. Gastroenterology, 2011. **140**(5): p. 1501-12 e2.
67. Hoshida, Y., et al., *Gene expression in fixed tissues and outcome in hepatocellular carcinoma*. N Engl J Med, 2008. **359**(19): p. 1995-2004.
68. Naugler, W.E., et al., *Gender disparity in liver cancer due to sex differences in MyD88-dependent IL-6 production*. Science, 2007. **317**(5834): p. 121-4.
69. Bruix, J. and M. Sherman, *Management of hepatocellular carcinoma*. Hepatology, 2005. **42**(5): p. 1208-36.
70. Tateishi, R., et al., *Diagnostic accuracy of tumor markers for hepatocellular carcinoma: a systematic review*. Hepatol Int, 2008. **2**(1): p. 17-30.
71. Roncalli, M., et al., *The vascular profile of regenerative and dysplastic nodules of the cirrhotic liver: implications for diagnosis and classification*. Hepatology, 1999. **30**(5): p. 1174-8.
72. Llovet, J.M., et al., *A molecular signature to discriminate dysplastic nodules from early hepatocellular carcinoma in HCV cirrhosis*. Gastroenterology, 2006. **131**(6): p. 1758-67.
73. Park, Y.N., et al., *Ductular reaction is helpful in defining early stromal invasion, small hepatocellular carcinomas, and dysplastic nodules*. Cancer, 2007. **109**(5): p. 915-23.

74. Paradis, V., et al., *Molecular profiling of hepatocellular carcinomas (HCC) using a large-scale real-time RT-PCR approach: determination of a molecular diagnostic index*. Am J Pathol, 2003. **163**(2): p. 733-41.
75. Nam, S.W., et al., *Molecular changes from dysplastic nodule to hepatocellular carcinoma through gene expression profiling*. Hepatology, 2005. **42**(4): p. 809-18.
76. Wurmbach, E., et al., *Genome-wide molecular profiles of HCV-induced dysplasia and hepatocellular carcinoma*. Hepatology, 2007. **45**(4): p. 938-47.
77. Gonzalez, A.D., et al., *OCI-5/GPC3, a glypican encoded by a gene that is mutated in the Simpson-Golabi-Behmel overgrowth syndrome, induces apoptosis in a cell line-specific manner*. J Cell Biol, 1998. **141**(6): p. 1407-14.
78. Filmus, J., *Glypicans in growth control and cancer*. Glycobiology, 2001. **11**(3): p. 19R-23R.
79. Capurro, M.I., et al., *Glypican-3 promotes the growth of hepatocellular carcinoma by stimulating canonical Wnt signaling*. Cancer Res, 2005. **65**(14): p. 6245-54.
80. Filmus, J., M. Capurro, and J. Rast, *Glypicans*. Genome Biol, 2008. **9**(5): p. 224.
81. Cheng, W., et al., *Glypican-3-mediated oncogenesis involves the Insulin-like growth factor-signaling pathway*. Carcinogenesis, 2008. **29**(7): p. 1319-26.
82. Tangkijvanich, P., et al., *Diagnostic role of serum glypican-3 in differentiating hepatocellular carcinoma from non-malignant chronic liver disease and other liver cancers*. J Gastroenterol Hepatol, 2010. **25**(1): p. 129-37.
83. Zynger, D.L., et al., *Expression of glypican 3 in hepatoblastoma: an immunohistochemical study of 65 cases*. Hum Pathol, 2008. **39**(2): p. 224-30.
84. Shafizadeh, N. and S. Kakar, *Diagnosis of well-differentiated hepatocellular lesions: role of immunohistochemistry and other ancillary techniques*. Adv Anat Pathol, 2011. **18**(6): p. 438-45.
85. Wang, X.Y., et al., *Glypican-3 expression in hepatocellular tumors: diagnostic value for preneoplastic lesions and hepatocellular carcinomas*. Hum Pathol, 2006. **37**(11): p. 1435-41.
86. Moorman, A.F., et al., *Complementary distribution of carbamoylphosphate synthetase (ammonia) and glutamine synthetase in rat liver acinus is regulated at a pretranslational level*. J Histochem Cytochem, 1988. **36**(7): p. 751-5.
87. Moorman, A.F., et al., *Localization of ammonia-metabolizing enzymes in human liver: ontogenesis of heterogeneity*. Hepatology, 1989. **9**(3): p. 367-72.
88. Poyck, P.P., et al., *Expression of glutamine synthetase and carbamoylphosphate synthetase i in a bioartificial liver: markers for the development of zonation in vitro*. Cells Tissues Organs, 2008. **188**(3): p. 259-69.
89. Parry-Billings, M., et al., *The effect of tumour bearing on skeletal muscle glutamine metabolism*. Int J Biochem, 1991. **23**(9): p. 933-7.
90. Souba, W.W., *Glutamine and cancer*. Ann Surg, 1993. **218**(6): p. 715-28.
91. Theimer, W., *[The glutamine levels in the serum of tumor patients]*. Klin Wochenschr, 1968. **46**(1): p. 49.
92. Kuramitsu, Y., et al., *Increased expression and phosphorylation of liver glutamine synthetase in well-differentiated hepatocellular carcinoma tissues from patients infected with hepatitis C virus*. Electrophoresis, 2006. **27**(8): p. 1651-8.
93. Osada, T., et al., *Prognostic significance of glutamine synthetase expression in unifocal advanced hepatocellular carcinoma*. J Hepatol, 2000. **33**(2): p. 247-53.
94. Austinat, M., et al., *Correlation between beta-catenin mutations and expression of Wnt-signaling target genes in hepatocellular carcinoma*. Mol Cancer, 2008. **7**: p. 21.
95. Ciocca, D.R. and S.K. Calderwood, *Heat shock proteins in cancer: diagnostic, prognostic, predictive, and treatment implications*. Cell Stress Chaperones, 2005. **10**(2): p. 86-103.
96. Garrido, C., et al., *Heat shock proteins: endogenous modulators of apoptotic cell death*. Biochem Biophys Res Commun, 2001. **286**(3): p. 433-42.
97. Conner, S.D. and S.L. Schmid, *Regulated portals of entry into the cell*. Nature, 2003. **422**(6927): p. 37-44.
98. Kirchhausen, T., *Clathrin*. Annu Rev Biochem, 2000. **69**: p. 699-727.

99. Royle, S.J., N.A. Bright, and L. Lagnado, *Clathrin is required for the function of the mitotic spindle*. *Nature*, 2005. **434**(7037): p. 1152-7.
100. Enari, M., et al., *Requirement of clathrin heavy chain for p53-mediated transcription*. *Genes Dev*, 2006. **20**(9): p. 1087-99.
101. Endo, Y., et al., *Regulation of clathrin-mediated endocytosis by p53*. *Genes Cells*, 2008. **13**(4): p. 375-86.
102. Wetthey, F.R., et al., *Controlled elimination of clathrin heavy-chain expression in DT40 lymphocytes*. *Science*, 2002. **297**(5586): p. 1521-5.
103. Seimiya, M., et al., *Identification of novel immunohistochemical tumor markers for primary hepatocellular carcinoma; clathrin heavy chain and formiminotransferase cyclodeaminase*. *Hepatology*, 2008. **48**(2): p. 519-30.
104. Argani, P., et al., *A novel CLTC-TFE3 gene fusion in pediatric renal adenocarcinoma with t(X;17)(p11.2;q23)*. *Oncogene*, 2003. **22**(34): p. 5374-8.
105. Bridge, J.A., et al., *Fusion of the ALK gene to the clathrin heavy chain gene, CLTC, in inflammatory myofibroblastic tumor*. *Am J Pathol*, 2001. **159**(2): p. 411-5.
106. Chikatsu, N., et al., *ALK+, CD30-, CD20- large B-cell lymphoma containing anaplastic lymphoma kinase (ALK) fused to clathrin heavy chain gene (CLTC)*. *Mod Pathol*, 2003. **16**(8): p. 828-32.
107. Ma, Z., et al., *Fusion of ALK to the Ran-binding protein 2 (RANBP2) gene in inflammatory myofibroblastic tumor*. *Genes Chromosomes Cancer*, 2003. **37**(1): p. 98-105.
108. Di Tommaso, L., et al., *Diagnostic value of HSP70, glypican 3, and glutamine synthetase in hepatocellular nodules in cirrhosis*. *Hepatology*, 2007. **45**(3): p. 725-34.
109. Di Tommaso, L., et al., *The application of markers (HSP70 GPC3 and GS) in liver biopsies is useful for detection of hepatocellular carcinoma*. *J Hepatol*, 2009. **50**(4): p. 746-54.
110. Bruix, J. and M. Sherman, *Management of hepatocellular carcinoma: an update*. *Hepatology*, 2011. **53**(3): p. 1020-2.
111. Chuma, M., et al., *Expression profiling in multistage hepatocarcinogenesis: identification of HSP70 as a molecular marker of early hepatocellular carcinoma*. *Hepatology*, 2003. **37**(1): p. 198-207.
112. *Pathologic diagnosis of early hepatocellular carcinoma: a report of the international consensus group for hepatocellular neoplasia*. *Hepatology*, 2009. **49**(2): p. 658-64.
113. Di Tommaso, L., et al., *Diagnostic accuracy of clathrin heavy chain staining in a marker panel for the diagnosis of small hepatocellular carcinoma*. *Hepatology*, 2011. **53**(5): p. 1549-57.
114. Tanaka, S., et al., *Oxidative stress pathways in noncancerous human liver tissue to predict hepatocellular carcinoma recurrence: a prospective, multicenter study*. *Hepatology*, 2011. **54**(4): p. 1273-81.
115. Choi, J., et al., *Reactive oxygen species suppress hepatitis C virus RNA replication in human hepatoma cells*. *Hepatology*, 2004. **39**(1): p. 81-9.
116. Sakurai, T., et al., *Hepatocyte necrosis induced by oxidative stress and IL-1 alpha release mediate carcinogen-induced compensatory proliferation and liver tumorigenesis*. *Cancer Cell*, 2008. **14**(2): p. 156-65.
117. Renton, K.W., *Cytochrome P450 regulation and drug biotransformation during inflammation and infection*. *Curr Drug Metab*, 2004. **5**(3): p. 235-43.
118. Barker, C.W., J.B. Fagan, and D.S. Pasco, *Down-regulation of P4501A1 and P4501A2 mRNA expression in isolated hepatocytes by oxidative stress*. *J Biol Chem*, 1994. **269**(6): p. 3985-90.
119. Zhou, S.F., et al., *Structure, function, regulation and polymorphism and the clinical significance of human cytochrome P450 1A2*. *Drug Metab Rev*, 2010. **42**(2): p. 268-354.
120. Nakai, K., et al., *Decreased expression of cytochromes P450 1A2, 2E1, and 3A4 and drug transporters Na+-taurocholate-cotransporting polypeptide, organic cation transporter 1, and organic anion-transporting peptide-C correlates with the progression of liver fibrosis in chronic hepatitis C patients*. *Drug Metab Dispos*, 2008. **36**(9): p. 1786-93.
121. Tarao, K., et al., *Association between high serum alanine aminotransferase levels and more rapid development and higher rate of incidence of hepatocellular carcinoma in patients with hepatitis C virus-associated cirrhosis*. *Cancer*, 1999. **86**(4): p. 589-95.

122. Okamoto, M., et al., *Specific gene-expression profiles of noncancerous liver tissue predict the risk for multicentric occurrence of hepatocellular carcinoma in hepatitis C virus-positive patients*. *Ann Surg Oncol*, 2006. **13**(7): p. 947-54.
123. Llovet, J.M., et al., *Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma*. *N Engl J Med*, 2008. **359**(4): p. 378-90.
124. Wenger, J.B., et al., *Can we develop effective combination antiangiogenic therapy for patients with hepatocellular carcinoma?* *Oncol Rev*, 2011. **5**(3): p. 177-184.
125. Cheng, A.L., et al., *Efficacy and safety of sorafenib in patients in the Asia-Pacific region with advanced hepatocellular carcinoma: a phase III randomised, double-blind, placebo-controlled trial*. *Lancet Oncol*, 2009. **10**(1): p. 25-34.
126. Faivre, S., M. Bouattour, and E. Raymond, *Novel molecular therapies in hepatocellular carcinoma*. *Liver Int*, 2011. **31 Suppl 1**: p. 151-60.
127. Kudo, M., *Future treatment option for hepatocellular carcinoma: a focus on brivanib*. *Dig Dis*, 2011. **29**(3): p. 316-20.
128. Lord, R., A. Suddle, and P.J. Ross, *Emerging strategies in the treatment of advanced hepatocellular carcinoma: the role of targeted therapies*. *Int J Clin Pract*, 2011. **65**(2): p. 182-8.
129. Pircher, A., M. Medinger, and J. Drevs, *Liver cancer: Targeted future options*. *World J Hepatol*, 2011. **3**(2): p. 38-44.
130. Porta, C. and C. Paglino, *Medical treatment of unresectable hepatocellular carcinoma: Going beyond sorafenib*. *World J Hepatol*, 2010. **2**(3): p. 103-13.
131. Shen, Y.C., C. Hsu, and A.L. Cheng, *Molecular targeted therapy for advanced hepatocellular carcinoma: current status and future perspectives*. *J Gastroenterol*, 2010. **45**(8): p. 794-807.
132. Villanueva, A. and J.M. Llovet, *Targeted therapies for hepatocellular carcinoma*. *Gastroenterology*, 2011. **140**(5): p. 1410-26.
133. Santoro, A., et al., *Tivantinib for second-line treatment of advanced hepatocellular carcinoma: a randomised, placebo-controlled phase 2 study*. *Lancet Oncol*, 2012.
134. Miyahara, K., et al., *Predicting the treatment effect of sorafenib using serum angiogenesis markers in patients with hepatocellular carcinoma*. *J Gastroenterol Hepatol*, 2011. **26**(11): p. 1604-11.
135. Personeni, N., et al., *Usefulness of alpha-fetoprotein response in patients treated with sorafenib for advanced hepatocellular carcinoma*. *J Hepatol*, 2012. **57**(1): p. 101-7.
136. Abou-Alfa, G.K., et al., *Phase II study of sorafenib in patients with advanced hepatocellular carcinoma*. *J Clin Oncol*, 2006. **24**(26): p. 4293-300.
137. Bai, S., et al., *MicroRNA-122 inhibits tumorigenic properties of hepatocellular carcinoma cells and sensitizes these cells to sorafenib*. *J Biol Chem*, 2009. **284**(46): p. 32015-27.
138. Shimizu, S., et al., *The let-7 family of microRNAs inhibits Bcl-xL expression and potentiates sorafenib-induced apoptosis in human hepatocellular carcinoma*. *J Hepatol*, 2010. **52**(5): p. 698-704.
139. Braconi, C., et al., *Hepatitis C virus proteins modulate microRNA expression and chemosensitivity in malignant hepatocytes*. *Clin Cancer Res*, 2010. **16**(3): p. 957-66.
140. Zhou, C., et al., *microRNA-1274a, a modulator of sorafenib induced a disintegrin and metalloproteinase 9 (ADAM9) down-regulation in hepatocellular carcinoma*. *FEBS Lett*, 2011. **585**(12): p. 1828-34.
141. Chang, K.H., et al., *MicroRNA expression profiling to identify and validate reference genes for relative quantification in colorectal cancer*. *BMC Cancer*, 2010. **10**: p. 173.
142. Li, L., et al., *[DNA microarrays-based microRNA expression profiles derived from formalin-fixed paraffin-embedded tissue blocks of squamous cell carcinoma of larynx]*. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi*, 2010. **39**(6): p. 391-5.
143. Hummel, R., et al., *Chemotherapy-induced modification of microRNA expression in esophageal cancer*. *Oncol Rep*, 2011. **26**(4): p. 1011-7.
144. Garzon, R., G. Marcucci, and C.M. Croce, *Targeting microRNAs in cancer: rationale, strategies and challenges*. *Nat Rev Drug Discov*, 2010. **9**(10): p. 775-89.
145. Kong, Y.W., et al., *microRNAs in cancer management*. *Lancet Oncol*, 2012. **13**(6): p. e249-58.

11. PUBBLICAZIONI ED ABSTRACT

Di Tommaso L, Destro A, Fabbris V, **Spagnuolo G**, Laura Fracanzani A, Fargion S, Maggioni M, Patriarca C, Maria Macchi R, Quagliuolo M, Borzio M, Iavarone M, Sangiovanni A, Colombo M, Roncalli M.

Diagnostic accuracy of clathrin heavy chain staining in a marker panel for the diagnosis of small hepatocellular carcinoma.

Hepatology. 2011 May; 53(5): 1549-57 IF 10.885

ABSTRACT A CONGRESSO:

1. L. Di Tommaso, A. Destro, B. Fernandes, L. Valieri, **G. Spagnuolo**, E. Morengi, C. Galli, G. Torzilli, M. Montorsi, M. Roncalli
Tissue biomarkers as predictors of hepatocellular carcinoma outcome 2010
Gastrointestinal Cancers Symposium , January 22 - 24, 2010, Orlando
2. L. Di Tommaso, A. Destro, V. Fabbris, **G. Spagnuolo**, A.L. Fracanzani, S. Fargion, M. Maggioni, C. Patriarca, R.M. Macchi, M. Quagliuolo, M. Borzio, M. Roncalli.
The diagnostic accuracy of a panel of 4 immunomarkers (GPC3, HSP70, GS, CHC) for the detection of small HCC in liver microbiopsies

EASL, 25-27 June, 2010 Dubrovnik
3. L. Di Tommaso, A. Destro, V. Fabbris, **G. Spagnuolo**, A.L. Fracanzani, S. Fargion, M. Maggioni, C. Patriarca, R.M. Macchi, M. Quagliuolo, M. Borzio, M. Roncalli.
The diagnostic accuracy of a panel of 4 immunomarkers (GPC3, HSP70, GS, CHC) for the detection of small HCC on liver microbiopsies.

HCC Eastern & Western Experiences, 14-15 January, 2011 Parigi
4. Di Tommaso L, Destro A, **Spagnuolo G**, Torzilli G, Park YN, Roncalli M.
Proliferation and apoptosis in human hepatocarcinogenesis. A morphological study.

ILCA, 2-4 September, 2011 Hong Kong