



**Università
degli Studi
di Ferrara**

**DOTTORATO DI RICERCA IN
MEDICINA MOLECOLARE E FARMACOLOGIA**

CICLO XXXI

COORDINATORE Prof. Di Virgilio Francesco

Studio del potenziale terapeutico del miR-199a-3p come agente di profilassi e anti-tumorale in modelli pre-clinici di epatocarcinoma

Settore Scientifico Disciplinare MED/06

Dottoranda

Dott.ssa Guerriero Paola

Tutore

Prof. Negrini Massimo

Anni 2015/2018

INDICE

1. INTRODUZIONE	5
1.1 L'epatocarcinoma cellulare (HCC)	5
1.1.1 Epatocarcinoma: caratteristiche e prognosi.....	5
1.1.2 Meccanismi molecolari coinvolti nell'epatocarcinogenesi.....	8
1.1.3 Fibrosi e cirrosi nell'epatocarcinogenesi	9
1.1.4 Vie di segnalazione alterate in HCC.....	10
1.1.5 Terapie molecolari contro l'HCC	14
1.2 microRNA	17
1.2.1 Biogenesi e funzioni biomolecolari dei microRNA	17
1.2.2 miRNA ed HCC	20
1.2.3 miRNA come agenti o bersagli terapeutici.....	22
1.3 Il modello TG221	24
2. SCOPO DELLA TESI.....	29
3. MATERIALI E METODI.....	31
3.1 Linee cellulari.....	31
3.2 Vettore AAVV-199 e Infezione	31
3.3 Saggi di vitalità e apoptosi	31
3.4 Modello murino TG221 DEN e CCl4	32
3.5 Oligonucleotidi a RNA per la terapia <i>in vivo</i>	33
3.6 Nanoparticelle lipidiche	34
3.7 Farmaci anti-tumorali	35
3.8 Quantificazione di ascite	35
3.9 Procedure istologiche	35
3.10 Criteri morfologici utilizzati per la classificazione dei noduli epatici.....	36
3.11 Estrazione di RNA e analisi tramite "droplet digital PCR"	36
3.12 Analisi dell'espressione genica tramite tecnologia microarray.....	38
3.13 Analisi dei livelli proteici tramite Western Blot	39
3.14 Analisi statistiche	40
4. RISULTATI.....	41
4.1 Il miR-199a-3p ha un effetto pro-apoptotico sulle linee cellulari Hep3B e HepG2....	41
4.2 Il miR-199a-3p induce la regolazione di PAK4 e MTOR in linee cellulari umane.....	42
4.3 Il miR-199a-3p può essere veicolato efficientemente <i>in vivo</i> sfruttando le nanoparticelle lipidiche (NP)	43
4.4 Il miR-199a-3p rallenta la crescita tumorale nel modello murino TG221	46
4.5 Analisi molecolari degli effetti del miR-199a-3p in tessuti epatici normali e tumorali.....	48
4.6 Il modello murino TG221 CCl4 sviluppa HCC in un ambiente cirrotico.....	52
4.7 Confronto molecolare tra modello TG221 DEN e TG221 CCl4	59
4.8 Il trattamento di profilassi con il mimic miR-199a-3p previene lo sviluppo di lesioni maligne.....	61

5. DISCUSSIONE	66
5.1 Veicolazione <i>in vivo</i> di miRNA mimics	66
5.2 Importanza del modello di studio	69
5.3 Molecole mimics del miR-199a-3p hanno un effetto terapeutico	72
5.4 Vie Molecolari: PAK4 e MTOR.....	75
6. CONCLUSIONI	83
ELENCO DELLE ABBREVIAZIONI	85
BIBLIOGRAFIA	88

1. INTRODUZIONE

1.1 L'epatocarcinoma cellulare (HCC)

1.1.1 Epatocarcinoma: caratteristiche e prognosi

L'epatocarcinoma (HCC) è il più comune dei tumori epatici maligni. Esso rappresenta circa il 90% dei casi, mentre i rimanenti sono costituiti principalmente da colangiocarcinomi. Diversamente dalla maggior parte dei tumori umani, i fattori di rischio per lo sviluppo di HCC sono noti [1]. Essi includono epatite cronica di origine virale (tipi B e C), abuso di alcol, esposizione a Aflatossina B, steatoepatite non alcolica (NASH), steatosi epatica non alcolica (NAFLD) e patologie metaboliche, come la emocromatosi [2, 3]. La maggior parte di questi fattori induce danni epatici cronici che portano allo sviluppo di fibrosi e cirrosi. Oltre l'80% dei casi di HCC si sviluppa su fegato cirrotico, che rappresenta perciò la principale condizione predisponente ad HCC. Inoltre, HCC si riscontra più frequentemente negli individui di sesso maschile, con un rapporto di circa 3:1 [1].

L'incidenza di HCC è strettamente correlata con l'epatite cronica di origine virale e presenta importanti differenze a livello geografico. La più alta incidenza di HCC si osserva in Asia e nell'Africa Sub-Sahariana dove è alta l'infezione da virus dell'epatite B (HBV). Oltre il 50% dei casi è attribuibile ad infezione da HBV. Fino all'85% di questi casi sviluppano cirrosi. La Mongolia presenta la più alta incidenza al mondo con 78 casi / 100.000 all'anno. In Africa, l'esposizione ad aflatossina B1, un contaminante alimentare prodotto dal fungo *Aspergillus flavus*, rappresenta un importante cofattore e circa il 60% degli HCC presenta evidenza di esposizione a tale sostanza. In queste aree, l'esposizione ad aflatossina giustifica la comparsa di HCC in età più precoce rispetto al resto del mondo. Nei Paesi occidentali l'incidenza di HCC è prevalentemente associata ad infezione da virus dell'epatite C (HCV) e alcolismo [4]. Queste condizioni patologiche croniche provocano l'insorgenza di fibrosi e di cirrosi [3]. Nei paesi occidentali, un crescente fattore di rischio per HCC è la sindrome metabolica associata a diabete ed obesità, che è associata a NAFLD ed a NASH. In queste condizioni, circa il 40% dei casi di HCC si presenta in un fegato non cirrotico.

Globalmente, con circa 850.000 casi ed 800.000 morti all'anno, i tumori al fegato costituiscono la sesta più frequente neoplasia e la seconda causa di morte

correlata a cancro a livello mondiale e rappresentano perciò un rilevante problema di salute [1, 5, 6].

Nelle fasi iniziali, HCC è asintomatico e perciò esso viene spesso riconosciuto e diagnosticato in fasi avanzate. La diagnosi di HCC è effettuata tramite approcci di imaging strumentale, quali ecografia, Tomografia computerizzata (CT scan) e Risonanza Magnetica (MRI) [3], insieme a biomarcatori circolanti, quali la determinazione dei livelli sierici di AFP, che tuttavia non è raccomandata nelle linee guida americane ed europee. In presenza di criteri diagnostici tipici per HCC, alle tecniche di immagine non è raccomandata la biopsia. Il trattamento viene pianificato in base alla stadiazione del tumore e alla funzione epatica [2].

Diversamente dalla maggior parte dei tumori, la stadiazione del HCC perciò non si basa sul sistema TNM. Diversi sono i sistemi di stadiazione proposti nel corso degli anni ed ancor oggi non esiste un sistema globalmente accettato. Tuttavia, il sistema che attualmente consente di meglio riconoscere pazienti a stadi precoci e guidare la strategia terapeutica è il BCLC (Barcelona Clinic Liver Cancer). Tale sistema, basandosi sulle dimensioni tumorali e sulla funzionalità epatica ed il "performance status" del paziente, divide i pazienti in 5 classi prognostiche, per ognuna delle quali è associato un appropriato approccio terapeutico (**Figura 1**) [7].

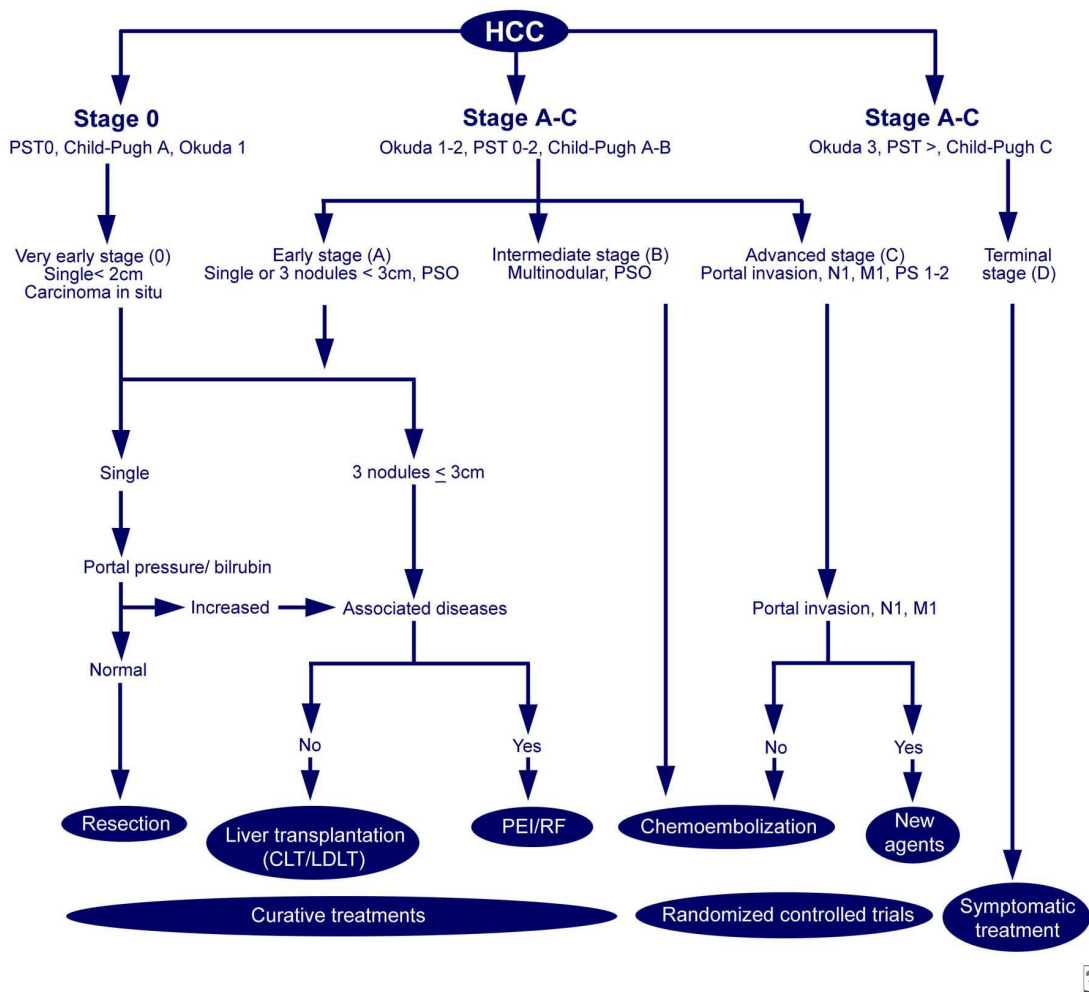


Figura 1. Il sistema BCLC per la gestione dei pazienti con HCC. Immagine da ["https://emedicine.medscape.com/article/197319-overview"](https://emedicine.medscape.com/article/197319-overview)

Dallo schema di Figura 1, si evince che i pazienti con HCC molto precoce o precoce (Stadio 0 e A) possono usufruire dei trattamenti curativi, come resezione del tumore, ablazione e trapianto di fegato. Chi presenta un HCC intermedio (Stadio B) o avanzato (Stadio C) può beneficiare di trattamenti palliativi, rispettivamente chemoembolizzazione e Sorafenib, in grado di migliorare la sopravvivenza in termini di durata e qualità. Infine, pazienti con HCC in stadio terminale (D) possono beneficiare solamente di trattamenti sintomatici [1, 3].

A causa della natura asintomatica del HCC in stadio precoce, solo il 30% dei pazienti è diagnosticato quando la malattia è in fase iniziale, condizione in cui le terapie curative sono ancora applicabili [2, 8]. Anche in questi casi, però, a distanza di 5 anni dall'intervento, circa il 70% dei pazienti sviluppa HCC *de novo*, oppure recidive correlate al tumore primario [3]. Nei casi di HCC in fase avanzata,

l'unica terapia sistemica approvata per il trattamento in prima linea di HCC avanzato è il Sorafenib, un inibitore multi-chinasico, che permette di allungare la sopravvivenza totale fino a 11 mesi dopo la diagnosi [2, 9]. L'HCC risulta quindi ancora un tumore con una prognosi sfavorevole, dovuta alla sua elevata ricorrenza ed inevitabile progressione [10].

Le terapie dirette contro bersagli molecolari hanno cambiato il panorama dei trattamenti per diversi tipi di cancro, ma nel caso del HCC, per un decennio, solo il Sorafenib ha dimostrato una qualche efficacia nella terapia. Nel 2018 sono state approvate nuove terapie molecolari contro HCC avanzato, descritte più approfonditamente in seguito, tuttavia queste, come il Sorafenib, permettono di aumentare la sopravvivenza dei pazienti soltanto di pochi mesi [1]. È quindi essenziale comprendere meglio quali sono gli eventi molecolari dell'insorgenza e progressione del HCC per identificare nuovi bersagli terapeutici [2].

1.1.2 Meccanismi molecolari coinvolti nell'epatocarcinogenesi

L'insorgenza di HCC è un processo multi-fase: durante la fase cirrotica preneoplastica, compaiono i noduli cirrotici con un basso grado di displasia (LGDN) che evolvono in noduli con alto grado di displasia (HGDN). Questi possono trasformarsi e dare avvio alla fase neoplastica, che avanza da HCC precoce, a intermedio, ad avanzato [3, 11]. Le attuali conoscenze molecolari indicano che durante l'epatocarcinogenesi concorrono due meccanismi principali:

1. Microambiente tumorale: cirrosi e rigenerazione cellulare, forniscono condizioni favorevoli sia all'insorgenza che alla progressione neoplastica;
2. Mutazioni geniche che colpiscono oncogeni e oncosoppressori [8].

Entrambi i meccanismi sono stati associati ad alterazioni di molteplici vie di segnale della cellula: approfondire la conoscenza di tali vie è d'interesse sia per riconoscere i meccanismi patogenetici del HCC, sia perché esse rappresentano potenzialmente importanti bersagli terapeutici [8].

1.1.3 Fibrosi e cirrosi nell'epatocarcinogenesi

L'HCC è un tumore tipicamente correlato ad infiammazione: il 90% dei casi è associato a prolungata esposizione ad agenti, quali virus, alcol e sostanze chimiche [3, 4, 12] in grado di danneggiare ed indurre una risposta riparativa del danno.

Il tessuto epatico ha la capacità di rigenerarsi in seguito a lesioni acute: le cellule necrotiche sono sostituite da nuovi epatociti sani e i danni alla matrice extracellulare sono riparati grazie al rimodellamento tissutale. Tuttavia, quando il danno è cronico, tali processi portano a fibrosi, cioè alla sostituzione del parenchima epatico con tessuto cicatriziale, una delle più comuni complicanze delle malattie epatiche croniche [13]. Con il termine fibrosi si intende l'accumulo eccessivo di matrice extracellulare nel fegato: il suo stadio terminale è la cirrosi, caratterizzata da una distorsione dell'organizzazione del parenchima epatico, con formazione di abbondante tessuto cicatriziale, di noduli rigenerativi, riorganizzazione dei vasi sanguigni e rischio d'insufficienza epatica [4, 13]. La cirrosi è responsabile di elevata mortalità ed è il principale fattore di rischio nello sviluppo di HCC [4, 14].

In un ambiente cirrotico, il metabolismo epatico è ostacolato e non riesce a convertire le sostanze chimiche in molecole non tossiche: le specie reattive di ossigeno e azoto, ROS e RNS, danneggiano il fegato [4]. La produzione di ROS e RNS provoca trascrizione e attivazione di una grande quantità di citochine e fattori di crescita [12]. I mitocondri degli epatociti, delle cellule di Kupffer e dei neutrofili rappresentano i maggiori produttori di radicali liberi che causano danno al tessuto epatico. Questi radicali hanno un'emivita molto breve, tuttavia reagiscono con una grande quantità di molecole o composti, come proteine, membrane cellulari, DNA e RNA, provocando danni cellulari irreversibili [4, 12].

In questo contesto infiammatorio, le cellule stellate sono attivate e convertite in miofibroblasti in grado di mobilizzarsi e depositare collagene e proteine della matrice con lo scopo di riparare i danni in un processo che tuttavia non è autolimitante. L'infiammazione cronica genera un microambiente infiltrato da cellule dell'immunità innata e adattativa, cellule stellate, di Kupffer ed endoteliali che producono un ambiente ricco di collagene I e III, proteine della matrice extracellulare e citochine, tra cui IL-6, IL-1 β , IL-12 [3, 4]. A loro volta, le citochine inducono la sovra-espressione di fattori di crescita che promuovono la

proliferazione degli epatociti, e già nella fase preneoplastica si osservano tipici noduli rigenerativi con diversi gradi di displasia [11].

Tra i fattori di crescita maggiormente espressi c'è HGF, potente mitogeno, motogeno e morfogeno degli epatociti maturi, che possiede anche attività anti-apoptotiche, angiogeniche e immunoregolatorie [11]. Un altro fattore epatotrofico è ALR, che stimola la proliferazione cellulare esclusivamente in presenza di danno epatico [11]. Anche diversi membri della famiglia del Fattore di Crescita Epidermico, in particolare EGF e TGF- α e β , sono correlati all'epatocarcinogenesi [10, 11]. Il recettore di EGF (EGFR) è espresso dagli epatociti e gioca un ruolo importante nella rigenerazione cellulare in seguito a danno epatico. Esso è espresso anche nelle cellule di HCC e, in questo modo EGF e TGF- α stimolano la proliferazione cellulare sia durante l'insorgenza che durante la progressione tumorale [8, 10].

TGF- β è espresso dalle cellule endoteliali, favorendo così il processo angiogenico e sostenendo la resistenza ai farmaci chemioterapici [4]. Questo fattore è prodotto anche dalle cellule stromali, provocando la transizione epitelio-mesenchimale [4, 12, 15]: durante EMT avviene la destabilizzazione delle giunzioni aderenti e le cellule acquisiscono proprietà invasive [4, 12].

Il ruolo del microambiente nello sviluppo del HCC è fondamentale non solo nelle fasi iniziali, ma anche nel corso della progressione verso stadi più avanzati. Infatti, HCC è uno dei tumori più vascolarizzati ed ha un'elevata propensione all'invasione vascolare [10]. La normale angiogenesi è mantenuta dall'equilibrio tra fattori pro-angiogenici e anti-angiogenici, che nel HCC è sregolato: le cellule tumorali e del microambiente secernono un eccesso di fattori angiogenici, che supportano il reclutamento e l'attivazione delle cellule endoteliali e dei periciti [8]. I fattori angiogenici, tra cui VEGF-A, il cui gene è amplificato nel 3-7% dei casi di HCC, PDGF, TGF- α e β , EGF, HGF, inducono segnali promotori dell'angiogenesi [8].

1.1.4 Vie di segnalazione alterate in HCC

L'instabilità dell'ambiente epatico sottoposto a diversi stress e la continua proliferazione cellulare favoriscono la comparsa di mutazioni in oncogeni e/o

oncosoppressori. Tali mutazioni provocano l'anormale attivazione di molteplici vie del segnale, contribuendo all'insorgenza e progressione dell'HCC (**Figura 2**) [16].

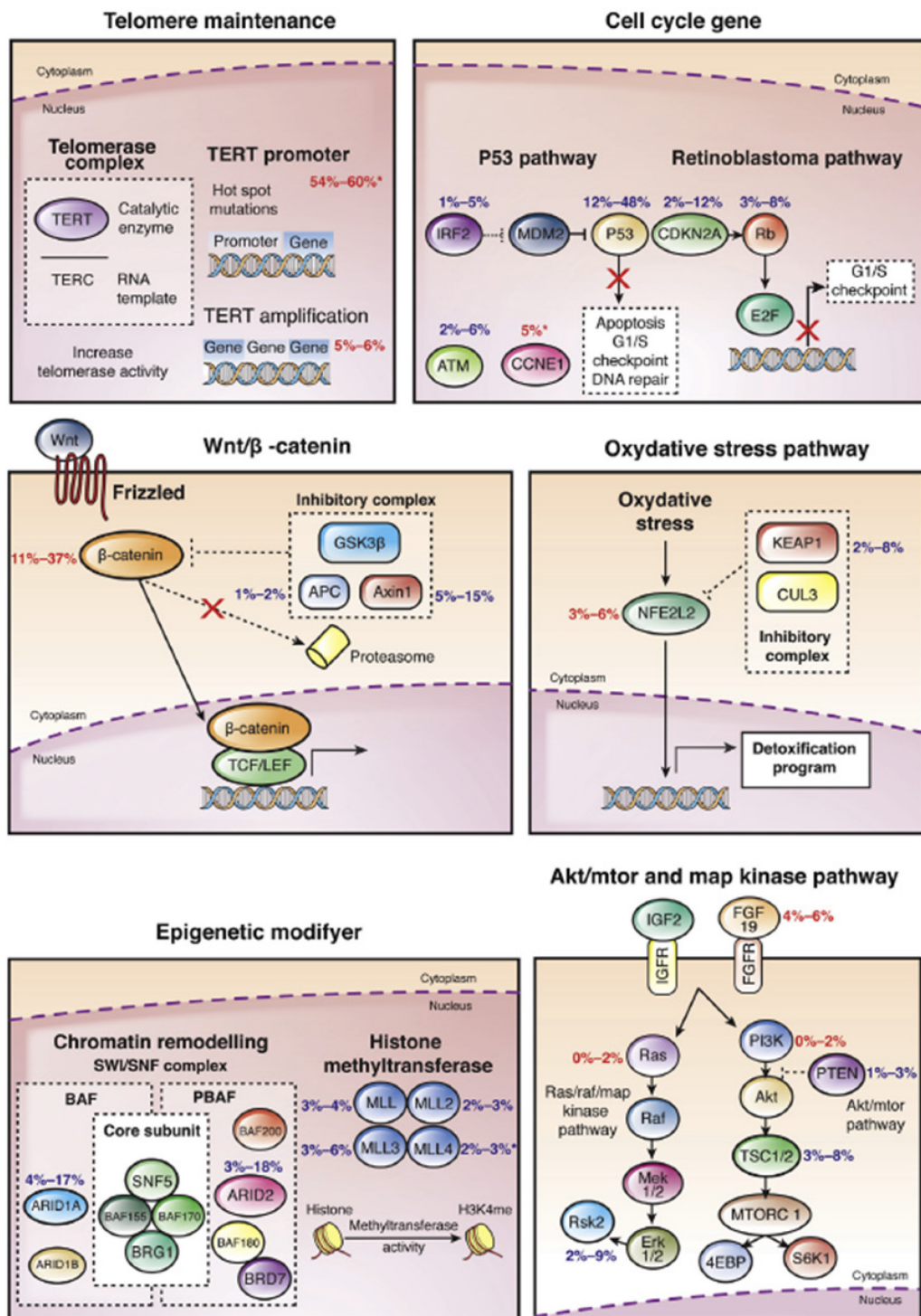


Figura 2. Vie del segnale coinvolte nell'epatocarcinogenesi. In figura sono riportate schematicamente le vie molecolari maggiormente coinvolte nell'insorgenza e progressione dell'HCC. I segnali extracellulari (fattori di crescita e pro-angiogenici) innescano i recettori sulla membrana che a loro volta attivano diverse intracellulari (mantenimento dei telomeri, controllo del ciclo cellulare, via di WNT-β-Catenina,

risoluzione dello stress ossidativo, regolazione delle modificazioni epigenetiche e vie di AKT/MTOR e delle MAP chinasi). La loro attivazione promuove la sopravvivenza e la proliferazione cellulari e la formazione di metastasi. Immagini da [17].

Nelle fasi iniziali di insorgenza del HCC, un ruolo importante è attribuibile alla **attivazione del Complesso della Telomerasi**. Negli epatociti normali, tale complesso è silente, ma viene riattivato in seguito a mutazioni nel promotore del gene codificante la trascrittasi inversa (*TERT*). Tali mutazioni sono state riscontrate sia nei noduli rigenerativi a basso grado di displasia (6%), come in quelli ad alto grado (20%) e negli HCC (60%). Inoltre, l'attivazione di *TERT* può avvenire per amplificazione genica (5%), e, negli HCC associati ad HBV, l'integrazione del DNA virale avviene frequentemente nel promotore di *TERT* e nei rari casi di HCC associati al virus Adeno-Associato 2 (AAV2) sono state ritrovate inserzioni nel gene *TERT*. Tali evidenze suggeriscono che la riattivazione di *TERT*, presente nel 90% degli HCC, consenta agli epatociti cirrotici di superare il processo di senescenza replicativa ed acquisire l'immortalizzazione grazie alla quale il processo di carcinogenesi può progredire [3].

Una seconda via di segnalazione rilevante nel processo di trasformazione e progressione tumorale è da attribuire alla **via WNT/ β -catenin**. L'attivazione di tale via avviene in seguito a mutazioni attivanti nel gene *CTNNB1* (11-37%), o nei geni *AXIN1* (10%), *APC* (1-2%) e *ZNRF3* (3%). L'attivazione di tale via porta alla trascrizione di geni, come la *CCND1*, *MYC*, *MYB* e *C-JUN* [8, 16], in grado promuovere il ciclo cellulare e bloccare il differenziamento.

Altre alterazioni che promuovono il **ciclo cellulare** rimuovono il blocco tra la fase G1-S e sono costituite da amplificazioni del gene *CCND1* (7% dei casi di HCC), da mutazioni inattivanti del gene *RB1* (3-8% dei casi di HCC) o nel gene *CDKN2A* (2-12%), codificante per l'inibitore delle chinasi ciclino-dipendenti p15/p16, [3, 4, 14]. In casi di HCC associati ad HBV, circa il 5% dei casi presenta l'inserzione del DNA virale in prossimità del gene *CCNE1*, codificante per la ciclina E.

All'incrocio di svariate vie si trova **p53**. In condizioni di stress cellulare, l'attivazione di p53 ha la capacità di attivare programmi trascrizionali in grado di bloccare il ciclo cellulare e eventualmente promuovere la morte cellulare, fase finale anche della senescenza replicativa. Tali meccanismi di salvaguardia sono carenti nel HCC a causa di frequenti mutazioni nel gene *TP53* (12-48% dei casi). Caratteristica è la mutazione R249S in seguito ad esposizione ad aflatossina B1.

La **via dello stress ossidativo** è costantemente attivata in HCC. Responsabili di tale attivazione sono mutazioni attivanti nel gene *NFE2L2 / NRF2*, codificante per Nuclear Factor (erythroid-derived 2)-like 2, (3-6% dei casi di HCC), il principale fattore in grado di promuovere la trascrizione di svariati geni codificanti per proteine citoprotettive, quali NAD(P)H chinone ossidoreductase 1, enzimi per la sintesi di glutathione, glutathione-S-transferase, enzimi per il riciclo di perossidoxine e diverse proteine della mutidrug-resistance. Un ulteriore meccanismo di attivazione della via è attraverso mutazioni inattivanti del gene *KEAP1* (2-8% dei casi di HCC), la cui proteina interagisce ed ha un effetto inibitorio su NRF2, facilitandone la ubiquitinazione e degradazione. Le mutazioni attivanti di *NRF2* hanno l'effetto di impedire il riconoscimento della proteina NRF2 da parte di KEAP1 [18]. Per la capacità di proteggere le cellule da radicali liberi e specie reattive dell'ossigeno, l'attivazione di NRF2 salvaguarda le cellule tumorali dall'esposizione tossica e dalla successiva morte. La stessa funzione nella fase pre-neoplastica ha invece l'effetto di prevenire la comparsa di tumori, presumibilmente riducendo la frequenza di mutazioni indotte dalle specie reattive nelle cellule non neoplastiche [17].

Anche vie molecolari che originano da **recettori tirosin chinasi** sono attivate attraverso diversi meccanismi. La presenza di numerosi fattori di crescita, quali HGF, PDGF, VEGF e FGF, nel microambiente infiammatorio stimola cronicamente la proliferazione di epatociti, cellule endoteliali, fibroblasti / cellule stellate e macrofagi attraverso recettori tirosin chinasi presenti in vario rapporto sulla membrana di queste cellule. Alterazioni geniche che influenzano tali vie includono l'amplificazione di diversi geni codificanti per FGF (in particolare FGF19, 5-14% dei casi di HCC). A valle dei recettori tirosin chinasi, le classiche vie **MAPK** e **PI3K/AKT/MTOR** sono conseguentemente attivate [4, 8, 16]. Raramente tali vie risultano attivate attraverso le classiche alterazioni genetiche, che si osservano in altri tipi di tumore. Ad esempio, mutazioni in geni *RAS* o *BRAF* sono presenti in meno del 2% di casi, così come mutazioni attivanti di *PI3KCA* sono anch'esse ritrovate in meno del 2% di casi. Rare sono anche le mutazioni in *PTEN* (1-3% di casi). Sono invece più frequenti mutazioni nel gene *RPS6KA3* che inattivano la ribosomal protein S6 kinase $\alpha 3$ (5-9% dei casi) o ribosomal S6 kinase 2 (*RSK2*). In seguito a fosforilazione da parte di ERK, la proteina RSK2 controlla la via MAPK tramite un feed-back inibitorio sulla proteina RAS. Mutazioni del gene *RSK2*

causano la perdita di tale controllo e l'attivazione costitutiva della via MAPK. Mutazioni inattivanti in *TSC1* o *TSC2* sono state ritrovate in circa il 3-8% dei casi di HCC e portano ad attivazione della via AKT/MTOR [8, 10, 16, 19-21].

Un ultimo aspetto in cui si riscontrano frequenti alterazioni genetiche in HCC riguarda **geni modificatori degli istoni**. I geni *ARID1A* e *ARID2*, che sono parte del complesso SWI/SNF presentano mutazioni inattivanti nel 4-18% dei casi di HCC. Inoltre, ciascuno dei diversi membri della famiglia MLL (*MLL*, *MLL2*, *MLL3* e *MLL4*) di iston-metil-transferasi presenta mutazioni nel 3-5% dei casi di HCC. Anche negli HCC associati ad HBV, il genoma virale è inserito in *MLL4* nel 10% dei casi. Tali alterazioni hanno certamente un effetto sul programma trascrizionale, ma rimane da chiarire quali siano le conseguenze bio-molecolari [17].

1.1.5 Terapie molecolari contro l'HCC

A causa della natura asintomatica del HCC precoce, l'HCC è frequentemente diagnosticato in stadio avanzato [22]. Inoltre, esso è tra i tipi di tumore più chemio-resistenti [1]. Trattamenti basati su chemioterapia sistemica sono risultati inefficaci. Il trattamento chemioterapico con doxorubicina, definito PIAF o il trattamento FOLFOX non hanno mostrato vantaggi in termini di sopravvivenza e, in alcuni casi hanno provocato eventi di tossicità grave [23]. Fino al 2007 nessuna terapia sistemica era approvata contro l'HCC avanzato. Nel 2008 il trial clinico SHARP (NCT00105443) ha dimostrato che il Sorafenib migliora la sopravvivenza in pazienti con HCC avanzato, allungando l'aspettativa di vita da 7.9 a 10.7 mesi [9]. Il Sorafenib è un inibitore multi-chinasico in grado di agire contemporaneamente sulla serin/treonin chinasi RAF e su diverse tirosin-chinasi, come VEGFR1-3 e PDGFR- α e β [24]. L'efficacia del Sorafenib è probabilmente dovuta al bersagliamento sia delle cellule cancerose che di quelle del microambiente circostante [22]. Sebbene limitato, l'aumento della sopravvivenza associato ad effetti collaterali gestibili, diarrea e reazioni cutanee, ha portato all'approvazione per l'utilizzo clinico del Sorafenib nel 2008 [3]. In seguito, diverse molecole sono state testate e comparate al Sorafenib [1], ma sono trascorsi 10 anni prima di individuare altre molecole con risultati positivi in fase III di studi clinici: Lenvatinib, per la terapia di prima linea, Regorafenib, Cabozantinib e Nivolumab, per la terapia di seconda linea, hanno mostrato risultati promettenti [1, 24]. (Vedi **BOX 1**)

BOX 1.

- *Lenvatinib*. È un inibitore dei recettori tirosin-chinasici (RTK) VEGFR 1-3; FGFR 1-4; PDGFR α e β ; KIT e RET [1, 24]. Questi RTK sono coinvolti nell'angiogenesi tumorale, nella proliferazione dei fibroblasti associati al tumore così come delle cellule tumorali. Lo studio di fase III che compara questo farmaco al Sorafenib come farmaco di prima linea (REFLECT, NCT01761266), ha dimostrato che il Lenvatinib non è inferiore al Sorafenib per la sopravvivenza totale e migliora la progressione libera da malattia (7.4 mesi, contro i 3.4 del Sorafenib) e il tempo alla progressione del tumore TTP (8.9 mesi contro i 3.7 del sorafenib) [1, 25]. Gli effetti avversi delle due molecole sono comparabili, tuttavia il 13% dei pazienti trattati con Lenvatinib hanno dismesso la terapia per effetti avversi, contro il 9% di quelli trattati con Sorafenib [26]. Questi risultati indicano che il Lenvatinib è una terapia di cui potrebbero beneficiare i pazienti con HCC avanzato o con progressione tumorale successiva alla chemoembolizzazione [1].
- *Regorafenib*. Le opzioni per i pazienti che progrediscono in seguito a terapia con Sorafenib, erano inesistenti fino alla dimostrazione di efficacia e sicurezza del Regorafenib [25]. Il Regorafenib è un inibitore multi-chinasico orale che blocca l'attività di VEGFR1-3; TIE2, PDGFR- α e β ; FGFR; KIT; RET; RAF-1 e BRAF [1, 24], protein-chinasi coinvolte nell'angiogenesi, nell'oncogenesi e nella formazione del microambiente tumorale. Dato che Sorafenib e Regorafenib hanno strutture molecolari simili e profili di tossicità comparabili, il Regorafenib è stato testato su pazienti non responsivi al Sorafenib [24]. In fase III dello studio clinico RESORCE (NCT01774344), Regorafenib vs Placebo, il Regorafenib ha mostrato un aumento della sopravvivenza totale (10.6 mesi contro 7.8), così come per la sopravvivenza libera da progressione e per il tempo alla progressione tumorale [27]. Gli eventi avversi sono risultati gestibili [27] e ciò ha portato all'approvazione da parte di FDA e EMA del Regorafenib in pazienti con HCC che sono già stati trattati e risultati non responsivi a Sorafenib [1].

- *Cabozantinib*. Cabozantinib è un inibitore dei recettori tirosin-chinasici MET, VEGFR e RET, già approvato per la terapia contro il cancro alla tiroide e renale. La fase III dello studio clinico CELESTIAL (NCT01908426) compara l'attività del Cabozantinib con quella del placebo come trattamento di seconda linea per l'HCC avanzato non responsivo a Sorafenib. I risultati mostrano un miglioramento della sopravvivenza totale (10.2 mesi vs 8.0 mesi del placebo) e della sopravvivenza libera da progressione (5.2 mesi per il Cabozantinib vs 1.9 mesi per il placebo) [28]. Gli effetti avversi più comuni sono reazione cutanee in mani e piedi, ipertensione, fatica e diarrea [28]. Questi risultati ne suggeriscono un'utile applicazione in seconda linea per pazienti con HCC avanzato.
- *Nivolumab*. Il successo degli inibitori dei check-point immunologici in diversi tipi di tumori ha aperto le strade all'uso di queste molecole anche per HCC avanzato [1]. Nivolumab, inibitore di PD-1, è stato testato in dose crescente in pazienti già trattati con Sorafenib o come farmaco di prima linea (NCT01658878). [29]. I primi risultati di questo studio hanno mostrato un tasso di risposta obiettiva del 20%, una serie di effetti avversi gestibili e una buona tollerabilità (rash cutanei, aumento degli enzimi epatici ALT e AST) [29]. Nonostante questo studio non sia randomizzato, i suoi risultati sono buoni, quindi FDA ha dato l'approvazione condizionata dell'uso del Nivolumab per i pazienti con HCC che non hanno beneficiato del trattamento con Sorafenib. Ulteriori risultati da studi randomizzati più ampi sono necessari per determinare se la risposta al farmaco è duratura e se è associata a un reale beneficio di sopravvivenza [1].

Nonostante queste molecole abbiano mostrato benefici nel trattamento dell'HCC avanzato, esse offrono una sopravvivenza molto limitata e la progressione tumorale resta invariata. Tale condizione sottolinea la necessità di sviluppare e testare nuove strategie terapeutiche [30].

Anche nell'HCC diagnosticato in fase precoce dove sono applicati approcci terapeutici a scopo curativo, quali trapianto di fegato o resezione del tumore primario, per l'elevata incidenza di recidiva del tumore entro i cinque anni (70%), risulta necessario lo sviluppo di terapie adiuvanti [5]. Alcune terapie molecolari basate su Sirolimus o Sorafenib sono state testate ma con risultati finora negativi [31, 32] (**BOX 2**).

BOX 2

- Sirolimus, inibitore di mTOR, è tra le terapie molecolari testate in adiuvante dopo trapianto: lo studio clinico di fase III (SiLVER, NCT00355862), non ha mostrato un miglioramento nel tempo di ricorrenza libero da malattia a cinque anni [31].
- Il Sorafenib è stato testato come agente per prevenire la ricomparsa di tumore in pazienti dopo completa resezione o ablazione: uno studio clinico di fase III (STORM, NCT00692770) ha dimostrato che il suo utilizzo non migliora il tempo di sopravvivenza libero da malattia a cinque anni [32].

Nessuna delle molecole testate in adiuvante ha portato a risultati positivi in studi clinici. È quindi necessario saggiare altre molecole o approcci non convenzionali. In questo contesto si inseriscono gli studi su microRNA, il cui ruolo nella patogenesi del HCC è dimostrato ed il cui potenziale terapeutico è finora stato solo in parte valutato.

1.2 microRNA

1.2.1 Biogenesi e funzioni biomolecolari dei microRNA

I microRNA (microRNA o miRNA) maturi sono costituiti da RNA di 20-24 nucleotidi non codificanti a singolo filamento. Essi sono filogeneticamente conservati. Svolgono un ruolo fondamentale nella regolazione post-trascrizionale dell'espressione genica, regolando in modo negativo bersagli genici, con cui condividono una parziale omologia di sequenza.

Nell'uomo, i miRNA precursori noti sono ad oggi 1917, mentre quelli maturi sono 2654 (mirbase.org, Release 22.1, Ottobre 2018) [33] e sono localizzati in tutti i cromosomi, ad eccezione del cromosoma Y. Circa il 50% dei miRNA conosciuti sono raggruppati in cluster e sono trascritti come RNA policistronici: la maggior parte dei miRNA nei mammiferi sono stati ritrovati in regioni introniche di geni codificanti proteine, o in regioni intergeniche; solo una piccola parte è localizzata a livello esonico, disponendosi con orientamento anti-senso rispetto alla sequenza genica codificante la proteina [34].

La biogenesi dei miRNA (**Figura 3**) inizia nel nucleo e si completa nel citoplasma. I miRNA sono trascritti dalla RNA polimerasi II come trascritti primari, detto pri-miRNA, di lunghezza variabile, a cui viene aggiunto il cap all'estremità 5' e la coda poli-A all'estremità 3'. La maturazione del miRNA inizia nel nucleo: il trascritto primario è processato da un complesso proteico, detto microprocessore, che contiene l'RNasi III nucleare Drosha ed il suo cofattore DGCR/Pasha. L'attività di questo complesso proteico genera un precursore del miRNA, chiamato pre-miRNA: è una sequenza di 60-70 nucleotidi con una struttura a stem-loop. Il pre-miRNA viene trasportato nel citoplasma grazie all'Esportina-5/Ran-GTP. Il miRNA maturo può risiedere nel braccio 5' o in quello 3' della struttura a stem-loop; tuttavia, a volte, entrambe le braccia possono dare origine a miRNA maturi [34, 35].

Una volta giunto nel citoplasma, il pre-miRNA è tagliato da una seconda RNasi III, Dicer: vengono rilasciati due filamenti di RNA di 20-24 nucleotidi appaiati (miRNA duplex). Dopo l'apertura del doppio filamento, il miRNA maturo è inserito in uno specifico complesso proteico, il complesso di silenziamento indotto da RNA (RISC): in questo modo avrà la capacità di reprimere l'espressione del gene bersaglio. Inizialmente si riteneva che solo uno dei filamenti del miRNA duplex avesse un'attività biologica, e che il secondo venisse distrutto [34-36], oggi è evidente che in moltissimi casi, entrambi i filamenti sono funzionali e svolgono un'attività regolativa sui bersagli diversi.

Il miRNA maturo guida il RISC nella regione 3'UTR del mRNA bersaglio: qui si appaia per complementarità parziale. Il legame avviene tra il 3'UTR del mRNA ed una specifica regione del miRNA maturo, detta "seed sequence", corrispondente ai nucleotidi 2-7 nella sua porzione 5'. Una volta avvenuto l'appaiamento per complementarità con l'RNA messaggero, il miRNA determina la degradazione o

l'inibizione della traduzione del mRNA [34, 37]. È stato dimostrato che i miRNA hanno la capacità di destabilizzare il trascritto bersaglio attraverso molteplici meccanismi, come la rimozione del cap al 5' o la deadenilazione [38].

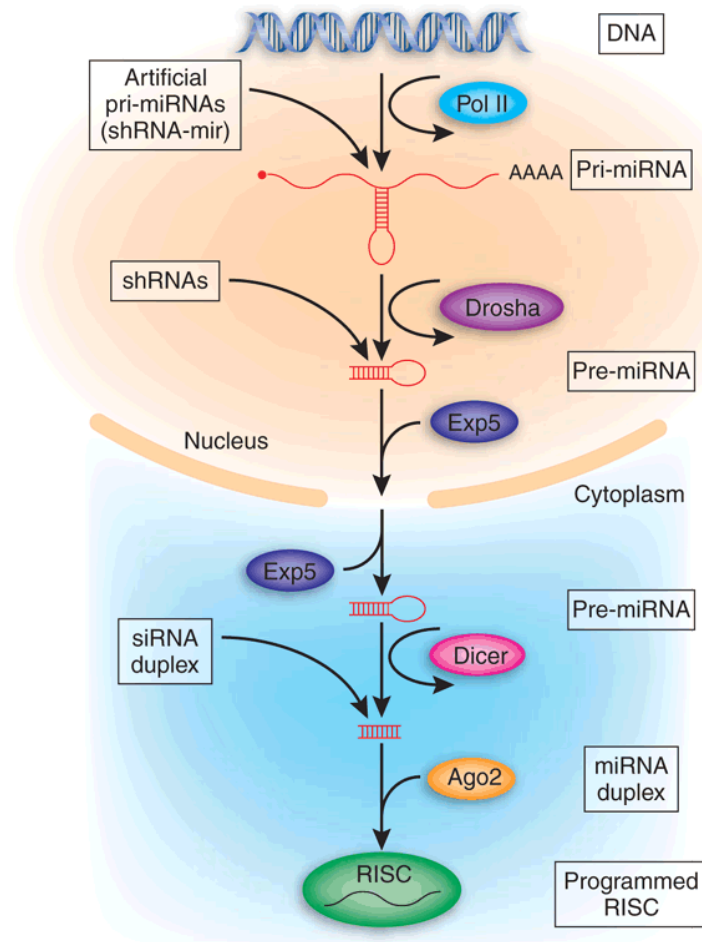


Figura 3. Maturazione dei miRNA. La figura riporta schematicamente la biogenesi dei miRNA. Il pri-miRNA viene trascritto nel nucleo dalla RNA polimerasi II e viene processato da Drosha. Il pre-miRNA viene esportato nel citoplasma grazie all'esportina-5/Ran-GTP: qui viene tagliato da Dicer e si forma il miRNA duplex. Il filamento guida del miRNA duplex viene poi caricato sul RISC dove può svolgere il suo ruolo di inibitore della traduzione. Immagine da [39].

Ogni miRNA può controllare l'espressione di centinaia di geni codificanti proteine ed ogni mRNA può essere bersagliato da molteplici miRNA ed essere sottoposto al loro controllo post-trascrizionale [40, 41]. I miRNA hanno la capacità di regolare l'espressione di pressoché tutti i geni codificanti proteine e sono coinvolti nella regolazione di tutti i processi biologici cellulari.

1.2.2 miRNA ed HCC

L'alterata espressione dei miRNA è stata associata a svariate malattie nell'uomo, quali Alzheimer [42], sclerosi multipla [43], patologie coronariche [44], patologie autoimmuni [45] e cancro.

La consistente deregolazione tramite sovra espressione o sotto espressione nelle diverse patologie neoplastiche ha suggerito che essi si comportino come oncogeni, quando sovra espressi, o come oncosoppressori, quando sotto-espressi [36]. I miRNA che sono coinvolti nella formazione e progressione del tumore sono quelli che operano nei processi classicamente deregolati in cancro, quali differenziamento, apoptosi, proliferazione [38].

I meccanismi molecolari alla base dell'alterata espressione dei miRNA nel cancro sono molteplici. Variazioni dell'espressione dei miRNA in cellule tumorali sono attribuite alla localizzazione in regioni ad elevata instabilità genomica e che possono subire processi di amplificazione, traslocazione o delezione. L'espressione alterata dei miRNA può essere anche dovuta alla deregolazione di proteine il cui ruolo oncosoppressorio o oncogeno è stato dimostrato sperimentalmente, come TP53, MYC e RAS. Deregolazione dell'espressione dei miRNA è stata anche collegata ad alterata regolazione epigenetica, come lo stato di metilazione del promotore delle sequenze codificanti per gli stessi miRNA: ciò può determinare alterazioni dei loro livelli trascrizionali [38].

Molteplici studi hanno dimostrato che l'espressione dei miRNA è deregolata nel HCC rispetto al tessuto epatico normale [46]. Per esempio, i miR-21, miR-221, miR-222, miR-224, e miR-17-92 sono stati ritrovati consistentemente sovra-espressi mentre i miR-29, miR-122, miR-200, miR-123, miR-199a, e miR-199b, let-7, sono stati ritrovati sotto-espressi. In **Tabella 1** sono riportati i miRNA maggiormente deregolati in campioni di HCC.

Tabella 1. MiRNA deregolati in HCC [46].

miRNA	Localizzazione cromosomica in <i>Homo sapiens</i>	Espressione in HCC	Bersagli genici
let-7g	3p21.2	Bassa	BCL2L1, COLIA2
miR-1	20q13.33	Bassa	MET, FOXP1, HDAC4
miR-23b	9q22.32	Bassa	uPA, MET
miR-26a	3p22.2	Bassa	CCND2, CCNE
miR-29	7q32.3	Bassa	BCL2, MCL1
miR-34a	1p36.22	Bassa	MET
miR-101	1p31.3	Bassa	MCL1, FOS
miR-122	18q21.31	Bassa	CCNG1, SRF, IGF1R, BCL2L2, ADAM10, ADAM17
miR-124	8p23.1	Bassa	CDK6, VIM, SMYD3, IQGAP1
miR-125a	19q13.41	Bassa	BMF, ERBB2, ERBB3
miR-125b	11q24.1	Bassa	
miR-130a	11q12.1	Bassa	ATXN1, PPAR γ
miR-139	11q13.4	Bassa	RHOK2
miR-145	5q32	Bassa	FSCN1, IRS1, STAT1, YES, MYC, ESR1, KLF4, OCT4, SOX2, MUC1
miR-150	19q13.33	Bassa	EGR2
miR-193b	16p13.12	Bassa	MCL1
miR-195	17p13.1	Bassa	CCND1, CDK6, E2F3
miR-199a-1	19p13.2	Bassa	
miR-199a-2	1q24.3	Bassa	KRT7, SET, IKBKB, MAPK1, MET, HES1, Smad1, HIF1A
miR-199b	9q34.11	Bassa	
miR-200a	1p36.33	Bassa	
miR-200b	1p36.33	Bassa	ZEB1, ZEB2, β -catenin
miR-223	Xq12	Bassa	Stathmin1
miR-375	2q35	Bassa	YAP
miR-602	9q34.3	Bassa	RASSF1A
miR-17-5p	13q31.3	Alta	NCOA3, E2F1, BCL2L11, CDKN1A, RBL2, MAPK14, STAT3, CCL1, DNAJC27, FBXO31, GPR137B, NPAT, OBFC2A, RAB12, YES1, ZNFX1, FN1, FNDC3A
miR-18a	13q31.3	Alta	NR3C1, CTGF, ESR1
miR-92a	13q31.3	Alta	HIF1A, STAT3, CDKN1A, MAPK14, ZBTB7A, E2F1, E2F2, E2F3
miR-106-25	7q22.1	Alta	CDKN1A, BIM
miR-21	17q23.1	Alta	FasL, SERPINB5, PDCD4, TIMP3, SPRY2, LRRFIP1, RECK, PTEN, BTG2, Peli1, HNRPK, TP63, MARCKS, TPM1
miR-30d	8q24.22	Alta	Galphai2
miR-151	8q24.3	Alta	RhoGDIA
miR-181b-1	1q32.1	Alta	CDX2, GATA6, NLK, TIMP3
miR-135a	3p21.2	Alta	APC
miR-221/miR-222	Xp11.3	Alta	BMF, CDKN1B, CDKN1C, ESR1, ICAM1, KIT, PTEN, TIMP3, MET, DDIT4, FOXO3
miR-224	Xq28	Alta	CD40, CDC42, CXCR4, KLK10, Smad4, API5
miR-373	19q13.42	Alta	MBD2, CD44, LATS2
miR-483-3p	11p15.5	Alta	BBC3

Alla luce di svariati studi indipendenti, i miRNA ritrovati più volte deregolati in HCC sono gli onco-miRNA miR-21 e miR-221 e i miRNA oncosoppressori miR-122 e miR-199a-3p [36]: dato che ogni miRNA può modulare diversi geni target contemporaneamente, molteplici funzioni biologiche e molecolari sono influenzate dalla loro deregolazione [46].

Studiare i miRNA è quindi fondamentale per chiarire aspetti molecolari alla base dell'insorgenza e progressione dell'HCC. Come per le analisi sull'espressione di geni codificanti proteine, tali conoscenze potrebbero permettere di riconoscere i miRNA come potenziali agenti terapeutici.

1.2.3 miRNA come agenti o bersagli terapeutici

I miRNA sono piccole molecole facilmente sintetizzabili in laboratorio. Hanno dimostrato di avere un ruolo importante in numerosi processi tumorigenici. È perciò logico pensare ad un loro possibile impiego come agenti terapeutici. Inoltre, i miRNA, essendo oligonucleotidi endogeni, inducono una ridotta risposta immunitaria e una bassa tossicità. Infine, sebbene un singolo miRNA possa influenzare molteplici vie del segnale contemporaneamente, tale evento fa parte delle proprie funzioni fisiologiche e non rappresenta un effetto "off-target", come descritto ad esempio per gli "short interfering RNA" (siRNA) [47]. Potenzialmente, molecole in grado di mimare miRNA (mimics) possono essere impiegate direttamente come agenti terapeutici, oppure possono essere i bersagli della terapia, sfruttando oligonucleotidi anti-miRNA (AMOs).

L'inibizione di miRNA *in vivo* è stata dimostrata per la prima volta tramite la somministrazione venosa di AMOs anti-miR-122, oligonucleotide a singolo filamento in un modello murino [48]. L'uso di AMOs, costituiti da oligonucleotidi modificati ha permesso di stabilizzare tali molecole che hanno dimostrato un'attività, misurata attraverso la sintesi di colesterolo ed acidi grassi, di circa 2-3 mesi in seguito a singolo inoculo (10 mg/kg). In seguito, è stata testata la sicurezza di tale molecola in primati non umani: non sono stati riscontrati eventi di tossicità o cambiamenti istopatologici nel fegato [49]. Alla luce di questi risultati, l'acido nucleico "locked" modificato anti-miR-122 (Miravirsen SPC3649, Santaris Pharma, Copenhagen, Danimarca) è stato usato in test clinici (NCT01200420) per il trattamento dell'infezione da HCV, dato che la replicazione del virus nel fegato è

dipendente dall'espressione del miR-122 [50, 51]. L'uso del Miravirsen ha mostrato una riduzione dose dipendente dei livelli di RNA virale e una buona tollerabilità [52], soppiantato tuttavia dall'approvazione dei farmaci antivirali diretti, che presentano una maggiore efficacia e maneggevolezza. Questi farmaci risultano tuttavia limitati dal fatto che sono utilizzabili in pazienti non cirrotici o con cirrosi in stadio iniziale.

Sulla base di questi risultati, l'inibizione dei miRNA è stata studiata anche in modelli pre-clinici di HCC.

Callegari et al. hanno dimostrato l'azione pro-tumorale *in vivo* del miR-221 nel modello transgenico TG221 [53]. Tale modello è stato conseguentemente utilizzato per verificare l'attività anti-tumorale dell'anti-miR-221. I topi trattati con l'oligonucleotide hanno visto una riduzione del numero e delle dimensioni dei noduli tumorali. Inoltre, la sottoespressione del miR-221 è stata riscontrata a livello molecolare nei tessuti epatici degli animali trattati, confermando l'abilità dell'anti-miR-221 nell'inibire il miR-221 endogeno.

In un altro studio su modelli ortotopici di HCC, la somministrazione intravenosa di anti-miR-221 coniugato con una molecola di colesterolo riduceva i livelli del miR-221 nel fegato. Ciò si traduceva nella riduzione della proliferazione delle cellule tumorali e nell'aumento della sopravvivenza degli animali [54].

L'importanza di manipolare i livelli dei miRNA a scopo terapeutico nel trattamento dell'HCC è stata dimostrata anche da Lim et al.: l'inibizione del miR-494, sovraespresso in HCC, comporta una significativa diminuzione delle dimensioni tumorali in un modello murino che sviluppa HCC in seguito a sovraespressione dell'oncogene *MYC* [55]. Inoltre, nello stesso modello, è stata recentemente dimostrata l'attività anti-tumorale dell'anti-miR-17: la somministrazione sistemica dell'oligonucleotide incapsulato in nanoparticelle lipidiche ha provocato apoptosi e diminuzione della proliferazione delle cellule tumorali, che si sono tradotte in una ritardata tumorigenesi [56].

Altri studi hanno poi dimostrato l'efficacia terapeutica del ripristino dei livelli di miRNA oncosoppressori, sottoespressi in cancro. I miRNA mimics sono stati testati come potenziali agenti terapeutici contro l'HCC. Nel modello murino di HCC indotto da dietilnitrosammina (DEN), la somministrazione sistemica del miR-124 tramite liposomi provoca la riduzione della crescita e delle dimensioni del tumore,

promuove la via apoptotica e non induce effetti avversi negli animali [57]. Hsu et al. hanno veicolato il mimic del miR-122 in un modello di HCC sfruttando delle nanoparticelle lipidiche cationiche: in seguito a somministrazione intravenosa, il miRNA è stato rilevato sia in cellule epatiche normali che in quelle tumorali, e non ha provocato effetti tossici né stimolato la risposta immunitaria. L'aumento del miRNA ha indotto una diminuzione della crescita tumorale accompagnata dalla riduzione dell'espressione dei target molecolari del miR-122 [58]. Per ottimizzare la veicolazione dei miRNA al fegato sono state testate diverse formulazioni di nanoparticelle: è stato dimostrato che l'inclusione di acidi grassi insaturi (lipidi "helper") nella formulazione delle nanoparticelle lipidiche migliora significativamente il trasporto e l'accumulo del miR-122 al fegato [59].

I promettenti risultati ottenuti negli studi preclinici hanno aperto le porte all'utilizzo dei miRNA mimics in trial clinici. Nel 2013 è stato intrapreso uno studio di fase I per testare massima dose tollerata, sicurezza e farmacocinetica del MRX34, mimic del miR-34a incapsulato in particelle liposomiali, in pazienti con tumore epatico primario, o altri tumori solidi (NCT01829971). A causa di effetti avversi associati all'infusione della molecola, diversi pazienti hanno dismesso prematuramente il trattamento e lo studio è stato interrotto [60].

Nel 2015 è stato avviato uno studio clinico di fase I, mirato a valutare l'utilizzo del miR-16 (TargomiRs) come trattamento di seconda o terza linea per pazienti con mesotelioma pleurico maligno e tumore al polmone non a piccole cellule (NCT02369198). I risultati preliminari mostrano che il TargomiR è ben tollerato e sono stati rilevati segni di attività anti-tumorale. Questo studio fornisce importanti dati sulla sicurezza dell'uso del miRNA mimic nell'uomo e mostra un'incoraggiante risposta al trattamento in pazienti con mesotelioma pleurico maligno [61].

1.3 Il modello TG221

Nonostante gli studi sul fegato siano stati condotti prevalentemente su ratto per la sua propensione allo sviluppo di fibrosi, il topo da laboratorio *Mus musculus* è considerato tra i migliori modelli animali per lo studio del cancro, per la disponibilità di strumenti per il bersagliamento genico, per la taglia dell'animale, per la facilità di stabulazione, per la sua durata di vita e per i numerosi studi disponibili su meccanismi fisiologici e molecolari [62].

Perciò, molteplici modelli murini geneticamente modificati sono stati creati con l'obiettivo di ricreare malattie tumorali umane tramite l'attivazione di oncogeni o inattivazione di oncosoppressori [62, 63]. Per l'HCC, vari geni coinvolti nella tumorigenesi, sono stati modificati per indurre lo sviluppo di cancro in modelli murini, fornendo dati fondamentali per comprendere la rilevanza nella epatocarcinogenesi (**Tabella 2**) [63-65].

Tabella 2. Modelli murini di HCC geneticamente modificati [66]

System	Transgene	Promotor	Strain	Percentage HCCs
Espressione costitutiva	<i>HBx</i>	HBV	CD1	> 80% in maschi > 60% in femmine
	<i>sequenza HBx + pre C-C</i>	HBV	C57BL/6xDBA	75% in topi TG > 15 mesi
	<i>p21 + HBsAg</i>	HBV	C57BL/6	53.3% in maschi $p21^{HBsAg/+}$, 72.7% in maschi $p21^{HBsAg/HBsAg}$ > 15 mesi
	<i>p21 + HBx</i>	HBV	C57BL/6	60% in maschi $p21^{HBx/+}$, 45.4% in femmine $p21^{HBx/+}$, 63.6% in $p21^{HBx/HBx}$ maschi e 42.9% in $p21^{HBx/HBx}$ femmine > 15 mesi
	<i>HCV core, E1, E2</i>	HBV	C57BL/6	>25.9% in maschi >16 mesi
Espressione condizionata	<i>HBV</i>	albumina	C57BL/6 × SJL	100% a 20 mesi
	<i>HCV core, E1, E2</i>	albumina	C57BL/6 × FVB	100% at 32 settimane (trattati con DEN)
	<i>c-myc</i>	albumina	C57BL/6J × CBA/J	65% in maschi di 20 mesi
	<i>c-myc + E2F1</i>	albumina	C57BL/6J × CBA/J	100% a 9 mesi
	<i>TGF-α</i>	metallotioneina	CD1	50% in maschi > 12 mesi
	<i>TGF-α + c-myc</i>	albumina	C57BL/6J × CBA/J	100% in maschi a 8 mesi
Espressione inducibile	<i>myc</i>	Liver Activator Protein (LAP)	FVB/N × NMRI	I tumori regrediscono dopo 3 giorni dall'inattivazione di <i>Myc</i> e sono completamente scomparsi dopo 30 giorni

Per quanto riguarda lo sviluppo di modelli murini di HCC basati su modifiche di miRNA, Callegari et al. hanno sviluppato un modello che esprime costitutivamente nel fegato il miR-221 (TG221) [53]. Descriverò in maggiore dettaglio le caratteristiche di questo modello, essendo stato utilizzato negli studi svolti per la preparazione di questa tesi.

Il promotore dell'alfa1-antitripsina accoppiato con l'enhancer II (EII) del virus HBV permette un'espressione costante e fegato-specifica del miRNA, quindi livelli del miR-221 sono costantemente alti nel tessuto epatico.

Questi topi transgenici presentano un'innata predisposizione allo sviluppo di tumori epatici: lesioni neoplastiche diventano visibili dal nono mese d'età in circa il 50% degli animali maschi. La predisposizione allo sviluppo tumorale è più alta negli animali di sesso maschile rispetto al femminile, condizione tipica anche nell'uomo.

La valutazione dell'espressione genica sui tessuti epatici pre-neoplastici ha rivelato che, rispetto ai topi WT, è presente un differente background molecolare, indotto dalla sovra-espressione del miR-221, responsabile della differenza fenotipica dei tessuti epatici e della predisposizione al cancro. Inoltre, i miRNA osservati, in particolare il miR-21, miR-122 e il miR-199a-3p sono deregolati nella stessa direzione che è riscontrata nei pazienti di HCC. Il trattamento con il carcinogeno DEN a 10 giorni dalla nascita ha reso più veloce e riproducibile la comparsa di tumori: a sei mesi d'età il 100% dei topi maschi presentano molteplici e estese lesioni tumorali, che sostituiscono quasi completamente il tessuto epatico sano. A confronto, il ceppo non transgenico B6D1 sviluppa tumori epatici con un tempo di latenza più lungo denotando un numero di tumori inferiore e più piccoli. Le lesioni neoplastiche variano da adenomi epatici a epatocarcinomi veri e propri, caratterizzati da crescita trabecolare invasiva ed elevato grado di angiogenesi come anche precedentemente descritto [66]. Tuttavia, come per la maggior parte dei modelli, anche il modello TG221 + DEN presenta tumori in un ambiente non cirrotico, condizione che, invece, è tipica per la maggior parte degli epatocarcinomi umani.

Un modello murino che mimi quanto più possibile quanto avviene nell'uomo, dovrebbe sviluppare HCC a partire da una condizione cirrotica preesistente. Un metodo consolidato per indurre danno epatico, fibrosi e cirrosi in ratto è l'esposizione prolungata all'epatotossina tetracloruro di carbonio (CCl₄) [67]. In topo, tuttavia il raggiungimento di cirrosi e ascite è più difficile, in quanto l'esposizione prolungata all'epatotossina diminuisce la sopravvivenza degli animali [68]. Domenicali et al. hanno dimostrato che la somministrazione di CCl₄ tramite brevi cicli d'inalazione è efficace nell'indurre cirrosi e ascite in topo, senza

provocare danni extraepatici o risposta infiammatoria sistemica [69]. Tuttavia, tale modello non sviluppa HCC.

Diversi studi hanno combinato l'utilizzo del CCl₄ con la DEN, per indurre la formazione di tumori insieme a fibrosi epatica [70-73], tuttavia la combinazione di queste epatotossine è poco tollerabile da parte degli animali trattati [68]. In modelli ortotopici, il trattamento con CCl₄ è stato combinato con l'impianto di linee cellulari, tuttavia lo sviluppo di tumore dipende dal ceppo murino e dalla linea cellulare prescelta [73].

Finora, un modello murino semplice che replichi la condizione di cirrosi epatica in cui si origini l'HCC non è ancora disponibile, poiché, oltre al trattamento con CCl₄, sono richiesti trattamenti aggiuntivi (**Tabella 3**) [63]. Uno degli obiettivi della tesi è stato perciò di saggiare il modello TG221 per capacità di sviluppare tumori epatici in un contesto cirrotico indotto da CCl₄.

Tabella 3. Modelli murini trattati con CCl₄ e altre molecole che sviluppano HCC in ambiente cirrotico

Modello murino	Somministrazione CCl ₄	Trattamento aggiuntivo	Reference
C57BL/6	2 volte alla settimana 1ml/kg via orale	trasposone "sleeping beauty" codificante per c-Myc & Short hairpin p53 (shp53)	[74]
C3H	3 volte alla settimana per via orale per 12 settimane (150ul)	Impianto intraepatico della linea cellulare HCA-1	[73]
Stk4^{-/-}-Stk3F^{-/-} GEM	3 volte alla settimana per via orale per 12 settimane (150ul)	Iniezione intravenosa della ricombinasi adenovirale Cre	[73]
B6C3F1	2 volte alla settimana (0,2mg/kg) per via intraperitoneale	DEN: una singola iniezione a 14 giorni di vita	[71]
BALB/c	2 volte alla settimana per via orale (0,1ml/10g peso corporeo)	Iniezione intraperitoneale di DEN (100mg/kg) una volta alla settimana + soluzione di etanolo al 10% nell'acqua di abbeveramento <i>ad libitum</i>	[75]

2. SCOPO DELLA TESI

Nonostante i progressi terapeutici, l'HCC rimane una patologia con una prognosi sfavorevole a causa di elevato tasso di recidiva nelle fasi precoci ed inefficacia delle terapie nelle fasi più avanzate.

I miRNA sono emersi negli ultimi anni come molecole deregolate in cancro ed hanno suscitato grande attenzione, perché ciascun miRNA è in grado di controllare l'espressione di diversi geni, e di molteplici vie del segnale, contemporaneamente.

In epatocarcinoma, si è rivelato di notevole interesse il miR-199a-3p (**BOX 3**), sotto-espresso nella maggior parte degli HCC esaminati e coinvolto nella regolazione di diverse vie associate a insorgenza e progressione di HCC.

BOX 3

miR-199a-3p e HCC

Il miR-199a-3p è il terzo microRNA più espresso nel fegato sano [76, 77], tuttavia è sotto-espresso nella maggior parte degli HCC esaminati, il che suggerisce una sua funzione oncosoppressoria [36].

Il ruolo del miR-199a-3p nella tumorigenesi è stato investigato in svariati studi. L'espressione forzata del miR-199a-3p in cellule di HCC *in vitro* induce l'arresto del ciclo cellulare in fase G1, riduce l'invasività cellulare, aumenta la suscettibilità delle cellule all'ipossia e all'apoptosi in seguito a trattamento con Doxorubicina [78]. Questi risultati possono essere spiegati dal fatto che il miR-199a-3p regola l'espressione di MET, mTOR [77, 79, 80] e PAK4 [77], controllando negativamente la progressione del ciclo cellulare. Anche YAP1 è target diretto del miR-199a-3p, che quindi controlla negativamente anche il processo apoptotico [81]. Altri bersagli di questo miRNA sono CD44 [82], VEGFA, VEGFR1-2 e MMP-2, [83] proteine coinvolte in adesione e migrazione cellulare, angiogenesi e formazione di metastasi. In pazienti di HCC, l'espressione del miR-199a-3p è inoltre correlata inversamente all'espressione di NOTCH1 e della E-Caderina, proteine coinvolte nella transizione epitelio-mesenchimale, suggerendo che l'asse miR-199a/NOTCH1/E-Caderina sia fondamentale nella progressione

e recidiva tumorali [84]. Infine, pazienti con HCC che presentano bassi livelli di questo miRNA sono associati a maggiore tasso di recidiva e a tempi più brevi per la comparsa del tumore due anni dopo l'intervento chirurgico [79].

Complessivamente, questo studio pone le basi per l'utilizzo di miRNA mimics come molecole terapeutiche anti-tumorale o come approccio di profilassi, per prevenire la formazione di noduli tumorali in condizioni cirrotiche.

Obiettivi di questa tesi sono stati:

1. Saggiare le proprietà anti-tumorali del miR-199a-3p, sviluppando contestualmente approcci metodologici per una efficiente veicolazione *in vivo*.
2. Valutare la possibilità di sviluppare un modello murino a partire dal ceppo transgenico TG221 che sviluppi tumori epatici nel contesto di fegato cirrotico.
3. In subordine all'obiettivo 2, valutare la possibilità del miR-199a-3p di prevenire la comparsa di tumori epatici su fegato cirrotico.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Linee cellulari

Le linee cellulari di epatocarcinoma Hep3B (HB-8064) e HepG2 (HB-8065) sono state ottenute dall'American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA). Le cellule sono state mantenute in coltura in terreno IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Media, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) con il 10% di siero fetale bovino (FBS, Lonza Group, Basel, Svizzera), 0.1% di gentamicina e 0.1% di L-glutamina (Sigma Aldrich). Le cellule sono mantenute in incubatore a 37°C e 5% di anidride carbonica.

3.2 Vettore AAVV-199 e Infezione

Per ottenere il vettore adeno-associato AAVV esprime il miR-199a-3p, tutti i plasmidi richiesti per la sua generazione (pAAV-IRES-GFP, pAAV-DJ e pHelper) sono stati ottenuti dalla Cell Biolabs (San Diego, CA, USA). La cassetta esprime la sequenza del miR-199a-3p è stata ottenuta dal plasmide pIRES-miR-199a [85] e clonata a monte della sequenza pIRES-GFP nel vettore pAAV-IRES-GFP, usando il sito di restrizione specifico per l'enzima XbaI. Il vettore virale adeno-associato AAVV-199 è stato generato da una tripla transfezione di pAAV-199 con i plasmidi helper (pAAV-DJ e pHelper) nella linea cellulare 293FT, in rapporto molare 1:1:1. La produzione del virus e la sua titolazione sono state svolte come precedentemente riportato [86].

Una volta generato il vettore virale adenoassociato, le linee cellulari Hep3B e HepG2 sono state infettate con AAVV-199 o AAVV-GFP. Le cellule sono state incubate a 37°C e 5% di CO₂ per 120 ore, dopo di che sono state raccolte per eseguire l'estrazione di RNA, proteine e saggi di vitalità e apoptosi.

3.3 Saggi di vitalità e apoptosi

I saggi di vitalità eseguiti sulle linee cellulari in seguito all'infezione sono stati eseguiti tramite il dispositivo Muse® Cell Analyzer (Merk Millipore Burlington, MA, USA). Lo strumento permette, grazie a un meccanismo miniaturizzato di rilevamento della fluorescenza, analisi cellulari quantitative accurate e precise, paragonabili a quelle ottenute da altri sistemi citofluorimetrici. La vitalità e lo stato di apoptosi cellulari sono state analizzate utilizzando il kit "Muse Annexin and Cell Dead Cell" (Merk, Cat. #MCH100105): questo saggio permette l'analisi

quantitativa di cellule vive, in apoptosi o morte sfruttando la traslocazione di fosfatidilserina (PS) all'esterno della membrana cellulare durante le prime fasi dell'apoptosi. L'annessina V è un fosfolipide che ha alta affinità per la PS, quindi, una volta marcata con un fluoroforo, è usata come marcatore di apoptosi. Il saggio prevede inoltre un marcatore di mortalità cellulare, la 7-Amino-Actinomicina D (7-AAD), che può penetrare nelle cellule quando la membrana non è più integra. Cellule vitali sono negative per entrambi i marcatori, cellule in apoptosi precoce sono positive per l'Annessina V ma non per il 7-AAD, infine cellule in apoptosi avanzata o morte sono positive per entrambi i marcatori.

3.4 Modello murino TG221 DEN e CCI4

Tutti gli studi *in vivo* sono stati eseguiti in accordo con le Linee Guida per la Cura e l'Utilizzo degli Animali da Laboratorio del Ministero Italiano della Salute. Per attenersi alla Direttiva del Parlamento Europeo 2010/63/EU, rafforzata dalla legislazione italiana che richiede di minimizzare il numero degli animali, il programma G*Power (www.gpower.hhu.de) è stato utilizzato per definire la numerosità degli animali negli esperimenti a lungo termine. Per gli studi di breve durata, è stato impiegato il numero minore di animali sufficiente per eseguire un'analisi statistica.

Gli animali hanno avuto libero accesso a cibo e acqua, lo stabulario è stato mantenuto a una temperatura costante di 24°C con cicli giorno/notte di 12 ore ciascuno. Tutti gli animali sono stati sacrificati attraverso l'inalazione dell'anestetico isofluorano per minimizzare la sofferenza. Al momento del sacrificio, i topi sono stati sottoposti a necropsia e i tessuti sono stati parzialmente fissati in formalina al 10% (Sigma Aldrich) e in parte congelati in azoto liquido.

Per gli esperimenti riguardanti la veicolazione dei microRNA, e l'uso del miR-199a-3p come agente terapeutico contro l'epatocarcinoma avanzato, è stato utilizzato esclusivamente il modello murino TG221, le cui caratteristiche sono state in precedenza descritte [53]. Nello studio di veicolazione gli animali sono stati usati tal quali, mentre nello studio terapeutico la formazione di tumori è stata accelerata tramite l'uso del carcinogeno Dietilnitrosammina (DEN, Sigma Aldrich): gli animali sono stati trattati a 10 giorni di vita con una dose di 7.5 mg/kg di DEN. Gli animali sono stati assegnati casualmente ai diversi gruppi all'inizio dei trattamenti. Il protocollo per la sperimentazione animale è stato approvato dal Ministero Italiano della Salute (approvazione no. 55/2015-PR, rilasciato il 29 gennaio 2015).

Per lo studio riguardante lo sviluppo del modello cirrotico e il trattamento di profilassi con il miR-199-a3p sono stati utilizzati animali Wild Type (WT) e animali TG221, derivati da tale ceppo [53]. La cirrosi epatica è stata indotta negli animali WT e TG221 tramite somministrazioni di CCl₄ al 20% in olio d'oliva (Sigma Aldrich), come descritto da Fujii et al. [87]. Animali WT (n=5) e TG221 (n=10) hanno ricevuto CCl₄ per via orale 3 volte alla settimana per 14 settimane consecutive, a partire dalla quinta-sesta settimana di vita. Un gruppo di animali WT (n=5) e TG221 (n=5) è stato usato come controllo non trattato per il relativo ceppo. Dalla quattordicesima settimana di trattamento, gli animali sono stati monitorati per la presenza di lesioni epatiche usando un ecografo a (Philips, IU22): per le analisi ecografiche gli animali sono stati sedati con un'iniezione intramuscolare di Ketamina (100mg/kg)/Xilazina (10mg/kg). Gli animali sono stati sacrificati alla ventiduesima settimana per poi eseguire le indagini istologiche e molecolari. Lo sviluppo del modello murino e il trattamento di profilassi tramite oligonucleotidi mimics sono stati approvati dal Ministero Italiano della Salute (approvazione no.713/PR, rilasciata il 22 luglio 2016).

3.5 Oligonucleotidi a RNA per la terapia *in vivo*

Il microRNA-199a-3p non modificato a singolo filamento ottenuto da Axolabs GmbH (Kulmbach, Germany) è stato utilizzato sia per lo studio terapeutico, sia per quello di profilassi: la sequenza del microRNA è 5'-ACAGUAGUCUGCACAUUGGUUA-3'. Un oligonucleotide non modificato "scramble" (Axolabs, Germany), è stato usato come controllo negativo.

Nel trattamento dell'epatocarcinoma avanzato, gli animali a 5 mesi di vita sono stati suddivisi in gruppi che hanno ricevuto i vari trattamenti: controlli trattati con 5mg/kg di oligonucleotide "scramble" (n=9); animali trattati con il miR-199-a-3p 5mg/kg (n=7) e un gruppo trattato con Sorafenib (5mg/kg, n=7). Gli oligonucleotidi sono stati somministrati 3 volte alla settimana per via intraperitoneale, sfruttando le nanoparticelle lipidiche come strumento di veicolazione. I trattamenti sono stati eseguiti per 3 settimane consecutive: gli animali sono stati sacrificati a 24 ore dall'ultimo trattamento.

Per lo studio di profilassi, gli animali, dalla quinta-sesta settimana di vita ricevono CCl₄ via orale per 14 settimane, come descritto precedentemente. Alla decima settimana di trattamento sono stati suddivisi in due gruppi: un gruppo di controllo (n=9) trattato con l'oligonucleotide "scramble" e un gruppo trattato con il mimic del

miR-199a-3p (5mg/kg, n=6). Gli oligonucleotidi sono stati somministrati per via intraperitoneale sfruttando le nanoparticelle lipidiche come veicolo, tre volte alla settimana per 12 settimane consecutive. 24 ore dopo l'ultimo trattamento, gli animali sono stati sacrificati.

3.6 Nanoparticelle lipidiche

Per ottimizzare la veicolazione dei microRNA abbiamo utilizzato le nanoparticelle lipidiche descritte da Huang et al. [88] e già sfruttate nel nostro laboratorio per la veicolazione del miR-26a in un modello di leucemia linfatica cronica [89]. Le nanoparticelle vuote sono formate da 1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (DOPE), Metoxypolietilen-glicole (DMG-PEG, Peso molecolare 2,000; Avanti Polaris Lipids, Alabaster, Al, USA), e Acido Linoleico (Sigma Aldrich) in rapporto molare di 50:48:2. La soluzione di lipidi preparata in etanolo 100% è stata spinta con forza in Hepes 20nmol/L a pH 4.0 (Sigma Aldrich), quindi sonicata per 5 minuti e conservata a 4°C fino al momento dell'uso. Il microRNA è stato inserito nelle nanoparticelle come indicato in **Figura 4**. Il mimic del miR-199a-3p è stato mescolato con polietilenimine (PEI, Peso molecolare 2,000, Sigma Aldrich) a temperatura ambiente: il rapporto tra le moli di ammine del PEI e il gruppo fosfato del RNA è di 10:1. La mix di miRNA e PEI viene mescolata con le nanoparticelle lipidiche vuote: il tutto è sonicato 5 minuti e poi riposto in incubatore per 45 minuti. Le nanoparticelle caricate con il miR-199a-3p devono essere usate entro un'ora dalla preparazione. Le dimensioni delle nanoparticelle vuote sono di 129.6 ± 1.0 nm e raggiungono i 137.6 ± 1.0 nm quando viene inserito il microRNA [88].

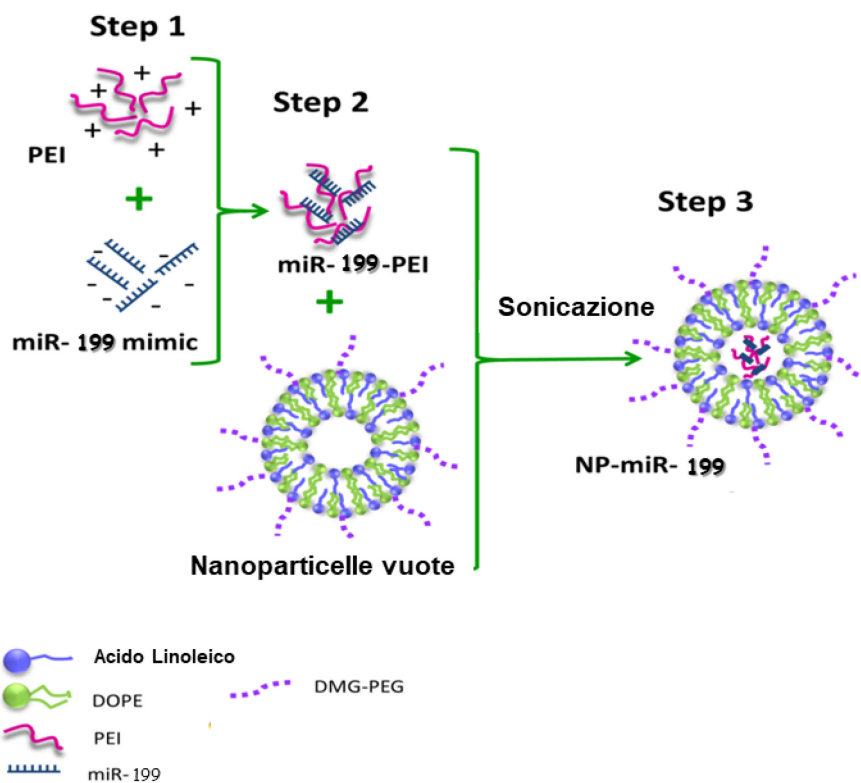


Figura 4. Preparazione delle nanoparticelle lipidiche caricate con il miR-199a-3p. Riassunto schematico delle fasi di caricamento del miR-199-3p nelle nanoparticelle vuote. Il miR-199a-3p è abbreviato in miR-199. Immagine tratta da [88] e modificata.

3.7 Farmaci anti-tumorali

Sorafenib tosilato (Sellekchem Cat. #S1040, Houston, TX, USA) è stato dissolto in una soluzione 50:50 di Cremophor EL e etanolo (Sigma Aldrich) per gli esperimenti *in vivo*, come indicato dalla ditta produttrice. Gli animali sono stati trattati giornalmente con una dose di 5mg/kg di Sorafenib per via orale.

3.8 Quantificazione di ascite

Al momento del sacrificio, è stata eseguita una laparotomia e quattro strisce di carta assorbente (5 x 30 mm) sono state inserite nella cavità addominale per 3 minuti. La quantità di liquido accumulato è stata calcolata come la differenza di peso della striscia tra prima e dopo l'inserimento nella cavità addominale.

3.9 Procedure istologiche

Per le indagini istologiche i tessuti di almeno due frammenti rappresentativi di ogni lobo epatico sono stati prelevati durante la necropsia, fissati in formalina

tamponata al 10% (Sigma Aldrich) per 12 - 24 ore, quindi inclusi in paraffina. Sezioni di 4 micron sono state colorate con ematossilina e eosina per determinare istologicamente il numero e le dimensioni dei noduli. Per valutare le aree fibrotiche è stata utilizzata la colorazione "Sirius Red": sezioni di 4 micron sono state deparafinizzate, reidratate e quindi messe in incubazione per 1 ora in acido picrico saturato con 0.1 Sirius Red F3BA (Aldrich Chemicals, St. Louis, MO, USA) a temperatura ambiente. In seguito, le sezioni sono state lavate due volte con una soluzione di acido acetico e infine disidratate tramite una serie di incubazioni con etanolo a concentrazione crescente. L'area fibrotica è stata individuata su quattro differenti porzioni di ogni vetrino, acquisite all'ingrandimento di 2.5X, e calcolata usando il programma ImageJ (<https://imagej.nih.gov>). La formula utilizzata per il calcolo finale è: $[\text{area collagene} / (\text{area totale} - \text{area del lume vascolare})] \times 100$.

3.10 Criteri morfologici utilizzati per la classificazione dei noduli epatici

La classificazione di noduli epatici è stata eseguita sfruttando le caratteristiche morfologiche, individuate durante le indagini istologiche. Gruppi di cellule displastiche, con un diametro minore di 500 micron, ben separati dal tessuto epatico e con una crescita espansiva e diffusa verso le placche epatocellulari circostanti, sono classificati come foci displastici. Questi sono generalmente localizzati attorno alla vena centrale e sono caratterizzati da epatociti ingrossati per l'accumulo di grasso, citoplasma denso ed eosinofilo con depositi di sostanze o globuli ialini. Lesioni con caratteristiche simili, ma con un diametro maggiore di 500 micron, sono state classificate come noduli displastici. Gli stessi criteri, ma con una soglia di 1000 micron, vengono applicati per la classificazione dei noduli nell'uomo [90].

La trasformazione maligna è stata individuata sulla base della presenza delle seguenti caratteristiche: sviluppo di noduli all'interno di altri noduli, atipia nucleare, aumento del rapporto tra nucleo e citoplasma, attività mitotica e aumento della larghezza trabecolare.

3.11 Estrazione di RNA e analisi tramite "droplet digital PCR"

L'RNA totale è stato estratto dalle cellule o dai tessuti congelati utilizzando la metodica TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, Ca, USA), seguendo le istruzioni della ditta fornitrice. Per l'analisi quantitativa abbiamo utilizzato l'innovativa tecnica di "Droplet Digital Polymerase Chain Reaction (ddPCR)", che permette la

quantificazione diretta ed assoluta di sequenze specifiche di acidi nucleici in modo preciso e rapido. Per l'analisi di espressione dei microRNA, abbiamo retrotrascritto 5ng di RNA, usando il kit "TaqMan microRNA Reverse Transcription" (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA). Il cDNA ottenuto è stato amplificato grazie alla Supermix per "probes" (BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA) e alla sonda TaqMan® specifica per il miR-199a-3p (Applied Biosystem, ID Assay #002304). La generazione delle droplets, i cicli di amplificazione ottimizzati per la metodica TaqMan® e la quantificazione delle droplets positive sono state precedentemente descritte in un lavoro eseguito dal nostro gruppo [91]. La quantità di RNA utilizzato è stata normalizzata sfruttando il saggio TaqMan® per l'RNA non codificante U6 (Applied Biosystem, ID Assay #001973).

La quantificazione del mRNA è stata eseguita sfruttando sempre la ddPCR, ma attraverso la metodica Evagreen. 200 ng di RNA totale sono stati retrotrascritti in modo universale, usando "random primers" e oligo dT (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Dopo aver eseguito le necessarie diluizioni, 1 ul di cDNA è stato utilizzato per l'amplificazione in una mix di reazione contenente la "ddPCR Evagreen Supermix" (BioRad) e i primers specifici, elencati in **Tabella 4**. Anche in questo caso, la generazione delle droplets, i cicli di amplificazione e il conteggio delle droplets positive sono già state ottimizzate dal nostro gruppo e riportate nel lavoro pubblicato da Miotto et al. [91]. Per normalizzare la quantità di cDNA utilizzato per l'analisi abbiamo usato il gene della β -Actina.

Tabella 4. Sequenze dei primers utilizzati per l'analisi di mRNA.

Gene	Nome Gene	mRNA	Primer Forward	Primer Reverse
Afp	alpha fetoprotein	NM_007423.4	GCACGAAAATGAGTTTGGG ATAG	CTGGGTAAAGGTGAT GGTAGC
Tff3	trefoil factor 3	NM_011575.2	CTGGGATAGCTGCAGATTA CG	AGGGCACATTTGGG ATACTG
Scd2	stearoyl- Coenzyme A desaturase 2	NM_009128.2	ATTTGGGAGCCTTGTACGG	CGTGCCTTGTATGTT CTGTG
Lpl	lipoprotein lipase	NM_008509.2	AACAAGGTCAGAGCCAAGA G	CCATCCTCAGTCCCA GAAAAG
Gpc3	glypican 3	NM_016697.3	AGAAACCTTATCCAGCCGA AG	AGTTCTTGTCCGTT CAGC
Tgfb1	transforming growth factor, β 1	NM_011577.2	CCTGAGTGGCTGTCTTTT G	CGTGGAGTTTGTAT CTTTGCTG
Ctgf	connective tissue growth factor	NM_010217.2	CTCCACCCGAGTTACCAAT G	TGGCGATTTTAGGT GCCG
α-Sma	alpha smooth muscle actin	NM_007392.3	GTGAAGAGGAAGACAGCAC AG	GCCATTCCAACCAT TACTCC

3.12 Analisi dell'espressione genica tramite tecnologia microarray

La qualità dell'RNA estratto tramite TRIzol (Invitrogen) è stata valutata usando lo strumento Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA): i campioni di buona qualità sono stati utilizzati per l'analisi di espressione genica tramite tecnologia microarray, che permette di valutare l'espressione di 60mila geni in otto campioni diversi contemporaneamente. L'RNA è stato ibridizzato su un vetrino "Agilent Whole Mouse Gene Expression Microarray" (Agilent Technologies, Cat. #G4852A, 8x60k), e l'analisi di espressione genica è stata eseguita secondo le istruzioni dell'azienda produttrice. Il cRNA è stato sintetizzato da 100ng di RNA totale di partenza, usando il kit "Low RNA Input Linear Amplification" (Agilent Technologies) e marcato tramite Cianina 3-citosina trifosfato (CTP; Agilent Technologies). Il vetrino ibridato è stato letto dallo scanner Agilent e le immagini generate sono state interpretate dal programma "Feature Extraction v.10.5" (Agilent Technologies), che ha fornito i dati grezzi. L'analisi è stata eseguita attraverso il programma "Qlucore Omics Explorer" (QOE; <https://www.qlucore.com/>; Qlucore AB, Lund, Svezia).

3.13 Analisi dei livelli proteici tramite Western Blot

Per eseguire l'analisi dei livelli proteici, le cellule, una volta raccolte, sono state lavate con tampone fosfato salino (PBS) e i tessuti prelevati sono stati immediatamente congelati in azoto liquido: entrambe le tipologie di campioni sono state conservate a -80°C fino all'estrazione delle proteine. I campioni sono stati dissolti in tampone di radioimmunoprecipitazione (RIPA, Sigma Aldrich), addizionato degli inibitori di fosfatasi e proteasi (Sigma Aldrich). I lisati sono stati centrifugati a $8,000 \times g$ per 10 minuti a 4°C per far precipitare i detriti cellulari. Il surnatante è stato raccolto e utilizzato per l'analisi tramite Western Blot. Gli anticorpi utilizzati, riportati in **Tabella 5**, sono stati diluiti in una soluzione di BSA al 5% v/v (Sigma Aldrich), 1x TBS e 0.1% Tween@20 (BioRad Laboratories) e incubati per 16 ore a 4°C . Per la normalizzazione sono stati utilizzati gli anticorpi β -Actina e Gliceraldeide Trifosfato Deidrogenasi (GAPDH), anch'essi riportati in tabella 5. Per il rilevamento della chemiluminescenza, l'anticorpo secondario contro le immunoglobuline G (IgG) di coniglio coniugato alla perossidasi di rafano (Cell Signaling, Danvers, MA, USA; Cat. #7074), è stato utilizzato in combinazione con il "Clarity™ Western ECL Blotting Substrate" (BioRad Laboratories). Le immagini digitali sono state acquisite tramite lo strumento Chemidoc (BioRad Laboratories) e le bande ottenute sono state quantificate con il programma ImageJ. I livelli di espressione delle proteine sono stati normalizzati sull'espressione della proteina costitutivamente espressa.

Tabella 5. Anticorpi per le analisi di Western Blot

Anticorpo	Ditta	Numero di catalogo
PTEN Antibody	Cell Signaling	9552
Akt (pan) (C67E7) Rabbit mAb	Cell Signaling	4691
Phospho-Akt (Ser473) (D9E) XP® Rabbit mAb	Cell Signaling	4060
mTOR (7C10) Rabbit mAb	Cell Signaling	2983
Phospho-mTOR (Ser2481) Antibody	Cell Signaling	2974
FoxO3a (D19A7) Rabbit mAb	Cell Signaling	12829
Phospho-FoxO1 (Thr24)/FoxO3a (Thr32)/FoxO4 (Thr28) (4G6) Rabbit mAb	Cell Signaling	2599
FOXM1 Rabbit Polyclonal Antibody	Origene Technologies ,Rockville, MD, USA	TA327273
PAK4 Antibody	Cell Signaling	3242
GAPDH Rabbit Polyclonal Antibody	Origene Technologies	TA890003
β-Actin (13E5) Rabbit mAb	Cell Signaling	4970

3.14 Analisi statistiche

Le differenze tra i gruppi sono state analizzate sfruttando il test-*t* di Student a due code. La soglia di significatività è stata fissata ad un p-value di 0.05. Quando appropriato, i valori riscontrati per ogni gruppo sono stati rappresentati in termini di media ± deviazione standard (DS). Per tutte le analisi dei dati è stato utilizzato il programma GraphPad Prism v. 6.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). Nessun animale o campione è stato escluso dalle analisi.

4. RISULTATI

4.1 Il miR-199a-3p ha un effetto pro-apoptotico sulle linee cellulari Hep3B e HepG2

Primo obiettivo è stato analizzare quale potesse essere l'effetto sulla vitalità cellulare in seguito al ripristino dell'espressione del miR-199a-3p in linee cellulari umane di HCC, Hep3B e HepG2. Le cellule sono state infettate con un vettore virale adeno-associato (AAVV) in grado di esprimere il miR-199a-3p (AAVV-199). Cellule non infettate (NI) o infettate con un AAVV-GFP sono state utilizzate come controlli negativi. Dopo 120 ore, tempo richiesto affinché avvenga l'espressione dei geni da parte del vettore, le cellule sono state raccolte per essere analizzate.

Per provare l'efficacia del vettore, sono stati inizialmente valutati i livelli del miRNA. In entrambe le linee cellulari abbiamo effettivamente riscontrato un aumento dell'espressione del miR-199a-3p, circa 25 volte nelle Hep3B e circa 10 volte nelle HepG2 (**Figura 5A e 5C**).

Abbiamo poi valutato gli effetti del ripristino del miR-199a-3p su vitalità / morte cellulare tramite il saggio basatosu Annessina V e 7-AAD. In entrambe le linee cellulari, il 50% delle cellule infettate con AAVV-199 si trovava in uno stato di apoptosi, contro il 20% delle cellule di controllo (**Figura 5B e 5D**).

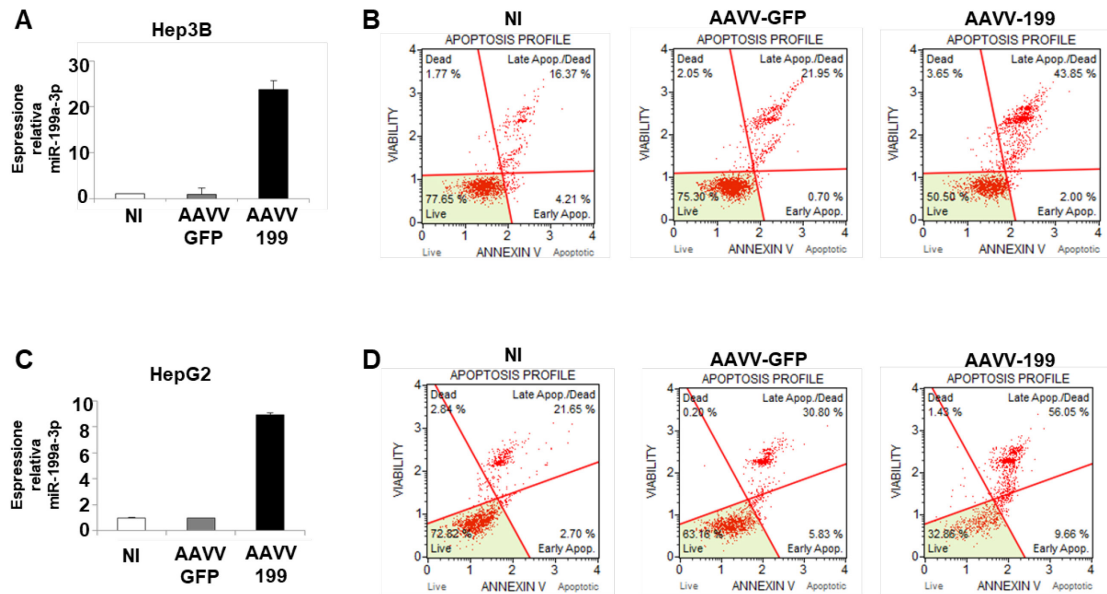


Figura 5. L'aumento del miR-199a-3p ha un effetto apoptotico su linee cellulari di epatocarcinoma. L'espressione del miR-199a-3p è stata indotta nelle linee cellulari di epatocarcinoma Hep3B e HepG2 tramite un vettore AAVV che esprime tale microRNA (AAVV-199). Come controllo sperimentale, le cellule sono state infettate con un virus AAVV che esprime la GFP (AAVV-GFP) oppure non sono state infettate (NI). Le analisi biologiche e molecolari sono state eseguite 120 ore dopo l'infezione. **(A e C)** L'espressione del miR-199a-3p è stata determinata tramite ddPCR: le cellule infettate presentano livelli significativamente più alti del microRNA rispetto ai controlli (p -value < 0.0001 per entrambe le linee cellulari). I dati riportati sono le medie di condizioni sperimentali eseguite in triplicato. **(B e D)** In entrambe le linee cellulari, le cellule trattate con AAVV-199 presentano un aumento dell'apoptosi rispetto alle cellule non trattate; al contrario le cellule infettate con AAVV-GFP non presentano cambiamenti apprezzabili nella vitalità rispetto alle cellule di controllo.

4.2 Il miR-199a-3p induce la regolazione di PAK4 e MTOR in linee cellulari umane

Per confermarne l'azione molecolare, abbiamo analizzato l'effetto su alcuni bersagli genici diretti del miR-199a-3p. Tramite Western Blot, abbiamo dimostrato che MTOR, conseguentemente anche p-MTOR (S2481), e PAK4 mostrano livelli dimezzati nelle cellule trattate con il miR-199a-3p rispetto ai controlli cellulari non trattati o trattati con AAVV-GFP (**Figura 6A**). Abbiamo anche osservato che l'effetto del miR-199a-3p sul pathway di MTOR si ripercuote anche a valle, come dimostra l'aumento dell'oncosoppressore FOXO3A e, allo stesso tempo, la riduzione di p-FOXO3A, forma inattiva dell'oncosoppressore. L'aumento di

FOXO3A è poi responsabile dell'abbassamento di FOXM1, oncoproteina coinvolta in insorgenza e progressione di HCC (**Figura 6B**) [92].

L'aumento del miR-199a-3p ha quindi indotto un effetto pro-apoptotico *in vitro*, agendo su PAK4 e sulla via di MTOR.

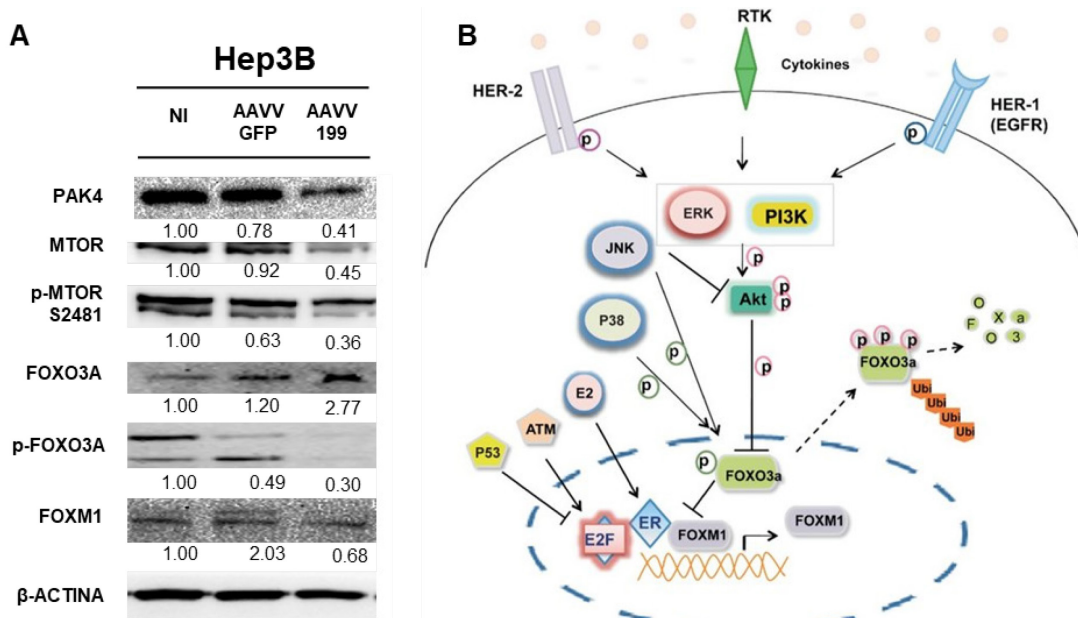


Figura 6. (A) Per valutare l'effetto molecolare del miR-199a-3p è stata eseguita l'analisi dei livelli proteici sulla linea cellulare Hep3B a 120 ore dall'infezione. L'aumento del miR-199a-3p determina l'abbassamento dei suoi target diretti MTOR, anche nella sua forma fosforilata Ser2481, e PAK4; inoltre provoca l'abbassamento della forma fosforilata di FOXO3A e di FOXM1. La forma non fosforilata di FOXO3A, invece aumenta in seguito al trattamento con il miR-199a-3p. Cellule non infettate sono state prese come riferimento per la normalizzazione dei dati e la β -Actina è stata utilizzata come normalizzatore interno. **(B)** Figura schematica della relazione tra FOXO3A e FOXM1 in condizioni di HCC, tratta da [92]. Una volta fosforilato da AKT, p-FOXO3A viene trasportato fuori dal nucleo, ubiquitinato e degradato. In questo modo p-FOXO3A non può più contrastare l'attività di FOXM1, che agisce da fattore di trascrizione su molti oncogeni.

4.3 Il miR-199a-3p può essere veicolato efficientemente *in vivo* sfruttando le nanoparticelle lipidiche (NP)

Dopo aver validato l'effetto del miR-199a-3p *in vitro* su due linee cellulari umane, abbiamo indagato se potesse avere un effetto biologico in un modello animale. Come riportato da diversi studi, i miRNA non sono stabili quando inoculati *in vivo*, poiché sono rapidamente degradati in circolo, penetrano difficilmente nei tessuti tumorali e sono trasportati con difficoltà all'interno della cellula [47, 93]. Date le piccole dimensioni e il basso peso molecolare, i miRNA possono essere introdotti in sistemi di trasporto per ottimizzare la loro veicolazione *in vivo* [47]. Tra i vari sistemi, abbiamo scelto nanoparticelle lipidiche, descritte in precedenza da Huang

et al. [88], poiché si sono dimostrate efficienti nella veicolazione dei miRNA, non hanno indotto risposta immunitaria negli animali e vengono sequestrate in maniera limitata dalle proteine plasmatiche [88, 89].

Per identificare la miglior via di somministrazione sistemica abbiamo comparato la via intraperitoneale (I.P.) e quella endovenosa (I.V.). Tre topi per gruppo sono stati trattati con una singola dose di miR-199a-3p (2.5 mg/kg) e tre topi non trattati sono stati utilizzati come controlli (CTRL). Dopo 24 ore dal trattamento gli animali sono stati sacrificati, gli organi prelevati e tramite ddPCR abbiamo analizzato i livelli del miR-199a-3p nel fegato, dove si riscontra un significativo incremento rispetto ai controlli. I livelli raggiunti dal miR-199a-3p sono simili per le due vie di somministrazione: abbiamo perciò scelto la via I.P. per i successivi esperimenti, poiché risulta essere più pratica e riproducibile. Infatti, in caso di inoculazioni multiple, la via I.V. prevede che i topi subiscano anestesia e siano posizionati in strumenti di immobilizzazione. Inoltre, oltre alla richiesta di un certo livello di manualità, rimane il rischio di chiusura delle vene dopo un certo numero di inoculazioni. Al contrario le inoculazioni I.P. sono più facilmente eseguibili in un quadrante del basso addome, il topo rimane cosciente durante il trattamento e si può alternare il lato in cui eseguire l'inoculazione (**Figura 7A**).

Una volta prescelto il metodo di somministrazione sistemico, abbiamo valutato se il miR-199a-3p fosse veicolato in maniera efficiente al fegato tramite le nanoparticelle lipidiche, così da sfruttare pienamente un suo eventuale effetto biologico. L'efficienza di veicolazione delle nanoparticelle è stata comparata con quella ottenuta sfruttando la Polietilenimmina, commercializzata con il nome di in-vivo Jet-PEI®, polimero molto utilizzato per la veicolazione di oligonucleotidi [94]. Abbiamo analizzato la biodistribuzione del miR-199a-3p in 3 animali inoculati con una singola dose di 5mg/kg di miR-199a-3p veicolato per via I.P., tramite nanoparticelle lipidiche o in-vivo jet-Pei®. Un numero analogo di animali non trattati è stato utilizzato come controllo per la normalizzazione. I risultati in **Figura 7B** rappresentano il livello medio del miR-199a-3p nei diversi organi analizzati. 24 ore dopo la somministrazione, il fegato si presenta come l'organo maggiormente bersagliato dal miRNA: la veicolazione tramite nanoparticelle lipidiche ha causato un incremento del miR-199a-3p di circa 800 volte rispetto al fegato di controllo, viceversa il Jet-PEI® ha aumentato i livelli del miRNA di sole 100 volte. Le nanoparticelle lipidiche, quindi, permettono una più efficiente veicolazione del miR-

199a-3p al fegato rispetto al metodo più comunemente utilizzato basato su Jet-PEI®.

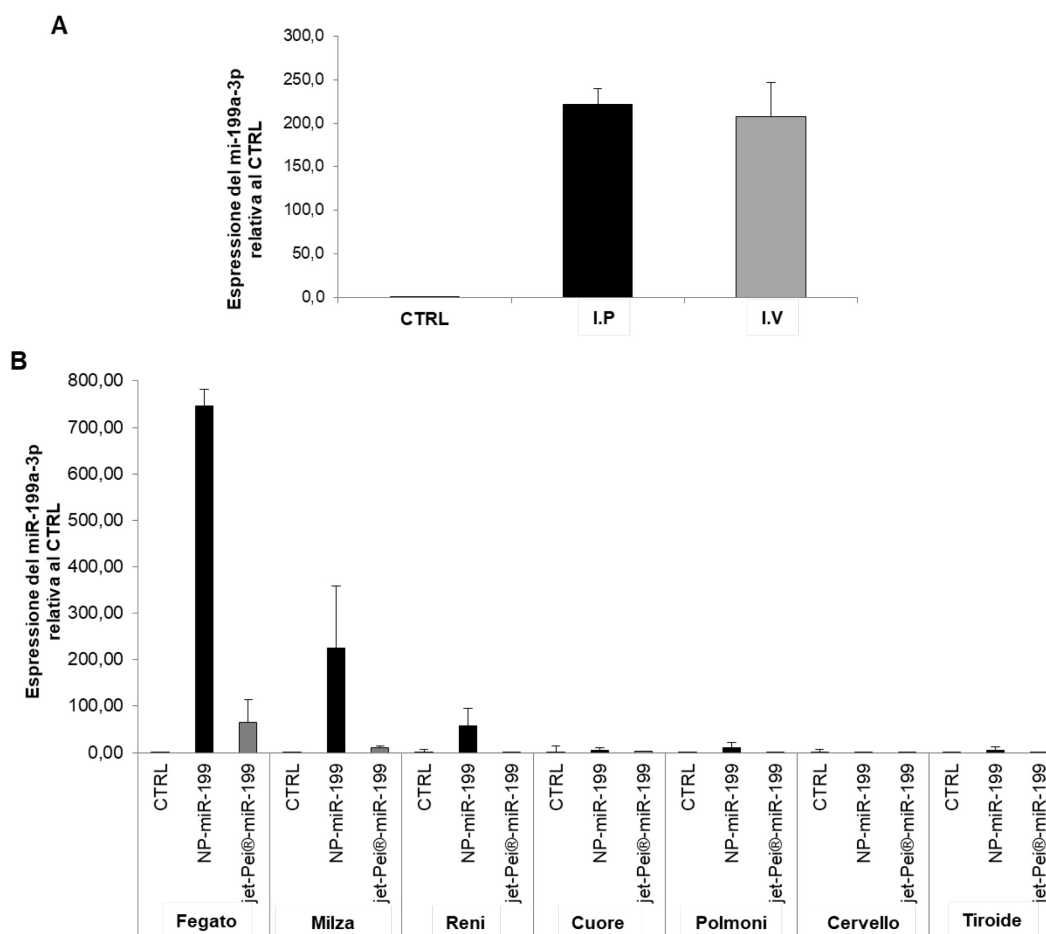


Figura 7. Le nanoparticelle lipidiche veicolano in modo efficiente il miR-199a-3p al fegato. (A) Tre topi per gruppo hanno ricevuto una singola dose di miR-199a-3p (2.5mg/kg) per via I.P. o I.V., mentre tre topi non trattati sono utilizzati come controlli (CTRL). 24 ore dopo, gli animali sono stati sacrificati e i livelli del miR-199a-3p nel fegato sono stati analizzati tramite ddPCR. I risultati sono rappresentati come la media di ogni condizione + deviazione standard (DS). L'RNA non codificante U6 è stato usato per la normalizzazione interna. Le due vie sistemiche sono comparabili (B) Tre topi sono stati trattati con una singola dose (5mg/kg) di miR-199a-3p veicolato tramite nanoparticelle lipidiche (NP-miR-199) o tramite jet-Pei® (jet-Pei® -miR-199) e sacrificati dopo 24 ore; animali non trattati (CTRL) sono stati usati come controlli. L'analisi dei livelli del miR-199a-3p è stata eseguita mediante ddPCR. Il risultato è rappresentato come media dei livelli per i tre animali di ogni condizione + DS. L'RNA non codificante U6 è stato usato per la normalizzazione interna. Il fegato è l'organo in cui il miR-199a-3p viene più efficacemente veicolato sia dalle nanoparticelle lipidiche sia dal jet-Pei®, tuttavia le NP consentono di veicolare il miR-199a-3p in questo organo circa 10 volte di più rispetto al jet-Pei®. In figura il miR-199a-3p è riportato come miR-199.

Sebbene con livelli inferiori al fegato, si osserva, inoltre un significativo incremento del miRNA veicolato tramite nanoparticelle in milza e polmoni. Mentre la presenza di alti livelli di miRNA nei reni è presumibilmente indicazione della via preferenziale di eliminazione dei miRNA dal circolo ematico.

4.4 Il miR-199a-3p rallenta la crescita tumorale nel modello murino TG221

Stabilito il metodo ottimale per veicolare miRNA al fegato, abbiamo condotto un esperimento *in vivo* su topi TG221 per valutare se il miR-199a-3p abbia un effetto terapeutico contro l'HCC. Tutti i topi impiegati sono stati trattati a 10 giorni di vita con il carcinogeno DEN per accelerare la comparsa dei tumori [53]. Raggiunti i 5 mesi di vita gli animali sono stati suddivisi in tre diversi gruppi: 7 topi sono stati trattati con il mimic del miR-199a-3p (5mg/kg) veicolato tramite NP via I.P., 3 volte alla settimana; 9 topi sono stati trattati con un oligonucleotide "scramble" (CTRL), utilizzati come controlli negativi; infine, 7 animali sono stati trattati con Sorafenib (5 mg/kg) per via orale tutti i giorni, utilizzati come controlli positivi, in quanto tale farmaco rappresenta lo standard per la terapia del HCC avanzato. Tutti i trattamenti sono stati eseguiti per 3 settimane consecutive (**Figura 8A**).

Dopo 24 ore dall'ultimo trattamento gli animali sono stati sacrificati, i tessuti di interesse sono stati prelevati, ed è stata eseguita un'analisi del numero e della dimensione dei noduli tumorali. In **Figura 8B** sono riportate immagini rappresentative dei risultati. I topi trattati con miR-199a-3p presentavano un numero di noduli per topo inferiore rispetto al gruppo di controllo (p-value 0.0068). Inoltre, anche il diametro medio dei noduli è risultato minore rispetto ai controlli (p-value < 0.0001) (**Figura 8C**). È interessante notare che i risultati conseguiti con il mimic del miR-199a-3p sono comparabili a quelli ottenuti con il Sorafenib, attualmente unico farmaco sistemico approvato per il trattamento di prima linea di HCC in stadio avanzato [1].

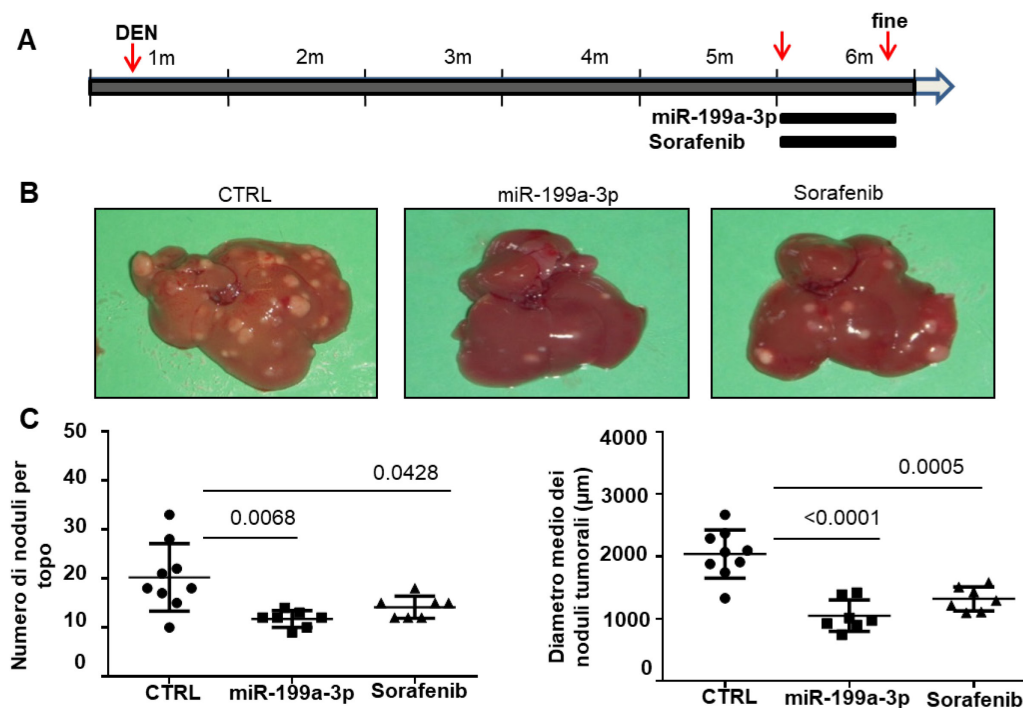


Figura 8. L'aumento del miR-199a-3p blocca la crescita tumorale. (A) Topi TG221 sono trattati I.P. con il carcinogeno DEN (7.5 mg/kg) a 10 giorni di vita. A cinque mesi sono iniziati i trattamenti con il "mimic" del miR-199a-3p (5mg/kg) 3 volte alla settimana via I.P. (n=7). Lo stesso protocollo è stato usato per i topi di controllo (n=9) inoculati con un oligonucleotide "scramble" (CTRL). Il trattamento giornaliero con il Sorafenib 5mg/kg (n=7) per via orale, è stato usato come controllo positivo, poiché farmaco di riferimento per il trattamento dell'HCC. I trattamenti sono stati eseguiti per 3 settimane consecutive. (B e C) Gli animali sono stati sacrificati 24 ore dopo l'ultimo trattamento e le lesioni epatiche sono state analizzate. Il numero e le dimensioni dei noduli sono significativamente inferiori nei topi trattati con il miR-199a-3p e con il Sorafenib rispetto ai controlli. In grafico sono mostrati i valori assunti da ogni campione \pm DS.

Poiché i trattamenti con Sorafenib e miR-199a-3p hanno raggiunto risultati comparabili, abbiamo combinato le due terapie per verificare un potenziale effetto additivo nel rallentamento della patologia. Il trattamento combinato è stato eseguito seguendo lo schema sperimentale definito per i trattamenti singoli. I risultati ottenuti non hanno tuttavia mostrato alcun effetto additivo di Sorafenib e miR-199a-3p: il numero di noduli riscontrati per topo e il diametro medio dei noduli tumorali non differiscono in modo significativo né rispetto al trattamento con il miR-199a-3p, né rispetto al Sorafenib come singole terapie (Figura 9A e B).

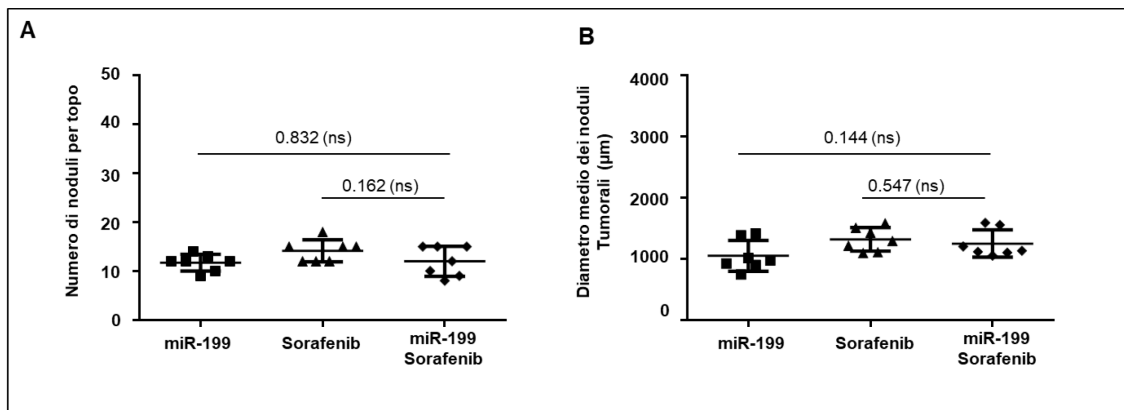


Figura 9. Trattamento combinato miR-199a-3p e Sorafenib. Un gruppo di topi (n=7) è stato trattato contemporaneamente con il mimic del miR-199a-3p (5mg/kg), via intraperitoneale 3 volte alla settimana, e con il Sorafenib (5mg/kg), per via orale tutti i giorni. Il trattamento è stato eseguito per 3 settimane consecutive. I risultati sono stati paragonati a quelli ottenuti con i trattamenti singoli. **(A)** Il numero medio dei noduli per topo, in seguito a trattamento combinato non diminuisce significativamente rispetto al miR-199-3p e Sorafenib (p-value rispettivamente 0.83, 0.162). **(B)** Anche il numero medio di noduli per topo in seguito a trattamento sinergico è comparabile ai singoli trattamenti (p-value 0.144 rispetto al miR-199-3p e 0.547 rispetto al Sorafenib). Nei grafici sono stati riportati i valori di ogni animale: è evidenziato il valore medio \pm DS. Il miR-199a-3p è abbreviato in miR-199.

4.5 Analisi molecolari degli effetti del miR-199a-3p in tessuti epatici normali e tumorali

Dimostrato l'effetto biologico del miRNA sulla crescita tumorale, abbiamo approfondito le analisi molecolari per chiarire il meccanismo tramite cui agisce il miR-199a-3p. Abbiamo eseguito le indagini molecolari sui tumori epatici prelevati subito dopo il sacrificio. Inizialmente, abbiamo valutato i livelli del miR-199a-3p nei i topi trattati con il mimic rispetto a quelli trattati con oligonucleotide "scramble" e un gruppo di topi non trattati (CTRL). Questi ultimi sono stati presi come riferimento per la normalizzazione dei dati (**Figura 10A**). La analisi ddPCR ha mostrato livelli di miR-199a-3p aumentati significativamente nei topi trattati con il mimic rispetto ai non trattati (p-value 0.006). Al contrario, i topi trattati con l'oligonucleotide "scramble" non presentavano alcuna variazione rispetto ai non trattati.

Stabilito l'aumento dei livelli del miRNA, abbiamo indagato l'effetto sui suoi target diretti MTOR [79] e PAK4 [77, 95]. La **Figura 10B** evidenzia che i livelli delle due proteine sono aumentati in campioni di HCC rispetto al fegato normale (NL), ma in seguito al trattamento con miR-199a-3p abbiamo riscontrato che i livelli di MTOR e PAK4 si riducono fino a quelli del NL o inferiori. Nessun effetto è stato riscontrato

nel gruppo trattato con l'oligonucleotide "scramble". Possiamo quindi concludere che l'aumento del miR-199a-3p ha prodotto una diminuzione dei suoi target MTOR e PAK4, che si è tradotto, a livello biologico, nel rallentamento della crescita dei noduli tumorali.

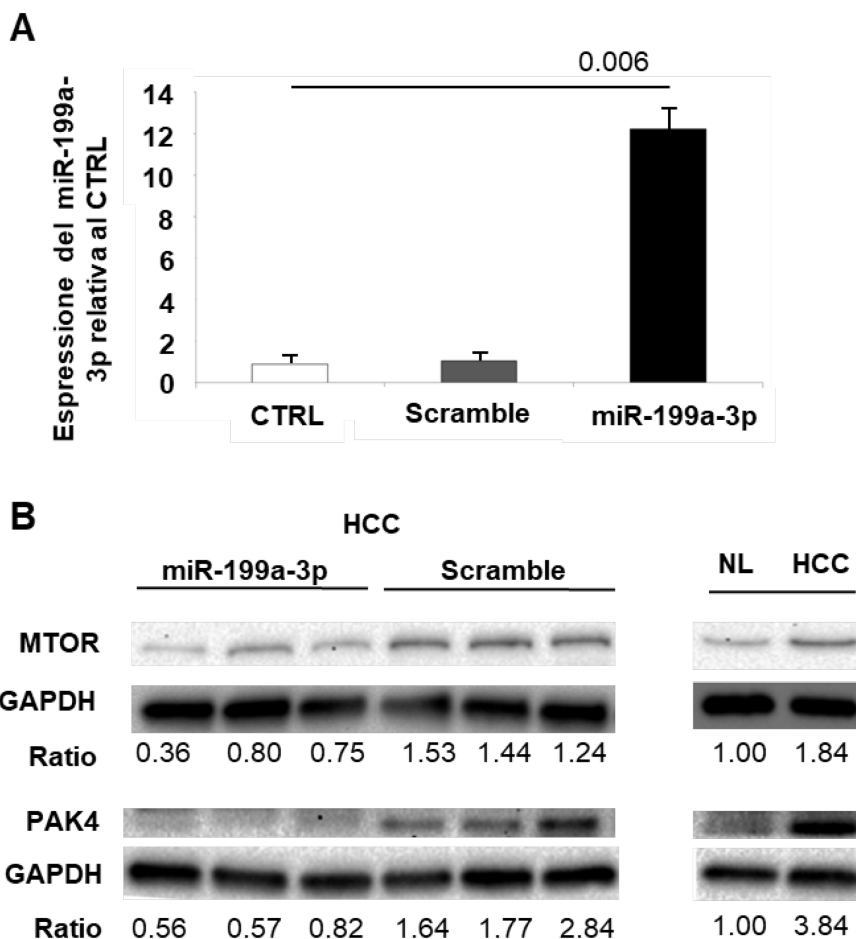


Figura 10. L'aumento del miR-199a-3p provoca l'abbassamento di MTOR e PAK4. (A) I livelli del miR-199a-3p sono stati valutati nel fegato 24 ore dopo l'ultimo trattamento tramite ddPCR. È stato riscontrato un aumento significativo dei livelli del microRNA nei topi trattati rispetto ai controlli (p-value 0.006). Nessuna differenza è stata rilevata nei topi trattati con l'oligonucleotide "scramble". In grafico è riportato il valore medio di ogni condizione + DS. L'RNA non codificante U6 è stato usato per la normalizzazione interna. (B) La valutazione dei livelli proteici di MTOR e PAK4 nei tessuti di HCC è stata eseguita tramite Western Blot. Il GAPDH è stato utilizzato come normalizzatore interno e i dati sono stati rapportati ai livelli riscontrati nel fegato normale (NL). L'aumento forzato del miR-199a-3p ha provocato la diminuzione dei suoi target diretti.

Come fatto in precedenza per le linee cellulari umane, abbiamo approfondito l'analisi del pathway di MTOR (**Figura 11A**). Abbiamo riscontrato che la via di MTORC1 non viene influenzata dal trattamento con il miR-199a-3p, poiché i livelli proteici di p-MTOR (S2448) e di p-S6, proteina fosforilata e attivata dalla cascata del segnale di MTORC1, non si abbassano significativamente in seguito al

trattamento. Al contrario, la via di MTORC2 viene inibita dal miR-199a-3p, infatti il trattamento provoca la riduzione a cascata, dell'espressione dei bersagli a valle di MTOR, p-AKT, p-FOXO3A e FOXM1, in tumori trattati con il miR-199a-3p rispetto ai controlli.

A ulteriore supporto dei risultati proteici, essendo FOXM1 un fattore di trascrizione [96], abbiamo valutato come la sua inibizione incidesse sui geni di cui promuove la trascrizione. Abbiamo eseguito un'analisi microarray per valutare i livelli di espressione genica su campioni HCC trattati con miR-199a-3p (**Figura 11B**). Il risultato, riportato sotto forma di heatmap, mostra il livello di svariati geni la cui trascrizione è indotta da FOXM1. La figura rappresenta il livello relativo (dal verde al rosso, a seconda del livello) di ciascun gene nelle diverse condizioni sperimentali e dimostra che nei campioni trattati con il miR-199a-3p, i geni controllati da FOXM1 presentano livelli di espressione intermedi tra HCC e fegato normale (NL). Tra questi, sono presenti diversi geni anti-apoptotici o coinvolti nella progressione del ciclo cellulare (*Ccnb1*, *Cdc25b*, *Cdc20*, *Cdk1*, *Tgfb2*, *Birc5/Survivin*), che hanno una bassa espressione in condizioni normali, mentre sono sovraespressi nei campioni di HCC.

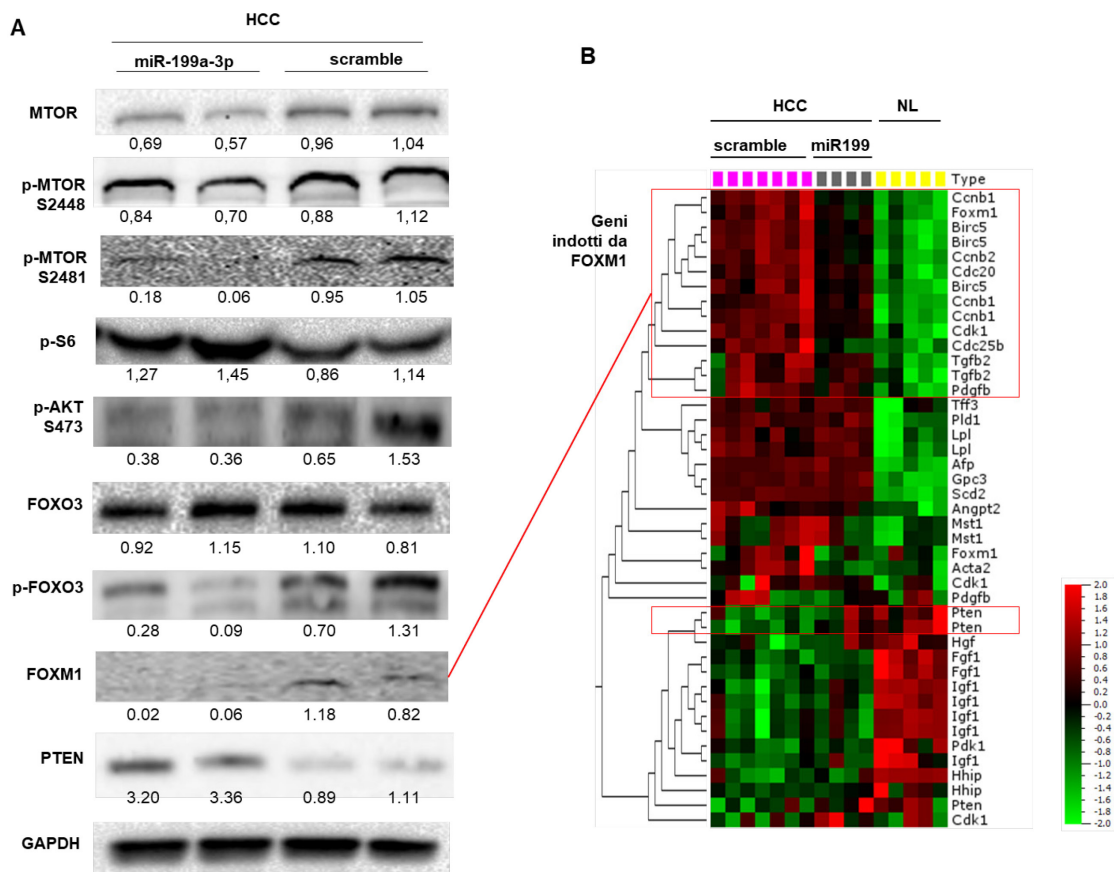


Figura 11. Il miR-199a-3p influenza la via di MTORC2, ma non quella di MTORC1, *in vivo*. L'analisi dei livelli proteici sui tessuti di epatocarcinoma trattati con il miR-199a-3p è stata svolta per indagare gli effetti molecolari del miR-199a-3p sulla via di MTORC1 e MTORC2. I livelli di p-MTOR (S2448) p-S6, forme fosforilate e attivate, coinvolte nel pathway di MTORC1, non si abbassano significativamente in seguito al trattamento con il miR-199a-3p. Nella via di MTORC2, invece, le forme attivate di MTOR (p-MTOR S2481), AKT (p-AKT S473) e il fattore di trascrizione FOXM1 si abbassano nei campioni trattati con il miR-199a-3p rispetto ai controlli. L'aumento del miR-199a-3p correla anche con la diminuzione della forma inattiva dell'oncosoppressore FOXO3A (p-FOXO3) e con l'aumento di PTEN. I valori medi degli HCC scramble sono stati utilizzati per la normalizzazione dei dati; GAPDH è stato utilizzato come normalizzatore interno. **(B)** Per valutare l'effetto dell'abbassamento di FOXM1 è stata eseguita un'analisi di espressione genica su campioni di HCC trattati con miR-199a-3p e confrontati con gli HCC trattati con l'oligonucleotide "scramble", e con la condizione non patologica (NL). Nell'analisi gerarchica non supervisionata a cluster, diversi geni coinvolti nella progressione del ciclo cellulare, nell'inibizione dell'apoptosi e nella progressione di fibrosi e cirrosi sono risultati sotto-espressi nei campioni trattati con il miR-199a-3p rispetto all'HCC "scramble". In rosso sono riportati i geni sovra-espressi, in verde quelli sotto espressi. Box viola=campioni trattati con l'oligonucleotide scramble; box grigie= campioni trattati con il miR-199a-3p; box gialle= fegato normale.

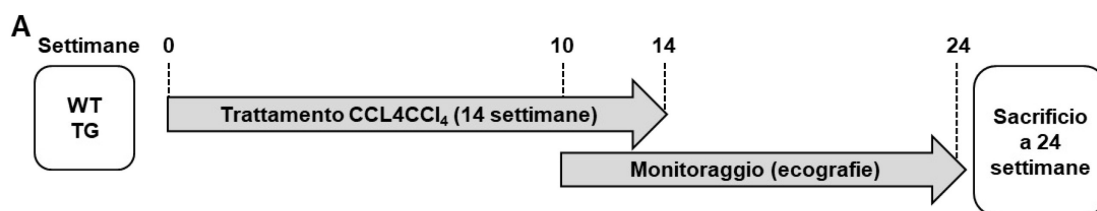
Inoltre, abbiamo osservato che i campioni di HCC trattati con il miR-199a-3p presentano l'innalzamento dell'oncosoppressore *Pten*, che invece è fortemente sotto-espresso in HCC. Questo dato è stato confermato tramite Western Blot: PTEN è espresso 3 volte di più nei campioni trattati con miR-199a-3p rispetto a quelli trattati con l'oligonucleotide "scramble".

Tramite queste indagini abbiamo individuato una firma molecolare su cui il miR-199a-3p ha agito comportandosi come potenziale agente antitumorale: inibendo MTOR e p-MTOR (S2481), ha provocato modifiche a cascata sulla via di segnale di MTORC2, innescando l'abbassamento degli oncogeni e l'innalzamento degli oncosoppressori.

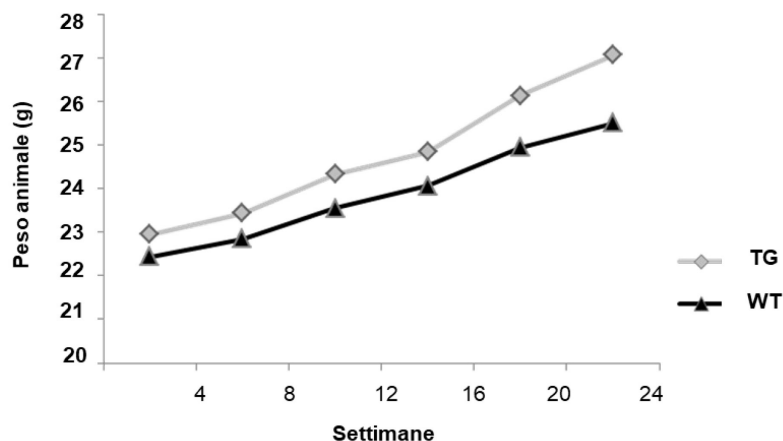
4.6 Il modello murino TG221 CCl4 sviluppa HCC in un ambiente cirrotico

Il modello TG221 precedentemente descritto permette lo sviluppo di tumori visibili a 5 mesi d'età, promossi dalla sovra-espressione del miR-221 e dal trattamento con DEN [53]. Questo modello, tuttavia, non sviluppa epatocarcinomi in ambiente cirrotico, condizione invece comune alla maggior parte degli HCC umani [3].

Fujii et al. hanno sviluppato un approccio metodologico capace di indurre cirrosi in seguito a somministrazioni ripetute per via orale di CCl4 [87]. Abbiamo perciò applicato tale metodo con lo scopo di ottenere un modello murino in cui la malattia evolva da fibrosi a cirrosi ed HCC. Gli animali TG221 (n=10) e WT (n=5) sono stati sottoposti a ripetute somministrazioni per via orale di CCl4 al 20% a partire dalla quinta / sesta settimana di vita. I trattamenti sono stati eseguiti 3 volte alla settimana per 14 settimane consecutive, dopo di che i topi sono stati monitorati per le successive 10 settimane (**Figura 12A**). Topi non trattati TG221 (n=5) e WT (n=5) sono stati utilizzati come controlli negativi dell'esperimento (CTRL). Durante il periodo di somministrazione di CCl4, i topi non hanno mostrato segni di sofferenza: a intervalli settimanali abbiamo rilevato i pesi degli animali e, come mostrato in **Figura 12B**, e per entrambi i gruppi è avvenuto un continuo aumento del peso nel tempo. Inoltre, lungo il corso del trattamento, gli animali sono stati monitorati per la presenza di lesioni epatiche tramite ecografie. Dopo 12-14 settimane di trattamento entrambi i gruppi di topi presentavano bordi epatici irregolari e versamenti peritoneali (ascite). Nelle 10 settimane successive tutti gli animali TG221, ma non i WT, hanno sviluppato anche noduli epatici. La **Figura 12C** riporta un'immagine ecografica del fegato di un topo TG221, rappresentativa delle tre caratteristiche riscontrate.



B



C

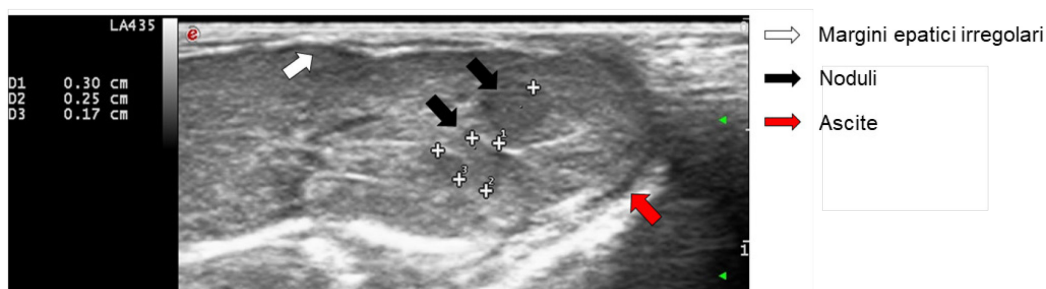


Figura 12. Il CCl₄ non è tossico e induce modifiche epatiche durante il trattamento in topi WT e TG221. (A) Fibrosi e cirrosi epatica sono state indotte in topi WT e TG221 tramite somministrazioni orali di CCl₄, ripetute per 14 settimane consecutive e sono stati sacrificati a 24 settimane dall'inizio del trattamento. **(B)** Durante il trattamento con l'epatotossina, gli animali non hanno mostrato sofferenza: per entrambi i gruppi (WT e TG221) non sono stati rilevati cali di peso. In grafico è riportato il peso medio di ogni gruppo in grammi ogni 4 settimane. **(C)** Sia i topi WT che i TG221 sono stati monitorati per la presenza di lesioni epatiche tramite ecografie dalla decima settimana di trattamento fino alla conclusione dell'esperienza. Fibrosi e cirrosi epatiche si sono manifestate in entrambi i gruppi. L'immagine riportata proviene dal fegato di un topo TG221, dove sono stati riscontrati: ascite nella cavità peritoneale (freccia rossa), margini epatici irregolari (freccia bianca) e noduli epatici (freccie nere).

Dopo 10 settimane dalla fine del trattamento con CCl₄, gli animali sono stati sacrificati e il fegato analizzato. L'accumulo di fluido ascitico nella cavità

peritoneale è stato quantificato sia nei topi WT che nei TG221 trattati con CCl₄, rispetto ai relativi controlli (p-value <0.001 per entrambi i gruppi, **Figura 13A**).

Abbiamo inoltre valutato le aree fibrotiche tramite analisi istologica con il colorante “Sirius Red”, che si lega alle fibre di collagene. In **Figura 13C-F** abbiamo riportato le immagini rappresentative della colorazione “Sirius Red” eseguita per topi WT non trattati (C), TG non trattati (D), WT trattati con CCl₄ (E) e TG trattati con CCl₄ (F). Durante la colorazione le fibre collagene assumono il colore rosso, e come si può notare, l’accumulo di collagene è maggiore per i topi trattati con l’epatotossina, rispetto ai relativi controlli. La colorazione ha dimostrato che topi WT e TG221 trattati con CCl₄ presentano tessuto epatico fibrotico comparabile e significativamente maggiore rispetto ai controlli (p-value <0.001 per entrambi i gruppi, **Figura 13B**). Il dato macroscopico rilevato al momento del sacrificio era in linea con quanto avevamo osservato grazie alle ecografie: abbiamo indotto fibrosi e cirrosi in entrambi i gruppi di topi.

L’attivazione del processo fibrotico è stata confermata anche dall’analisi dell’espressione di 3 marcatori associati ad incremento di fibrosi, *α-Sma* [97], *Ctgf* [98] e *Tgfb1* [99]. Abbiamo osservato che i livelli di tutti e tre i geni erano significativamente più alti nei gruppi di topi sottoposti al trattamento con CCl₄ rispetto al relativo controllo, confermando l’attivazione del processo fibrotico (**Figura 13G**).

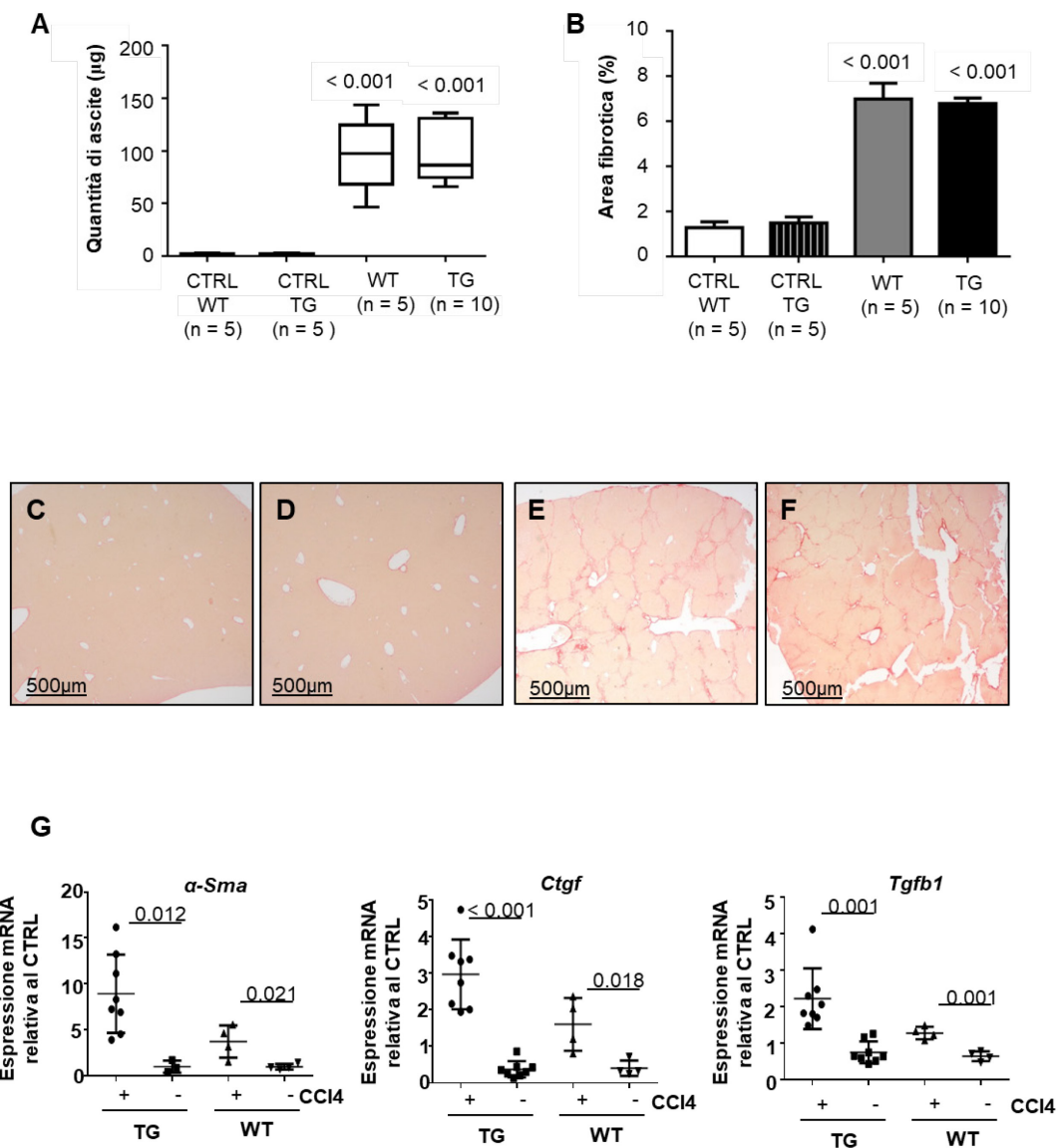


Figura 13. Il trattamento con CCI4 produce cirrosi e ascite *in vivo*. (A) Al tempo del sacrificio i topi WT e TG221 presentava un accumulo di liquido intraperitoneale significativamente maggiore rispetto ai controlli negativi (CTRL) (p-value <0.001 per entrambi i gruppi). In grafico sono riportati i valori medi di ogni condizione \pm DS. (B) L'analisi delle aree fibrotiche del fegato in seguito al sacrificio ha mostrato un significativo aumento di queste sia per i topi WT che per i TG221 rispetto ai controlli negativi (CTRL) (p-value <0.001 per entrambi i gruppi). In grafico è rappresentata la media ottenuta per ogni condizione + DS. (C-F) Risultati rappresentativi della colorazione "Sirius Red", specifica per l'accumulo di collagene, in sezioni epatiche di topi WT non trattati (C), TG non trattati (D), WT trattati con CCI4 (E) e TG trattati con CCI4 (F). (G) L'analisi tramite ddPCR sui tessuti epatici dei topi TG221 e WT mostra un aumento statisticamente significativo dell'espressione di α -Sma, Ctgf, e Tgfb1 negli animali trattati con CCI4(+) rispetto ai relativi controlli (-) (p-value riportati in figura). β -Actina è stata usata come normalizzatore interno e i campioni non trattati di ogni gruppo sono stati presi come riferimento per la normalizzazione. In grafico è riportato il valore assunto da ogni campione e la media di ogni condizione \pm DS.

Infine, mentre sia i topi TG221 che WT trattati con CCI4 hanno sviluppato fibrosi e cirrosi, l'evoluzione della malattia si è rivelata differente per i due gruppi. A 4

settimane dal termine del trattamento con il CCl₄, le analisi ecografiche hanno rivelato che i topi TG221 presentavano noduli epatici, assenti invece nei topi WT. Al momento del sacrificio, l'osservazione diretta dell'organo ha confermato quanto visto ecograficamente: noduli macroscopici erano visibili nel 100% dei topi transgenici, mentre non erano presenti nel fegato di topi WT (**Figura 14A-D**).

I risultati delle analisi istologiche hanno rivelato che la maggior parte delle lesioni individuate nei topi TG221 era di natura displastica o veri e propri epatocarcinomi, mentre per i topi WT i noduli erano di natura macro-rigenerativa o iperplastica (**Tabella 6**).

Tabella 6. Esame istopatologico del tessuto epatico dei topi trattati con CCl₄

Genotipo	ID TOPO	Diagnosi
wild type	WT-1	iperplasia
	WT-2	iperplasia
	WT-3	iperplasia
	WT-4	iperplasia
	WT-5	iperplasia
TG221	TG-1	displasia
	TG-2	HCC
	TG-3	HCC
	TG-4	displasia
	TG-5	HCC
	TG-6	HCC
	TG-7	displasia
	TG-8	HCC
	TG-9	HCC
	TG-10	HCC

I fegati dei topi WT trattati con CCl₄ presentano la perdita di un'ordinata architettura lobulare e fibrosi a ponte: gli epatociti si aggregano in lesioni rigenerative e proliferative, che presentano mitosi ordinarie e non contengono caratteristiche displastiche (**Figura 14E-G**). Nei campioni epatici di topi TG221,

invece, abbiamo riscontrato alterazioni necro-infiammatorie più intense ed estese: le componenti degli epatociti sono degenerate e sono associate a effetti necrotici litici e coagulativi. (**Figura 14H-L**). In **Figura 14M** abbiamo riportato la quantificazione dei noduli, riscontrati tramite indagine istologica: la differenza tra i due gruppi di topi è statisticamente significativa, con un p-value <0.001.

Abbiamo quindi ottenuto un modello semplice da replicare, che tramite il solo trattamento con CCl₄ sviluppa HCC in un ambiente cirrotico, accostandosi alla condizione con cui si sviluppa l'HCC nell'uomo.

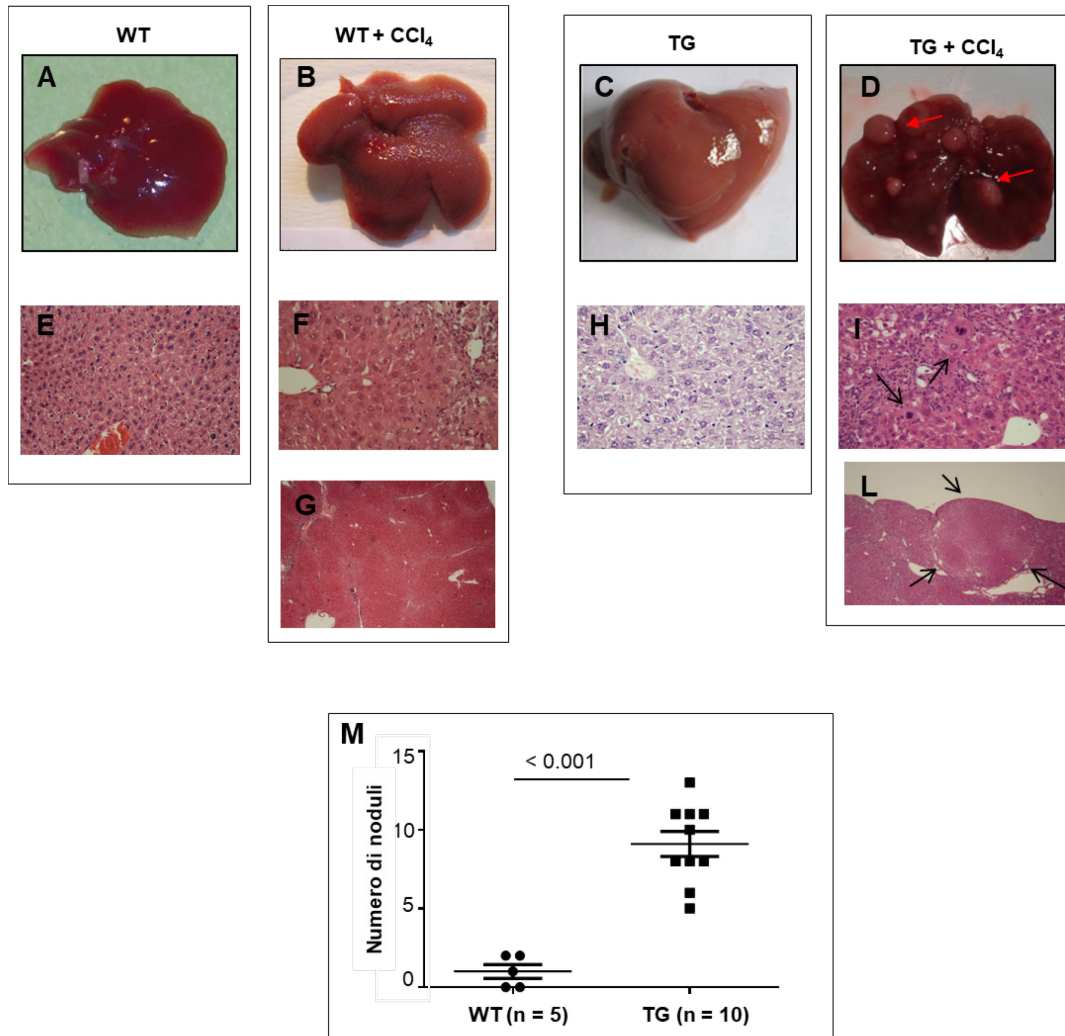


Figura 14. Il trattamento con CCl₄ promuove la formazione di noduli tumorali nel modello TG221. Immagine macroscopiche rappresentative di fegato provenienti da topi WT non trattati (A), topi WT trattati con CCl₄ (B), topi TG221 non trattati (C) e topi TG221 trattati CCl₄ (D). Fegati di topi TG221 presentano un aspetto cirrotico e una superficie granulosa. Al momento del sacrificio, noduli macroscopici (frecche rosse) erano evidenti nei topi TG221 ma non nei topi WT. (E-L) Tessuti epatici di topi non trattati e trattato (ingrandimento 40X) con CCl₄ (200X e 40X) analizzati tramite colorazione ematossilina-eosina. Rispetto ai topi WT non trattati (E), gli animali trattati presentano alterazioni alla struttura lobulare e degenerazione epatica con la presenza di noduli rigenerativi (F). Negli animali TG221 (TG), la somministrazione di CCl₄ ha indotto le stesse alterazioni osservate negli animali WT, ma il grado di infiammazione è più elevato ed intenso. Le lesioni proliferative sono associate a un aspetto displastico e mitosi atipiche, caratteristiche tipiche dell'epatocarcinoma (frecche nere, H-L). (M) Dall'analisi istopatologica è stato riscontrato che il numero di noduli nei topi TG221 è statisticamente maggiore rispetto ai topi WT. In grafico sono riportati i valori per ogni animale e la media ± DS.

4.7 Confronto molecolare tra modello TG221 DEN e TG221 CCl4

Una volta appurato che il modello murino TG221 trattato con CCl4 per 12-14 settimane sviluppa tumori epatici, abbiamo deciso di confrontarlo a livello molecolare con l'altro modello da noi utilizzato, cioè il topo TG221 trattato con DEN a 10 giorni dalla nascita. Utilizzando la tecnica della ddPCR, abbiamo analizzato l'espressione di diversi geni che sono noti per essere marcatori di progressione tumorale nel fegato: *Afp*, *Tff3*, *Scd2*, *Lpl* e *Gpc3* [100, 101]. Abbiamo analizzato campioni provenienti da noduli tumorali sviluppati dal modello DEN (HCC DEN) o CCl4 (HCC CCl4), e tessuto cirrotico non neoplastico proveniente dal modello CCl4 (CL CCl4). Infine, abbiamo utilizzato campioni fegato normale (NL) come riferimento per la normalizzazione dei dati. Come mostra la **Figura 15A**, nei noduli tumorali l'espressione di questi marcatori è significativamente maggiore rispetto ai NL, sia per i topi trattati DEN che CCl4. Abbiamo inoltre osservato un innalzamento dei marcatori anche per i campioni di cirrosi, in particolare per *Scd2* e *Lpl*, che sono significativamente più alti rispetto al fegato normale (p-value 0.024 e 0.002 rispettivamente). Questo mostra un progressivo aumento dell'espressione di tali marcatori dal fegato normale verso l'HCC, passando per la condizione cirrotica intermedia.

Abbiamo quindi valutato le differenze di espressione genica tra campioni di HCC insorti in seguito a trattamento DEN o CCl4 tramite microarray. L'analisi si è concentrata su geni descritti in letteratura come marker di fibrosi e di rinnovamento cellulare nel tessuto epatico. Abbiamo analizzato campioni di fegato normale ottenuti da topi WT (NL-WT) e TG221 (NL-TG221); campioni di cirrosi provenienti da topi WT (CL-WT) e TG221 trattati con CCl4 (CL-CCl4); HCC sviluppati in animali TG221 trattati con CCl4 (HCC-CCl4-TG); HCC provenienti da topi WT (HCC-DEN-WT) e TG221 trattati con DEN (HCC-DEN-TG). In **Figura 15B**, è riportato il risultato ottenuto sotto forma di heatmap: i geni sovra-espressi sono rappresentati in rosso e quelli sotto espressi in verde. L'analisi gerarchica a cluster non supervisionata ha mostrato che il fegato normale WT e TG221 presentano un profilo genico molto simile tra loro. Allo stesso tempo, campioni di HCC in topi TG221, sviluppati in seguito al trattamento DEN o CCl4, hanno espressione genica molto simile tra loro, quindi i noduli derivati dai due trattamenti sono fenotipicamente simili. Infine, abbiamo riscontrato che, anche per questi

geni, i campioni di cirrosi presentano un profilo di espressione intermedio tra i fegati normali e gli HCC.

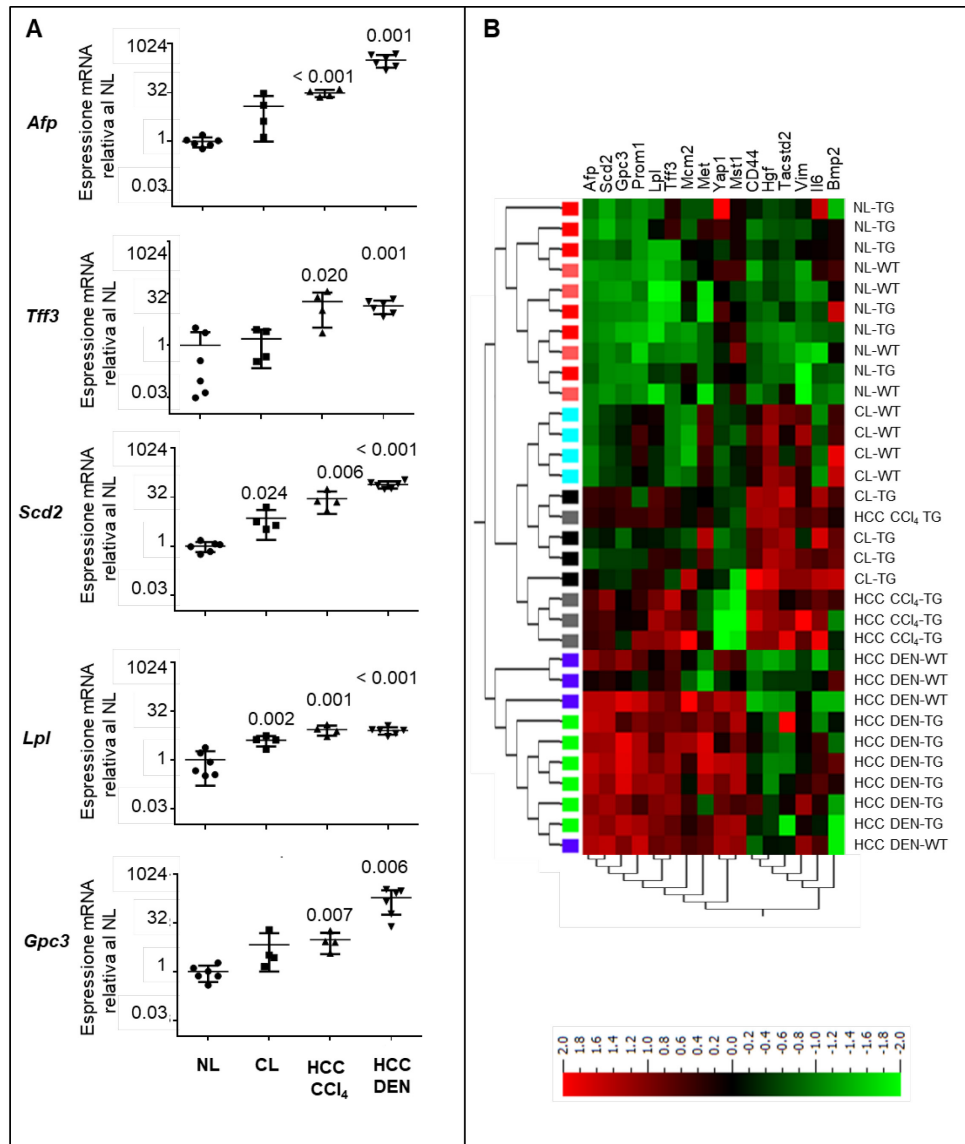


Figura 15. L'espressione di geni associati alla progressione tumorale è simile tra il modello TG221 DEN e TG221 CCl₄. (A) I geni associati all'insorgenza e alla progressione tumorale *Afp*, *Tff3*, *Scd2*, *Lpl* e *Gpc3*, sono sovraespressi nei tumori di animali TG221(HCC) derivati in condizione cirrotica (CCI₄) e non cirrotica (DEN). I livelli dell'espressione di tali geni nella cirrosi sono intermedi tra il fegato normale (NL) e gli epatocarcinomi (HCC). In grafico sono riportati i valori dei singoli campioni normalizzati rispetto al NL e la media \pm DS. La β -Actina è stata utilizzata come normalizzatore interno. I p-value riportati per il tessuto cirrotico e per gli HCC sono sempre riferiti alla condizione normale (NL). (B) L'analisi gerarchica non supervisionata a cluster ha mostrato delle somiglianze tra il profilo dell'espressione genica per gli HCC DEN e CCl₄ nei topi TG221. Fegati cirrotici di animali TG221 presentano un profilo di espressione intermedia tra NL e HCC. Anche fegati normali, cirrotici e HCC DEN di animali WT sono stati inseriti nell'analisi. I geni analizzati sono noti biomarcatori per la progressione tumorale e per la proliferazione cellulare del tessuto epatico. Legenda dei colori: NL-WT, rosa; CL-WT, azzurro; HCC DEN-WT, blu; NL-TG, rosse; CL-TG, nere; HCC DEN-TG, verdi; HCC CCl₄-TG, grigie. Lista delle abbreviazioni: *Afp* (alpha fetoprotein); *Scd2* (stearoyl-Coenzyme A desaturase 2); *Gpc3* (glypican 3); *Prom1* (prominin 1); *Lpl* (lipoprotein lipase); *Tff3* (trefoil factor 3); *Mcm2* (minichromosome maintenance deficient 2 mitotini); *Met* (met proto-oncogene); *Yap1* (yes-associated protein 1); *Mst1* (macrophage

stimulating 1 (hepatocyte growth factor-like); *CD44* (CD44 antigen); *Hgf* (hepatocyte growth factor); *Tacstd2* (tumor-associated calcium signal transducer 2); *Vim* (Vimentin); *Il6* (interleukin 6); *Bmp2* (bone morphogenetic protein 2).

Possiamo quindi affermare che nel modello TG221, noduli tumorali derivanti dal trattamento con CCl₄ hanno un profilo di espressione simile a quelli derivati dal trattamento con DEN, quindi presentano un profilo genico da epatocarcinomi, come peraltro atteso dalle analisi istopatologiche. Inoltre, i livelli di espressione di questi geni nei tessuti cirrotici ci mostra che nel modello TG221-CCl₄ il raggiungimento dell'HCC avanzato è preceduto da uno stadio intermedio di cirrosi, proprio come avviene per l'HCC umano.

4.8 Il trattamento di profilassi con il mimic miR-199a-3p previene lo sviluppo di lesioni maligne.

Stabilito che il modello TG221 trattato ripetutamente con CCl₄ ripercorre le fasi di sviluppo dell'HCC umano in un ambiente cirrotico, abbiamo saggiato se l'impiego di miR-199a-3p precocemente, durante la fase cirrotica, possa prevenire la formazione di HCC.

Topi TG221 sono stati trattati a 5-6 settimane di vita con CCl₄, 3 volte a settimana per 14 settimane consecutive. Dalla decima settimana di CCl₄, un gruppo di animali (n=6) è stato trattato con 5mg/kg di mimic miR-199a-3p, per 3 volte alla settimana per 12 settimane consecutive. Animali trattati con un oligonucleotide "scramble" (n=9) hanno rappresentato il controllo dell'esperimento (CTRL, **Figura 16A**). A 24 ore dall'ultimo trattamento, i topi sono stati sacrificati e i fegati analizzati. La **Figura 16B** riporta un fegato rappresentativo di entrambe le condizioni, dove si può osservare che nei topi trattati il numero dei noduli epatici è inferiore rispetto ai controlli. Questo è in linea con quanto osservato lungo il corso dell'esperimento: dalla quattordicesima alla diciottesima-ventiduesima settimana, i topi sono stati monitorati tramite ecografia. Gli animali di controllo hanno mostrato una progressiva crescita tumorale, mentre nei trattati la crescita era meno evidente (**Figure 16C e D**). Le analisi istologiche hanno inoltre confermato che nei topi trattati con il miR-199a-3p le dimensioni medie dei noduli significativamente inferiori rispetto ai controlli (p-value 0.0007) (**Figura 16E**), mentre non ci sono differenze nel rapporto tra peso del fegato e peso del corpo (**Figura 16F**).

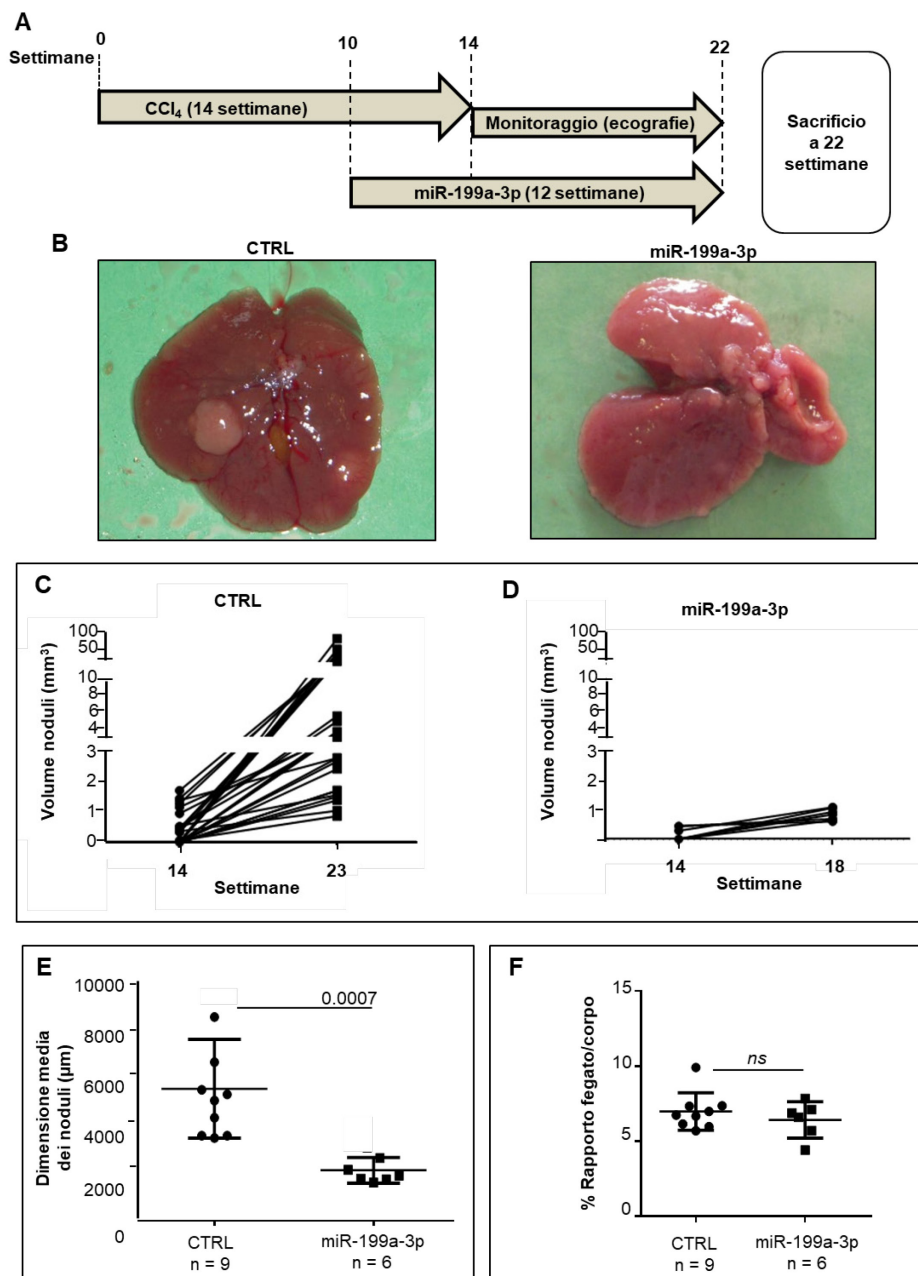


Fig. 16. Il miR-199a-3p “mimic” rallenta la progressione tumorale in trattamento di profilassi nel modello TG221. (A) Il disegno sperimentale prevede il trattamento per 14 settimane consecutive con il CCl₄ di tutti gli animali. Alla decima settimana di trattamento, un gruppo di topi (n=6) ha ricevuto il mimic del miR-199a-3p per 12 settimane consecutive. Il gruppo di controllo (CTRL) è stato trattato con l’oligonucleotide “scramble”. **(B-D)** A 22 settimane dall’inizio del trattamento gli animali sono stati sacrificati. Al momento del sacrificio, il fegato degli animali è stato analizzato. Il gruppo trattato con il miR-199a-3p presenta un numero di lesioni inferiore rispetto ai controlli, com’era stato anche riscontrato durante il monitoraggio tramite ecografie, dalla quattordicesima alla ventiduesima settimana. Nei grafici sono riportate le dimensioni nel tempo di tutti i noduli individuati per i CTRL (C) e per gli animali trattati con il miRNA (D). **(E-F)** Le dimensioni medie dei noduli negli animali trattati è significativamente inferiore rispetto ai controlli (p-value 0.0007), però non vi sono differenze di rapporto tra il peso del fegato e quello del corpo nei due gruppi. In E sono rappresentate le dimensioni medie dei noduli per ogni animale analizzato, la media ± la deviazione standard. In F è rappresentato, in percentuale, il rapporto tra il peso del fegato e quello corporeo di ogni animale preso in analisi, evidenziando la media ± la deviazione standard

La **Tabella 7** riporta i risultati riguardo la natura dei noduli osservati. Il numero di noduli totali, sia di grandi (>500um) che piccole dimensioni (<500um) è maggiore per gli animali non trattati rispetto a quelli che hanno ricevuto il miR-199a-3p, ma di maggiore interesse il fatto che nessuno dei noduli sviluppati durante il trattamento con il miR-199a-3p è risultato essere un carcinoma, mentre per i topi non trattati sono stati individuati 4 noduli di natura maligna.

Tabella 7. Analisi istologica sui noduli nei topi TG221 + CCl4

	NODULI		HCC
	< 500 µM	> 500 µM	
CONTROLLI (n=9)	66	24	4
miR-199a-3p	44	12	0

In parallelo alle osservazioni macroscopiche, abbiamo svolto le analisi molecolari. Dapprima abbiamo valutato, tramite ddPCR, i livelli di espressione di *Gpc3* e α -*Sma* in seguito al trattamento con il miR-199a-3p, sia in tessuto cirrotico, che nei noduli epatici. Campioni di fegato normale (NL, n=3) di TG221 sono stati presi come riferimento per la normalizzazione. *Gpc3* è altamente espresso in pazienti con HCC e correla con prognosi infausta [102, 103]: sia per campioni di cirrosi (CL) che di noduli epatici (NE), il trattamento con il miR-199a-3p non ha indotto un abbassamento significativo dell'espressione di *Gpc3* rispetto ai controlli (**Figura 17A**). Lo stesso è avvenuto per α -*Sma*, indicatore di attivazione delle cellule stellate, miofibroblasti epatici attivi nella deposizione di collagene (**Figura 17B**). Alla luce di questo risultato, tramite microarray, abbiamo valutato l'espressione di *Col1a1*, gene che codifica per il Collagene 1 α in campioni di cirrosi (n=4) e HCC (n=6) di animali di controllo rispetto agli animali trattati con il miR-199a-3p (cirrosi n=2; noduli epatici n=2). In linea con quanto riscontrato per α -*Sma*, il trattamento con il miR-199a-3p non ha modificato l'espressione di *Col1a1* rispetto ai controlli trattati con l'oligonucleotide "scramble" (**Figura 17C**). Il trattamento con il miR-199a-3p ha quindi avuto un effetto biologico significativo nel rallentare la comparsa dei tumori epatici, tuttavia non ha agito sull'espressione di questi geni.

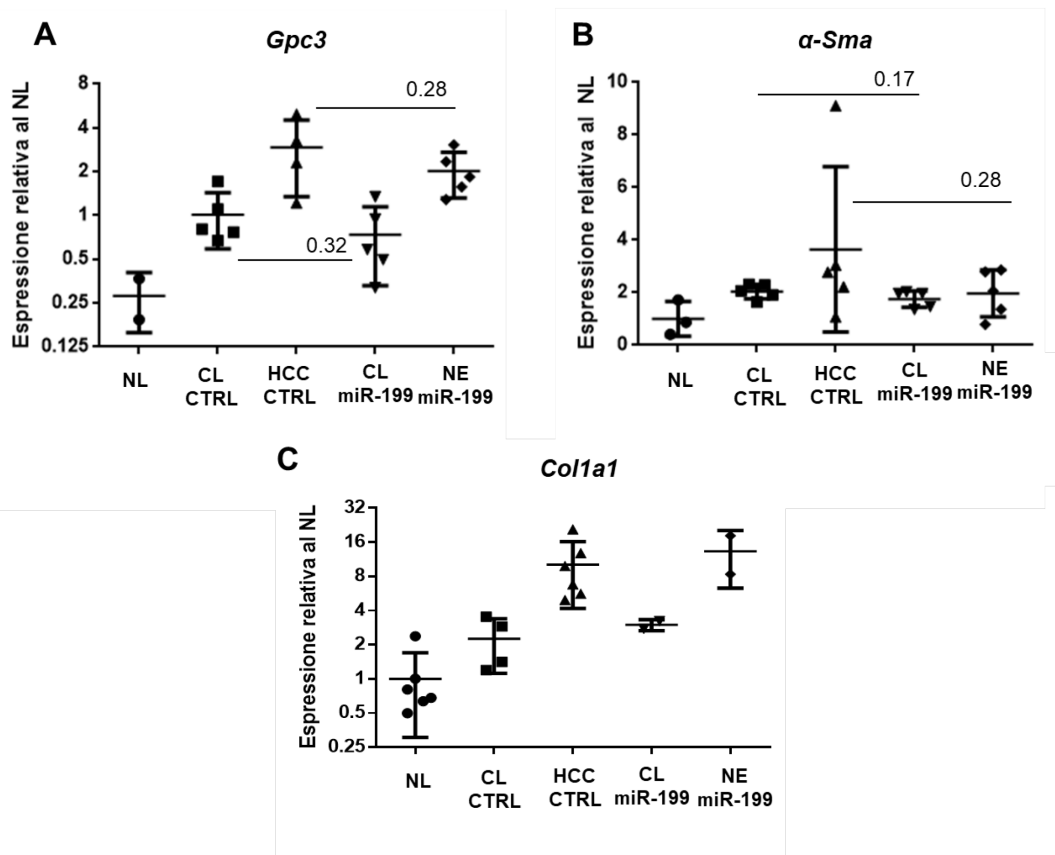


Figura 17. Il trattamento con il miR-199a-3p non agisce su *Gpc3*, α -*Sma*, e *Col1a1*. (A e B) Valutazione tramite ddPCR dell'espressione di *Gpc3* e α -*Sma* e tramite microarray di *Col1a1*. Campioni di fegato normale (NL) di TG221 sono stati presi come riferimento per la normalizzazione; per la normalizzazione interna abbiamo usato il gene housekeeping della β -*Actina*. In entrambi i casi, il trattamento con il miR-199a-3p non ha abbassato significativamente i livelli di espressione dei due geni. In grafico sono riportati i valori ottenuti per ogni animale e la media \pm DS. (C) Valutazione dell'espressione di *Col1a1* tramite microarray su campioni di cirrosi e HCC di animali di controllo e trattati con il miR-199a-3p. Il trattamento con il miR-199a-3p non ha modificato l'espressione di *Col1a1* rispetto ai campioni di controllo né nel tessuto cirrotico né nei noduli esaminati. I campioni di NL sono stati utilizzati per la normalizzazione dei dati. In grafico sono riportati i valori ottenuti per ogni animale e la media \pm DS. Il miR-199a-3p è abbreviato in miR-199. NL= Normal Liver; CL= Cirrosi; HCC= epatocarcinoma; NE= Noduli Epatici.

L'analisi dell'espressione delle proteine MTOR e PAK4, target del miR-199a-3p, dimostra invece un cambiamento in seguito al trattamento con il mimic. Abbiamo analizzato campioni di cirrosi (CL) e HCC provenienti da animali non trattati (CTRL) e di cirrosi e noduli epatici (NE) trattati con il miR-199a-3p. Fegati normali (NL) di topi TG221 non trattati sono stati utilizzati come riferimento per la normalizzazione. In **Figura 18** abbiamo riportato le bande densitometriche ottenute e i valori normalizzati sul NL. I livelli di MTOR si alzano in cirrosi e HCC rispetto al fegato normale, tuttavia si abbassano per entrambe le condizioni in seguito al trattamento con il miR-199a-3p. Anche PAK4 segue lo stesso andamento: negli

animali trattati con il miR-199a-3p i livelli di espressione della proteina sono più bassi rispetto all'HCC e cirrosi del gruppo di controllo, ritornando verso la condizione riscontrata nel fegato normale.

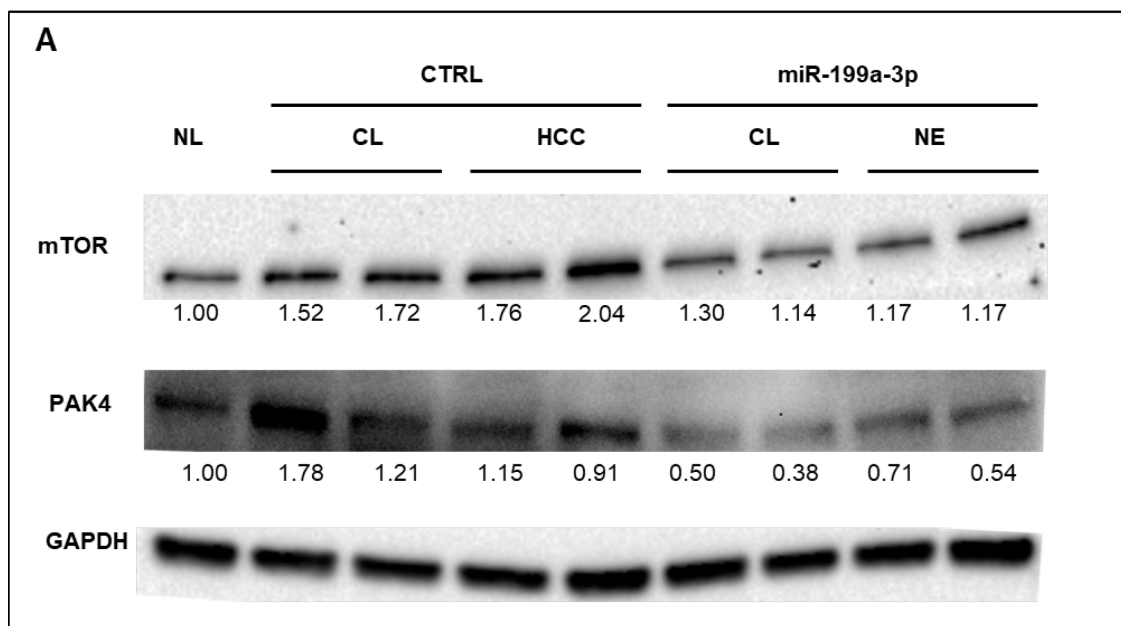


Figura 18. I target del miR-199a-3p sono sottoespressi negli animali TG221 trattati con il microRNA. Analisi dei livelli proteici eseguita su tessuti cirrotici (CL), epatocarcinomi (HCC) di topi di controllo (CTRL) rispetto a campioni di cirrosi (CL) e noduli epatici (NE) di animali trattati con il miR-199a-3p. Sia nel tessuto cirrotico che nei noduli epatici, gli animali trattati con il mimic presentano una riduzione dei livelli di MTOR e PAK4, target diretti del miR-199a-3p. Fegati normali (NL) di topi TG221 non trattati sono stati utilizzati come riferimento per la normalizzazione e GAPDH come normalizzatore interno per valutare la quantità di campione utilizzato.

Questi risultati dimostrano che la profilassi con il miR-199a-3p agisce inibendo vie del segnale coinvolte nell'insorgenza e progressione dell'HCC e non su processi associati al microambiente fibrotico / cirrotico. Ciò si traduce nel rallentamento della crescita del tumore durante le sue fasi precoci di sviluppo ed una inibizione della progressione verso la malignità. Questi risultati suggeriscono pertanto che mimic miR-199a-3p abbia considerevoli potenzialità nel prevenire la comparsa di epatocarcinomi in individui affetti da cirrosi epatica.

5. DISCUSSIONE

Sulla base della sottoespressione del miR-199a-3p in HCC [46, 77] e del suo ruolo nella regolazione di diverse vie del segnale coinvolte in cancro [77, 79, 81, 83, 104], in questo studio abbiamo investigato l'utilità del miR-199a-3p per la terapia o la profilassi del HCC in modelli pre-clinici *in vitro* ed *in vivo*. Per studiarne tali potenzialità è stato necessario scegliere e sviluppare opportuni modelli sperimentali e mettere a punto un efficace sistema di veicolazione al fegato di oligonucleotidi a RNA.

5.1 Veicolazione *in vivo* di miRNA mimics

Diversi aspetti sono stati infatti preliminarmente affrontati e standardizzati per rendere efficiente e riproducibile la veicolazione al fegato del miR-199a-3p.

L'uso miRNA mimics *in vivo* presenta un importante problema pratico: le molecole oligonucleotidiche costituite da RNA non modificato sono altamente instabili e, diversamente dagli oligonucleotidi anti-microRNA (AMO), che sono basati su nucleotidi modificati resistenti alle nucleasi, vengono rapidamente eliminate in circolo o dalle cellule in cui penetrano, perdendo così di efficacia. Perciò, risulta di fondamentale importanza la scelta di un sistema di veicolazione *in vivo* dei miRNA, in grado di proteggerli dalla degradazione e, contemporaneamente, migliorare l'ingresso nelle cellule del tessuto tumorale [47]. Quindi, prima di procedere all'utilizzo del mimic del miR-199a-3p per valutarne l'eventuale potenziale terapeutico, abbiamo dovuto ottimizzare il sistema di veicolazione.

Gli approcci per la veicolazione *in vivo* dei miRNA si dividono in due tipi principali: sistemi di veicolazione virali e non virali. Diverse tipologie di virus (lentivirus, adenovirus e virus adenoassociati) sono state usate per veicolare vettori codificanti miRNA alle cellule di interesse. Molteplici studi hanno dimostrato l'efficacia di veicolazione dei miRNA da parte dei vettori virali [105-108], tuttavia tali vettori mostrano anche degli svantaggi, come difficoltà nella traslocazione nucleare di vettori di DNA di grandi dimensioni e limitata espressione di miRNA maturi [109]. Inoltre, non è da sottovalutare il rischio di produrre virus competenti per la replicazione che possono causare complicazioni di natura infettiva [110].

L'utilizzo dei virus come strumenti di veicolazione deve essere ben ponderato anche alla luce di quanto scoperto recentemente da Nault et. al [111]. Pazienti

hanno sviluppato HCC in seguito ad infezione da AAV2, in seguito ad integrazione del genoma virale in proto-oncogeni (*CCNA*, *TERT*, *CCNE1*, *TNFSF10*, e *KMTB2*) provocando la loro sovra-espressione e promuovendo la comparsa di HCC.

Tra i metodi di veicolazione non virali, polimeri e particelle lipidiche cationiche sono i più utilizzati per veicolare miRNA in modelli pre-clinici di diversi tumori, dove però hanno anche mostrato eventi di tossicità [112-115]. Tale tossicità è stata confermata in sperimentazione clinica, tanto che lo studio di fase I, che testava in tumori solidi la sicurezza d'utilizzo e il potenziale terapeutico del MRX34, miR-34a veicolato tramite liposomi a carica positiva, è stato interrotto per problemi di tossicità [60].

La nostra scelta è quindi ricaduta su nanoparticelle lipidiche, sviluppate da Huang et al. [88], che possiedono una formulazione lipidica anionica per evitare la risposta immunitaria non specifica, causata invece dai lipidi cationici, che attivano le vie di TLR-4 e NF- κ B [116, 117]. Inoltre, la composizione lipidica di tali nanoparticelle permette un facile rilascio del miRNA nella cellula e protezione dalla filtrazione renale [118]. L'efficacia di tali nanoparticelle nel veicolare miRNA è stata appurata in un nostro recente studio su un modello murino di leucemia linfatica cronica in cui il trattamento con miR-26a ha provocato un significativo rallentamento dell'espansione leucemica senza dare effetti tossici [89]. In questo studio, abbiamo nuovamente confermato l'efficienza di tali nanoparticelle lipidiche nella veicolazione di miRNA, in particolare al fegato, nostro organo di interesse.

L'efficacia di veicolazione del miR-199a-3p tramite nanoparticelle lipidiche è stata confrontata con quella del polimero cationico polietilenimina, commercializzata con il nome di in-vivo jet-Pei®, frequentemente utilizzato per veicolare oligonucleotidi *in vivo*. La sua efficacia nel veicolare i miRNA è stata dimostrata *in vivo* tramite l'analisi dell'attività luciferasica [119], tuttavia sono stati anche evidenziati casi in cui il jet-Pei® ha provocato necrosi epatica e morte [120]. Dallo studio della biodistribuzione del miR-199a-3p abbiamo riscontrato che il fegato è l'organo in cui il miRNA viene maggiormente veicolato sia dal jet-Pei® che dalle nanoparticelle lipidiche, tuttavia, a parità di quantità inoculata, queste ultime sono in grado di veicolare nelle cellule epatiche una quantità di miRNA 10 volte superiore rispetto al polimero.

Abbiamo inoltre riscontrato un aumento del miR-199a-3p in altri organi, in particolare milza, reni e polmoni, sebbene in quantità nettamente inferiori rispetto al il fegato. Dato che i miRNA regolano molteplici funzioni cellulari, è bene

prestare cautela quando si modificano i loro livelli in organi diversi da quello bersaglio, poiché ciò potrebbe provocare effetti indesiderati. Questo è uno dei motivi principali per cui, prima di utilizzare un mimic di un miRNA, è necessario individuare il metodo che abbia la capacità di veicolare il miRNA all'organo di interesse in modo efficiente, ma che modifichi in minima parte i livelli dello stesso miRNA negli altri organi.

La milza è coinvolta in diverse patologie ematologiche neoplastiche, ed in alcuni casi il miR-199a-3p è sovraespresso rispetto la condizione fisiologica. Ad esempio, nel linfoma diffuso a grandi cellule B, i livelli del miR-199a-3p aumentano nelle cellule tumorali [121]. Tuttavia, pazienti con più alta espressione del miRNA presentano una migliore OS [121, 122], in quanto la presenza del miRNA aumenta la chemiosensibilità delle cellule tumorali ai farmaci [121]. In questo caso è quindi necessario prestare maggiore cautela nell'utilizzo del mimic del miR-199a-3p, così come per il carcinoma polmonare a cellule squamose, in cui i livelli del miR-199a-3p aumentano durante la progressione della patologia [123]. Nell'eventuale del miR-199a-3p nell'uomo contro HCC, dovrà dapprima essere analizzata la biodistribuzione del miRNA, quindi dovranno essere individuati i potenziali effetti che il mimic potrebbe avere negli organi in cui aumentano i suoi livelli.

Elevati livelli del miR-199a-3p sono stati rilevati anche nei reni, suggerendo che la via preferenziale di eliminazione del miRNA è quella renale. Il miR-199a-3p svolge un ruolo di oncosoppressore nel tumore renale, infatti è sotto-espresso nelle cellule tumorali, rispetto al tessuto sano [124]. Aumentare i livelli del miRNA in linee cellulari di carcinoma renale arresta il ciclo cellulare in fase G1, induce apoptosi e ostacola l'invasione e la migrazione cellulari [124]. In questo organo, quindi, l'aumento del miR-199a-3p nei reni potrebbe risultare meno dannoso rispetto a milza e polmoni.

Nonostante la somministrazione del mimic del miR-199a-3p abbia provocato l'aumento del miRNA anche in organi diversi dal fegato, le nanoparticelle lipidiche si sono comunque dimostrate un metodo notevolmente efficace nella veicolazione del miRNA al fegato dato che qui l'espressione è di molte volte superiore rispetto agli altri organi.

Di fondamentale importanza è anche il metodo di somministrazione del miRNA: i più utilizzati sono quelli sistemici, cioè per via endovenosa (I.V) o intra-peritoneo (I.P.) [93]. La I.V. è solitamente la preferita, poiché il miRNA è somministrato

direttamente nel circolo sanguigno, tuttavia il nostro studio ha riportato che i livelli del miR-199a-3p somministrato I.V. sono comparabili con quelli ottenuti in seguito alla somministrazione I.P.. Il protocollo da applicare prevede ripetuti trattamenti, quindi è stata preferita la via I.P. poiché più fattibile e riproducibile. Infatti, la somministrazione I.V. prevede l'inoculazione del miRNA nella vena caudale del topo, azione non sempre semplice data le piccole dimensioni dei vasi. Inoltre, questo procedimento prevede la sedazione o l'immobilizzazione dell'animale, comportando stress del topo stesso, può causare la chiusura del vaso dopo alcune iniezioni, ed è eccessivamente time-consuming. Le iniezioni I.P. possono essere invece effettuate agevolmente nella parte bassa dell'addome del topo, per di più l'animale non deve essere introdotto in uno strumento di immobilizzazione e rimane cosciente durante l'intera procedura, che quindi risulta molto più rapida e meno stressante per l'animale.

5.2 Importanza del modello di studio

La scelta del modello sperimentale è ovviamente importante per gli obiettivi che lo studio si propone di raggiungere.

Diversi modelli animali di HCC sono disponibili ed alcuni sono stati utilizzati per lo studio di miRNA come molecole terapeutiche. I modelli di trapianto ortopico e di xenotrapianto sono tra i più utilizzati [63], tuttavia, nonostante permettano di ottenere tumori epatici rapidamente, non si avvicinano alla condizione in cui si sviluppa normalmente HCC nell'uomo, né possono essere utilizzati per studiare gli eventi molecolari iniziali che promuovono la tumorigenesi.

Sono stati perciò sviluppati modelli murini geneticamente modificati, che consentono lo studio dell'epatocarcinogenesi e le condizioni molecolari in cui essa avviene. L'inattivazione di *Tp53* è sufficiente per indurre la formazione di tumori in 14 mesi [125], mentre le contemporanee delezioni di *Tp53* e *Pten* inducono la formazione di tumori macroscopici a 4 mesi in un modello murino transgenico di HBV [126]. La sovra-espressione degli oncogeni *MYC* e *E2F1* è comunemente riscontrata negli HCC umani [127] e, in accordo con ciò, il modello murino transgenico per *Myc* e *E2f1* sviluppa HCC a 9 mesi di età nel 100% dei casi [128]. Per il nostro studio, abbiamo utilizzato un modello murino sviluppato in laboratorio. Il modello murino transgenico TG221 esprime stabilmente il miR-221 nel fegato ed è predisposto allo sviluppo di tumori epatici: circa il 50% degli animali maschi sviluppano tumori visibili a 9-12 mesi di vita [53]. In questo modello, il trattamento

con DEN causa la comparsa di tumori nel 100% di topi di sesso maschile visibili intorno ai 4-5 mesi di vita. Dal punto di vista isto-patologico, i tumori presentano caratteristiche tipiche del HCC, inoltre l'espressione genica in noduli tumorali sviluppati in seguito a trattamento con DEN, è simile a quella riscontrata in pazienti con HCC avanzato, in accordo con quanto riportato da Lee et al. [40]. Perciò il topo TG221 trattato con DEN presenta caratteristiche utili per studiare terapie contro l'HCC avanzato.

Tuttavia, tutti i modelli sopra descritti sviluppano HCC in un background di fegato sano, molto diverso dalla condizione di fegato cirrotico su cui si sviluppano oltre l'80% degli HCC umani [3]. Lo stadio finale della fibrosi epatica è la cirrosi, responsabile di elevata morbilità e mortalità [13]. La fibrosi epatica è reversibile, mentre la cirrosi è considerata irreversibile [129, 130]. Approcci atti a prevenire o rallentare la progressione da cirrosi a neoplasia sarebbero quindi clinicamente rilevanti.

Per poter testare nuovi approcci terapeutici che ostacolano la progressione da cirrosi a tumore, è necessario disporre di un modello che presenti epatocarcinomi sviluppati da una condizione cirrotica pre-esistente. La somministrazione ripetuta a basse dosi di CCl₄ rappresenta un metodo consolidato per indurre fibrosi e cirrosi [68].

L'uso di CCl₄ è ottimizzato in ratti, dove provoca necrosi, infiammazione e fibrosi, che si propaga fino alle strutture vascolari. Esso, inoltre, attiva le cellule epatiche stellate (HSC) che inducono l'apoptosi degli epatociti. Diversi studi riportano che la somministrazione continuata di CCl₄ in ratto induce moderata necrosi cellulare e infiltrazioni di adipe in sole quattro settimane di trattamento [67, 131, 132]. Nonostante fibrosi e cirrosi siano ben stabilite, soltanto somministrazioni ripetute di basse dosi di DEN, conducono allo sviluppo di HCC in ratti [133, 134].

Associazione di DEN e CCl₄ è stata utilizzata anche in modelli di topo per indurre HCC in condizioni cirrotiche [71, 72, 75], tuttavia l'esposizione prolungata alle epatotossine comporta una ridotta sopravvivenza degli animali [68]. In altri studi, la somministrazione di CCl₄ combinata all'impianto intraepatico di linee cellulari di HCC ha provocato l'insorgenza di tumore su un background cirrotico, però, lo sviluppo e le dimensioni del tumore variano in base alla linea cellulare e al ceppo murino prescelti. Alternativamente, lo sviluppo di tumore in concomitanza di cirrosi epatica è stato indotto in un modello murino geneticamente modificato, a cui è

stato somministrato CCl₄ in combinazione con la ricombinasi Cre adenovirale [73]. In un recente studio, Chiung et al. hanno ideato un modello murino transgenico che sviluppa cirrosi e HCC in seguito alla somministrazione di CCl₄ e di trasposoni che esprimono l'oncogene *c-Myc* e la sequenza di RNA a forcina complementare a p53 (shp53, short hairpin p53), in modo da impedire l'espressione di *Tp53* [74]. Tuttavia, è da sottolineare che lo sviluppo di tumori in seguito a soli trattamenti con CCl₄ non è stato ancora riportato.

Per questo motivo, oltre all'uso di DEN, negli studi descritti in questa tesi, abbiamo saggiato l'effetto dell'epatotossina CCl₄ su topi TG221, basandoci sul metodo sviluppato da Fujii et al. [87]. I topi, trattati con ripetute somministrazioni di CCl₄ per via orale per 14 settimane, sviluppano cirrosi decompensata con accumulo di liquido nel peritoneo (ascite). Il nostro studio ha così dimostrato che il modello TG221 trattato con CCl₄ presenta tutte le fasi presenti nella storia naturale della tumorigenesi epatica, da fibrosi a cirrosi, fino a HCC.

Le analisi sui tessuti epatici di animali TG221 esposti a CCl₄, hanno mostrato la perdita dell'architettura lobulare, fibrosi a ponte e danno epatico necro-infiammatorio. La cirrosi, dimostrata dall'aspetto del fegato e dalla presenza di abbondante liquido ascitico, è stata anche confermata sia dal dato istologico, che individua notevoli depositi di collagene, sia dal dato molecolare, che riporta elevata espressione di α -*Sma*, un marcatore specifico dell'attivazione delle cellule stellate epatiche [97]. Inoltre, è stata riscontrata anche la sovra espressione di *Tgf- β* e *Ctgf*, molecole pro-fibrotiche, che hanno un ruolo primario nello sviluppo e progressione di fibrosi e HCC [98, 99].

La natura neoplastica dei noduli sviluppati nei topi TG221 è stata confermata dall'analisi istologica, che ha rivelato la presenza di lesioni displastiche e di epatocarcinomi veri e propri. L'analisi molecolare ha inoltre mostrato che i geni *Afp*, *Tff3*, *Lpl*, *Scd2* e *Gpc3*, coinvolti nell'epatocarcinogenesi, presentano un'espressione progressivamente crescente nel tessuto cirrotico, nei tumori indotti dall'uso di CCl₄ e nei tumori sviluppati in seguito a trattamento con DEN, rispetto al fegato normale. L'espressione di questi geni nei tumori sviluppati in seguito a trattamento DEN o CCl₄ è simile, mentre nella cirrosi la loro espressione è intermedia tra la condizione tumorale e quella normale, confermando che la cirrosi rappresenta una fase intermedia fondamentale per lo sviluppo di HCC.

Riassumendo, le analisi isto-patologiche e molecolari dei tumori hanno evidenziato diversi gradi di malignità, da noduli iperplastici con displasia di diverso grado, fino a veri HCC, quindi, questo modello TG221-CCI4 risulta ideale per saggiare approcci mirati a prevenire la comparsa di tumori epatici su background cirrotico.

5.3 Molecole mimics del miR-199a-3p hanno un effetto terapeutico

In entrambi i modelli sperimentali (TG221-DEN e TG221-CCI4), il trattamento con miR-199a-3p ha avuto effetti anti-tumorali significativi.

In animali con HCC avanzati, indotti da DEN, il trattamento sistemico con miR-199a-3p ha causato un rallentamento della crescita tumorale, evidenziato dalla diminuzione del numero di noduli tumorali e dalla riduzione del loro diametro. Inoltre, è interessante il fatto che il miR-199a-3p abbia dimostrato un effetto anti-tumorale comparabile a quello del Sorafenib. I meccanismi molecolari di azione di miR-199a-3p (contro MTOR e PAK4) e di Sorafenib (inibitore multichinasico anti-RAF, anti-VEGFR) suggerivano che la loro combinazione potesse avere una azione additiva/sinergica, tuttavia, i nostri studi di combinazione tra miR-199a-3p e Sorafenib non hanno evidenziato effetti additivi rispetto a quanto ottenuto nei singoli trattamenti. In effetti, è stato descritto che il miR-199a-3p agisce anche su VEGFR1-2 [83] impedendo l'angiogenesi e bloccando la via di RAS/MEK/ERK [77], analogamente a quanto indicato per Sorafenib, i cui principali bersagli sono coinvolti nell'angiogenesi [135] e nell'attivazione della via MAPK [136]. Ciò presumibilmente spiega il motivo per cui non abbiamo osservato alcun effetto additivo e perché gli effetti anti-tumorali delle due diverse molecole siano risultati simili.

Altri studi avevano già saggiato l'attività anti-tumorale del miR-199a-3p *in vivo*, in modelli murini ortotopici o sottocute [77, 83, 104, 137], dimostrando che ripristinare i livelli di questo miRNA comporta una diminuzione significativa delle dimensioni e del peso dei tumori. Nel nostro studio abbiamo dimostrato che aumentare i livelli del miR-199a-3p provoca il dimezzamento delle dimensioni dei noduli epatici rispetto ai controlli, risultato paragonabile a quanto ottenuto negli studi pregressi. Inoltre, abbiamo osservato la diminuzione del numero totale dei noduli, evento che negli altri lavori non era stato possibile riscontrare a causa del modello murino prescelto. Questo risultato, quindi, apporta nuove informazioni sull'attività anti-tumorale del miR-199a-3p, poiché abbiamo dimostrato come esso

abbia agito sia ostacolando la crescita di tumori di dimensioni già apprezzabili, sia rallentando l'epatocarcinogenesi.

Gli studi sul miR-199a-3p si inseriscono nel contesto di approcci terapeutici basati su anti-miRNA o miRNA mimics. In precedenza, sono stati riportati studi basati su molecole di anti-miR-221 [53], o anti-miR-494 [55], che hanno causato una riduzione delle dimensioni di tumori epatici rispetto ai controlli. Per quanto riguarda l'uso di miRNA mimics, i miR-101 [138], miR-29b [139], miR-375 [140, 141], miR-122 [58] e il miRNA let-7a [142] hanno rallentato la crescita di epatocarcinomi in modelli murini ortotopici. Altro miRNA studiato in HCC è il miR-124, la cui efficacia anti-tumorale è stata testata dapprima in modelli di HCC sottocutanei e, successivamente, in animali in cui i tumori sono stati indotti dalla DEN. In entrambi i modelli, il miR-124 è stato in grado di rallentare la crescita di HCC e di indurre apoptosi nelle cellule tumorali senza provocare effetti tossici [57].

Complessivamente, tutti gli studi pubblicati hanno messo in evidenza che gli approcci basati su miRNA / anti-miRNA presentano potenzialità anti-tumorali significative, ma nessuno ad oggi ha dimostrato la capacità di indurre regressioni tumorali. Ciò vale sia per i modelli pre-clinici appena descritti, sia per le sperimentazioni cliniche. Difatti lo studio sull'utilizzo di MRX34 in tumori solidi, già citato in precedenza, non ha potuto saggiare l'eventuale potenziale terapeutico di questa molecola, in quanto è stato interrotto prematuramente per problemi di tossicità [60], mentre il trial clinico che testa l'attività terapeutica dei TargomiRs in mesotelioma pleurico maligno e NSCLC è ancora agli albori e, nonostante i primi riscontri positivi, non sono tuttora disponibili risultati attendibili [61].

Effettivamente anche il miR-199a-3p non ha indotto regressione dei tumori, tuttavia, aver riscontrato un significativo rallentamento della crescita tumorale, addirittura comparabile a quella del Sorafenib, pone questo miRNA in posizione di rilievo come potenziale nuovo agente terapeutico contro l'HCC avanzato. Inoltre, è da notare che l'utilizzo del miR-199a-3p non ha provocato effetti tossici negli animali trattati, aspetto da non sottovalutare per poter poi traslare l'utilizzo di questa molecola dai modelli pre-clinici all'uomo.

Come precedentemente detto, il modello TG221-DEN, utile per mimare la condizione di HCC avanzato, non è adeguato per testare le potenzialità del miR-199a-3p di prevenire l'insorgenza dell'HCC a partire da cirrosi. Con questo obiettivo, abbiamo utilizzato il modello TG221-CCI4. poiché riproduce le diverse

fasi della storia naturale del HCC su base cirrotica, il modello TG221-CCl4 risulta perciò di grande utilità per studiare terapie in grado di prevenire la comparsa di lesioni neoplastiche.

Abbiamo quindi utilizzato il miR-199a-3p come trattamento di profilassi nel modello murino TG221-CCl4. Lo studio ha dimostrato che il mimic del miR-199a-3p, seppur non bloccando completamente la comparsa di noduli, ha prodotto una significativa diminuzione del loro numero e delle loro dimensioni. Ancora più importante, la natura delle lesioni tumorali sono risultate diverse in seguito a trattamento con miR-199a-3p, infatti le indagini istopatologiche hanno infatti rivelato che nessuno dei noduli presenti negli animali trattati con il miRNA è di natura maligna, a differenza dei controlli trattati con oligonucleotide “scramble”, in cui svariati noduli erano HCC. Questi risultati indicano che il miR-199a-3p ha avuto la capacità di prevenire la formazione di tumori epatici maligni in ambiente cirrotico.

Poiché la cirrosi rappresenta uno stadio di malattia epatica altamente predisponente allo sviluppo di HCC (ogni anno, circa il 5% dei pazienti sviluppa HCC), strategie anti-fibrotiche in grado di rallentare la progressione da fibrosi a cirrosi, potrebbero anche prevenire la comparsa di HCC. Cenicriviroc, inibitore di CCR2/CCR5, molecole promotrici di fibrosi, ha causato la riduzione di fibrosi epatica in uno studio clinico di fase II e viene ora testato in fase III (AURORA, NCT03028740) [143]. Anche l'antagonista di PPAR α/δ , Elafibranor, ha ridotto la fibrosi in pazienti di NASH in fase II, ed ora studiato in uno studio clinico di fase III (RESOLVE-IT, NCT02704403) [144]. Nonostante i primi risultati promettenti, tuttavia, non è ancora stato stabilito se tali terapie siano effettivamente efficaci non solo nel ridurre la fibrosi epatica, ma anche nella chemio-prevenzione dell'HCC [5].

Queste molecole, infatti, agiscono esclusivamente sull'ambiente epatico non tumorale, e non sulle cellule neoplastiche, in contrasto con quanto abbiamo osservato per il miR-199a-3p in questo studio. I nostri risultati, infatti, non evidenziano un effetto anti-fibrotico del miR-199-3p, dimostrato dalla mancata riduzione dei livelli di collagene in seguito al trattamento, ma suggeriscono che il miRNA abbia agito direttamente sul processo di trasformazione degli epatociti piuttosto che sulle cellule del microambiente.

Dato che la capacità di impedire la trasformazione maligna in HCC non è ancora stata riportata per Cenicriviroc e Elafibranor, potrebbe essere interessante testare la combinazione del miR-199a-3p con farmaci che impediscono la progressione della cirrosi, in modo da agire contemporaneamente sul microambiente epatico e sulle cellule neoplastiche, rallentando la progressione da fibrosi a cirrosi e prevenendo la trasformazione maligna.

Infine, abbiamo testato l'effetto del miR-199a-3p anche *in vitro*, dimostrando che l'espressione forzata del miRNA induce un aumento dell'apoptosi cellulare sulle linee cellulari umane derivate da carcinoma epatico Hep3B e HepG2. Questo è un aspetto da non sottovalutare in quanto suggerisce che il potenziale terapeutico del miRNA non è ristretto esclusivamente alla specie murina, ma è anche estendibile all'uomo.

5.4 Vie Molecolari: PAK4 e MTOR

Le analisi molecolari eseguite sui tessuti epatici degli animali trattati e sulle linee cellulari Hep3B e HepG2 hanno permesso di riconoscere vie di segnalazione regolate dal miR-199a-3p, non necessariamente le uniche. In tutti i casi, l'espressione forzata del miR-199a-3p ha causato la diminuzione dei livelli proteici di due target diretti MTOR e PAK4, suggerendo che la loro inibizione sia importante affinché il miR-199a-3p possa esplicare la sua azione anti-tumorale. A supporto di questa idea, le vie di segnalazione in cui queste proteine sono inserite hanno un ruolo oncogenico ampiamente riconosciuto.

PAK4 è membro di una famiglia di p21-activated kinases (PAKs), serin-treonin chinasi costituite da due principali sottogruppi, omologhi tra loro, ma con meccanismi di attivazione diversi [145]. Le chinasi del gruppo I sono attivate dal legame con piccole GTPasi, in particolare Cdc42 e Rac1. Le chinasi del gruppo II, di cui è membro PAK4, sono invece intrinsecamente attive. Le proteine PAK agiscono come punto di convergenza di diversi segnali extracellulari e promuovono l'attivazione di numerose vie di segnalazione intracellulare.

Numerosi elementi indicano un ruolo importante di PAK4 nella tumorigenesi. È sovraespresso in svariati tumori umani, tra cui il carcinoma pancreatico, ovarico, mammario [146] e l'inibizione di PAK4 in linee cellulari tumorali che lo sovraesprimono dimostra una riduzione della sopravvivenza cellulare e della

crescita in terreno semisolido [147-151]. Ci sono inoltre molteplici esempi di mutazioni che attivano la chinasi PAK4 in svariati tumori [152-155].

PAK4, è attivato da MET, il recettore per il fattore di crescita degli epatociti (HGF) [156, 157] e a sua volta, può attivare le vie di ERK, AKT e WNT, coinvolte nella proliferazione e sopravvivenza cellulari [158, 159]. PAK4 può attivare il trasduttore del segnale e attivatore della trascrizione 3 (STAT3) e mantenere il fenotipo staminale [160], inoltre modulando la fosforilazione di CRAF e BAD inibisce l'apoptosi nelle cellule endoteliali [161]. Infine, PAK4 interagisce e fosforila diverse proteine coinvolte nella migrazione, invasione, angiogenesi e permeabilità vascolare, quali ad esempio MMP-2, integrina $\beta 5$, GAB-1, catena leggera 9 della miosina (MYL9) e GEF-H1 [156, 162, 163] (**Figura 19**).

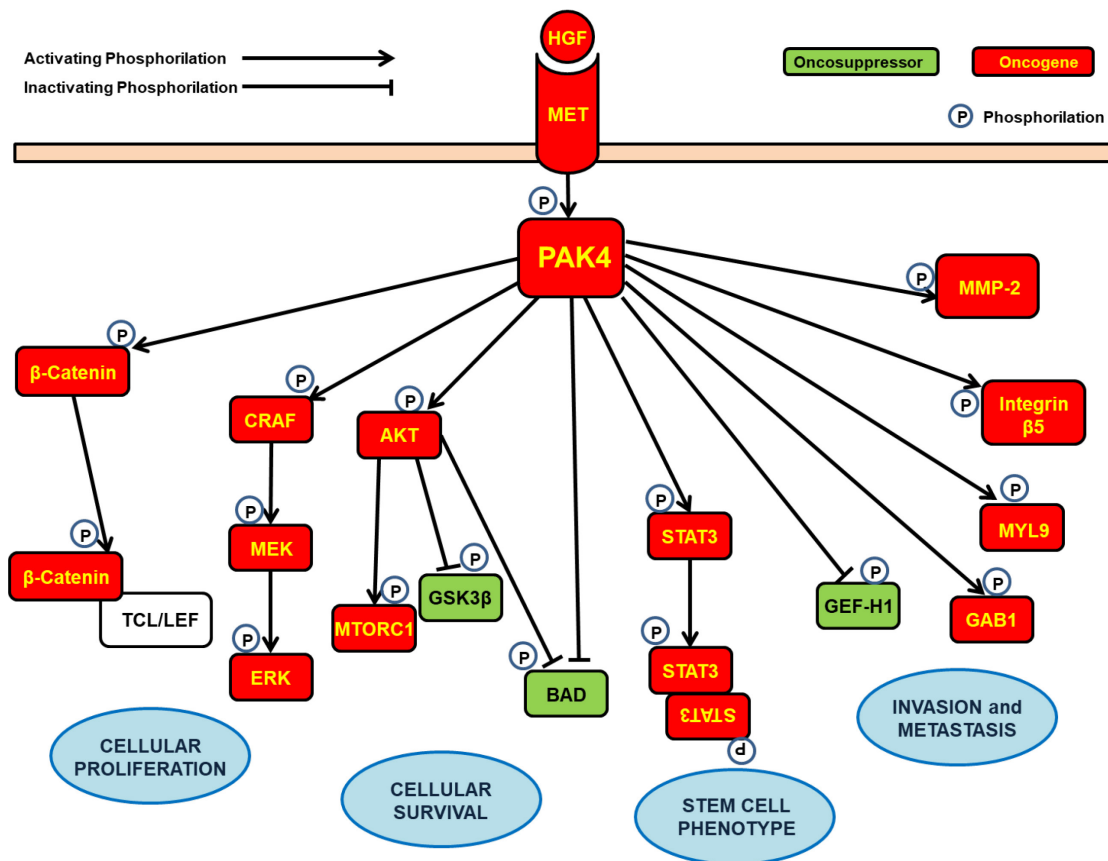


Figura 19. PAK4 fosforila diverse proteine influenzando molteplici attività cellulari. PAK4 svolge la sua funzione di chinasi fosforilando una grande quantità di proteine coinvolte in sviluppo e progressione tumorale, come β -Catenina, CRAF e AKT, attivando le vie di proliferazione e sopravvivenza cellulare. Inoltre, fosforila e inattiva BAD, proteina pro-apoptotica, inibendo il processo di apoptosi direttamente. Pak4, inoltre, fosforila STAT3, che in questo modo dimerizza, e promuove la trascrizione di geni che favoriscono il mantenimento del fenotipo staminale. Infine, PAK4 fosforila e attiva GAB1, MMP-2, MYL9, integrina $\beta 5$, e inattiva GEF-H1, promuovendo migrazione e invasione cellulare e in conclusione la formazione di metastasi.

MTOR, proteina essenziale nella regolazione della via PI3K/AKT/PTEN, è una serin-treonin chinasi che fosforila numerosi bersagli proteici, regolando sintesi proteica, crescita, proliferazione e sopravvivenza delle cellule. MTOR si associa a diverse proteine per formare due complessi: MTORC1 e MTORC2, entrambi coinvolti in vie oncogeniche [164]. Il complesso MTORC1 funziona da sensore per nutrienti, energia, e controlla la sintesi proteica. L'attività di questo complesso è stimolata da insulina ed altri fattori di crescita, e da stress ossidativo. Tale complesso si trova a valle e è controllato dalla via di segnalazione PI3K/AKT. Diversamente, il complesso MTORC2 si trova a monte e controlla l'attivazione di AKT tramite fosforilazione sul residuo di serina S473, agendo come la chinasi precedentemente nota con il nome di PDK2. Insieme a PDK1, che fosforila AKT sulla treonina T308, MTORC2 è responsabile dell'attivazione completa di AKT (Figura 20) [165].

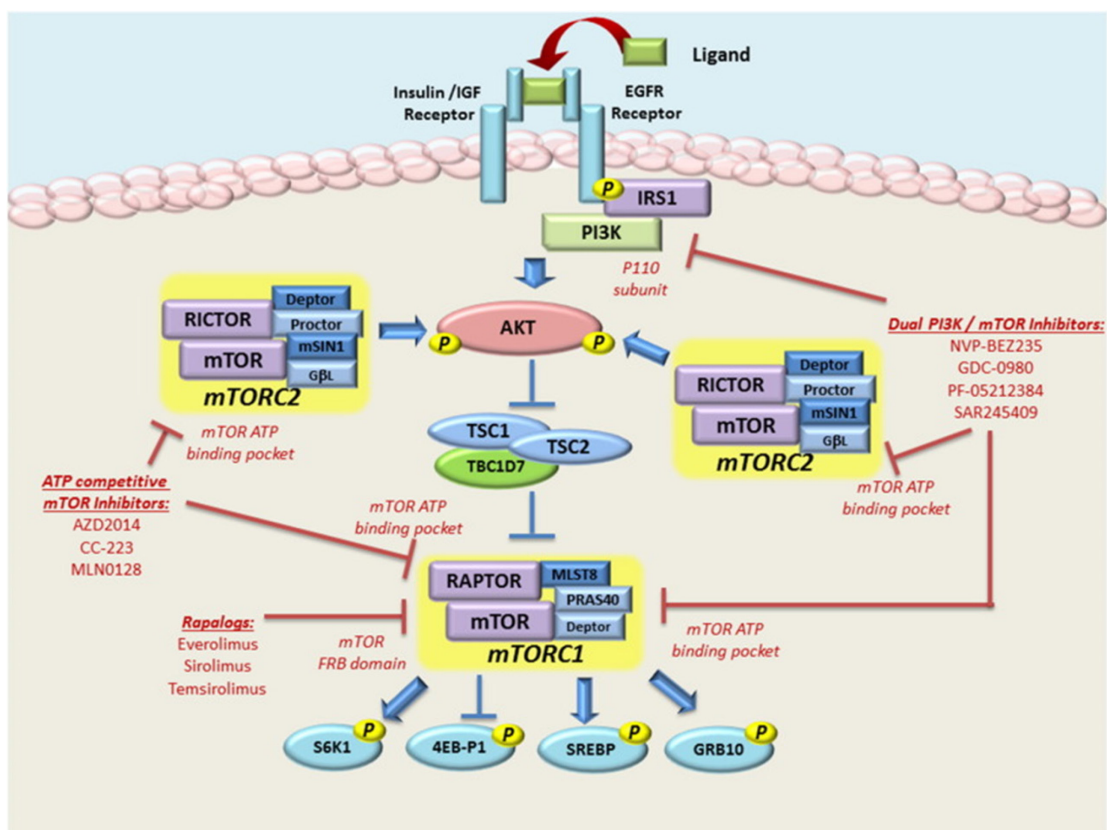


Figura 20. La via di segnale di mTOR. MTOR è una proteina che può associarsi in due complessi, MTORC1 e MTORC2. L'attivazione dei recettori di membrana innesca la cascata di segnale che attiva MTORC2: questo complesso, fosforilando AKT, promuove l'attivazione del complesso MTORC1 a valle. Immagine da [166].

MTOR ha un ruolo importante nell'epatocarcinogenesi: questa via del segnale, infatti, è attiva in più del 50% degli HCC umani [167]. In modelli preclinici,

l'importanza della via di MTOR è stata dimostrata in un modello murino in cui il gene *Pten*, oncosoppressore di questa via, è inattivato: questo modello presenta steatoepatite a 10 mesi di vita, con sviluppo di adenomi nel 60% degli animali e di HCC nel 100% degli animali a 18 mesi [168]

Nel nostro studio abbiamo osservato che il complesso MTORC2, ma non MTORC1, è modulato da miR-199a-3p.

MTORC1 attiva la sintesi proteica fosforilando diverse proteine, tra cui S6K1, che a sua volta può fosforilare e attivare diversi bersagli proteici, come SKAR, PDCD4, eIF4B, eEF2K e S6 [164]. S6 è una proteina che appartiene alla subunità ribosomiale 40S e, una volta fosforilata, promuove la sintesi proteica e l'aumento delle dimensioni cellulari [164]. L'abbassamento dei livelli di MTOR nella forma non fosforilata non è accompagnato dall'abbassamento di p-MTOR S2448, tipica fosforilazione del complesso MTORC1 attivato [169], suggerendo che il complesso mantiene inalterata la sua attività. Questo dato è confermato anche dal mancato abbassamento dei livelli di p-S6, proteina a valle della cascata del segnale innescato da MTORC1. Il meccanismo molecolare tramite cui il miR-199a-3p regola negativamente MTOR ma non l'attività del complesso MTORC1 non è ancora stato chiarito, tuttavia il mantenimento dell'attività di MTORC1 potrebbe essere uno dei motivi per cui il miR-199a-3p non ha provocato regressione tumorale, ma solo il rallentamento della crescita dei noduli neoplastici, dato che, come già detto in precedenza, MTORC1 è fortemente coinvolto in sviluppo e progressione tumorale. Poiché il miR-199a-3p non ha completamente soppresso, ma ha soltanto ridotto le quantità di MTOR, possiamo inoltre ipotizzare che MTOR residuo abbia una maggiore affinità di legame con le proteine che formano il complesso di MTORC1, la cui attività, segnalata dalla fosforilazione in S2448 e da p-S6, non risente del calo della forma non fosforilata di MTOR.

Al contrario la via di MTORC2, viene inibita dal trattamento con il miR-199a-3p, come riscontrabile attraverso la ridotta fosforilazione di AKT e di FOXO3A (**Figura 21**). Ciò porta ad attivazione di FOXO3A, che si traduce nell'inibizione del fattore di trascrizione oncogeno FOXM1. È, infatti, stato dimostrato che i livelli di espressione di *Foxo3a* e *Foxm1* sono inversamente correlati, sebbene, il meccanismo tramite cui FOXO3A inibisca l'espressione di *Foxm1* non sia pienamente chiarito [92, 96]. L'effetto su FOXM1 è rilevante nel processo tumorigenico, in quanto esso è un proto-oncogene, la cui aberrante sovra

espressione è stata osservata nella maggior parte dei tumori solidi nell'uomo. FOXM1 ha un ruolo chiave nella progressione del ciclo cellulare, dove è abbondante nella fase G2/M, periodo in cui regola la trascrizione di numerosi geni specifici di questa fase, importanti nella corretta segregazione cromosomica [96].

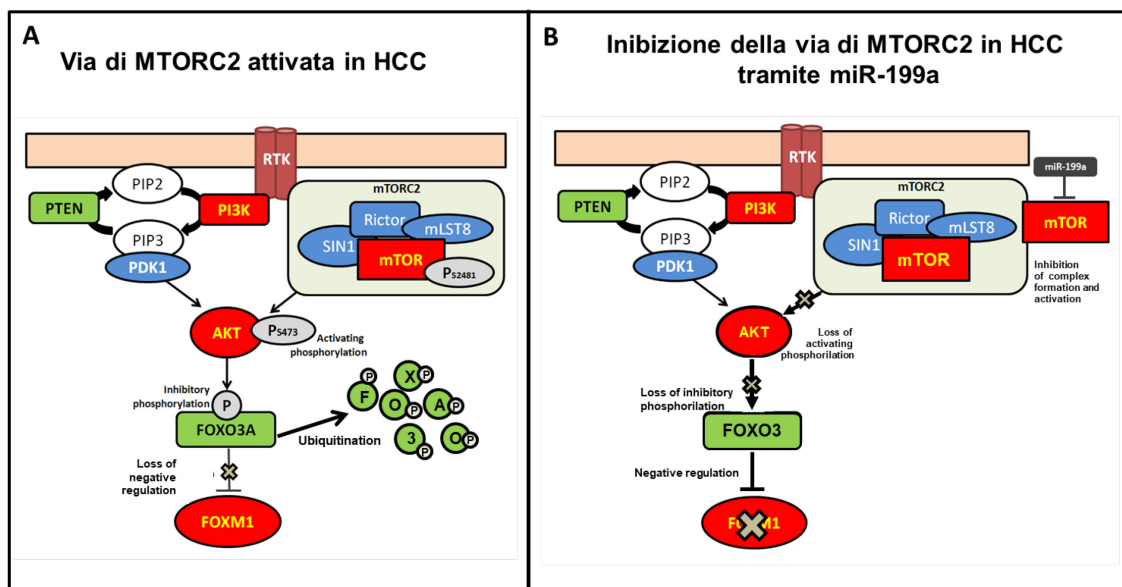


Figura 21. Inibizione della via di mTORC2 da parte del miR-199a-3p. (A) Schema della via di MTORC2 attivata in HCC. Il complesso fosforila AKT che a sua volta determina l'inattivazione dell'oncosoppressore FOXO3A e l'attivazione del fattore di trascrizione FOXM1. (B) L'aumento del miR-199a-3p determina l'abbassamento dei livelli proteici di MTOR, nonché l'inattivazione del complesso MTORC2. Di conseguenza, AKT non può essere fosforilato, FOXO3A può svolgere le sue funzioni oncosoppressive e impedisce l'espressione di FOXM1. In entrambe le figure le proteine con attività oncogenica sono riportate in rosso, quelle con attività oncosoppressoria in verde. Il miR-199a-3p è abbreviato in miR-199a.

Il ruolo fondamentale svolto da *Foxm1* nella progressione tumorale dell'HCC è stato dimostrato in modelli pre-clinici, dove la sua espressione aumenta in tumori epatici indotti dal carcinogeno DEN [170]. Inoltre, in pazienti di HCC, elevata espressione di *Foxm1* è correlata all'aumento dell'instabilità cromosomica [171] ed è associata ad una prognosi sfavorevole [172].

Nonostante non sia bersaglio diretto del miR-199a-3p, l'azione a cascata del miRNA sulla via di segnale di MTORC2 riesce a indurre l'abbassamento di FOXM1, inibendo di conseguenza l'espressione dei geni regolati da questo fattore di trascrizione. Nel nostro studio, infatti, le analisi di espressione genica hanno mostrato che l'abbassamento dei livelli proteici di FOXM1 si traduce nell'inibizione della trascrizione di geni chiave coinvolti nella progressione del ciclo cellulare e nella sopravvivenza cellulare, tra cui *Ccnb1*, *Cdc25*, *Cdc20*, *Cdk1*, *Tgfb2* E *Birc5* (*Survivin*) [173, 174]. Inibire FOXM1 è quindi di fondamentale importanza per

impedire l'espressione di una grande quantità di geni coinvolti nella progressione dell'HCC in stato avanzato.

Infine, con un meccanismo indiretto ancora da chiarire, il trattamento con il miR-199a-3p regola la via PI3K/AKT anche attraverso l'aumento della proteina oncosoppressoria PTEN, fondamentale per inibire l'attivazione di AKT e, di conseguenza, anche il processo tumorale.

Nell'ambito della profilassi, il miR-199a-3p sembra agire con meccanismi analoghi, mentre non sembra avere alcun effetto nei processi pre-tumorali di fibrosi e cirrosi, come dimostrato dall'analisi dei livelli di espressione di *α -Sma*, gene coinvolto nella attivazione delle cellule stellate implicate nella formazione di fibrosi e di cirrosi, e di *Col1a1*, codificante per il Collagene 1 α , che non risultano modificati dal miR-199a-3p. Infine, non risulta modificata l'espressione di *Gpc3*, gene che partecipa alle fasi precoci di trasformazione in HCC [102, 175]. Nonostante i livelli di espressione di questo gene rimangano invariati, il miR-199a-3p ha impedito la trasformazione tumorale, suggerendo che diverse vie molecolari partecipano alla progressione da noduli cirrotici a tumorali. Quindi, inibire alcune delle molecole coinvolte, anche se non necessariamente tutte, può comunque contrastare la trasformazione maligna.

L'azione del miR-199a-3p su PAK4 e sulla via di MTORC2 è stata riscontrata sia in entrambi i modelli sperimentali TG221, DEN e CCl₄, sia in linee cellulari umane, confermando l'attendibilità ed importanza di tale meccanismo di controllo operato dal miR-199a-3p nel processo di tumorigenesi. Questi risultati, inoltre, forniscono informazioni su possibili bersagli terapeutici, tra cui MTOR, AKT, FOXM1 ed anche PAK4, tuttavia i farmaci molecolari testati in sperimentazioni cliniche contro l'HCC hanno finora avuto risultati deludenti, come dimostrano gli studi di seguito riportati.

Tra le terapie molecolari contro il cancro più utilizzate spiccano gli inibitori di mTOR Everolimus e Temsirolimus, derivati della Rapamicina [176]. Entrambi i farmaci sono stati approvati da FDA e EMA per la terapia di diversi tipi di tumore come il carcinoma renale avanzato [177], tumore al seno HR⁺/HER⁻ [178], tumore al pancreas e altre neoplasie endocrine [179]. Everolimus è stato anche testato come terapia di seconda linea in pazienti con HCC avanzato che hanno avuto progressione tumorale durante il trattamento con Sorafenib o sono risultati intolleranti al farmaco. Nel trial clinico di fase III EVOLVE-1 (Everolimus vs

Placebo, NCT01035229), Everolimus non ha significativamente aumentato la sopravvivenza totale dei pazienti, non raggiungendo l'obiettivo principale dello studio clinico. Anche Temsirolimus è stato testato come terapia in pazienti con HCC avanzato e cirrosi: il trial clinico di fase II (NCT01079767) è stato tuttavia interrotto prematuramente per il mancato rispetto del protocollo di monitoraggio dati e sicurezza (DSMB) per gli studi clinici.

Altro bersaglio molecolare contro cui sono state sviluppate diverse molecole è AKT: gli inibitori AZ05363, GDC-0068 (Ipatasertib), GSK2141795 e MK2206 sono stati studiati in diversi trial clinici, soprattutto contro tumore al seno (NCT02077569, NCT02423603, NCT02301988, NCT01240941), cancro al colon (NCT01333475) e tumore alla cervice (NCT01958112). Nonostante la grande quantità di studi clinici che analizzano l'attività terapeutica di questi inibitori di AKT [180], nessuno di essi è mai entrato in uno studio di fase III, poiché i risultati ottenuti sono stati piuttosto scarsi. L'inibitore di AKT MK2206 è stato testato anche in uno studio di fase II in pazienti con HCC avanzato che non hanno risposto a precedenti terapie (NCT01239355), tuttavia a causa di risultati scoraggianti, lo studio è stato prematuramente interrotto.

Non sono presenti, invece, inibitori di FOXM1 che, come riportato precedentemente, è una proteina di notevole importanza nell'insorgenza e progressione tumorale: risulta quindi di particolare interesse l'effetto che abbiamo ottenuto nel nostro studio attraverso il mimico del miR-199a-3p che, agendo sulla via di mTORC2, permette una significativa riduzione di questa proteina e dell'espressione dei geni di cui promuove la trascrizione.

Altro potenziale target per nuove terapie è PAK4: diversi inibitori di questa proteina sono stati scoperti, tuttavia nessuno è ancora stato approvato per l'utilizzo in pratica clinica [162]. Lo studio clinico di fase I (NCT00932126) che analizzava l'effetto di PF-03758309, inibitore specifico di PAK4, in pazienti con tumori solidi è stato prematuramente terminato in quanto il farmaco non ha mostrato alcuna efficacia, mentre un nuovo studio di fase I che testa l'efficacia e la tollerabilità di KPT-9274, inibitore di PAK4 e NAMPT, in pazienti con tumori solidi e linfoma non Hodgking (NCT02702492) è ancora in fase di reclutamento, quindi per avere i primi risultati si dovrà ancora attendere. Per quanto riguarda HCC, l'utilizzo di inibitori di PAK4 non è ancora stato riportato, né in modelli pre-clinici né in trial clinici.

Il fallimento di questi studi in diversi tipi di cancro e l'inefficacia di queste terapie contro HCC mette ancor più in risalto quanto siamo riusciti a ottenere sfruttando il mimic del miR-199a-3p, che agendo su MTOR e PAK4, ha permesso l'abbassamento dei livelli di molteplici proteine coinvolte in sviluppo e progressione di HCC.

6. CONCLUSIONI

In conclusione, questo studio ha portato diversi nuovi risultati nello studio del potenziale utilizzo di molecole miRNA nella terapia di tumori epatici. Essi sono andati dalle specifiche analisi del miR-199-3p, allo sviluppo di un nuovo modello murino in grado di ricapitolare la storia naturale del HCC umano, al saggio di nanoparticelle lipidiche anioniche per la efficiente veicolazione al fegato di molecole miRNA.

L'uso del mimic del miR-199a-3p ha avuto effetti anti-tumorali significativi. Questo studio infatti dimostra che il ripristino del miR-199a-3p può avere un potenziale effetto anti-tumorale nell'HCC avanzato, rallentando la crescita dei noduli tumorali. Sebbene, il trattamento non abbia determinato la scomparsa dei noduli, si è osservato una significativa riduzione di numero e dimensione dei carcinomi indotti tramite DEN. Di particolare interesse il fatto che lo stesso risultato sia stato ottenuto con Sorafenib, suggerendo che l'efficacia del miR-199a-3p non sia molto diversa da quest'ultimo farmaco, usato nell'uomo per la terapia degli HCC avanzati. In aggiunta, il miR-199-3p non ha mostrato alcun evidente effetto tossico, quali calo ponderale, letargia.

Per quanto riguarda il modello murino TG221 trattato con CCl₄, l'utilizzo del mimic miR-199a-3p come terapia di profilassi in fase cirrotica pre-neoplastica, ha impedito la formazione di noduli tumorali maligni. Tuttavia, nessun effetto indotto da miR-199a-3p è stato osservato nella modifica del microambiente fibrotico. In ipotesi, ciò apre la possibilità di intervenire combinando approcci anti-fibrotici con terapie anti-tumorali ad esempio basati su miR-199a-3p, soprattutto considerando la sua scarsa o assente tossicità. Sotto questo punto di vista, l'uso di nanoparticelle lipidiche anioniche risulta avere una migliore tollerabilità rispetto a vettori cationici.

Dallo studio dei meccanismi molecolari attraverso cui il miR-199a-3p ha agito, sono emersi processi coinvolgenti la via PI3K/AKT/MTOR/FOXM1 e PAK4, confermati sia nel modello DEN, che nel modello CCl₄ che in linee cellulari umane.

Infine, un ulteriore aspetto rilevante emerso da questo studio riguarda lo sviluppo del modello TG221-CCl₄. Tale modello appare l'unico nel panorama scientifico in grado di ricapitolare la storia naturale del HCC umano in maniera relativamente

semplice. Infatti, il trattamento di topi TG221 con CCl₄ porta non solo allo sviluppo di fibrosi e cirrosi in 14 settimane, ma entro i 6 mesi di vita, tutti i topi sviluppano noduli tumorali che vanno da iperplasie con displasia di vario grado fino ad HCC. Tale modello è stato essenziale per poter saggiare approcci basati su miRNA mirati alla prevenzione di HCC su fegato cirrotico e potrà essere ulteriormente impiegato per analisi di altre molecole.

ELENCO DELLE ABBREVIAZIONI

7-AAD - 7-Aminoactinomycin D
AFP - Alpha Fetoprotein
AKT - Protein Kinase B
ALR - Augmenter Of Liver Regeneration
ALT - Glutamic--Pyruvic Transaminase
APC - Adenomatous Polyposis Coli
ARID1A - AT-rich Interaction Domain 1A
ARID2 - AT-rich Interaction Domain 2
AST - Glutamic Oxaloacetic Transaminase
BIRC5 - Baculoviral IAP Repeat Containing 5
BRAF - B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase
CCNA - Cyclin A
CCND1 -Cyclin D1
CCR2 - C-C motif chemokine receptor 2
CCR5 - C-C motif chemokine receptor 5
CDC20 - Cell Division Cycle 20
CDC25B - Cell Division Cycle 25B
CDK1 - Cyclin Dependent Kinase 1
CDKN2A - Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A
C-JUN - Jun Proto-Oncogene, AP-1 Transcription Factor Subunit
CTGF - Connective Tissue Growth Factor
CTNNB1 - Catenin Beta 1
E2F1 - E2F Transcription Factor 1
eEF2K - Eukaryotic Elongation Factor 2 Kinase
EGF - Epidermal Growth Factor
EGFR - Epidermal Growth Factor Receptor
eIF4B - Eukaryotic Translation Initiation Factor 4B
EMA - European Medicin Agency
EMT – Epitelial to Mesenchimal Transition
ERK - Mitogen-Activated Protein Kinase 1
FDA - Food and Drug Administration
FGF - Fibroblast Growth Factor
FGFR - Fibroblast Growth Factor Receptor
FOLFOX – Folinic Acid, 5-FU e Oxaliplatin
FOXM1 - Forkhead Box M1

FOXO3A - Forkhead Box O3
GAB-1 - GRB2 Associated Binding Protein 1
GEF-H1 - Rho/Rac Guanine Nucleotide Exchange Factor 2
GFP - Green Florescent Protein
GLOSSARIO
GPC3 - Glypican 3
HBsAg - Hepatitis B surface antigen
HGF - Hepatocyte Growth Factor
IL-12 - Interleukin 12
IL-1 β - Interleukin 1 B
IL-6 - Interleukin 6
KEAP1- Kelch-like ECH-associated protein 1
KIT - KIT proto-oncogene, receptor tyrosine kinase
KMTB2 or MLL- Lysine Methyltransferase 2B
LPL - Lipoprotein Lipase
MAPK - Mitogen-Activated Protein Kinase
MET - MET proto-oncogene, receptor tyrosine kinase
MMP-2 - Matrix Metalloproteinase 2
MTOR - Mammalian Target of Rapamycin
MTORC1 - Mammalian Target Of Rapamycin Complex 1
MTORC2 - Mammalian Target Of Rapamycin Complex 2
MYB - MYB proto-oncogene, transcription factor
MYC - MYC proto-oncogene, bHLH transcription factor
NAFLD - Nonalcoholic Fatty Liver Disease
NAMPT - nicotinamide phosphoribosyltransferase
NASH - Nonalcoholic steatohepatitis
NF- κ B - Nuclear Factor Kappa B
NRF2 - Nuclear Factor, Erythroid 2 Like 2
NSCLC - Non-small-cell lung carcinoma
PAK4 - p21 (RAC1) Activated Kinase 4
PD-1 - Programmed Cell Death 1
PDCD4 - Programmed Cell Death 4
PDGF - Platelet Derived Growth Factor Subunit
PDGFR- α e β - Platelet-derived growth factor receptors α e β
PDK1/2 - Pyruvate Dehydrogenase Kinase 1/2
PFS – Progression Free Survival

PI3K - Phosphoinositide 3 Kinase
PI3KCA - Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit α
PIAF - Platino, Interferone, Doxorubicina e 5-FU
PPAR α/δ - Peroxisome Proliferator Activated Receptor Alfa/Delta
PTEN - Phosphatase And Tensin Homolog
RAF-1 - Raf-1 proto-oncogene
RB1 - Retinoblastoma Protein
RET - RET proto-oncogene
S6 - Ribosomal Protein S6
S6K1 - Ribosomal Protein S6 Kinase
SCD2 - Stearoyl-Coenzyme A Desaturase 2
SKAR - DNA Polymerase Delta Interacting Protein 3
SWI/SNF - SWItch/Sucrose Non-Fermentable
TERT - Telomerase Reverse Transcriptase
TFF3 - Trefoil Factor 3
TGFB1 - Transforming Growth Factor Beta 1
TGFB2 - Transforming Growth Factor Beta 2
TGF- α - Transforming Growth Factor Alpha
TGF- β - Transforming Growth Factor Beta
TIE2 - TEK Receptor Tyrosine Kinase
TNFSF10 - TNF Superfamily Member 10
TP53 - Tumor Protein P53
TRL-4 - Toll Like Receptor 4
TSC1 - TSC Complex Subunit 1
TSC2 - TSC Complex Subunit 2
TTP - Time To Progression
VEGF-A - Vascular Endothelial Growth Factor A
VEGFR1-3 - Receptors For Vascular Endothelial Growth Factor 1-3
WT- Wild Type
YAP1 - Yes associated protein 1
ZNRF3 - Zinc and Ring Finger 3
 α -SMA- Actin, Alpha 2, Smooth Muscle, Aorta

BIBLIOGRAFIA

1. *EASL Clinical Practice Guidelines: Management of hepatocellular carcinoma*. J Hepatol, 2018. **69**(1): p. 182-236.
2. European Association For The Study Of The, L., R. European Organisation For, and C. Treatment Of, *EASL-EORTC clinical practice guidelines: management of hepatocellular carcinoma*. J Hepatol, 2012. **56**(4): p. 908-43.
3. Llovet, J.M., et al., *Hepatocellular carcinoma*. Nat Rev Dis Primers, 2016. **2**: p. 16018.
4. Aravalli, R.N., E.N. Cressman, and C.J. Steer, *Cellular and molecular mechanisms of hepatocellular carcinoma: an update*. Arch Toxicol, 2013. **87**(2): p. 227-47.
5. Fujiwara, N., et al., *Risk factors and prevention of hepatocellular carcinoma in the era of precision medicine*. J Hepatol, 2018. **68**(3): p. 526-549.
6. Torre, L.A., et al., *Global cancer statistics, 2012*. CA Cancer J Clin, 2015. **65**(2): p. 87-108.
7. Pons, F., M. Varela, and J.M. Llovet, *Staging systems in hepatocellular carcinoma*. HPB (Oxford), 2005. **7**(1): p. 35-41.
8. Whittaker, S., R. Marais, and A.X. Zhu, *The role of signaling pathways in the development and treatment of hepatocellular carcinoma*. Oncogene, 2010. **29**(36): p. 4989-5005.
9. Llovet, J.M., et al., *Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma*. N Engl J Med, 2008. **359**(4): p. 378-90.
10. Pang, R.W. and R.T. Poon, *From molecular biology to targeted therapies for hepatocellular carcinoma: the future is now*. Oncology, 2007. **72 Suppl 1**: p. 30-44.
11. Ierardi, E., et al., *From chronic liver disorders to hepatocellular carcinoma: Molecular and genetic pathways*. World J Gastrointest Oncol, 2010. **2**(6): p. 259-64.
12. Severi, T., et al., *Tumor initiation and progression in hepatocellular carcinoma: risk factors, classification, and therapeutic targets*. Acta Pharmacol Sin, 2010. **31**(11): p. 1409-20.
13. Guyot, C., et al., *Hepatic fibrosis and cirrhosis: the (myo)fibroblastic cell subpopulations involved*. Int J Biochem Cell Biol, 2006. **38**(2): p. 135-51.
14. Aravalli, R.N., C.J. Steer, and E.N. Cressman, *Molecular mechanisms of hepatocellular carcinoma*. Hepatology, 2008. **48**(6): p. 2047-63.
15. Giannelli, G., et al., *Laminin-5 with transforming growth factor-beta1 induces epithelial to mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma*. Gastroenterology, 2005. **129**(5): p. 1375-83.
16. Chen, C. and G. Wang, *Mechanisms of hepatocellular carcinoma and challenges and opportunities for molecular targeted therapy*. World J Hepatol, 2015. **7**(15): p. 1964-70.
17. Zucman-Rossi, J., et al., *Genetic Landscape and Biomarkers of Hepatocellular Carcinoma*. Gastroenterology, 2015. **149**(5): p. 1226-1239 e4.
18. Shibata, T., et al., *Cancer related mutations in NRF2 impair its recognition by Keap1-Cul3 E3 ligase and promote malignancy*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(36): p. 13568-73.
19. Schmidt, C.M., et al., *Increased MAPK expression and activity in primary human hepatocellular carcinoma*. Biochem Biophys Res Commun, 1997. **236**(1): p. 54-8.
20. McKillop, I.H., et al., *Altered expression of mitogen-activated protein kinases in a rat model of experimental hepatocellular carcinoma*. Hepatology, 1997. **26**(6): p. 1484-91.
21. Ito, Y., et al., *Activation of mitogen-activated protein kinases/extracellular signal-regulated kinases in human hepatocellular carcinoma*. Hepatology, 1998. **27**(4): p. 951-8.
22. Llovet, J.M., et al., *Advances in targeted therapies for hepatocellular carcinoma in the genomic era*. Nat Rev Clin Oncol, 2015. **12**(7): p. 408-24.
23. Llovet, J.M. and J. Bruix, *Systematic review of randomized trials for unresectable hepatocellular carcinoma: Chemoembolization improves survival*. Hepatology, 2003. **37**(2): p. 429-42.
24. Kudo, M., *Systemic Therapy for Hepatocellular Carcinoma: 2017 Update*. Oncology, 2017. **93 Suppl 1**: p. 135-146.
25. Sun, W. and R. Cabrera, *Systemic Treatment of Patients with Advanced, Unresectable Hepatocellular Carcinoma: Emergence of Therapies*. J Gastrointest Cancer, 2018. **49**(2): p. 107-115.
26. Kudo, M., et al., *Lenvatinib versus sorafenib in first-line treatment of patients with unresectable hepatocellular carcinoma: a randomised phase 3 non-inferiority trial*. Lancet, 2018. **391**(10126): p. 1163-1173.
27. Bruix, J., et al., *Regorafenib for patients with hepatocellular carcinoma who progressed on sorafenib treatment (RESORCE): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial*. Lancet, 2017. **389**(10064): p. 56-66.

28. Ghassan K. Abou-Alfa, et al., *Cabozantinib (C) versus placebo (P) in patients (pts) with advanced hepatocellular carcinoma (HCC) who have received prior sorafenib: Results from the randomized phase III CELESTIAL trial*. Journal of Clinical Oncology, 2018.
29. El-Khoueiry, A.B., et al., *Nivolumab in patients with advanced hepatocellular carcinoma (CheckMate 040): an open-label, non-comparative, phase 1/2 dose escalation and expansion trial*. Lancet, 2017. **389**(10088): p. 2492-2502.
30. Nault, J.C., P.R. Galle, and J.U. Marquardt, *The role of molecular enrichment on future therapies in hepatocellular carcinoma*. J Hepatol, 2018. **69**(1): p. 237-247.
31. Geissler, E.K., et al., *Sirrolimus Use in Liver Transplant Recipients With Hepatocellular Carcinoma: A Randomized, Multicenter, Open-Label Phase 3 Trial*. Transplantation, 2016. **100**(1): p. 116-25.
32. Bruix, J., et al., *Adjuvant sorafenib for hepatocellular carcinoma after resection or ablation (STORM): a phase 3, randomised, double-blind, placebo-controlled trial*. Lancet Oncol, 2015. **16**(13): p. 1344-54.
33. <http://www.mirbase.org/>.
34. Negrini, M., et al., *MicroRNAs in human cancer: from research to therapy*. J Cell Sci, 2007. **120**(Pt 11): p. 1833-40.
35. Saliminejad, K., et al., *An overview of microRNAs: Biology, functions, therapeutics, and analysis methods*. J Cell Physiol, 2018.
36. Callegari, E., et al., *Role of microRNAs in hepatocellular carcinoma: a clinical perspective*. Onco Targets Ther, 2013. **6**: p. 1167-78.
37. Kalla, R., et al., *MicroRNAs: new players in IBD*. Gut, 2015. **64**(3): p. 504-17.
38. Farazi, T.A., et al., *MicroRNAs in human cancer*. Adv Exp Med Biol, 2013. **774**: p. 1-20.
39. Cullen, B.R., *RNAi the natural way*. Nat Genet, 2005. **37**(11): p. 1163-5.
40. Lee, J.S., et al., *Application of comparative functional genomics to identify best-fit mouse models to study human cancer*. Nat Genet, 2004. **36**(12): p. 1306-11.
41. Wong, C.M., F.H. Tsang, and I.O. Ng, *Non-coding RNAs in hepatocellular carcinoma: molecular functions and pathological implications*. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2018. **15**(3): p. 137-151.
42. Song, J. and J.E. Lee, *miR-155 is involved in Alzheimer's disease by regulating T lymphocyte function*. Front Aging Neurosci, 2015. **7**: p. 61.
43. Mancuso, R., et al., *MicroRNA-572 expression in multiple sclerosis patients with different patterns of clinical progression*. J Transl Med, 2015. **13**: p. 148.
44. Gao, H., et al., *Plasma Levels of microRNA-145 Are Associated with Severity of Coronary Artery Disease*. PLoS One, 2015. **10**(5): p. e0123477.
45. Qu, B. and N. Shen, *miRNAs in the Pathogenesis of Systemic Lupus Erythematosus*. Int J Mol Sci, 2015. **16**(5): p. 9557-9572.
46. Negrini, M., et al., *microRNA involvement in hepatocellular carcinoma*. Anticancer Agents Med Chem, 2011. **11**(6): p. 500-21.
47. Chen, Y., D.Y. Gao, and L. Huang, *In vivo delivery of miRNAs for cancer therapy: challenges and strategies*. Adv Drug Deliv Rev, 2015. **81**: p. 128-41.
48. Krutzfeldt, J., et al., *Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs'*. Nature, 2005. **438**(7068): p. 685-9.
49. Elmen, J., et al., *LNA-mediated microRNA silencing in non-human primates*. Nature, 2008. **452**(7189): p. 896-9.
50. Roberts, A.P., A.P. Lewis, and C.L. Jopling, *miR-122 activates hepatitis C virus translation by a specialized mechanism requiring particular RNA components*. Nucleic Acids Res, 2011. **39**(17): p. 7716-29.
51. Gebert, L.F., et al., *Miravirsin (SPC3649) can inhibit the biogenesis of miR-122*. Nucleic Acids Res, 2014. **42**(1): p. 609-21.
52. Janssen, H.L., et al., *Treatment of HCV infection by targeting microRNA*. N Engl J Med, 2013. **368**(18): p. 1685-94.
53. Callegari, E., et al., *Liver tumorigenicity promoted by microRNA-221 in a mouse transgenic model*. Hepatology, 2012. **56**(3): p. 1025-33.
54. Park, J.K., et al., *miR-221 silencing blocks hepatocellular carcinoma and promotes survival*. Cancer Res, 2011. **71**(24): p. 7608-16.
55. Lim, L., et al., *MicroRNA-494 within an oncogenic microRNA megacluster regulates G1/S transition in liver tumorigenesis through suppression of mutated in colorectal cancer*. Hepatology, 2014. **59**(1): p. 202-15.
56. Dhanasekaran, R., et al., *Anti-miR-17 therapy delays tumorigenesis in MYC-driven hepatocellular carcinoma (HCC)*. Oncotarget, 2018. **9**(5): p. 5517-5528.

57. Hatzia Apostolou, M., et al., *An HNF4 α -miRNA inflammatory feedback circuit regulates hepatocellular oncogenesis*. Cell, 2011. **147**(6): p. 1233-47.
58. Hsu, S.H., et al., *Cationic lipid nanoparticles for therapeutic delivery of siRNA and miRNA to murine liver tumor*. Nanomedicine, 2013. **9**(8): p. 1169-80.
59. Wang, X., et al., *Enhanced hepatic delivery of siRNA and microRNA using oleic acid based lipid nanoparticle formulations*. J Control Release, 2013. **172**(3): p. 690-8.
60. Beg, M.S., et al., *Phase I study of MRX34, a liposomal miR-34a mimic, administered twice weekly in patients with advanced solid tumors*. Invest New Drugs, 2017. **35**(2): p. 180-188.
61. van Zandwijk, N., et al., *Safety and activity of microRNA-loaded minicells in patients with recurrent malignant pleural mesothelioma: a first-in-man, phase 1, open-label, dose-escalation study*. Lancet Oncol, 2017. **18**(10): p. 1386-1396.
62. Newell, P., et al., *Experimental models of hepatocellular carcinoma*. J Hepatol, 2008. **48**(5): p. 858-79.
63. Brown, Z.J., B. Heinrich, and T.F. Greten, *Mouse models of hepatocellular carcinoma: an overview and highlights for immunotherapy research*. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2018.
64. Ju, H.L., et al., *Transgenic mouse models generated by hydrodynamic transfection for genetic studies of liver cancer and preclinical testing of anti-cancer therapy*. Int J Cancer, 2016. **138**(7): p. 1601-8.
65. Li, Y., Z.Y. Tang, and J.X. Hou, *Hepatocellular carcinoma: insight from animal models*. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2011. **9**(1): p. 32-43.
66. He, L., et al., *Mouse models of liver cancer: Progress and recommendations*. Oncotarget, 2015. **6**(27): p. 23306-22.
67. Marques, T.G., et al., *Review of experimental models for inducing hepatic cirrhosis by bile duct ligation and carbon tetrachloride injection*. Acta Cir Bras, 2012. **27**(8): p. 589-94.
68. Chang, M.L., et al., *Comparison of murine cirrhosis models induced by hepatotoxin administration and common bile duct ligation*. World J Gastroenterol, 2005. **11**(27): p. 4167-72.
69. Domenicali, M., et al., *A novel model of CCl₄-induced cirrhosis with ascites in the mouse*. J Hepatol, 2009. **51**(6): p. 991-9.
70. Dapito, D.H., et al., *Promotion of hepatocellular carcinoma by the intestinal microbiota and TLR4*. Cancer Cell, 2012. **21**(4): p. 504-16.
71. Uehara, T., I.P. Pogribny, and I. Rusyn, *The DEN and CCl₄ -Induced Mouse Model of Fibrosis and Inflammation-Associated Hepatocellular Carcinoma*. Curr Protoc Pharmacol, 2014. **66**: p. 14 30 1-10.
72. Uehara, T., et al., *Molecular mechanisms of fibrosis-associated promotion of liver carcinogenesis*. Toxicol Sci, 2013. **132**(1): p. 53-63.
73. Reiberger, T., et al., *An orthotopic mouse model of hepatocellular carcinoma with underlying liver cirrhosis*. Nat Protoc, 2015. **10**(8): p. 1264-74.
74. Chung, S.I., et al., *Development of a transgenic mouse model of hepatocellular carcinoma with a liver fibrosis background*. BMC Gastroenterol, 2016. **16**: p. 13.
75. Luo, M., et al., *Two-stage model of chemically induced hepatocellular carcinoma in mouse*. Oncol Res, 2013. **20**(11): p. 517-28.
76. Murakami, Y., et al., *Comprehensive analysis of microRNA expression patterns in hepatocellular carcinoma and non-tumorous tissues*. Oncogene, 2006. **25**(17): p. 2537-45.
77. Hou, J., et al., *Identification of miRNomes in human liver and hepatocellular carcinoma reveals miR-199a/b-3p as therapeutic target for hepatocellular carcinoma*. Cancer Cell, 2011. **19**(2): p. 232-43.
78. Bronte, F., et al., *HepatomiRNoma: The proposal of a new network of targets for diagnosis, prognosis and therapy in hepatocellular carcinoma*. Crit Rev Oncol Hematol, 2016. **97**: p. 312-21.
79. Fornari, F., et al., *MiR-199a-3p regulates mTOR and c-Met to influence the doxorubicin sensitivity of human hepatocarcinoma cells*. Cancer Res, 2010. **70**(12): p. 5184-93.
80. Kim, S., et al., *MicroRNA miR-199a* regulates the MET proto-oncogene and the downstream extracellular signal-regulated kinase 2 (ERK2)*. J Biol Chem, 2008. **283**(26): p. 18158-66.
81. Ren, K., et al., *miR-199a-3p inhibits cell proliferation and induces apoptosis by targeting YAP1, suppressing Jagged1-Notch signaling in human hepatocellular carcinoma*. J Biomed Sci, 2016. **23**(1): p. 79.
82. Henry, J.C., et al., *miR-199a-3p targets CD44 and reduces proliferation of CD44 positive hepatocellular carcinoma cell lines*. Biochem Biophys Res Commun, 2010. **403**(1): p. 120-5.

83. Ghosh, A., et al., *MiRNA199a-3p suppresses tumor growth, migration, invasion and angiogenesis in hepatocellular carcinoma by targeting VEGFA, VEGFR1, VEGFR2, HGF and MMP2*. *Cell Death Dis*, 2017. **8**(3): p. e2706.
84. Giovannini, C., et al., *MiR-199-3p replacement affects E-cadherin expression through Notch1 targeting in hepatocellular carcinoma*. *Acta Histochem*, 2018. **120**(2): p. 95-102.
85. Callegari, E., et al., *Anti-tumor activity of a miR-199-dependent oncolytic adenovirus*. *PLoS One*, 2013. **8**(9): p. e73964.
86. Moshiri, F., et al., *Inhibiting the oncogenic mir-221 by microRNA sponge: toward microRNA-based therapeutics for hepatocellular carcinoma*. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench*, 2014. **7**(1): p. 43-54.
87. Fujii, T., et al., *Mouse model of carbon tetrachloride induced liver fibrosis: Histopathological changes and expression of CD133 and epidermal growth factor*. *BMC Gastroenterol*, 2010. **10**: p. 79.
88. Huang, X., et al., *Targeted delivery of microRNA-29b by transferrin-conjugated anionic lipopolyplex nanoparticles: a novel therapeutic strategy in acute myeloid leukemia*. *Clin Cancer Res*, 2013. **19**(9): p. 2355-67.
89. D'Abundo, L., et al., *Anti-leukemic activity of microRNA-26a in a chronic lymphocytic leukemia mouse model*. *Oncogene*, 2017. **36**(47): p. 6617-6626.
90. International Working, P., *Terminology of nodular hepatocellular lesions*. *Hepatology*, 1995. **22**(3): p. 983-93.
91. Miotto, E., et al., *Quantification of circulating miRNAs by droplet digital PCR: comparison of EvaGreen- and TaqMan-based chemistries*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2014. **23**(12): p. 2638-42.
92. Nestal de Moraes, G., et al., *Insights into a Critical Role of the FOXO3a-FOXM1 Axis in DNA Damage Response and Genotoxic Drug Resistance*. *Curr Drug Targets*, 2016. **17**(2): p. 164-77.
93. Robb, T., G. Reid, and C. Blenkiron, *Exploiting microRNAs As Cancer Therapeutics*. *Target Oncol*, 2017.
94. Hobel, S. and A. Aigner, *Polyethylenimines for siRNA and miRNA delivery in vivo*. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*, 2013. **5**(5): p. 484-501.
95. Li, S.Q., et al., *MiR-199a/b-3p suppresses migration and invasion of breast cancer cells by downregulating PAK4/MEK/ERK signaling pathway*. *IUBMB Life*, 2015. **67**(10): p. 768-77.
96. Zhao, F. and E.W. Lam, *Role of the forkhead transcription factor FOXO-FOXM1 axis in cancer and drug resistance*. *Front Med*, 2012. **6**(4): p. 376-80.
97. Puche, J.E., Y. Saiman, and S.L. Friedman, *Hepatic stellate cells and liver fibrosis*. *Compr Physiol*, 2013. **3**(4): p. 1473-92.
98. Liu, H., et al., *Transforming Growth Factor beta1 Promotes Migration and Invasion of Human Hepatocellular Carcinoma Cells Via Up-Regulation of Connective Tissue Growth Factor*. *Cell Biochem Biophys*, 2015. **73**(3): p. 775-81.
99. Carthy, J.M., *TGFbeta signaling and the control of myofibroblast differentiation: Implications for chronic inflammatory disorders*. *J Cell Physiol*, 2018. **233**(1): p. 98-106.
100. Sun, Q., et al., *Identification of candidate biomarkers for hepatocellular carcinoma through pre-cancerous expression analysis in an HBx transgenic mouse*. *Cancer Biol Ther*, 2007. **6**(10): p. 1532-8.
101. Yamauchi, N., et al., *The glypican 3 oncofetal protein is a promising diagnostic marker for hepatocellular carcinoma*. *Mod Pathol*, 2005. **18**(12): p. 1591-8.
102. Zhang, J., et al., *Overexpression of glypican-3 is a predictor of poor prognosis in hepatocellular carcinoma: An updated meta-analysis*. *Medicine (Baltimore)*, 2018. **97**(24): p. e11130.
103. Liu, H., et al., *Prognostic significance of glypican-3 expression in hepatocellular carcinoma: A meta-analysis*. *Medicine (Baltimore)*, 2018. **97**(4): p. e9702.
104. Jia, X.Q., et al., *Lentivirus-mediated overexpression of microRNA-199a inhibits cell proliferation of human hepatocellular carcinoma*. *Cell Biochem Biophys*, 2012. **62**(1): p. 237-44.
105. Kasar, S., et al., *Systemic in vivo lentiviral delivery of miR-15a/16 reduces malignancy in the NZB de novo mouse model of chronic lymphocytic leukemia*. *Genes Immun*, 2012. **13**(2): p. 109-19.
106. Liu, Y., et al., *MicroRNA-494 is required for the accumulation and functions of tumor-expanded myeloid-derived suppressor cells via targeting of PTEN*. *J Immunol*, 2012. **188**(11): p. 5500-10.
107. Kota, J., et al., *Therapeutic microRNA delivery suppresses tumorigenesis in a murine liver cancer model*. *Cell*, 2009. **137**(6): p. 1005-17.

108. Pegtel, D.M., et al., *Functional delivery of viral miRNAs via exosomes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(14): p. 6328-33.
109. McCarty, D.M., *Self-complementary AAV vectors; advances and applications*. Mol Ther, 2008. **16**(10): p. 1648-56.
110. Anson, D.S., *The use of retroviral vectors for gene therapy-what are the risks? A review of retroviral pathogenesis and its relevance to retroviral vector-mediated gene delivery*. Genet Vaccines Ther, 2004. **2**(1): p. 9.
111. Nault, J.C., et al., *Recurrent AAV2-related insertional mutagenesis in human hepatocellular carcinomas*. Nat Genet, 2015. **47**(10): p. 1187-93.
112. Trang, P., et al., *Regression of murine lung tumors by the let-7 microRNA*. Oncogene, 2010. **29**(11): p. 1580-7.
113. Pramanik, D., et al., *Restitution of tumor suppressor microRNAs using a systemic nanovector inhibits pancreatic cancer growth in mice*. Mol Cancer Ther, 2011. **10**(8): p. 1470-80.
114. Trang, P., et al., *Systemic delivery of tumor suppressor microRNA mimics using a neutral lipid emulsion inhibits lung tumors in mice*. Mol Ther, 2011. **19**(6): p. 1116-22.
115. Ibrahim, A.F., et al., *MicroRNA replacement therapy for miR-145 and miR-33a is efficacious in a model of colon carcinoma*. Cancer Res, 2011. **71**(15): p. 5214-24.
116. Tanaka, T., et al., *DiC14-amidine cationic liposomes stimulate myeloid dendritic cells through Toll-like receptor 4*. Eur J Immunol, 2008. **38**(5): p. 1351-7.
117. Lonez, C., M. Vandenbranden, and J.M. Ruyschaert, *Cationic liposomal lipids: from gene carriers to cell signaling*. Prog Lipid Res, 2008. **47**(5): p. 340-7.
118. Aliabadi, H.M., et al., *Impact of lipid substitution on assembly and delivery of siRNA by cationic polymers*. Macromol Biosci, 2011. **11**(5): p. 662-72.
119. Boussif, O., et al., *A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(16): p. 7297-301.
120. Chollet, P., et al., *Side-effects of a systemic injection of linear polyethylenimine-DNA complexes*. J Gene Med, 2002. **4**(1): p. 84-91.
121. Troppan, K., et al., *miR-199a and miR-497 Are Associated with Better Overall Survival due to Increased Chemosensitivity in Diffuse Large B-Cell Lymphoma Patients*. Int J Mol Sci, 2015. **16**(8): p. 18077-95.
122. Lawrie, C.H., et al., *Expression of microRNAs in diffuse large B cell lymphoma is associated with immunophenotype, survival and transformation from follicular lymphoma*. J Cell Mol Med, 2009. **13**(7): p. 1248-60.
123. Mascaux, C., et al., *Evolution of microRNA expression during human bronchial squamous carcinogenesis*. Eur Respir J, 2009. **33**(2): p. 352-9.
124. Liu, J., et al., *MiR-199a-3p acts as a tumor suppressor in clear cell renal cell carcinoma*. Pathol Res Pract, 2018. **214**(6): p. 806-813.
125. Katz, S.F., et al., *Disruption of Trp53 in livers of mice induces formation of carcinomas with bilineal differentiation*. Gastroenterology, 2012. **142**(5): p. 1229-1239 e3.
126. Liu, Y., et al., *CRISPR/Cas9-mediated p53 and Pten dual mutation accelerates hepatocarcinogenesis in adult hepatitis B virus transgenic mice*. Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 2796.
127. Shibata, T. and H. Aburatani, *Exploration of liver cancer genomes*. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2014. **11**(6): p. 340-9.
128. Conner, E.A., et al., *Dual functions of E2F-1 in a transgenic mouse model of liver carcinogenesis*. Oncogene, 2000. **19**(44): p. 5054-62.
129. Benyon, R.C. and J.P. Iredale, *Is liver fibrosis reversible?* Gut, 2000. **46**(4): p. 443-6.
130. Bioulac-Sage, P., et al., *[Cirrhosis: forever?]*. Gastroenterol Clin Biol, 2000. **24**(10): p. 877-82.
131. Jimenez, W., et al., *Carbon tetrachloride induced cirrhosis in rats: a useful tool for investigating the pathogenesis of ascites in chronic liver disease*. J Gastroenterol Hepatol, 1992. **7**(1): p. 90-7.
132. Domenicali, M., et al., *A novel sodium overload test predicting ascites decompensation in rats with CCl4-induced cirrhosis*. J Hepatol, 2005. **43**(1): p. 92-7.
133. Lee, T.Y., K.T. Kim, and S.Y. Han, *Expression of ErbB receptor proteins and TGF-alpha during diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis in the rat liver*. Korean J Hepatol, 2007. **13**(1): p. 70-80.
134. Schiffer, E., et al., *Gefitinib, an EGFR inhibitor, prevents hepatocellular carcinoma development in the rat liver with cirrhosis*. Hepatology, 2005. **41**(2): p. 307-14.

135. Chang, Y.S., et al., *Sorafenib (BAY 43-9006) inhibits tumor growth and vascularization and induces tumor apoptosis and hypoxia in RCC xenograft models*. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2007. **59**(5): p. 561-74.
136. Wilhelm, S.M., et al., *BAY 43-9006 exhibits broad spectrum oral antitumor activity and targets the RAF/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis*. *Cancer Res*, 2004. **64**(19): p. 7099-109.
137. Guan, J., et al., *MicroRNA-199a-3p inhibits tumorigenesis of hepatocellular carcinoma cells by targeting ZHX1/PUMA signal*. *Am J Transl Res*, 2017. **9**(5): p. 2457-2465.
138. Su, H., et al., *MicroRNA-101, down-regulated in hepatocellular carcinoma, promotes apoptosis and suppresses tumorigenicity*. *Cancer Res*, 2009. **69**(3): p. 1135-42.
139. Hsu, S.H., et al., *Essential metabolic, anti-inflammatory, and anti-tumorigenic functions of miR-122 in liver*. *J Clin Invest*, 2012. **122**(8): p. 2871-83.
140. 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.
141. Xue, H.Y., et al., *Gold nanoparticles delivered miR-375 for treatment of hepatocellular carcinoma*. *Oncotarget*, 2016. **7**(52): p. 86675-86686.
142. Liu, Y.M., et al., *Cholesterol-conjugated let-7a mimics: antitumor efficacy on hepatocellular carcinoma in vitro and in a preclinical orthotopic xenograft model of systemic therapy*. *BMC Cancer*, 2014. **14**: p. 889.
143. Friedman, S.L., et al., *A randomized, placebo-controlled trial of cenicriviroc for treatment of nonalcoholic steatohepatitis with fibrosis*. *Hepatology*, 2018. **67**(5): p. 1754-1767.
144. Ratzliff, V., et al., *Elafibranor, an Agonist of the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-alpha and -delta, Induces Resolution of Nonalcoholic Steatohepatitis Without Fibrosis Worsening*. *Gastroenterology*, 2016. **150**(5): p. 1147-1159 e5.
145. Kumar, R., et al., *Structure, biochemistry, and biology of PAK kinases*. *Gene*, 2017. **605**: p. 20-31.
146. Kumar, R. and D.Q. Li, *PAKs in Human Cancer Progression: From Inception to Cancer Therapeutic to Future Oncobiology*. *Adv Cancer Res*, 2016. **130**: p. 137-209.
147. Liu, Y., et al., *The pak4 protein kinase plays a key role in cell survival and tumorigenesis in athymic mice*. *Mol Cancer Res*, 2008. **6**(7): p. 1215-24.
148. Menzel, N., et al., *The Drosophila p21-activated kinase Mbt modulates DE-cadherin-mediated cell adhesion by phosphorylation of Armadillo*. *Biochem J*, 2008. **416**(2): p. 231-41.
149. Ahn, H.K., et al., *P21-activated kinase 4 overexpression in metastatic gastric cancer patients*. *Transl Oncol*, 2011. **4**(6): p. 345-9.
150. Kimmelman, A.C., et al., *Genomic alterations link Rho family of GTPases to the highly invasive phenotype of pancreas cancer*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. **105**(49): p. 19372-7.
151. Callow, M.G., et al., *Requirement for PAK4 in the anchorage-independent growth of human cancer cell lines*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(1): p. 550-8.
152. Davis, S.J., et al., *Functional analysis of genes in regions commonly amplified in high-grade serous and endometrioid ovarian cancer*. *Clin Cancer Res*, 2013. **19**(6): p. 1411-21.
153. Greenman, C., et al., *Patterns of somatic mutation in human cancer genomes*. *Nature*, 2007. **446**(7132): p. 153-8.
154. Whale, A.D., et al., *PAK4 kinase activity and somatic mutation promote carcinoma cell motility and influence inhibitor sensitivity*. *Oncogene*, 2013. **32**(16): p. 2114-20.
155. Parsons, D.W., et al., *Colorectal cancer: mutations in a signalling pathway*. *Nature*, 2005. **436**(7052): p. 792.
156. Paliouras, G.N., M.A. Naujokas, and M. Park, *Pak4, a novel Gab1 binding partner, modulates cell migration and invasion by the Met receptor*. *Mol Cell Biol*, 2009. **29**(11): p. 3018-32.
157. Aspenstrom, P., A. Fransson, and J. Saras, *Rho GTPases have diverse effects on the organization of the actin filament system*. *Biochem J*, 2004. **377**(Pt 2): p. 327-37.
158. Tyagi, N., et al., *p-21 activated kinase 4 promotes proliferation and survival of pancreatic cancer cells through AKT- and ERK-dependent activation of NF-kappaB pathway*. *Oncotarget*, 2014. **5**(18): p. 8778-89.
159. Wells, C.M., A. Abo, and A.J. Ridley, *PAK4 is activated via PI3K in HGF-stimulated epithelial cells*. *J Cell Sci*, 2002. **115**(Pt 20): p. 3947-56.
160. Tyagi, N., et al., *p-21 activated kinase 4 (PAK4) maintains stem cell-like phenotypes in pancreatic cancer cells through activation of STAT3 signaling*. *Cancer Lett*, 2016. **370**(2): p. 260-7.

161. Alavi, A., et al., *Role of Raf in vascular protection from distinct apoptotic stimuli*. Science, 2003. **301**(5629): p. 94-6.
162. Radu, M., et al., *PAK signalling during the development and progression of cancer*. Nat Rev Cancer, 2014. **14**(1): p. 13-25.
163. Dart, A.E. and C.M. Wells, *P21-activated kinase 4--not just one of the PAK*. Eur J Cell Biol, 2013. **92**(4-5): p. 129-38.
164. Alayev, A. and M.K. Holz, *mTOR signaling for biological control and cancer*. J Cell Physiol, 2013. **228**(8): p. 1658-64.
165. Bhat, M., N. Sonenberg, and G.J. Gores, *The mTOR pathway in hepatic malignancies*. Hepatology, 2013. **58**(2): p. 810-8.
166. Malley, C.O. and G.P. Pidgeon, *The mTOR pathway in obesity driven gastrointestinal cancers: Potential targets and clinical trials*. BBA Clin, 2016. **5**: p. 29-40.
167. Villanueva, A., et al., *Pivotal role of mTOR signaling in hepatocellular carcinoma*. Gastroenterology, 2008. **135**(6): p. 1972-83, 1983 e1-11.
168. Watanabe, S., Y. Horie, and A. Suzuki, *Hepatocyte-specific Pten-deficient mice as a novel model for nonalcoholic steatohepatitis and hepatocellular carcinoma*. Hepatol Res, 2005. **33**(2): p. 161-6.
169. Copp, J., G. Manning, and T. Hunter, *TORC-specific phosphorylation of mammalian target of rapamycin (mTOR): phospho-Ser2481 is a marker for intact mTOR signaling complex 2*. Cancer Res, 2009. **69**(5): p. 1821-7.
170. Gusarova, G.A., et al., *A cell-penetrating ARF peptide inhibitor of FoxM1 in mouse hepatocellular carcinoma treatment*. J Clin Invest, 2007. **117**(1): p. 99-111.
171. Weiler, S.M.E., et al., *Induction of Chromosome Instability by Activation of Yes-Associated Protein and Forkhead Box M1 in Liver Cancer*. Gastroenterology, 2017. **152**(8): p. 2037-2051 e22.
172. Song, B.N. and I.S. Chu, *A gene expression signature of FOXM1 predicts the prognosis of hepatocellular carcinoma*. Exp Mol Med, 2018. **50**(1): p. e418.
173. Laoukili, J., et al., *FoxM1 is required for execution of the mitotic programme and chromosome stability*. Nat Cell Biol, 2005. **7**(2): p. 126-36.
174. Chai, N., et al., *FOXM1 promotes proliferation in human hepatocellular carcinoma cells by transcriptional activation of CCNB1*. Biochem Biophys Res Commun, 2018. **500**(4): p. 924-929.
175. Montalbano, M., et al., *Biology and function of glypican-3 as a candidate for early cancerous transformation of hepatocytes in hepatocellular carcinoma (Review)*. Oncol Rep, 2017. **37**(3): p. 1291-1300.
176. Martelli, A.M., F. Buontempo, and J.A. McCubrey, *Drug discovery targeting the mTOR pathway*. Clin Sci (Lond), 2018. **132**(5): p. 543-568.
177. Motzer, R.J., et al., *Efficacy of everolimus in advanced renal cell carcinoma: a double-blind, randomised, placebo-controlled phase III trial*. Lancet, 2008. **372**(9637): p. 449-56.
178. Andre, F., et al., *Everolimus for women with trastuzumab-resistant, HER2-positive, advanced breast cancer (BOLERO-3): a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 3 trial*. Lancet Oncol, 2014. **15**(6): p. 580-91.
179. Pavel, M., et al., *Safety and QOL in Patients with Advanced NET in a Phase 3b Expanded Access Study of Everolimus*. Target Oncol, 2016. **11**(5): p. 667-675.
180. clinicaltrials.gov. *clinicaltrials.gov*. Available from: <https://clinicaltrials.gov/>.