

ALMA MATER STUDIORUM - UNIVERSITA' DI BOLOGNA

FACOLTA' DI SCIENZE MATEMATICHE FISICHE E NATURALI

Corso di Laurea Magistrale in Biologia Molecolare e Cellulare

**RUOLO DEL SORAFENIB NELLA
PREVENZIONE DELL'EPATOCARCINOMA
IN UN MODELLO SPERIMENTALE DI
RATTO**

Relatore:

Prof. Luigi Bolondi

Candidato:

Stefania D'Adamo

Correlatore:

Dott.sa Catia Giovannini

Anno Accademico 2010 – 2011

Sessione III

INDICE

1. INTRODUZIONE	7
1.1 Il Fegato	7
1.2 Epidemiologia	8
1.3 Eziologia	11
1.3.1 HBV	11
1.3.2 HCV	13
1.3.3 AFB1	14
1.4 Epatiti Croniche e Cirrosi	15
1.5 Stress Ossidativo e Sistema Antiossidante.....	16
1.6 Infiammazione e Stress Ossidativo nelle Lesioni Pre-Neoplastiche.....	19
1.7 Epatocarcinogenesi	21
1.8 Epatocarcinogenesi nello Stadio Cirrotico.....	21
1.8 Trattamento dell'Epatocarcinoma.....	23
1.9 Target Molecolari nel Trattamento dell'HCC.....	25
1.10 SORAFENIB	28
1.10.1 Target del Sorafenib	29
1.10.2 pERK Come Potenziale Predittore della Risposta al Sorafenib	31
1.11 Trattamenti di Prevenzione delle Recidive dell'Epatocarcinoma	33
1.12 Modelli Sperimentali per lo Studio dell'HCC.	33
1.13.1 Dietilnitrosamina, come Carcinogeno Epatico	36
1.13.2 Conclusioni Dietilnitrosamina	39
2. SCOPO DELLA TESI.....	40
3. MATERIALI E METODI	42
4. RISULTATI	53
5. DISCUSSIONE	56
6. APPENDICE	61
7. BIBLIOGRAFIA	70

RIASSUNTO

Il carcinoma epatocellulare (HCC) è la forma di cancro più diffusa che colpisce il fegato. La mancanza iniziale di sintomi non permette una diagnosi precoce e per tale motivo il tasso d'incidenza si sovrappone quasi interamente al tasso di mortalità. Negli ultimi 20 anni le tecniche chirurgiche di ultima generazione e i trattamenti pre-operatori hanno portato ad una diminuzione delle morti (nei 30 giorni dopo l'intervento) del 2,5%. Nonostante tale miglioramento, l'epatectomia curativa dell'epatocarcinoma cellulare non viene considerato un approccio totalmente soddisfacente, rispetto agli altri tumori solidi, a causa dell'alta incidenza delle recidive intraepatiche. Si è riscontrato un tasso di ricorrenza, all'interno dei 5 anni post-operatori, del 61,5%⁷⁹. Per tale motivo si sta cercando di potenziare le opportunità di sopravvivenza di tale approccio, associando dei trattamenti di prevenzione.

Il nostro studio è stato proposto per valutare il potenziale utilizzo del sorafenib come terapia adiuvante in seguito alla resezione dell'HCC, mediante l'uso di un modello sperimentale di ratto. Inoltre sorafenib ha mostrato un'azione antifibrotica, inibendo l'accumulo di materiale della matrice extracellulare⁸⁴ e, dunque, potrebbe essere identificato anche come terapia di prevenzione dell'HCC in pazienti affetti da cirrosi.

La scelta del modello in vivo si è basata sulle similitudini anatomiche e fisiologiche del fegato di ratto con quello umano e su alcuni pathway comuni implicati nei meccanismi predisponenti l'HCC, come infiammazione cronica e stress metabolico, ossidativo e nitrosativo. . Tra i vari modelli di induzione chimica dell'epatocarcinogenesi, la decisione di utilizzare la dietilnitrosamina (DENa), come carcinogeno, è stata presa sulla base della condizione pre-neoplastica che si è voluta 'ricreare'.

Per valutare se il sorafenib esibisse, oltre alla sua funzione antitumorale, ampiamente descritta in letteratura, anche una funzione epatoprotettiva nella prevenzione dell'HCC, sono stati divisi in due gruppi, i ratti esposti precedentemente alla DENa. Un gruppo è stato trattato con il sorafenib, mentre un gruppo di controllo con il veicolo.

Tramite analisi di Real Time-PCR, di Western Blot e di Immunoistochimica, risulta che il sorafenib mostra un'attività anti-proliferativa, anti-angiogenica e anti-apoptotica. Inoltre attraverso il rafforzamento della difesa anti-ossidativa, di cui la cellula è dotata in maniera

endogena, sorafenib agisce contro lo stress metabolico e contro lo stato infiammatorio, condizioni scatenanti l'insorgenza dell'epatocarcinoma.

1. INTRODUZIONE

1.1 Il Fegato

Il fegato è un organo impari situato a destra nell'addome, nell'ipocondrio destro. La struttura interna è costituita da unità funzionalmente autonome, i lobuli. Al centro di ogni lobulo scorre la vena centro lobulare, circondata dagli epatociti, disposti radialmente in colonne ordinate, interconnessi da spazi sinusoidali, attraverso i quali scorre il sangue delle vene interlobulari verso la vena centro lobulare. L'ilo epatico contiene le principali strutture vascolari del fegato:

- ✓ l'arteria epatica, che porta sangue ossigenato dall'aorta;
- ✓ la vena porta, che origina dalla confluenza della vena splenica (proveniente dalla milza) e dalla vena mesenterica superiore (proveniente dall'intestino);
- ✓ la via biliare, che origina dai canalicoli biliari, che si interpongono tra le colonne del lobulo, e porta la bile prodotta dal fegato all'intestino e che esplica la funzione esocrina della ghiandola.

Sulla superficie posteriore scorre la vena cava inferiore, il cui sangue proviene da arti inferiori e reni.

Nel fegato sono presenti 4 tipologie di popolazioni cellulari: gli epatociti, che rappresentano il 60% in numero e l'80% in volume del fegato; **le cellule stellate, di origine mesenchimale, fondamentali per la rigenerazione epatica, perché secernono fattori di crescita;** le cellule endoteliali sinusoidali, che costituiscono l'endotelio, caratterizzato da fenestrature molto ampie, tali da permettere agli epatociti il diretto contatto col sangue; le cellule di Kupffer, rappresentano i macrofagi del fegato, il cui compito è anche quello di secernere citochine e di stimolare il sistema immunitario.

Le funzioni dell'organo vengono espletate dalle cellule predominanti, ossia gli epatociti. Il fegato ha il compito di produrre la bile, che viene riversata nell'intestino per la digestione e l'emulsione dei grassi. Svolge funzioni nel metabolismo di carboidrati (gluconeogenesi, glicogenolisi e glicogenosintesi), nel metabolismo proteico (transaminazione e deaminazione degli amminoacidi, conversione di ammoniaca in urea) e nel metabolismo lipidico. Il fegato è responsabile della sintesi del fibrinogeno, dell'albumina, della protrombina, dei fattori VII IX

e XI della coagulazione, della transferrina e di altre proteine. Gli epatociti sono anche responsabili della detossificazione del sangue, attraverso complessi enzimatici o attraverso l'assorbimento di sostanze tossiche, che verranno rilasciate ed eliminate nell'intestino insieme alla bile.

1.2 Epidemiologia

L'epatocarcinoma umano (HCC) è il tumore epatico più comune e, rappresenta il 90% tra i tumori epatici primitivi. La distribuzione non risulta omogenea, ma dipendente dall'età, dal sesso, dalla regione geografica e dall'etnia. Se per gli uomini è la quinta forma di cancro più comune, con 523.000 casi, per le donne è la settima, con 226.000 casi (stimati nel 2008, GLOBOCAN-IARC)¹. Il tasso d'incidenza appare maggiormente elevato in determinate regioni, per lo più in paesi in via di sviluppo, quali l'Africa Sub-Sahariana e il Sud-Est asiatico. Solo in Cina si conta circa il 50% dei casi mondiali. Nonostante venga riscontrato principalmente in queste zone, la sua incidenza sta crescendo vertiginosamente nei paesi occidentali, come gli Stati Uniti d'America, e industrializzati, come il Giappone. Questa crescita si pensa sia associata all'aumento di specifici fattori di rischio, quali infezioni da epatite di tipo C e di tipo B, assunzione cronica di alcohol e obesità².

Età

Questo tipo di cancro risulta raro prima dei 40 anni, raggiungendo il massimo picco intorno ai 70 anni. La variabilità della patologia in relazione all'età d'insorgenza è dovuta alla diversa distribuzione geografica: in Qidong (China) il tasso d'incidenza nei maschi raggiunge il picco a 45 anni. Questo può essere dovuto ad una eterogeneità dei fattori di rischio nel globo terrestre. Ad esempio, la maggior parte dei portatori di HCV risulta infetto in tarda età, mentre la maggior parte dei portatori di HBV risulta infetto in età giovane.³

Sesso

L'HCC viene manifestato con un tasso maggiore dai maschi rispetto alle femmine, in particolar modo tale differenza si evidenzia nelle aree con medio-alta incidenza della patologia. Risulta più equamente distribuita tra i sessi nelle regioni meno colpite. Il possibile ruolo degli ormoni sessuali nell'epatocarcinogenesi può spiegare, per lo meno in parte, la variabilità d'incidenza relativa al sesso³.

Etnia

Il tasso di incidenza varia tra popolazioni con diversa etnia che vivono nella medesima regione, ad esempio popolazioni di etnia cinese che vivono a Singapore hanno un tasso d'insorgenza del tumore maggiore rispetto alle popolazioni di etnia indiana della stessa regione³.

LIVER CANCER INCIDENCE, MORTALITY AND PREVALENCE WORLDWIDE IN 2008¹

Estimated (thousands)	numbers	Men			Women			Both sexes		
		Cases	Deaths	5- year prev.	Cases	Deaths	5- year prev.	Cases	Deaths	5- year prev.
World		523	478	433	226	217	180	749	695	613
More developed regions		82	75	107	40	39	50	122	114	157
Less developed regions		440	402	325	185	177	129	625	579	454
WHO Africa region (AFRO)		29	28	19	15	14	10	44	42	29
WHO Americas region (PAHO)		31	28	26	20	21	16	51	49	42
WHO East Mediterranean region (EMRO)		9	9	5	4	3	2	13	12	7
WHO Europe region (EURO)		43	42	39	22	24	19	65	66	58
WHO South-East Asia region (SEARO)		46	42	27	21	20	12	67	62	39
WHO Western Pacific region (WPRO)		363	327	313	141	133	118	504	460	431
IARC membership (22 countries)		101	88	121	45	42	53	146	130	174
United States of America		15	12	14	6	5	5	21	17	19
China		292	266	219	109	105	76	401	371	295
India		14	12	6	5	5	2	19	17	8
European Union (EU-27)		32	30	30	15	16	13	47	46	43

INCIDENCE OF LIVER CANCER.

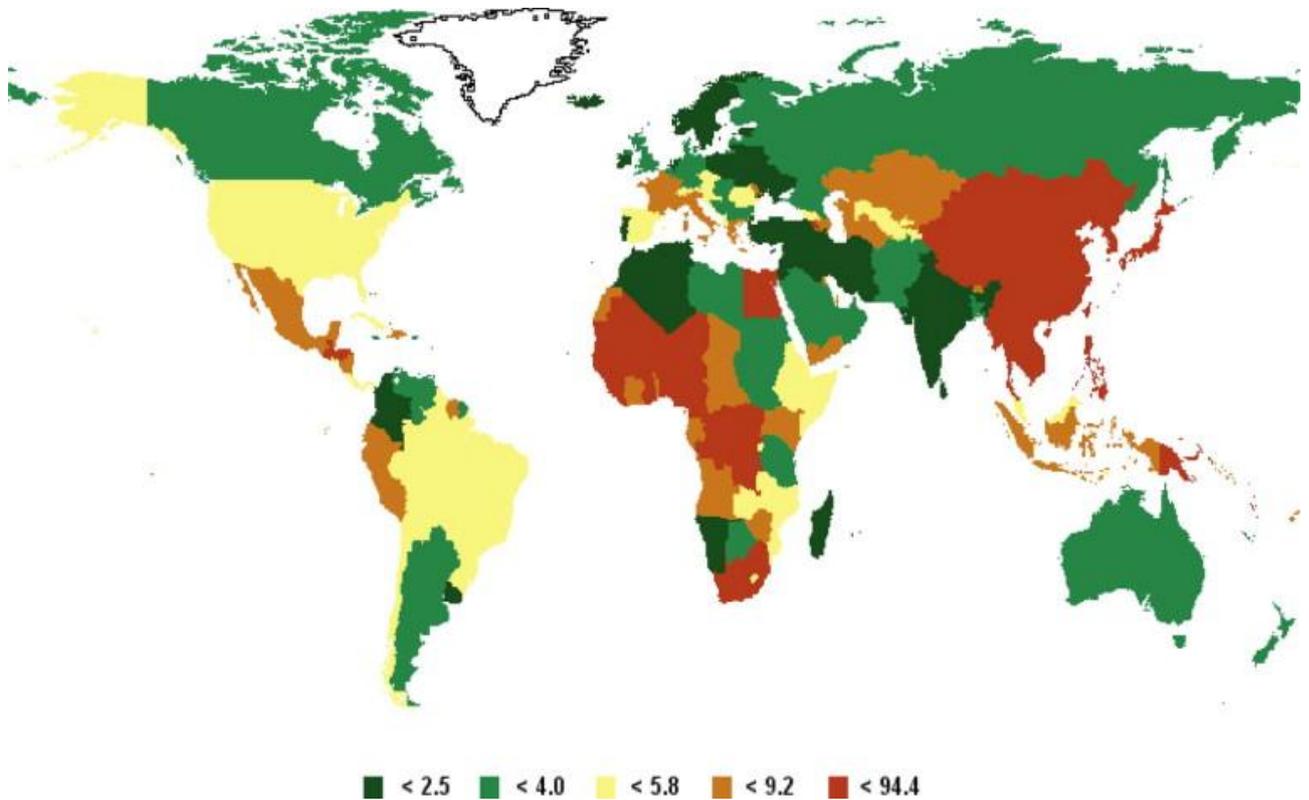


Fig 1.: Tasso di incidenza del cancro primario del fegato. Stima del 2008.

(Da Ferlay J, et al. GLOBOCAN 2008 Cancer Incidence and Mortality Worldwide, IARC Cancer Base No.10. Lyon, International Agency for Research on Cancer; 2010. Available from <http://globocan.iarc.fr>.¹⁾)

1.3 Eziologia

I maggiori fattori di rischio dell'HCC includono le infezioni da HBV o HCV o da entrambi, abuso d'alcohol e NAFLD (nonalcoholic fatty liver disease), nonché l'esposizione all'aflatossina B1. Le cause meno comuni includono l'emocromatosi ereditaria, la deficienza dell'alfa1-antitripsina, la porfiria e la malattia di Wilson ².

L'epatocarcinoma cellulare, dunque, è una patologia, dal punto di vista eziologico, multifattoriale e dipendente dalla regione geografica.

La maggior parte dei fattori di rischio inducono la formazione e lo sviluppo del tessuto cirrotico, che si presenta nell'80-90% dei pazienti con HCC ⁴.

1.3.1 HBV

Si stima che nel mondo ci siano circa 350 milioni di persone infettate cronicamente dal virus dell'epatite B, e di questi il 50% risulta affetto da HCC.

Il virus dell'epatite di tipo B appartiene alla famiglia *Hepadnaviridae*, dotato di un genoma circolare costituito da DNA solo parzialmente a doppio filamento di 3200 basi, capace di integrarsi nel genoma ospite. Il DNA virale è stato isolato da epatociti sia infetti che neoplastici, esercitando il suo potenziale cancerogenico, tramite la probabile inserzione all'interno o in prossimità di oncogeni o di oncosoppressori (p53, Rb, cyclin D1 e p16). L'integrazione del genoma virale sembra indurre processi di instabilità cromosomica, quali delezioni, duplicazioni e traslocazioni di regioni cromosomiche, spesso associati al fenotipo tumorale.⁶

Inoltre, evidenze sperimentali hanno confermato l'azione oncogenica delle proteine virali, mediante meccanismi di transattivazione.

Il genoma, associato alla proteina P (polymerase), per il meccanismo di replicazione, è racchiuso in un core, da cui gli antigeni HBcAg e HBeAg. Per diagnosticare l'infezione viene però valutata la positività all'antigene HBsAg, proteina contenuta nell'envelope e secreto dal virus nel siero dell'ospite.

Il rischio dell'instaurarsi dell'HCC aumenta nei pazienti con alti livelli di DNA virale, con positività all'HBeAg, ma negatività all'antigene di superficie HBsAg ⁷.

Un altro antigene importante dal punto di vista patologico è la proteina non strutturale X di 16,5 KDa, che è indicata come chiave multifunzionale dello sviluppo del cancro al fegato.

Il prodotto del gene X di HBV può indurre la trasformazione di cellule in vitro e in vivo ¹⁴, in seguito ad integrazione nel cromosoma ospite nonostante l'assenza di altri geni virali ⁹. Tale proteina riesce a mantenere la sua funzione di transattivatore, anche nella sua forma mutata/troncata ¹⁶.

L'espressione del prodotto genico HBx provoca la diminuzione dei livelli endogeni di NICD1 (Notch Intra-Cellular Domain 1) negli epatociti neoplastici e di conseguenza la mancata regolazione trascrizionale dei geni target a valle. Questi ultimi risultati sembrano essere dovuti ad una riduzione del cleavage di Notch1, causata dalla soppressione della trascrizione del gene della presenilina 1 (componente del complesso delle γ -secretasi) piuttosto che dalla trascrizione di Notch 1 o dei suoi ligandi. La disfunzione del pathway di Notch 1 sembra dunque indurre un'aumentata proliferazione cellulare e una progressione del ciclo cellulare in fase S, diminuendo l'entrata in senescenza (fase G0) ⁸.

HBx esercita, dunque, il suo ruolo di transattivatore trascrizionale non solo a livello dei geni virali ma anche cellulari, di oncogeni ad esempio, come c-myc, c-Fos e c-Jun. La sua azione non consiste in un legame diretto al DNA, ma indiretto, attraverso interazione con fattori trascrizionali o altre proteine regolatorie ⁹. In letteratura risulta che HBx influenzi la fisiologia dell'epatocita modulando alcuni pathway di trasduzione del segnale, agendo su determinati target, quali la protein kinase C ¹⁰, JAK/STAT ¹¹, Src ¹² e il pathway di Ras ¹³.

La proteina X esercita il suo ruolo carcinogenico andando a sopprimere l'attività del tumor suppressor p53, non solo a livello trascrizionale, ma anche mediante un'interazione diretta proteina-proteina ¹⁷. È stato infatti dimostrato che HBx è in grado di sequestrare a livello citoplasmatico p53, prevenendo il suo ingresso nel nucleo e bloccando, dunque, la sua attività trascrizionale ²⁰. Questo ha effetto sui target a valle, come ad esempio p21^{Waf1/Cip1} inibitore universale dei complessi cdk/cicline e dunque promotore dell'arresto del ciclo in fase G1. Inoltre, è capace di distruggere le interazioni tra p53 e gli altri fattori coinvolti nel pathway di morte cellulare programmata ¹⁹.

Sembra dunque che l'infezione da HBV sia il maggior fattore predisponente l'insorgenza dell'HCC, rischio che aumenta considerevolmente se addizionato ad altri fattori, quali il sesso, l'età, la lunga incubazione del virus, la storia familiare, l'esposizione all'aflatossina, assunzione di alcohol e tabacco e soprattutto la coinfezione con l'HCV o con l'HIV.

1.3.2 HCV

Si stima che circa 170 milioni di persone al mondo sono infette dal virus dell'epatite C e il rischio di sviluppare il tumore al fegato per i pazienti infetti si aggira tra l'1% e il 3%². Anche se il numero dei casi di infezione sono minori rispetto all'HBV, la cronicità risulta più elevata, dell'85% sul totale.

La necrosi degli epatociti in seguito allo stato cronico di infiammazione ha come conseguenza la rigenerazione del tessuto, che porta ad un accumulo di mutazioni che possono culminare nello sviluppo dell'HCC. Questa sequenza di eventi sembra essere causata indirettamente dall'infezione da HCV attraverso l'induzione di uno stato infiammatorio epatico, così come anche gli altri virus epatitici²².

L'HCV è un virus appartenente alla famiglia *Flaviviridae* del genere *Hepacivirus* dotato di un genoma a RNA a singolo filamento di 9600 basi. Dalla poliproteina precursore di 3000 amminoacidi si originano, tramite clivazione, proteine strutturali (core, envelope 1, 2) e non strutturali (NS₁, NS₃, NS₄, NS₅), tra cui l'RNA polimerasi in grado di produrre il filamento negativo, che costituirà il templatato su cui produrre i genomi dei virioni nascenti²³.

A differenza dell'HBV il DNA virale non si integra nel genoma dell'ospite perché privo della trascrittasi inversa.

Alcuni studi attribuiscono la funzione oncogenica dell'HCV all'azione diretta delle proteine virali. Attraverso l'utilizzo di topi transgenici, esperimenti separatamente proteine dell'envelope, del core e le non strutturali, è stato confermato che lo sviluppo del tumore epatico avviene in seguito all'espressione della Core protein²⁴.

La proteina del Core (circa 21 kDa) si localizza a livello citoplasmatico, nucleare e mitocondriale, causando una condizione di stress ossidativo, con produzione delle specie reattive dell'ossigeno (ROS), anche in assenza di infiammazione del tessuto²⁵.

Gli altri possibili pathway modulati da tale proteina coinvolgono prodotti di geni coinvolti nella segnalazione intracellulare: il tumor necrosis factor (TNF)- α e l'interleuchina-1 β , che risultano trascrizionalmente attivati²⁶; il retinoid X receptor (RXR)- α ²⁷; la cascata JNK-p38-ERK, coinvolta nella proliferazione cellulare, che risulta attivata²⁸. Target più a valle subiscono una maggiore attivazione, quali CDK4 e ciclinaD1, oltre al tumor suppressor SOCS-1 (suppressor of cytokine signaling-1).

La Core protein sembra dunque svolgere un ruolo importante nell'epatocarcinogenesi in seguito all'infezione da HCV, attraverso la stimolazione della crescita cellulare e dello stato d'infiammazione.

La proteina RB (Retinoblastoma tumor suppressor protein) risulta down-regolata negli epatociti ospitanti il virus dell'epatite C, il che promuove la progressione del ciclo cellulare nel checkpoint G1-S, attivando il pathway di sintesi del DNA richiesto per la replicazione del genoma virale. Questo evento è dovuto all'RNA polimerasi virale (NS5B), che forma nel citoplasma un complesso con RB, con conseguente reclutamento della proteina associata E6 (E6AP), sua ubiquitinazione e distruzione proteosomale^{29,30}.

Anche le funzioni di p53 risultano compromesse dall'infezione virale, condizione che sembra imputabile ad un'interazione diretta della proteina cellulare con la proteina del Core e altre proteine non-strutturali, oppure ad una modulazione a livello trascrizionale³¹.

È stato dimostrato che la proteina NS5A può regolare il pathway Wnt in maniera indiretta, attraverso l'interazione con la subunità regolatoria p85 di P3K, con conseguente attivazione della subunità catalitica p110. Ciò risulta nell'attivazione di AKT, che inattiva GSK-3 β , fosforilandolo. Quest'ultima proteina agisce in un complesso multiproteico, che ha il compito di portare a degradazione β -catenina. Dunque, l'azione di NS5A porta alla stabilizzazione di β -catenina, che trasloca nel nucleo andando a promuovere la trascrizione di geni coinvolti nella cancerogenesi³². Recenti studi hanno suggerito una possibile interazione diretta tra NS5A e β -catenina³³.

Richiedono ulteriori approfondimenti degli studi che ipotizzano il coinvolgimento del mir-122, altamente espresso nel tumore al fegato, nel processo di amplificazione del genoma virale dell'HCV. Nel 2010 il team di Lanford conducendo studi su chimpanzè ha ottenuto la soppressione della replicazione del genoma virale, mediante silenziamento terapeutico del mir-122³⁴. Altri, invece, smentiscono la totale dipendenza del virus da tale mir³⁵.

1.3.3 AFB1

L'aflatossina B1 è un metabolita secondario prodotto dall'*Aspergillus flavus*, fungo che contamina riso, cereali e derrate alimentari, quando vengono conservate in condizioni di eccessiva umidità, ad esempio in regioni tropicali e subtropicali³. Il nostro organismo quando entra in contatto con la micotossina, attraverso il citocromo p450 la metabolizza, ossidandola nella forma epossida AFB1 exo-8,9. Questa forma risulta tossica, perché in grado di indurre mutazioni nel gene di p53. In genere si tratta di una trasversione GC \rightarrow TA, che avviene in genere a livello di un "hotspot", localizzato a livello del codone 249 del gene, che comporta una sostituzione amminoacidica Arg \rightarrow Ser. Tale mutazione è stata riscontrata nel 50% dei

casi di HCC in Africa meridionale, dove l'AFB1 è stata correlata con un alto tasso all'HCC
36,37,38

1.4 Epatiti Croniche e Cirrosi

L'epatite cronica è una patologia che colpisce il fegato ed è caratterizzata da un prolungato e sostenuto stato d'infiammazione e di necrosi tissutale. Le cause più comuni sono le infezioni virali da HBV e/o da HCV.

Le caratteristiche delle epatiti sono: infiltrato infiammatorio intra-portale, danno degli epatociti della lamina limitante, prevalentemente morte per apoptosi o per necrosi litica, infiltrato infiammatorio intra-lobulare. Le popolazioni dell'infiltrato sono composte da linfociti, plasmociti e in minima parte da cellule polimorfonucleate; le proporzioni dipendono dall'agente eziologico. Le lesioni interne avvengono per necrosi. La deposizione continua di collagene e di ulteriori componenti della matrice extracellulare induce un'espansione del tessuto fibrotico a formare un ponte tra spazi portali stessi o tra questi e la vena centro-lobulare, fino a isolare gli epatociti in piccoli cluster. A questo punto la patologia può evolvere allo stadio di cirrosi, con modificazione dell'architettura lobulare, in cui il tessuto fibrotico delimita noduli in rigenerazione.

Le caratteristiche morfologiche chiave della cirrosi includono: fibrosi diffusa, noduli rigenerativi, architettura lobulare alterata e stabilimento di shunt vascolari intraepatici tra vasi afferenti (vena portale e arteria epatica) e vasi efferenti (vena epatica). Queste deviazioni sono indotti dai setti fibrosi vascolarizzati. Altre caratteristiche sono la capillarizzazione dei sinusoidi, la fibrosi perisinusoidale, trombosi vascolare, lesioni portali, perfusione del parenchima e conseguente ipossia del tessuto epatocitico. Queste condizioni inducono lo sviluppo di ipertensione portale.

Le strutture vascolari dei tessuti cirrotici derivano o da sinusoidi che persistono nell'area post-necrotica del connettivo o da meccanismi angiogenetici patologici. In quest'ultimo caso, uno dei pathway implicati è caratterizzato dall'overespressione di fattori di crescita, citochine e metalloproteinasi (MMPs). In particolare il platelet-derived growth factor (PDGF), il transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1), il fibroblast growth factor (FGF), il vascular endothelial growth factor (VEGF) promuovono direttamente la fibrogenesi e l'angiogenesi. Un altro meccanismo che stimola la neo-angiogenesi nel tessuto cirrotico è il progressivo aumento dell'ipossia tissutale. Questa è causata indirettamente dalle modificazioni

dell'anatomia del fegato: la fibrosi periportale induce un aumento del contributo da parte dell'arteria epatica al sangue sinusoidale, che, con maggiori concentrazioni di Ossigeno, porta ad una capillarizzazione dei sinusoidi come risposta e, di conseguenza, ad uno stato di ipossia degli epatociti. Praticamente in presenza di un danno del tessuto parenchimatoso persistente, ipossia e fibrosi aggravano reciprocamente il loro stato ³⁹.

1.5 Stress Ossidativo e Sistema Antiossidante

Per stress metabolico si intende sia lo stress ossidativo che nitrosativo e si ha quando la cellula non è più in grado di neutralizzare ed eliminare l'eccesso di molecole altamente reattive, i radicali liberi, derivati dall'ossigeno e dall'azoto, rispettivamente ROS (reactive-oxygen species - come l'anione superossido O_2^- , il perossido d'idrogeno H_2O_2 e il gruppo ossidrilico OH) e RNS (reactive-nitrogen species - come l'ossido nitrico NO, il perossinitrito $ONOO^-$ e l'S-nitrosotioolo SNO).

Queste molecole, altamente reattive e diffusibili, possono agire direttamente e indirettamente nel provocare le alterazioni, attraverso perossidazione dei fosfolipidi di membrana e ossidazioni del DNA e di proteine, strutturali e non, della cellula. Inoltre, sembra che ROS e RNS siano in grado di reclutare le cellule infiammatorie in una seconda ondata, amplificando il danno verso la progressione al cancro.

Le fonti principali dei radicali liberi sono mitocondri, perossisomi e citocromo P450, e vengono prodotte in maniera endogena, in condizioni fisiologiche perché componenti del signaling del metabolismo, del ciclo cellulare e della trasduzione intracellulare. L'equilibrio tra produzione e distruzione di tali specie reattive riflette l'equilibrio fragile tra il fisiologico e il patologico. Tale bilancio viene regolato da enzimi, quali superossido dismutasi (SOD), catalasi (CAT), glutazione perossidasi (GPx) e glutazione S-transferasi, appartenenti al sistema antiossidante.

Esistono tre distinte isoforme di SOD, identificate e caratterizzate nei mammiferi: SOD/Rame e Zinco, codificata dal gene Sod-1, SOD/Manganese, codificata dal gene Sod-2 e la SOD extracellulare, codificata dal gene Sod-3. Queste isoforme esplicano simili funzioni e a distinguerle sono caratteristiche strutturali della proteina, localizzazione cromosomica, diversi cofattori metallici, distribuzione genica e compartimentalizzazione cellulare. Il gene Sod-2, a differenza degli altri due, non condivide omologia amminoacidica. La regolazione genica

gioca un ruolo fondamentale nel bilancio della concentrazione delle ROS. La compartimentalizzazione e il controllo delle SOD sia a livello di espressione che di attività contribuisce al livello dell'enzima e di conseguenza al livello delle ROS e della loro localizzazione.

La diversa regolazione trascrizionale a livello dei 3 geni dipende dalla variabilità costitutiva delle regioni promotoriali. Il promotore del gene Sod-1 è provvisto di una regione ricca in GC, una TATA box e una CCAAT box. Il gene Sod-2 manca di una TATA box e di una CCAAT box, ma è fornito di una regione ricca in GC e di sequenze consesus, in prossimità del promotore, per il legame di proteine, quali Sp1 (*Specificity protein 1*) e AP2 (*Activating protein 2*). Per il gene Sod3 sono state identificate ben due CCAAT box, ma il promotore è privo di una classica TATA box. In seguito ad un'analisi computerizzata sono stati identificati diversi siti di binding per molteplici fattori trascrizionali, come NFkB, AP1 e AP2, Sp1 e per la CCAAT-enhancer-binding protein (C/EBP). L'esercizio della loro funzione di modulatori è fondamentale per l'espressione sia costitutiva che inducibile di tutti e tre i geni Sod. Sod-1 risulta la forma costitutivamente espressa, ed è spesso considerato un gene housekeeping per monitorare le variazioni di espressione e di attività dell'isoforma 2.

Il fattore di trascrizione *redox-sensitive* NFkB, agisce come regolatore di diversi geni, come risposta agli stimoli esterni. Siti di legame per NF-kB sono stati trovati sia a livello del promotore che a livello intronico di tutti e tre i geni Sod. Nonostante, il sito per NF-kB nel gene di Sod1 non è molto sensibile agli stimoli esterni, il pathway PI3K/Akt può attivare NF-kB e indurre l'overespressione di Cu/Zn SOD. La Mn-SOD sembra, invece, rappresentare la forma inducibile, ossia quella che più risponde agli stimoli esterni variando a livello di espressione genica. In diversi studi è risultato NF-kB come il principale fattore trascrizionale in grado di modulare l'induzione di MnSOD. Sp1 è una proteina che agisce come fattore trascrizionale legandosi direttamente al DNA, attraverso tre consecutivi motivi Zn-finger (a dita di Zinco) nell'estremità C-terminale e, attiva l'espressione attraverso uno dei due motivi ricchi di glutammina. La comune presenza di motivi ricchi in GC delle 3 isoforme, suggerisce un comune ruolo regolatore per Sp1 per l'espressione di SOD. AP1 agisce come fattore trascrizionale, modulando meccanismi di trasduzione del segnale, coinvolti nella proliferazione e nella trasformazione cellulare. Sia l'attività che la sua stessa espressione sembrano rispondere a stimoli esterni, ad esempio è risultato che AP1 venga espresso in maniera diversa a seconda dell'omeostasi redox cellulare ⁴⁰. In condizioni fisiologiche, il sistema antiossidante di difesa contro lo stress metabolico si avvale nel mitocondrio dell'azione combinata di SOD e GPx. Nonostante l'azione di questi due enzimi, il maggior

ammontare di H₂O₂ riesce a diffondere fuori dall'organello, dove viene detossificato per azione del GPx citosolico e della catalasi, localizzata nei perossisomi. In condizioni patologiche, ad esempio in uno stato infiammatorio, in presenza di quantità esagerate di ROS, CAT risulta il principale *scavenger* di H₂O₂ nel citosol. È ancora sotto studio la possibilità che CAT possa ritrovarsi anche all'interno del mitocondrio, e qui in grado di sovertire ai danni prodotti dalle ROS, come la perossidazione lipidica delle membrane mitocondriali, che intaccate nella loro integrità possono rilasciare la citocromo C e attivare la cascata pro apoptotica delle caspasi ⁴¹.

La reazione di detossificazione (mostrata sotto) dell'anione superossido consiste nella dismutazione del radicale a ossigeno molecolare e perossido d'idrogeno da SOD (1), che in seguito è metabolizzato ad acqua e ossigeno (3) (4) da CAT e dalla GPx (o GSH-Px). CAT è un enzima contenente un gruppo eme che è localizzato nei perossisomi, che agisce per ridurre il rischio della formazione del radicale idrossile dal perossido d'idrogeno (2) attraverso la reazione di Fenton ⁴².



Il virus dell'epatite C è uno dei principali agenti causativi dell'epatite cronica. Il meccanismo attraverso cui il virus causa danni nella cellula non è ancora ben chiaro. Però, è stata ipotizzata la sua capacità nel causare stress ossidativo durante il decorso patogenico dell'infezione. Alcune evidenze sperimentali confermano tale ipotesi, avendo riscontrato nelle cellule infette turnover del glutathione attivato, incremento del livello di perossidazione lipidica e dei depositi di ferro nel fegato.

Inoltre, è stata valutata nei pazienti affetti da epatite C una maggiore produzione del TNF- α e citochine che possono indurre stress ossidativo, stimolando la generazione di ROS, come l'anione superossido e il perossido d'idrogeno. Le specie reattive causano danni attraverso perossidazione lipidica, danno ossidativo di acidi nucleici e proteine, riduzione degli store di

ATP. La perossidazione è causata dai radicali liberi che portano alla distruzione ossidativa degli acidi grassi polinsaturi delle membrane cellulari. Tale danno porta alla produzione di metaboliti aldeidici reattivi e tossici, come il malondialdeide (MDA) e l'idrossinonenale (HNE). Questi metaboliti altamente citotossici, prodotti in grandi quantità, diffondono dal sito di origine ad attaccarsi a target distanti, formando legami covalenti con varie molecole. Molteplici studi hanno correlato il ruolo delle ROS e delle RNS a diverse patologie gastrointestinali, come pancreatiti acute, coliti ulcerose, ecc. Un'azione significativa è stata dimostrata nelle epatiti non virali, specialmente nell'emocromatosi, nella malattia di Wilson e nelle lesioni epatiche da abuso di alcohol. Recentemente è stato associato il fondamentale ruolo di stress ossidativo nel danno epatico in seguito ad infezione da HBV e principalmente da HCV. I meccanismi non sono ancora ben chiari, tanto che ci sono controversie anche sull'effetto dei virus sull'incremento o sulla riduzione del sistema antiossidante di difesa dell'ospite ⁴³.

1.6 Infiammazione e Stress Ossidativo nelle Lesioni Pre-Neoplastiche

Il prolungato stato infiammatorio, durante l'epatite e a seguire nella cirrosi, predispone le cellule alla trasformazione neoplastica, attraverso alterazioni intracellulari *via* stress metabolico.

Come risposta ad un danno tissutale o sua infezione, vengono innescati i processi di riparo che consistono nell'infiltrazione della regione interessata da parte delle cellule competenti, quali neutrofilo, monociti, macrofagi, eosinofili, cellule dendritiche e linfociti. Il tessuto danneggiato entra in contatto con fattori rilasciati, come prostaglandine, citochine, nuclear factor NFkB, chemochine e fattori di angiogenesi. Queste molecole chiave sembrano essere il link tra infiammazione e le alterazioni geniche, riscontrate negli stadi tumorigenici.

D'altro canto, i principali effettori chimici sono rappresentati dai radicali liberi, ROS e RNS, che vengono prodotte sotto stimolo di citochine pro infiammatorie in cellule fagocitarie e non, attraverso l'attivazione del signaling delle chinasi. Ad esempio, il TNF- α incrementa la formazione delle specie reattive dell'ossigeno da neutrofilo e da altre cellule, mentre le interleuchine-1 β (IL-1 β), TNF- α e interferone (IFN)- γ stimolano l'espressione di iNOS, la forma inducibile dell'ossido nitrico sintasi nelle cellule infiammatorie e epiteliali. L'IL-8, una chemochina infiammatoria prodotta da monociti, macrofagi e cellule endoteliali risulta

implicata nella progressione e nella metastatizzazione dei tumori nel colon, stomaco e polmone ⁴⁴.

L'infiammazione cronica è strettamente associata all'angiogenesi ⁴⁵, in cui macrofagi piastrine fibroblasti e le cellule tumorali stesse producono fattori angiogenici, come FGF, VEGF e prostaglandine, oltre a citochine, chemochine, e NO ⁴⁴.

I radicali liberi possono interagire con i fosfolipidi di membrana generando idroperossidi, lipoperossidi e aldeidi tossiche come la malondialdeide (MDA), capace di alterare la permeabilità di membrana e la microcircolazione. Tali specie reattive e loro derivati sembrano attivare fattori nucleari, come l'NFkB, inducendo l'ulteriore produzione di citochine proinfiammatorie, che aumentano lo stato d'infiammazione e l'ulteriore produzione di ROS e RNS. La cellula risponde ampliando la difesa antiossidativa oppure, oltre una certa soglia, "sceglie" di promuovere la morte cellulare programmata, attivando la cascata delle caspasi. Il perossinitrito agisce nel pathway apoptotico, attraverso la nitrosilazione delle proteine e l'alterazione di NFkB, AP-1, p53 e caspasi ⁴⁴. Il fallimento dei sistemi di difesa porta alla progressione da parte dei radicali e loro intermedi fino al nucleo, portando all'accumulo di cellule mutate.

Il danno del DNA indotto dai ROS consiste in rotture del DNA a doppio e singolo filamento, modificazioni di purine e pirimidine o deossiribosio e crosslink tra acidi nucleici e proteine ⁴⁸.

Tali modificazioni riflettono l'inibizione o l'attivazione trascrizionale, l'induzione di pathway della trasduzione del segnale, errori di replicazione e instabilità cromosomica, alterazioni associate alla cancerogenesi.

L'ONOO⁻ (perossinitrito), prodotto dalla reazione tra NO e O₂⁻, media la formazione di 8-ossio-7,8-diidro-2'-deossiguanosina e di 8-nitroguanina ⁴⁶. L'8-nitroguanosina è una molecola altamente reattiva e l'8-nitroguanina è un mutageno che induce la trasversione G>T, mutazioni riscontrate *in vivo* nel gene ras e in p53 nel cancro del fegato. Tali mutazioni collegano lo stress ossidativo all'attivazione di oncogeni e all'inattivazione degli oncosoppressori.

Anche se i meccanismi nel dettaglio non sono stati ancora chiariti, risulta che il danno ossidativo a livello mitocondriale contribuisca nell'insorgenza della carcinogenesi. Il perossido d'idrogeno e altre specie reattive dell'ossigeno attivano geni nucleari che regolano la biogenesi, trascrizione e replicazione del genoma mitocondriale. Il DNA mitocondriale, legato alla membrana interna, è maggiormente sensibile a causa della mancanza delle proteine istoniche e dei meccanismi di riparo completi, nonché della vicinanza alla catena di trasporto degli elettroni. Il danno del mtDNA causa una disfunzione dei trasportatori e conseguente

incremento dei radicali idrossilici, che rappresentano i principali responsabili del danno genomico ⁴⁷.

I primi componenti cellulari a reagire con i radicali liberi sono le proteine e la loro attività enzimatica viene ridotta a seguito dell'ossidazione dei gruppi –SH. Lo stress ossidativo va ad alterare anche i componenti lipidici, formando aldeidi e perossilipidi, che ad alte concentrazioni facilmente reagiscono con proteine, DNA e fosfolipidi, con amplificazione dello stress metabolico e funzionalità alterata della membrana cellulare ^{48,49}.

1.7 Epatocarcinogenesi

L'epatocarcinoma cellulare viene associato a molteplici fattori di rischio, che sembrano causare delle lesioni pre-neoplastiche che, successivamente portano all'insorgenza dell'HCC. La cirrosi è considerata una lesione epatica pre-maligna, anche se non è sempre riscontrata nei pazienti affetti da HCC, in alcuni dei quali non appare alcuna evidenza clinica di patologie collegate al fegato prima della diagnosi infausta.

È ampiamente accettato che l'accumulo di alterazioni genetiche possa indurre lo sviluppo di un fenotipo displastico e tumorale. Nel caso dell'HCC si parla di un vasto range di anomalie, quali delezioni e riarrangiamenti cromosomali, aneuploidie, mutazioni e alterazioni epigenetiche.

L'elevata eterogeneità delle lesioni riscontrate nei tessuti colpiti dal cancro epatico induce a pensare che, questo tipo di neoplasia possa essere causata da cambiamenti genomici ed epigenetici che vadano ad intaccare e compromettere diversi pathway cellulari ³⁸.

1.8 Epatocarcinogenesi nello Stadio Cirrotico

La cirrosi è una condizione patologica caratterizzata da una diminuita capacità rigenerativa del fegato. Gli epatociti, difettivi nei meccanismi replicativi, mostrano il progressivo accorciamento dei telomeri ed una favorita entrata in fase di senescenza (non definitiva). Questa condizione patologica è indotta dall'attivazione del checkpoint di p53 e conseguente modulazione del suo maggior target p21^{Waf1/Cip1} ⁵⁰.

La capacità rigenerativa danneggiata e l'accumulo di epatociti senescenti induce la perdita della competenza replicativa del tessuto cirrotico, portando ad una selezione di cellule in crescita aberranti, e conseguente espansione di cloni maligni, in seguito alla ri-espressione del complesso enzimatico della telomerasi ⁵¹.

Nel promuovere il processo di tumorigenesi sono coinvolti diversi meccanismi, responsabili dei cambiamenti del microambiente nel tessuto cirrotico. Steatosi e fibrosi vengono identificati come fattori di rischio indipendenti per l'insorgenza dell'HCC nei pazienti con epatiti croniche. Il contributo principale di tali modifiche è dato dall'elevata produzione delle citochine e dei fattori di crescita (PGF3, VEGF1), associata a fibrosi e steatosi. Questo sembra essere dovuto ad eventi di infiltrazione da parte della popolazione cellulare del sistema immunitario attivato, nonché di risposta a stress da accumulo lipidico ⁵².

Durante la fase di pre-neoplasia, le alterazioni nell'espressione genica sono per lo più quantitative e dovute a meccanismi epigenetici senza modifiche nella struttura dei geni e di cromosomi.

In questo stadio, che precede l'insorgenza dell'HCC, si osserva un'elevata espressione del *transforming growth factor- α* (TGF- α) e dell'*insulin-like growth factor-2* (IGF-2), responsabile dell'aumentata proliferazione degli epatociti. L'up-regolazione del TGF- α e dell'IGF-2 risulta dall'azione delle citochine prodotte in seguito all'infiammazione cronica del tessuto danneggiato, dalla trans attivazione virale e dai meccanismi indotti dalla rigenerazione del fegato.

La mancata regolazione dell'espressione dell'IGF-2 sembra essere causata da un'alterata metilazione e re-imprinting del gene IGF-2 con produzione elevata del prodotto proteico. Eventi deregolati di metilazione (ipo e ipermetilazione) avvengono anche a livello delle isole CpG di altri geni e segmenti cromosomici delle regioni tissutali affette da patologie croniche epatiche, quali cirrosi ed epatiti. La deregolazione in tali cellule è dovuta ad un'espressione incrementata sia delle DNA metiltransferasi (DNMTs) ⁵³, responsabili della metilazione e demetilazione delle isole CpG, che dell'S-adenosilmetionina sintasi e della glicina N-metiltransferasi, che modulano la disponibilità dei gruppi metilici "liberi". Un altro possibile meccanismo epigenetico alterato potrebbe includere l'acetilazione della cromatina.

I cambiamenti epigenetici e alcune alterazioni strutturali **precoci** in geni o loci non sono sufficienti di per sé a indurre un fenotipo maligno, ma inducono una condizione di criticità nella popolazione epatocitica, tale da accumulare continue aberrazioni a livello strutturale e funzionale di geni. L'azione di promozione neoplastica sembra dunque essere indiretta.

Un esempio in cui, alterazioni epigenetiche direttamente causano alterazioni strutturali in un gene, riguarda l'overespressione di *c-myc*, che inizialmente è dovuta all'ipometilazione del promotore e successivamente all'amplificazione del gene. Anche nel caso del gene *p16^{INK4A}* (CDKN2A) sembra che, l'evento scatenante una riduzione nell'espressione, sia l'ipermetilazione del promotore, anche se sono associate anche la perdita di eterozigotà (LOH) e altre mutazioni ⁵⁴.

Un'altra caratteristica che si identifica confrontando i diversi casi di HCC è l'eterogeneità genomica, che dipende in parte dall'agente causativo della patologia. Ad esempio pazienti esposti cronicamente all'AFB1 mostrano una mutazione a livello del codone 249 del gene di p53 ³⁸. Questo aspetto riflette molto anche la diversità del tumore stesso, che può essere piccolo e ben differenziato oppure grande e metastatico e nonostante tutto, a parità di stadio clinico, di dimensione della massa cancerosa e di tempo di progressione, si rileva un alto grado di variabilità.

Le alterazioni che si riscontrano nei diversi casi di HCC interessano pathway che regolano la proliferazione, la durata replicativa, la morte, il differenziamento e l'integrità genomica. Quando a subire alterazioni è una molecola che gioca un "ruolo di snodo" all'interno di un circuito in cui si intersecano differenti pathway, come ad esempio il tumor suppressor p53, si può considerare l'ipotesi che una singola modifica faccia crollare la stabilità cellulare fino all'insorgenza neoplastica. Però le evidenze sperimentali e cliniche portano a credere che lo sviluppo di un fenotipo tumorale sia avviato in seguito all'accumulo di aberrazioni genetiche diverse. Questa considerazione consente di associare ad una specifica diagnosi una specifica terapia da seguire ⁵⁵.

1.8 Trattamento dell'Epatocarcinoma

Per il trattamento dell'epatocarcinoma ci sono diversi approcci, che vengono scelti in base allo stadio del cancro. Numerosi sono i sistemi di classificazione, tra i quali il Barcelona Clinic Liver Cancer staging, proposto come sistema standard di valutazione della prognosi del carcinoma epatocellulare. Tale classificazione si basa sullo stato del paziente, numero e dimensioni dei noduli, sintomatologia e funzionalità epatica, determinata dal sistema Child-Pugh, che segue 5 parametri clinici, a ciascuno dei quali si assegnano da 1 a 3 punti, come indicazione di severità. La somma dei punti di tutti e 5 i parametri, determina la classe di appartenenza (classe A: da 5 a 6; classe B: da 7 a 9; classe C: da 10 a 15) ^{56,57}.

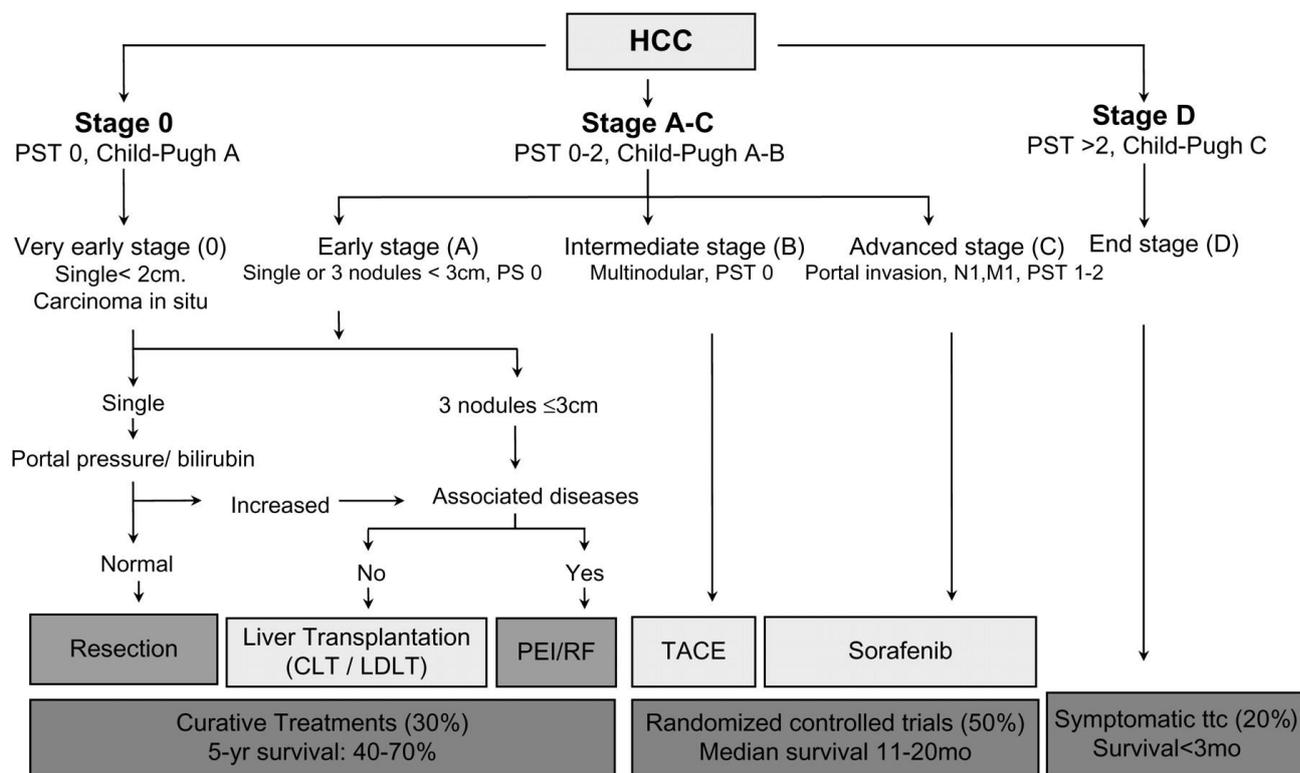


Fig 2.: Barcelona Clinic Liver Cancer (BCLC) staging classification and treatment schedule (Llovet et al. J Natl Cancer Inst 2008 100-10:698-711)⁵⁸

Quando un caso di HCC viene diagnosticato ad uno stadio relativamente precoce, in cui rimane preservata la funzionalità epatica, l'approccio più indicato e che offre una maggiore percentuale di sopravvivenza post operatoria è la resezione chirurgica⁵⁷. Nonostante i continui progressi delle tecniche chirurgiche, di diagnosi non tardive (tramite nuovi strumenti diagnostici, come l'ultrasonografia⁵⁷), il tasso di 'morbidity' dei pazienti sottoposti a resezione epatica rimane comunque molto alto, del 30-60%⁵⁹.

Dunque, rispetto agli altri tipi di tumori solidi, la prognosi a lungo termine (5 anni dopo l'intervento chirurgico) rimane insoddisfacente, a causa dell'alta incidenza delle recidive intraepatiche.

Come seconda opzione, viene considerato il trapianto epatico ortotopico, a cui è associato il più basso tasso di ricorrenza tumorale, però a causa della scarsità di organi disponibili e compatibili, vengono selezionati solamente quei pazienti per i quali è previsto un eccellente esito.

Quando il paziente non è operabile, si possono usare due tecniche alternative: l'alcolizzazione percutanea e la termoablazione. Queste tecniche prevedono la distruzione del tumore mediante iniezione di alcohol o calore, introdotti nel fegato con aghi o sonde attraverso la parete addominale sotto guida ecografica. L'alcohol diffonde selettivamente nel tumore, causando la morte delle cellule cancerose per denaturazione; anche il calore, prodotto da una radiazione con lunghezza d'onda di poco inferiore a quella degli infrarossi (radiofrequenza), produce un effetto simile.

Nei pazienti di stadio intermedio, non operabili chirurgicamente, la scelta del trattamento da intraprendere è la chemioembolizzazione trans-arteriosa (TACE), se l'organo è ancora funzionale. Questa tecnica prevede l'infusione di un'alta concentrazione locale di farmaci chemioterapici, legati a sferette di materiale inerte, tramite l'arteria epatica, (i cui rami irrorano i noduli tumorali), in modo tale da bloccare il rifornimento sanguigno ai noduli di HCC. La conseguenza di ciò è che la maggior parte dei noduli tumorali diventano necrotici, mentre la funzionalità epatica rimane praticamente inalterata ⁵⁷.

La maggior parte dei pazienti, a cui è stato diagnosticato l'HCC in stadio avanzato, non vengono considerati candidati né per il trapianto dell'organo, né per la resezione chirurgica o per terapie *in loco*. In questi casi si opta per l'intervento chemioterapico citotossico a livello sistemico, per il quale è stato riscontrato un'efficacia assai limitata con scarse aspettative di vita ⁵⁷. La resistenza intrinseca ai chemioterapici è un fenomeno associato all'up-regolazione nell'HCC delle adenosine triphosphate-binding cassette proteins (ABC family), che includono MDR1, p-glycoprotein (p-gp) e la multidrug resistance protein (MRP). L'aumentata modulazione di MDR1 è associata ad un decremento nell'assorbimento dei livelli di doxorubicina in determinate linee cellulari ⁶⁰. La topoisomerasi IIa, che codifica per un enzima target di diversi chemioterapici antitumorali, presenta mutazioni associate alla resistenza, e la sua up-regolazione è riscontrata nelle cellule resistenti alla doxorubicina, caratteristica correlata ad un cancro fenotipicamente aggressivo ⁶¹.

1.9 Target Molecolari nel Trattamento dell'HCC

Sia l'angiogenesi che il signaling attraverso la cascata Ras/Raf/MEK/ERK giocano un ruolo critico nello sviluppo dell'HCC. Le terapie antiangiogeniche, che inibiscono la formazione dei vasi necessari per l'apporto sanguigno alla massa tumorale, sembrano essere assai promettenti. Oltre ad essere altamente angiogenico, l'HCC presenta un'elevata espressione e

un'incrementata attività della miogeno-activated protein kinase, paragonato al tessuto epatico non neoplastico circostante ⁶².

Il pathway MAPK/ERK, evolutivamente conservato, rappresenta il link tra segnali extracellulari e i processi intracellulari che regolano crescita, proliferazione, differenziamento, migrazione, angiogenesi e apoptosi. L'attivazione del signaling avviene in seguito al binding dei fattori di crescita al recettore, che porta allo switch on del complesso GRB2/SHC/SOS, che dà il via a successivi eventi di fosforilazione a cascata, che si concludono con l'attivazione delle molecole segnale più a valle, ERK 1/2. Questi ultimi regolano diverse attività cellulari, agendo su più di 100 substrati nucleari e citoplasmatici, come fattori di trascrizione e chinasi del ciclo cellulare. Ras gioca un ruolo di regolazione anche su altri signaling, come ad esempio il PI3K/AKT/mTOR pathway, che anch'esso risulta up-regolato nell'HCC ⁶³.

Hwang *et al.* (2004) ha riscontrato un'overespressione di CRAF (isoforma delle serin-treonina chinasi raf) su tutti e 30 i campioni di HCC presi in esame, con un grado di fosforilazione di MEK1/2 7 volte maggiore rispetto al tessuto epatico adiacente ⁶⁴. Studi successivi hanno dimostrato l'incremento dei livelli di ERK 1/2 fosforilato. L'attivazione patologica di CRAF è stata collegata alla mutazione nel gene Ras ⁶⁵.

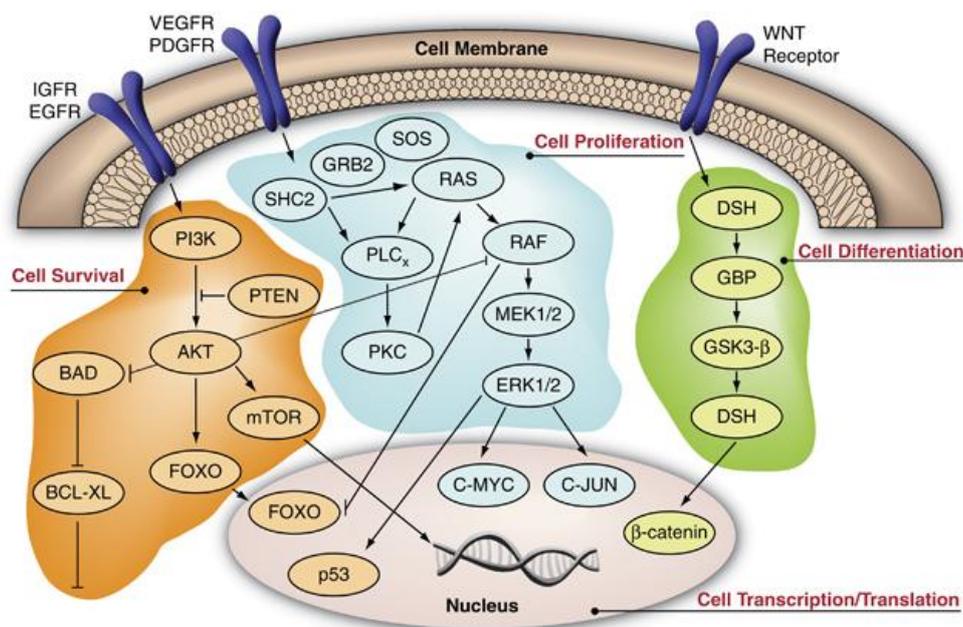


Fig 3.: Tre pathway di signaling implicati nella patogenesi dell'epatocarcinoma cellulare.

(Whittaker S *et al.*, *Oncogene* 2010;29: 4989–5005)⁶²

L'attivazione costitutiva del pathway PI3K/AKT/mTOR risulta implicato nei meccanismi di crescita e di sopravvivenza cellulare nell'epatocarcinoma umano, così come in una grande varietà di tumori solidi ⁶³. Questo avviene in seguito ad un'up-regolazione dell'IGF e dell'IGF receptor nell'HCC e nel tessuto cirrotico, che induce l'attivazione anche dei pathway RAF/MEK/ERK e WNT/ β -catenina ⁶⁶.

Quest'ultima via di segnalazione viene attivata in seguito all'interazione dei ligandi glicoproteici ricchi di cisteina (WNTs), ai relativi recettori, che andranno ad attivare l'effettore DSH che previene la fosforilazione di β -catenina da parte della glycogen synthase kinase (GSK)-3 β e, la successiva degradazione proteosomiale ubiquitina-dipendente. L'aumento della concentrazione citoplasmatica di β -catenina porta alla sua traslocazione nucleare, dove agisce come co-attivatore trascrizionale, stimolando l'espressione di geni, i cui prodotti sono coinvolti nei meccanismi di proliferazione (myc, myb, cJun, cycD1), di angiogenesi, di protezione contro l'apoptosi e di formazione della matrice extracellulare ⁶⁶.

Uno dei fattori maggiormente coinvolti e studiati nei processi di angiogenesi è il vascular endothelial growth-factor (VEGF), che risulta, assieme al rispettivo recettore (VEGFR), overespresso nelle linee cellulari, nei tessuti e nel siero dei pazienti con HCC ^{67,68}. L'up-regolazione di VEGF è stata rilevata in tessuti cirrotici e displastici, suggerendo un possibile ruolo nel promuovere l'angiogenesi nei primi stadi di epatocarcinogenesi. Inoltre sembra che alti livelli di VEGF siano dei biomarker del grado del tumore, nonché dell'esito negativo post-resezione e di recidive ⁶⁸.

1.10 SORAFENIB

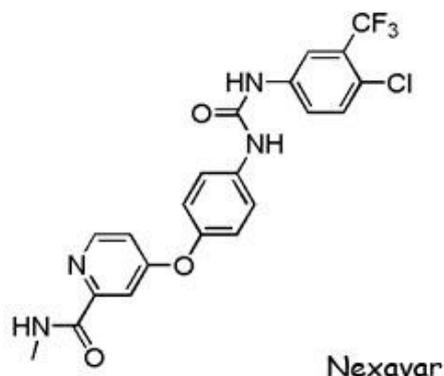


Fig 4.: Struttura chimica del Sorafenib (Nexavar)

<http://kinasepro.wordpress.com/2007/04/08/nexavar/>

Sorafenib (Nexavar, Bayer HealthCare Pharmaceuticals–Onyx Pharmaceuticals) è un inibitore multichinasico, somministrato per via orale, approvato da U.S. Food and Drug Administration e da European Medicines Agency per il trattamento di pazienti con carcinoma renale (RCC) in stadio avanzato e con carcinoma epatocellulare non resecabile. Nei trials preclinici sorafenib ha mostrato un'attività antiproliferativa, una riduzione dell'angiogenesi e un incremento dell'apoptosi nella cellula tumorale⁶⁹.

I risultati dello studio di fase II, in cui erano stati esaminati pazienti con HCC avanzato e di classe A o B del Child-Pugh system, hanno dimostrato che il farmaco ha degli effetti terapeutici benefici, somministrando oralmente 400 mg 2 volte al giorno. In questo trial è stato attribuito il potenziale ruolo di biomarker del parametro TTP (time to progression), al livello fosforilativo di ERK, quale indicatore dello stato di attivazione del pathway Ras/Raf/MEK/ERK. Un TTP più alto corrispondeva a livelli di phospho-ERK più elevati⁷⁰.

In uno studio multicentrico di fase III, *Sorafenib Hepatocellular Carcinoma Assessment Randomized Protocol (SHARP)*, sono stati coinvolti 602 pazienti con HCC in stadio avanzato per andare a valutare efficacia e sicurezza del farmaco, rispetto al placebo, con modalità doppio cieco. Sono stati testati, come endpoint primari di efficacia, la sopravvivenza globale e il tempo di progressione dei sintomi, e, come endpoint secondari, il tempo di progressione e il tasso di controllo della patologia. Gli effetti collaterali più comunemente osservati nei pazienti trattati con la molecola sono stati diarrea (11% vs 2%) e rash cutanei (8% vs 1%)⁶⁴. I risultati

positivi del trial SHARP hanno spinto gli studiosi a caratterizzare i pathway molecolari coinvolti nei meccanismi di risposta della cellula tumorale al Sorafenib ⁷¹.

1.10.1 Target del Sorafenib

Sebbene originariamente venne identificato come inibitore della serina/treonina chinasi Raf *in vitro* ⁷², sorafenib è in grado di inibire anche i recettori tirosin chinasi, coinvolti nella progressione e nell'angiogenesi tumorale, quali VEGFR-1,-2,-3, PDGFR- β , c-Kit e Ret, esposti sulla superficie delle cellule endoteliali ⁷³. L'attivazione del pathway Raf/MEK/ERK da parte di recettori tirosin-chinasi, avviene in seguito al binding di ligandi secreti dalla cellula tumorale, quali VEGF e PDGF- β , al fine di indurre la formazione di vasi per l'apporto sanguigno di cui ha bisogno. Il farmaco ha mostrato un potente effetto inibitore anche su altre isoforme di Raf, in Raf-1 (o C-Raf), in B-Raf wild type e nella variante mutata B-Raf V600E ⁷⁴.

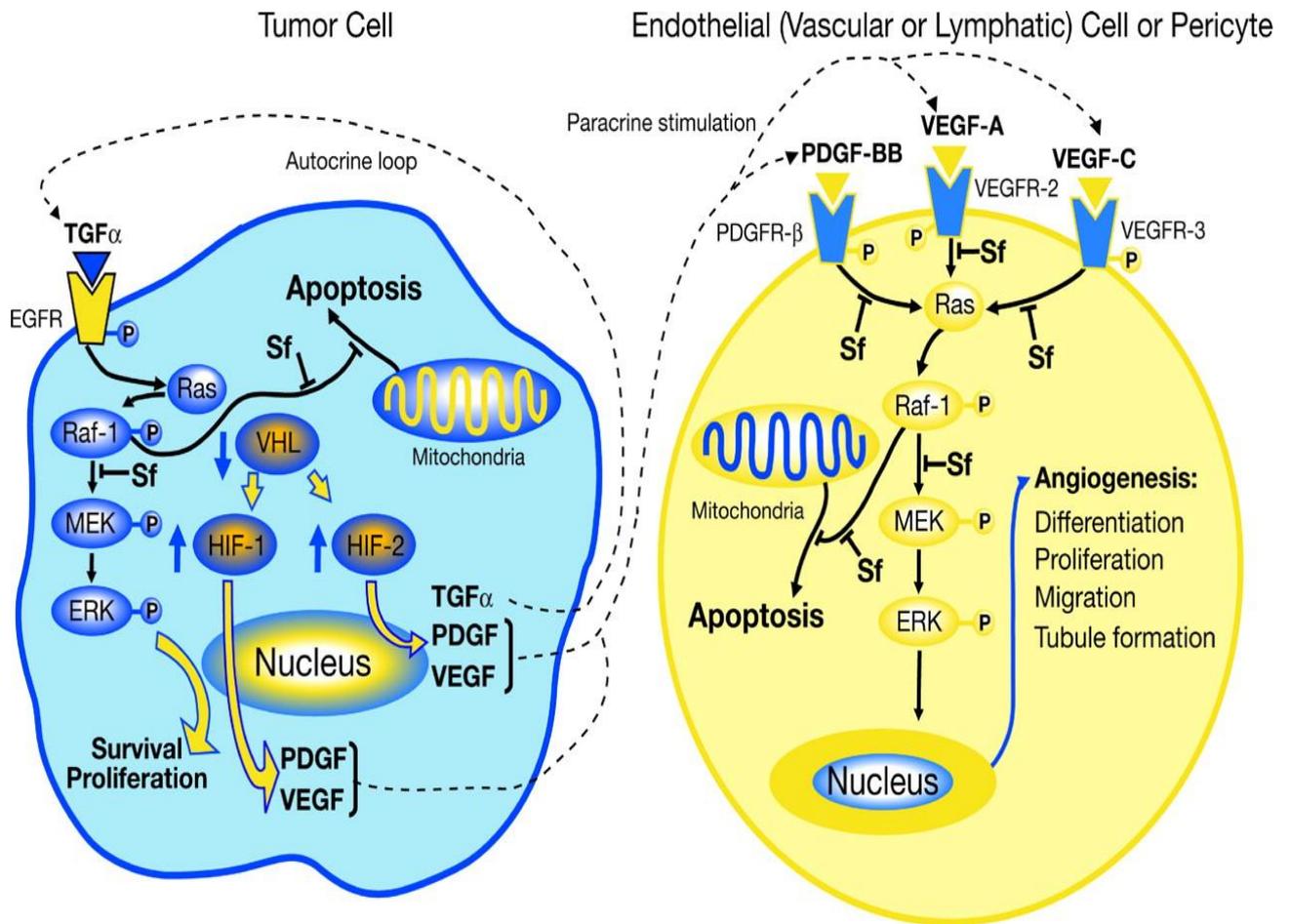


Fig 5.: Deregolazione del Ras/Raf-signaling, e azione del Sorafenib in cellule tumorali e dell'endotelio vascolare⁷³.

L'attività antiproliferativa del farmaco varia a seconda del pathway di signaling alterato che guida la tumorigenesi e di conseguenza varia il range di concentrazione da somministrare. Ad esempio nelle linee cellulari tumorali senza recettori tirosin chinasi mutati e con multipli pathway di signaling che dirigono la crescita tumorale, l'attività antiproliferativa del sorafenib si avrà ad una concentrazione micro molare. Anche l'effetto sulla proliferazione risulta dose-dipendente a seconda della mutazione e del pathway coinvolto nella carcinogenesi⁷³.

Il sorafenib mostra un'attività pro apoptotica in diverse linee cellulari tumorali, nonostante i meccanismi implicati non siano ancora chiariti del tutto e potrebbero essere differenti tra le varie linee cellulari. Un comune effetto osservato è l'inibizione della fosforilazione dell'*initiation factor* eIF4E e la perdita della proteina antiapoptotica Mcl-1 (*myeloid cell leukemia-1*). eIF4E regola la traduzione di molti messaggeri, tra cui Mcl-1, membro della

famiglia Bcl-2. Infatti, l'overespressione costitutiva di Mcl-1 inibisce significativamente l'apoptosi indotta dal sorafenib, mentre la down regolazione di Mcl-1 mediata da RNA interference intensifica l'azione proapoptotica del farmaco. La diminuita regolazione di Mcl-1 dal sorafenib si ritiene essere associata al rilascio del citocromo C dal mitocondrio al citoplasma e all'attivazione delle caspasi. Nonostante la correlazione tra l'attenuazione della fosforilazione di eIF4E e della regolazione di Mcl-1 e la morte cellulare per apoptosi guidata dal sorafenib sia stata comprovata, rimane da delucidare la mancata connessione a livello temporale tra gli eventi in successione. Probabilmente queste discordanze possono essere dovute alla caratteristica intrinseca della cellula tumorale stessa di sopravvivere, attivando diversi pathway antiapoptotici. Quindi l'azione farmacologica si pensa agisca su varie vie che promuovono o inibiscono la morte cellulare programmata, dato che è ormai chiaro che il sorafenib sensibilizza la cellula tumorale ad andare incontro all'apoptosi. È stato infatti dimostrato che la risposta al sorafenib è incrementata se in combinazione con chemioterapici e con inibitori della trasduzione del segnale, ad esempio di mTOR ⁷⁵.

1.10.2 pERK Come Potenziale Predittore della Risposta al Sorafenib

Gli studi finora condotti sul sorafenib, come terapia molecolare per il trattamento dell'epatocarcinoma cellulare, hanno offerto nuove speranze per i pazienti con HCC in stadio avanzato. Date le potenzialità di questa piccola molecola, a basso peso molecolare, la comunità clinico-scientifica si sta sempre più interessando ai recenti sviluppi, che stanno portando a chiarire il meccanismo di azione del farmaco, caratterizzando i pathway molecolari, che sembrano essere coinvolti nella risposta al sorafenib. Recentemente, è stata delineata l'idea di identificare dei biomarcatori molecolari, implicati sia nella tumorigenesi che nei meccanismi d'azione del NEXAVAR, da utilizzare come indicatori della risposta del paziente al trattamento col farmaco.

Come già detto, nel trial di fase II era stato identificato ERK, il cui livello di fosforilazione poteva risultare utile allo scopo. Risultava, infatti, che nella fase di pre-trattamento, i livelli di pERK correlavano con il tempo di progressione del cancro. Pazienti con tumori che esprimevano livelli più alti di pERK presentavano, in seguito al trattamento col sorafenib, un tempo di progressione più lungo ⁷⁶.

È noto ormai da tempo che ERK fosforilato è un componente chiave a valle del pathway Raf/MEK/ERK. Dopo l'evento di fosforilazione, ERK trasloca nel nucleo, dove provoca dei

cambiamenti nell'espressione genica di determinati target, ad esempio dei fattori trascrizionali della famiglia Ets.

Zhang *et al.* (2009) per capire la relazione tra l'effetto del sorafenib sulla proliferazione cellulare e livelli basali di pERK delle cellule tumorali, hanno valutato 4 diverse linee cellulari di HCC (SMMC-7721, MHCC97-L, MHCC97-H e HCCLM6) con diversi livelli di pERK e diversi potenziali metastatici.

I risultati rivelano un aumento graduale dei livelli di pERK nelle linee cellulari in accordo con il loro potenziale metastatico, indicando il ruolo del pathway Raf/MEK/ERK nell'invasione e nella metastatizzazione del tumore. Le analisi condotte hanno mostrato che il sorafenib inibisce la fosforilazione di ERK in maniera dose-dipendente e che il grado di inibizione nelle linee cellulari di HCC è significativamente differente a seconda dei livelli basali di pERK. Si pensa inoltre che l'attività antitumorale del farmaco sia legata alla sua capacità nell'inibire le tirosin-chinasi, coinvolte nell'angiogenesi, con meccanismi Raf/MEK/ERK-indipendenti. Ad ogni modo i risultati positivi di tale studio dimostrano che, la sensibilità al farmaco è collegata direttamente all'attivazione del pathway, preso in esame, e ai livelli fosforilativi di ERK delle cellule tumorali. Un'ulteriore dimostrazione è stata data trattando le cellule con l'inibitore di MEK1/2, che riduceva i livelli di pERK e che comportava una minore sensibilità delle cellule alla risposta al NEXAVAR⁷⁷. Questa correlazione è in accordo con i risultati clinici ottenuti dal trial del sorafenib in fase II⁷⁰.

In un altro studio è stato valutato che, l'aumento dei livelli di p-ERK in pazienti resistenti alla terapia farmacologica, potrebbe essere dovuto all'instaurarsi di un feedback-pathway attivato dall'inibizione della chinasi Raf da parte del sorafenib, che potrebbe sollecitare in maniera alternativa l'attivazione di Mek, e la conseguente fosforilazione di ERK. Infatti è stato visto che nella linea cellulare HepG2 la protein-chinasi C- α può attivare le proteine Mek/Erk, in maniera Ras/Raf-indipendente. Per cui non può essere escluso che questo meccanismo prenda forma anche nel tessuto neoplastico⁷⁸.

Questi studi condotti identificano come potenziale marcatore della risposta al sorafenib i livelli basali di phospho-ERK, in fase di pre trattamento. Tale correlazione risulta estremamente utile perché offre l'opportunità di poter selezionare in maniera più mirata i pazienti che possono trarre maggior beneficio dal trattamento col sorafenib.

1.11 Trattamenti di Prevenzione delle Recidive dell'Epatocarcinoma

Negli ultimi 20 anni le tecniche chirurgiche di ultima generazione e i trattamenti pre-operatori hanno portato ad una diminuzione delle morti (nei 30 giorni dopo l'intervento) del 2,5%. Nonostante tale miglioramento, l'epatoectomia curativa dell'epatocarcinoma cellulare non viene considerato un approccio totalmente soddisfacente, rispetto agli altri tumori solidi, a causa dell'alta incidenza delle recidive. Si è riscontrato un tasso di ricorrenza, all'interno dei 5 anni post-operatori, del 61,5%⁷⁹. Per tale motivo si sta cercando di potenziare le opportunità di sopravvivenza di tale approccio, associando dei trattamenti di prevenzione, per i quali sono stati condotti una serie di trials randomizzati (RCT).

Innanzitutto, è necessario stabilire l'origine della ricorrenza, che può essere mono-centrica o multi-centrica, discriminata in base alla positività a determinati marcatori. L'origine mono-centrica si riferisce ad una ricorrenza, in seguito a metastatizzazione intraepatica, in cui le metastasi provengono dal tumore primario e sono localizzate nel tessuto epatico rimanente. L'origine multicentrica è identificata quando si riscontrano lesioni *de novo* nel background cirrotico. Sono due tipologie di recidive, distinguibili anche in base al parametro temporale.

Un approccio preventivo testato è l'utilizzo di chemioterapici a livello sistemico o regionale, in seguito a resezione epatica. I risultati indicano che l'approccio risulta utile solo nei pazienti con una buona funzionalità dell'organo e con uno stato cirrotico medio.

È stata inoltre saggiata la ricorrenza dopo l'epatoectomia, in seguito a trattamento preventivo con IFN. L'idea si è basata su precedenti scoperte: il trattamento con IFN contro l'infezione da HCV, riduceva il tasso d'incidenza dell'HCC; l'origine multicentrica della ricorrenza post-resezione, è strettamente associata allo stato infettivo in casi di HCC. I risultati riportano un effetto anti-angiogenico dell'IFN- α piuttosto che anti-proliferativo, con un aumento della sopravvivenza disease-free in seguito a trattamento prolungato dopo la resezione. Anche il trattamento con l'acido retinoico dopo l'intervento chirurgico induce un aumento del tasso di sopravvivenza⁷⁹.

1.12 Modelli Sperimentali per lo Studio dell'HCC.

La carcinogenesi è un processo multistep che coinvolge diverse modifiche molecolari, e diversi fattori di rischio possono accelerare il processo e predisporre l'organo alla patogenesi. L'identificazione dei fattori di rischio può fornire delle indicazioni sui meccanismi

neoplastici. Un modello sperimentale animale di cancro al fegato, che mima la situazione umana, è essenziale perché possa fedelmente riflettere la patologia nell'uomo, sia per chiarire la biologia alla base del cancro sia per individuare nuove proposte terapeutiche. Il range degli animali utilizzati per costruire modelli di HCC è assai ampio e include topi, ratti, conigli, maiali, cani, gatti, ecc. La scelta del modello è importante e deve essere specifica per l'aspetto che si vuole andare a studiare.

A partire dal lavoro pionieristico di Yoshida che, indusse nel 1932 il cancro epatico in un modello di ratto mediante esposizione all'*o*-aminoazotoluene, molti altri carcinogeni sono stati identificati. Molti di questi sono composti chimici, come il tetracloruro di carbonio (CCL₄), la dietilnitrosamina (DENA), il 2-acetilaminofluorene (AAF), N-nitrosodimetilamina, arsenico, *o*-aminoazotoluene, N-nitrosomorfolina (NMOR) e 1,2-dicloroetano, o anche composti naturali, come l'aflatossina, la pirrolizidina, il safrolo. Comunemente i metodi di induzione sono attraverso il cibo, l'acqua, inalazione di gas o iniezione intraperitoneale o sub cutanea.

È noto che l'induzione chimica è un processo di sviluppo complesso di tre step: l'iniziazione, la promozione e la progressione. Ciascuno step è il risultato dell'abbattimento della naturale barriera di difesa della cellula, attraverso lo sbilanciamento di oncogeni e oncosoppressori. I modelli chimici di epatocarcinogenesi consistono nello step d'inizio attraverso la somministrazione dell'agente carcinogenico, seguito dalla promozione per indurre l'espansione clonale delle cellule "iniziate", mediante parziale epatoectomia o trattamento con phenobarbitale. Questi modelli sono i più utilizzati per lo studio dell'epatocarcinogenesi⁸⁰.

Dato che il fattore eziologico più comune dell'HCC è l'epatite virale cronica, appare evidente che i modelli virali appaiono molto utili per lo studio di tale forma di cancro. I problemi nel creare tali modelli consistevano nel capire quali erano le componenti virali ad indurre specificamente l'insorgenza della neoplasia epatocellulare.

Nel 2007 Zheng et al. dimostrarono che l'HBV da solo non era un efficiente carcinogeno. Ad ogni modo, i modelli creati mostravano necrosi e infiammazione epatica e lesioni tumorali che rispecchiavano la patologia e i meccanismi carcinogenici associati all'infezione da HBV. Esperimenti condotti mediante l'uso di colture cellulari hanno suggerito la possibilità che la Core protein di HCV riesca a modulare le funzioni dell'ospite e lo sviluppo di HCC associato a HCV.

Un modello di HCC molto usato negli ultimi 30 anni si basa sull'impianto di linee cellulari di cancro o di tessuti tumorali stessi in topi o ratti. L'intento di questo tipo di modello è di

ricreare condizioni di crescita per il tumore, stabilendo interazioni con l'ospite che mima la situazione di partenza dell'organismo donatore. Le differenze tra questi modelli includono l'origine del tumore (umano o animale), la tipologia del campione (sospensione cellulare in coltura o porzioni tissutali prelevati chirurgicamente) e il sito anatomico che ospita l'impianto (sub cutaneo o ortotopico).

I modelli trapiantabili, oggi, possono dividersi nei modelli singenici e nei modelli xenograft. I trapianti singenici si riferiscono a linee cellulari o tessuti stessi di topo o ratto che derivano da tumori di animali inbred con lo stesso background genetico. Gli xenograft si riferiscono al trapianto di porzioni istologicamente intatte o sospensioni cellulari di cancro umano, inclusi i tumori prelevati direttamente da pazienti. I più comunemente impiegati sono i trapianti di cancro umano in animali immunodeficienti, principalmente topi *nudi*, a livello sub cutaneo. Questi modelli risultano molto utili, anche se si pensa che gli xenograft non possono mimare pienamente l'ambiente reale per lo sviluppo tumorale⁸¹. Piuttosto, dovrebbero essere considerati uno step intermedio tra coltura cellulare e modello animale, considerando che le caratteristiche cruciali del microambiente carcinogenico sono alterate, quali tessuto sano confinante, cellule dello stroma, circolazione linfatica e vascolare, nonché il sistema immunitario.

I modelli murini transgenici forniscono un'altra possibilità per studiare le caratteristiche molecolari della cancerogenesi umana, già dagli anni '80. Le modificazioni genetiche erano indotte, facendo esprimere geni mutati endogeni o esogeni. I modelli GEM (genetically engineered models) mimano accuratamente le caratteristiche molecolari e patofisiologiche dei tumori umani e, tra questi vengono inclusi modelli transgenici, sistemi inducibili dell'espressione oncogenica, modelli knock-out e knock-in. La scelta di utilizzare i modelli GEM comporta la considerazione di parecchi svantaggi: costo elevato; difficoltà nello screening del transgene; l'uso di un promotore forte per l'overespressione del transgene, il knock-out di un gene oncosoppressore o il knock-in di un oncogene nel fegato non rispecchia il naturale sviluppo dell'HCC; il tempo di induzione tumorale è piuttosto lungo⁸⁰.

1.13.1 Dietilnitrosamina, come Carcinogeno Epatico

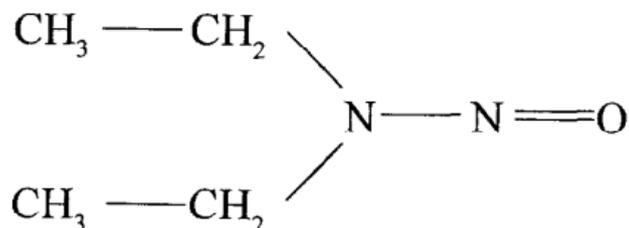


Fig 6.: Struttura chimica della dietilnitrosamina (DENA) ⁸².

L’N-Nitrosodietilamina (NDEA), conosciuta come dietilnitrosamina (DENA), è impiegata come modello chimico per lo studio della carcinogenesi umana e sebbene è evidente il collegamento tra l’esposizione al composto e l’insorgenza dell’HCC, non ci sono studi epidemiologici relativi. La NDEA è stata trovata in una grande varietà di prodotti a contatto con l’uomo, incluso il tabacco, la carne e il whiskey. L’International Agency for Research on Cancer review (IARC, 1978) gli attribuì il potenziale ruolo carcinogenico per l’uomo, nonostante la mancanza di dati epidemiologici.

Sono stati effettuati molti studi sull’azione della DENA in un ampio spettro di specie animali, incluso un saggio dose-risposta in modelli di ratto, dal British Industrial Biological Research Association (BIBRA).

L’esposizione continua alla dietilnitrosamina induceva l’insorgenza tumorale specie-specifica, ossia a seconda della specie animale risultavano colpiti dal cancro diversi tipi di organi e tessuti. Ad esempio la specie murina sviluppava neoplasie epatiche, gastrointestinali, della pelle, respiratorie ed ematopoietiche, nel ratto si rilevavano principalmente nel fegato e anche nel tratto gastrointestinale.

I saggi dose-risposta sono stati effettuati somministrando il composto chimico in dosi crescenti (0,7 to 132,5 ppm), che correlavano inversamente con i tempi di insorgenza tumorali. La relazione è matematicamente risolta nell’equazione:

$$(\text{dose rate}) \times (\text{median time to tumor})^n = \text{constant},$$

in cui il *dose rate* corrisponde alla dose giornaliera somministrata e il *median time to tumor* è il tempo medio di induzione del tumore, entrambi in scala logaritmica, con fattore *slope* $n=2,6$.

Nel 1991 è stato condotto un ampio studio presso il BIBRA in cui furono sottoposti 4080 ratti inbred Colworth Winstar a concentrazioni diverse di NDEA. 60 campioni per ciascun sesso esposti a 0.033, 0.066, 0.13, 0.26, 0.53, 1.1, 1.6, 2.1, 2.6, 3.2, 4.2, 5.3, 6.3, 8.4 o 17 ppm di NDEA, con 240 maschi e 240 femmine come controlli. Questi valori corrispondevano ad un dosaggio crescente da 0.0013 mg/kg/day a 0.66 mg/kg/day per i maschi e da 0.0022 mg/kg/day a 1.1 mg/kg/day per le femmine. Il dosaggio era rapportato al tempo di morte e al tempo di incidenza del tumore. Dai risultati ottenuti si concluse che a dosi di 0.01, 0.1 e 1 ppm di DENA, corrispondevano circa 0.25, 2.5 e 25% di ratti con neoplasie epatiche.

Il meccanismo con cui la dietilnitrosamina provoca danni cellulari, promuovendo l'insorgenza del tumore epatocellulare è suddiviso in 3 step: biotrasformazione, alchilazione e mutagenicità.

Il primo step consiste nell' α -idrossilazione, ossia l'aggiunta di gruppi $-OH$, mediata dal citocromo P450 (CYP), producendo l' α -idrossilnitrosamina. La DENA è idrossilata principalmente dall'isoforma etanolo-inducibile CYP2E1, del fegato, anche se sono stati identificati altri isozimi della famiglia dei citocromi P450. L'intermedio che si forma evolve nella forma ionica etil-diazonio, elettrofila, che si coniuga al DNA rilasciando N_2 e H_2O .

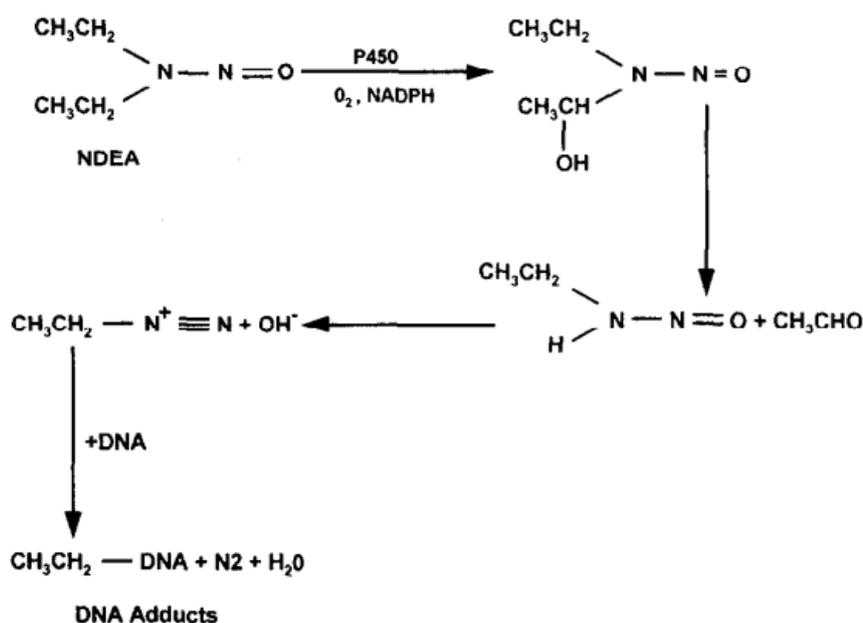


Fig 7.: Biotrasformazione di DENA e meccanismo di alchilazione del DNA ⁸².

Una volta bioattivata nell'intermedio elettrofilico, la DENA reagisce con composti nucleofili, incluse le basi di DNA. La coniugazione è dipendente dalla carica negativa individuale di ciascuna base e, considerando la densità elettronica, l'N3 della citosina risulta essere il maggior candidato in termini di reattività. Altri target identificati sono mostrati in figura 8.

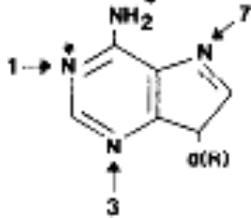
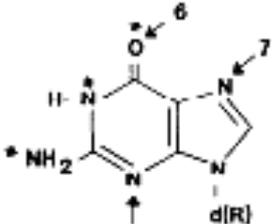
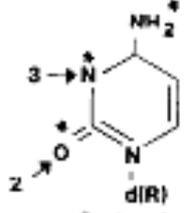
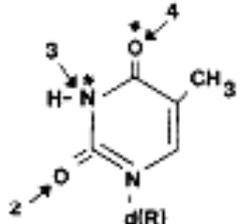
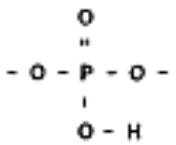
	Base Position	% Ethylation
 <p>Adenine</p>	N1	~0.1
	N3	4
	N7	0.6
 <p>Guanine</p>	N3	1.5
	O6	8
	N7	12
 <p>Cytosine</p>	O2	~0.1
	N3	0.5
 <p>Thymine</p>	O2	7
	N3	0.4
	O4	2.5
 <p>Phosphate</p>	Triester	58

Fig 8.: Posizioni e percentuali di etilazione del DNA (Singer and Grunberger 1983)⁸².

Gli studi, condotti da Singer e Grunberger nel 1983 e da Singer nel 1985, evidenziarono che il 58% degli addotti formati avvenivano a livello dell'O-H del fosfato che è libero dal legame fosfodiesterico, dove non causa un mispairing ma piuttosto una rottura del filamento.

In particolare, venne dimostrata, da Dyroff et al. nel 1986, la correlazione tra la produzione di O⁴-EtdT (CH₃CH₂-O⁴-Timina), foci positivi alla γ -glutamyl transferasi (GGT⁺) e il carcinoma epatocellulare. La base T etilata sull'O⁴ viene riconosciuta come una citosina e per tale motivo che si ha il mismatch, con incorporazione nel filamento opposto di una guanina invece dell'alanina. La mutazione che risulta è una transizione del tipo TA→CG. Lo stesso errore di lettura si ha nel caso che l'alchilazione avviene a livello dell'O⁶ di una guanina, che viene riconosciuta come un'adenina, producendo una transizione del tipo GC→AT. Gli addotti etilici portano, dunque, a mutazioni puntiformi⁸³. L'esposizione alla DENA provoca mutazioni in oncogeni e oncosoppressori, quali k-ras, h-ras e p53⁸².

1.13.2 Conclusioni Dietilnitrosamina

L'utilizzo della DENA per indurre l'epatocarcinogenesi è particolarmente indicato quando si vuole studiare l'andamento della neoplasia in seguito ad uno stato d'infiammazione, in cui vengono prodotte le specie reattive dell'O e dell'N, ROS e RNS. Infatti, come detto sopra, la bioattivazione in seguito a detossificazione porta alla produzione di una molecola altamente reattiva, in grado di coniugarsi al DNA ed indurre, in tal modo, mutazioni puntiformi. Le ROS e le RNS, quando è presente uno sbilanciamento tra produzione e distruzione nei meccanismi cellulari, provocano delle modifiche in diversi compartimenti cellulari, citoplasma e nucleo, più tardivamente, compresi gli organelli, come i mitocondri. Questa condizione di stress metabolico si raggiunge in seguito ad uno stato d'infiammazione. Inoltre, la DENA, attraverso la simulazione di uno stress ossidativo, sembra mimare la condizione in cui l'organismo si trova in seguito ad infezione da HCV. Infatti è stato evidenziato che la Core protein del virus dell'epatite di tipo C, si localizza nel citoplasma, nel nucleo e nei mitocondri, dove induce una sovrapproduzione di ROS²⁵.

2. SCOPO DELLA TESI

L'epatocarcinoma umano (HCC) è il tumore epatico più comune e, rappresenta il 90% tra i tumori epatici primitivi. Negli ultimi 20 anni le tecniche chirurgiche di ultima generazione e i trattamenti pre-operatori hanno portato ad una diminuzione delle morti (nei 30 giorni dopo l'intervento) del 2,5%. Nonostante tale miglioramento, l'epatoectomia curativa dell'epatocarcinoma cellulare non viene considerato un approccio totalmente soddisfacente, rispetto agli altri tumori solidi, a causa dell'alta incidenza delle recidive. Si è riscontrato un tasso di ricorrenza, all'interno dei 5 anni post-operatori, del 61,5%⁷⁹. Per tale motivo si sta cercando di potenziare le opportunità di sopravvivenza di tale approccio, associando dei trattamenti di prevenzione, per i quali sono stati condotti una serie di trials randomizzati (RCT). L'associazione dei trattamenti chemioterapici è la più comune strategia per ridurre la ricorrenza del cancro, dopo la resezione operatoria nella maggior parte dei tumori solidi. Questo approccio non ha mostrato degli esiti positivi nell'HCC⁷⁹.

Recentemente, grazie alle caratterizzazioni, sempre più dettagliate, dei pathway cellulari coinvolti nella carcinogenesi epatica, sta crescendo l'interesse verso le *targeted therapy*, ossia terapie mirate contro specifiche molecole direttamente implicate nella tumorigenesi e nella proliferazione cellulare, piuttosto che farmaci che colpiscono semplicemente cellule in divisione, come i chemioterapici. Questo tipo di terapie, di ultima generazione, risulta maggiormente efficiente e specifica, nonché meno dannosa per le cellule non tumorali.

Sorafenib (NEXAVAR) è una piccola molecola che rientra in questa categoria, inibitore di diverse proteine tirosin chinasi (VEGFR e PDGFR) e serin-treonin chinasi (cRAF e bRAF). Il trial SHARP (*Sorafenib Hepatocellular Carcinoma Assessment Randomized Protocol*) ha dimostrato l'efficacia del Sorafenib nel rallentare la progressione del tumore e una buona tolleranza del paziente al trattamento⁷¹.

Lo scopo del nostro lavoro è stato valutare il potenziale utilizzo del sorafenib come terapia adiuvante per la prevenzione di recidive in seguito alla resezione dell'HCC, mediante l'uso di un modello sperimentale di ratto.

La scelta del modello in vivo si è basata sulle similitudini anatomiche e fisiologiche del fegato di ratto con quello umano e su alcuni pathway comuni implicati nei meccanismi predisponenti l'HCC, come infiammazione cronica e stress metabolico, ossidativo e nitrosativo.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Colture Cellulari.

La linea cellulare ARL-6 di epatoma di ratto (Wistar), utilizzata come controllo dell'espressione genica, è stata ottenuta dal European Collection of Cell Cultures (ECACC Health Protection Agency, UK.) ed è stata coltivata in terreno di coltura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium-GIBCO), addizionato con 10% Siero fetale bovino (FBS) scomplementato a 56°C per 30 minuti, L-glutammina, 100U/ml di penicillina e 100mg/mL di Streptomicina e mantenute nell'incubatore a 37°C in atmosfera umidificata al 5% di CO₂.

Per la preparazione di pellets cellulari destinati all'estrazione dell' RNA e all'estrazione proteica, le cellule sono state raccolte in falcon da 15ml e centrifugate a 1200 rpm a 4°C per 5'. Eliminato il surnatante, le cellule sono state risospese in PBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline; Invitrogen) a 4°C, trasferite in eppendorf e nuovamente centrifugate a 7500 rpm a 4°C per 2'. Una volta eliminato il surnatante, i pellets sono stati congelati istantaneamente in azoto liquido e conservati a -80°C.

3.2 Modello Animale

Sono stati utilizzati 20 ratti albini Wistar, di sesso maschile, di circa 125-150 grammi di peso corporeo, ottenuti dall'Harlan Italia (Udine, Italia). Gli animali sono stati stabulati presso lo stabulario della facoltà di veterinaria dell'Università di Bologna, ad Ozzano dell'Emilia, alla temperatura controllata di 20-22 °C. Hanno ricevuto una dieta a base di pellet contenenti cereali ed acqua, *ad libitum*. Tutti gli esperimenti sono stati svolti nel rispetto delle norme legislative della comunità europea sulla sperimentazione animale, e i protocolli degli esperimenti sono stati approvati dalla commissione etica dell'Università di Bologna.

I ratti hanno ricevuto la DENA (Sigma Chemicals, St. Louis, MO, USA) disciolta nell'acqua ad una concentrazione di 100 mg/L per otto settimane. Al termine del trattamento con la DENA 14 ratti che non avevano sviluppato tumore sono stati divisi in due gruppi da 7 in modo casuale. Un gruppo è stato trattato per 10 giorni con sorafenib a dosi di 60 mg/kg, tramite gavaggio. Il sorafenib è stato ottenuto dalla Bayer-Schering Pharma e la soluzione

finale era composta in etanolo 95% / 50% Cremophore (Sigma) / 50% sorafenib 4X. Il secondo gruppo parallelamente ha ricevuto il Cremophore, come veicolo. Alla fine del trattamento, gli animali sono stati sacrificati, il fegato è stato prelevato e sezionato. I pezzi ottenuti sono stati in parte congelati all'istante in azoto liquido e in parte fissati in formalina.

3.3 Estrazione Proteica

I campioni di fegato congelati sono stati omogenizzati in un buffer di lisi costituito da 10mM Tris-HCl pH 7.4, 2.5mM NaCl, 0.5%, Triton X100, 1mM DTT, 1mM di PMSF (Fenil metil sulforanil fluoride) e da un mix di inibitori di proteasi, utilizzando dei pestelli. I lisati sono stati lasciati in ghiaccio per 10'. Gli omogenati sono stati centrifugati a 15000 rpm per 30' a 4°C. Il sovrantante è stato raccolto e la concentrazione proteica determinata mediante il metodo di Lowry.

3.4 Western Blot.

Gli estratti proteici (50 µg per campione) sono stati incubati a 95°C per 10 minuti in presenza di sample buffer 2X(65mM Tris-HCl pH 7.5, 65mM 2-mercaptoetanol, 1% SDS, 10% glicerolo, 0.003% di blu di bromo fenolo, 200mM DTT). Successivamente le proteine sono state caricate su gel di poliacrilammide a opportune percentuali, in base al peso molecolare della proteina di interesse, e separate, mediante elettroforesi, in Running Buffer (25mM Tris, 0.2mM Glicina, 0.1% SDS) ad amperaggio costante tra 10 e 30mA. Al termine della corsa le proteine sono state trasferite su membrana di nitrocellulosa (Amersham Bioscience, Milano) in presenza di Transfer Buffer 0.2M glicine, 25mM Tris e 20% Metanolo a pH 8.5, in un campo elettrico costante di 300mA a 4°C per 2h e 30min. Una volta avvenuto il trasferimento delle proteine, le membrane sono state incubate con 5% di latte scremato in PBS per 45' per la copertura dei siti aspecifici, dopodichè incubate in PBS-Tween 0,1% in presenza dei seguenti anticorpi primari.

<i>Anticorpo I</i>	<i>Caratteristiche</i>	<i>Peso Molecolare</i>	<i>Ditta</i>	<i>Diluizione</i>
Notch 3	policlonale	97kDa	Santa Cruz (clone M-134)	1:1000
p21	monoclonale	21kDa	Santa Cruz (clone F-5)	1:500
p-ERK1/2	monoclonale	42/44kDa	Cell Signaling	1:300
pAKT	policlonale	60 kDa	Cell Signaling (clone D9E)	1:200
p-GSK3 β (Ser 9)	policlonale	46kDa	Cell Signaling (clone 5B3)	1:250
Bax	policlonale	20 kDa	Cell Signaling	1:500
PCNA	monoclonale	36 kDa	DAKO (clone PC10)	1:400
CD31	policlonale	76 kDa	Cell Signaling	1:500
β -actina	monoclonale	42 kDa	Santa Cruz (clone C4)	1:1000

Dopo l'incubazione over/night con l'anticorpo primario, la membrana è stata lavata in PBS-Tween 0,1%, per essere successivamente incubate con anticorpi secondari anti-Mouse o anti-Rabbit, a seconda dell'anticorpo primario utilizzato, coniugati con HRP (HorseRadish Peroxidase, EnVision, DAKO, Denmark), per 50' in agitazione a temperatura ambiente.

Dopo 3 lavaggi con PBS-tween, le membrane vengono nuovamente incubate con anticorpi secondari coniugati con perossidasi (Envision DAKO, Denmark) per 50' a temperatura ambiente.

La detection è stata effettuata con ECL (GE Healthcare-Amersham), il segnale visualizzato mediante autoradiografia e la quantificazione con densitometria ottica (Quantity One, Biorad).

Tutti i valori delle quantificazioni, sono stati normalizzati con i valori relativi alla β -actina di ciascun campione caricato.

3.5 Estrazione RNA.

Il protocollo utilizzato per l'estrazione è basato sul reagente Trizol[®], una miscela di fenolo e guanidina isotiocinato che mantiene integro l'RNA, mentre distrugge le cellule e dissolve i componenti cellulari.

L'estrazione dell'RNA da tessuti congelati conservati a -80°C è stata effettuata mediante l'iniziale polverizzazione con bisturi monouso. Essi sono stati omogeneizzati in presenza di Trizol[®] (Invitrogen) e utilizzando siringhe monouso per la disaggregazione meccanica e l'omogenizzazione. È stato poi aggiunto cloroformio in rapporto 1:5 rispetto al Trizol, per permettere la separazione delle fasi. In seguito a centrifugazione a 12000 rpm per 10' a 4°C , è stata prelevata la fase acquosa contenente RNA e trasferita in eppendorf RNase free. Successivamente è stato aggiunto isopropanolo in rapporto 1:2 rispetto al Trizol iniziale, per poter separare le proteine dall'RNA nella fase acquosa, ottenuta per ulteriore centrifugazione a 12000rpm per 10'. Il pellet di RNA ottenuto è stato quindi lavato con EtOH 70% rimosso per centrifugazione alle stesse condizioni sopradescritte e risospeso in acqua DEPC (Diethyl Piro Carbonato) 0,01%. L'RNA è quindi stato stoccato a -80°C .

3.6 Retro-Trascrizione.

La retrotrascrizione (RT) permette la sintesi di una molecola di cDNA a partire da una molecola di RNA stampo. La reazione è catalizzata dall'azione dell'enzima Trascrittasi inversa, una DNA-polimerasi RNA dipendente, che sintetizza una molecola di DNA complementare (cDNA) all'mRNA di partenza. La reazione è stata sviluppata utilizzando 1 µg di RNA in un volume di reazione di 20µL, contenente H₂O DEPC, OligodT Primers, Random primers, Improm-II Buffer5X, MgCl₂ (25mM), DNTPs (10mM), RNasi Inhibitor (20U) e Improm-II RT (trascrittasi inversa). La reazione di retrotrascrizione è stata condotta con il termociclo mostrato in tabella:

<i>Step</i>	<i>Temperatura</i>	<i>Tempo</i>
1	25 °C	5'
2	42°C	60'
3	70°C	15'
4	4°C	∞

Fig 3.1 : Termociclo di retrotrascrizione

Le reazioni di PCR per ciascun gene, sono state normalizzate con i valori relativi del gene della β -actina. Primers e condizioni di amplificazione per le diverse PCR sono riportate in tabella:

<i>Gene</i>	<i>Primers (5' – 3')</i>	<i>Temp. Annealing</i>
SOD1	Fw 5'-GGGCAAAGGTGGAAATGAAGAAAG-3' Rv 5'-ACAGTTTAGCAGGACAGCAGATG-3'	60°C
SOD2	Fw 5'-GAGGAGAGCAGCGGTCGTG-3' Rv 5'-CCATAGTCGTAAGGCAGGTCAGG-3'	60°C
SOD3	Fw 5'-AGAACGGCAACGCAGGTCG-3' Rv 5'-CGCTCCTTTGTCTGGCTCTCC-3'	60°C
CAT	Fw 5'-GCTCCCAACTACTACCCCAACAG-3' Rv 5'-TCGTATAGAATGTCCGCACCTGAG-3'	60°C
Casp3	Fw 5'-TGCGGTATTGAGACAGACAGTGG-3' Rv 5'-TGACCCGTCCCTTGAATTTCTCC-3'	60°C
Xiap	Fw 5'-GTAATCAGCATCGCAGTCCATTAGC-3' Rv 5'-CGGGCATTTCAGATCCAGAAATTCG-3'	60°C
c-Flip	Fw 5'-TGGACCTGGTGATTGAACTGGAG-3' Rv 5'-TCTTGGCTGGACTGCGTGTAC-3'	60°C
Stat3	Fw 5'-TGAGTGAGCGTGGGTGATGC-3' Rv 5'-GGAGGACAGGCGGACAGAAC-3'	60°C
Kdr	Fw 5'-GCGATGTTAGTGCTTTGTGTGTTG-3' Rv 5'-TTGCTCCTTCCTTCTTACCAGTCC-3'	60°C

GAPDH	Fw 5'-CTCTACCCACGGCAAGTTCAAC-3' Rv 5'-GACATACTCAGCACCAGCATCAC-3'	60°C
β -actina	Fw 5'-CTATCGGCAATGAGCGGTTCC-3' Rv 5'-GCACTGTGTTGGCATAGAGGTC-3'	60°C

Step		Temperatura (°C)	Tempo (min)
1. Attivazione <i>Taq-Gold</i>		94.0	10:00
Cicli (**)	2. Denaturazione (apertura del DNA)	94.0	0:30
	3. Annealing primer	(*)	0:30
	4. Estensione primer (sintesi di una nuova elica di DNA)	72.0	0:30
5. Estensione finale degli ampliconi		72.0	7:00
6.		4.0	∞

Fig 3.2. Termociclo della reazione di PCR

(**) Si ripetono i cicli di denaturazione, annealing, estensione per 25-30 volte.

(*) La temperatura di annealing è specifica per ogni coppia di primer, e dipende dalla loro dimensione e sequenza, è riportata in tabella della fig 3.1.

I prodotti di PCR sono poi separati mediante corsa elettroforetica su gel d'agarosio al 2% addizionato di Bromuro d'etidio 0,01%, e quantificati tramite analisi fluorimetrica (Quantità One, BIORAD).

3.7 Real Time-PCR

Sull'RNA totale estratto e retro trascritto in cDNA è stata eseguita la quantificazione dell'mRNA utilizzando il sistema iCycler (BioRad), un unico strumento risultante dalla combinazione di un termociclatore, di un rilevatore a fluorescenza laser e di software applicativi specifici. La reazione di amplificazione è stata condotta utilizzando come sistema rilevatore il SYBR[®] Green, un intercalante che presenta una minima fluorescenza nella

miscela iniziale ed emette a 520 nm, quando si lega al DNA double strand. L'intensità di fluorescenza dipende dunque dalla quantità iniziale del campione. L'emissione durante l'amplificazione di PCR è analizzata dal software, che costruisce la curva di amplificazione. Le misurazioni dal 3° al 15° ciclo sono considerate rumore di fondo (livello di base) e su questi è calcolata la deviazione standard. La fluorescenza relativa di ciascun campione viene analizzata mediante il *threshold cycle* (C_t), corrispondente al ciclo al quale il campione emette una fluorescenza che supera un valore soglia. La fluorescenza viene misurata durante la fase di amplificazione lineare in cui nessun segnale si trova a saturazione.

Il segnale fluorescente emesso da ciascun campione durante l'amplificazione, viene rappresentato con una curva di colore diverso. Il punto in cui ciascuna curva interseca la linea relativa al valore soglia, rappresenta il C_t di ciascun campione (Fig. 3.3). Alle concentrazioni iniziali dei campioni si risale interpolando il ciclo soglia sulla curva standard, creata con concentrazioni note di uno standard.

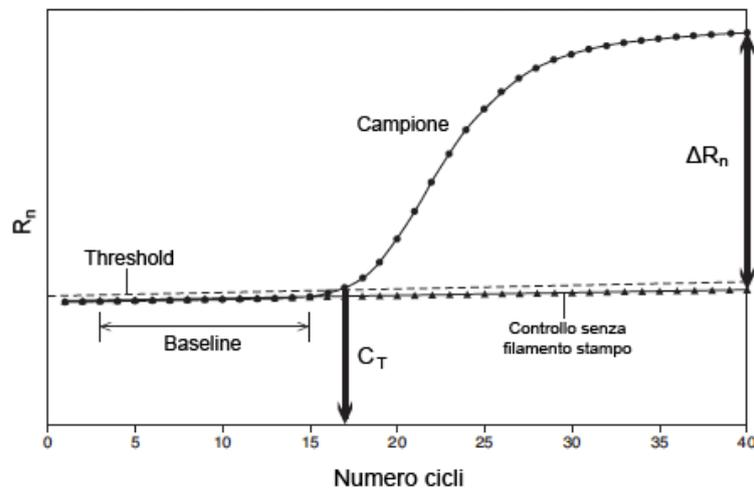


Figura 3.3: Curva di amplificazione del segnale in Real Time PCR

La reazione di amplificazione è stata eseguita in un volume finale di 25 μL in una miscela costituita da 12,5 μL di 2X iQSybr Green Supermix (BioRad), 1 μL (0,2 μM) di primers senso ed antisenso, 2 μL di cDNA ed acqua MilliQ. La fase di denaturazione a 95°C per 10 minuti è stata seguita da 50 cicli di denaturazione per 15 secondi e di appaiamento alla temperatura richiesta dai primers per 30 secondi. Ogni campione è stato analizzato in triplicato. Le coppie

dei primers sono state disegnate usando BioRad Beacon Designer 2.0 Software e sintetizzate da Tema Ricerche (Bologna).

La quantificazione dei cambiamenti d'espressione genica è stata calcolata paragonando i valori ottenuti con il metodo $\Delta\Delta Ct$. Per la normalizzazione dei valori dei geni presi in esame, è stata valutata l'espressione dei geni housekeeping β -actina e GAPDH.

3.8 Saggio di Immunoistochimica

I pezzi da analizzare mediante immunoistochimica, provenienti dalle sezioni epatiche di ratti, sono stati fissati immediatamente in formalina, e successivamente inclusi in paraffina. Le sezioni di 4 μ m di spessore sono state raccolte su vetri silanati, ossia carichi elettrostaticamente per evitare che gli smascheramenti causino un distacco della stessa. Le sezioni sono state sparaffinate in toluene mediante 2 passaggi successivi di 15' ciascuno e idratate nella scala decrescente degli alcoli. L'inibizione delle perossidasi endogene è stata fatta in metanolo (MetOH) + 1% H₂O₂, a 4°C per 20'. Lo smascheramento antigenico, per ripristinare le caratteristiche antigeniche del tessuto, alterate dalla fissazione e dalla processazione, è stato condotto in tampone citrato (ph 6.0 0,01M, costituito da acido citrico 0,1M e sodio citrato tribasico biidrato 0,1M), nella pentola a pressione a 120°C per 15'. Successivamente i vetri sono stati incubati con anticorpo primario (pERK e PCNA), per tutta la notte in camera umida, a 4°C. Dopo opportuni lavaggi in PBS le sezioni sono state incubate con l'anticorpo secondario appropriato (Envision, Dako), per 30' a temperatura ambiente. Lo sviluppo, che permette di valutare la reazione antigene-anticorpo, è stato fatto utilizzando come cromogeno la Diamminobenzidina (DAB). 1mL di DAB al 5% è stata diluita in 99 mL di PBS con aggiunta di 150 μ L H₂O₂ al 3%. Le sezioni sono state contrastate in ematossilina, disidratate nella scala crescente degli alcoli e montate in DPX (BDH Chemical, Poole, UK).

3.9 Statistical analysis

Le differenze di espressione genica e proteica tra i ratti veicolo e i ratti trattati con sorafenib è stata valutata mediante il test t di Student a due code. I dati sperimentali sono espressi come media $E \pm SE$ (errore standard). Il test parametrico di Pearson e non parametrico di Sperman sono stati utilizzati per analizzare le correlazioni tra l'espressione delle diverse proteine. Il

valore di P minore di 0.05 è stato considerato statisticamente significativo. L'analisi statistica è stata fatta utilizzando la versione 19 di SPSS.

L'analisi statistica Wisker Box Plot è stata ottenuta mediante software Graphpad Prism5. Per ogni gene sono rappresentati: le osservazioni tra il 10 e il 90 percentile (rettangolo) con esclusione dei valori al di fuori, il valore minimo e massimo (linea a T sopra e sotto il rettangolo) e la mediana (riga interna al rettangolo).

4. RISULTATI

4.1 Effetto del Sorafenib nella Regolazione dell'Espressione Genica

Il trattamento con la DENA induce un aumento della produzione dei radicali liberi dell'ossigeno, mimando ciò che avviene in un tessuto epatico danneggiato in seguito ad uno stato d'infiammazione. Per valutare l'effetto del trattamento con sorafenib sull'espressione di geni che subiscono alterazioni in seguito al trattamento con la DENA, abbiamo valutato, mediante analisi di Real Time-PCR, il livello di espressione di 4 geni, i cui prodotti fanno parte della difesa anti-ossidativa di cui la cellula è dotata, Sod-1, Sod-2, Sod-3 e Cat. I nostri dati, riportati nel grafico della fig.1, non mostrano alcuna differenza significativa tra i livelli del messaggero di Sod-2, Sod-3 e Cat tra i ratti trattati col sorafenib e i veicoli. Al contrario, il sorafenib induce un aumento significativo ($p=0,0135$) dell'espressione del gene Sod-1, rispetto al veicolo.

Successivamente abbiamo valutato, mediante lo stesso saggio di Real Time-PCR, l'espressione di 3 geni implicati nei pathway apoptotici, Caspasi-3, Xiap, suo inibitore, e c-Flip, inibitore della Caspasi-8. Nel grafico della fig 1. si può apprezzare una riduzione significativa ($p=0,0116$) dei livelli di messaggero della Caspasi-3 nei campioni dei ratti trattati col farmaco rispetto ai veicoli. Nessun cambiamento rilevante è stato riscontrato nei trascritti di c-Flip e di Xiap. Infine abbiamo analizzato l'espressione genica di Stat3 (signal transducer and activator of transcription-3), che blocca l'apoptosi, inibendo indirettamente la cascata delle caspasi⁸⁵, e di Kdr/Flk-1 (o VEGFR-2), recettore del ligando VEGF, quindi è un utile marker angiogenetico. Per entrambi i geni abbiamo ottenuto dei risultati significativi: un aumento dell'espressione genica di Stat3 ($p=0,0115$) e una riduzione di Kdr ($p=0,0398$) nei trattati col sorafenib, rispetto ai veicoli.

4.2 Effetto del Sorafenib nella Modulazione dei Livelli Proteici di Marker Implicati in Diversi Pathway Cellulari

Per capire se il trattamento farmacologico avesse un effetto simile a quello riscontrato nei numerosi studi descritti ampiamente in letteratura, in cui il sorafenib trova spazio come

terapia antitumorale, siamo andati ad analizzare eventuali cambiamenti nello stato di fosforilazione di bersagli già noti, come ERK-1/2 e AKT. Inoltre sulla base dei risultati ottenuti dal nostro precedente studio, in cui abbiamo osservato come il trattamento con sorafenib riduce l'espressione di p21 ed aumenta i livelli pGSK-3 β (Ser9) in linee cellulari di HCC, abbiamo valutato la loro espressione nel nostro modello di ratto in assenza e in presenza di trattamento con sorafenib. Infine vista l'attività citostatica, citotossica e anti-angiogenetica del sorafenib⁷²⁻⁷³, abbiamo analizzato l'espressione proteica di PCNA, CD31 e Bax. L'analisi è stata condotta attraverso saggi di western blotting, i cui risultati sono riportati nelle immagini della figura 2.

I dati ottenuti non mostrano cambiamenti significativi sulla base dell'analisi statistica, probabilmente dovuto al basso numero di animali trattati. Tuttavia, come si evince dai grafici della figura 3 (A e B), si delinea una tendenza alla diminuzione di p21 e un'up-regolazione di pGSK-3 β (Ser9), negli animali trattati rispetto ai veicoli. Una riduzione dell'espressione proteica si osserva anche per PCNA e per CD31. Nessuna modifica si rileva nell'analisi dei due bersagli noti del farmaco, pERK e pAKT, così come per il marker pro apoptotico Bax, lasciando ipotizzare che il farmaco non agisce per la via intrinseca del pathway apoptotico(dato ottenuto anche nel lavoro antecedente a questo). I dati ottenuti pur essendo privi di potere statistico, sono indicativi su come il sorafenib tende ad agire in un tessuto non tumorale, ma talmente danneggiato da essere potenzialmente pre-neoplastico.

Sono state analizzate, inoltre, se esistevano delle correlazioni fra l'espressione delle diverse proteine e, soprattutto, se si verificavano cambiamenti nelle correlazioni proteiche fra i veicoli e i trattati sorafenib. Sono state effettuate due tipi di misure statistiche di correlazione, il test di Pearson (parametrico) e il test rho di Spearman (non parametrico). Nei grafici A e B della figura 4, risulta una correlazione inversa significativa ($p=0,05$) tra pERK e CD31 nei trattati sorafenib, ma non nei veicoli. Nei grafici C e D viene mostrata una correlazione diretta significativa ($p=0,05$) tra pAKT e Bax nei trattati sorafenib, ma non nei veicoli. Nei grafici E e F, è stata riportata l'esistenza di una correlazione significativa ($p=0,01$) inversa nei veicoli tra pGSK-3 β e Bax, ma non nei trattati col sorafenib. Una correlazione diretta significativa ($p=0,05$) si ottiene nei trattati sorafenib tra pGSK-3 β e p21, ma non nei veicoli, come mostrato nei grafici G e H della figura 4. Infine si riporta nei grafici I e L una correlazione inversa significativa ($p=0,01$) tra PCNA e p21 nei non trattati, che viene meno nei trattati con

il sorafenib, probabilmente in seguito alla diminuzione indotta dal farmaco di entrambi i livelli proteici, come appare nei grafici A e B della figura 3.

Quest' ultima correlazione mostra come p21, quale inibitore dell'avanzamento del ciclo cellulare, abbia un andamento inverso rispetto a PCNA, antigene di proliferazione, nei veicoli e questo è idoneo con le loro funzioni principali, perché una è opposta all'altra. Nei campioni trattati col farmaco non viene mantenuto tale andamento, dato che i livelli proteici tendono a diminuire in entrambi i casi ma con una intensità diversa, maggiore in PCNA rispetto a p21.

4.3 Valutazione immunoistochimica

L'immunoistochimica è stata condotta per valutare la localizzazione proteica di pERK1/2 e l'espressione, nonché distribuzione di PCNA. Le immagini delle figure 5 e 6 mostrano come il tessuto dei controlli, rispetto alle sezioni epatiche dei trattati sorafenib, appare maggiormente danneggiato. Inoltre è apprezzabile notare nelle immagini in figura 6 come la positività all'antigene di proliferazione PCNA sia maggiore e soprattutto più omogeneamente distribuita nelle sezioni dei veicoli (A, C, E), rispetto a quelle dei fegati dei ratti riceventi la terapia farmacologica (B, D, F). Per quanto riguarda la reattività all'anticorpo contro la forma fosforilata di ERK-1/2, nelle immagini della figura 5, si può osservare come tra i veicoli (A, C, E) e i trattati con il sorafenib (B, D, F) non ci siano differenze significative né come espressione proteica né nella localizzazione della stessa. Si può però apprezzare una positività più intensa a tale antigene negli epatociti in prossimità dei vasi dei fegati riceventi il farmaco. I risultati del saggio di immunoistochimica ci confermano ciò che abbiamo ottenuto dall'elaborazione dei dati del western blotting.

5. DISCUSSIONE

Il carcinoma epatocellulare (HCC) è la forma di cancro più diffusa che colpisce il fegato e la sua incidenza riflette quasi interamente la mortalità. L'alta prevalenza risulta dall'elevata frequenza nelle popolazioni di sviluppare danni epatici cronici, in seguito ad epatiti e/o cirrosi ⁸⁶. La mancanza iniziale di sintomi non permette una diagnosi precoce e dunque un tempestivo intervento per combattere la neoplasia. Infatti, l'HCC è una forma di cancro potenzialmente curabile attraverso resezione chirurgica o trapianto epatico, purtroppo la maggior parte dei pazienti presentano la patologia ad uno stadio avanzato, accompagnata da un tessuto circostante fortemente danneggiato ⁸⁷.

Quando un caso di HCC viene diagnosticato ad uno stadio relativamente precoce, in cui rimane preservata la funzionalità epatica, l'approccio più indicato e che offre una maggiore percentuale di sopravvivenza post operatoria è la resezione chirurgica ⁵⁷. Nonostante i continui progressi delle tecniche chirurgiche, di diagnosi non tardive (tramite nuovi strumenti diagnostici, come l'ultrasonografia⁵³), il tasso di 'morbidity' dei pazienti sottoposti a resezione epatica rimane comunque molto alto, del 30-60% ⁵⁹.

Dunque, rispetto agli altri tipi di tumori solidi, la prognosi a lungo termine (5 anni dopo l'intervento chirurgico) rimane comunque insoddisfacente, a causa dell'alta incidenza delle recidive intraepatiche.

Per tale motivo si sta cercando di potenziare le opportunità di sopravvivenza in seguito a resezione epatica, associando dei trattamenti di prevenzione, per i quali sono stati condotti una serie di trials randomizzati (RCT) ⁷⁹.

Il nostro studio è stato proposto per valutare il potenziale utilizzo del sorafenib come terapia adiuvante in seguito alla resezione dell'HCC, mediante l'uso di un modello sperimentale di ratto. Inoltre sorafenib ha mostrato un'azione antifibrotica, inibendo l'accumulo di materiale della matrice extracellulare ⁸⁴ e, dunque, potrebbe essere identificato anche come terapia di prevenzione dell'HCC in pazienti affetti da cirrosi.

Per poter valutare se il sorafenib, oltre alla sua attività antitumorale, avesse degli effetti benefici nel prevenire recidive intraepatiche, in seguito a resezione chirurgica, e lesioni

neoplastiche *de novo* in un background cirrotico, abbiamo utilizzato la DENA, come modello sperimentale di epatocarcinogenesi. L'induzione chimica permette di riprodurre lo sviluppo tumorale dall'iniziazione dei cloni maligni, alla promozione e, infine, alla progressione⁸⁰. Detossificazione e conseguente bioattivazione della DENA portano alla produzione di una molecola talmente reattiva e nociva da essere in grado di alchilare il DNA ed indurre mutazioni⁸². La scelta di utilizzare la DENA tra i vari modelli chimici si è basata sulle caratteristiche del danno epatico che risultano comuni in seguito a trattamento con la dietilnitrosamina e alle epatiti virali, dove risulta aumentata la sintesi di nitrati e nitrosamina⁹⁵. L'utilizzo della DENA per indurre l'epatocarcinogenesi è particolarmente indicato quando si vuole studiare l'andamento della neoplasia in seguito ad uno stato d'infiammazione, in cui vengono prodotte le specie reattive dell'O e dell'N, ROS e RNS. Inoltre, la DENA, attraverso la simulazione di uno stress ossidativo, sembra mimare la condizione in cui l'organismo si trova in seguito ad infezione da HCV. Infatti è stato evidenziato che la Core protein del virus dell'epatite di tipo C, si localizza nel citoplasma, nel nucleo e nei mitocondri, dove induce una sovrapproduzione di ROS²⁵.

I risultati ottenuti mostrano come il sorafenib induce la cellula a rispondere allo stato d'infiammazione e di stress ossidativo, potenziando il sistema di difesa antiossidativa, attraverso l'overespressione del gene Sod-1. In letteratura ci sono diversi lavori che attribuiscono un ruolo importante alla sovrapproduzione di ROS negli eventi precoci dell'epatocarcinogenesi, tra questi lo studio di risonanza paramagnetica elettronica (o Risonanza di Spin elettronico) condotto da Valgimigli *et al.* nel 2002 su pazienti affetti da epatiti croniche e a differenti stadi di trasformazione maligna. L'overespressione delle SODs in cellule neoplastiche mostra una ridotta aggressività tumorale e attività metastatica⁸⁸. Inoltre, studi clinici su pazienti a diversi stadi di HCC riportano una forte correlazione tra i bassi livelli di SOD e la severità tumorale. Infine, è stato pubblicato nel 2001 un lavoro di Lin che correla positivamente l'attività antiossidativa di SOD, nei tumori e nei tessuti normali circostanti, con il tempo di sopravvivenza post-operatoria nei pazienti affetti da HCC. Queste scoperte attribuiscono un ruolo benefico antitumorale e preventivo al potenziamento dell'attività antiossidativa cellulare e dunque, il sorafenib, inducendo un aumento dell'espressione di Sod-1, mostra un effetto positivo contro lo stress ossidativo.

Un'altra condizione predisponente la carcinogenesi, riguarda la capacità proliferativa cellulare. L'importanza della divisione cellulare nell'induzione della carcinogenesi è stata ampiamente caratterizzata nel fegato di ratto^{89,90,91,92}. Il fegato di ratto, nonostante manifesti

resistenza a sviluppare tumori, aumenta la propria suscettibilità, quando la proliferazione epatocitica è indotta da un carcinogeno o da PH (partial hepatectomy). Inoltre sembra che i tassi di divisione cellulare e apoptotici siano aumentati nella progressione da adenoma a carcinoma, questo per fornire un vantaggio selettivo di crescita alle sub-popolazioni fortemente maligne⁹³. Basandoci sui lavori sopra citati, siamo andati ad analizzare entrambi questi aspetti, valutando l'espressione proteica di PCNA, quale marker di proliferazione, l'espressione genica di Caspasi-3, Xiap e c-Flip, e proteica di Bax, per i pathway apoptotici. I nostri risultati mostrano una tendenza alla riduzione dei livelli proteici di PCNA e una diminuzione significativa dei livelli di mRNA della caspasi-3, nei campioni degli animali trattati rispetto ai veicoli. Questi dati risultano in linea con gli studi precedentemente descritti e con il profilo di danno epatico indotto dal consumo della DENA (20 mg/kg). L'alta patogenicità della dietilnitrosamina, il cui effetto nocivo si estende ampiamente per tutto l'organo, comporta l'attivazione dei pathway apoptotici, che significa una perdita consistente e continua di popolazioni cellulari. Questa progressiva morte cellulare viene recepita come uno stimolo mitogenico immediato di proliferazione, che favorisce la crescita di epatociti 'iniziati', e conseguente espansione di cloni potenzialmente maligni. Facendo tali considerazioni, la terapia con il sorafenib, potrebbe risultare estremamente utile nell'ostacolare i primi step dell'epatocarcinogenesi.

I risultati del saggio di immunostochimica ci confermano ciò che abbiamo ottenuto dall'elaborazione dei dati del western blotting. Basandoci sui dati ottenuti da studi precedenti condotti sempre sulla valutazione della risposta epatocitica al sorafenib, possiamo ipotizzare che l'inibizione del pathway RAF/MEK/ERK indotta dall'inibitore multichinasi, avvenga all'inizio del trattamento e, in seguito ad una terapia prolungata, vengano ripristinati i livelli di pERK, che comunque in un tessuto non tumorale non sono ancora alti, ma che in tal modo vengono mantenuti "stabili".

Il ruolo dell'angiogenesi nell'insorgenza dell'HCC a partire da lesioni pre-neoplastiche è stato comprovato da numerosi lavori, inducendo vari studiosi a valutare il ruolo di VEGF nello sviluppo dell'epatocarcinoma. Le ipotesi furono confermate quando venne dimostrata una forte associazione tra la crescita di espressione tissutale di VEGF e la progressione graduale dell'epatocarcinogenesi⁹⁴.

La natura ipervascolare dell'HCC, quindi, ha portato i gruppi di ricerca che studiano la neoplasia a sviluppare un interesse sempre maggiore verso le terapie antiangiogeniche. In risposta a tale caratteristica, stanno emergendo una nuova classe di agenti terapeutici inibitori

dell'angiogenesi, come il Bevacizumab, anticorpo monoclonale umanizzato contro VEGF, da combinare alla chemioterapia.

Per tale motivo, siamo andati a valutare se anche il sorafenib, identificato originariamente come inibitore di Raf e successivamente anche di recettori tirosin chinasi esposti sulla superficie endoteliale, avesse un effetto benefico nel prevenire lo sviluppo dell'HCC, ostacolando i meccanismi angiogenici fondamentali nello stadio precoce dell'epatocarcinogenesi. Analizzando l'espressione genica del recettore Kdr/Flk-1, attraverso il saggio di Real Time-PCR, abbiamo riscontrato una riduzione significativa nei campioni degli animali riceventi il farmaco rispetto ai veicoli. I livelli proteici di CD31, valutati mediante western blot, hanno mostrato una riduzione dell'espressione nei trattati sorafenib rispetto ai veicoli, dimostrando un'azione positiva del sorafenib nel prevenire la neo-angiogenesi, di cui necessita il tumore per il proprio sviluppo.

Inoltre, sono state analizzate eventuali correlazioni tra l'espressione proteica di diverse proteine e, soprattutto, se si ottenevano cambiamenti nelle correlazioni fra veicoli e sorafenib. Nei veicoli la correlazione inversa tra PCNA e p21 rispecchia le loro funzioni principali, dato che PCNA è un marcatore di proliferazione e p21 è un inibitore del ciclo cellulare. Il sorafenib tende a far diminuire i livelli proteici di entrambi i target, maggiormente di PCNA, il che spiega la perdita della correlazione nei campioni degli animali trattati farmacologicamente. Le altre correlazioni osservate verranno prese in considerazione per spiegare meccanismi molecolari non noti, attraverso i quali il sorafenib agisce in un tessuto non tumorale. Studi *in vitro* saranno pertanto necessari per spiegare le correlazioni proteiche osservate nei trattati sorafenib rispetto ai veicoli.

Il nostro è stato uno studio preliminare volto a testare se il sorafenib potesse esibire una nuova funzione, oltre a quella antitumorale.

I risultati ottenuti suggeriscono che il trattamento produce un effetto che potrebbe risultare benefico per la prevenzione di recidive intraepatiche post resezione-chirurgica.

Dato il riscontro positivo che è stato ottenuto da tale studio, è stato proposto di continuare il progetto, attraverso l'utilizzo di un numero maggiore di animali, trattati nelle stesse condizioni sperimentali, che saranno sacrificati più tardivamente, quando l'analisi ecografica evidenzierà lo sviluppo di noduli di HCC. La conclusione del lavoro ci permetterà di comprendere se realmente il sorafenib abbia un effetto nella prevenzione dell'epatocarcinoma cellulare.

6. APPENDICE

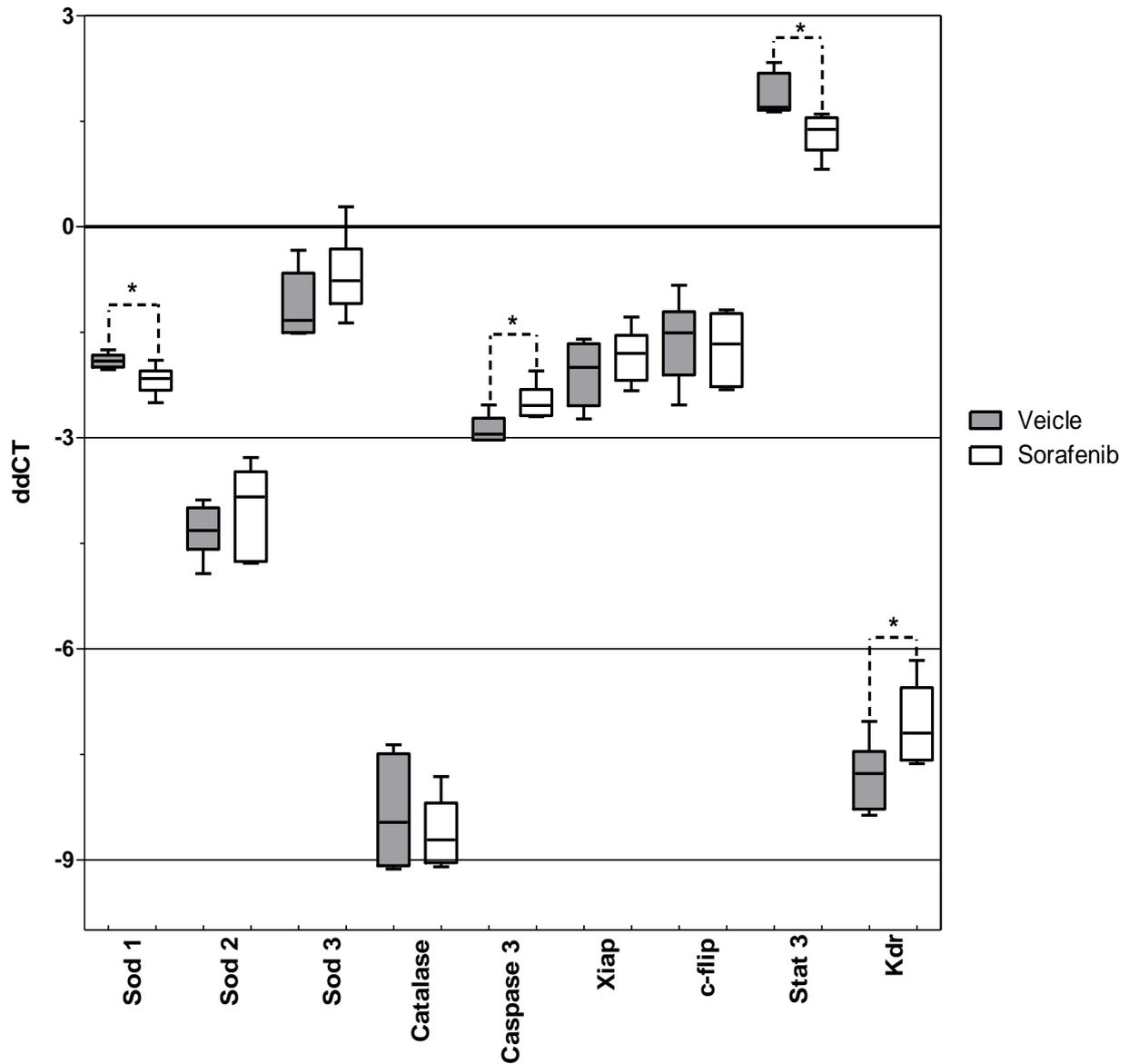


Figura 1. Box plot (Wisker plot) dei dati di real time eseguiti sui geni in analisi.

Per ogni gene sono rappresentati le osservazioni tra il 10 e il 90 percentile (rettangolo), il valore minimo e massimo (linea a T sopra e sotto il rettangolo) la mediana (riga interna al rettangolo). Ogni coppia Veicolo- Trattato sorafenib è stata analizzata singolarmente tramite t-test, i valori di p significativi sono risultati come seguente: Sod 1 $p=0,0135$; Caspasi 3 $p=0,0116$; Stat 3 $p=0,0115$; Kdr $p=0,0398$.

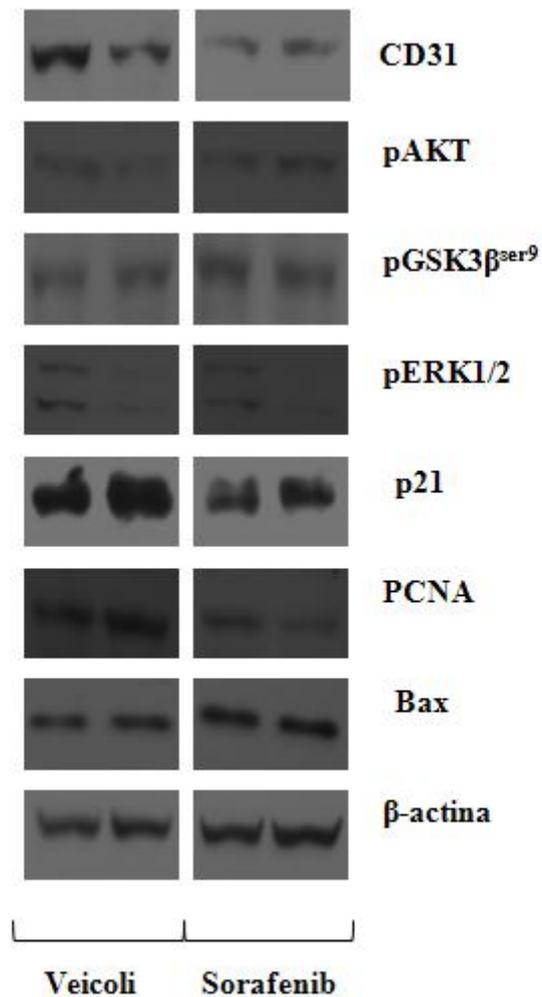


Figura 2. Valutazione dei livelli proteici di target noti del sorafenib e markers apoptotici, angiogeneteci e di proliferazione, mediante western blot.

Vengono mostrati due esempi di veicoli e due di campioni trattati con il sorafenib. Gli estratti proteici sono stati analizzati mediante western blot, utilizzando anticorpi monoclonali/policlonali. La β actina è stata utilizzata come gene di riferimento per la normalizzazione dell'espressione delle diverse proteine.

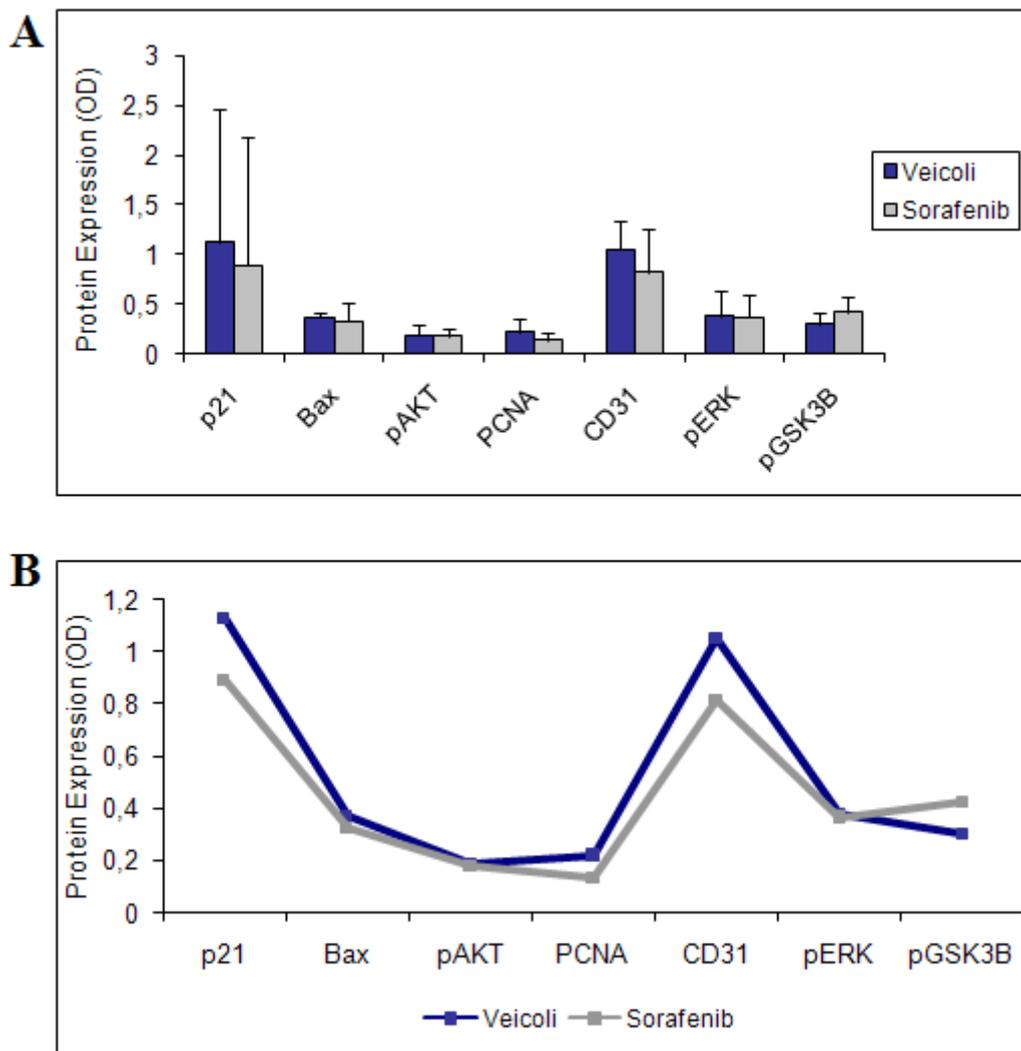
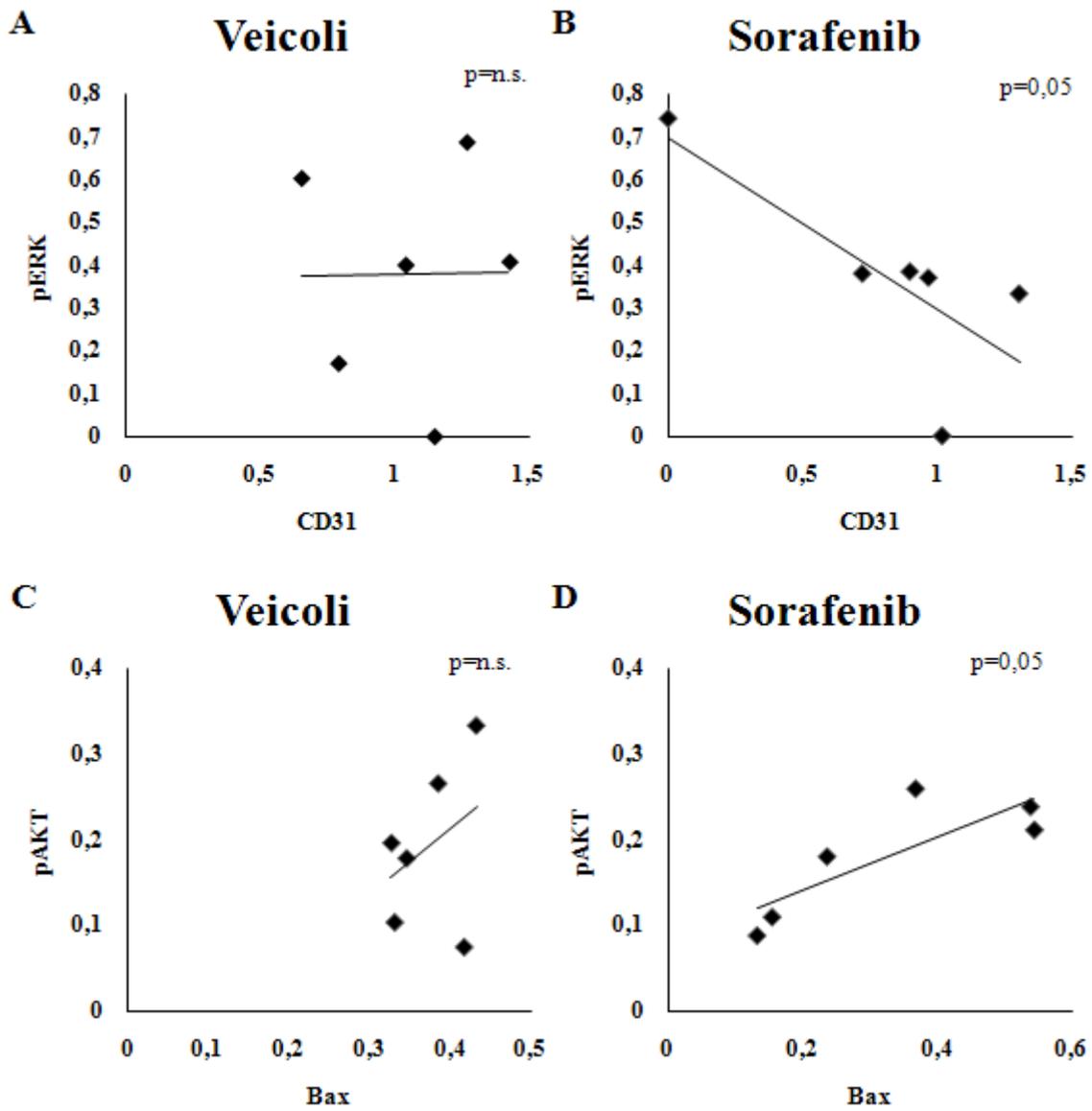
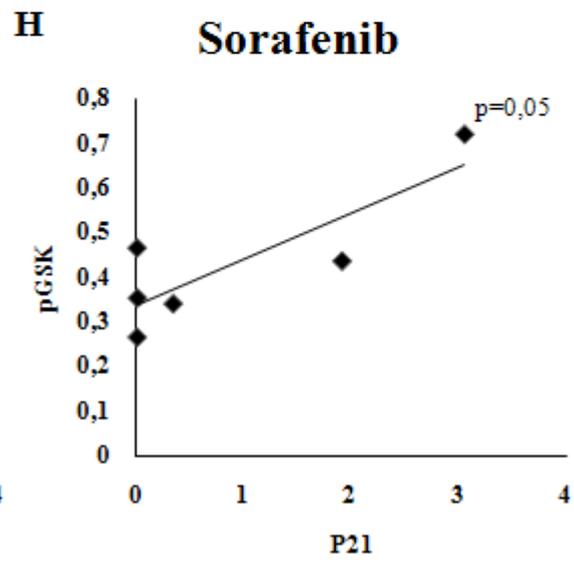
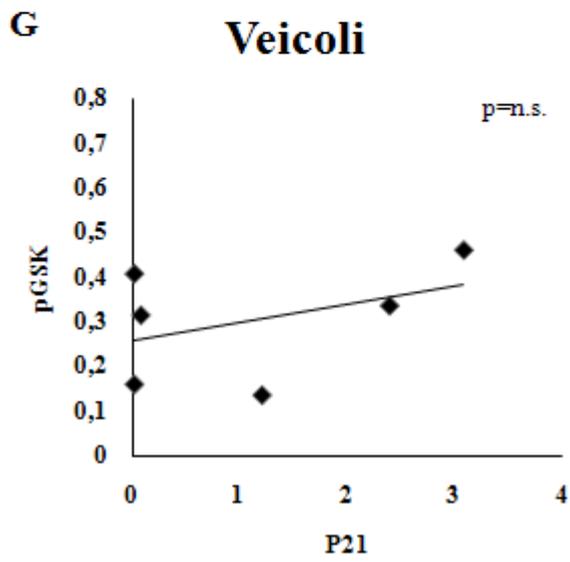
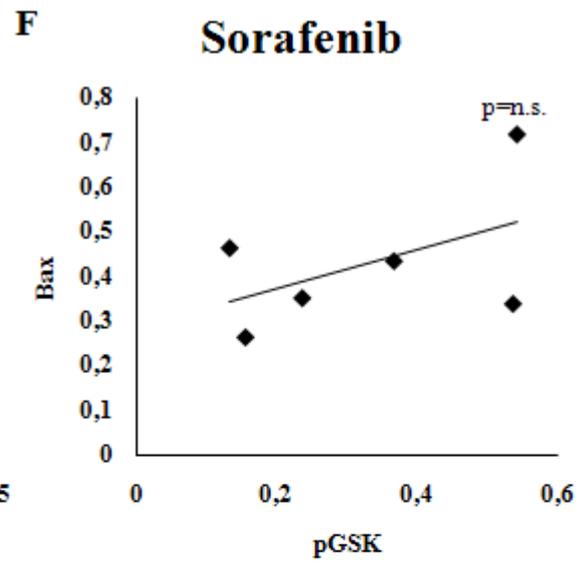
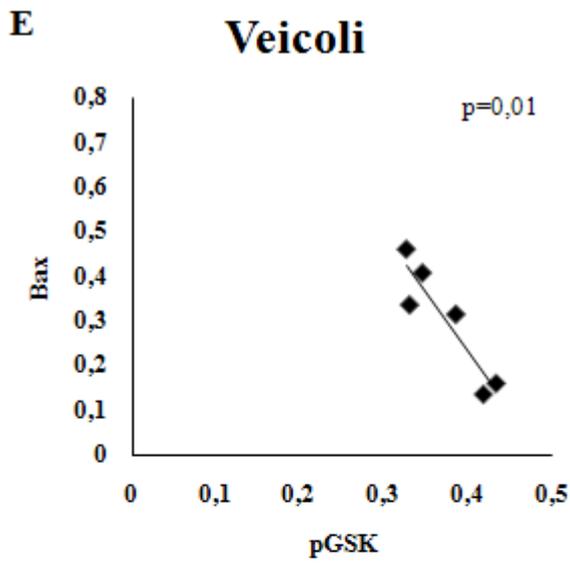


Fig. 3. Effetti antiproliferativi e anti-angiogenetici del sorafenib

Il trattamento con il Sorafenib mostra una tendenza da parte della cellula ad abbassare i livelli di p21 e ad aumentare i livelli di fosforilazione sulla Ser9 di GSK-3 β . Vengono mantenuti inalterati i livelli di pERK, di pAKT e Bax. Si delinea una riduzione di PCNA e di CD31, quali marker di proliferazione e di angiogenesi. Le barre rappresentano l'errore standard (SE).





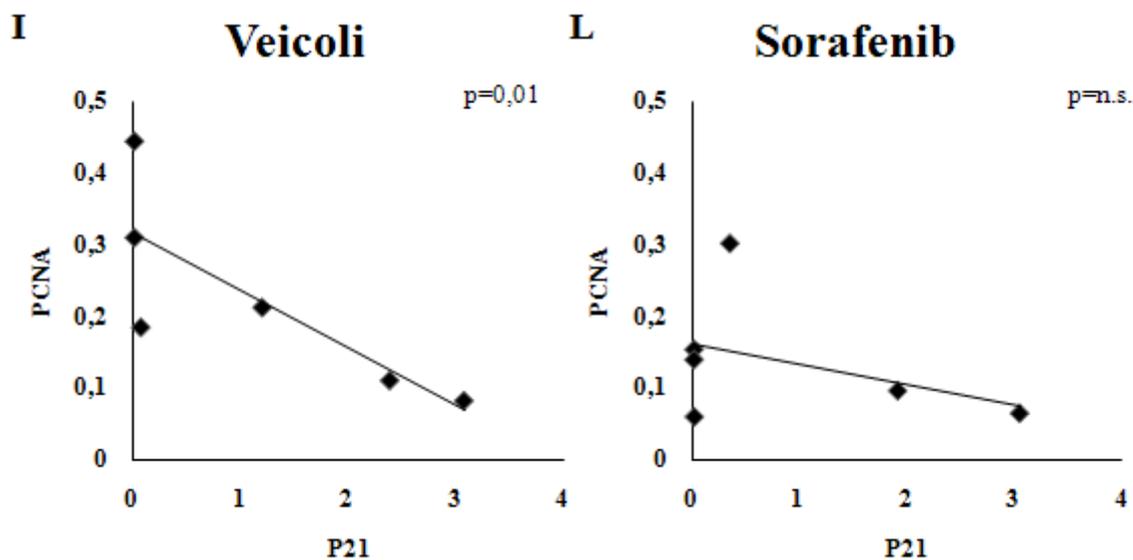


Fig. 4. Analisi di correlazione fra l'espressione delle proteine rilevate mediante western blotting.

In ciascun grafico è riportata la correlazione esistente per ogni coppia di proteine in esame, sia nei trattati con il sorafenib che con il veicolo. L'analisi correlativa è stata effettuata tramite il test di Pearson o il test rho di Spearman, con i valori p riportati su ciascun grafico. Una correlazione significativa è risultata: inversa tra pERK e CD31 nei trattati sorafenib ma non nei veicoli (A e B), diretta tra pAKT e Bax nei trattati sorafenib ma non nei veicoli (C e D), inversa tra pGSK-3B e Bax nei veicoli ma non nei sorafenib (E e F), diretta tra pGSK-3B e p21 nei sorafenib ma non nei veicoli (G e H) e inversa tra PCNA e p21 nei veicoli ma non nei sorafenib (I e L).

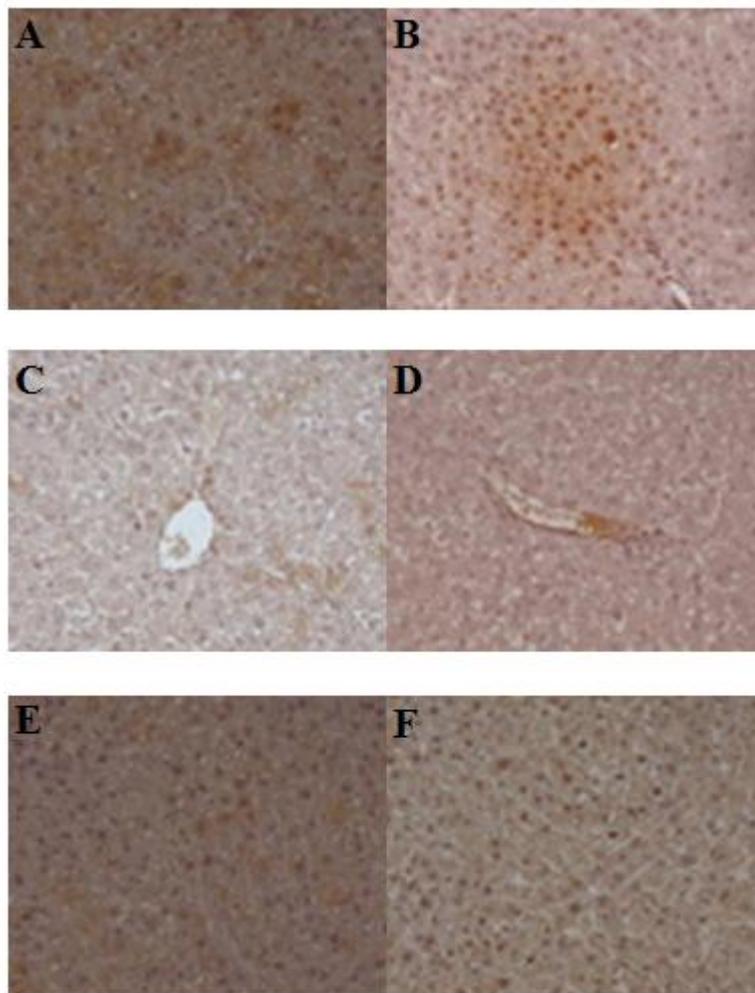


Fig. 5. Valutazione immunoistochimica di pERK

Le immagini mostrate in figura rappresentano le sezioni di fegato di ratto fissate in formalina e incluse in paraffina. L'incubazione con l'anticorpo ha permesso la valutazione dell'espressione di pERK 1/2. La positività è stata valutata con un sistema HRP Envision e la diaminobenzidina usata come cromogeno. Le sezioni sono state contrastate con ematossilina. Le immagini A, C ed E rappresentano esempi di sezioni derivate dal tessuto epatico di ratti ricevuti il veicolo, mentre le immagini B, D ed F di ratti trattati con il sorafenib. Ingrandimento 20X.

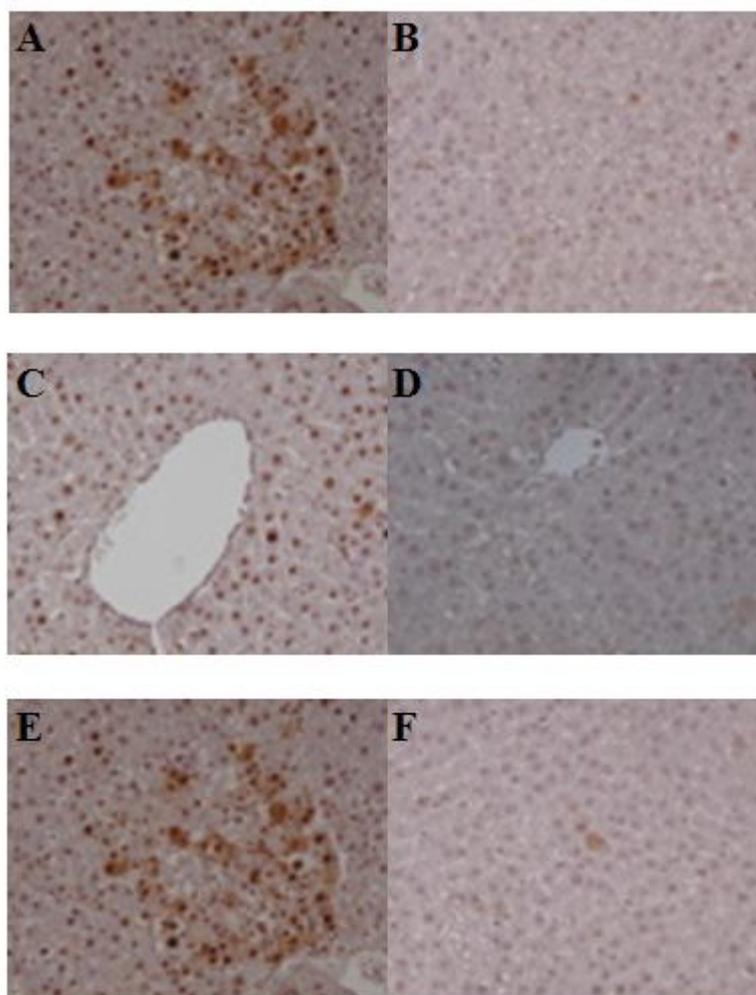


Fig. 6. Valutazione immunoistochimica di PCNA.

Le immagini mostrate in figura rappresentano le sezioni di fegato di ratto fissate in formalina e incluse in paraffina. L'incubazione con l'anticorpo ha permesso la valutazione dell'espressione di PCNA. La positività è stata valutata con un sistema HRP Envision e la diaminobenzidina usata come cromogeno. Le sezioni sono state contrastate con ematossilina. Le immagini A, C ed E rappresentano esempi di sezioni derivate dal tessuto epatico di ratti riceventi il veicolo, mentre le immagini B, D ed F di ratti trattati con il sorafenib. Ingrandimento 20X.

7. BIBLIOGRAFIA

1. World Health Organization, International Agency for Research on Cancer. GLOBOCAN 2008. (<http://globocan.iarc.fr>)
2. **El-Serag HB, Rudolph KL.** Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology* 2007; 132; 2557-76
3. **El-Serag HB, Lechel A, Rudolph KL.** Epidemiology and Molecular mechanisms of Hepatocarcinogenesis. *Zakim and Boyer's Hepatology (Sixth Edition)* 2012;142-156
4. **C Tiribelli, et al.** Prevalence of hepatocellular carcinoma and relation to cirrhosis: comparison of two different cities of the world—Trieste, Italy, and Chiba, Japan. *Hepatology.* 1989;10:998-1002.
5. **Wanget WX et al.** Abrogation of p53-induced apoptosis by the hepatitis B virus X gene. *Cancer Res.* 1995;55:6012-6016.
6. **Cassini R et al.** Il ruolo del virus dell'epatite B (HBV) nell'insorgenza del carcinoma epatico. [<http://www.biomedit.it/rivista/2008-08-25.asp>]
7. **CJ Chen et al.** Hepatitis B virus DNA levels and outcomes in chronic hepatitis B. *Hepatology* 2009;49:S72–S84.
8. **Jiejie X, Xiaojing Y, Jianhai J, et al.** Hepatitis B Virus X Protein Blunts Senescence-Like Growth Arrest of Human Hepatocellular Carcinoma by Reducing Notch1 Cleavage. *Hepatology.* 2010;52(1).
9. **Murakami S.** Hepatitis B virus X protein: structure, function and biology. *Intervirology* 1999;42:81-99.
10. **Kekulé A. S., Lauer U., Weiss L., Luber B., Hofschneider P. H.** Hepatitis B virus transactivator HBx uses a tumor promoter signaling pathway. *Nature* 1993;361:742–745
11. **Lee Y. H., Yun Y.** HBx protein of hepatitis B virus activates Jak1-STAT signaling. *J. Biol. Chem.* 1998;273:25510-25515.

12. **Klein N. P., Schneider R. J.** Activation of Src family kinases by hepatitis B virus HBx protein and coupled signaling to Ras. *Mol. Cell. Biol.*1997;17:6427-6436.
13. **Benn J., Schneider R. J.** Hepatitis B virus HBx protein activates Ras-GTP complex formation and establishes a Ras, Raf, MAP kinase signaling cascade. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1994;91:10350–10354.
14. **Kim, C. M., K. Koike, I. Saito, T. Miyamura, and G. Jay.** HBx gene of hepatitis B virus induces liver cancer in transgenic mice. *Nature* 1991;351:317–320.
15. **Lee SG, Rho HM.** Transcriptional repression of the human p53 gene by hepatitis B viral X protein. *Oncogene* 2000;19:468-471.
16. **Kumar, V., N. Jaysuryan, and R. Kumar.** A truncated mutant (residues 58-140) of the hepatitis B virus X protein retains transactivation function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1996;93:5647–5652.
17. **Wang, X. W., Forrester, K., Yeh, H., Feitelson, M. A., Gu, J. R. & Harris, C. C.** Hepatitis B virus X protein inhibits p53 sequence-specific DNA binding, transcriptional activity, and association with transcription factor ERCC3. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*1994;91:2230-2234.
18. **Arbuthnot P, Capovilla A, Kew M.** Putative role of hepatitis B virus X protein in hepatocarcinogenesis: effects on apoptosis, DNA repair, mitogen-activated protein kinase and JAK/STAT pathways. *J Gastroenterol Hepatol* 2000; 15: 357-368.
19. **Elmore LW, Hancock AR, Chang SF et al.** Hepatitis B virus x protein and p53 tumour suppressor interactions in the modulation of apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 1997;14:707–12.
20. **Wang XW, Forrester K, Yeh H et al.** Hepatitis B virus x protein inhibits p53 sequence-specific binding, transcriptional activity, and association with transcription factor ERCC3. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 1994;15:2230–4.
21. **Szabó E, Lotz G, Páska C et al:** Viral hepatitis: New data on hepatitis C. *Pathol Oncol Res* 2003;9:215-221.

22. **Lin C.B, Lindenbach B, Pragai D. W, et al.** Processing of the hepatitis C virus E2-NS2 region: identification of p7 and two distinct E2-specific products with different C termini. *J. Virol.* 1994;68:5063-5073.
23. **Kazuhiko Koike.** Hepatitis C virus contributes to hepatocarcinogenesis by modulating metabolic and intracellular signaling pathway. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 2007;22 Suppl.1; S108–S111.
24. **Koike K, Moriya K, Ishibashi K et al.** Expression of hepatitis C virus envelope proteins in transgenic mice. *J. Gen. Virol.* 1995; 76:3031–8.
25. **Moriya K, Nakagawa K, Santa T et al.** Oxidative stress in the absence of inflammation in a mouse model for hepatitis C virus-associated hepatocellular carcinogenesis. *Cancer Res.* 2001;61:4365-70.
26. **Tsutsumi T, Suzuki T, Moriya K et al.** Intrahepatic cytokine expression and AP-1 activation in mice transgenic for hepatitis C virus core protein. *Virology* 2002;304:415–24.
27. **Tsutsumi T, Suzuki T, Shimoike T et al.** Interaction of hepatitis C virus core protein with retinoid X receptor- α modulates its transcriptional activity. *Hepatology* 2002;35:937-46.
28. **Tsutsumi T, Suzuki T, Moriya K et al.** Hepatitis C virus core protein activates ERK and p38 MAPK in cooperation with ethanol in transgenic mice. *Hepatology* 2003;38:820-8.
29. **Munakata T, Liang Y, Kim S, McGivern DR, Huibregtse JM, Nomoto A et al.** Hepatitis C virus induces E6AP-dependent degradation of the retinoblastoma protein. *PLoS Pathog* 2007;3: 1335-1347.
30. **Munakata T, Nakamura M, Liang Y, Li K, Lemon SM.** Down-regulation of the retinoblastoma tumor suppressor by the hepatitis C virus NS5B RNA-dependent RNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:18159-18164.
31. **DR McGivern and SM Lemon.** Virus-specific mechanisms of carcinogenesis in hepatitis C virus associated liver cancer.. *Oncogene* 2011;30:1969-1983.
32. **Park CY, Choi SH, Kang SM, Kang JI, Ahn BY, Kim H et al.** Nonstructural 5A protein activates beta-catenin signaling cascades: implication of hepatitis C virus-induced liver pathogenesis. *J Hepatol* 2009;51:853-864.

33. **Milward A, Mankouri J, Harris M.** Hepatitis C virus NS5A protein interacts with beta-catenin and stimulates its transcriptional activity in a phosphoinositide-3 kinase-dependent fashion. *J Gen Virol* 2010;91:373-381.
34. **Lanford RE, Hildebrandt-Eriksen ES, Petri A, Persson R, Lindow M, Munk ME et al.** Therapeutic silencing of microRNA-122 in primates with chronic hepatitis C virus infection. *Science* 2010;327:198-201.
35. **Norman KL, Sarnow P.** Modulation of hepatitis C virus RNA abundance and the isoprenoid biosynthesis pathway by microRNA miR-122 involves distinct mechanisms. *J Virol* 2010;84:666-670.
36. **Bressac B, Kew M, Wands J, et al.** Selective G to T mutations of p53 gene in hepatocellular carcinoma from southern Africa. *Nature* 1991;350:429-431.
37. **K. G. Murugavel et al.** Prevalence of aflatoxin B1 in liver biopsies of proven hepatocellular carcinoma in India determined by an in-house immunoperoxidase test. *Journal of Medical Microbiology* 2007;56,1455-1459.
38. **Snorri S Thorgeirsson et al.** Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. *Nature Genetics* 2002;31:339-346.
39. **Pinzani M et al.** Liver Cirrhosis Best Practice and Research Clinical Gastroenterology 2011;25:281-290
40. **.Lu Miao, Daret K St. Clair.** Regulation of superoxide dismutase genes: Implications in disease. *Free Rad Biomed* 2009;47:344-356
41. **Salvi et al.** Catalase takes part in rat liver mitochondria oxidative stress defense. *J Biol Chem* 2007;282(33):24407-24415
42. **Szaleczky E et al.** Alterations in enzymatic antioxidant defence in diabetes mellitus-a rational approach. *Postgrad Med J* 1999;75:13-17
43. **Levent G et al.** Oxidative stress and antioxidant defense in patients with chronic hepatitis C patients before and after pegylated interferon alfa-2b plus ribavirin therapy. *J Translational Med* 2006;4:25

44. **Zouki C, József L, Ouellet S, Paquette Y, Filep JG.** Peroxynitrite mediates cytokine-induced IL-8 gene expression and production by human leukocytes..J Leukoc Biol. 2001;69(5):815-24.
45. **Jackson JR et al.** The codependence of angiogenesis and chronic inflammation. FASEB J 1997;11:457-65.
46. **Inoue S. et al.** Oxidative DNA damage induced by simultaneous generation of nitric oxide and superoxide. FEBS Lett 1995;371:86-88.
47. **Kowaltowski AJ et al.** Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. Free Radic Biol Med 1999;26:463-71.
48. **Blair IA.** Lipid hydroperoxide-mediated DNA damage. Exp Gerontol 2001;36:1473-81.
49. **Kuhn H et al.** Regulation of enzymatic lipid peroxidation: the interplay of peroxidizing and peroxide reducing enzymes. Free Radic Biol Med 2002;33:154-72.
50. **RR Plentz et al.** Telomere shortening and inactivation of cell cycle checkpoints characterize human hepatocarcinogenesis. Hepatology 2007;45:968-976.
51. **RR Plentz et al.** Hepatocellular telomere shortening correlates with chromosomal instability and the development of human hepatoma. Hepatology 2004;40:80-86.
52. **Grisham J W.** Molecular genetic alterations in primary hepatocellular neoplasms: hepatocellular adenoma, hepatocellular carcinoma and hepatoblastoma. In The Molecular Basis of Human Cancer 2001;269-346.
53. **Saito Y. et al.** Expression of mRNA for DNA methyltransferases and methyl-CpG-binding proteins and DNA methylation status on CpG islands and pericentromeric satellite regions during human hepatocarcinogenesis. Hepatology 2001;33:561-568.
54. **Kaneto H. et al.** Detection of hypermethylation of the p16^{INK4A} gene promoter in chronic hepatitis and cirrhosis associated with hepatitis B or C virus. Gut 2001;48:372-377.
55. **HE van Gijssel et al.** p53 protein expression by hepatocarcinogenesis in the rat liver and its potential role in mitoinhibition of normal hepatocytes as a mechanism of hepatic tumor promotion. Carcinogenesis 1997;18:1027-1033

56. **Hashem B, El-Serag, M. D., M.P.H.** Hepatocellular Carcinoma. Current Concepts. New England J Med 2011;365:1118-27.
57. **Simonetti RG et al.** Treatment of hepatocellular carcinoma: a systematic review of randomized controlled trials. Ann Oncol 1997;8:117-36.
58. **Llovet et al.** Design and Endpoints of Clinical Trials in Hepatocellular Carcinoma. J Natl Cancer Inst 2008;100(10):698-711
59. **Rahbari NN et al.** Clamp-Crushing versus stapler hepatectomy for transection of the parenchyma in elective hepatic resection (CRUNSH) – A randomized controlled trial (NCT01049607) BMC Surgery 2011 11:22
60. **Tsang WP, Kwok TT.** Riboregulator H19 induction of MDR1-associated drug resistance in human hepatocellular carcinoma cells. Oncogene 2007;26:4877-81
61. **Okada Y, Tosaka A, Nimura Y et al.** Atypical multidrug resistance may be associated with catalytically active mutants of human DNA topoisomerase II alpha. Gene (Amst) 2001;272:141-8.
62. **Whittaker S et al.** The role of signaling pathways in the development and treatment of hepatocellular carcinoma. Oncogene 2010;29:4989–5005
63. **Chen YL, Law PY, Loh HH.** Inhibition of PI3K/Akt signaling: an emerging paradigm for targeted cancer therapy. Curr Med Chem Anticancer Agents 2005;5:575–589.
64. **Hwang YH, Choi JY, Kim S, et al.** Over-expression of c-raf-1 proto-oncogene in liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. Hepatol Res. 2004; 29: 113–21
65. **Gollob JA, Wilhelm S, Carter C, et al.** Role of Raf kinase in cancer: therapeutic potential of targeting the Raf/MEK/ERK signal transduction pathway. Semin Oncol 2006;33:392-406
66. **Alexia C, Falot G, Lasfer M, Schweizer-Groyer G, Groyer A.** An evaluation of the role of insulin-like growth factors (IGF) and of type-I IGF receptor signalling in hepatocarcinogenesis and in the resistance of hepatocarcinoma cells against drug-induced apoptosis. Biochem Pharmacol 2004;68:1003-1015.

67. **Poon RT, Ho JW, Tong CS, Lau C, Ng IO, Fan ST.** Prognostic significance of serum vascular endothelial growth factor and endostatin in patients with hepatocellular carcinoma. *Br J Surg* 2004a;91:1354-1360.
68. **Poon RT, Lau C, Yu WC, Fan ST, Wong J.** High serum levels of vascular endothelial growth factor predict poor response to transarterial chemoembolization in hepatocellular carcinoma: a prospective study. *Oncol Rep* 2004b;11:1077-1084.
69. **Keating GM and Santoro A.** Sorafenib. A review of its use in hepatocellular carcinoma. *Drugs* 2009;10:25-34.
70. **Abou-Alfa GK, Sshwartz L, Ricci S et al.** Phase II study of sorafenib in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *J Clin Oncol* 2006;24:4293-300.
71. **Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V et al.** Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 2008;359:378-90.
72. **Wilhelm SM, Carter C, Tang L 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;64:7099-109.
73. **Wilhelm SM, Lila Adnane, Philippa N, et al.** Preclinical overview of sorafenib, a multikinase inhibitor that targets both Raf and VEGF and PDGF receptor tyrosine kinase signaling. *Mol Cancer Ther* 2008;7:3129-3140.
74. **Wan PT, Garnett MJ, Roe SM, et al.** Mechanism of activation of the Raf/ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-Raf. *Cell* 2004;116:855-67.
75. **Yu C, Bruzek LM, Meng XW et al.** The role of Mcl-1 downregulation in the proapoptotic activity of the multikinase inhibitor BAY 43-9006. *Oncogene* 2005;24:6861-9.
76. **Zhang Z, Zhou X, Shen H et al.** Phosphorylated ERK is a potential predictor of sensitivity to sorafenib when treating hepatocellular carcinoma: evidence from an in vitro study. *BMC Medicine* 2009;7:41.
77. **Andrei X Zhu.** Predicting the response to Sorafenib in hepatocellular carcinoma: where is the evidence for phosphorylated extracellular signaling-regulated kinase (pERK)?. *BMC Medicine* 2009;7:42.

78. **Caraglia M, Giuberti G, Marra M, et al.** Oxidative stress and ERK1/2 phosphorylation as predictors of outcome in hepatocellular carcinoma patients treated with sorafenib plus octreotide LAR. *Cell Death and Disease*.2011;150:1-7.
79. **Hui-Chuan Sun, Zhao-You Tang.** Preventive treatments for recurrence after curative resection of hepatocellular carcinoma - A literature review of randomized control trials. *World J Gastroenterol* 2003;9(4):635-640.
80. **Long Wu, Zhao-You Tang, Yan Li.** Experimental models of hepatocellular carcinoma: developments and evolution. *J Cancer Res Clin Oncol* 2009;135:969-981.
81. **Frese and Tuveson.** Maximizing mouse cancer models. *Nature Reviews Cancer* 2007;7:654-658
82. **Verna L, Whysner J, Williams GM.** N-Nitrosodiethylamine Mechanistic Data and Risk Assessment: Bioactivation, DNA-Adduct Formation, Mutagenicity and Tumor Initiation. *Pharmacol Ther* 1996;71:57-81.
83. **Richardson FC et al.** Differential repair of O⁴-alkylthymidine following exposure to methylating and ethylating hepato-carcinogens. *Carcinogenesis* 1985;6:625-629.
84. **Wang Y et al.** New insights into the antifibrotic effects of sorafenib on hepatic stellate cells and liver fibrosis. *J Hepatology* 2010;53(1):132-144.
85. **Haga, S., et al.** Stat3 protects against Fas-induced liver injury by redox-dependent and -independent mechanisms. *J.Clin. Invest.*2003;112:989–998
86. **Gish RG.** Hepatocellular carcinoma : Overcoming Challenges in Disease Management *Clin Gastroenter and Hepatology* 2006;4:252-261
87. **Thomas M.** Molecular targeted therapy for hepatocellular carcinoma *J Gastroenterology* 2009;44(S19):136-141).
88. **Oberley LW** Anticancer Therapy by Overexpression of Superoxide Dismutase Antioxidants & Redox Signaling. 2001, 3(3): 461-472
89. **Columbano et al.** Requirement of Cell Proliferation for the Initiation of Liver Carcinogenesis as Assayed by Three Different Procedures *Cancer Research* 1981;41:2079

90. **Cayama et al.** Initiation of chemical carcinogenesis requires cell proliferation. *Nature* 1978;275:60-62
91. **Craddock.** Induction of Liver Cell Adenomata in the Rat by a Single Treatment with N-Methyl-N-Nitrosourea given at Various Times after Partial Hepatectomy. *Br J Cancer.* 1974;30(6):503–511
92. **Pitot et al.** Biochemical characterisation of stages of hepatocarcinogenesis after a single dose of diethylnitrosamine. *Nature* 1978;271:456-458
93. **Schulte-Hermann et al.** Role of active cell death (apoptosis) in multi-stage carcinogenesis *Toxicology Letters* 1995;82-83:143-148
94. **Park YN et al.** Increased expression of vascular endothelial growth factor and angiogenesis in the early stage of multistep hepatocarcinogenesis. *Arch Pathol Lab Med.* 2000;124:1061-5
95. **Liu RH et al.** Elevated Formation of Nitrate and N-Nitrosodimethylamine in Woodchucks (*Marmota monax*) Associated with Chronic Woodchuck Hepatitis Virus Infection. *Cancer Research* 1991;51:3925

RINGRAZIAMENTI

I ringraziamenti più sentiti vanno ai miei genitori, a mia sorella e mio fratello, le persone che, in ogni momento della mia vita, mi hanno sostenuto, incoraggiato e criticato quando dovevano. Ringrazio con affetto la mia seconda famiglia e le mie nonne.

Ringrazio la dottoressa Catia Giovannini, che ha guidato i miei primi passi nel mondo della ricerca, confidando sempre nelle mie capacità. La ringrazio per la dolcezza dimostratami e per il suo rigore nell'ambito lavorativo.

Desidero ringraziare il professor Luigi Bolondi, relatore della mia tesi, e la dottoressa Laura Gramantieri per la loro infinita disponibilità e gentilezza.

Non potrei non ringraziare l'intero gruppo di ricerca, che mi ha accolto da subito con tanto affetto: il dottor Michele Baglioni, la dottoressa Maddalena Milazzo, la dottoressa Francesca Fornari e il dottor Cristiano Ventrucci. In particolar modo un ringraziamento speciale va alla dottoressa Manuela Minguzzi per avermi trasmesso la sua incondizionata passione per questo lavoro.

Un grazie al dottor Pasquale Chieco, direttore del CRBA, che ha accettato la mia richiesta di entrare a far parte di una vera e propria famiglia.

Ringrazio in ultimo tutti coloro che mi hanno accompagnato in questi anni universitari rendendoli speciali e indimenticabili.

GRAZIE